



CEMOVIS, développements méthodologiques et étude ultrastructurale de la cellule HT29 : De la cellule aux nucléosomes

Nicolas Lemerrier

► To cite this version:

Nicolas Lemerrier. CEMOVIS, développements méthodologiques et étude ultrastructurale de la cellule HT29 : De la cellule aux nucléosomes. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114812 . tel-00685425

HAL Id: tel-00685425

<https://theses.hal.science/tel-00685425>

Submitted on 10 Apr 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

DISCIPLINE :

Biologie Cellulaire et Moléculaire

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1163

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 23/03/2012

par

Nicolas LEMERCIER

**CEMOVIS : Développements méthodologiques et
étude ultrastructurale de la cellule HT29.
-De la cellule aux nucléosomes-**

Directeur de thèse :

Françoise LIVOLANT

Directeur de Recherche CNRS (LPS Orsay)

Co-directeur de thèse :

Amélie LEFORESTIER

Chargé de Recherche CNRS (LPS Orsay)

Composition du jury :

Rapporteurs :

Denis CHRETIEN

Directeur de Recherche CNRS (Université de Rennes 1)

Benoît ZUBER

Senior Assistant (Université de Bern)

Examineur :

Jean-Jacques LACAPERE

Directeur de Recherche CNRS (Université Paris-Diderot)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, Denis Chrétien et Benoît Zuber qui ont accepté de juger ce travail et à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de participer à cette soutenance.

Je remercie aussi Dominique Chandesris pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Physique des Solides.

Mes remerciements vont naturellement vers ma directrice de thèse Françoise Livolant qui m'a accepté au sein de son équipe et m'a conseillé au long de ces trois années. Merci à elle de m'avoir aidé à réaliser ce travail en dépit des nombreux aléas de matériel que nous avons connu, d'avoir soutenu mes baisses de moral et le découragement qui s'installe parfois devant l'adversité. Même si nous n'avons toujours réussi à bien nous comprendre, j'ai été content de travailler avec toi et j'ai beaucoup appris.

Je souhaite bien sûr remercier ma co-directrice de thèse Amélie Leforestier qui a eu la lourde tâche d'apprendre le CEMOVIS à quelqu'un qui manque cruellement de confiance en lui. C'est très difficile de tirer des rubans de coupes en tremblant ! Ce défaut est parti aujourd'hui, merci à elle de m'avoir formé à cette technique très difficile mais aussi très élégante et satisfaisante.

Merci également à Guillaume Tresset, Jéril Degrouard et Yves Lansac pour les discussions intéressantes et le soutien moral qu'ils m'ont apporté au long de ces trois années. Nous n'avons pas travaillé ensemble au cours de cette thèse mais j'espère que cela se fera un jour.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation des films supports pour les grilles.

Je pense bien sûr à Hélène Raffy qui a eu la gentillesse de me faire partager un peu de sa connaissance pour essayer de préparer ces films dans les meilleures conditions. Merci aussi à Claude Pasquier et Pascale Senzier pour le prêt de l'évaporateur pour les sous-couches organiques et à toute l'équipe Méso (LPS) qui m'a prêté son évaporateur pour préparer les couches métalliques.

Merci également à Alain Girard (ICMPE) qui a eu la gentillesse de passer des journées avec moi pour couper l'alliage (plus d'une heure par tranche !). Je lui en suis reconnaissant.

Je remercie également la Plate-forme de microscopie ultrastructurale de l'Institut Pasteur où j'ai réalisé la plupart des images de ce manuscrit. L'accueil chaleureux qui m'a été fait était très agréable. Une mention spéciale pour Gérard Pehau-Arnaudet qui m'a beaucoup appris aussi en microscopie et avec qui j'ai eu des discussions des plus intéressantes. Son aide, ses encouragements et son amitié m'ont beaucoup soutenu durant ces trois ans.

Katia March m'a permis de caractériser mes films par EELS avec son efficacité et sa gentillesse habituelle. Je tiens à l'en remercier chaleureusement.

Merci également à tous ceux qui m'ont fourni la matière première pour ces travaux : les modèles biologiques. Les différents essais n'ont pas tous été heureux mais nous sommes tous de même parvenu à trouver un modèle qui réponde aux exigences principales de cette méthode. Merci à Arach Goldar pour les levures, Anne-Marie Tassin pour les essais sur les KE37, Anne Fleury pour les euglènes.

Je tiens aussi à remercier bien sûr Jean-Jacques Lacapère et Leeyah Issop qui m'ont gentiment fourni des cellules HT29 en abondance et sont même venus assister aux congélations pour s'assurer que tout se passe dans les meilleures conditions. Ces cellules ont donné la plupart des images décrites dans ce manuscrit, merci à vous.

Merci également aux services mécanique et instrumentation qui m'ont apporté un soutien efficace, en particulier Vincent Klein et Sambath Saranga pour les réparations effectuées sur la chambre de coupe qui m'ont permis de continuer à travailler.

Je remercie également Mickaël Pelloux pour le développement du micromanipulateur (très efficace !) et l'atelier mécanique qui a toujours su répondre à mes problèmes avec efficacité, rapidité (et le sourire). Mes pensées vont aussi à Jean-Louis Signoret qui s'est donné beaucoup de mal pour réaliser la pince de ce micromanipulateur.

Merci à tous ceux que j'ai approchés de près ou de loin pendant ces trois années au sein du Laboratoire, votre contact fut très agréable et enrichissant.

J'adresse aussi mes remerciements à mes parents et ma sœur qui ont soutenus les moments difficiles et m'ont permis d'arriver jusqu'ici.

Table des matières

<i>Introduction générale.....</i>	<i>4</i>
<i>Chapitre I Etat de l'art.....</i>	<i>9</i>
<i>I- De la molécule d'eau aux sections vitreuses.....</i>	<i>11</i>
<i>1- L'eau : une molécule fondamentale en biologie.....</i>	<i>11</i>
<i>A- Rappels sur la molécule d'eau.....</i>	<i>11</i>
<i>B- L'eau sous différentes formes.....</i>	<i>13</i>
<i>C- L'eau dans les cellules.....</i>	<i>15</i>
<i>2- Conserver l'échantillon hydraté en MET : la cryomicroscopie.....</i>	<i>18</i>
<i>A- Vitrifier l'échantillon.....</i>	<i>18</i>
<i>B- Les cryosections hydratées-congelées ou CEMOVIS (Cryo-electron Microscopy Of Vitreous Sections).....</i>	<i>24</i>
<i>C- Observation des objets biologiques par cryomicroscopie.....</i>	<i>28</i>
<i>1. Rappels sur la formation de l'image en cryo-microscopie.....</i>	<i>28</i>
<i>2. La Fonction de Transfert de Contraste (FTC).....</i>	<i>31</i>
<i>3. Dégâts d'irradiation et conditions d'acquisition des images.....</i>	<i>33</i>
<i>3- Apport du CEMOVIS à la connaissance de l'organisation des molécules biologiques.....</i>	<i>33</i>
<i>A- Organisation moléculaire de la cellule.....</i>	<i>34</i>
<i>B- Assemblages supramoléculaires in vitro.....</i>	<i>36</i>
<i>II- Organisation de la chromatine dans les noyaux.....</i>	<i>38</i>
<i>1- L'ADN : support de l'information génétique.....</i>	<i>38</i>
<i>2-Association de l'ADN et des protéines histones.....</i>	<i>39</i>
<i>A- Les histones.....</i>	<i>39</i>
<i>B- La particule cœur de nucléosome (NCP).....</i>	<i>40</i>
<i>C- Les modèles basés sur des études in vitro.....</i>	<i>43</i>
<i>1. La fibre de 30nm.....</i>	<i>43</i>
<i>2. Phases denses de nucléosomes purifiés.....</i>	<i>47</i>
<i>3. Limites de ces approches in vitro.....</i>	<i>49</i>
<i>3-Comment s'organise la chromatine au sein du noyau.....</i>	<i>50</i>
<i>A- Les territoires chromosomiques.....</i>	<i>50</i>
<i>B- Un modèle d'organisation multi-échelle : un objet fractal.....</i>	<i>51</i>
<i>C- Analyse ultrastructurale de la chromatine.....</i>	<i>53</i>
<i>III-Objectifs de la thèse.....</i>	<i>58</i>

Chapitre II Matériels et Méthodes..... 60

1-Matériels biologiques.....	62
A-Levures (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	62
B-Lignée lymphocytaire : les cellules KE37.....	63
C-Lignée cancéreuse colique humaine : les cellules HT29.....	63
D-algues unicellulaires : les Euglènes.....	63
2-Vitrification des échantillons biologiques.....	64
A-Préparation du cryoprotectant.....	64
B-Concentration des cellules : préparation des culots.....	64
C-Congélation par « Slam-freezing ».....	65
3-Préparation des sections.....	67
A-Sélection et mise en place des échantillons dans le microtome.....	67
B-Taille de la pyramide.....	68
C-Confection des cryosections.....	69
D-Adhésion des coupes sur les grilles.....	72
4-Observation en cryomicroscopie.....	73
5-Analyse des images.....	75
A-Numérisation des négatifs.....	75
B-Filtre Passe-Bande.....	76
C-Correction de la fonction de transfert de contraste (FTC).....	76
1. Acquisition du Spectre de Puissance.....	76
2. Correction de la fonction de transfert de contraste.....	77
a-Inversion des phases.....	77
b-Filtrage de Wiener.....	78

Chapitre III Résultats..... 80

I- Développements méthodologiques..... 82

1-Développement d'un micromanipulateur.....	82
A- Description du micromanipulateur.....	82
B- Comparaison au modèle commercial.....	85
C- Les améliorations à apporter.....	86
2-Vers de nouveaux supports pour l'adhésion des cryosections.....	87
A-Problématique.....	87
1. Introduction.....	87
2. Instabilité des coupes sous le faisceau.....	87
3. Test d'adhésion des coupes sur leur support.....	89
4. Identification des problèmes rencontrés avec les supports carbone....	90
5. Vers le développement d'un nouveau film support.....	91
B-Matériels et Méthodes.....	92
1. Préparation des alliages de TiSi.....	92
2. Conditions d'évaporation de l'alliage.....	93
3. Choix d'un matériau pour le dépôt d'un film de TiSi.....	94

4. Microscopie électronique et spectroscopie de pertes d'énergie.....	97
C-Résultats.....	97
1. Aspects des films métalliques préparés sur trois supports différents...	99
2. Caractérisation chimique du film par spectroscopie EELS.....	101
3. Cartographie chimique du film de TiSi.....	104
4. Test d'adhésion des coupes sur le film métallique.....	106
D-Discussion-Conclusion.....	107
1. Composition du film métallique formé par évaporation de $Ti_{88}Si_{12}$...	107
2. Interactions mises en jeu pour stabiliser la coupe sur son support.....	108
 II- Analyse des structures biologiques par CEMOVIS.....	 111
1-Choix du matériel biologique.....	111
A-Levures : <i>S.cerevisiae</i>	111
B-Cellules KE37.....	114
C-Euglènes.....	114
D-HT29.....	115
2-Présentation de la cellule HT29.....	116
3-Structure de la chromatine au sein du noyau.....	128
A- Description générale du noyau.....	128
B- Projections théoriques de particules cœur de nucléosomes.....	131
C-Identification de structures compatibles avec les nucléosomes.....	133
D-Tests à l'aveugle.....	136
E-Analyse des NCPs en solution.....	138
F-Discussion.....	143
 Discussion Générale.....	 148
Bibliographie.....	153
Annexe : Systèmes membranaires.....	169

Introduction

Dans les cellules eucaryotes, chaque chromosome correspond à une molécule d'ADN condensé dans une région déterminée du noyau appelée territoire chromosomique (chapitre I). Chaque molécule d'ADN est associée à des protéines basiques appelées histones pour constituer une structure périodique, la fibre nucléosomique qui avec d'autres protéines, s'organise en un édifice complexe, la chromatine. La question de l'agencement de cette fibre au sein des territoires chromosomiques est essentielle car elle implique une accessibilité plus ou moins grande des complexes protéiques chargés de l'expression des gènes (transcription, épissage). L'expression de certains gènes en fonction du type cellulaire et de son état de différenciation ainsi que la régulation spatio-temporelle de cette expression dépendent donc directement de cette accessibilité et donc de l'organisation structurale de la chromatine.

Depuis les années 1990, le développement de la biologie moléculaire et de la génétique ont apporté beaucoup d'information sur les mécanismes de lecture des gènes. La concentration de l'ADN dans les cellules est élevée, entre 50 et 250 mg/mL, ce qui implique une forte compacité et suppose une régulation fine de la structure pour permettre d'atteindre ces concentrations en permettant l'expression de certains gènes. Cette question a fait l'objet depuis les années 1970 de nombreux travaux de biologie structurale et de microscopie électronique en particulier, pour tenter de comprendre comment l'expression ou non de certains gènes est corrélée à la structure de la chromatine.

La plupart des études, réalisées *in vitro* ont abouti à la proposition d'un modèle d'organisation supramoléculaire de la fibre de 11nm pour former de superstructures de 30nm qui s'organisent ensuite pour former des structures de plus grande taille jusqu'au territoire chromosomique ou au chromosome métaphasique. Lorsque les techniques d'études des échantillons hydratés par cryomicroscopie ont été mises au point au début des années 1980, les études structurales sont devenues plus intéressantes à réaliser en raison de la conservation de l'état natif possible avec cette approche. La technique de CEMOVIS (Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections) permettait d'étudier l'organisation de la chromatine directement au sein des noyaux avec une préservation optimale de l'échantillon. Cette approche présentait en outre l'avantage d'étudier la chromatine avec l'ensemble des partenaires protéiques dans le noyau (histones de liaisons, lamines...) souvent absentes des études *in vitro* et dans une gamme de concentration compatible avec les conditions rencontrées *in vivo*.

Peu de travaux ont été réalisés sur les noyaux de cellules avec cette technique en raison de sa grande difficulté de mise en œuvre. Ce n'est que récemment que le CEMOVIS a connu des progrès significatifs pour permettre l'acquisition reproductible de coupes de qualité. Les

travaux de McDowall et al (1986) et Eltsov et al (2008) n'ont pas permis de mettre en évidence de superstructures de 30 nm ou plus au sein des chromosomes métaphasique de lignées cellulaires en cultures. Les mêmes observations ont été faites sur la chromatine interphasique (Bouchet-Marquis et al, 2006). Ces travaux remettent fortement en question l'organisation de la chromatine en fibre de 30 nm admise jusqu'alors et ont conduit à la proposition d'une organisation de la chromatine en une structure désordonnée à grande échelle, proche de celle d'un liquide. Notons par ailleurs que ces travaux n'ont pas non plus permis de visualiser clairement les nucléosomes.

La compréhension de l'organisation de la chromatine au sein des noyaux implique de pouvoir reconnaître les « perles du collier » de 11 nm, c'est à dire les nucléosomes et de les orienter les uns par rapport aux autres. Avant mon arrivée dans l'équipe, une étude exhaustive de l'organisation de particules cœurs de nucléosomes purifiées en phase dense a été réalisée, montrant une organisation cristalline liquide. Les concentrations en nucléosomes, proches de celles rencontrées dans les noyaux laissaient penser que ce type de structure pourrait exister, au moins localement dans les noyaux. Cette hypothèse est à l'origine de ce sujet de thèse sur la structure de la chromatine eucaryote *in situ* par CEMOVIS.

Notre objectif principal était de montrer qu'il est possible de visualiser des nucléosomes de manière reconnaissable dans les noyaux si les conditions d'imagerie sont adéquates. Notre approche diffère grandement des précédents travaux par cette technique car l'information recherchée nécessite une imagerie à une résolution suffisamment haute, de l'ordre de 2 à 2,5 nm, pour pouvoir identifier les nucléosomes empilés. Pour cela, l'acquisition d'images à fort grandissement ($\approx 30\,000\times$) et faiblement sous-focalisées (1 à 2 μm) est nécessaire. Dans ces conditions l'obtention d'images de qualité est très difficile et la technique de CEMOVIS est proche de ses limites actuelles ; ce qui nous a conduit à proposer quelques améliorations techniques pour faciliter ces travaux.

Dans ce manuscrit, je commencerai par rappeler l'importance et l'intérêt de la cryomicroscopie électronique et du CEMOVIS en particulier puis je rappellerai les données connues sur l'organisation supramoléculaire de la chromatine eucaryote. Je présenterai ensuite les développements méthodologiques que nous avons initiés. Enfin, je présenterai et analyserai les images obtenues par cette technique sur des lignées cellulaires humaines (HT29) au niveau du cyoplasme (organites, filaments...) et du noyau (nucléosomes).

Chapitre I

Etat de l'art

I- De la molécule d'eau aux sections vitreuses

1-L'eau : une molécule fondamentale en biologie

A-Rappels sur la molécule d'eau

La molécule d'eau est constituée de deux atomes d'hydrogène H liés à un atome d'oxygène O. Cette molécule présente une forme en V avec une distance O-H de 0,1 nm et un angle entre les trois atomes de $104,5^\circ$ (Figure I.1A). Cette molécule possède des propriétés chimiques qui lui confèrent des capacités d'interaction avec les autres molécules tout à fait singulières. En effet, la molécule d'eau est polaire. L'atome d'oxygène possède une électronégativité supérieure à celle de l'atome d'hydrogène, ce qui signifie que le doublet de liaison créé par la mise en place de la liaison covalente O-H ne se trouve pas équidistant des deux atomes. Le doublet est plus proche de l'atome d'oxygène. Cette propriété équivaut à un gain de charges négatives pour l'oxygène ($2\delta^-$) et une perte de cette charge pour l'hydrogène (δ^+), produisant une polarisation de cette liaison (Figure I.1A). Cette répartition des charges conduit à la formation d'un dipôle résultant, d'une valeur de 1,8 Debye.

La molécule d'eau est capable d'interagir avec son environnement par le biais de liaisons hydrogène. Ces liaisons sont rencontrées lorsque sont mis en présence des atomes d'hydrogène reliés à des atomes électronégatifs et des atomes X très électronégatifs comme l'azote N, l'oxygène O et le fluor F. Ces liaisons hydrogènes sont non-covalentes mais néanmoins très directionnelles. Elles se situent dans le prolongement des liaisons covalentes X-H. Les liaisons sont les plus fortes lorsque l'alignement entre les trois atomes mis en jeu est respecté mais une tolérance de 30° permet de conserver ces liaisons. Ces liaisons possèdent une énergie de l'ordre de 10 à 20 kJ/mol, ce qui permet d'établir une interaction entre deux molécules mais cette valeur relativement faible les distinguent nettement des liaisons covalentes (~ 400 kJ/mol). L'agitation thermique à 25°C et sous une pression de 1 bar est suffisante pour rompre fréquemment ces liaisons. Ces interactions sont donc en remaniement permanent. La molécule d'eau peut être impliquée dans quatre liaisons hydrogènes simultanément, ceci la place au centre d'une structure tétraédrique par rapport à son environnement (Figure I.1B). Les liaisons H et l'organisation tétraédrique du voisinage de la molécule d'eau sont au cœur de l'organisation des différentes formes solides (amorphes et cristallines), liquide de l'eau et des solutions aqueuses. Le caractère dipolaire de la molécule d'eau lui confère des propriétés d'orientation sous l'influence d'un champ électrique et

favorise l'interaction avec des ions en solution et la rend notamment sensible aux forces de Van der Waals. Ce caractère dipolaire et l'implication de la molécule dans les liaisons hydrogènes sont à l'origine de son comportement singulier qui joue un rôle très important dans la vie cellulaire.

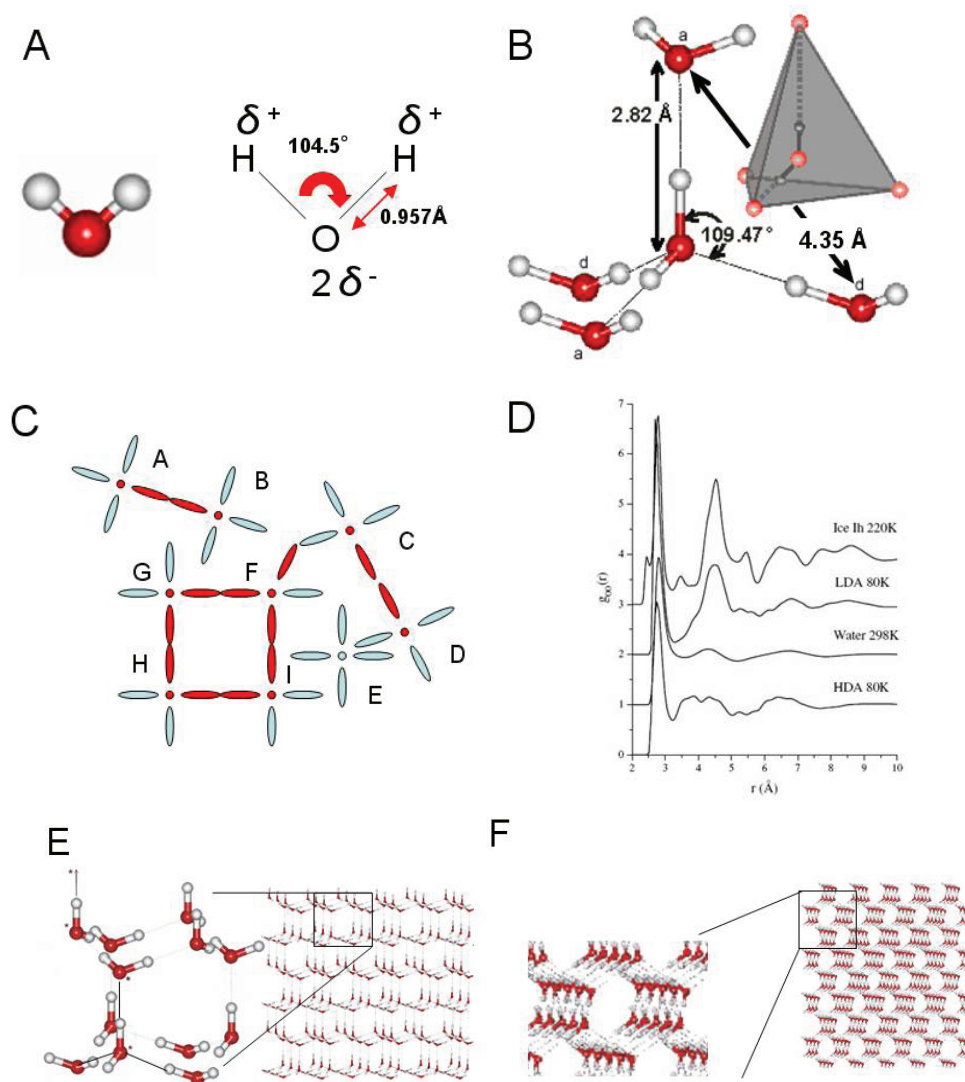


Figure I.1. Structure de la molécule d'eau. Structure de l'eau liquide et des différentes formes de glace

(A) Structure d'une molécule d'eau. L'atome d'oxygène est en rouge et les atomes d'hydrogène en blanc. La molécule d'eau est polarisée avec une faible charge positive sur chaque H et deux faibles charges négatives sur O. (B) Formation d'un tétraèdre avec les 4 molécules voisines par établissement de liaisons hydrogène dans le prolongement des liaisons covalentes O-H. (C) Modélisation de l'eau liquide par un réseau aléatoire de liaisons hydrogène. Chaque molécule d'eau est représentée par un point. Les ellipses représentent les axes de liaisons hydrogènes possibles. Les liaisons hydrogènes sont en rouge (d'après Stanley et Teixeira, 1980 ; Dubochet et al, 1988). (D) Détermination des distances O-O au sein de différentes formes de glace et d'eau liquide par diffusion des neutrons. L'eau à 298 K présente un pic intense à $2.82 \text{ \AA}$ et un pic plus diffus à $4.35 \text{ \AA}$ caractéristique d'une structure tétraédrique distordue (reproduit de Finney et al, 2002). (E) Réseau hexagonal produit par l'agencement des molécules d'eau dans la glace hexagonale (1h). Les molécules d'eau sont inscrites dans un tétraèdre formé des 4 molécules les plus proches. L'organisation à plus grande échelle repose sur la répétition de la maille hexagonale. (F) Organisation de l'eau en glace cubique (1c). Le voisinage local des molécules d'eau reste basé sur la structure tétraédrique mais l'orientation réciproque de deux molécules d'eau voisine diffère de 180° le long de la liaison hydrogène par rapport à la glace 1h. La maille cristalline est cubique.

B-L'eau sous ses différentes formes

L'eau est une des molécules que nous côtoyons le plus dans notre vie quotidienne puisqu'elle est largement présente dans notre environnement sous les trois états classiques de la matière : solide (iceberg, banquise), liquide (océans, lacs) et gaz (vapeur d'eau atmosphérique). Elle couvre environ 75% de la surface de la Terre. Le diagramme de phase de l'eau est présenté Figure I.2. L'organisation moléculaire des différents états de l'eau est connue avec plus ou moins de précision. On retrouve sur ce diagramme les trois états de la matière sous lesquels nous rencontrons habituellement la molécule d'eau (solide, liquide et gaz). L'eau sous forme solide peut présenter différentes structures cristallines notées Ih à XI sur ce diagramme en fonction des conditions de température et de pression. Dans ce chapitre, nous ne décrivons que certaines des phases cristallines, celles rencontrées à pression ambiante.

➤ L'eau liquide

La forme liquide de l'eau est celle que nous côtoyons le plus à l'échelle humaine mais elle reste pourtant la plus mal comprise. Les travaux de Bernal et Fowler (1933) ont montré que l'organisation tétraédrique des molécules d'eau sous l'effet des liaisons hydrogène est un élément de base de l'eau liquide (Rahman et Stillinger, 1971). L'un des modèles les plus pertinents et les plus acceptés repose sur la description d'un réseau aléatoire de liaisons hydrogène par un modèle de percolation (Stanley et Teixeira, 1980). Cette représentation repose sur une organisation locale en tétraèdre avec une distorsion très importante du réseau de liaisons hydrogène qui annule l'ordre à grande distance (Figure I.1C). Ce modèle répond assez bien aux observations expérimentales. Les travaux de Finney et al (2002) sur la structure de l'eau sous différentes formes par la diffusion des neutrons montrent des profils de corrélation de paires assez diffus pour l'eau à 298 K, ce qui signe un désordre prononcé. On remarque néanmoins deux pics à 2,8 Å et 4,6 Å qui correspondent aux distances O-O au sein des structures tétraédriques (Figure I.1D). Les travaux de Eaves et al (2005) montrent par spectroscopie infrarouge 2D que les molécules d'eau emprisonnées au sein du réseau de liaisons hydrogène sont mobiles et que les interactions avec les autres molécules d'eau sont faibles. L'eau liquide est donc en perpétuel réarrangement et l'ensemble des liaisons a une durée de vie extrêmement courte.

➤ Les formes solides à pression atmosphérique : les glaces hexagonale et cubique

La glace hexagonale est la forme solide de l'eau que nous rencontrons dans la vie quotidienne, celle qui constitue les icebergs notamment. Elle conserve l'organisation tétraédrique des molécules d'eau. Ces tétraèdres sont répétés sur de grandes distances en formant un maillage hexagonal (Figure I.1E). La formation de ce type de glace requiert une amorce cristalline, ou nucléation, décrite par Franks (1982) et reprise par Dubochet et al (1988). A l'échelle moléculaire, la baisse de température ralentit l'agitation thermique proportionnelle à kT , les liaisons hydrogène qui se forment ont ainsi une durée de vie plus grande qu'à 30°C et elles s'établissent le long de l'axe des liaisons covalentes. Cette configuration constitue une amorce hexagonale. Lorsque cette amorce est de taille suffisante, la probabilité pour les molécules en solution de rencontrer un donneur ou un accepteur de liaison H impliqué dans cette structure cristalline est grande. Le cristal va donc croître très rapidement.

La glace cubique repose elle aussi sur une organisation tétraédrique mais l'orientation relative de deux molécules voisines diffère de celle rencontrée dans la glace hexagonale par une rotation de 180° le long de l'axe de la liaison hydrogène (Figure I.1F). La maille constituée par ce type de glace est cubique. Cette forme de glace est constituée de petits cristaux (30 nm à 1 μm) orientés de manière aléatoire. Elle n'est stable à pression atmosphérique que pour une température inférieure à -70°C. Elle est obtenue pour une vitesse de refroidissement supérieure à celle nécessaire pour former de la glace hexagonale (Mayer et Hallbrucker, 1987 ; Dubochet et McDowall, 1981 ; Dubochet et al, 1982).

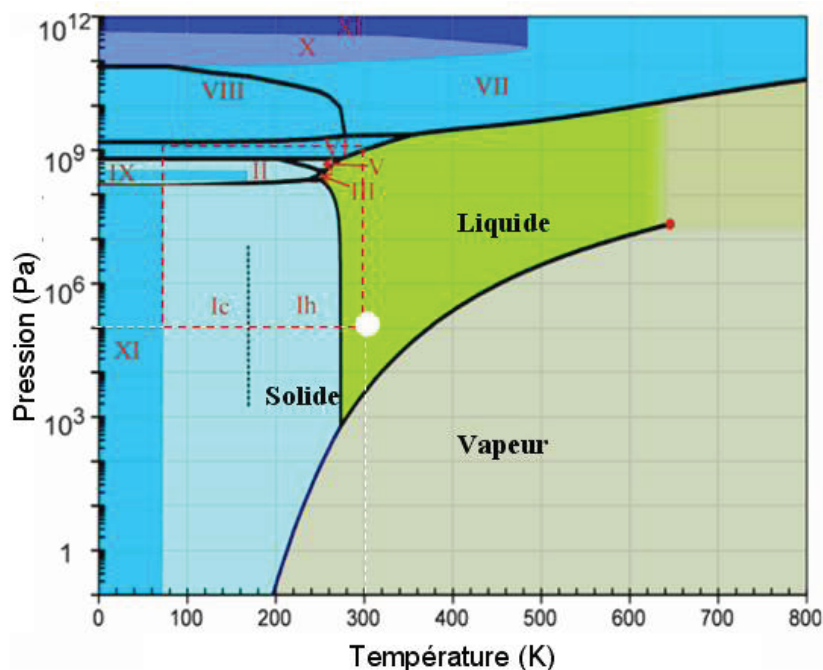


Figure I.2: Diagramme de phase de l'eau. Les trois états classiques de l'eau sont indiqués en bleu (phase solide), en gris (phase gazeuse) et en vert (phase liquide). Le point blanc représente les conditions de vie de la plupart des cellules (1 atm et 30°C). Les chiffres de Ih à XI représentent différentes formes de glace cristalline. La région encadrée en pointillés rouges est présentée en détail figure I.4.

C-L'eau dans les cellules

- L'eau est un constituant très important des cellules

L'eau est un constituant majeur, qualitativement et quantitativement, des organismes vivants. Elle constitue typiquement 60 à 95% de la masse cellulaire. La teneur en eau de certaines cellules ou de certains tissus a été déterminée par Ponder (1948) et Ling et Walton (1975) ; certaines sont reprises dans le tableau I.1.

Organisme	Type cellulaire ou tissu	Teneur en eau (%)	Auteurs
Grenouille léopard	Cœur	80.3	Ling et Walton (1975)
	Rein	77.0	
	Foie	68.3	
	Muscle	77.4	
Homme	hématie	63.9	Ponder (1948)
Lapin		63.3	
Mouton		60.5	
Chien		64.5	

Tableau I.1 : Teneur en eau de types cellulaires chez différents organismes biologiques

L'importance quantitative de l'eau dans la composition des cellules suggère un rôle fonctionnel et structural majeur. Plusieurs travaux et théories depuis le début du vingtième siècle ont tenté d'expliquer sa prépondérance dans la composition des organismes. Ces expériences ont donné naissance à quatre principales théories :

- La théorie de l'accident : la forte teneur en eau de la cellule est due à son environnement aqueux (Ling, 2004).
- L'équilibre membranaire : La teneur en eau résulte de l'activité osmotique intracellulaire (Donnan, 1924 ; Boyle et Conway, 1941).
- La théorie « pompe-fuite » directe : l'eau fuit la cellule par la membrane plasmique perméable et retourne dans la cellule par un mécanisme de pompe (Jain, 1972)
- La théorie « pompe-fuite » indirecte : le système de fuite et de pompage est lié au couplage avec la pompe Na/K (Dean, 1941 ; Dowben, 1969).

L'origine de cette teneur en eau n'est pas tranchée. En revanche l'organisation de l'eau au sein des cellules est mieux comprise, il semble que les molécules d'eau forment des couches d'hydratation à la surface des molécules qui influent à grande distance sur l'organisation des molécules d'eau dans le cytosol (Ling, 1965 ; Ling, 2004). Cette théorie dite des multicouches polarisées orientées, également défendue par Pollack (2001) suggère que l'eau au sein des cellules présente une organisation différente de l'eau liquide, en raison de propriétés collectives liées à la forte concentration macromoléculaire. Cette théorie est aujourd'hui assez communément admise bien que les différentes expériences proposées pour la vérifier présentent des résultats contradictoires.

Les molécules d'eau présentes autour des molécules biologiques forment une couronne d'hydratation en interaction forte avec les composés chimiques exposés à leur surface. Ces interactions découlent directement des propriétés de la molécule d'eau évoquées précédemment, le caractère dipolaire et la capacité à former des liaisons hydrogène avec les atomes électronégatifs. En prenant l'exemple d'une protéine globulaire en solution aqueuse, les interactions entre les molécules d'eau et la surface des molécules biologiques rentrent dans 4 catégories :

- liaison hydrogène avec des atomes électronégatifs ou avec des atomes d'hydrogène
- interaction de type Van der Waals avec des résidus polaires
- interaction coulombienne avec des résidus chargés
- isolation des résidus apolaires au sein d'une cavité constituée par les solvants.

➤ Effets de la déshydratation des macromolécules et des cellules

La prépondérance de l'eau dans la constitution des cellules et son rôle dans la solubilisation des macromolécules biologiques suggèrent qu'il faut la conserver lors des études structurales ou fonctionnelles sur des objets biologiques. Les effets de la suppression de l'environnement aqueux ont été observés à l'échelle moléculaire et cellulaire. L'importance de la couronne d'hydratation pour le maintien de la structure et de la fonction des molécules biologiques a été largement étudiée. La déshydratation des molécules biologiques a aussi un effet sur leur fonctionnalité. Reid et Rand (1997) ont étudié cet effet sur l'hexokinase, une enzyme au rôle essentiel qui catalyse la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate au cours de la glycolyse. Dans ce cas, l'ajout de PEG (PM 1000-10000) dans une solution d'hexokinase retire 325 molécules d'eau de la région du site actif et produit ainsi une hausse de l'affinité pour son substrat, le glucose, et dérégule l'activité normale de cette enzyme.

A l'échelle cellulaire, les effets de la déshydratation se manifestent dans les échantillons préparés par les techniques classiquement utilisées pour la microscopie électronique. L'eau est remplacée par de l'alcool, lui-même par un solvant et enfin le solvant par une résine. La déshydratation induit en particulier l'agrégation des macromolécules (Figure I.3A), largement décrite dans un grand nombre de cas (revue dans Kellenberger, 1987 et Dubochet et Sartori (2001)). Par exemple, l'agrégation des polysaccharides formant les parois des cellules végétales est visible sur la Figure I.3B. Cette agrégation induit la formation d'un espace vide, dépourvu de macromolécules, le long des membranes cellulaires, espace absent dans la structure native (Dubochet et Sartori, 2001). La formation de mésosomes à partir des membranes (Dubochet et al, 1983 ; Ebersold et al, 1981), l'effondrement d'endosomes précoces (Murk et al, 2003), des réarrangements membranaires dans les cellules photoréceptrices (Szczesny et al, 1996) ainsi que la dégradation de protéines (Behrman, 1984 ; Maupin et Pollard, 1983) ont également été observés. Ces artefacts ont conduit au développement d'un nouveau champ méthodologique conservant l'état hydraté des échantillons.

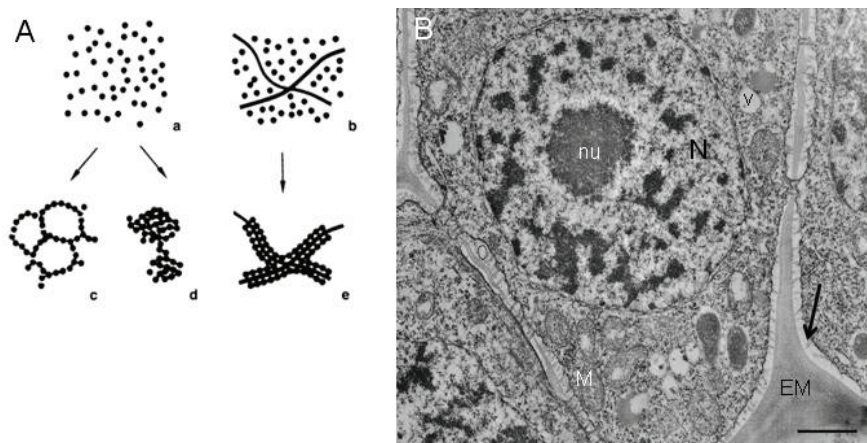


Figure I.3. Effet de la déshydratation en microscopie électronique conventionnelle. (A) De la solution à l'état agrégé. Après déshydratation les macromolécules solubles dans le milieu cellulaire (a, b) s'agrègent, formant des structures artéfactuelles absentes de la structure native (c-e). Selon leur structure et leur distribution native, la forme des agrégats diffère. La présence de filaments et de membranes peut déterminer la forme de l'agrégat observé après déshydratation (e) (d'après Kellenberger, 1987). (B) Observation de cellules d'un méristème de maïs après fixation chimique (glutaraldéhyde et tétroxyde d'osmium), déshydratation (alcool) et inclusion en résine (Spurr). On reconnaît un noyau (N) et le nucléole (nu), des vacuoles (v) et des mitochondries (M). La cellulose de la matrice extracellulaire (EM), constituant majeur des parois est agrégée entre les cellules, libérant un espace clair aux électrons dépourvu de matériel (flèche), tout le long de la membrane cellulaire. Echelle 1 mm (reproduit de Dubochet et Sartori, 2001).

2-Conservation l'échantillon hydraté en MET : la cryomicroscopie

A-« Vitrifier » l'échantillon

La colonne d'un microscope électronique est toujours maintenue sous vide (2.10^{-5} Pa). Pour conserver l'eau dans les échantillons, la solution consiste à la solidifier. La cristallisation de l'eau sous forme de glace hexagonale ou cubique que nous avons décrite précédemment est destructrice pour les cellules (Dubochet et al, 1988) et doit être évitée. La solution à ce problème a été apportée dans les années 1980 par Brüggeller et Mayer (1980) et Dubochet et McDowall (1981), elle consiste à vitrifier l'échantillon en le maintenant le plus proche possible de l'état natif, c'est à dire en conservant la répartition et l'organisation de l'eau dans la cellule. L'organisation de l'eau reste très proche de celle de l'état liquide. L'état vitreux est un état métastable et peut être obtenu en refroidissant rapidement l'échantillon en dessous de -135°C . Le refroidissement rapide permet une chute de l'agitation thermique proportionnelle à kT qui ne laisse pas le temps pour un réarrangement des liaisons hydrogène à grande échelle pour former un réseau hexagonal comme dans le cas de la glace 1h. La vitesse de refroidissement nécessaire pour vitrifier de l'eau pure est de l'ordre de 10^6 K/s à pression ambiante. Elle permet d'éviter la nucléation.

Dans le cas des échantillons biologiques, cette vitesse peut être plus faible en raison de leur forte concentration en macromolécules. La couronne d'hydratation des macromolécules a

pour effet de limiter le nombre de degrés de liberté des molécules d'eau incluses dans la couronne. Les interactions entre l'eau de la couronne et la macromolécule doivent être rompues pour former une amorce cristalline. Plus un échantillon est concentré en macromolécules, plus la vitesse de refroidissement nécessaire à sa vitrification pourra être diminuée (Dubochet et al, 1988).

Le problème majeur lié à la vitrification des échantillons biologiques est leur mauvaise conduction thermique. Lors de la vitrification, la région de l'échantillon au contact du liquide cryogénique voit sa température chuter assez rapidement. Malheureusement, plus on s'éloigne de la zone de contact, en profondeur dans l'échantillon, plus la vitesse de refroidissement diminue, et elle peut devenir insuffisante pour éviter la nucléation et la cristallisation.

➤ Vitrification en film mince (50-500 nm)

Ainsi, il est facile de vitrifier des échantillons biologiques, et même de l'eau pure, préparés en film minces (< 500 nm), par simple trempe dans un « bon » cryogène (éthane liquide refroidi par de l'azote liquide à une température proche de son point de fusion). Cette technique est très largement utilisée de nos jours et permet l'étude d'objets de petite taille : complexes macromoléculaires isolés en solution, virus, petites vésicules, et même des organites subcellulaires isolés. Des informations structurales à haute résolution ($4,7 \text{ \AA}$) de la structure des macromolécules dans leur état hydraté congelé peuvent être ainsi obtenues (Cong et al, 2010).

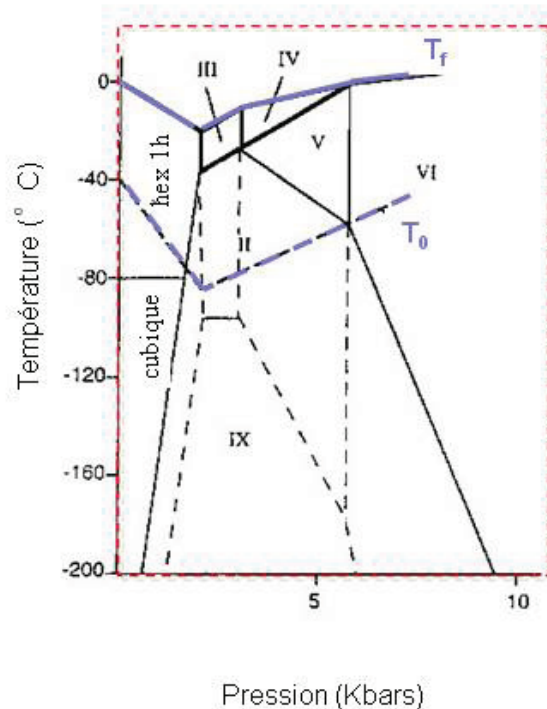
➤ Vitrification des objets massifs (cellules, tissus)

La vitrification des objets massifs est beaucoup plus difficile. Il est à ce jour impossible de vitrifier de l'eau pure sur des épaisseurs supérieures à $1 \text{ }\mu\text{m}$ (Mayer, 1985). Des mesures et des approches théoriques de la vitesse de refroidissement V d'un échantillon en fonction de son épaisseur e et de la vitesse de refroidissement appliquée à sa surface V_0 ont montré que, quelle que soit V_0 , V décroît très rapidement avec l'épaisseur (Escaig, 1982, Studer et al, 1995) et ne dépasse pas 20000 K/s à $30 \text{ }\mu\text{m}$ de profondeur. De plus, la nucléation et la croissance de cristaux de glace qui se produit inévitablement dans les régions profondes des échantillons les plus épais est un processus exothermique qui ralentit encore le refroidissement (Escaig, 1982).

Grâce aux propriétés cryoprotectrices des macromolécules biologiques, il est cependant possible de vitrifier des échantillons massifs contenant jusqu'à environ 90% d'eau, sur des épaisseurs compatibles avec la taille d'une cellule, ou plus. Ceci peut être obtenu par deux méthodes :

(i) La vitrification à haute pression (ou « High Pressure Freezing », HPF)

Le diagramme de phase de l'eau montre que les points de fusion et de nucléation homogène de l'eau décroissent significativement avec l'augmentation de la pression et présentent un minimum autour de 2048 bars (210MPa). La glace cristalline a un volume spécifique supérieur à celui de l'eau liquide et de la glace amorphe (Kanno et al, 1975) mais ce constat n'est plus vrai lorsque la pression augmente suffisamment (Figure I.4). A 2048 bars, la glace devient plus dense que l'eau liquide, ce qui entraîne une baisse du point de fusion de l'eau qui atteint -22°C et la surfusion atteint la température limite de -92°C au lieu de -42°C à pression ambiante (Figure I.4). La vitrification par haute pression repose sur cette propriété. Moor et Riehle (Moor, 1980 ; Riehle et Hoechli, 1973) ont été les premiers à l'exploiter en augmentant la pression à 2048 bar (210MPa) au cours du refroidissement de l'échantillon. L'augmentation de la pression permet une réduction significative de la vitesse de refroidissement nécessaire à la vitrification des cellules, passant de plus 100 000 K/s à pression atmosphérique à 1000 K/s à 210 MPa (Studer et al, 2001 ; Vanhecke et al, 2007). Les calculs réalisés par Studer et al montrent que cette vitesse peut être obtenue jusqu'à 200 µm de profondeur (Studer et al, 1995, 2008). Deux systèmes différents de vitrification par haute pression sont commercialisés actuellement. L'EMPACT® (Leica) augmente la pression autour de l'échantillon puis le vitrifie par un double jet d'azote liquide (-196°C) (Riehle et Hoechli, 1973). Le deuxième appareil (Bal-Tec HPM100®) augmente la pression de l'azote liquide jusqu'à 210 MPa puis le projette sur l'échantillon.



Le point de fusion T_f (ligne bleue) et le point de nucléation homogène (ou limite de la surfusion, T_0 , pointillé bleu) présentent un minimum autour de 2 kbar.

(ii) Le « slam-freezing » (SF)

Cette méthode de congélation à pression atmosphérique consiste à mettre en contact l'échantillon avec une surface de cuivre refroidie, de très grande pureté (>99.999%) dont la surface est parfaitement polie de manière à optimiser la vitesse de refroidissement. Cette méthode est assez ancienne dans son principe, elle a déjà été employée dans les années 1970 par Christensen (1971) pour congeler des échantillons de pancréas et de foie mais sans toutefois permettre la vitrification. Cette méthode a été améliorée dans les années 1980 en utilisant l'hélium liquide au lieu de l'azote liquide, et surtout en utilisant un appareillage plus performant (Escaig, 1982). L'appareil utilisé consiste en un bloc de cuivre maintenu dans une chambre sous vide pour éviter la contamination atmosphérique, et refroidi à l'hélium liquide pour atteindre une température de 6 K. Les vitesses de refroidissement mesurées à l'aide d'un thermocouple sont de l'ordre de 200 000 K soit deux fois la valeur requise pour vitrifier un échantillon à pression atmosphérique. Cette vitesse décroît dans l'épaisseur de l'échantillon comme nous l'avons décrit ci-dessus. La zone vitrifiée est superficielle. La diminution de la vitesse de refroidissement au fur et à mesure que l'on progresse dans l'épaisseur de l'échantillon induit la formation de glace cubique 1c, puis plus en profondeur de la glace

hexagonale 1h. La profondeur de la zone vitreuse dépend du type cellulaire et en particulier de sa teneur en eau.

La congélation HPF est la méthode la plus utilisée actuellement parce qu'elle permet de vitrifier des cellules et des tissus sur des épaisseurs plus importantes (jusqu'à 200 μm) soit environ 10 fois plus que par SF (Sartori, 1993). Toutefois cette méthode peut être à l'origine d'artéfacts. Selon les cas et les questions biologiques abordées, ceux-ci peuvent s'avérer rédhibitoires. L'analyse de la glace vitreuse obtenue après congélation haute pression montre que celle-ci est plus dense que l'eau vitreuse obtenue à pression ambiante (Richter, 1994b). Après remise à pression ambiante dans la chambre du cryomicrotome, il arrive que la relaxation de l'échantillon s'accompagne de mouvements tectoniques et provoque des cassures des cellules (Dubochet et al, 2007). Par ailleurs, les régions vitrifiées en profondeur l'ont été avec des vitesses de refroidissement relativement lentes, ce qui peut laisser le temps à des réarrangements liés au changement de température et de pression dans l'échantillon. Des transitions de phase et des modifications structurales ont été mises en évidence in vitro, dans des phases cristallines liquides d'ADN et de phospholipides (Leforestier et al, 1996 ; Semmler et al, 1998). Le slam-freezing n'est pas exempt d'inconvénients non plus. Outre sa faible profondeur de vitrification, l'impact sur le bloc de cuivre peut provoquer des déformations de l'ultrastructure de l'échantillon (Leforestier et Livolant, 1992 et voir chapitre II).

➤ Ajout de cryoprotectant au milieu extracellulaire

Les échantillons constitués de cellules isolées en suspension ne peuvent être vitrifiés directement dans leur milieu de culture. Celui-ci est effet généralement trop riche en eau (> 90%) et cristalliserait lors de la congélation. Pour contrer ce phénomène, l'ajout d'un cryoprotectant dans le milieu extérieur à la cellule est nécessaire. Les molécules susceptibles de jouer ce rôle présentent des fonctions chimiques polaires et donneuses ou accepteuses de liaisons hydrogènes. Différentes molécules ont été testées (Takahashi et al, 1988). Les sucres constitués de groupements hydroxyles sont particulièrement adaptés pour cette fonction. L'emploi de ces molécules n'est cependant pas sans effet sur les cellules car elles modifient l'équilibre osmotique entre le milieu extérieur et le cytosol. La prise en compte de ces deux aspects, minimisation des effets osmotiques et absence de cristallisation du milieu a permis de montrer qu'un dérivé du maltose (dextran) serait un bon candidat (Takahashi et al, 1988). Le

Dextran de haut poids moléculaire (PM 40000) est à ce jour le plus couramment utilisé pour permettre la vitrification du milieu extérieur aux cellules.

➤ Caractérisation de la glace obtenue après congélation d'un échantillon

L'état de l'eau dans les échantillons peut être analysé dans le microscope par diffraction électronique (Dubochet et al, 1982). La glace hexagonale présente une organisation structurée à longue distance qui se traduit par la présence de pics de Bragg sur les clichés de diffraction (Figure I.5a). La glace cubique est constituée de petits cristaux de taille submicronique et orientés aléatoirement les uns par rapport aux autres. Le diffractogramme obtenu correspond à un diagramme de poudre avec des anneaux fins et intenses (Figure I.5b). La glace amorphe ne présente aucune structure cristalline. L'image est homogène et le diffractogramme présente des anneaux larges et diffus (Figure I.5c). La densité de ces trois types de glace est toutefois assez proche ($0,94 \text{ g/cm}^3$) (Dubochet et al, 1982).

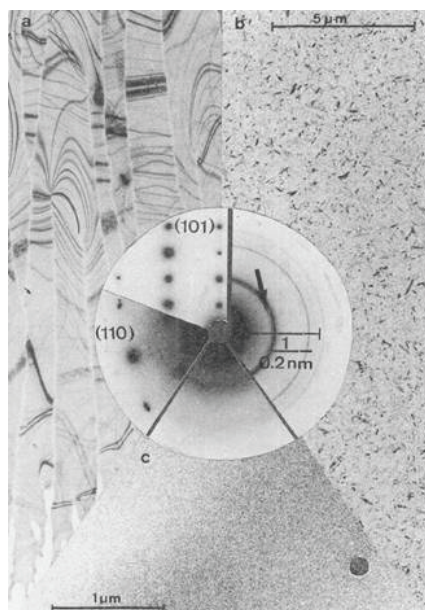


Figure I.5 : Images et diffractogrammes (cercle au centre) des trois formes de glace à pression atmosphérique (d'après Dubochet et al, 1982) (a) Glace hexagonale obtenue par congélation lente d'un film d'eau. Les lignes sombres correspondent aux lignes de défaut dans le réseau hexagonal. Deux plans cristallins (101) et (110) sont illustrés dans les diffractogrammes au centre. (b) Glace cubique obtenue pour des vitesses de refroidissement un peu plus rapides que pour la glace hexagonale. La glace cubique est constituée de nanocristaux orientés aléatoirement, à l'origine de l'aspect pailleté de l'image. Le diffractogramme présente une série d'anneaux fins caractéristiques d'un diagramme de poudre. (c) Glace amorphe obtenue par congélation ultrarapide. Les anneaux diffus traduisent le désordre des molécules d'eau au sein de l'échantillon. Les diamètres des anneaux valent 0,37 et 0,21 nm

B - Les cryo-sections hydratées congelées ou CEMOVIS (Cryo-Electron Microscopy Of Vitreous Sections)

La découverte de la vitrification dans les années 1980 a permis de développer la cryo-microscopie des coupes de cellules et tissus hydratés-congelés. Cette nouvelle approche a rapidement produit quelques résultats encourageants, notamment sur les tissus hépatiques de rat (McDowall et al, 1983) ou sur des bactéries *E.coli* (Dubochet et al, 1983). Cependant, jusqu'au début des années 2000, cette approche est restée confidentielle, essentiellement développée dans le laboratoire dirigé par J. Dubochet en Suisse. Le frein au développement de cette technique était alors la difficulté d'obtention de cryo-sections vitreuses.

L'apparition de nouvelles générations de cryo-ultramicrotomes (Leica UC6/FC6 puis UC7), l'utilisation de micromanipulateurs pour faciliter la collecte de rubans de sections sériées (Ladinsky et al, 2006, Ladinsky et al, 2010) et le contrôle de l'environnement du microtome ($T = 21-23^{\circ}\text{C}$, $\text{HR} = 25-30\%$) ont permis des avancées spectaculaires dans ce domaine. La confection des coupes est en effet très sensible aux conditions environnementales. Parmi les paramètres influant sur la qualité des coupes obtenues, les plus importants répertoriés sont l'humidité et l'électricité statique. La chambre du cryo-microtome est ouverte pour permettre à l'expérimentateur de manipuler les coupes. Les basses températures employées dans cet environnement (-140°C à -160°C) favorisent la condensation de vapeur d'eau atmosphérique ainsi que la charge électrique des surfaces. Ces problèmes sont aujourd'hui en grande partie maîtrisés par l'utilisation de l'atmosphère contrôlée et l'utilisation d'un ionisateur pour neutraliser les effets de charge par l'émission d'un flux d'ions positif ou négatif avec une alternance à haute fréquence.

Bien que permettant l'observation de l'ultrastructure de la cellule dans un état proche de son état natif, et donc en l'absence des artéfacts liés à l'agrégation et la coloration induites par les techniques classiques, la méthode de CEMOVIS n'est pas dépourvue d'artéfacts, essentiellement liés au processus de coupe. Ces artefacts sont bien documentés, et sont également rencontrés, mais dans une moindre mesure avec les méthodes de coupe conventionnelles (Hayat, 1970). Ces défauts se regroupent en quatre catégories : la compression, les crevasses, le « chatter », les marques de couteau (Dubochet et al, 1988 ; Dubochet et al, 2007) (Figure I.6).

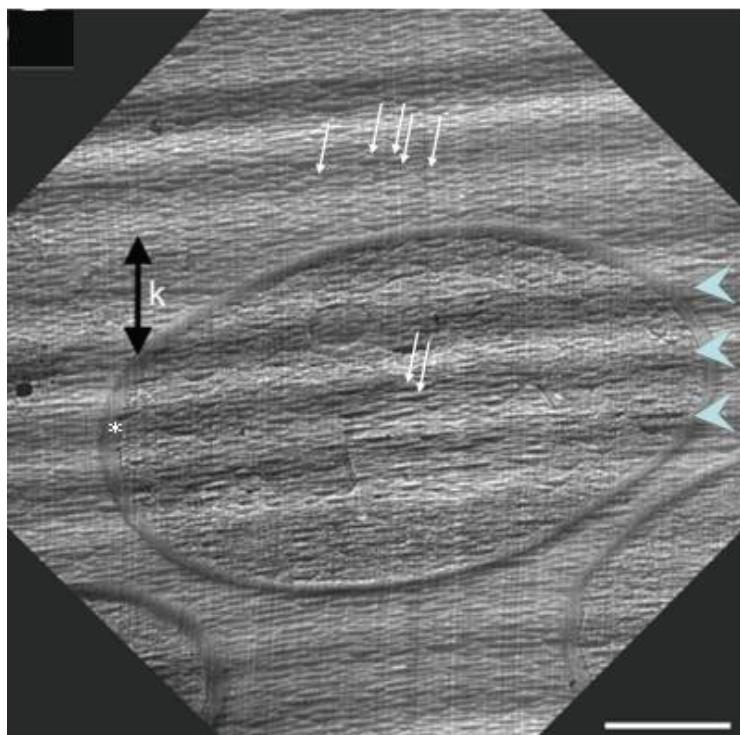


Figure I.6. Principaux artefacts de cryosections (d'après Al-Amoudi, thèse de doctorat, Lausanne, 2004). Cryo-section de levure présentant les principaux artefacts liés à la coupe des échantillons hydratés congelés. Les marques de couteaux sont visibles comme des stries orientées parallèlement à la direction de coupe (k). Les crevasses (flèches blanches), sont des fractures de l'échantillon, présentes sur toute l'image, à l'exception de la région de la paroi cellulaire (*). La compression à grande distance est particulièrement importante et se traduit par un aplatissement global de la cellule et des compartiments subcellulaires dans la direction de coupe. Le « chatter » perpendiculaire à la direction de coupe se traduit par une modulation périodique de l'épaisseur de la coupe (têtes de flèches). Echelle 1 μm .

-La compression est liée à la déformabilité de l'eau amorphe au passage du couteau et affecte toutes les cryo-sections. Les dimensions sont réduites de 30 à 60% le long de la direction de coupe alors qu'elles sont maintenues dans la direction perpendiculaire. Cette compression s'accompagne d'une augmentation de l'épaisseur de la coupe par rapport à la valeur nominale choisie par l'expérimentateur. Elle dépend de la nature du matériau et peut donc varier d'un échantillon à l'autre, mais elle dépend aussi d'autres paramètres, tels l'angle du couteau et l'épaisseur de coupe (Han et al, 2008). Plus celle-ci est importante, moins la compression est sévère. Notons que si la compression à grande distance est souvent importante en CEMOVIS, ce n'est pas forcément le cas à l'échelle moléculaire (Sartori Blanc et al, 2001, voir plus loin Figure I.11)

- Les crevasses apparaissent comme des sillons parallèles au tranchant du couteau. Elles correspondent à des fractures en profondeur de l'échantillon. Elles ne sont pas systématiquement présentes sur les coupes. Elles apparaissent d'autant plus facilement que le matériau coupé est rigide et non déformable. Certains matériaux sont plus enclins à former ce type de défauts comme les gouttelettes lipidiques. Elles sont généralement absentes des coupes ultraminces (< 50 nm) et plus fréquentes quand l'épaisseur de la coupe augmente.

- Le « chatter » est une variation périodique de l'épaisseur de la coupe due à une vibration du spécimen par rapport au couteau. Cette variation présente une période de 0,1 µm à plusieurs micromètres et peut être liée à une mauvaise fixation de l'échantillon ou à une vitesse de coupe correspondant à une fréquence de résonance de l'ensemble échantillon-couteau. Ce phénomène est généralement facilement évitable en modifiant la vitesse de coupe par exemple.

- Les marques de couteau apparaissent comme des striations, parallèles à la direction de coupe. Elles correspondent à des sillons superficiels provenant des défauts du tranchant du couteau de diamant. Ces marques ne gênent généralement pas l'interprétation du signal.

L'épaisseur des coupes confectionnées varie en fonction des objectifs de l'expérimentateur. Les plus courantes sont les cryo-sections ultrafines (40 à 80 nm). Celles-ci sont généralement destinées aux analyses à « haute » résolution pour analyser des détails moléculaires d'une structure cellulaire (voir par exemple Sartori et al, 2001 ; Matias et al, 2003 ; Salje et al, 2009 ; Eltsov et Zuber, 2006). Les coupes plus épaisses (80 à 200 nm) sont utilisées pour étudier la répartition de gros complexes macromoléculaires ou des organites au sein de la cellule par cryotomographie (Bouchet-Marquis et al, 2007). Cette méthode consiste à reconstruire informatiquement l'objet étudié en trois dimensions à partir d'acquisition de séries tiltées.

Si les cryosections peuvent être maintenant obtenues avec un rendement satisfaisant, ce qui conduit à l'implantation de la technique dans un nombre croissant de laboratoires dans le monde, le principal verrou technologique à lever est le problème de l'adhésion des cryo-sections sur un support, indispensable afin d'éviter leur mouvement sous le faisceau d'électrons (ou « drift »). Cette étape est donc cruciale. Aux débuts du CEMOVIS, les coupes étaient déposées sur des grilles de cuivre recouvertes d'un fin film de carbone (3-10 nm). Ces supports présentent l'inconvénient d'être fragiles et non parfaitement plans. Aujourd'hui, on utilise donc le plus souvent des grilles en cuivre couvertes d'un film de carbone à trous obtenu

par lithographie (C-flat, Quantifoil), ce qui assure un support plan (Al-Amoudi et al, 2007). Dans certaines applications pour la cryotomographie, certains expérimentateurs utilisent des grilles de cuivre sans autre support (Masich et al, 2006).

Pour faire adhérer les coupes sur le film de carbone, la méthode classiquement utilisée consiste à appuyer sur la coupe au moyen d'une presse mécanique pour la fixer au support. Cette méthode conduit à une adhésion imparfaite et seulement locale de la coupe sur le film de carbone, comme nous le détaillerons plus loin (Chapitre III). Différentes versions de ce système ont été développées depuis les débuts du CEMOVIS, sans véritable amélioration. Seule l'introduction d'une feuille d'Indium - métal mou même à basse température- sous la grille support a permis une légère amélioration du rendement d'adhésion et surtout empêche la casse des films et des coupes lors de cette étape (Hsieh et al, 2006, Figure I.7A, B).

Plus récemment, une « presse électrostatique » a été développée par Pierson et al (2010). Elle exploite le caractère isolant des cryo-sections du point de vue électrique et consiste à déposer des charges négatives sur la surface des coupes au moment du dépôt sur une grille reliée électriquement à la terre. Celle-ci se trouve donc au potentiel 0V, elle est donc positive en regard de la surface de la coupe. L'absence de conductivité électrique de la section vitreuse empêche la diffusion des charges vers la masse. Ces charges négatives créent un champ électrique entre la coupe et la grille qui plaque les coupes sur le film support (Figure I.7C).

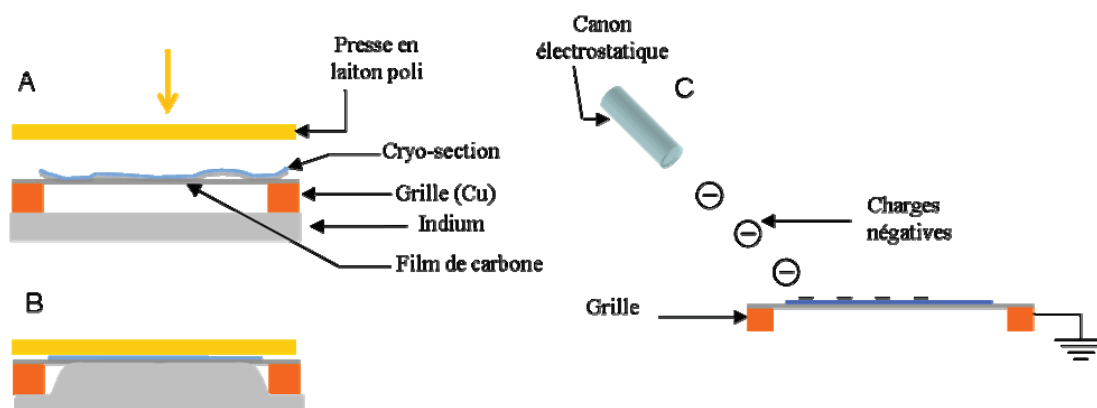


Figure I.7. Principe de fixation des cryo-sections sur les grilles-support

(A) Presse mécanique en métal poli. La coupe est déposée sur la grille de cuivre recouverte du film de carbone et posée sur une feuille d'Indium. (B) La pression exercée applique la coupe contre le film et déforme la feuille d'Indium. Les coupes sont aplaties sur la surface du film. (C) Dispositif de presse électrostatique (Crion). La coupe se trouve entre des charges négatives générées par le Crion et grille reliée à la masse.

C-Observations des objets biologiques par cryomicroscopie

1. Rappels sur la formation de l'image en cryomicroscopie

Les électrons sont des particules électriquement chargées. Chaque électron interagissant avec l'échantillon va passer à travers le nuage électronique d'un atome et à une distance plus ou moins grande du noyau de celui-ci. Les électrons du faisceau vont donc se trouver en interaction avec un environnement chargé électriquement. La déviation des électrons du faisceau par les atomes de l'échantillon est à l'origine de la formation du contraste de l'image. Le passage d'un électron au voisinage d'un atome peut donner lieu à différents types d'interactions exploitées par différentes techniques de microscopie électronique (Figure I.8). Nous ne nous intéresserons ici qu'aux électrons transmis. Ceux-ci se classent en trois catégories :

- Les électrons transmis sans déviation. Ce sont les électrons qui traversent l'échantillon sans rencontrer d'atomes. Ils ne subissent aucune perte d'énergie.
- Les électrons subissant une diffusion élastique. Ce phénomène se produit lorsqu'un électron passe au voisinage immédiat du noyau de l'atome. L'interaction coulombienne résultant de cette proximité entraîne une déviation de sa trajectoire d'un angle dépendant entre autre du numéro atomique de l'atome. L'énergie de l'électron reste inchangée.
- Les électrons subissant une diffusion inélastique. Elle résulte du passage d'un électron dans le nuage des orbitales électroniques. L'électron interagit alors avec des particules de même masse et leur transmet de l'énergie. Cette perte d'énergie dépend de la nature chimique de l'atome et s'accompagne également d'une déviation angulaire. Si on ne s'intéresse pas à l'analyse de ce signal permettant une caractérisation chimique de l'échantillon (Electron Energy Loss Spectroscopy ou EELS ; Electron Spectroscopy Imaging ou ESI), ces électrons produisent un bruit de fond qui se superpose au signal.

Les électrons entrant dans ces trois catégories contribuent à la formation de l'image en microscopie électronique à transmission.

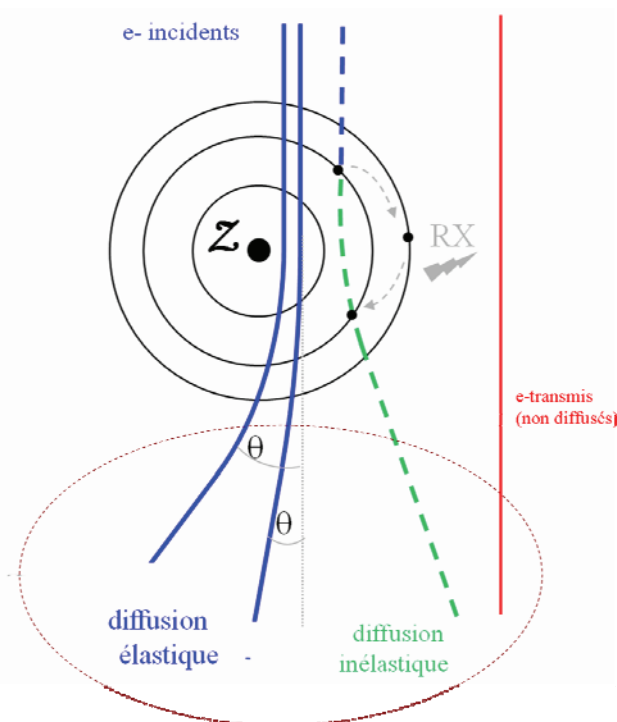


Figure I.8: Interaction électrons-matière

Les électrons incidents passant à proximité du noyau sont plus ou moins déviés d'un angle θ . On parle de diffusion élastique. L'angle θ varie en fonction de la distance au noyau et du numéro atomique Z . D'autres électrons interagissent avec le nuage électronique et perdent alors de l'énergie (diffusion inélastique). Cette perte d'énergie s'accompagne de l'émission d'un photon X. Certains électrons traversent l'échantillon sans être déviés (non diffusés). Ces trois types d'électrons contribuent au signal détecté.

Le contraste d'amplitude résulte de la transmission ou non des électrons en fonction des atomes traversés dans l'échantillon. Les électrons déviés à grand angle en présence d'atomes lourds peuvent être stoppés par le diaphragme objectif (Figure I.9A). Ce type de contraste est utilisé pour l'imagerie d'échantillons contenant des billes d'or, ou les échantillons biologiques colorés par des sels de métaux lourds. Dans les spécimens hydratés-congelés (films minces ou cryosections), le faible numéro atomique des atomes constituant les molécules biologiques (C, H, N, O, P) rend ce type de contraste extrêmement faible.

Le contraste de phase s'explique par la nature ondulatoire des électrons. Le faisceau incident est considéré comme une onde plane qui traverse l'échantillon. Selon le principe de Huygens, les noyaux des atomes traversés se comportent comme des sources secondaires qui émettent une onde sphérique dont le rayon de courbure est d'autant plus grand que l'atome est lourd. Ces ondes interfèrent avec l'onde plane transmise, c'est à dire les électrons n'interagissant pas avec l'échantillon, et génèrent le contraste de l'image (Figure I.9B). Dans le cas des échantillons biologiques, le déphasage entre l'onde transmise et l'onde diffusée est faible. De plus la densité des macromolécules biologiques diffère peu de celle de l'eau amorphe qui les

entoure, le contraste est donc presque nul lorsqu'on se trouve au focus. Ce déphasage peut être augmenté artificiellement en modifiant la courbure de la lentille objective par sous-focalisation.

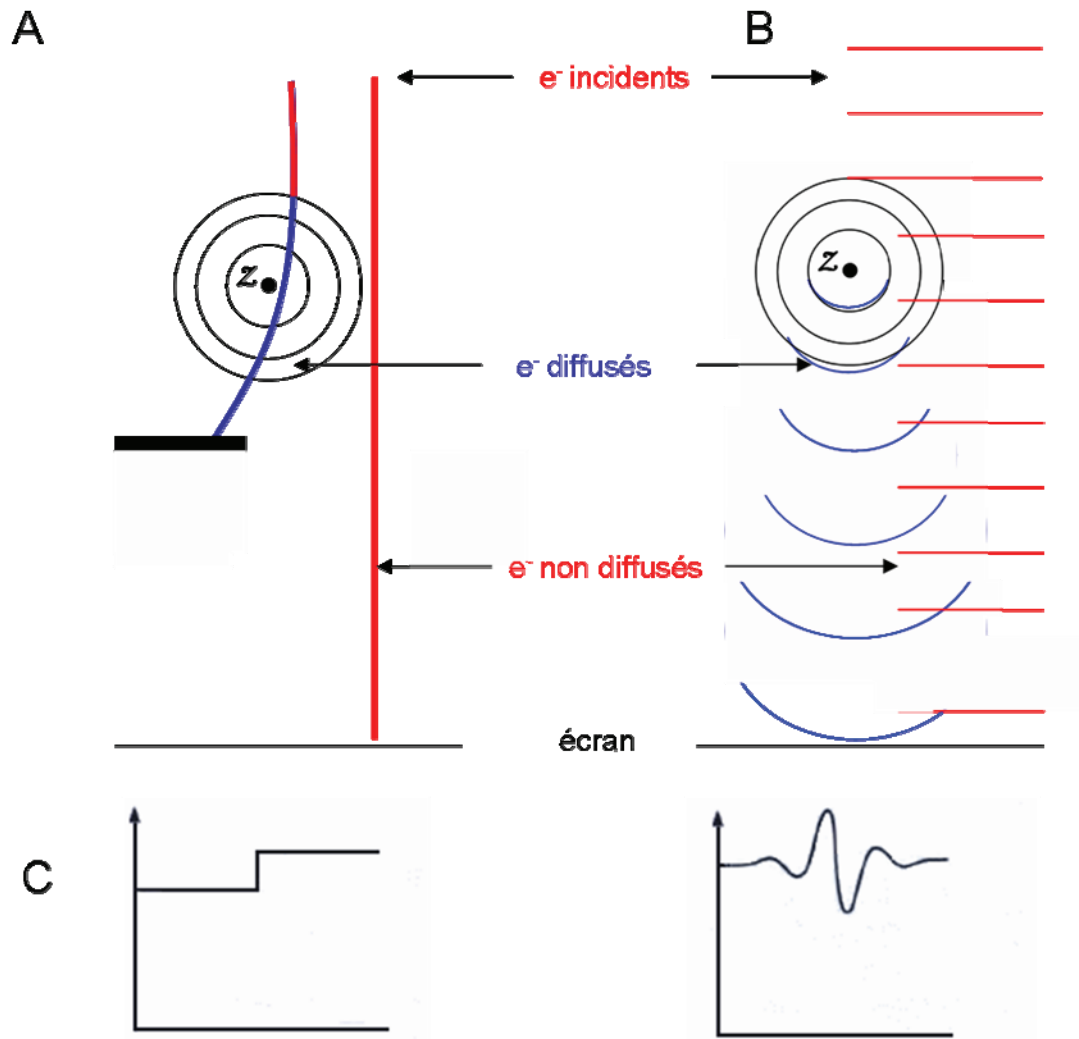


Figure I.9 : Contraste d'amplitude et contraste de phase

(A) Contraste d'amplitude. Les électrons se comportent comme des particules. Les électrons incidents passant à proximité du noyau sont déviés (en bleu) et sont arrêtés par le diaphragme objectif. Certains électrons traversent l'échantillon assez loin des noyaux et ne sont pas déviés (en rouge). La transmission ou non des électrons est à l'origine du contraste. (B) Contraste de phase. Les électrons sont vus comme des ondes. Le faisceau incident est une onde plane (rouge). Certains électrons interagissent avec les atomes et sont diffusés sous formes d'ondes sphériques (en bleu). Les électrons non diffusés traversent l'échantillon comme en A. Ils vont interagir avec les ondes diffusés et provoquent une déformation du front d'onde responsable du contraste. (C) Intensité du signal sur l'image correspondante (d'après Dubochet et al, 1988).

Ces deux types de contraste contribuent à la formation de l'image en cryo-microscopie électronique à hauteur de 90 à 93% pour le contraste de phase et 7 à 10% pour le contraste d'amplitude (Toyoshima et Unwin, 1988) qui intervient surtout dans le domaine des basses fréquences spatiales (Toyoshima et al, 1993).

2. La fonction de transfert de contraste (FTC)

Le microscope électronique, comme tout instrument chargé de transmettre une information n'est pas parfait et il introduit des modifications dans l'information qui doivent être corrigées. Ces défauts sont regroupés dans un modèle mathématique appelé fonction de transfert de contraste (FTC).

Une des composantes de cette fonction est due aux défauts de la lentille objectif :

- les défauts d'aberration sphérique (C_s) dus au fait que la lentille objectif est plus convergente pour des électrons très déviés que pour les électrons para-axiaux. L'image d'un point est donc un disque dit de moindre confusion, proportionnel à C_s .
- les défauts d'aberration de chromaticité (C_c). Les électrons n'ont pas tous les mêmes longueurs d'onde. Ils ne convergent pas au même point et produisent aussi un disque proportionnel à C_c .

L'image de l'objet que nous observons en microscopie électronique en transmission est une projection de cet objet affectée par la fonction de transfert du microscope $H(S)$. La transformée de Fourier de l'image $TF(I)$ est reliée à la transformée de Fourier de l'objet $TF(O)$ par la relation :

$$TF(I) = TF(O) * H(S) \quad (1)$$

La composante $H(S)$ issue de la diffusion élastique des électrons est une fonction de la fréquence spatiale S . Elle est donnée par la relation (Misell, 1978 ; Conway et Steven, 1999) :

$$H(S) = A \sin [-\gamma(S)] - (1-A) \cos [-\gamma(S)] \quad (2)$$

Où γ est le déphasage induit par la lentille objectif, A est la proportion du signal issue du contraste de phase. La valeur de A est donc comprise entre 90 et 93% en cryo-microscopie.

Le déphasage γ est donné par la relation :

$$\gamma(S) = 2\pi/\lambda (C_s(\lambda S)^4/4 - \Delta Z(\lambda S)^2/2) \quad (3)$$

où ΔZ est la défocalisation et C_s le coefficient d'aberration sphérique de la lentille objectif, S la fréquence spatiale et λ , la longueur d'onde des électrons incidents.

La FTC est une fonction oscillante qui dépend des défauts de la lentille objectif mais aussi des conditions d'imagerie (sous-focalisation ΔZ) (Figure I.10). L'amplitude de l'onde transmise décroît lorsque $\sin [-\gamma(S)]$ tend vers 0. Les fréquences pour lesquelles cette fonction est nulle

ne sont pas transmises puis le changement de signe de $\sin [-\gamma(S)]$ produit un déphasage de π . La défocalisation ΔZ influe sur le déphasage et contribue donc aux défauts de la lentille. La valeur choisie pour ΔZ va donc changer la modulation appliquée par la FTC au signal issu de l'objet et modifier les fréquences transmises (Figure I.10).

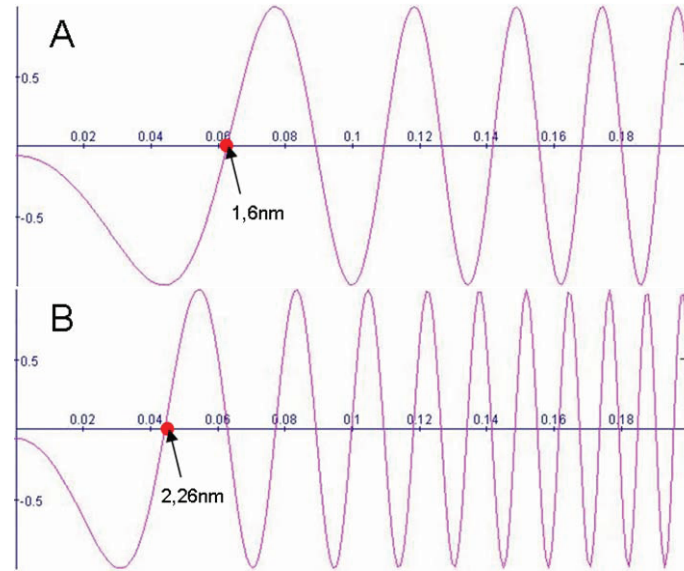


Figure I.10: Fonction de transfert de contraste en fonction de la valeur de la sous-focalisation (Δz)

Les profils ont été réalisés avec CTFsimu (http://ncmi.bcm.edu/ncmi/software/software_details) pour une tension de 200 kV, $C_s = 2$ mm et 7% de contraste d'amplitude. (A) Profil de FTC pour une sous-focalisation de $1\mu\text{m}$. (B) Profil obtenu pour une sous-focalisation de $2\mu\text{m}$. Le premier zéro de la FTC (point rouge) montre la limite de transmission du signal, sans défaut liés au microscope. Au delà la FTC affecte l'image par des inversions de contraste et doit être corrigée. L'enveloppe n'est pas représentée sur cette figure.

En pratique, l'équation (1) ne rend pas compte des défauts de cohérence du faisceau d'électrons et des fluctuations de la tension accélératrice qui, couplés à d'autres phénomènes (sensibilité des détecteurs, ...) vont atténuer la transmission du signal vers les hautes fréquences spatiales.

Cette atténuation est modélisée par la fonction d'enveloppe $E(S)$ donnée par l'équation :

$$E(S) = \exp [-\pi^2 Q^2 (S^2 C_s \lambda^3 - \Delta z S \lambda)^2] \exp [S^4 \lambda^2 (D_s)^2 - \pi^2 / (16 \ln 2) \sqrt{(C_s \lambda)}] \exp [-(S/E_g)^2] \quad (4)$$

La première exponentielle décrit l'effet de la taille effective Q de la source d'électrons, la deuxième prend en compte les fluctuations de la tension accélératrice, de la variation de défocalisation D_s , et des fluctuations de courant dans les lentilles électromagnétiques. La troisième regroupe tous les autres paramètres sous une fonction gaussienne de largeur à mi-hauteur E_g . La FTC peut être corrigée en tout ou partie sur l'image pour rétablir le contraste

réel au sein de l'échantillon et éventuellement restaurer le signal correspondant aux fréquences non transmises (Frank, 2006) (voir chapitre II).

3. Dégâts d'irradiation et conditions d'acquisition des images

Les échantillons hydratés congelés utilisés en cryo-microscopie sont extrêmement sensibles aux effets des électrons qui produisent des dégâts d'irradiation se traduisant par la formation de radicaux libres à l'origine du phénomène de « bubbling » (Leapman et Sun, 1995) puis par la destruction de l'échantillon. Les doses admissibles pour l'acquisition d'une image s'en trouvent significativement réduites, autour de $10 \text{ e}/\text{\AA}^2$. Le recours à de si faibles doses impose une approche différente de l'acquisition des images. La microscopie est effectuée en mode « low-dose », le microscope étant alors équipé d'un système d'acquisition fonctionnant en trois étapes :

- le mode « search » permet de rechercher les régions d'intérêt au sein de l'échantillon sous irradiation minimum,
- le mode « focus » permet de faire la mise au point avant l'acquisition de l'image, à distance de la zone d'intérêt (2 à 3 μm) pour ne pas l'irradier lors de cette étape.
- le mode « photo » correspond au mode d'acquisition de l'image. Ce mode est réglé avec le grandissement, l'intensité et le temps d'exposition voulu. Chaque image est acquise avec une dose de $10 \text{ e}/\text{\AA}^2$. Chaque région peut être photographiée plusieurs fois (pour acquérir des séries focales par exemple) dans la limite d'une dose totale de 30 à 40 $\text{e}/\text{\AA}^2$ (Conway et al, 1993).

3-Apport du CEMOVIS à la connaissance de l'organisation des molécules biologiques

Le maintien de l'état hydraté des échantillons permet d'étudier les complexes macromoléculaires in situ dans leur environnement natif ; aussi bien au sein des cellules qu'in vitro sur de macromolécules isolées et de systèmes modèles. Nous avons choisi de présenter ici quelques exemples illustrant les apports de la technique de CEMOVIS : d'une part une imagerie sub-cellulaire à une résolution jamais atteinte auparavant, et d'autre part la

préservation de structures labiles, détruites par les traitements employés en microscopie traditionnelle.

A-Organisation moléculaire de la cellule

La technique de CEMOVIS a permis d'observer la cellule dans son ensemble à faible grossissement mais elle a aussi été utilisée pour des analyses de la structure fine de différents composants cellulaires *in situ* révélant des caractéristiques jusqu'alors inconnues. Parmi ces composants, on peut citer par exemple l'étude des éléments du cytosquelette qui a permis de montrer l'existence de particules dans la lumière des microtubules (Garvalov et al, 2006), la présence d'un manteau protéique présentant une périodicité de 8-9 nm autour des vésicules golgiennes, différentes des clathrines (Bouchet-Marquis et al, 2008). Les travaux de Zuber et al (2005) ont également permis de montrer l'existence d'une forte densité de matériel dans l'espace synaptique avec une organisation périodique (8,2 nm). Les travaux de Vanhecke et al (2010) sur les corps multi-lamellaires impliqués dans la sécrétion du surfactant pulmonaire ont mis en évidence des empilements périodiques de membranes (7,3 nm) alors que les techniques conventionnelles montraient un empilement moins régulier. Enfin, les travaux de Zuber et al (2008) ont permis de visualiser la membrane externe des mycobactéries (*Mycobacterium segmatis*) dont l'existence avait été suggérée mais que les coupes ultrafines en microscopie conventionnelle n'avaient pas permis de détecter (Daffé et Draper, 1998 ; Draper, 1998 ; Puech et al, 2001).

Les exemples d'informations apportées par le CEMOVIS sont nombreux et nous avons choisi d'en illustrer deux : i) la structure des desmosomes car ces travaux illustrent la capacité du CEMOVIS et CETOVIS (Cryo-Electron Tomography Of Vitreous Sections) à permettre l'observation de structures biologiques *in situ* et même l'obtention de leur structure tridimensionnelle par cryotomographie en conservant leur organisation native et ii) l'organisation de l'ADN dans les spermatozoïdes humains et d'étalons car ces travaux illustrent la capacité du CEMOVIS à atteindre une résolution assez élevée (~2 nm).

- Les desmosomes

Les desmosomes, jonctions protéiques impliquées dans la constitution des épithéliums ont été très étudiés en microscopie électronique par les méthodes conventionnelles. Les meilleurs résultats obtenus par cryosubstitution montrent que les cadhérines impliquées dans ces jonctions sont irrégulièrement organisées (Figure I.11A) (He et al, 2003). L'observation de

ces mêmes jonctions par CEMOVIS (Al-Amoudi et al, 2004) montre des jonctions organisées où les cadhérines sont ordonnées avec une périodicité de 5 nm (figure I.11B).

L'emploi de la cryotomographie électronique (CETOVIS) a permis de reconstruire l'organisation tri-dimensionnelle et le mode d'interaction des cadhérines dans ces jonctions après recalage de la structure atomique de la cadhérine C dans les tomogrammes (Figure I.11 C-E, Al-Amoudi et al, 2007).

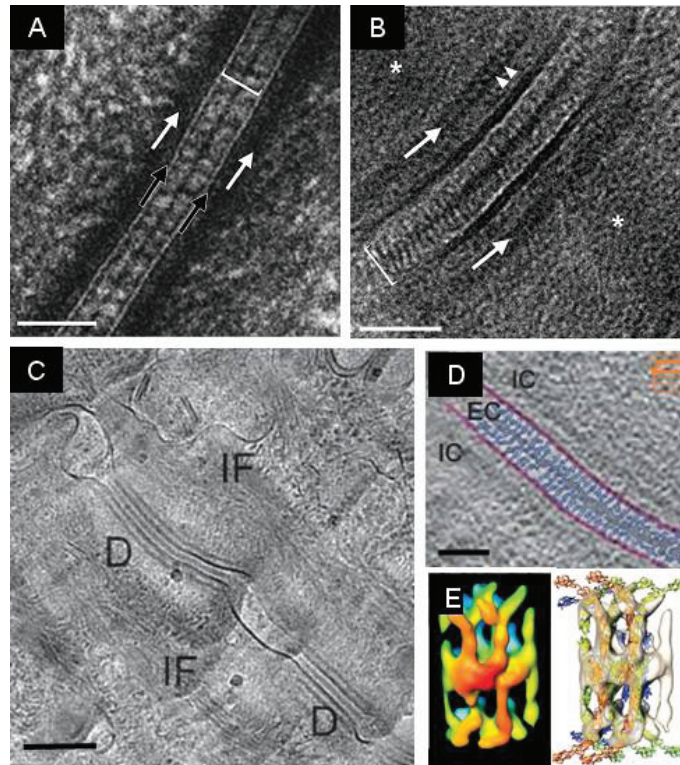


Figure I.11 : Organisation structurale des desmosomes (d'après Al-Amoudi et al, 2004 et al-Amoudi et al, 2007) (A) Desmosomes d'épiderme de souris préparés par cryo-substitution (He et al, 2003). (B) Desmosomes d'épiderme humain observés par CEMOVIS (Al-Amoudi et al, 2004). Les crochets blancs montrent l'espace intercellulaire, les flèches noires indiquent les membranes cellulaires et les flèches blanches les plaques intracellulaires. Les astérisques indiquent les régions riches en filaments intermédiaires et les pointes de flèches blanches la présence de structures périodiques dans les plaques intracellulaires. Echelles 50 nm. (C) Vue générale d'une jonction intercellulaire contenant des desmosomes D. Ces régions sont bordées par des filaments intermédiaires IF à l'intérieur des cellules. Echelle 200 nm. (D) Observation d'une section du volume reconstruit par tomographie présentant l'espace extracellulaire EC et intracellulaire IC avec les cadhérines formant la jonction. Echelle 35 nm. (E) Visualisation de l'interaction des cadhérines dans l'espace extracellulaire obtenue en moyennant le signal sur plusieurs sous-tomogrammes, et positionnement de la structure atomique de la cadhérine dans la carte de densité reconstruite.

- L'ADN des spermatozoïdes :

L'organisation supramoléculaire de l'ADN dans les têtes des spermatozoïdes humains et d'étalon, natifs et après décondensation partielle, a pu être analysée par CEMOVIS (Sartori et al, 2001). L'utilisation de cette méthode a permis de visualiser le nucléofilament d'ADN-protamine, ce qui n'est pas possible par microscopie conventionnelle et d'analyser son organisation supramoléculaire (Figure I.12).

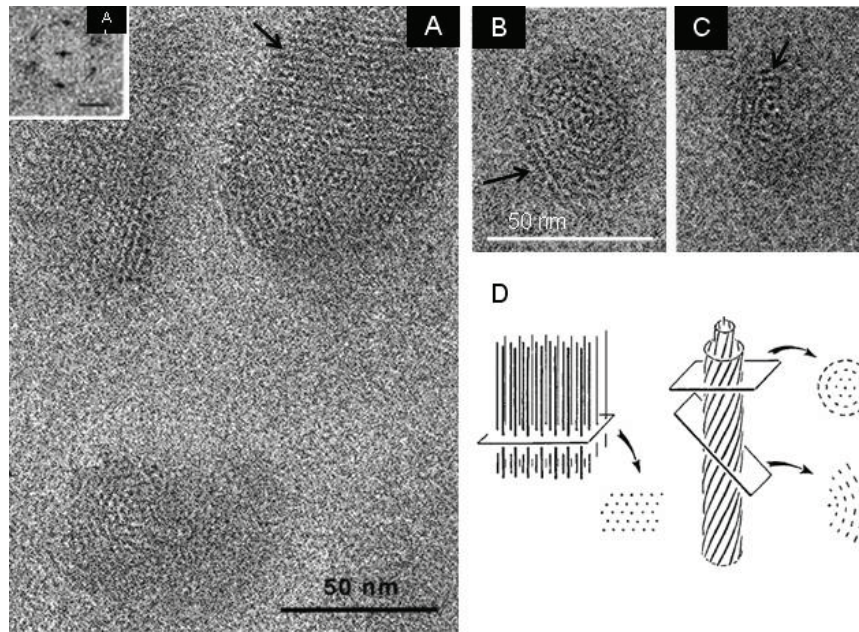


Figure I.12. Spermatozoïdes d'étalon analysés par CEMOVIS après décondensation partielle de la chromatine au DTT (d'après Sartori et al, 2001). Différents types de motifs sont observés (A-C). Les molécules d'ADN perpendiculaires au plan d'observation apparaissent comme des points sombres de 2 nm de diamètre. On peut alors visualiser directement le réseau hexagonal entre segments de la molécule ou sur le diffractogramme en insert en A' (échelle 1/2,7 nm). Lorsque l'ADN est oblique au plan d'observation, on voit apparaître des motifs striés (flèches). On observe des domaines où l'ADN est aligné unidirectionnellement selon un réseau hexagonal (A), et des domaines où l'ADN présente une organisation dite en double torsion (B, C), schématisés en (D). Il est à noter que le réseau hexagonal n'est pas déformé par le processus de coupe.

B-Assemblages supramoléculaires in vitro

La technique CEMOVIS ne s'applique pas seulement aux cellules ou aux tissus mais aussi aux structures supramoléculaires obtenues in vitro notamment : les phases lamellaires phospholipidiques. Les travaux de Ruiz et al (1994) sur des phases lamellaires phospholipidiques montrent que le CEMOVIS permet d'étudier des systèmes organisés avec une résolution élevée (1.5 nm) et d'analyser les défauts de la structure lamellaire (Figure I.13).

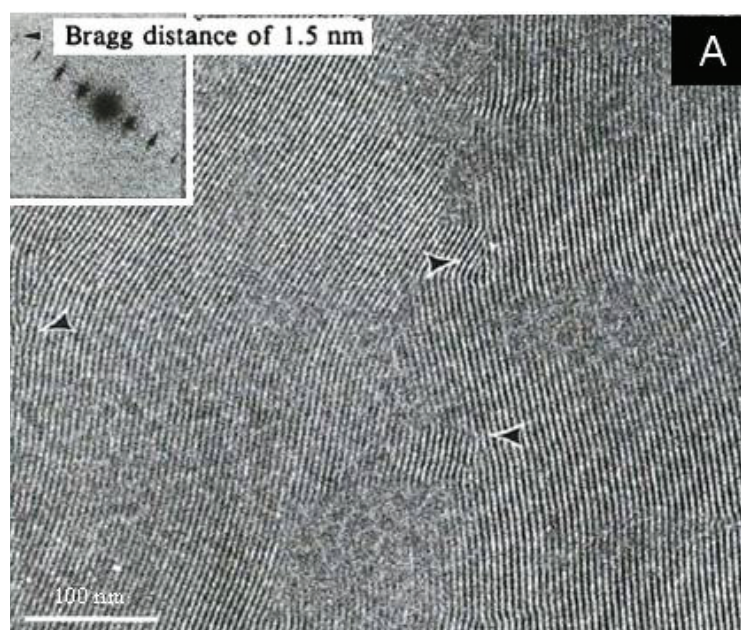


Figure I.13 : Assemblages supramoléculaires en phase lamellaire de DPPC/eau (25/75 %) observés in vitro par CEMOVIS. (d'après Ruiz et al, 1994).

Le diffractogramme montre une information jusqu'à 1,5 nm. On peut visualiser le cœur des défauts de la structure lamellaire (pointes de flèches).

Cette technique a également permis la caractérisation structurale de phases denses formées de particules cœur de nucléosomes (NCP) en solution concentrée (300 à 370 mg/ml) comme nous le détaillerons dans le paragraphe II.2.C.

Enfin, cette technique a été utilisée depuis ses débuts sur des cristaux de protéines (Chang et al, 1983 ; Richter, 1994c) afin d'estimer ses potentialités et ses limites, en particulier en termes de résolution. Récemment, une analyse par diffraction électronique de cryosections de cristaux de lysozyme a montré que l'information structurale dans les sections vitreuses était préservée jusqu'à 7,9 Å (Sader et al, 2009).

Les quelques exemples de succès du CEMOVIS et du CETOVIS montrés dans ce chapitre constituent une sélection de faits remarquables par l'information biologique inédite qu'ils apportent ou par leur résolution spatiale élevée pour du matériel biologique in situ. Ces succès ne doivent pas faire oublier les difficultés et les limites de ces techniques.

- Tous les échantillons ne se comportent pas de la même manière lors de la vitrification. Cette étape est fortement dépendante de la teneur en eau de ses compartiments et organites ce qui signifie que toutes les cellules ne peuvent pas être vitrifiées sans ajout d'un cryoprotectant (Zuber et al, 2005). Or ces composés ne sont pas sans effet sur les structures cellulaires et peuvent provoquer des effondrements (Meryman 2007). Ces techniques ne seront pas toujours adaptées au type de cellule étudié ou à la question posée, et la vitrification des objets massifs reste une étape difficile.
- L'obtention systématique d'images de qualité à fort grossissement (30000-50000x) constitue la principale limitation actuelle de la méthode. Notons par ailleurs que les coupes sont rarement parfaitement planes ainsi que l'a montré l'acquisition d'images après inclinaison de l'échantillon à grand angle (Bouchet-Marquis et Hoenger, 2010), ce qui complique encore l'acquisition de ces images.

Les exemples présentés illustrent aussi le fait que les résultats les plus remarquables ont été obtenus sur des objets périodiques ou sur des objets de grande taille devant l'épaisseur de la coupe comme les microtubules (Bouchet-Marquis et al, 2007) ou les ribosomes (Ortiz et al, 2006). L'observation de plus petits objets comme les nucléosomes (11x 6nm) au sein des noyaux est plus difficile à réaliser.

II-Organisation de la chromatine dans les noyaux

1-L'ADN : support de l'information génétique

L'ADN ou Acide Désoxyribonucléique est le support de l'information génétique. Sa structure cristallographique est connue depuis longtemps (Watson et Crick, 1953). L'information est codée par une séquence de bases azotées, l'Adénine (A) et la Guanine (G) (bases puriques) ainsi que la cytosine (C) et la thymine (T) (bases pyrimidiques).

Les bases sont associées à un sucre, le 2-désoxy-ribose, porteur d'un groupement phosphate qui assure la liaison entre les sucres par une liaison phosphodiester. Cette architecture constitue un brin de la molécule d'ADN. Celle-ci est constituée par l'association antiparallèle de deux brins. Cette association en double hélice est médiée par l'interaction entre bases complémentaires A-T et G-C par deux et trois liaisons hydrogènes respectivement (Figure I.14). L'ADN est donc un polymère que la présence de groupements phosphate rend chargé négativement. Ce polyélectrolyte possède une charge négative tous les 1,7 Å et constitue un

polymère semi-flexible dont la longueur de persistance, en conditions salines « physiologiques » a été évaluée à 50 nm (150 paires de bases) (Bustamante et al, 2003 ; Wang et al, 1997).

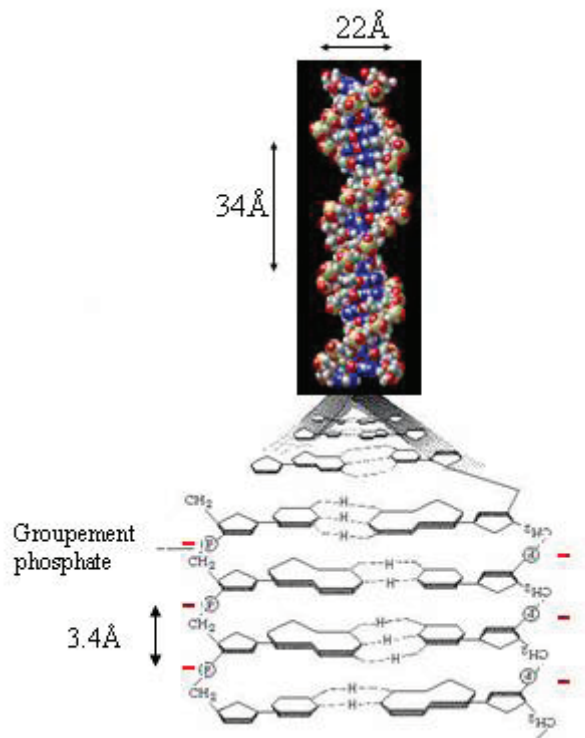


Figure I.14: structure de l'ADN

La formation de la double hélice résulte de l'interaction entre bases complémentaires par des liaisons H. Chaque brin est constitué d'une série de nucléotides reliés entre eux par une liaison phosphodiester. La présence de groupements phosphate rend cette structure négativement chargée.

Des variations structurales permettent de distinguer deux formes principales de la molécule d'ADN, la forme A que nous ne détaillerons pas ici et la forme B considérée comme la forme canonique qui présente un diamètre de 2 nm avec 10,5 paires de bases par tour d'hélice. Deux paires de bases consécutives sont distantes de 3,4 Å. La double hélice forme des petits et des grands sillons de 12 Å et 22 Å (Wing, 1980).

2-Association de l'ADN et des protéines histones

A-Les histones

Les histones, riches en acides aminés basiques (arginine et lysine), qui leur confèrent une charge globalement positive, se répartissent en deux groupes, les histones de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) associés à l'ADN pour former les particules cœur de nucléosomes et les

histones de liaison (H1 ou H5) qui jouent un rôle important dans les étapes de compaction de la chromatine.

En solution, dans des conditions physiologiques, les histones H2A et H2B interagissent par paires alors que les histones H3 et H4 forment des tétramères (Kelley, 1973 ; Kornberg et Thomas, 1974). A forte concentration en sels monovalents (2 M NaCl), deux dimères H2A-H2B et un tétramère (H3-H4)₂ s'associent pour former un octamère (Shaw et al, 1976 ; Thomas et Kornberg, 1975 ; Thoma et Butler, 1977 ; Ruiz-Carillo et al, 1979). La structure de l'octamère d'histones a été obtenue à 3,1 Å de résolution par cristallographie des rayons X (Arents et al, 1991). Il s'agit d'un disque de 55 Å d'épaisseur et de 70 Å de diamètre, en accord avec les études précédentes (Klug et al, 1980). Il est constitué d'un tétramère (H3-H4)₂ entouré de deux dimères H2A-H2B. La plupart des acides aminés sont localisés dans des hélices α (45%), les autres se trouvent dans des brins β (10%) et des boucles non structurées (25%). Les demi-tétramères H3-H4 et les dimères H2A-H2B s'associent selon un motif « poignée de main ». A l'intérieur de chacun de ces domaines, on retrouve une structure commune (repliement de type histone) constituée d'une longue hélice centrale avec de part et d'autre une boucle et une hélice plus courte.

B- La particule cœur de nucléosome (NCP)

Jusque dans les années 1970, l'interaction des histones avec l'ADN était très mal connue. Les expériences de digestion à la désoxyribonucléase ont montré que l'ADN des hépatocytes de rat pouvait être décomposé en unités de même taille (Hewish et Burgoyne, 1973). Un an plus tard, l'existence d'une structure périodique au sein de ces unités a pu être démontrée par Kornberg et Thoma (1974). Ces unités, constitués d'ADN et de protéines histones ont une masse moléculaire de 205 kDa et constituent des particules cœur de nucléosomes (NCP). Plusieurs études de cristallographie aux rayons X ont permis d'obtenir leur structure. La première structure obtenue (7Å de résolution), proposée en 1984 par Richmond et al, a permis de montrer que l'ADN s'enroule en un tour trois quart autour du cœur d'histones. La longueur d'ADN impliquée est de 146 paires de bases. Une structure à plus haute résolution (2,8 Å) a pu être obtenue sur des NCP recombinants (Luger et al, 1997). Les particules cœur de nucléosome possèdent un pseudo-axe de symétrie ou axe dyade (Figure I.15A). Les NCP ne sont pas parfaitement symétriques, un côté de cet axe comprend 73 paires de bases et l'autre 72. La structure proposée par Davey (2002) à 1,9 Å de résolution a été obtenue avec 147pdb ce qui symétrise le NCP (73pb de chaque côté) (Figure I.15B). ADN et histones interagissent

en 14 points tous les 10pb environ. Au niveau des douze positions les plus centrales, une chaîne latérale d'arginine interagit avec un petit sillon d'ADN par des liaisons H, hydrophobes, électrostatiques et Van der Waals. Les histones contiennent à leurs extrémités N et C terminales, des acides aminés constituant des chaînes non structurées. Ces extensions encore appelées « queues des histones » présentent une grande mobilité et s'étendent largement au delà du cœur protéique ce qui empêche leur positionnement précis dans les structures cristallographiques. Toutefois, dans la structure proposée par Davey (2002), tous ces résidus sont positionnés mais avec une marge d'erreur très élevée pour les plus terminaux. Ces queues sont très riches en acides aminés basiques (chargés positivement) et subissent des modifications *in vivo* qui modulent leur charge globale, consistant en l'ajout d'un groupement chimique sur ces acides aminés chargés, en particulier sur les résidus lysines. On distingue surtout l'acétylation / déacétylation qui active ou réprime la transcription (Cheung et al, 2000). L'hyperacétylation rend les fibres de chromatine moins compactes *in vitro* (Garcia-Ramirez et al, 1995). Ces modifications sont regroupées selon des règles appelées « code des histones » et régissent en grande partie l'état conformationnel de la chromatine pour constituer l'euchromatine (forme peu compacte et transcriptionnellement active) et l'hétérochromatine beaucoup plus dense correspondant aux gènes réprimés.

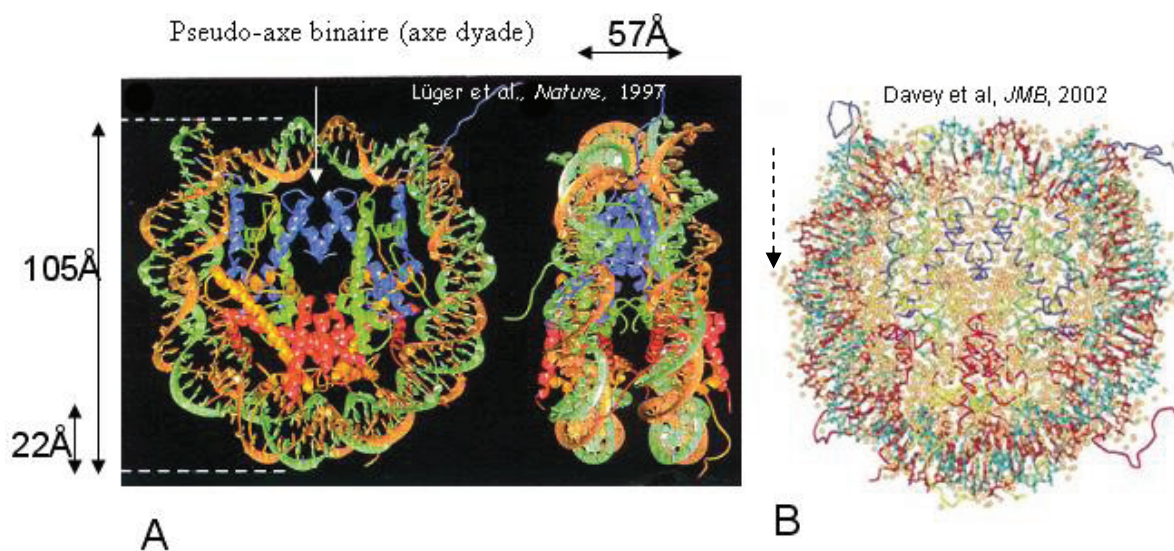


Figure I.15: structure cristallographique des particules cœur de nucléosomes

(A) Structure d'un NCP à 2,8 Å de résolution. L'ADN est enroulé autour du cœur protéique avec 72 paires de bases d'un côté et 73 de l'autre. Cette organisation décrit un pseudo-axe de symétrie (axe dyade) à la structure. (B) Structure d'un NCP à 1,9 Å de résolution. Les queues des histones sont positionnées avec une plus grande précision et les molécules d'eau en interaction avec le NCP sont visualisées (flèche noire pointillée).

Les NCP sont reliés entre eux par des fragments d'ADN nus (ADN de liaison) pour former une fibre de 11 nm (fibre chromatinienne), organisée en collier de perle, visualisée in vitro pour la première fois en microscopie électronique en transmission par Olins et Olins (1974). Chaque perle correspond à un nucléosome. De nombreuses études ont été menées sur cette fibre depuis les années 1970 pour comprendre l'effet de la concentration ionique et de la longueur de l'ADN de liaison sur sa structure. La plupart de ces expériences ont été réalisées in vitro sur du matériel génétique purifié et les résultats ont conduit à l'élaboration d'un modèle d'organisation à plusieurs échelles depuis la double hélice d'ADN jusqu'au chromosome métaphasique reproduit aujourd'hui dans de nombreux manuels et ouvrages de vulgarisation (Alberts et al, 2002) (Figure I.16). La plupart de ces niveaux d'organisation sont également proposés pour expliquer l'organisation du matériel génétique au sein du noyau interphasique. Ce modèle repose sur des repliements successifs de la fibre de 11nm pour constituer une fibre de diamètre supérieur (30 nm). Cette fibre forme ensuite des boucles qui s'enroulent en hélice autour d'un axe central pour former les bras des chromosomes métaphasiques (Figure I.17).

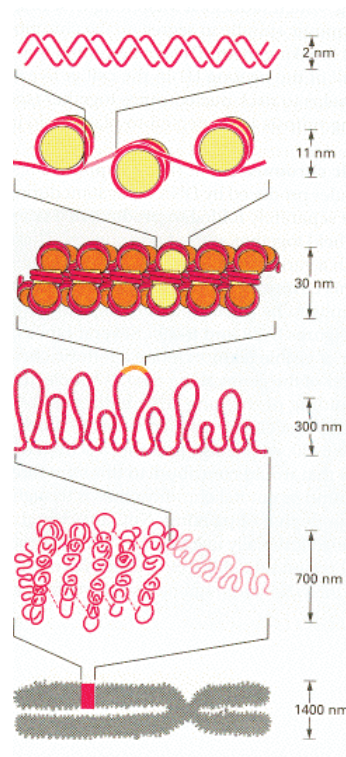


Figure I.16 : Schéma de repliement de la fibre de 11nm en chromosome métaphasique (Alberts et al, 2002). L'ADN s'enroule autour des nucléosomes pour former la fibre de 11nm en collier de perle qui se replie ensuite pour former une fibre de 30 nm. Cette fibre forme des boucles qui se replient autour d'un axe central pour constituer les bras du chromosome métaphasique.

Les niveaux d'organisation supérieurs de la fibre de 11 nm et leur existence même au sein des cellules sont sujets à controverse. Dans les paragraphes suivants, nous décrirons les principaux modèles d'organisation supramoléculaire proposés et nous discuterons les éléments en faveur de l'un ou l'autre des modèles.

C- Les modèles basés sur des études in vitro

1. La fibre de 30 nm

La chromatine est un polyampholyte en raison de la présence de l'ADN et des histones dont le cœur et les queues sont électriquement chargées. Sa charge globale est fortement négative. Cette caractéristique rend son état conformationnel particulièrement sensible à la force ionique et donc à la concentration en sel de l'environnement. De nombreuses études ont été menées pour rendre compte des conditions de formation et de la structure de la fibre de 30 nm. Widom (1986) a fait varier les concentrations en ions monovalents et en ions divalents et observé les effets sur la structure de la chromatine *in vitro* par microscopie électronique en transmission et diffraction des rayons X. Ces travaux ont abouti à un diagramme donnant l'état de repliement de la chaîne pour chacune des conditions testées (Figure I.17A). Pour de faibles concentrations en sel, les charges ne sont pas écrantées et tendent à se repousser, conduisant à une forme étendue de la chromatine (la fibre de 11 nm ou collier de perle) (Figure I.17B). Lorsque la concentration en sels monovalents (ou dans une moindre mesure en sels divalents) augmente, les ions écrantent les charges de la fibre et autorisent un rapprochement des NCPs. La fibre se condense alors pour former une fibre de 30 nm (Figure I.17C). Lorsque la concentration en ions divalents augmente fortement, les fibres sont fortement compactées et agrégées.

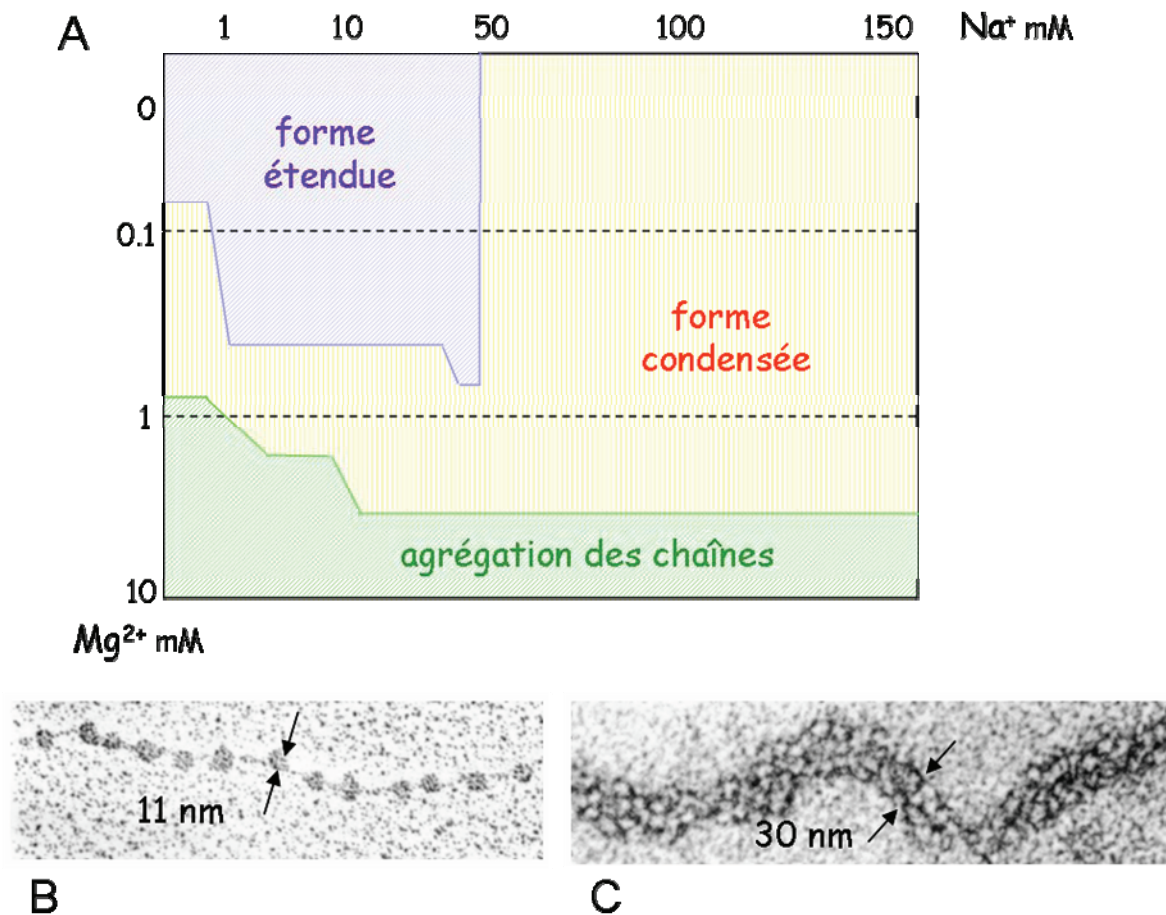


Figure I.17 (A) Conformation de la fibre de chromatine en fonction de la concentration en sels monovalents (Na^+) et divalents (Mg^{2+}). (B) pour des faibles concentrations en sels, la chromatine a une conformation étendue en collier de perle. (C) Pour des concentrations plus élevées en sels, la chromatine se compacte en une fibre de 30nm (d'après Widom, 1986).

La structure des fibres de 30 nm obtenues pour différentes conditions ioniques a été largement étudiée depuis les années 1970, essentiellement en microscopie électronique mais aussi par sédimentation ou par dichroïsme linéaire par exemple. Les différentes structures proposées peuvent être regroupées en deux catégories (Schiessel, 2003, Van Holde et Zlatanova, 2007) : les modèles de type solénoïde (Figure I.18A) et les modèles de type zig-zag (Figure I.18B)

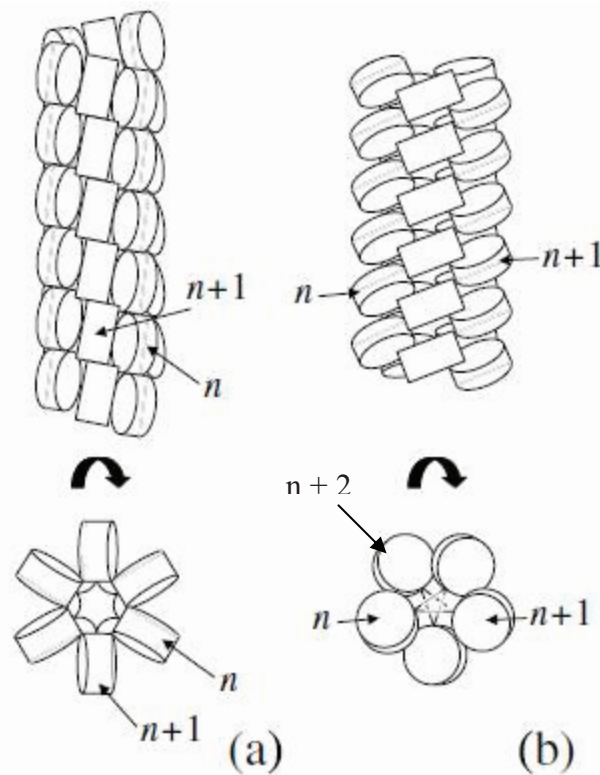


Figure I.18 (a) Modèle de fibre de chromatine en solénoïde (Schiessel, 2003). Les nucléosomes n et $n+1$, en regard, sont consécutifs dans la fibre de 11 nm **(b) Modèle de fibre en zig-zag.** Les nucléosomes n et $n+2$ sont en regard en raison de l'organisation des ADN de liaison

- Organisation selon un modèle en solénoïde

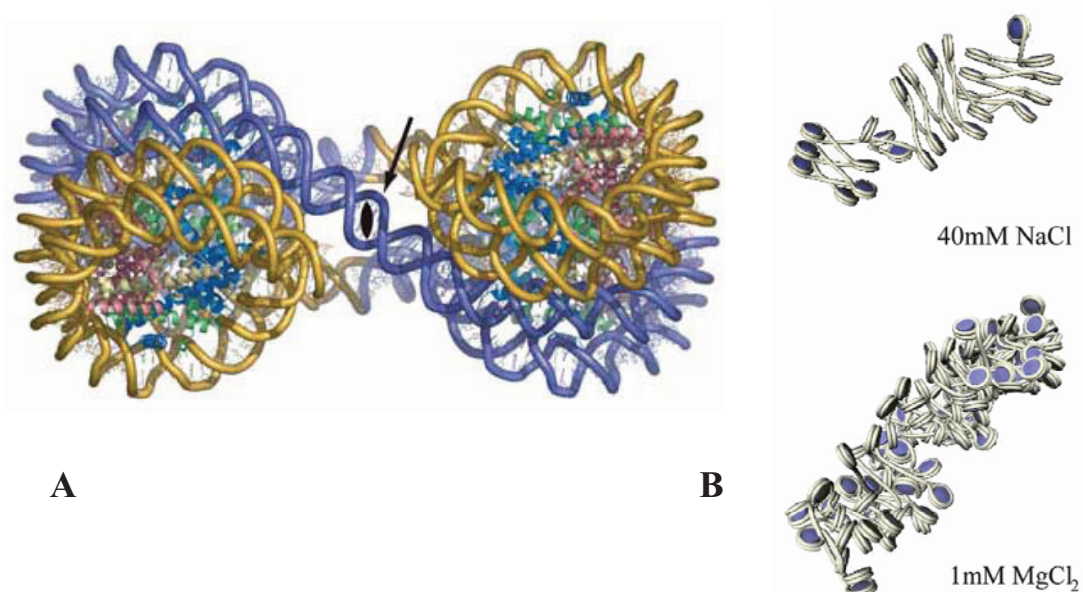
Ce type d'organisation implique un agencement le long de la chaîne où chaque nucléosome n interagit avec les nucléosomes $n+1$ et $n-1$, directement voisins dans la fibre de 11 nm (Figure I.18A). Ce type de structure a été initialement proposé par Finch et Klug (1976) sur la base d'observation par coloration négative en microscopie électronique en présence d'ions Mg^{2+} . De nombreuses variantes structurales de ce modèle ont été proposées en fonction des conditions expérimentales (Thoma et al, 1979 ; Butler et Thomas, 1980 ; Bates et al, 1981 ; Pearson et al 1983, McGhee et al, 1983).

Des travaux plus récents de cryomicroscopie électronique ont apporté des résultats en faveur du modèle solénoïdal. Robinson et al (2006) et Routh et al (2008) ont formé des fibres de 30 nm in vitro à l'aide de séquences positionnantes à forte affinité pour les cœurs d'histones (séquence 601) reliées par des ADN de liaison de longueur variable. La condensation de cette chaîne à l'aide de sels divalents (1,6 mM $MgCl_2$) conduit à la formation de fibres solénoïdales très compactes.

- Organisation selon un modèle en zig-zag

Ce deuxième modèle propose deux départs d'hélices de nucléosomes reliées par des segments d'ADN de liaison tendus. Chaque nucléosome n se trouve en interaction avec les nucléosomes $n-2$ et $n+2$ (Figure I.18B). Le diamètre de la fibre sera donc clairement dépendant de la longueur de l'ADN de liaison. Ce modèle a été introduit par Worcel et al (1981), il a été décliné en différentes variantes en fonction notamment de la longueur de l'ADN de liaison (Williams et al, 1986, Woodcock et al, 1984).

Ce type d'organisation est également soutenu par des travaux de cristallographie aux rayons X (Figure I.19A) (Schalch et al, 2005) et de tomographie électronique (figure I.19B) (Horowitz et al, 1994). Schalch et al (2005) ont obtenu la structure cristallographique d'une chaîne de quatre nucléosomes à 9 Å de résolution. Cette structure présente deux empilements de deux NCPs interagissant par les faces inférieure et supérieure des octamères d'histones (tétranucléosome). Les NCP sont reliés par un ADN de liaison de 20 pb en un motif en « zig-zag » (Figure I.19A). Des travaux de tomographie électronique proposent aussi un modèle de ce type dont la caractéristique réside dans l'absence de symétrie à grande échelle, la structure de la fibre varie de manière continue et les auteurs attribuent cet effet à la variabilité de la longueur de l'ADN de liaison (Horowitz et al, 1994). Localement l'arrangement des NCPs est en accord avec la structure cristallographique du tétranucléosome (Schalch et al, 2005).



L'organisation en zig-zag de la fibre de 30nm a été confortée par des travaux récents sur la chromatine isolée d'érythrocytes de poulet par cryotomographie en présence de sels monovalents (5 mM et 40 mM NaCl) ou divalents (1 mM $MgCl_2$) (Scheffer et al, 2011a). A 5 mM en sels, la chromatine présente une conformation étendue avec un motif en zig-zag. A 40 mM NaCl ou 1 mM $MgCl_2$, les fibres sont plus compactes et les nucléosomes s'empilent par leurs faces supérieures et inférieures pour former des colonnes à courte distance (3 à 4 nucléosomes maximum). Les nucléosomes sont distants de 7,5 nm en moyenne. Ces travaux montrent que la chromatine peut former une fibre de 30 nm de diamètre avec des empilements de nucléosomes qui n'avaient jamais été observés dans ce type de structure auparavant (Figure I.19B).

2. Phases denses de nucléosomes purifiés

D'autres études ont été menées sur des phases denses de nucléosomes purifiés par CEMOVIS et diffraction des rayons X (Leforestier et al, 2001 ; Mangenot et al, 2003) pour mimer les effets d'encombrement stérique rencontrés *in vivo*. Ces travaux ont été menés sur une large gamme de concentration en sels monovalents et de pression osmotique en concentrant l'échantillon en présence de polyéthylène glycol (PEG) pour couvrir des gammes de concentrations en nucléosomes comparables à celles du noyau et établir un diagramme de phase (Figure I.20). Les auteurs ont observé un ensemble de phases dont la nature dépend des conditions environnementales. Lorsque la pression osmotique est faible, on observe une phase isotrope dans laquelle les nucléosomes sont désordonnés, quelle que soit la concentration en sel Na^+ (3,5 mM à 150 mM). Pour une pression osmotique un peu plus forte, les nucléosomes s'empilent pour former des colonnes (phase colonnaire isotrope). L'augmentation de la concentration ionique conduit à la formation d'une phase nématique de colonnes de longueur variable (25 à 120 nm). Dans chaque colonne, les nucléosomes sont libres de leur orientation. Pour des pressions plus élevées (3 à 25 atm), les colonnes de nucléosomes s'ordonnent et les phases formées dépendent de la concentration ionique. La phase lamello-colonnaire formée à faible concentration saline (<25mM NaCl) est constituée par des colonnes de nucléosomes alignées en parallèle, qui s'organisent en bicouches à longue distance (Leforestier et al 2001) (Figure I.21A). L'axe dyade des NCP est orienté vers l'extérieur de la bicouche (Figure I.21B et C, flèches noires). Cette phase évolue vers une phase hexagonale inverse à plus forte pression. A forte concentration saline (50 à 160 mM), les colonnes de nucléosomes s'organisent pour former une phase colonnaire hexagonale dans laquelle la concentration en ADN est très élevée (250 à 290 mg/mL).

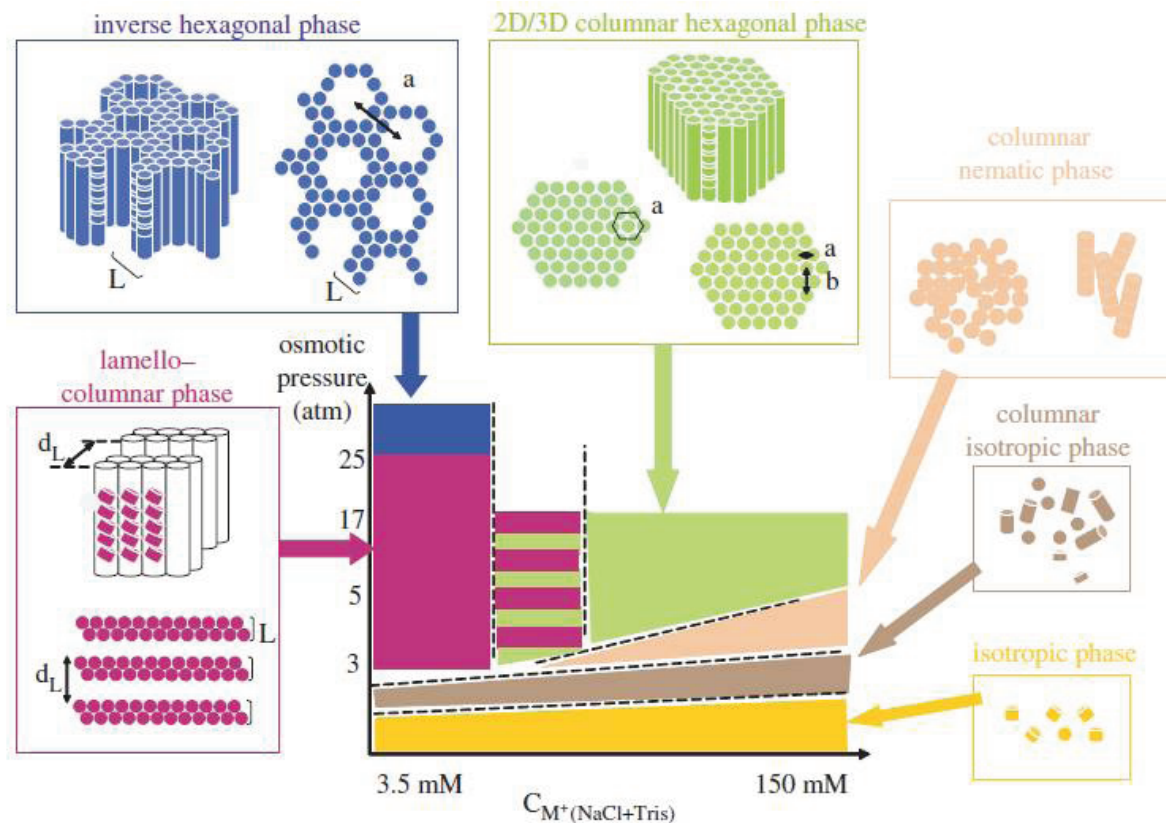


Figure I.20: Diagramme de phase de NCP natifs pour différentes concentrations en sel et pression osmotique (tiré de Livolant et al, 2006). Les nucléosomes tendent à former des empilements en colonnes. Celles-ci s'organisent en différentes phases plus ou moins compactes et ordonnées en fonction de la concentration en NCP (modulée par la pression osmotique) et de la concentration en sels monovalents dans la solution.

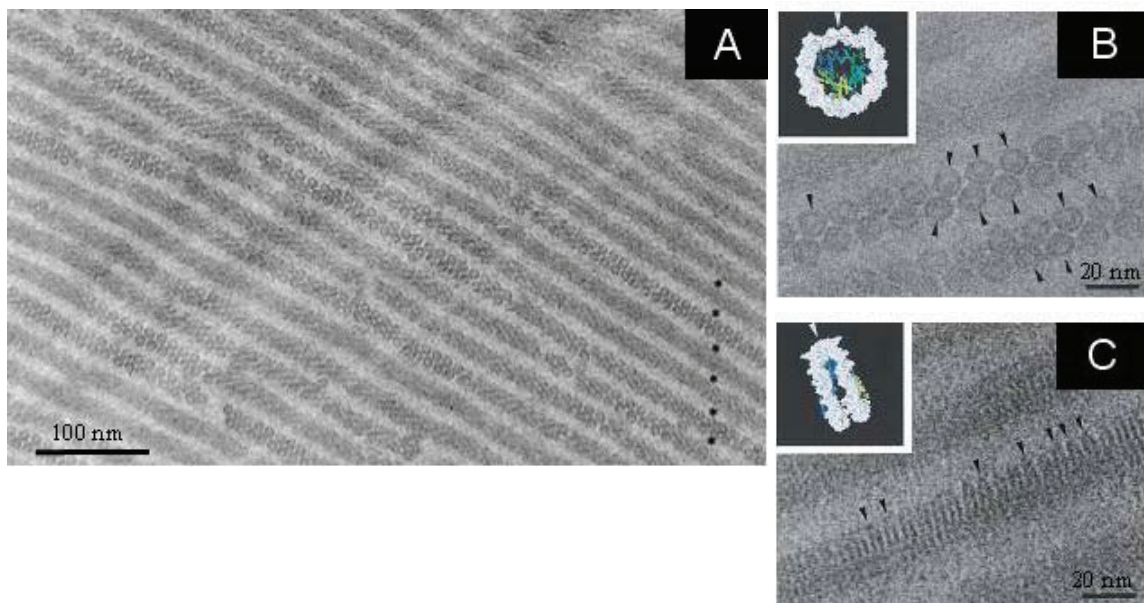


Figure I.21: Particules cœur de nucléosome (NCP) organisées en phase lamellaire (d'après Leforestier et al, 2001). (A) Phase lamello-colonnaire de nucléosomes observée par CEMOVIS en coupe transversale. Chaque lamelle est une bicouche de colonnes de NCP séparée de la suivante par une couche de solvant (*). (B) Colonnes de nucléosomes perpendiculaires au plan de coupe, en vue de dessus. (C) Colonnes de nucléosomes en vue de profil (parallèles au plan de coupe). La comparaison à la structure cristallographique (encart, d'après Lüger et al, 1997) permet d'orienter l'axe dyade des nucléosomes (flèches noires). Les NCP sont disposés « dos à dos », les extrémités du brin d'ADN sont tournées vers la couche de solvant.

3. Limites des approches *in vitro*

Les approches réalisées *in vitro* sur des fragments de chromatine extraite présentent de nombreux inconvénients. Certains travaux sont basés sur l'utilisation de séquences d'ADN positionnantes à forte affinité pour les nucléosomes, conçues artificiellement. Ce type de séquences n'est pas représentatif de la variabilité des séquences chromatiniennes en fonction des régions du génome et l'organisation très conservée des fibres formées dans ces conditions peut résulter de l'uniformité de positionnement des nucléosomes (Van Holde et Zlatanova, 2007).

De plus, de nombreuses études sont menées dans des conditions de concentration en ADN inférieures à celles rencontrées *in vivo*. Chaque chromosome représente en effet une longueur de contour de l'ADN de 1 à 10 cm. Cette longueur, importante au regard des dimensions attendues pour les territoires chromosomiques, implique une forte compacité des chromosomes interphasiques avec un encombrement moléculaire important caractérisable par la concentration en ADN (Kellenberger et al (1986) et Daban (2000)). Des études menées par microscopie électronique chez différents organismes et à différents stades du cycle cellulaire montrent que la concentration locale en ADN est très élevée dans le chromosome interphasique (Minton, 1981 ; Manuelidis et Chen, 1990 ; Lewin, 2000) et plus élevée encore au sein des chromosomes métaphasiques (Bennett et al, 1983, Heslop-Harrison et al, 1989, Fritzsche et Henderson, 1996) comme le résume Daban (2000, 2003) dans le tableau I.1.

Chromatine et Organisme	Concentration en ADN (g/mL)	Présence de nucléosomes	Auteurs
Noyaux interphasiques	0.1	oui	Manuelidis et Chen (1990) Lewin (2000)
Chromosomes métaphasiques (fibroblastes humains)	0.16	oui	Bennett et al (1983) Heslop-Harrison et al (1989)
Chromosomes métaphasiques (lymphocytes humains)	0.12	oui	Fritzsche et Henderson (1996)
Euglène (chromosomes condensés tout au long du cycle cellulaire)	0.2	oui	Bohrmann et al (1983)

Tableau I.1 : Concentration en ADN dans les chromosomes interphasiques ou mitotiques de quelques organismes (d'après Daban (2003)).

Ces concentrations (en moyenne 0,17 g/mL) sont très supérieures à celles atteintes dans les modèles proposés *in vitro* et les effets éventuels de cette forte compacité sur les interactions entre nucléosomes ne sont pas toujours pris en considération dans la plupart des travaux mentionnés dans ce chapitre.

Les travaux réalisés sur les phases denses de nucléosomes prennent en compte ce paramètre et montrent la formation de structures ordonnées complexes dans des conditions expérimentales (concentration moléculaire et force ionique) proches de celles du noyau (50 à 250 mg/mL en ADN) et diffèrent grandement des modèles de fibres classiquement proposés *in vitro*. Toutefois, ces travaux ne rendent pas compte de tous les paramètres impliqués dans l'environnement du matériel génétique dans les noyaux. En effet, l'absence d'ADN de liaison dans ces expérimentations constitue une limitation pour l'extension à la chromatine dans les noyaux mais ce n'est pas la seule.

Enfin, les expérimentations réalisées *in vitro* ne prennent pas, pour la plupart, en considération l'existence d'autres molécules au sein du noyau comme les histones de liaison ou les protéines qui jouent un rôle dans la condensation de la chromatine en hétérochromatine (comme HP-1 par exemple). Ces exemples montrent les limites de cette approche *in vitro* et indiquent clairement la nécessité d'étudier cette organisation directement au sein des noyaux.

3-Comment s'organise la chromatine au sein du noyau ?

A- Les territoires chromosomiques

Depuis la fin des années 1970, un modèle d'architecture nucléaire basé sur une répartition des chromosomes interphasiques en régions distinctes à émergé (Stack et al, 1977 ; Zorn et al, 1979). Cette organisation comprend des territoires chromosomiques (CT) occupant des volumes de 1 μ m de diamètre et des compartiments interchromatiniens (IC) qui les séparent (Figure I.22A). Des expériences de localisation par sonde fluorescente ont permis de conforter ce modèle. La méthode de « chromosome painting » a montré que les territoires de certains chromosomes pauvres en gènes se trouvent localisés à la périphérie du noyau alors que les chromosomes riches en gène se situent à l'intérieur (Figure I.22B) (Cremer et Cremer, 2011). Le couplage d'histones à la GFP dans les cellules HeLa (Kanda et al, 1998) confirme la présence de ces territoires et suggère l'existence d'une région apparemment dépourvue de nucléosomes entre eux (IC). L'IC est contigu au pore nucléaire et peut contenir des boucles de chromatine décondensée (Visser et al, 2000) ainsi que des facteurs de transcription et

d'épissage diffusant librement (Misteli, 2001), l'ARN messager (ARNm) a été localisé dans ces régions par hybridation de fluorescence *in situ* (FISH) (Verschure et al, 1999). Ce modèle, aujourd'hui accepté, a fait l'objet de nombreuses études et revues depuis les années 1990 (Cremer et al, 1993 ; Cremer et Cremer, 2001 ; Cremer et al, 2004 ; Cremer et Cremer, 2005, Cremer et al, 2006).

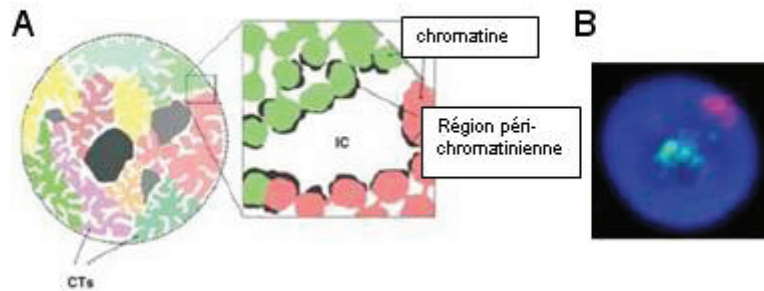


Figure I.22 (A) Schéma de l'organisation du noyau. Les territoires chromosomiques (CT) sont représentés de différentes couleurs. L'espace en blanc constitue l'espace interchromatinien IC et les régions péri-chromatinienne où se déroulent les phénomènes de transcription sont indiquées entre ces deux espaces (en noir). **(B) Exemple de localisation des chromosomes par hybridation de fluorescence in situ (FISH) dans un noyau interphasique (issu de Cremer et Cremer, 2011).** Les régions chromatinienne ont été ciblées au moyen d'une sonde fluorescente de couleur différente pour chaque chromosome. Le chromosome 19 est marqué en vert et le chromosome 18 en rouge.

B- Un modèle d'organisation multi-échelle : un objet fractal

Des études ont été menées par diffusion de neutrons ou microscopie de fluorescence pour comprendre l'organisation de la chromatine. Ces travaux présentent l'avantage de sonder l'organisation de la chromatine à différentes échelles depuis les nucléosomes jusqu'aux territoires chromosomiques ($\sim 1 \mu\text{m}$). Les résultats obtenus proposent une organisation identique à toutes ces échelles et décrivent la chromatine comme un globule fractal. Ce concept de « globule fractal », assez ancien, a été introduit par Grosberg et al (1988) et s'inscrit plus largement dans la physique des polymères que nous ne décrivons pas ici. De Gennes (1985) a montré que l'effondrement d'un polymère conduit à la formation d'une structure globulaire constituée elle-même de globules comparables à un facteur d'échelle près. Ce type d'organisation multi-échelle est qualifié de structure fractale. Ces structures sont particulièrement présentes dans la nature à chaque fois qu'une surface de contact entre deux milieux différents doit être importante malgré un volume réduit, comme le réseau bronchial au sein des poumons ou les systèmes dendritiques des neurones de Purkinje dans le cervelet

(Sapoval, 2001). Grosberg et al (1993) suggèrent que ce modèle peut rendre compte de l'organisation de la chromatine dans les noyaux des cellules eucaryotes. Cette théorie a été étayée par des résultats expérimentaux à partir des années 2000. Tout d'abord, des expériences réalisées sur des noyaux d'érythrocytes de poulet purifiés, par diffusion des neutrons aux petits angles (Lebedev et al, 2005), ont permis de montrer que l'intensité diffusée par la partie protéique de la chromatine (histones) aux différentes fréquences spatiales explorées suit une loi d'échelle avec une pente de 2,5 caractéristique d'un objet fractal qui s'étend sur une échelle de 15 nm (proche de la taille d'un nucléosome) à 3 μ m (le diamètre d'un territoire chromosomique). Cette organisation fractale est corroborée par d'autres travaux de microscopie optique de fluorescence. Sachs et al (1995) et Yokota et al (1995) ont réalisé des expériences de mesures de distance entre des sondes fluorescentes introduites dans les noyaux de cellules en interphase par hybridation de fluorescence *in situ* (FISH). La comparaison entre la distance entre ces marqueurs et la longueur des segments de chromatine entre les sites marqués dans le volume du noyau fait apparaître une loi d'échelle en deux parties caractérisées par une valeur de pente fractionnaire (Munkel et al, 1999) qui indiquent que la chromatine forme une structure fractale au sein des territoires chromosomiques proposés par Cremer (1993). Ce type d'organisation présent chez l'homme et le poulet semble assez bien conservé au cours de l'évolution. D'autres expériences plus récentes tendent à confirmer ce modèle ; ainsi Lieberman et al (2009) ont réalisé une cartographie de la proximité spatiale de segments d'ADN dans les noyaux par une méthode dite « HI-C » qui consiste à lier les segments proches dans l'espace par pontage au formaldéhyde puis à digérer la chromatine avec des enzymes de restriction avant d'analyser les fragments. Les régions du génome spatialement proches *in situ* restent associées après digestion enzymatique. Les résultats obtenus lors de ces travaux aboutissent à un modèle d'organisation de la chromatine en un globule fractal (Figure I.23B) en accord avec le modèle proposé par Grosberg et al (1988) où chaque région du polymère représentée par une couleur différente occupe une région bien délimitée du globule contrairement à ce que l'on attend dans un globule à l'équilibre (Figure I.23A) où chaque partie du polymère explore une grande partie du globule. Ce modèle semble de plus en plus attractif pour décrire l'organisation de la chromatine en raison de la concordance entre les contraintes topologiques de ce modèle et celles subies par la chromatine ainsi que par les caractéristiques adaptées à la vie de la cellule, notamment la possibilité de décondenser rapidement une région pour permettre la transcription (Mirny et al, 2011).

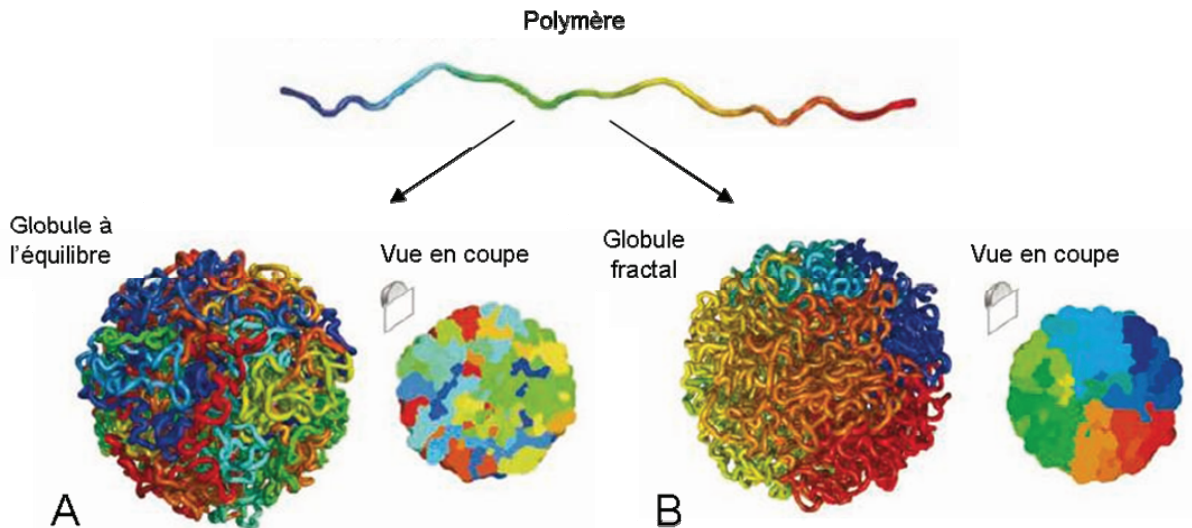


Figure I.23 (A) Repliement d'un polymère en un globule à l'équilibre (d'après Liebermann-Aiden et al, 2009). Les différentes régions du polymère n'occupent pas un espace spécifique dans la structure globulaire. **(B) Repliement de ce même polymère en un globule fractal.** Chaque région du polymère (couleurs différentes) forme un petit globule et occupe une région bien définie au sein du globule fractal qui signe une organisation à une échelle inférieure

C- Analyse ultrastructurale de la chromatine in situ

Depuis la fin des années 1980, la méthode CEMOVIS et la microscopie électronique ont été utilisées pour analyser la structure de la chromatine *in situ*.

La fibre de 30 nm a été observée dans les noyaux purifiés de concombre de mer (Woodcock et al, 1994) et d'érythrocytes de poulet par CEMOVIS (Woodcock et al 1994, Scheffer et al, 2011). Les coupes de noyaux hydratées-congelées montrent des fibres dont le diamètre vaut 32 nm en moyenne. Les nucléosomes peuvent être identifiés au sein des fibres (Scheffer et al, 2011b) (Figure I.24). Ces travaux tendent à corroborer l'existence de niveaux d'organisation supérieurs à 11 nm au sein des noyaux. La « fibre de 30 nm » proposée par Scheffer et al (2011b) est une hélice à deux départs dont l'organisation est proche de celle du tétranucléosome (Schalch et al, 2005) avec un pas de 22,8 nm et un nombre variable de nucléosomes par tour (6 en moyenne). Les nucléosomes au sein de cette fibre sont orientés avec leurs faces supérieure et inférieure en regard et sont séparés d'environ 10 nm.

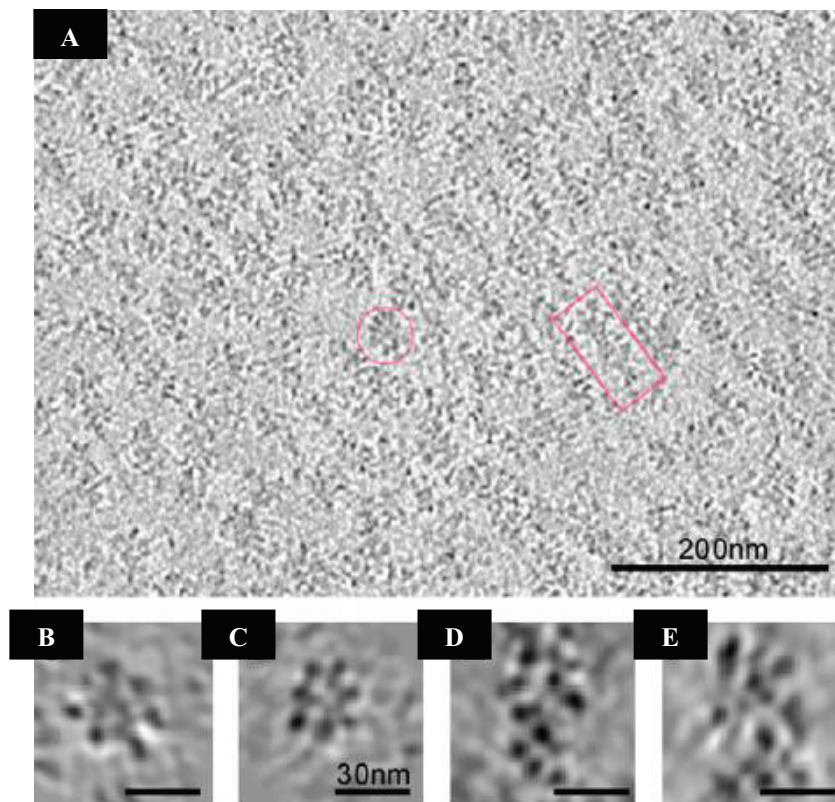


Figure I.24 Noyau d'érythrocyte de poulet isolé observé par CETOVIS sans fixation chimique (d'après Scheffer et al, 2011b) (A) Section de reconstruction tridimensionnelle de noyau. Des fibres de 30nm compactes mais clairement distinctes sont observables en vue transversale (rond rose) ou longitudinale (rectangle rose). (B et C) Fibres de 30 nm observées en coupe transversale. (D et E) Fibres de 30 nm en vue longitudinale.

La fibre de 30 nm a aussi été observée par microscopie conventionnelle (fixation chimique et inclusion en résine époxy) dans les noyaux purifiés de spermatozoïdes d'étoile de mer (Woodcock, 1994) ou par cryosubstitution dans les cellules en bâtonnets de la rétine de souris (Kizilyaprak et al, 2010). Ces travaux chez la souris montrent l'existence d'une fibre de 11 nm dans certaines régions du noyau où les nucléosomes sont identifiables sous la forme de petits cylindres ainsi que des régions où la chromatine forme des fibres de plus grand diamètre (~30 nm) et des régions très denses où aucun ordre n'est détectable. Kizilyaprak et al (2010) et Scheffer et al (2011b) attribuent l'existence de cette fibre de 30nm à une étape de compaction intermédiaire destinée à réprimer des gènes en conservant la possibilité de les réactiver. Les régions très denses et désordonnées sont attribuées à de l'hétérochromatine constitutive contenant des gènes fortement réprimés (Kizilyaprak et al, 2010).

L'ensemble de ces travaux confirme la possibilité de détecter une fibre de 30 nm dans certains noyaux par CEMOVIS, microscopie conventionnelle et même par cryosubstitution,

lorsqu'elle est présente ainsi que la possibilité d'identifier les nucléosomes au sein de ces fibres. Toutefois les conditions expérimentales utilisées dans ces travaux et les modèles biologiques choisis conduisent à considérer ces résultats avec prudence.

Certains travaux ont été réalisés par cryosubstitution (Kizilyaprak et al, 2010 ; Woodcock, 1994) et cette méthode ne permet pas de conserver l'échantillon hydraté tout au long de la préparation des échantillons et de leur observation et certains ont même été fixés chimiquement avant la congélation (Woodcock, 1994). De plus, les noyaux observés ont été purifiés et incubés dans un tampon avec une forte teneur en sel monovalents (150 mM NaCl) avant vitrification (dans les études par CEMOVIS comme par cryosubstitution) (Woodcock, 1994 ; Scheffer et al, 2011b). Or, Widom (1986) a montré que la chromatine isolée en présence de ces concentrations salines forme une fibre de 30 nm. Il est donc possible que la présence de ces fibres soit due aux conditions expérimentales. Cette possibilité est encore plus forte dans le cas des noyaux d'érythrocytes de poulet purifiés par Woodcock (1994) en présence d'un détergent qui détruit la membrane nucléaire. Dans ce cas, il n'existe plus de séparation entre la chromatine et le milieu extracellulaire.

Les modèles biologiques choisis dans ces études possèdent pour la plupart (spermatozoïdes d'échinodermes et érythrocytes de poulet) une chromatine inactive, des ADN de liaisons de grande longueur et peu ou pas de protéines non-histones. La généralisation immédiate de ces observations à d'autres types cellulaires n'est donc pas certaine.

En effet, d'autres études ont été menées dans le groupe de J. Dubochet sur des sections de cellules entières, hydratées-congelées (état natif) sans purifier les noyaux au préalable et n'ont pas mis en évidence de fibres de 30 nm. Pour l'essentiel, ces travaux ont porté sur la structure de la chromatine au sein du chromosome métaphasique. Les travaux de McDowall et al (1986) ont été réalisés sur des cellules CHO et HeLa en culture avec des coupes assez épaisses (70 nm à 200 nm). Les images acquises à fort grandissement (30 000x environ) avec une sous-focalisation importante (-4 à -10 μ m) présentent des chromosomes métaphasiques avec une texture granulaire homogène jamais observée par les méthodes conventionnelles de microscopie. Les transformées de Fourier réalisées sur ces régions montrent la présence de signal à 11 nm mais aucune structure n'est distinguable à une échelle supérieure. Cette information conduit les auteurs à invalider l'hypothèse de la présence d'une fibre de 30 nm *in vivo*. Selon ces auteurs, la capacité à visualiser un microtubule de 25 nm de diamètre en coupe transversale dans le cytoplasme de ces mêmes cellules dans ces conditions d'imagerie suggère qu'une fibre de 30 nm devrait également être visible dans le noyau. L'origine du signal à 11 nm n'est pas claire. Selon McDowall et al (1986), l'explication la plus simple

serait une agrégation désordonnée de sous-unités de 11 nm comparable à l'organisation des molécules dans un liquide comme celle observée sur des minichromosomes purifiés de virus simien SV40 (Dubochet et al, 1986). Des travaux plus récents, menés sur des chromosomes métaphasiques de cellule HeLa (Eltsov et al, 2008) (Figure I.25A) prennent en considération les éventuels effets de la fonction de transfert de contraste sur la détection des fibres et corrigent cette fonction en moyennant des séries focales acquises à différentes sous-focalisations (6 à 30 μm). Ces conditions d'imagerie sont très favorables à la détection de cette fibre mais ne montrent pas non plus de signal au delà de 11 nm, en accord avec les travaux de McDowall et al, 1986.

Pour tenter de comprendre l'origine du signal à 11 nm, ces mêmes auteurs ont purifié ces chromosomes et suivi l'organisation du matériel génétique lors de leur décondensation par chélation des ions Mg^{2+} . Le chromosome se décompacte en une masse assez homogène qui se dissocie en fibres en zig-zag de 11 nm sans passage par un état intermédiaire à 30 nm. Pour rendre compte de ces observations, Eltsov et al (2008) proposent un modèle structural du chromosome mitotique (figure I.25B) dans lequel les fibres de 11 nm se mélangent pour former une chromatine plus concentrée sans passer par la formation de fibre de 30nm.

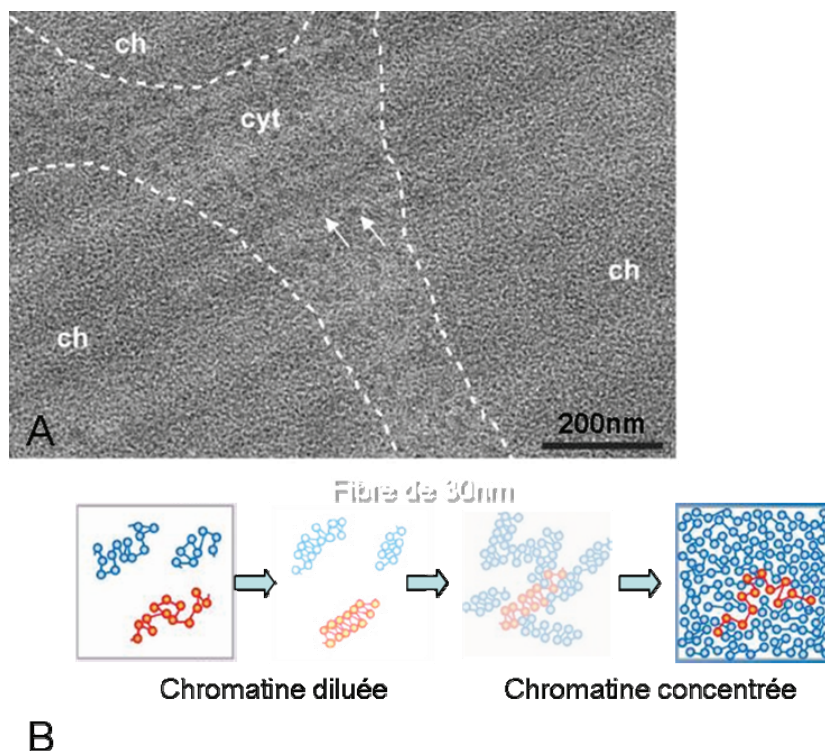


Figure I.25 (A) Noyau d'une cellule HeLa en mitose (d'après Eltsov et al, 2008). Région cytoplasmique (cyt) où sont visibles des ribosomes (flèches blanches) qui sépare les régions chromatiniques (ch). (B) Schéma du repliement de la chromatine dans les chromosomes métaphasiques. En raison de la forte densité moléculaire des noyaux, les fibres de 11nm se mélangent pour former une structure concentrée (mélange de polymères) sans passage par une fibre de 30nm.

Une étude a également été menée sur l'organisation de la chromatine au sein des noyaux interphasiques sur différents types cellulaires dont des cellules d'hépatome de rat (HTC) et de rein de rat (Ptk2) (Bouchet-Marquis et al, 2006). Sur ces images, la chromatine apparaît finement granulaire et répartie de manière non homogène formant des régions riches en matériel génétique avec une granulosité marquée, séparées par des régions dépourvues de ces structures, les régions interchromatiniennes (Figure I.26).

Les régions granulaires sont localisées indifféremment en périphérie du noyau ou plus au centre. A l'interface entre les régions granulaires et les régions interchromatiniennes (région périchromatinienne), la granulosité apparaît légèrement plus diffuse. Ces résultats sont compatibles avec le modèle d'organisation à grande échelle des territoires chromosomiques proposé par Cremer (1993).

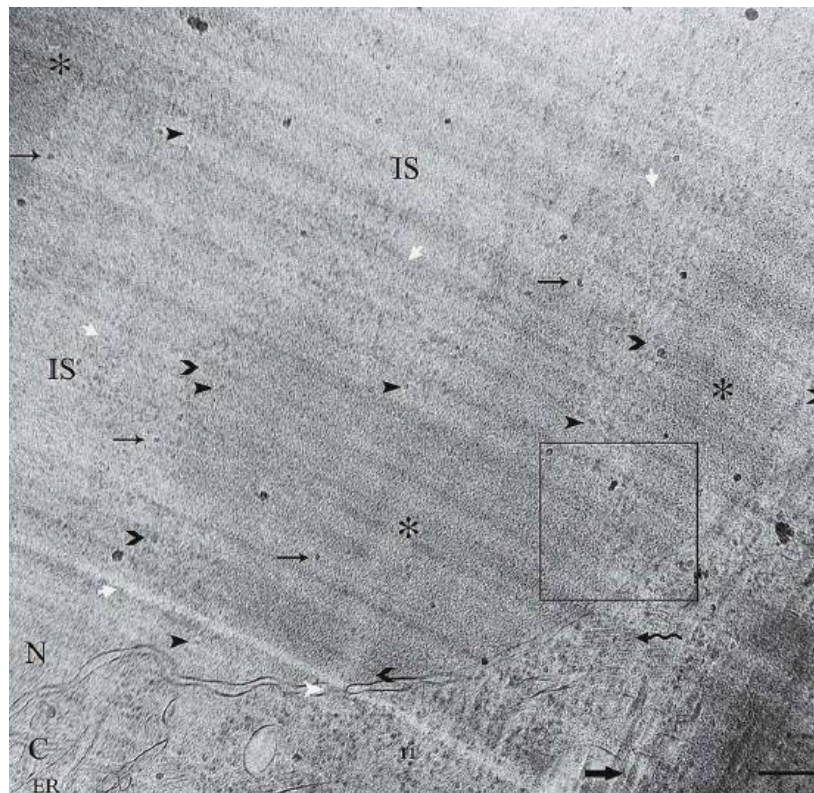


Figure I.26 Noyau interphasique de cellule épithéliale de rein de rat (PtK2) (d'après Bouchet-Marquis et al, 2006). Le noyau (N) présente trois régions de chromatine condensée (astérisque noire). L'enveloppe nucléaire est constituée par deux bicouches lipidiques. Un pore nucléaire est visible (flèche blanche). Des faisceaux de microtubules (flèche ondulée), des ribosomes (ri) et le reticulum endoplasmique (ER) sont également visibles dans le cytoplasme (C). Les bords de la chromatine condensée (flèches courtes blanches) sont irréguliers et montrent des fibres (têtes de flèches pleines) et des granules (têtes de flèches ouvertes). L'espace interchromatinien (IS) apparaît finement structuré avec un matériel fibro-granulaire sans domaine reconnaissable. Des cristaux de glace (petites flèches) se déposent à la surface de la coupe lors de sa préparation. Des crevasses sont visibles localement (flèche large). La région encadrée correspond à l'espace entre deux domaines condensés. La barre d'échelle vaut 200 nm.

III- Objectifs de la thèse

La fibre de 30 nm a été observée par CEMOVIS ou par cryosubstitution dans quelques cas particuliers comme la chromatine d'échinoderme (Woodcock, 1994) ou d'érythrocyte de poulet (Woodcock, 1994 ; Scheffer et al, 2011) sur des noyaux isolés ou sur des cellules entières par cryosubstitution (Kizilyaprak, 2010). Néanmoins, ces observations ne sont pas toujours réalisées dans des conditions proches de celles d'une cellule (encombrement moléculaire, force ionique...) ou concernent des types cellulaires dont la chromatine possède des particularités connues. Son existence dans les autres modèles cellulaires est fortement mise en question (Maeshima et al, 2010) que ce soit dans des cellules en interphase ou en mitose. Les différents travaux que nous avons présentés dans ce chapitre montrent que l'organisation de la chromatine dans les cellules eucaryotes n'est pas encore bien comprise actuellement. L'existence à l'échelle du micromètre des territoires chromosomiques semble avérée aujourd'hui mais l'organisation de la chromatine au sein de ces derniers reste ouverte. La fibre de 30 nm attendue par de nombreuses équipes de recherche ne semble pas systématiquement présente. Ce type de fibre pourrait exister localement dans des régions d'hétérochromatine facultative par exemple comme suggéré par Scheffer et al (2011) mais Eltsov et al (2008) suggèrent une interaction préférentielle des nucléosomes entre des fibres différentes plutôt qu'au sein d'une même fibre lorsque l'encombrement moléculaire devient important. Ceci expliquerait l'absence de fibre de 30 nm dans les cellules HeLa par exemple. Cette hypothèse est également au cœur des travaux sur les phases denses de nucléosomes *in vitro* réalisés dans l'équipe avant mon arrivée (Livolant et al, 2006) qui montrent que les nucléosomes seuls sont capables de former des structures denses et ordonnées basées sur la formation de colonnes de nucléosomes.

Pour progresser dans la compréhension de l'organisation de la chromatine dans les noyaux, nous devons répondre à deux questions importantes :

- Peut-on observer les nucléosomes dans les noyaux avec une résolution suffisante pour reconnaître leur structure ?

Dans les précédents travaux, en effet, la chromatine était décrite comme une structure finement granulaire mais les nucléosomes n'ont pu être identifiés que dans les noyaux d'érythrocytes de poulet purifiés (Scheffer et al, 2011b), et seulement sous la forme de

disques denses aux électrons. La structure fine des nucléosomes n'est donc pas résolue comme dans les cryosections de phases denses de nucléosomes.

- Existe-t-il localement, des empilements de nucléosomes comparables à ceux observés dans les phases denses *in vitro* et/ou les modèles de fibres de 30 nm ?

Les phases denses, obtenues *in vitro* dans des conditions (concentration en nucléosomes et force ionique) proche de celles des noyaux, nous laissaient imaginer que la présence de colonnes pouvait exister localement sur un petit nombre de nucléosomes dans les noyaux. Les travaux récents de Scheffer et al (2011) sur la chromatine isolée montrant des colonnes de nucléosomes sont également favorables à cette hypothèse.

La réponse à ces deux questions a constitué l'un des objectifs de ma thèse. Nous avons cherché à visualiser les nucléosomes *in situ* dans les noyaux en interphase par CEMOVIS avec une résolution suffisante pour reconnaître leurs formes caractéristiques par rapport aux structures cristallographiques disponibles et à observer leurs interactions et leur organisation supramoléculaire. Cette approche suppose de pousser la technique CEMOVIS à ses limites. Elle nécessite des coupes très fines et une imagerie à fort grandissement sous une faible sous-focalisation (1 à 2 μm) pour obtenir une bonne résolution et limiter les effets de superposition des objets biologiques dans l'épaisseur de la coupe, néfastes pour la compréhension du signal. Ces conditions d'imagerie permettent un rendement assez faible en images de qualité.

Dans une première partie, je présenterai donc les limitations rencontrées dans l'imagerie à fort grandissement en CEMOVIS et les solutions que nous proposons pour améliorer le rendement. Dans une seconde partie, je décrirais les observations que nous avons faites sur les différents organites des cellules HT29 et sur l'organisation du matériel génétique au sein des noyaux.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

1-Matériels Biologiques

Nous présenterons ici brièvement les types cellulaires que nous avons utilisés.

A-Levures (*Saccharomyces cerevisiae*)

1) La souche M185 de *Saccharomyces cerevisiae* nous a été fournie par Arach Goldar (équipe Mécanismes de surveillance de l'ADN, CEA, Saclay), ensemencée sur des boîtes de Pétri. Quelques cellules sont prélevées au moyen d'un râteau et re-suspendues dans un tube Falcon de 50 ml contenant du milieu de culture YPD (extraits de levures). Cette culture est incubée à 30°C sous agitation (100 t/min) durant 48 h en maintenant le bouchon légèrement dévissé pour permettre la diffusion d'O₂ dans la culture. La densité optique (D.O.) de la suspension est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Hitachi U-2000. Nous avons étudié les levures maintenues en culture jusqu'à une densité optique D.O.<1 pour obtenir des levures en phase de croissance. Nous avons également utilisé des cellules en phase stationnaire (D.O.≥1).

2) Par ailleurs, nous avons utilisé la souche MCM869, fournie par la même équipe. Pour augmenter le contraste de l'ADN dans les noyaux, nous avons tenté de marquer l'ADN à l'iode (Z=53) en cultivant les levures en présence de désoxy-uridine iodée (IdU). La désoxy-uridine est un précurseur des voies de synthèse de la thymidine. Le passage de l'un à l'autre s'effectue par méthylation, assurée par la thymidilate synthase. Les souches ne produisant pas cette enzyme nécessitent l'ajout de la désoxy-thymidine (dT) ou de la désoxy-uridine (dU) dans le milieu de culture pour pouvoir se développer et nécessitent également une machinerie moléculaire pour permettre leur phosphorylation et leur intégration dans l'ADN. La souche MCM869 se caractérise par :

- l'absence du gène *cdc21* nécessaire à la production de la thymidilate synthase,
- la présence d'un transporteur passif pour l'apport de nucléotides non phosphatés,
- l'ajout d'un gène codant pour une protéine kinase de drosophile pour assurer la phosphorylation des nucléotides.

Ainsi, les nucléotides dT ou dU ajoutés dans le milieu de culture pénètrent dans la cellule par le transporteur mentionné ci-dessus et sont phosphorylés par la protéine kinase de drosophile pour entrer dans la constitution de l'ADN. Un lot de levures a été cultivé en présence de dT (lot témoin) et un autre en présence d'IdU.

En pratique, la préculture présentant une D.O. de 2,4 est diluée dix fois dans du milieu de culture « Casa » (milieu synthétique contenant 2% d'acides aminés et supplémenté en adénine ; Shearman, 1994) ; les levures se trouvent ainsi en phase de croissance ou phase exponentielle. La suspension cellulaire est séparée en deux lots incubés à 30°C durant 1h30. Chaque lot est ensuite centrifugé à 1000 g durant 3 min et remis en suspension dans du milieu casa. Cette étape de rinçage est répétée trois fois. A la troisième étape de centrifugation, l'un des deux culots est re-suspendu dans un petit volume de casa supplémenté en desoxy-thymidine (dT) et constitue le lot témoin. L'autre est repris dans les mêmes conditions mais la desoxy-thymidine est remplacée par la desoxy-uridine iodée (IdU). Les culots repris sont déposés dans du milieu de culture contenant (dT) ou (IdU) pour le lot témoin et l'échantillon respectivement. Les suspensions sont incubées 1h à 30°C. On ajoute ensuite l' α -factor à une concentration finale de 1 μ M dans chacune des cultures. Cette molécule est une phéromone produite par un type de levure haploïde (α) pour attirer les partenaires de l'autre type (a) et permettre la formation d'une levure diploïde stable. Nous l'utilisons pour un de ces effets, le blocage des levures en phase G1 de leur cycle cellulaire pour avoir des cellules synchrones et qui ne soient pas en mitose.

B- Lignée lymphocytaire : les cellules KE37

Les cellules KE37 sont fournies par Anne-Marie Tassin (équipe Bases structurales de processus cellulaires, Institut Curie/INSERM U759, Orsay).

C- Lignée cancéreuse colique humaine : les cellules HT29

Les cellules HT29 sont fournies par Jean-Jacques Lacapère et Leeyah Issop (INSERM U773, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris). Ces cellules, assez faciles à cultiver, nous ont été fournies gracieusement en quantité suffisante pour réaliser de nombreux tests permettant la mise au point des méthodes. La lignée HT29 a été établie en culture en 1964 (Fogh et Trempe, 1975) à partir d'un adénocarcinome colique de grade II. La lignée parentale est composée de plusieurs types cellulaires dont 95% ne sont pas différenciés (Zweibaum et al, 1991). Jean-Jacques Lacapère et Leeyah Issop ont cultivé ces cellules en présence de cryoprotectant (Dextran 20%) durant 24h. Les cellules ont bien survécu à ce traitement.

D- Algues unicellulaires : les Euglènes

Les algues unicellulaires nous ont été fournies par Anne Aubusson Fleury (Gif sur Yvette).

2-Vitrification des échantillons biologiques.

A-Préparation du cryoprotectant

L'ajout d'un cryoprotectant dans le milieu extracellulaire est indispensable pour la vitrification (chapitre I). Nous avons utilisé le dextran de *Leucomonia sp* (Sigma-Aldrich), de haut poids moléculaire (MM 40000). Il est préparé à 40% (m/m) dans le milieu de culture ou le tampon adapté au type cellulaire étudié. Après agitation une nuit (100 t/min) et dégazage sous vide, la solution transparente et visqueuse est prête à être mélangée aux cellules.

B-Concentration des cellules : préparation des culots

Les cellules sont concentrées par centrifugation dans leur milieu de culture. Les vitesses et temps de centrifugation, adaptés à chaque type cellulaire afin de préserver leur intégrité et leur viabilité, sont indiqués dans le Tableau II.1.

Echantillons	Vitesse de centrifugation	Durée de centrifugation
Levures	1200 g	3 min
Euglènes	100 g	3 min
KE37	285 g	7 min
HT29	1000 g	3 min

Tableau II.1: Conditions de centrifugation des différents modèles biologiques

Au volume V du culot cellulaire est ajouté un volume équivalent Vd de dextran 40%, juste avant la congélation, afin d'obtenir une concentration finale en dextran de 20% (Figure II.1). Une goutte de la solution est immédiatement déposée sur chaque coupelle, en ajustant le volume pour que la goutte dépasse légèrement le rebord de la coupelle de téflon (Figure II.2)

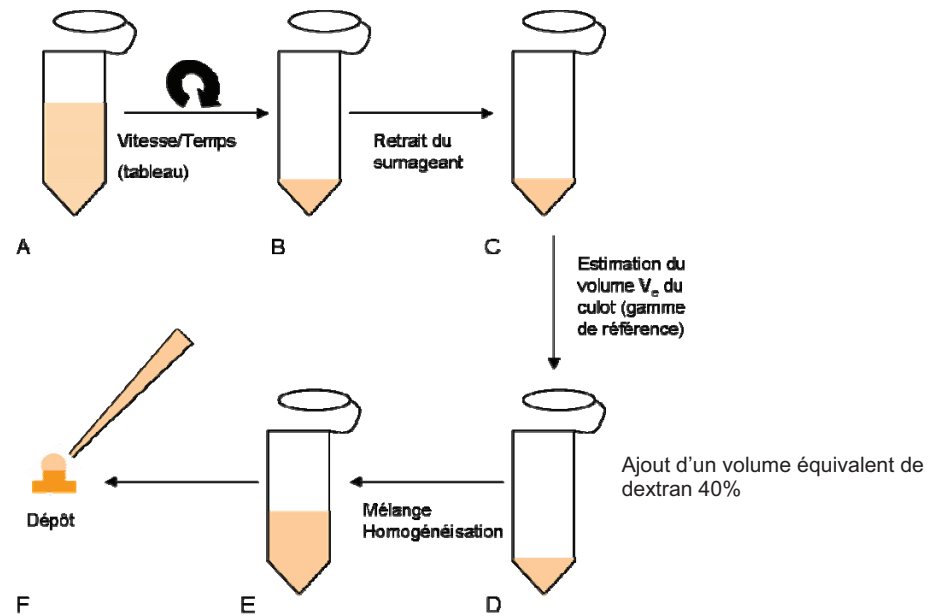


Figure II.1: Préparation des culots cellulaires pour la vitrification

Les cellules sont centrifugées pour les concentrer puis mélangées à un volume équivalent de dextran 40%. Une goutte de ce mélange est déposée sur les coupelles en cuivre pour la congélation.

C-Congélation par « Slam-freezing »

Le porte-échantillon est constitué par l'assemblage d'un aimant et d'une coupelle en téflon séparés par une mousse en néoprène. Les coupelles en cuivre ou en or sont fixées sur la coupelle en téflon (Figure II.2A). Toutes les pièces sont fixées par de l'adhésif double-face. Le porte-échantillon est prêt pour le dépôt des gouttes d'échantillons (Figure II.2B).

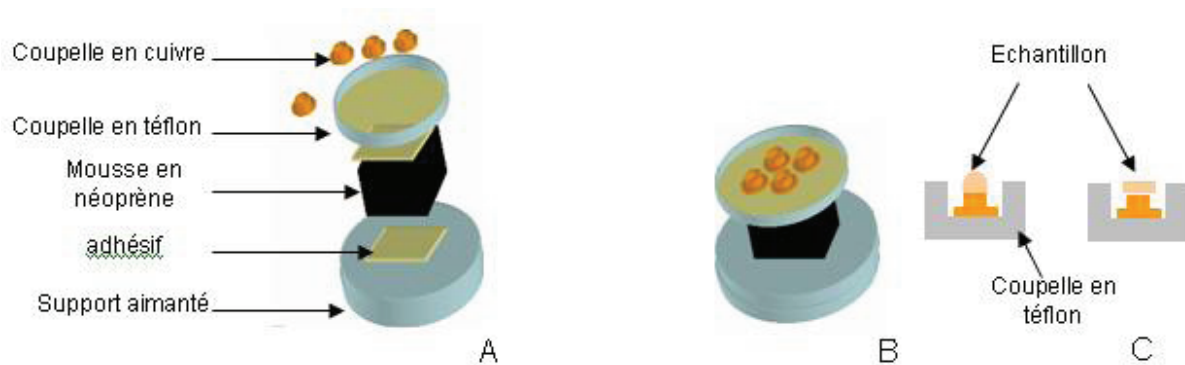


Figure II.2: Assemblage du porte-échantillon (A, B) puis dépôt du matériel cellulaire sur chaque coupelle (C). Après congélation par « slam-freezing », le matériel est aplati jusqu'au niveau de la butée en téflon.

La vitrification par Slam-Freezing s'effectue à l'aide d'un cryo-vacubloc (Reichert®). La congélation se déroule en 4 étapes (Figure II.3)

- 1- La chambre contenant le bloc de cuivre est mise sous vide (Figure II.3A)
- 2- Le bloc de cuivre est refroidi à l'hélium (Figure II.3B) jusqu'à ce que la température se stabilise (5-10 min).
- 3- Le porte-échantillon est installé tête en bas sur la tige (aimantée) (Figure II.3C). Le pompage est arrêté, la chambre reste maintenue sous vide.
- 4- L'opérateur déclenche une vanne pneumatique, provoquant l'entrée de vapeurs d'hélium dans la chambre autour du bloc de cuivre. La remontée de la chambre à pression ambiante provoque l'ouverture de la trappe et déclenche la projection de l'échantillon sur le cuivre (Figure II.3D)

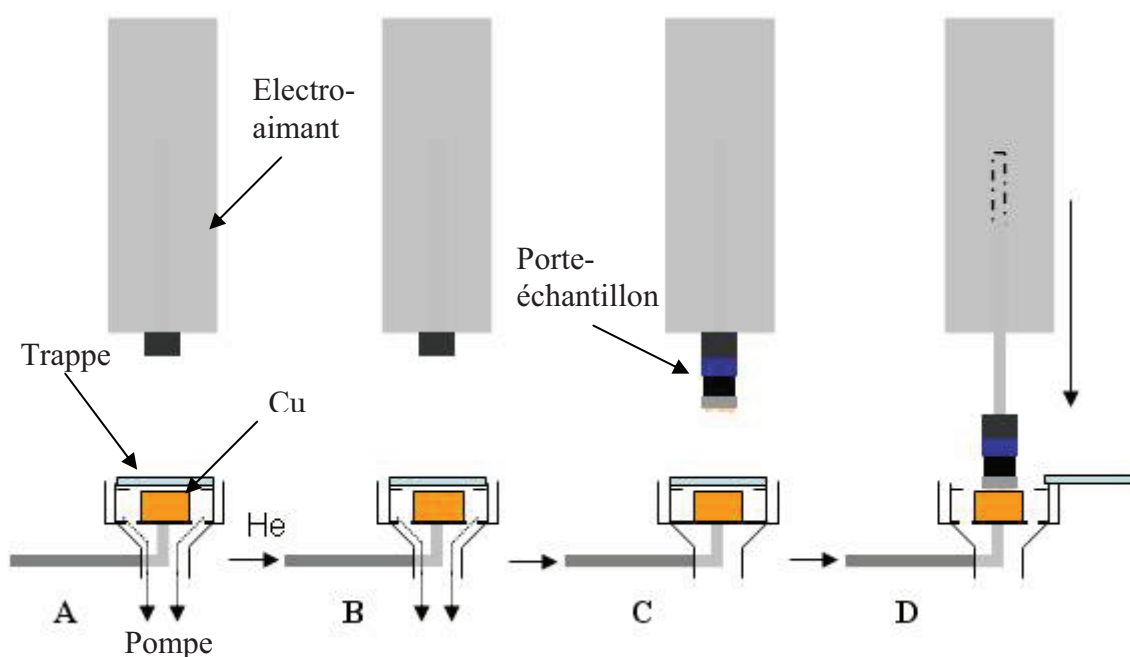


Figure II.3: Déroulement d'une expérience de congélation par slam-freezing (cryovacublock Reichert)
 (A) La surface du bloc de cuivre est maintenue sous vide pour éviter la condensation d'eau à sa surface. (B) Le bloc de cuivre est refroidi à l'hélium liquide (4 K). (C) L'échantillon est installé sur l'appareil. (D) L'échantillon est projeté contre le bloc de cuivre.

Pour les cellules, il s'est écoulé entre 1 et 4 minutes entre leur mélange avec la solution de dextran et leur vitrification. Des tests préliminaires ont montré leur survie dans des conditions équivalentes pendant environ 20 minutes pour les levures et 24h pour les cellules HT29. L'échantillon congelé est immédiatement transféré et stocké dans l'azote liquide.

3-Préparation des sections

L'ensemble des étapes conduisant à la préparation des coupes pour la cryomicroscopie est effectué à basse température (-140°C à -160°C) dans un cryo-ultramicrotome (Leica UC6) équipé d'une chambre refroidie par des vapeurs d'azote (Leica FC6).

A-Sélection et mise en place des échantillons dans le microtome

L'aspect des échantillons est observé dans les vapeurs d'azote, sous la loupe binoculaire du cryomicrotome. Les échantillons de bonne qualité présentent une surface circulaire parfaitement plane avec des bords nets dus à la projection de l'échantillon sur la surface de cuivre. En vue latérale, on remarque une zone superficielle transparente qui constitue la région vitrifiée (Figure II.4A). Sa transparence est due à l'absence de diffusion de la lumière associée aux cristaux de glace. L'épaisseur de cette région varie en fonction de la concentration en dextran. Sa détection peut être difficile si l'échantillon est très concentré en cellules. La surface présente alors un aspect pailleté en raison de la présence des cellules. Des contraintes mécaniques s'exercent sur les cellules au moment de l'impact sur le bloc de cuivre, et leur importance dépend de la localisation des cellules dans l'échantillon. En périphérie de l'échantillon, les cellules sont souvent plus nombreuses et déformées (étirées selon les rayons du cercle). Au centre de l'échantillon, les cellules sont moins déformées mais moins concentrées (Figure II.4B). La région choisie pour les coupes résulte d'un compromis entre une concentration suffisante et une déformation acceptable des cellules.

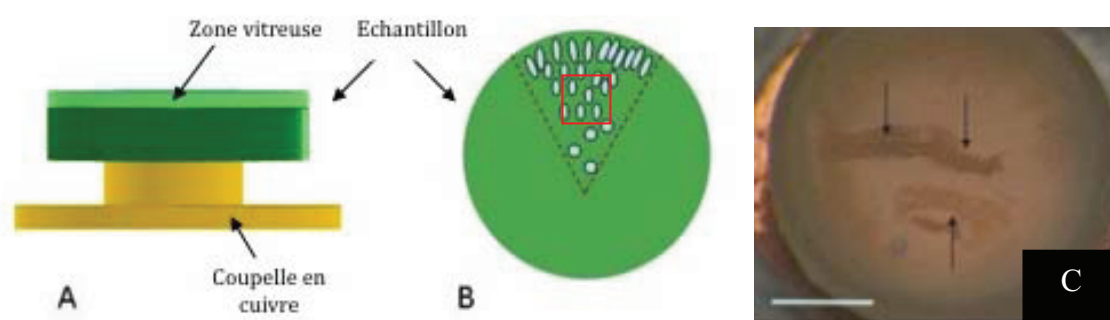


Figure II.4: Aspect de l'échantillon après congélation par «slam-freezing». (A) En cas de bonne vitrification, la zone superficielle vue de profil est plane, (dessinée ici en vert plus clair) et transparente en l'absence de cristaux diffractant la lumière. (B) En vue de dessus, un secteur est représenté (pointillés). Les cellules en périphérie sont très déformées. Au centre les cellules sont plus rondes mais moins concentrées. La zone choisie est encadrée en rouge. (C) Echantillon de levures mal vitrifié (aspect laiteux). La surface est légèrement concave et peut même comporter des crevasses (flèches noires). Echelle 1mm (D).

Les échantillons dont l'aspect n'est pas satisfaisant (irrégularités ou sillons de surface, aspect laiteux ou craquelures, etc..) en raison d'un mélange dextran/milieu de culture inhomogène par exemple sont éliminés. Les levures ont représenté un cas particulier dans la mesure où nous n'avons pas réussi à les congeler convenablement. Les échantillons présentent un aspect laiteux, opaque. On peut même observer des bulles d'air ou des crevasses à la surface de l'échantillon (Figure II.4C). Dans la même série d'échantillons, le dextran 20% utilisé ici comme test de bon fonctionnement de l'appareil est bien vitrifié.

Les coupelles de cuivre des échantillons sélectionnés sont collées sur un clou en aluminium au moyen d'une goutte de cryo-colle (Richter et al, 1994a) composée d'un mélange de 2 volumes d'éthanol absolu et 3 volumes d'isopropanol, liquide visqueux à -140°C et solide à -160 °C. Ce collage est réalisé dans la chambre du cryo-ultramicrotome refroidie à -140°C. Le clou est ensuite trempé dans un bac d'azote liquide pour solidifier la colle. La température est abaissée à -160 °C pour la taille de la pyramide et la confection des coupes.

B-Taille de la pyramide

La confection des coupes exerçant une pression importante sur l'échantillon, la largeur de la surface à couper doit être minimisée et les échantillons pré-taillés. La surface taillée aura une forme carrée ou rectangulaire de 50 à 100 µm de côté (Figure II.5D) avec une base élargie pour assurer la transmission des contraintes au sein de l'échantillon sans dommages. Cette pyramide est formée au moyen d'un couteau « trimmer » (Diatome ®) de 2 mm avec une angulation à 45° (Figure II.4A et II.4B). Cette étape est réalisée par une série de coupes successives, à une vitesse de 100 mm/s avec un pas de 150 nm (Figure II.5C). Le petit côté de la pyramide, parallèle au couteau, est d'environ 50 µm (Figure II.5D)

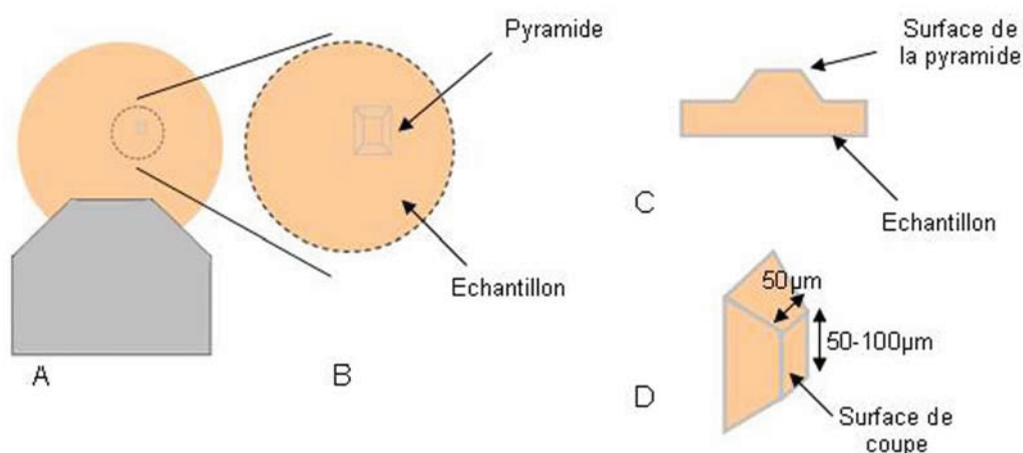


Figure II.5: Taille de la pyramide

(A) La surface de l'échantillon est taillée jusqu'à obtenir une région de 50 µm de côté avec une base pyramidale. (B) Agrandissement de la pyramide vue de la pyramide de profil (C) ou en perspective (D).

C-Confection des cryosections

➤ Préparation des grilles supports

Les coupes sont déposées sur des grilles commerciales de 200 mesh S7/2 (Quantifoil®), c'est à dire des grilles recouvertes d'un film de carbone épais (~30 nm) à trous carrés de 7 µm de côté, régulièrement espacés de 2 µm. Ces grilles sont recouvertes au laboratoire d'un fin film de carbone (2 à 3 nm). L'évaporation du carbone est réalisée sur des lames de mica fraîchement clivées sous un vide de 10^{-5} mbar et une tension de 3,8 V sur une durée de 3 s (évaporateur Cressington 208) ou 10^{-6} Torr, 7 V et 5 s (évaporateur Edwards E301). Les lames de mica carbonnées sont stockées à température ambiante à l'abri de la poussière. Le film de carbone est décollé de la surface du mica et déposé sur les grilles à l'aide d'un protocole classique illustré sur la Figure II.6. Les coupes sont ensuite déposées sur ce film mince de carbone (Figure II.6D). Des grilles R3,5/1 (Figure II.6E) et R2/2 (Figure II.6F) ont occasionnellement été utilisées, c'est-à-dire des grilles recouvertes d'un film texturé présentant des trous sont plus petits et circulaires (3,5 et 2 µm de diamètre respectivement). Contrairement aux S7/2, nous n'avons pas recouvert ces grilles d'un film continu supplémentaire.

Le film de carbone Quantifoil présente une bonne planéité ce qui est favorable pour l'imagerie. Les grilles R3,5/1 et R2/2 sont donc plus favorables de ce point de vue.

Néanmoins le film est trop épais pour permettre l'imagerie sauf au-dessus des trous. Leur taille réduite ne permet pas de photographier des régions étendues des cellules. Pour avoir une surface plus grande, les S7/2 sont plus intéressantes mais nécessitent l'ajout d'un film continu dessus pour assurer un support suffisant sous la coupe.

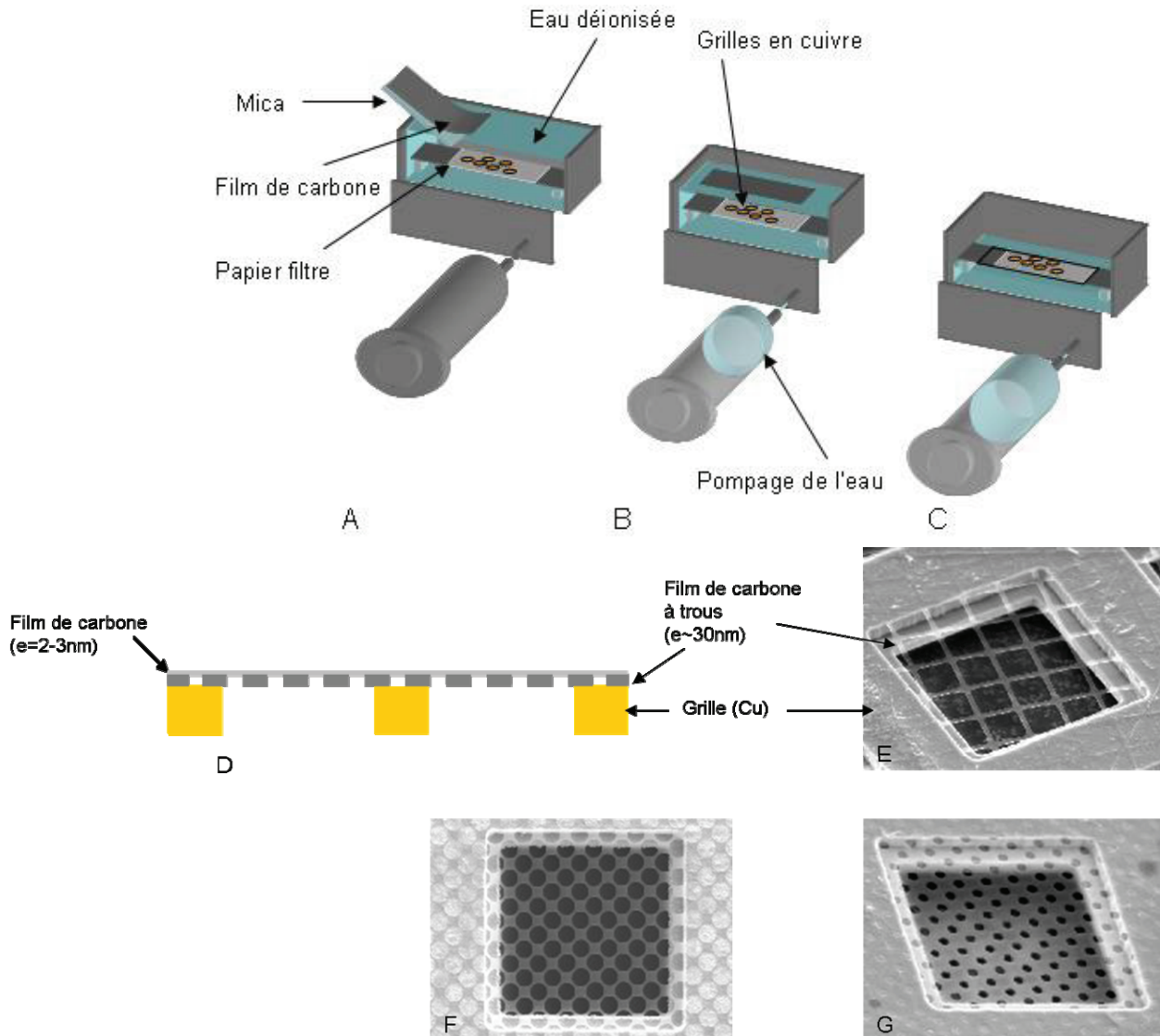


Figure II.6: Les étapes du dépôt d'un film de carbone sur les grilles TEM

(A) Les grilles (en orange) sont déposées sur un papier filtre (en gris) au fond d'un bac d'eau déionisée. Le mica recouvert d'un film de carbone est immergé lentement pour décoller le film. (B) Le film (en noir) entièrement décollé flotte à la surface du bain. L'eau est pompée par une seringue pour faire descendre le film. (C) Le film recouvre les grilles, elles sont ensuite stockées sur leur papier filtre au fond d'une boîte de Pétri légèrement entrouverte pour sécher durant 48h. (D) Schéma d'une grille S7/2 recouverte d'un fin film de carbone. (E) Photo d'une grille R3.5/1 (F) Photo d'une grille R2/2 (G) Photo d'une grille R2/2. Les photos (E, F, G) proviennent du site web de Quantifoil (<http://www.quantifoil.com>).

➤ Confection et collecte des coupes

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un ultracryotome Leica, à -160°C avec un couteau cryo-immuno 35° (Diatome®). Leur épaisseur nominale, de 25 à 35 nm, est obtenue avec une vitesse de coupe réglée à 0,4 mm/s. Le microtome est situé dans une pièce à humidité contrôlée, réglée à 25% HR et 23°C. Pour limiter les effets de l'électricité statique, un canon ionique est utilisé en permanence pendant la confection des coupes. Les appareils utilisés sont le Static-Line II (Haug®) ou le Crion (Leica microsystems®) en mode décharge. Deux méthodes très différentes sont employées pour confectionner et récupérer les coupes. La première consiste à réaliser des séries de 2 à 5 coupes sériées que l'expérimentateur laisse accrochées sur la surface du couteau. Ce processus est répété après déplacement du couteau de manière à recouvrir toute la largeur du couteau de coupes. Les coupes sont alors collectées en les touchant avec un cil ou une fibre de nylon collée à l'extrémité d'un bâtonnet en bois et déposées sur une grille recouverte d'un film de carbone pour observation ultérieure au cryo-MET. La deuxième approche consiste à choisir une région du tranchant du couteau et à confectionner des rubans de coupes à cet endroit. Les coupes glissent sur le couteau et le cil est alors glissé sous la première. Les coupes continuent à se former à la surface du couteau, les unes à la suite des autres en formant un ruban. L'expérimentateur accompagne la formation et la glisse des coupes en tirant le ruban avec le cil (Figure II.7A). Lorsque le ruban est assez long, celui-ci est déposé à plat sur la grille (Figure II.7B et C). Cette méthode présente l'avantage de produire des coupes sériées qui permettent d'avoir de l'information sur l'évolution des structures d'intérêt dans l'épaisseur de l'échantillon. La première méthode est techniquement plus facile à réaliser mais les coupes peuvent s'enrouler autour du cil lors de la collecte. La traction du ruban est une approche beaucoup plus difficile en raison de l'utilisation de l'ionisateur pour la confection des sections. Celui-ci entraîne un mouvement du ruban qui vrille et parfois se casse. Cette fragilité est d'autant plus importante que l'épaisseur des coupes est fine. Les rubans permettent le plus souvent d'avoir des coupes plus planes.

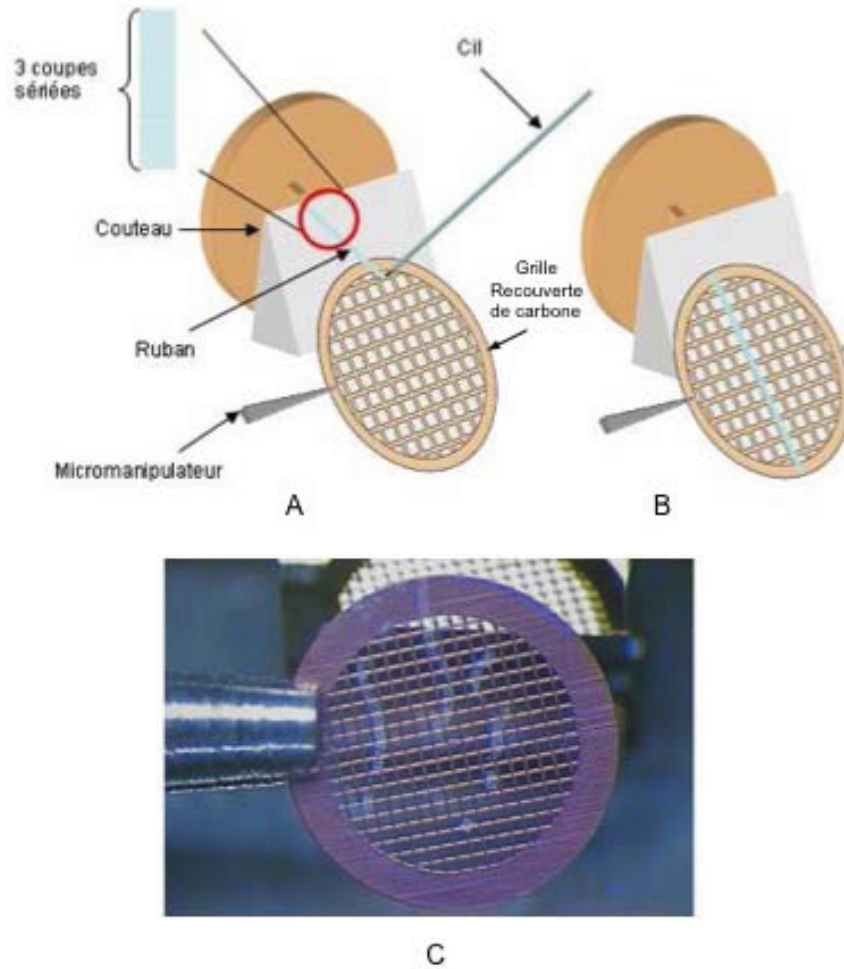


Figure II.7: Confection et collecte des cryosections

(A) Schéma de la traction du ruban de coupes au-dessus de la grille. Celle-ci est maintenue par un micromanipulateur que nous avons développé. (B) Dépôt du ruban de coupes sur la grille. (C) Une grille recouverte de plusieurs rubans de coupes.

D-Adhésion des coupes sur les grilles

L'adhésion des coupes sur la grille est assurée par une presse mécanique ou par un champ électrostatique. Pour la fixation mécanique, nous utilisons une presse en laiton (Figure II.8A) dont la surface a été polie et dont toute trace d'oxydation a été retirée préalablement à chaque utilisation. La grille avec les coupes déposées en surface est écrasée entre une feuille de métal mou à basse température (typiquement de l'indium 0,127 mm, 99,99%, Alfa Aesar 012206) et la presse en laiton selon le protocole de Hsieh et al (2006). Sous la pression, la feuille d'indium se déforme et assure un support sous l'ensemble de la grille pour éviter de casser les coupes.

L'adhésion par un champ électrostatique est réalisée avec le Crion (Leica microsystems®) en mode charge (Figure II.8B). Ces deux méthodes peuvent être utilisées séparément ou conjointement.

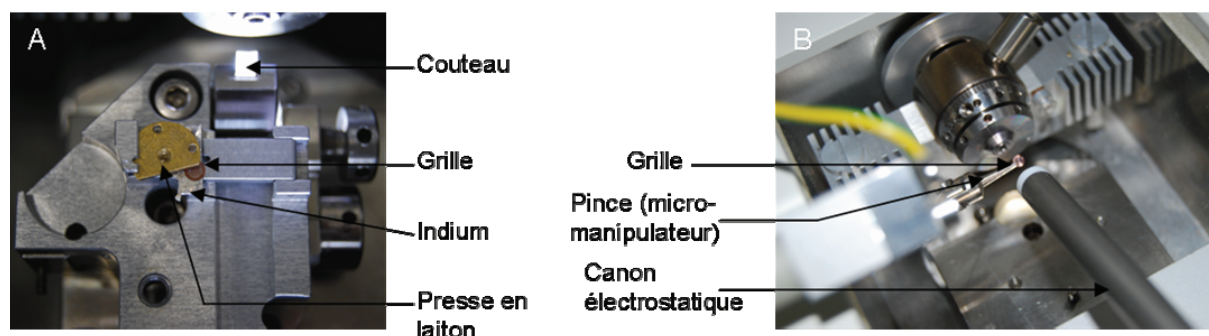


Figure II.8. Fixation des cryo-sections sur les grilles-support

(A) Dispositif de presse en laiton dans la chambre du cryo-microtome. La grille recouverte de coupes est posée entre la feuille d'indium et la presse de laiton. La pression exercée applique la coupe contre le film et déforme la feuille d'Indium. Le disque de cuivre indique le positionnement de la grille. (B) Dispositif de presse électrostatique (Crion). La coupe se trouve entre des charges négatives générées par le Crion et la grille reliée à la masse. Le champ électrostatique applique la coupe sur le film.

4-Observation en cryo-microscopie

Les images ont été acquises sur les microscopes JEOL 2010 LaB6 (LPS, Orsay) et JEOL 2010 FEG (Plate-forme d'Imagerie Ultrastructurale, Institut Pasteur). Le microscope LaB6 est équipé d'un canon thermo-électronique. Les électrons sont émis par un cristal d'hexaborure de Lanthane. La lentille objectif possède une pièce polaire Ultra Haute Résolution (UHR) et l'acquisition se fait sur négatifs ou sur une caméra Gatan Ultrascan 2k x 2k. Le microscope FEG est équipé d'un canon à effet de champ (Field Emission Gun). La lentille objectif du FEG est équipée d'une pièce polaire à large gap adaptée à la tomographie. Le FEG est équipé d'une caméra Gatan Ultrascan 4k x 4k.

L'imagerie a été réalisée sous une tension accélératrice de 200 kV en utilisant le système d'imagerie à faible dose « Minimum Dose System » (MDS). La recherche des régions d'intérêt est effectuée en mode « search » qui fonctionne en mode diffraction et utilise de très faibles doses d'électrons afin d'endommager le moins possible l'échantillon. La mise au point est effectuée en mode « focus » sur le grain de carbone à un grossissement de 150000x à 600000x à distance de la zone d'intérêt (2 à 3 μm) pour la protéger. Les photos sont acquises en mode « photo » sur des négatifs Kodak SO-163 avec une dose inférieure à $10\text{e}/\text{\AA}^2$. Chaque région peut être photographiée plusieurs fois (sous-focalisations différentes) dans la limite

d'une dose totale de 30 à 40 e/Å² (Conway et al, 1993). Les images ont été acquises à des grossissements variant de 15000 à 30000, avec un temps d'exposition de 1 seconde et une sous focalisation adaptée aux fréquences spatiales recherchées dans l'échantillon. Le tableau II.2 présente l'ensemble des conditions utilisées lors de ce travail. Les images acquises à une grossissement de 15-20000x et forte sous focalisation (-3 µm, -7 µm) permettent d'obtenir des vues d'ensemble (accès à l'architecture générale d'une région cellulaire). Les images obtenues à plus fort grossissement (25-30000x) et à plus faible sous focalisation (1 à 2 µm) permettent d'accéder à l'ultrastructure de la cellule et de ses complexes macromoléculaires. Pour l'imagerie du noyau et de la chromatine, nous avons choisi d'explorer une gamme de sous focalisation comprise entre 1,3 et 2 µm. Nous avons ainsi cherché à nous placer dans des conditions d'imageries proches de celles utilisées pour l'étude des phases denses de nucléosomes *in vitro* (Leforestier et al, 2001) pour pouvoir visualiser l'ultrastructure des nucléosomes et leur organisation supramoléculaire (visualisation de l'ADN enroulé à la surface des nucléosomes, identification des motifs caractéristiques dessinés par ces particules en vues de profil (voir Figures I.15 et III.27), résolution des empilements denses). La figure II.9 présente la simulation de la fonction de transfert de contraste (FTC) dans deux des conditions d'imagerie utilisées lors de ce travail. La distance séparant les deux tours d'ADN dans les nucléosomes est de 2,8 nm (Figure I.15). Ceux-ci devraient donc être visualisés et séparés sur des images acquises à une sous focalisation de 1,5 µm (Figure II.9.A), et ne devraient pas l'être sur les images acquises à une sous focalisation de 3 µm (Figure II.9.B). Des vues plus générales de cellules ont été acquises sur la caméra en mode « search ».

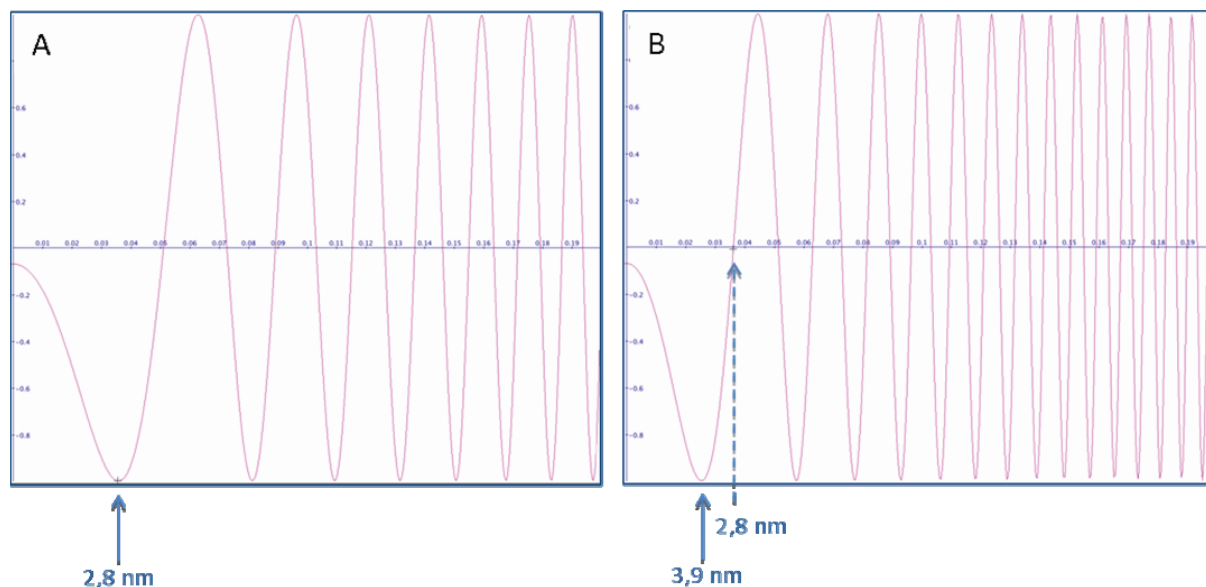


Figure II.9. Exemples de simulation de la FTC dans deux conditions d'imagerie différentes : 200kV, Cs=2 mm, Cc=2,1 mm, sous focalisations de 1,5 (A) et 3 µm (B). (A) Le premier maximum (flèche) est localisé à 2,8 nm. (B) Le premier maximum (flèche) et le premier zéro (flèche pointillée) sont respectivement localisés à 3,9 et 2,8 nm. Simulations réalisées par CTFSimu (<http://ncmi.bcm.tmc.edu/homes/wen/ctf>).

Les grandissements et les sous-focalisations utilisées dans chaque cas sont regroupés dans le tableau II.2

Grandissement	Valeur de Sous-focalisation
30 000x	-1 µm ; -1.3 µm ; -1.5 µm ; -1.7 µm et -2 µm
25 000x	-2 µm
20 000x	-2 µm et -3 µm
15 000x	-3 µm et -7 µm

Tableau II.2: Conditions d'acquisition des images

5-Analyse des images

A-Numérisation des négatifs

Les négatifs acquis sur les deux microscopes ont été numérisés sur un scanner Nikon Supercoolscan 9000 ED à l'aide du logiciel propriétaire. La numérisation est réalisée à 4000 pixels/pouces (dot per inches ou dpi).

L'intensité du signal est codée sur une échelle de gris en 8-bits. Les niveaux de gris sont codés entre 0 et 255.

B-Filtre passe-bande

La recherche des régions d'intérêt et les mesures sont réalisées avec le logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Le filtrage des images par un filtre passe-bande est réalisé avec ce même logiciel (FFT bandpass filter). Les périodes de taille supérieure à 220nm (basse fréquences) et inférieure à 0.6 nm sont retirés de l'image (Figure II.10) ce qui permet de conserver les objets étudiés (y compris les éventuelles fibres de 30 nm) et de réduire le bruit dans l'image.

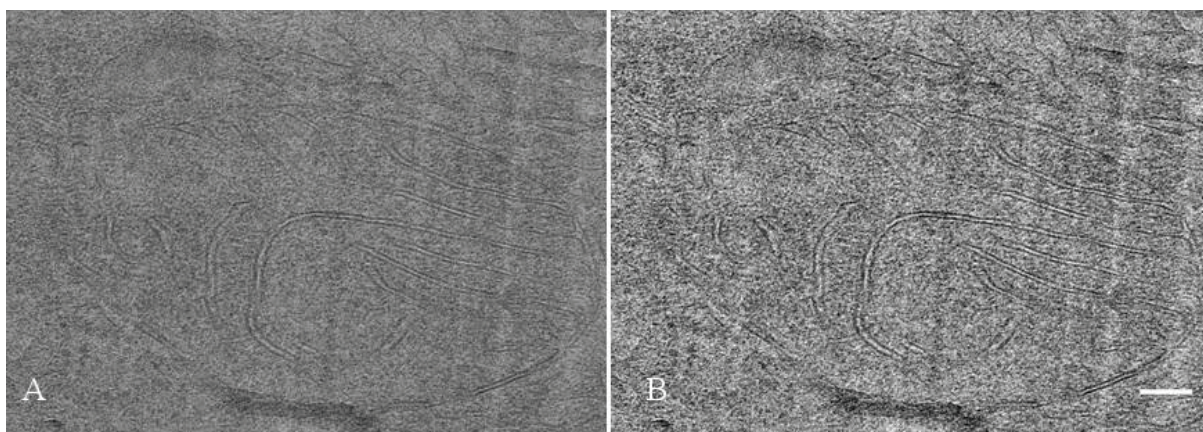


Figure II.10: Effet du filtre passe-bande

(A) Image brute de mitochondrie (sous-focalisation de 3 μm). (B) La même image après traitement par un filtre passe-bande (Image J). Le signal est conservé entre 220 nm et 0,6 nm. La barre d'échelle concerne les deux images et vaut 100 nm.

C-Correction de la fonction de transfert de contraste (FTC)

1. Acquisition du Spectre de Puissance

Les spectres de puissance des images de noyaux ont été obtenus avec le programme bsoft (Heymann, 2001 ; Heymann et Belnap, 2007). L'image est découpée en vignettes de 512x512 pixels sur lesquels le spectre de puissance est calculé. Les spectres de l'ensemble des vignettes sont ensuite moyennés pour augmenter le rapport signal sur bruit. Le spectre obtenu présente une série d'anneaux concentriques clairs et sombres qui représentent les fréquences spatiales transmises et non-transmises respectivement (Figure II.11). Pour analyser la fonction de transfert, le spectre 1D est calculé par une moyenne rotationnelle de la distribution du signal le long du rayon du spectre de puissance. La moyenne ainsi effectuée prend en compte l'ellipticité éventuelle du spectre en présence d'astigmatisme sur l'image.

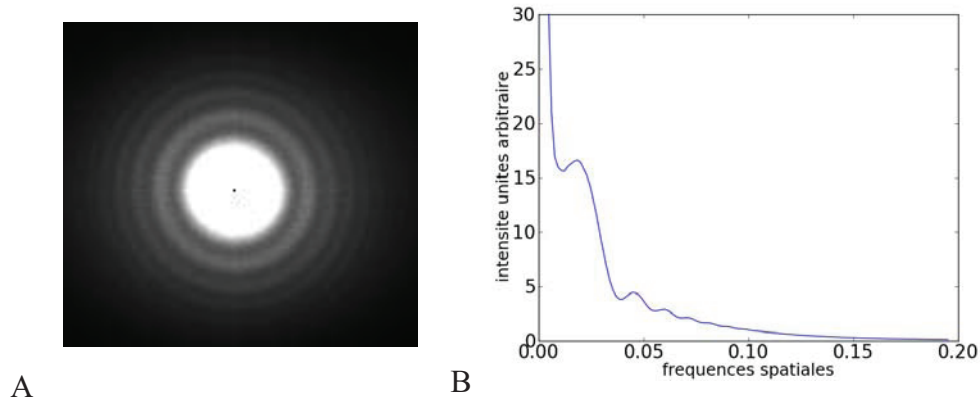


Figure II.11: Spectre de puissance d'une image en cryomicroscopie
(A) Spectre de puissance de l'image. (B) Profil radial moyenné.

2. Correction de la fonction de transfert de contraste

Nous avons utilisé deux méthodes de correction différentes : l'inversion des phases et le filtrage de Wiener.

a-Inversion des phases

La fonction de transfert de contraste affecte les hautes et moyennes fréquences spatiales, essentiellement en provoquant des inversions de contraste, ce qui se traduit par des régions où le contraste apparaît comme négatif et doit donc être inversé. On réalise pour cela une inversion des phases (Frank et al, 2006).

$$F(S) = \begin{cases} -F(S) & \text{pour } H(S) < 0 \\ F(S) & \text{pour } H(S) > 0 \end{cases}$$

Cette méthode permet d'inverser les contrastes négatifs au sein de l'image mais les fréquences atténuées ou non transmises en raison de la FTC (zéros) ne subissent aucun changement. Cette inversion des phases a été réalisée avec la fonction `bctf` du logiciel `bsoft` (Heymann et Belnap, 2007).

b-filtrage de Wiener

Une autre méthode de correction peut être utilisée pour compenser partiellement l'effet de décroissance du signal vers les hautes fréquences du à l'enveloppe (Chapitre I). En négligeant le bruit gaussien présent sur l'image, la relation entre l'image TF(I) obtenue et la projection réelle TF(O) de l'objet est donnée par l'équation :

$$TF(I) = TF(O)H(S)$$

On cherche à appliquer un filtre W(S) sur l'image tel que :

$$W(S) = H^*(S) / (|H(S)|^2 + 1/\alpha) \quad \text{où } \alpha \text{ représente le rapport signal sur bruit}$$

Ce filtre permet d'inverser le contraste en fonction du signe de $H^*(S)$ dans les régions nécessaires (« flip » des phases) et de restaurer en partie la décroissance d'amplitude du signal. Lorsque le bruit prédomine largement sur le signal, α tend vers 0, $W(S)$ tend vers 0. Aucun signal n'est transmis. Si le signal prédomine très largement, α tend vers ∞ , $W(S)$ tend vers $1/H(S)$. Ceci constitue le cas d'un fonctionnement optimal du filtre qui permet de corriger parfaitement la fonction de transfert. Pour des valeurs intermédiaires mais néanmoins très faibles du rapport signal sur bruit α , $W(S) \approx \alpha H^*(S)$. Ceci revient à multiplier le signal par la fonction de transfert, l'effet est alors équivalent à un « flip » des phases (Downing et Glaeser, 2008 ; Frank, 2006). Ce dernier cas se rencontre lorsqu'on applique le filtre de Wiener à des données brutes de cryomicroscopie électronique (Downing et Glaeser, 2008 ; Frank, 2006). Nous avons calculé le spectre de puissance avec le logiciel bsoft comme pour le flip des phases. Le spectre 1D moyenné a été calculé avec la fonction TF ED du logiciel SPIDER (Frank et al, 1981 ; Frank et al, 1996). Cette fonction permet également de déterminer la valeur de sous-focalisation de l'image et d'estimer l'effet d'un astigmatisme éventuel sur cette valeur (Huang et al, 2003). La valeur de sous-focalisation est ajustée et les paramètres d'enveloppe déterminés par comparaison entre la FTC des données et la FTC théorique du microscope au moyen de l'application graphique ctfmatch pour SPIDER (Shaikh et al, 2008) (Figure II.12).

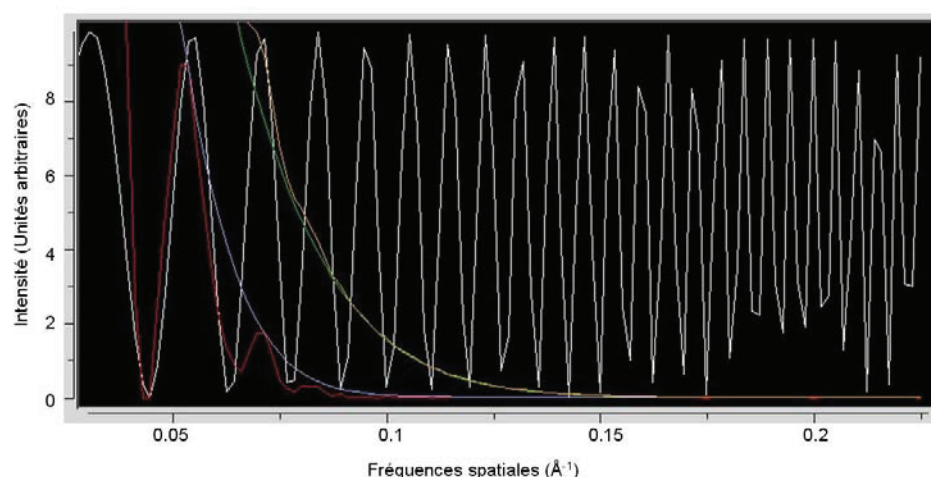


Figure II.12: Comparaison des CTF théorique et expérimentale avec ctfmatch

La CTF expérimentale est en jaune. Le bruit de fond (courbe verte) est soustrait pour visualiser les oscillations (courbe rouge). La CTF théorique (en blanc) doit être superposée à la courbe rouge. L'amplitude des oscillations doit rester en dessous de l'enveloppe (courbe bleue).

Les paramètres sont sélectionnés pour que les courbes se superposent parfaitement. Les valeurs des différents paramètres sont ensuite utilisées pour générer une FTC théorique du microscope dans les conditions d'imagerie utilisées à l'aide de la fonction FTC du logiciel SPIDER. Cette courbe est ensuite utilisée pour appliquer le filtre de Wiener sur l'image à l'aide de la fonction TF CTS de ce même logiciel (Penczek, 2010; Penczek et al, 1997).

Les deux méthodes de correction de FTC produisent sur nos images des effets similaires comme attendu (Figure II.13). Nous avons donc utilisé indifféremment l'une ou l'autre méthode.

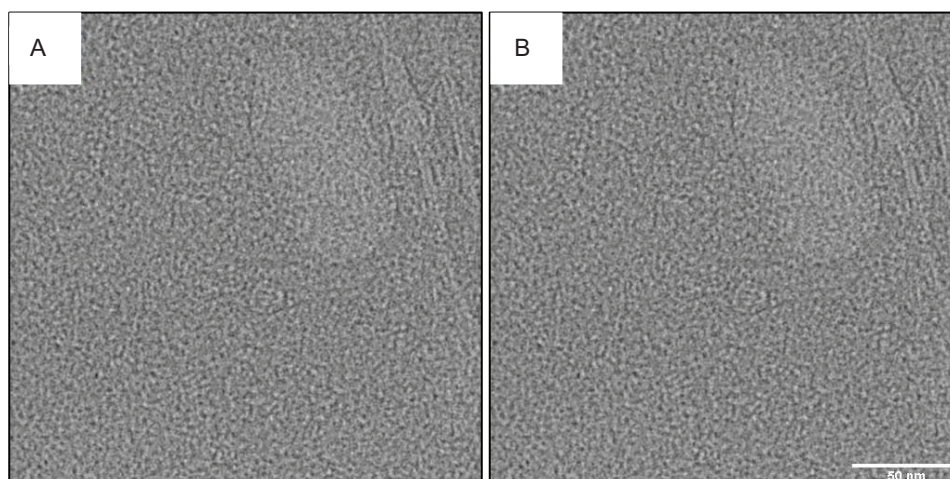


Figure II.13: Images de noyau après correction de la CTF

(A) Après une inversion de contraste (flip des phases) avec le logiciel bsoft. (B) Correction de la fonction de transfert par un filtre de Wiener avec le logiciel SPIDER.

Chapitre III

Résultats

I- Développements méthodologiques

L'obtention d'une image en CEMOVIS présente de nombreuses difficultés qu'il est nécessaire de surmonter pour obtenir de l'information à haute résolution :

- i) la collecte des coupes confectionnées
- ii) leur fixation sur la grille et leur stabilité sous le faisceau d'électrons

Au cours de ma thèse, nous avons essayé d'améliorer ces deux étapes particulièrement critiques grâce au développement d'un micromanipulateur d'une part et à la recherche de nouveaux films supports d'autre part.

1- Développement d'un micromanipulateur

Les coupes d'échantillons enrobés dans une résine sont confectionnées par un couteau attaché à une cuve remplie d'eau distillée. Les coupes ainsi confectionnées flottent à la surface de l'eau et peuvent être aisément collectées sur la grille. En CEMOVIS au contraire, la nécessité de maintenir l'échantillon vitreux à chacune des étapes oblige à confectionner les coupes à des températures inférieures ou égales à -135°C (température de dévitrification de l'eau pure). A ces températures, on ne dispose d'aucun liquide qui permette la flottaison des coupes, il faut donc les collecter « à sec ».

Pour faciliter la traction du ruban, le recours à un micromanipulateur externe pour tenir le cil a été proposé (Ladinsky et al, 2006) afin de minimiser les mouvements imprimés au ruban. Notre objectif était différent. Il s'agissait de minimiser la distance entre le tranchant du couteau où se trouvent les coupes et la grille afin de limiter les risques de pertes des sections lors de leur transfert sur la grille. Le micromanipulateur que nous avons développé permet de positionner la grille avec précision à l'endroit souhaité sur le couteau pour faciliter le dépôt des sections et des rubans.

A- Description du micromanipulateur

Ce micromanipulateur a été conçu au sein du Laboratoire de Physique des Solides avec Mickaël Pelloux (service Mécanique et Cryogénie) et réalisé par l'atelier mécanique. Sa conception repose sur une mobilité maximale de la grille au voisinage du couteau. Le micromanipulateur est constitué d'une partie statique et d'une partie amovible (Figure III.1)

qui permet son orientation précise. La partie statique est constituée d'une plaque en acier fixée de manière réversible et ajustable à la table du microtome. Cette plaque comporte un rail qui permet un déplacement et un positionnement rapide dans la chambre, utile pour charger et retirer les grilles sur le micromanipulateur. La partie mobile est constituée par trois platines micrométriques disposées perpendiculairement les unes aux autres qui permettent un réglage fin du positionnement de la grille à proximité du couteau. La pince tenant la grille dans la chambre est reliée à ces platines par un bras articulé qui permet un degré de liberté supplémentaire (la rotation de la grille). Les mâchoires de la pince sont actionnées par un ressort.

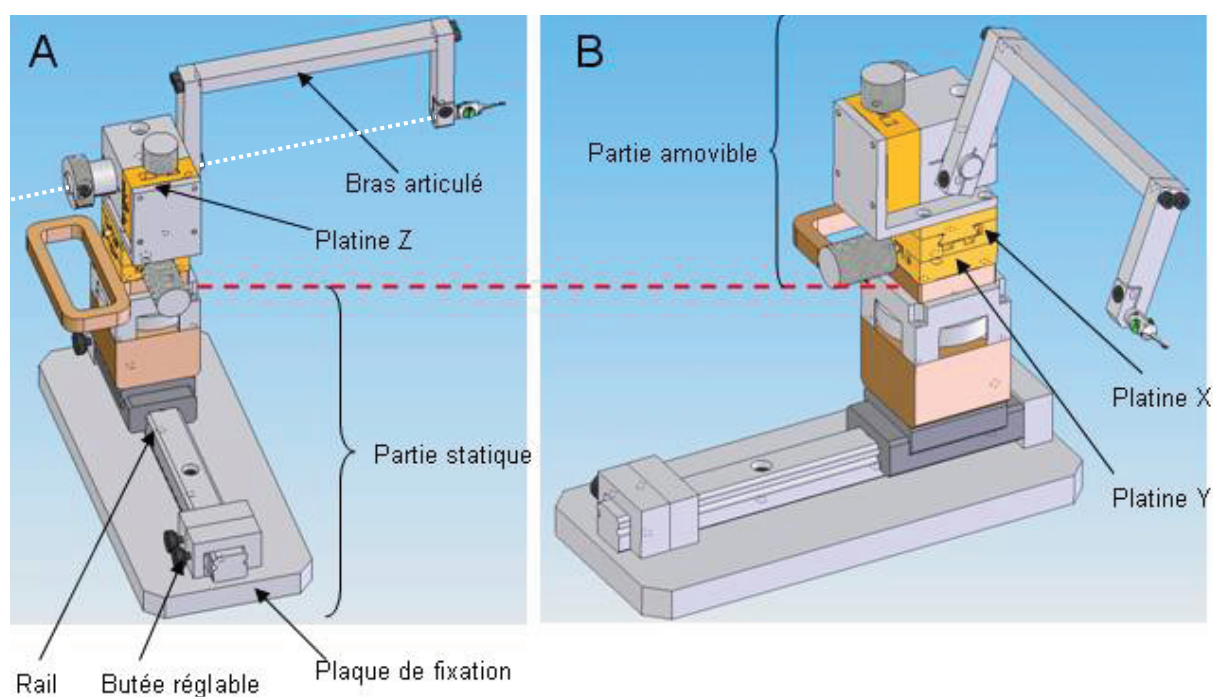


Figure III.1: micromanipulateur conçu au Laboratoire de Physique des Solides

(A) Vue de face. Les deux parties, statique et amovible sont distinguables (ligne rouge) ainsi que l'axe de rotation du bras articulé (ligne blanche pointillée). (B) Vue de côté. Les platines micrométriques sont visibles (en orange). (Plans M. Pelloux)

Le micromanipulateur est un appareil dissocié du cryo-ultramicrotome et positionné à côté de celui-ci. Le bras passe au-dessus de la chambre de cryosections pour positionner la pince au sein de celle-ci (Figure III.2A et III.2B). Pour faciliter l'introduction des grilles dans la chambre du microtome et leur récupération après dépôt des coupes, une platine recouvrant le porte couteau a également été développée (Figure III.3). Elle offre une grande surface pour manipuler les grilles avec une échancrure en face du couteau (en bleu) pour approcher la pince. Elle comporte également un réceptacle pour les boîtes de stockage (en bleu cyan). Une presse en laiton est également disponible pour la fixation mécanique des coupes sur la grille

(voir chapitre II). Sa proximité permet de faire glisser la grille dessous en réduisant les risques de perte.

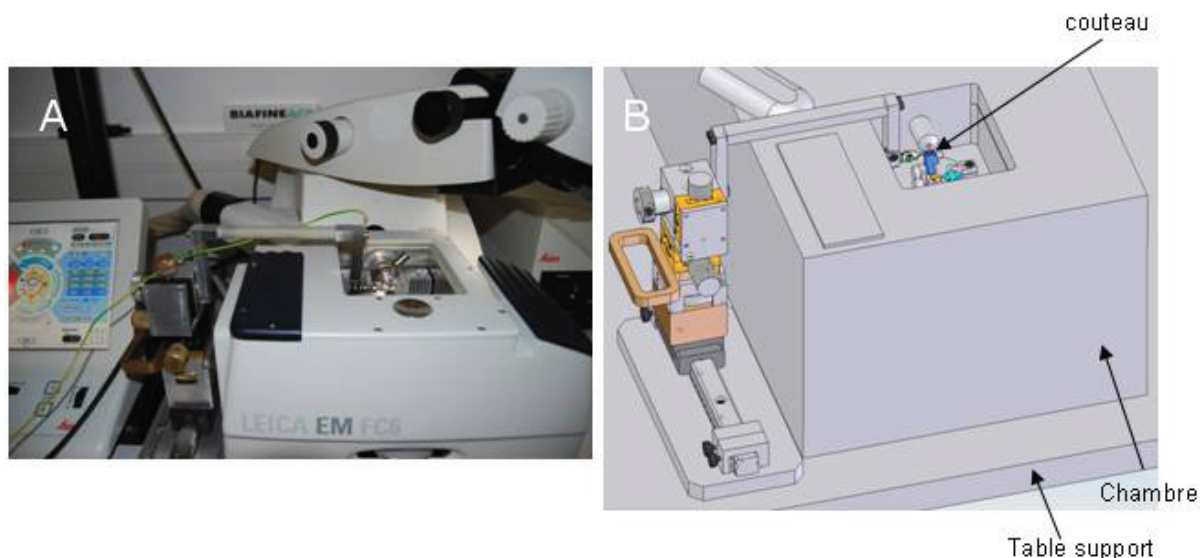


Figure III.2: Positionnement du micromanipulateur

(A) Photographie du micromanipulateur en fonctionnement. La ligne de masse (câble vert et jaune) est reliée à la terre. (B) Schéma de positionnement de la pince dans la chambre de cryosection. (Plan M. Pelloux)

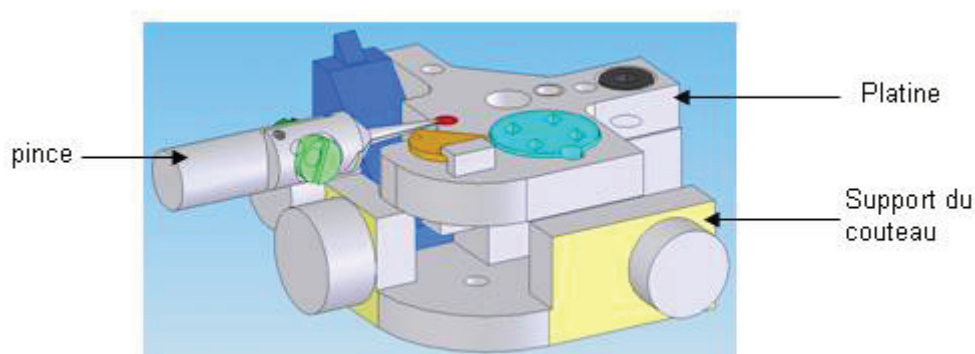


Figure III.3: Platine de chargement des grilles TEM positionnée sur le porte-couteau

Le schéma représente le couteau (bleu foncé) sur son support. Celui-ci est surmonté de la platine qui comprend la presse en laiton (orange) et la boîte de stockage des grilles (bleu cyan). La pince est représentée avec la grille (en rouge). (M. Pelloux)

Les trois axes du micromanipulateur permettent son positionnement selon les axes X, Y, Z que nous avons définis par rapport au couteau (Figure III.4B). Le mouvement en X permet de positionner la grille latéralement par rapport au couteau face à la zone du tranchant qui offre la meilleure glisse des coupes. Le mouvement en Y permet d'approcher plus ou moins la grille du couteau. Ce degré de liberté permet d'ajuster le positionnement au cours de la confection de rubans. Le dernier axe (Z), vertical, permet d'approcher la grille à hauteur du tranchant ou de la platine pour déposer la grille. Le micromanipulateur possède également un axe de rotation qui permet d'ajuster l'angle θ entre la grille et la surface du couteau (Figure

III.4B). Les rubans peuvent être déposés directement sur la grille en minimisant les contraintes mécaniques exercées. Cet axe permet aussi d'orienter la grille perpendiculairement au canon électrostatique (Leica Crion®) pour une fixation optimale du ruban sur le support. Le micromanipulateur peut être relié à la masse au moyen d'un fil électrique classique cossé. Nous utilisons la ligne de masse du Crion®, ce qui permet d'éviter l'accumulation de charges sur la grille lors de la confection des rubans.

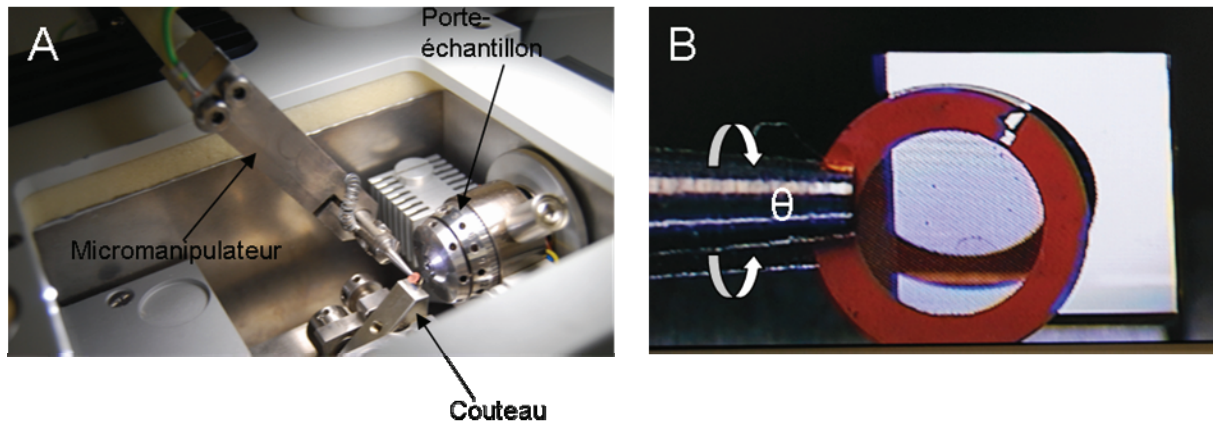


Figure III.4: Positionnement de la grille à la surface du couteau

(A) Photographie de la pince en position, le bras articulé de la pince est incliné pour orienter la grille. (B) Agrandissement de la région du couteau (en blanc), la grille est positionnée parallèlement à sa surface. Les axes x, y et z sont les directions de références pour le mouvement de la grille et θ son angle de rotation.

La première version du micromanipulateur présentait l'inconvénient d'avoir un bras articulé entièrement métallique. Nous avons observé que l'utilisation du micromanipulateur provoquait un réchauffement de la température de la chambre de 4°C. Cet écart était vraisemblablement dû à la masse métallique présente hors de la chambre. Nous avons résolu ce problème en substituant un tube en fibre de verre à la partie métallique horizontale du bras.

B- Comparaison au modèle commercial

Pendant que nous développons notre micromanipulateur, la société Leica Microsystem en a commercialisé un avec les mêmes objectifs. Ce système repose lui aussi sur une mobilité de la grille selon les trois axes X, Y, Z. Cette mobilité est assurée par des platines micrométriques disposées sur la chambre du microtome. Celui-ci étant monté sur une table anti-vibration, ceci à l'avantage d'éviter les vibrations de la pince lors de son utilisation. La grille est maintenue par une pince dont l'extrémité est courbée à 45° perpendiculairement à la pince. Cette pince est également amovible. Toutefois les essais réalisés avec ce micromanipulateur ont mis en lumière des difficultés majeures. L'axe de rotation ne passe pas par le centre de la grille. Ainsi

la rotation entraîne un déplacement par rapport au couteau, l'eucentricité du mouvement est perdue. Cette caractéristique est limitante pour le positionnement précis de la grille à proximité du tranchant du couteau dans une orientation permettant la glisse des coupes sur le couteau. Nous pensons que c'est le positionnement de la grille dans le champ de l'ionisateur qui en perturbe le fonctionnement. Lorsque la grille est parallèle au tranchant, ce problème disparaît (micromanipulateur LPS). Contrairement au micromanipulateur Leica, celui que nous avons développé peut être maintenu en position tout au long de la confection des coupes ou des rubans sans perturber leur production. Cet avantage permet de positionner la grille au plus proche du tranchant et de faciliter ainsi la collecte des cryosections.

C- Les améliorations à apporter

Le micromanipulateur a permis de confectionner des coupes de manière très satisfaisante en offrant une grande souplesse dans le positionnement des grilles, particulièrement utile pour déposer les rubans sans risquer de les détériorer. Nous l'utilisons couramment et les images présentées dans ce mémoire proviennent de cryo-sections réalisées avec cet appareil. Il s'agit cependant d'un prototype qui nécessite encore quelques améliorations :

- Nous avons constaté que le positionnement de la grille près du tranchant était plus délicat à l'extrémité du couteau opposée à la pince. Ceci est dû à la forme conique des mâchoires qui devront être affinées pour améliorer la mise en place de la grille.
- Sous sa forme actuelle, le micromanipulateur est positionné sur la table du microtome. Cette configuration pose deux problèmes :
 - la pince n'est pas solidaire de la table anti-vibration du microtome et se trouve donc soumise aux vibrations liées à l'environnement et à l'utilisation du microtome. La grille étant très proche du couteau, le risque d'une détérioration de celui-ci par la pince n'est pas négligeable. Il serait donc souhaitable d'associer ce micromanipulateur à la table anti-vibration du microtome. Un moyen simple d'y parvenir consisterait à fixer la pince sur la chambre comme dans le cas de l'appareil commercial mais en conservant le bras articulé et la capacité de rotation de la grille (en projet au LPS).

- le micromanipulateur est fixé sur la table au moyen du rail de fixation des accoudoirs. Or ce rail est également utilisé pour la mise en place de la cryosphère® (Leica), boîte à gant permettant de contrôler l'humidité autour du cryo-ultramicrotome. Ce moyen de contrôle de l'environnement de coupes remplace la chambre de contrôle que nous utilisons et permet de descendre à un pourcentage d'humidité très faible (2%). Il est de plus en plus répandu. Le positionnement du micromanipulateur sur le microtome permettrait d'utiliser conjointement celui-ci et la cryosphère®.

2-Vers de nouveaux supports pour l'adhésion des cryo-sections

A-Problématique

1. Introduction

Nous avons exposé dans le premier chapitre les difficultés rencontrées lors de la pratique du CEMOVIS. Chacune des étapes, depuis la préparation des échantillons jusqu'à l'acquisition des images est critique pour l'obtention d'une information biologique exploitable. Beaucoup de progrès ont été accomplis depuis les débuts de cette technique et l'obtention de coupes de qualité est aujourd'hui beaucoup plus accessible. L'acquisition d'images à des grossissements allant jusqu'à 15 000x est relativement aisée et permet d'obtenir des vues générales des tissus ou des cellules et des informations sur les organites qui les composent. La situation est plus critique pour les images collectées à fort grossissement. La plupart d'entre elles sont de mauvaise qualité et doivent être éliminées. Nous avons cherché dans un premier temps à identifier l'origine du problème puis à améliorer l'adhésion sur les grilles de carbone et enfin cherché à trouver des supports de substitution. Notre choix s'est porté sur un alliage métallique Titane-Silicium.

2. Instabilité des coupes sous le faisceau

Environ 90% des images collectées à un grossissement supérieur à 15000x sont de mauvaise qualité. Elles présentent un mauvais défocus pouvant aller jusqu'à un contraste inversé qui indique une sur-focalisation. Les cryosections sont donc décalées sur l'axe optique par rapport au plan de focalisation de référence, le film de carbone. Elles présentent également une déformation du signal dans une direction représentée par des lignes sur l'image (drift) (Figure

III.6) qui traduisent un mouvement de l'échantillon sous le faisceau. Ces deux défauts n'affectent pas toujours l'intégralité de l'image de manière uniforme ; ils peuvent être plus ou moins prononcés. Ce problème, d'autant plus marqué que le grandissement augmente, devient fortement limitant à partir de 25 000x-30 000x.

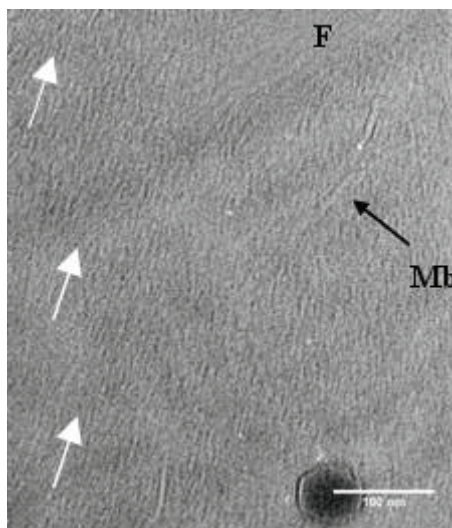


Figure III.6: Effets de l'instabilité de la coupe sous le faisceau. Le signal est déformé et présente des lignes visibles sur l'image (selon la direction des flèches blanches). Les structures cellulaires sont à peine distinguables (faisceau de fibres F et membrane Mb).

Lorsque le grandissement augmente, la dose d'électrons reçue par l'échantillon augmente également. La valeur du courant mesurée sur l'écran et qui sert de référence pour les conditions d'imagerie est reliée mathématiquement à la dose reçue par l'échantillon. Dans le cas du Jeol 2010 FEG, une calibration a été effectuée, permettant d'associer le grandissement, la dose reçue par l'échantillon et l'intensité du faisceau mesurée sur l'écran par la relation :

$$G^2 \times 4.10^{-10} \times M = D$$

où G correspond au grandissement, M à la dose mesurée sur l'écran (pA/cm²) et D à la dose reçue par l'échantillon (e⁻/Å²) (G. Pehau-Arnaudet, communication personnelle).

Lors de l'acquisition de nos images, nous avons utilisé un courant de 16 pA/cm², ce qui représente une dose de 1,44 e⁻/Å² et 4 e⁻/Å² pour des grandissements de 15000x et 25000x respectivement. Nous pensons que la dose reçue aux plus forts grandissements peut être responsable de l'instabilité des coupes sous le faisceau. Lors de l'acquisition de séries tiltées à un grandissement de 25000x pour la cryotomographie, ce phénomène est moins souvent rencontré. Dans ces conditions en effet, l'étalement du faisceau est plus important et les doses

reçues par l'échantillon sont de l'ordre de $1 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$, beaucoup plus proches de la dose d'une image acquise à 15000x.

Sur des régions non adhérentes, nous avons acquis plusieurs images à 30 000x sous de faibles doses d'électrons ($1 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$) par image pour voir l'effet de cette dose sur la stabilité des coupes. Le drift et la mauvaise focalisation apparaissent lorsque la dose cumulée atteint $4 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$.

3. Tests d'adhésion des coupes sur leur support

Pour comprendre ce phénomène, nous avons observé le comportement des coupes sous l'effet de fortes doses d'électrons en concentrant le faisceau sur une région d'intérêt jusqu'à destruction de l'échantillon. Deux types de comportements ont ainsi été mis en évidence. Dans la plupart des cas, le faisceau détruit la coupe localement en formant un trou qui se propage de manière circulaire et isotrope (zone 1 sur la Figure III.7). Plus rarement, la concentration du faisceau produit localement des bulles au sein de l'échantillon (zone 2 sur la Figure III.7), phénomène couramment observé par les cryomicroscopistes en présence de matériel biologique (Dubochet et al, 1988) et qui serait dû à l'émission de dihydrogène gazeux (Leapman et Sun, 1995 ; Baker et Rubinstein, 2010).

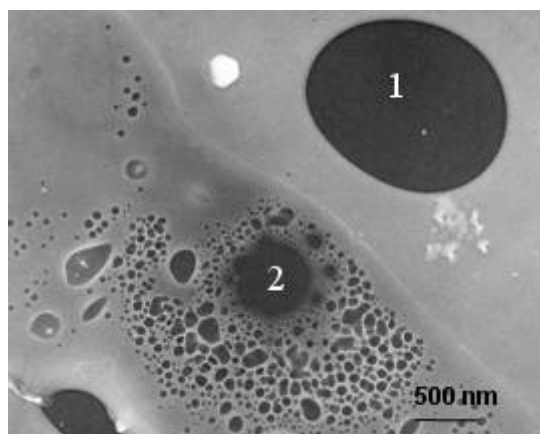


Figure III.7: Test d'adhésion locale de la section sur un film de carbone. La dose locale d'électrons a été augmentée en concentrant le faisceau sur deux régions de la coupe (1 et 2). Lorsque la coupe n'adhère pas au substrat, celle-ci brûle en formant un trou qui se propage (1). Une adhésion forte avec le support produit la formation de bulles (2). Les deux sites présentés ici sont séparés d'un micromètre.

Nous avons réalisé ce test de manière systématique après acquisition d'images à fort grandissement. Nous observons une forte corrélation entre la qualité de l'image et le comportement de la coupe sous un faisceau intense d'électrons. Lorsque la coupe brûle en formant un trou qui se propage, l'image prise auparavant présente des signes d'instabilité sous le faisceau (drift) et une mauvaise focalisation. Lorsque des bulles se forment, au contraire, l'image obtenue est de bonne qualité, le contraste des structures observées est en accord avec

la sous-focalisation choisie et on n'observe pas de dérive au sein de l'image. Nous interprétons ces deux types de comportements comme une conséquence de l'adhésion, ou de l'absence d'adhésion, de la coupe sur son support. La mauvaise focalisation suggère que la coupe ne se trouve pas au même niveau que le film de carbone sur lequel a été faite la mise au point, ce qui explique le mouvement de la coupe lors de la prise photo conduisant à l'obtention d'images « driftées ». Sur une telle coupe, décollée au moins localement de son film de carbone support, les dégâts d'irradiation provoqués en concentrant le faisceau d'électrons peuvent se propager très rapidement au sein de l'échantillon. En revanche, une coupe au contact du carbone reste stable sous le faisceau, et permet d'obtenir une image correctement focalisée. L'échantillon en interaction avec le carbone est détruit sous le faisceau, avec formation de bulles. Ces observations mettent donc en évidence une relation directe entre l'adhésion des coupes sur le film support et la qualité des images obtenues.

Ce test d'adhésion des coupes sur le substrat est destructeur et ne permet pas d'identifier les régions d'intérêt où prendre des photos. Néanmoins, il nous a permis d'identifier le problème à résoudre, à savoir améliorer l'adhésion des cryosections sur les films supports. Dans un premier temps nous avons cherché à optimiser l'adhésion sur les films de carbone puis nous avons cherché à développer d'autres supports.

4. Identification des problèmes rencontrés avec les supports carbone

Pour faciliter l'adhésion des coupes sur la grille, une méthode proposée il y a plusieurs années consiste à presser mécaniquement les coupes sur la grille. Divers instruments ont été développés dans ce but dont la presse en laiton que nous utilisons. Une solution alternative, proposée par Pierson et al (2010) repose sur l'utilisation d'un champ électrostatique. Nous avons comparé les deux méthodes en utilisant différents types de grilles (Quantifoil R2/2, S7/2 recouvertes d'un fin film de carbone et C-flat R2/2). Les résultats obtenus sont sensiblement identiques avec obtention d'environ 10% d'images satisfaisantes à fort grandissement ($\geq 25\,000\times$). Nous avons constaté par ailleurs que la fixation par champ électrostatique était plus efficace pour de longs rubans que pour des coupes collectées en petit nombre. Cette méthode semble appréciée pour des applications de cryo-tomographie électronique (Pierson et al, 2010) mais n'apporte pas d'amélioration du rendement dans notre cas (images acquises avec une dose d'électrons $> 4\text{ e}^-/\text{\AA}^2$).

Lors de la collecte des coupes, nous avons constaté que les rubans en cours de traction étaient fortement attirés par les bords de la grille en cuivre, dans des zones non recouvertes de

carbone, provoquant parfois leur rupture. Ce phénomène est plus marqué lorsque la grille est reliée à la masse. Cette observation suggère qu'un substrat conducteur et électriquement neutre serait favorable à l'adhésion. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons cherché à modifier la charge de surface des films de carbone. Les grilles carbonées S7/2 ont été chargées négativement par effluvage selon la méthode préconisée par Reissig et Orrell (1970) ou recouvertes d'un film de poly-L-lysine pour obtenir des charges positives (Williams, 1977). L'application de ces charges sur le support a eu un effet fortement néfaste sur l'adhésion. Les rubans de coupes d'une longueur de 3 mm et d'une épaisseur de 40 nm se tendent perpendiculairement à la surface de la grille dès qu'on approche ceux-ci de la surface, que la grille soit chargée positivement ou négativement. Ce comportement indique clairement que la présence de charges électriques sur le film support est défavorable à l'adhésion. Ces charges électriques pourraient s'accumuler sur la grille à deux étapes du processus : i) lors de la confection des sections en présence de l'ionisateur et ii) lors de l'observation en cryomicroscopie. Cette accumulation résulterait des propriétés du carbone, isolant électrique à basse température (Larson et al, 2011 ; Rhinow et Kuhlbrandt, 2008).

5. Vers le développement d'un nouveau film support

N'ayant pu obtenir de résultats satisfaisants avec les films de carbone, nous avons cherché à développer un nouveau film support i) transparent aux électrons, ii) amorphe à l'échelle nanométrique, iii) de bonne résistance mécanique à basse température et iv) de bonne conductivité électrique (film métallique).

Le respect de ces conditions restreint fortement le choix des éléments chimiques envisageables. La plupart des métaux ont en effet un numéro atomique trop élevé. Le titane (Ti) est un candidat intéressant car bien que possédant un numéro atomique élevé ($Z=22$) par rapport au carbone ($Z=6$), cette valeur permet encore la transparence aux électrons si le film est suffisamment fin. Le titane a déjà été employé depuis quelques années en cryomicroscopie sous forme d'oxyde (TiO_2) (Zenhausern et al, 1993) ou sous forme d'alliage TiSi pour l'étude de cristaux bidimensionnels (Rader et Lamvik, 1992 ; Sherman et Chiu, 2003 ; Rhinow et Kuhlbrandt, 2008) pour la constitution de films supports. Les travaux de Rader et Lamvik (1992) et Rhinow et Kuhlbrandt (2008) ont montré que ce film pouvait présenter une planéité identique à celle des films de carbone et une conductivité électrique à basse température comparable à celle des métaux, c'est à dire une faible résistance électrique ($1,02 \mu\Omega\text{m}$ à 77K), proche de celle du titane ($0.39 \mu\Omega\text{m}$ à cette température) (Lide, 2001). Par comparaison, la

résistance électrique du carbone à 77K est si élevée qu'elle n'a pu être mesurée avec un appareillage standard (Rhinow et Kühlbrandt, 2008).

B-Matériels et Méthodes

1.Préparation des alliages de TiSi

Deux alliages $\text{Ti}_{88}\text{Si}_{12}$ de provenances différentes ont été utilisés. L'un a été fourni par Goodfellow, en grains de 2 à 3 mm. Nous avons réalisé un deuxième alliage à partir de titane (Cézus 99,995%) et de silicium de qualité électronique (Cézus) à la Plate-forme d'Elaboration d'Alliages Métalliques et Céramiques (Institut de Chimie des Matériaux Paris-Est-UMR 7182) par induction en quasi-lévitation dans un creuset (tableau III.1).

Elément chimique	Masse atomique	Pourcentage massique	Masse utilisée
Ti (99.995%)	47.9 uma	92.59%	18.518 g
Si (qualité électronique)	28.0855 uma	7.41%	1.482 g

Tableau III.1 : Composition massique de l'alliage $\text{Ti}_{88}\text{Si}_{12}$. Le titane est conditionné en petits cylindres et le silicium en pépites. A partir des masses des éléments chimiques, on convertit les pourcentages atomiques souhaités en pourcentages massiques présentés dans ce tableau. Les masses utilisées correspondent à la préparation de 20 g d'alliage.

Les composés sont introduits dans un creuset en cuivre à secteurs multiples refroidi par eau. Les petits cylindres de titane sont introduits en périphérie et les fragments de silicium sont déposés au centre car c'est la fusion du titane qui va entraîner la fusion du silicium. Le creuset, maintenu sous flux d'hélium pour chasser l'humidité résiduelle, est chauffé par un champ radiofréquence (180 kHz) qui permet en même temps de maintenir le corps en fusion en lévitation pour assurer l'homogénéité du mélange. L'alliage ainsi brassé est produit sous forme de boule (Figure III.5A). La boule d'alliage est une nouvelle fois refondue dans le creuset afin de s'assurer d'une homogénéité optimale. L'alliage est ensuite introduit dans un bateau en cuivre placé lui aussi sous atmosphère contrôlée. Le même principe d'induction est utilisé pour allonger le mélange sous forme cylindrique. En déplaçant la bobine électromagnétique, le long de l'axe du bateau, on attire le métal chauffé en lui donnant la forme souhaitée (Figure III.5B). Le cylindre d'alliage est ensuite découpé en petites lamelles

de 0,7 mm d'épaisseur (~160 mg) au moyen d'une scie circulaire en carbure de silicium dans un bain de détergent pour faciliter la pénétration dans le métal. Les lamelles ont ensuite été cassées à la pince en fragments de 40 mg.

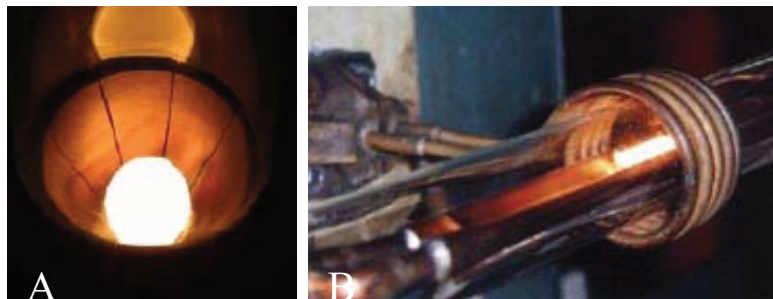


Figure III.5: Creuset à induction pour la préparation d'alliages métalliques (A) et leur mise en forme (B). Le creuset en cuivre est constitué de plusieurs secteurs chauffés par un champ Radio fréquences (RF) pour assurer un brassage homogène de l'alliage (A). La bobine visible en (B) peut être mécaniquement déplacée pour étaler le métal en fusion dans le creuset.

2. Conditions d'évaporation de l'alliage

L'évaporation de l'alliage a été réalisée par effet Joule dans un évaporateur Plassys BC300S dans les conditions proposées par Rhinow et al (2008) soit un vide meilleur que 10^{-6} mbar, un courant de 300 A environ et une vitesse d'évaporation entre 0,1 et 0,2 nm/s. Nous n'avons pas noté que la qualité du vide (dans la gamme 10^{-6} - 10^{-7} mbar) ait un effet notable sur notre capacité à décoller le film de son support (les films non décollés n'ont pu être analysés).

3. Choix d'un matériau pour le dépôt d'un film de TiSi

Le TiSi a été évaporé sur différents types de substrats :

- des substrats solides (mica, verre, PDMS, NaCl) dans le but de décoller ensuite ce film à la surface de l'eau distillée pour le déposer sur les grilles de carbone.
- des substrats solides recouverts d'une couche sacrificielle (Formvar, Collodion, PMMA, SMP), solubles dans un solvant pour faciliter le décollage du film de TiSi du substrat solide.

Les caractéristiques chimiques de ces matériaux sont regroupées sur le Tableau III.2.

Différents **mica** (grades V1 à V5, Agar et EMS) ont été utilisés immédiatement après clivage. Les **lames de verre** ont été lavées au détergent et rincées abondamment à l'eau dé-ionisée et dans certains cas à l'éthanol absolu. Des lamelles de polydiméthylsiloxane (**PDMS**)

(préparées au laboratoire) ont été utilisées sans traitement. Les **cristaux de NaCl** (Agar G3941) ont été clivés en plaquettes de 1 à 2 mm immédiatement avant évaporation.

Le **métaphosphate de sodium** (SMP) est un ester d'acide phosphorique particulièrement soluble dans l'eau. Ce produit a été largement utilisé pour produire des films métalliques difficiles à détacher de leur support dont un alliage Aluminium-Beryllium amorphe utilisé comme support pour de l'ombrage (Kaye, 1949) ou encore des films de bismuth ou de silicium utilisés pour leur propriétés optiques (Hunter et al, 1965) ou plus récemment pour produire des films de carbone texturés pour des applications de microscopie électronique (Reznik et Isaacson, 1992 ; Downing, 2003 ; Quispe et al, 2007). Ce produit est commercialisé sous forme d'un mélange d'acide mono et di-ethylhexyl-phosphatidique (Victawet, SPI), précurseurs du SMP. Nous avons utilisé deux méthodes pour constituer des sous-couches hydrosolubles de **métaphosphate de sodium** (SMP) :

- Par évaporation en deux étapes (SPI datasheet ; Stiegler et Nogglér, 1961). Les composés carbonés du victawet sont évaporés sous une tension de 280 à 300 V avec un courant de 120 A sous un vide de 4.5×10^{-6} mbar (évaporateur Alcatel, LPS) en produisant une remontée de la pression dans la chambre qui signale la fabrication du SMP, évaporé quasi-instantanément sur lame de verre, lame de cuivre et feuille de mica.
- Par spin-coating d'une solution de SMP à 0,25%, 0,5%, 1%, ou 2% (m/v) sur les mêmes substrats. Le SMP est préparé par dissolution du victawet dans l'eau distillée. L'eau rompt les liaisons entre les groupements phosphate et les chaînes carbonées pour former le SMP et des alcools respectivement.

Pour préparer les films de FORMVAR, de COLLODION, de PMMA et de SMP, le produit a été mis en solution dans leur solvant (chloroforme, acétate d'amyle, acétone et eau dé-ionisée respectivement). Une goutte de cette solution déposée sur une lame de verre (préalablement dégraissée et lavée) et étalée par « spin-coating ». Nous avons opté pour des concentrations de 0.25% formvar, 1% de collodion et 2% Victawet et 5% PMMA qui nous ont permis d'obtenir des sous-couches fines, homogènes qui se détachent du support ou peuvent être solubilisées facilement. Nous avons testé deux protocoles alternatifs pour préparer les grilles :

- i. Nous avons évaporé l'alliage sur la lame de verre recouverte de la sous-couche (formvar, collodion, PMMA ou SMP) et essayé de le décoller à la surface de l'eau. Dans le cas du formvar, du collodion et du PMMA, l'objectif était de déposer ce film double sur les

grilles de cuivre puis de dissoudre ensuite la couche sacrificielle en faisant flotter les grilles sur le solvant adapté. Dans le cas du SMP, la sous-couche est dissoute au contact de l'eau et le film métallique directement déposé sur les grilles

- ii. Une méthode alternative a consisté à décoller la sous-couche seule (formvar, collodion ou PMMA) à la surface de l'eau et à la déposer sur les grilles qui sont ensuite installées dans l'évaporateur pour le dépôt du TiSi. La sous-couche est ensuite dissoute dans le solvant adapté.

Les différents supports et sous-couches utilisés pour la préparation des films métalliques ainsi que leurs solvants respectifs sont regroupés dans le tableau III.2.

Les films préparés sur NaCl, sur Formvar et sur SMP ont été déposés sur des grilles de cuivre 1000 mesh à maillage carrés ou 600 et 700 mesh à maillage hexagonaux.

4. Microscopie électronique et spectroscopie de pertes d'énergie

Les échantillons métalliques ont été observés avec le microscope JEOL 2010 LaB6 disponible au laboratoire à une tension d'accélération des électrons de 200 kV. Celui-ci est équipé d'un filtre en sortie de colonne (GIF pour Gatan Imaging Filter) jouant le rôle de prisme magnétique pour l'analyse chimique. Nous avons ainsi étudié la composition chimique d'un film préparé sur NaCl à partir d'un fragment d'alliage fourni par D. Rhinow. Les films préparés sur une sous-couche de SMP ont été analysés sur un microscope STEM dédié (VG-HB501) au sein de l'équipe STEM avec Katia March. Celui-ci opère à une tension d'accélération des électrons de 100 kV et est équipé d'un spectromètre EELS Gatan 666. Dans les deux cas, l'acquisition des spectres a été réalisée à basse température (-180°C sur le JEOL et -140°C sur le VG) et après étuvage de la colonne pour éviter toute contamination dans le JEOL, avec une dispersion en énergie de 0,5 eV/canal. L'énergie des électrons collectés et les structures fines des seuils sont connues (Atlas Gatan). Les cryocoupes déposées sur les films ont été observées sur le microscope FEG JEOL 2010 (Institut Pasteur), sous une tension d'accélération de 200 kV.

C-Résultats

La première étape a été de trouver des substrats permettant i) de former un film métallique à partir de l'alliage et ii) de le décoller pour le déposer sur les grilles.

Nous avons testé de nombreux supports sur lesquels évaporer un film mince de TiSi que l'on puisse ensuite décoller et déposer sur les grilles de cuivre. Nous avons utilisé des supports classiques (mica, verre, PDMS) ou des supports solubles dans l'eau (cristal de NaCl, métaphosphate de sodium (SMP)) ou dans des solvants organiques (formvar, collodion, PMMA, etc.). Les essais réalisés initialement sur le mica ont permis de retenir les conditions de préparation qui ont ensuite été utilisées pour tous les supports, et d'identifier les paramètres les plus importants : l'épaisseur du dépôt (1 à 5 nm), le temps entre l'évaporation de l'alliage et le décollage du film (T_1), et le temps de séchage avant utilisation des grilles recouvertes du film de TiSi (T_2).

- L'épaisseur du film de TiSi influe sur la cohésion du film mais également sur sa rigidité et peut donc jouer un rôle sur son décollement du support. Nous avons ainsi observé un éclatement de certains films à la surface de l'eau. Un décollage partiel a été obtenu pour des épaisseurs de 2, 3 et 5 nm, mais ces observations n'ont pu être reproduites de manière

systematique. Pour des raisons de transparence aux électrons, nous n'avons pas cherché à augmenter cette épaisseur au-delà de 5 nm.

-Nous avons fait varier de quelques minutes à 13 jours le temps entre l'évaporation de l'alliage et le décollage du film, les films étant conservés à l'abri de la poussière et de l'humidité. Aucun film n'a pu être décollé plus de 3h après évaporation quel que soit le support utilisé et les conditions d'évaporation.

-Le temps de séchage des grilles recouvertes de TiSi avant utilisation a varié de 2 à 8 jours mais nous n'avons observé aucune influence de ce paramètre sur la qualité du film produit.

Les différents supports testés pour la préparation de ces films ont donné des résultats différents. Les cristaux de NaCl fraîchement clivés sont plans à grande échelle et le film de TiSi se décolle ensuite facilement sur l'eau en même temps que se dissout le NaCl. Ces caractéristiques en font apparemment un excellent support pour l'évaporation du TiSi mais nous verrons plus loin qu'il pose d'autres problèmes qui le rendent inadapté à nos besoins. Les supports de verre n'ont jamais permis de décoller les films métalliques à la surface de l'eau, cette piste a donc été abandonnée. Dans le cas des supports en mica, les résultats sont peu conclusifs. Quelques portions de films ont pu être décollées du mica mais ces résultats ne sont pas reproductibles, même en utilisant des micas d'un même lot. Dans le cas du PDMS, polymère siliconé couramment utilisé comme support, ou du COLLODION®, le TiSi forme de petits îlots séparés au lieu d'un film cohésif, ce qui montre que ces supports n'ont aucune affinité pour l'alliage.

Ces observations montrent que certains supports présentent une affinité trop élevée pour le film métallique alors que d'autres n'en montrent aucune. L'interaction mica-TiSi et mica-verre est sans doute trop forte ce qui explique que l'on ne peut décoller le film de TiSi de son support que dans de très rares cas. Au contraire, l'interaction PDMS-TiSi et Collodion-TiSi semble trop faible pour que le film puisse se former. Ces substrats ne sont donc pas adaptés à la préparation de films d'alliage de titane-silicium.

Les résultats obtenus après évaporation sur le PMMA, le Formvar, et le SMP sont beaucoup plus encourageants. L'affinité du PMMA pour le TiSi semble bonne et permet la formation d'un film métallique qui présente un aspect satisfaisant mais la dissolution du PMMA dans l'acétone provoque un enroulement du film de TiSi sur lui-même qui se fragmente et coule. Ceci peut s'expliquer par le caractère peu polaire du solvant employé et la faible affinité de celui-ci pour les matériaux hydrophiles comme le titane, ce comportement nous a conduit à

abandonner cette piste pour le moment. Les films Formvar-TiSi se décolle difficilement de la surface de verre alors qu'un film de formvar préparé dans les mêmes conditions que celui recouvert de TiSi seul se détache très bien. Ces difficultés pourraient venir du vide poussé lors de l'évaporation. Cette méthode a néanmoins donné des résultats encourageants et mérite d'être poursuivie. Enfin, les films évaporés sur SMP se sont détachés facilement pour flotter sur l'eau distillée. Néanmoins, ces films présentaient un aspect poreux et les bords apparaissaient morcelés à la surface de l'eau. Cette porosité du film de TiSi, absente avec les autres méthodes de préparation, suggère une inhomogénéité du dépôt de l'alliage métallique vraisemblablement due à une inhomogénéité de la sous-couche de SMP elle-même, qu'elle soit formée par évaporation ou par spin-coating. Ces résultats indiquent que la préparation de la sous-couche doit être améliorée mais la possibilité de décoller les films métalliques en font un support intéressant.

1. Aspects des films métalliques préparés sur trois supports différents

Les films ont été observés en microscopie électronique à transmission à faible grandissement pour déterminer l'aspect macroscopique des films (Figure III.8A, D, G), puis dans les conditions d'imagerie CEMOVIS (40000x avec sous focalisation de 2 μm (Figure III.8B, E, H) et enfin à fort grandissement (500,000x, proche du point de focalisation) (Figure III.8C, F, I) pour avoir accès à leur structure haute résolution.

Les films que nous avons pu obtenir sont souvent fragiles, comme l'attestent les cassures visibles à faible grandissement (Figure III.8A) mais un nombre suffisant de régions intactes ont permis de faire des tests.

- Les films préparés sur NaCl montrent une mosaïque de pavés de 10 nm. Ceux-ci apparaissent très nettement pour des valeurs de sous-focalisation allant de 1 μm à 10 μm (Figure III.8B) ce qui couvre la gamme habituellement employée en cryomicroscopie. Ils ne sont pas détectables à fort grandissement (Figure III.8C) où le film apparaît globalement amorphe. Ces pavés sont visibles sur les images de cryosections déposées sur ces films et gênent l'interprétation du signal. L'origine de ce phénomène n'est pas parfaitement comprise ; il semble que la structure cristalline du sel influe sur la structure du film, cette hypothèse n'a pas été vérifiée et le support a été abandonné. Ce phénomène a déjà été observé avec ces films (Sherman et Chiu, 2003).

- Les films préparés sur Formvar présentent une bonne planéité sur une partie de la grille mais semblent plissés dans d'autres régions (Figure III.8D). A fort grandissement, comme dans les conditions d'imagerie CEMOVIS, le film apparaît amorphe sans structure pouvant gêner le signal.
- Enfin, les films préparés sur SMP apparaissent plans. On observe la présence de grains sombres, denses aux électrons, d'environ 3 nm (Figure III.8H, flèches blanches) qui présentent des stries régulièrement espacées de 2,1 Å, caractéristiques d'une structure cristalline (Figure III.8I flèche blanche). Les régions entre ces grains semblent amorphes.

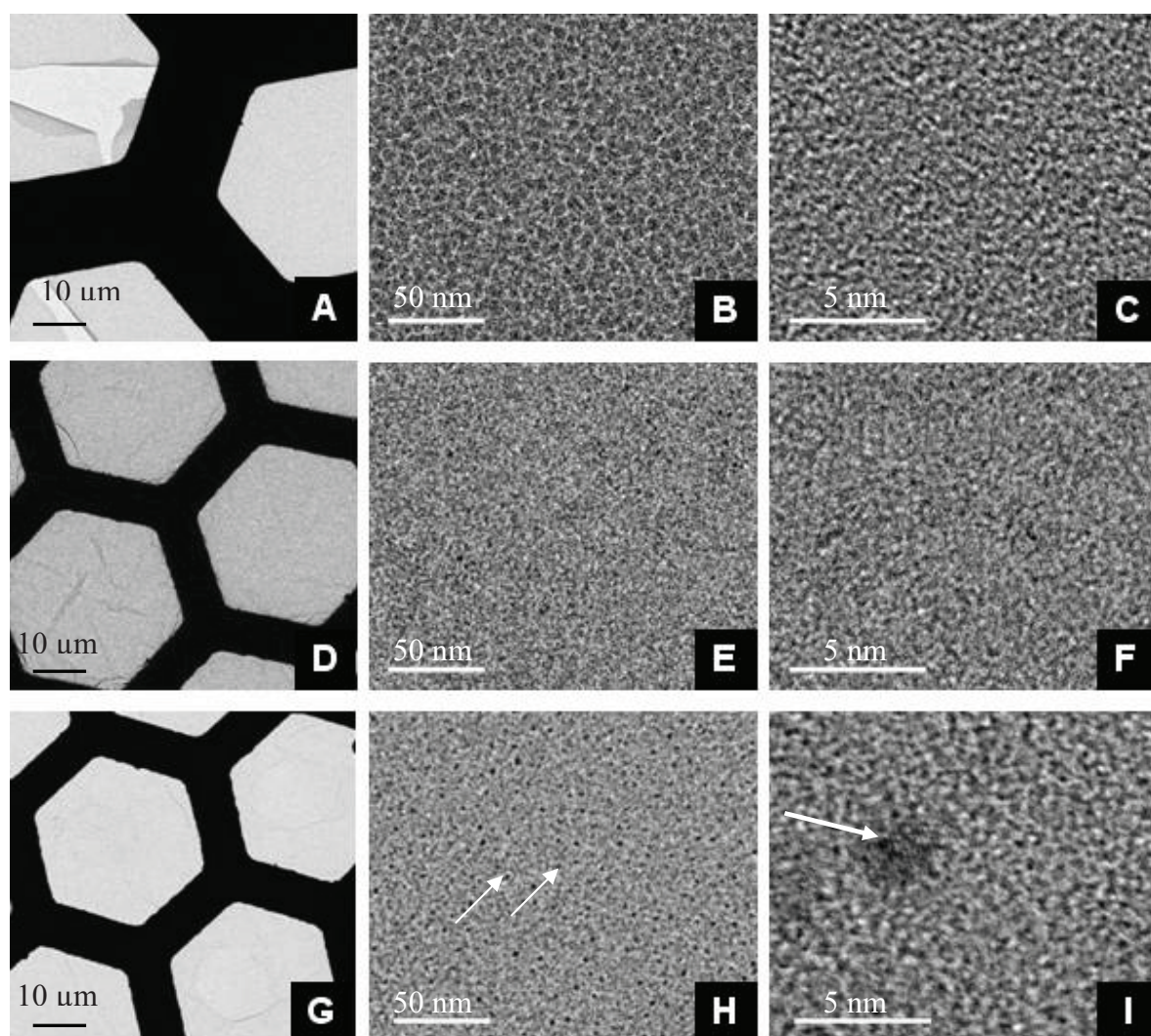


Figure III.8 : Aspect des films de TiSi en microscopie électronique. Films préparés sur NaCl (A,B,C), sur une sous-couche de formvar (D, E, F), ou sur une sous-couche de SMP (G, H, I) et imagés à faible grandissement (500x) (A,D,G), en conditions d'imagerie CEMOVIS (40000x, avec une sous-focalisation de 2 μm) (B, E, H) et en conditions d'imagerie HR (500.000, proche du focus)(C, F, I). Les films sont déposés sur des grilles 700mesh hexagonales (A) et 600 mesh hexagonales (D et G). Les zones cristallines sont marquées par des flèches blanches.

2. Caractérisation chimique du film par spectroscopie EELS

Nous avons analysé la composition chimique des films préparés sur des cristaux de NaCl à partir de l'alliage fourni par D. Rhinow ainsi qu'à partir de notre source principale d'alliage (préparé à Vitry) afin de connaître les pourcentages de Titane et de Silicium composant le film après évaporation. Cette analyse a également été réalisée pour des films préparés sur une sous-couche de Formvar à partir de notre source d'alliage.

La spectroscopie de pertes d'énergie des électrons ou EELS (« Electron Energy Loss Spectroscopy ») est une technique d'analyse de microscopie électronique en transmission. Cette technique de spectroscopie basée sur les électrons diffusés inélastiquement lors de la traversée de l'échantillon permet localement une caractérisation chimique de la zone sondée. Les électrons incidents, interagissant avec l'échantillon, peuvent provoquer différents phénomènes dont l'ionisation des atomes rencontrés. Les électrons incidents avec une énergie E rencontrant un atome peuvent arracher un électron des couches internes, cédant ainsi une énergie ΔE nécessaire pour arracher l'électron. La valeur de ΔE dépend de la couche électronique considérée et du numéro atomique Z de l'atome. Les électrons incidents ayant subi une telle diffusion ont une énergie spécifique et sont dispersés en fonction de celle-ci par un prisme magnétique et collectés par un analyseur. Cette technique permet donc d'obtenir un spectre présentant le nombre d'électrons collectés en fonction des différentes pertes d'énergie ΔE .

Le spectre EELS réalisé sur l'alliage que nous avons préparé puis évaporé sur un substrat cristallin (NaCl) (Figure III.9, courbe noire) présente une série de pics pour des énergies comprises entre 450 et 580 eV. Entre 450 et 520 eV, on observe le seuil $L_{2,3}$ caractéristique du titane présentant un double pic intense. Il révèle la présence de titane au sein du film. Elle est confirmée par l'observation du seuil L_1 du titane à 564 eV. Entre 525 et 550 eV, on distingue le seuil K de l'oxygène avec une structure étroite centrée sur 532 eV. La présence d'oxygène au sein des films est vraisemblablement due à l'oxydation du titane. En revanche, lors de l'expérience, aucun signal à 99 eV, traduisant la présence de Silicium n'a été observé. L'analyse du spectre obtenu sur l'alliage fourni par D. Rhinow et évaporé au laboratoire dans les mêmes conditions mène aux mêmes conclusions pour la présence de titane oxydé et l'absence de signal de silicium (Figure III.9, courbe rouge).

Ces deux compositions chimiques similaires suggèrent l'absence ou une très faible concentration de silicium au sein de nos films. L'alliage fourni par D. Rhinow contient pourtant 12% de silicium et 88% de titane et ces auteurs ont vérifié cette composition par

EDX (Rhinow et Kühlbrandt, 2008). L'alliage que nous avons réalisé à l'ICMPE (Vitry) a été préparé pour contenir également 12% de silicium et 88% de titane en pourcentage atomique et a été produit par une méthode différente (creuset à induction plutôt que four à arc). Nous n'avons pas vérifié la composition de l'alliage après sa préparation mais la similarité des deux spectres suggère que le problème réside dans l'évaporation de l'alliage. L'absence de silicium dans les deux cas indique une évaporation nulle ou partielle du silicium lors de la formation des films métalliques.

Le spectre acquis sur le film évaporé sur une sous-couche de Formvar (Figure III.9, courbe bleue) est similaire aux précédents à l'exception d'un seuil supplémentaire assez large, situé entre 280 et 320 eV signalant la présence de carbone amorphe. Cette observation peut avoir deux origines : la contamination au sein du microscope ou une mauvaise élimination de la sous-couche de Formvar, riche en atomes de carbone. Les conditions d'acquisition des spectres (basse température et étuvage) et l'absence de carbone dans les deux cas précédents nous font préférer la deuxième hypothèse.

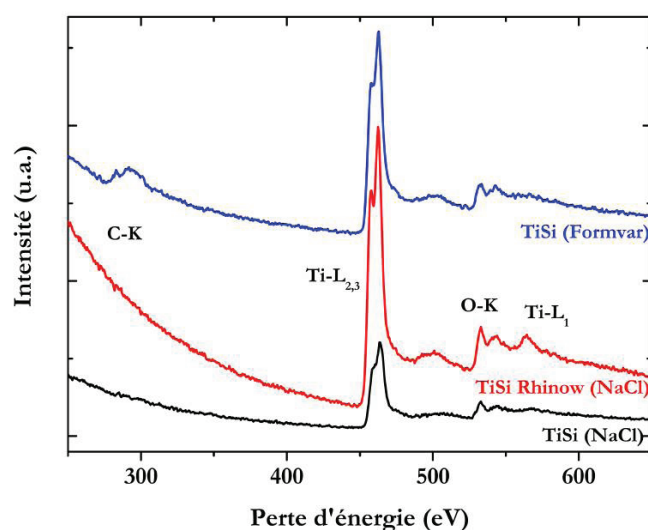


Figure III.9 : Composition chimique des films métalliques par spectroscopie EELS. La composition des films après évaporation sur du Formvar (courbe bleue) ou sur du NaCl (courbe noire) a été testée par spectroscopie de perte d'énergie sur le JEOL 2010 équipé d'un GIF (Gatan Imaging filter). La même expérience a été réalisée sur l'alliage fourni par D. Rhinow et évaporé sur du NaCl (courbe rouge). Les différents éléments chimiques sont indiqués à côté des pics correspondants. La deuxième lettre (K ou L) indique la couche électronique avec laquelle l'électron incident a interagi.

L'absence de détection de silicium sur ces trois spectres peut venir d'un pourcentage trop faible de ce composé dans la composition des films, en deçà du seuil de détection de la technique. Pour tester cette hypothèse, nous avons regardé la composition chimique du film avec un microscope dédié à l'imagerie EELS (STEM VG) dans le cas des films préparés sur une sous-couche de Métaphosphate de Sodium (SMP). Des premiers spectres ont été acquis

en sonde fixe dont un exemple est donné en Figure III.10. Ces spectres présentent le même aspect que les précédents mais avec une bien meilleure résolution en énergie permettant en particulier de distinguer le double pic du titane, seulement deviné sur les autres spectres. On retrouve le seuil C-K du carbone amorphe à 284 eV. On note en outre la présence d'un pic peu intense à 400 eV caractéristique du seuil K de l'azote.

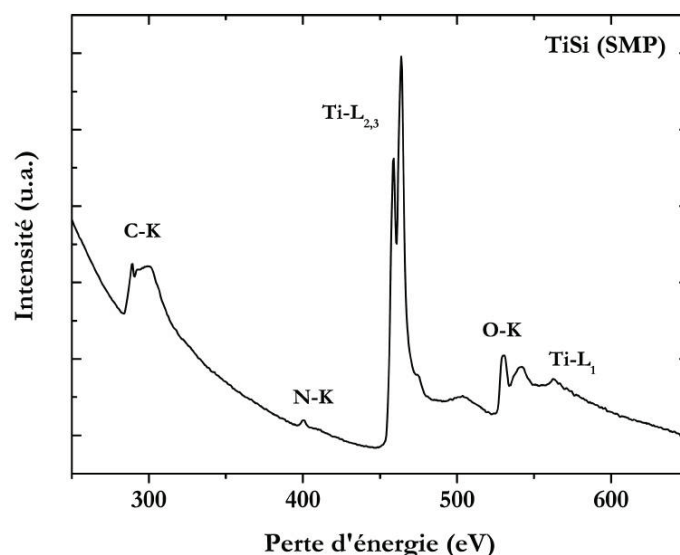


Figure III.10 : Composition chimique du film métallique évaporé sur métaphosphate de sodium (SMP) par spectroscopie EELS. Le spectre a été acquis sur le microscope STEM dédié (VG-HB501) pour avoir une meilleure résolution en énergie qui permet de distinguer le double pic du titane ainsi que la présence d'azote dans le film. Les différents éléments chimiques sont indiqués à côté des pics correspondants. La deuxième lettre (K ou L) indique la couche électronique avec laquelle l'électron incident a interagi.

L'acquisition du signal sur un temps long (Figure III.11) permet d'augmenter le rapport signal sur bruit et de mettre en évidence une faible quantité de silicium, inférieure à 2%, ce qui tend à confirmer l'hypothèse d'une évaporation partielle de ce composé lors de la préparation des films. L'analyse semi-quantitative de plusieurs spectres révèle que le film est essentiellement composé de TiO_2 avec des pourcentages d'azote de l'ordre de 2% et de carbone variant selon les zones choisies de 8 à 16%.

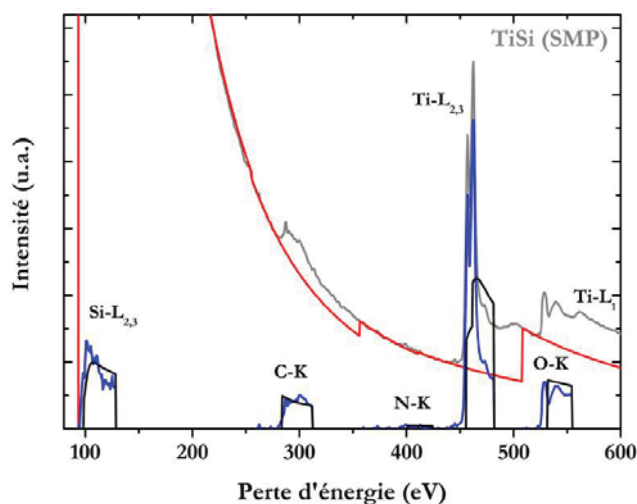


Figure III.11 : Quantification des éléments chimiques dans le film métallique. Le spectre a été acquis sur le microscope STEM dédié (VG-HB501). La quantification des différents éléments montre que l'oxygène et le titane sont majoritaires. Le pourcentage de silicium est très faible (2%) et largement en deçà des valeurs attendues. Le fond continu (en rouge) est soustrait du signal (en gris) avec une fenêtre d'intégration de 30 eV autour de chaque pic. Le signal résultant est indiqué pour chaque composé (en bleu). Le pourcentage de chaque élément est obtenu par simulation de l'aire sous chaque pic (en noir).

3. Cartographie chimique du film de TiSi

Outre le spectromètre EELS, le microscope STEM VG est équipé d'un détecteur de fond noir à grand angle qui permet l'imagerie de fond noir annulaire à grand angle des électrons diffusés élastiquement, HAADF (High Angle Annular Dark Field), sensible à l'épaisseur et à la chimie du volume sondé. La région du film que nous avons analysée présente un aspect inhomogène avec une surface présentant des défauts (Figure III.12A). Ces derniers apparaissent en noir sur l'image HAADF alors que le reste de l'image présente un contraste assez homogène, ponctué de points blancs marqués.

L'analyse en mode STEM a permis de cartographier la répartition des différents éléments chimiques observés sur les spectres au sein du film sur une sous-couche de SMP (Figure III.12). Les cartographies des seuils de titane (Figure III.12B) et d'oxygène (Figure III.12C) sont corrélées l'une à l'autre et, en dehors des défauts, présentent un contraste homogène ce qui caractérise une composition homogène sur l'ensemble du film. Celles des seuils d'azote (Figure III.12D) et de carbone (Figure III.12E) présentent des zones de forte intensité que l'on peut associer aux points blancs observés sur l'image HAADF. La cartographie du silicium (Figure III.12F) révèle que cet élément chimique est bien présent dans le film mais sa concentration n'est pas homogène. En effet, elle est augmentée localement au niveau des défauts, aussi bien les agrégats que les défauts linéaires apparaissant

en noir sur l'image HAADF. Une ségrégation du silicium lors de l'évaporation est donc à envisager.

La composition chimique de ces films montre des différences significatives par rapport à celle que nous attendions. L'exemple le plus flagrant est le faible taux de silicium dont nous avons discuté l'origine plus haut mais ces films contiennent aussi de l'oxygène, quelle que soit la source d'alliage et le type de support choisi. La présence de cet élément indique une oxydation du titane. L'alliage est conservé sous vide entre deux utilisations mais l'affinité de l'oxygène pour le titane est très élevée et peut expliquer la présence de cet élément chimique en dépit des précautions prises. L'origine de l'azote n'est pas connue mais sa répartition homogène en dehors des régions où il s'associe au carbone semble indiquer une contamination de la surface du film. Le carbone est observé dans le cas de films préparés sur du formvar ou du SMP mais pas lors d'une préparation sur cristal de NaCl. Dans le cas du formvar, la présence de cet élément dans la composition chimique (tableau III.2) permet d'expliquer sa présence sur le film en cas d'élimination incomplète de cette sous-couche. Dans le cas du SMP, la présence de carbone est plus surprenante car le composé évaporé est un ester phosphorique mais ne contient pas d'atomes de carbone. Ceux-ci ne sont présents que dans les précurseurs constituant le produit commercial (Victawet®) et sont censés être éliminés lors de la préparation de la sous-couche. La présence de carbone indique que la préparation de la sous-couche de SMP n'est pas réalisée dans de bonnes conditions, ce qui conforte nos premières observations et peut expliquer les défauts observés sur les films.

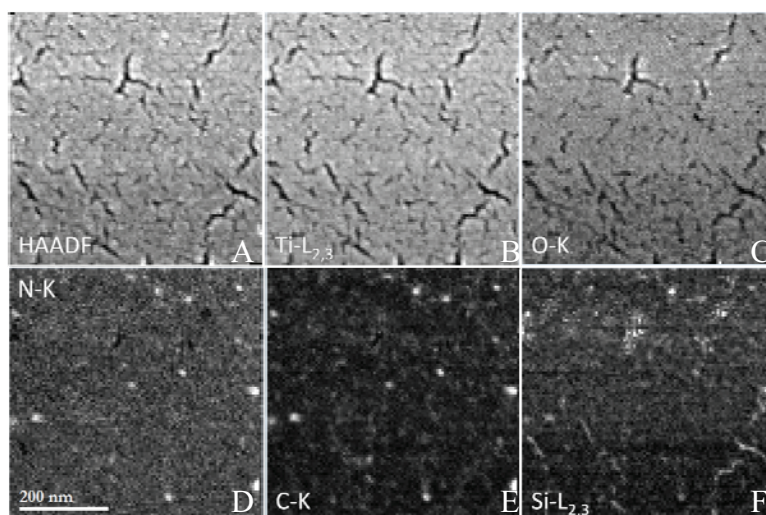


Figure III.12 : Cartographie chimique de la répartition des différents éléments au sein du film métallique (A) Image HAADF montrant l'aspect du film. (B) Carte de répartition du titane dans l'échantillon. Les régions en noir correspondent à des zones où ce composé est absent. (C) Carte de répartition de l'oxygène. (D) Carte de l'azote. (E) Répartition du carbone dans l'échantillon. La distribution de ces deux éléments est fortement corrélée. (F) Carte de répartition du silicium. Celui-ci est surtout présent dans les régions où le titane est absent.

4. Test d'adhésion des coupes sur le film métallique

Les tests d'adhésion des cryosections ont été réalisés sur des films métalliques préparés sur du NaCl, du formvar et du SMP selon le protocole décrit plus haut. Un exemple en est donné sur la Figure III.13A : la coupe repose partiellement sur le film de TiSi et partiellement dans le vide (en bas à droite de l'image). La portion de coupe sans film support a brûlé en formant un trou comme en cas de mauvaise adhésion alors que la coupe posée sur le film brûle en « bullant » (Figure III.13B), indiquant une bonne adhésion. D'une manière générale, les régions où les coupes et le film support étaient plans ont présenté une adhésion satisfaisante. Quelques images de bonne qualité (absence de drift et sous-focalisation choisie) ont été collectées à 30 000x. La Figure III.14 montre les empilements membranaires des thylacoïdes au sein d'un chloroplaste d'Euglène (décrits dans l'article sur les membranes).

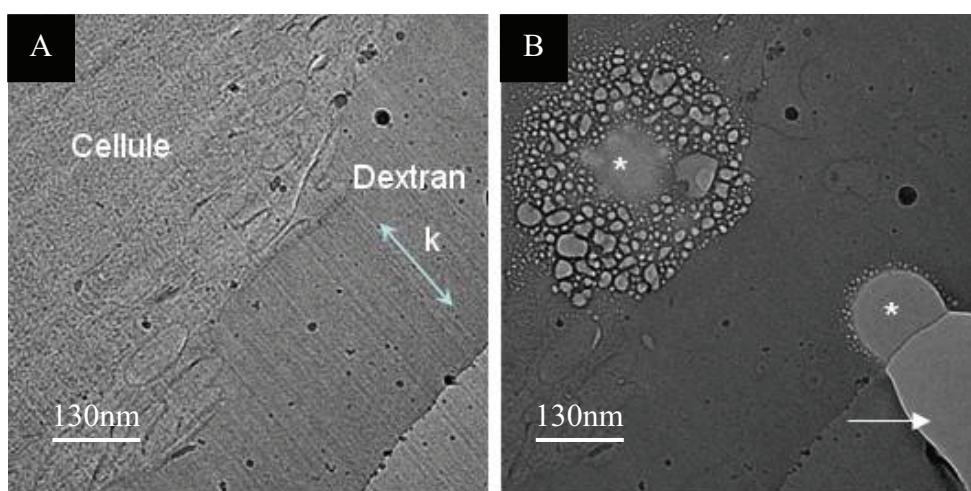


Figure III.13 : Test d'adhésion d'une cryocoupe cellulaire sur un film métallique préparé sur Formvar. A: Coupe d'une cellule HT29 entourée de dextran déposée sur la grille de cuivre recouverte d'un film métallique à l'exception du coin en bas à droite. L'orientation parallèle des marques du couteau (*k*) montre que la cryosection est plane. **B:** La même région est photographiée après irradiation forte en deux points (*). Les dégâts d'irradiation diffèrent selon que la coupe est posée sur le support (bullage du matériel) ou non (trou qui se propage rapidement indiqué par la flèche blanche).

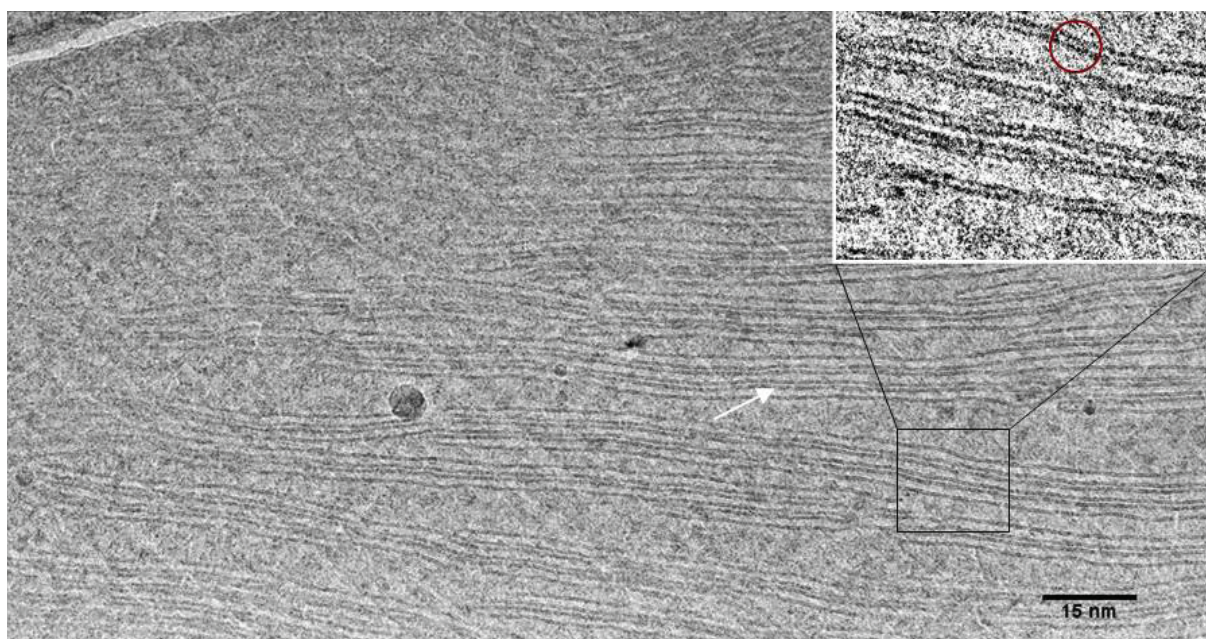


Figure III.14: Chloroplaste d'*Euglena gracilis*. L'image a été acquise à un grandissement de 30 000x avec une sous-focalisation de 1,3 μm . Les saccules (thylakoïdes) sont empilés par groupes de trois (flèche blanche). Un agrandissement est mis en encart. Les deux feuillettes des bicouches sont visibles (cercle rouge).

Le faible taux de recouvrement des grilles par des films dépourvus de cassures a néanmoins gêné l'obtention systématique d'images à fort grandissement.

D-Discussion-Conclusion

1. Composition du film métallique formé par évaporation de $\text{Ti}_{88}\text{Si}_{12}$

Polk et al (1978) avaient montré qu'un alliage composé de 88% de titane et de 12% de silicium présentait un caractère amorphe et une température de fusion abaissée en raison de la proximité des conditions d'eutecticité (température de fusion unique pour les deux composés, plus basse que pour d'autres proportions de ce mélange et composition identique des états solides et liquides). Cette composition devait permettre d'évaporer l'alliage en conservant les proportions de chacun des éléments. L'analyse par spectroscopie EELS des films de TiSi que nous avons obtenus montre que ceux-ci ne sont pas homogènes. Ils sont caractérisés par une composition en silicium inhomogène et plus faible qu'attendue suggérant une évaporation seulement partielle de ce composé. Dans leur composition actuelle, ces couches évaporées s'apparentent à des films de TiO_2 . Le faible pourcentage de silicium présent dans les films peut s'expliquer par la faible vitesse d'évaporation (0,2 nm/s) que nous n'avons pu dépasser sans rompre le creuset de tungstène, et qui reste très éloignée d'une évaporation « flash ». Pour améliorer cette composition, il faut améliorer les conditions d'évaporation en changeant

d'évaporateur. Par ailleurs, la cartographie des constituants au sein du film, dans le cas d'une évaporation sur sous-couche de SMP montre que celui-ci est assez inhomogène. Ceci peut s'expliquer par l'irrégularité de la sous-couche de SMP. La préparation de ce composé est en effet difficile à contrôler et peut conduire à l'existence de défauts se traduisant ensuite dans le film métallique. Nous n'avons pas cartographié les films déposés sur du formvar, ce qui serait utile car il s'agit également d'un substrat prometteur.

Quoi qu'il en soit, ce composé formant le film support (TiO_2) s'est avéré adhérent pour les cryosections et donc utilisable, à condition de pouvoir obtenir de plus grandes surfaces de film homogènes.

2. Interactions mises en jeu pour stabiliser la cryo-coupe sur son support

Le mécanisme intime impliqué dans l'adhésion des cryosections sur le film support reste pour l'instant inconnu. La nécessité de maintenir les cryosections à l'état vitreux rend toute analyse de l'interface assez difficile. Nous ne savons donc pas quels types d'interactions sont réellement impliqués dans les phénomènes d'adhésion.

Nous proposons ici deux hypothèses :

1. Plusieurs études sur la structure chimique du carbone amorphe ont été menées dans le cadre de l'étude de leurs propriétés de conductivité électrique pour l'industrie électronique. L'évaporation de carbone par effet Joule produit des films avec une structure inhomogène basée sur l'hybridation sp^2 ou sp^3 des atomes de carbone (Robertson et Oreilly, 1987). Cette hybridation implique une géométrie particulière des interactions avec les atomes voisins. Les carbones sp^3 présentent une géométrie tétragonale qui s'inscrit dans un espace à trois dimensions tandis que les carbones sp^2 ont une géométrie trigonale. L'organisation spatiale de ces liaisons conduit au maintien libre des orbitales pz du carbone sp^2 qui ne sont pas impliquées dans la formation d'orbitales moléculaires avec les atomes voisins. Ces orbitales permettent la circulation des électrons et sont d'ailleurs connues pour leur rôle dans les effets de mésomérie au sein des cycles aromatiques par exemple. Robertson et Oreilly (1987) montrent que les films de carbone préparés par évaporation sont majoritairement constitués d'atomes de type sp^2 dans l'épaisseur et d'atomes de type sp^3 en surface. En accord avec ces observations, Larson et al (2011) montrent que la conductivité des films de carbone croît lorsque leur épaisseur augmente mais les films plus fins que 5nm restent isolants. Cette conductivité reste toujours très faible en surface. Le faible nombre de sites hybridés sp^2 au

sein du film limite sa conductivité électrique, ce qui signifie que les charges électriques qui s'accumulent sur le film à basse température lors de la confection des coupes et lors de leur observation sous le faisceau d'électrons ne peuvent être éliminées. Cette caractéristique des films de carbone est à corrélérer aux observations que nous avons réalisées sur des grilles électriquement chargées mettant clairement en évidence leur action défavorable pour l'adhésion. Les charges accumulées ainsi sur le film de carbone ne permettraient pas une approche assez fine des coupes au contact du film support pour permettre aux forces de Van der Waals d'exercer leur action alors que la conductivité électrique du film de TiO_2 permettrait l'exercice de ces forces. Cette hypothèse permet de rendre compte de l'ensemble des observations que nous avons faites, dont l'importance de la planéité des coupes et du support, l'effet néfaste des charges de surfaces mais aussi l'affinité très importante des sections pour le cuivre relié électriquement à la masse.

2. Une autre hypothèse permettrait d'expliquer la meilleure adhésion des cryosections sur les films de TiO_2 . Devlin (1992) a observé le comportement des bandes de vibration des molécules d'eau dans la glace amorphe en présence de différents types de molécules déposées à sa surface. Ces observations sont également confortées par des simulations et des mesures spectroscopiques (Hixson et al, 1992). Les molécules adsorbées peuvent interagir avec les molécules d'eau par trois mécanismes distincts : i) liaison hydrogène avec un hydroxyle OH, ii) interaction électrostatique avec un atome d'oxygène, et iii) interaction avec plusieurs molécules d'eau par des forces de Van der Waals. Ces mécanismes d'interaction sont identiques à ceux rencontrés avec l'eau liquide, ce constat n'est pas surprenant puisque la glace amorphe se comporte comme de l'eau liquide à très haute viscosité (Dubochet et al, 1988). L'affinité du titane pour l'eau est très importante et il semble donc possible que les cryosections interagissent avec le film support par l'un des mécanismes ci-dessus. Cette hypothèse est moins probable que la précédente car une bonne adhésion peut aussi être observée parfois sur des supports en carbone. De plus l'interaction des molécules d'eau de la glace amorphe avec les composés adsorbés à sa surface nécessite des réarrangements moléculaires qui se produisent sur des temps longs en regard de ceux impliqués dans les mécanismes d'adhésion. Il faut également considérer le fait que l'ensemble des données mentionnées ci-dessus a été acquis pour de l'eau amorphe préparée par déposition de vapeur et pour une gamme de température comprise entre 12 et 40 K pour les travaux de Hixson et al (1992) et entre 12 et 120 K pour les travaux de Devlin (1992). Le procédé d'obtention de

l'eau amorphe diffère de celui que nous utilisons pour vitrifier les échantillons biologiques (voir chapitre II) et une extension directe de ces résultats au cas des cryosections adsorbées sur un film support est difficilement réalisable. Néanmoins ces observations montrent que l'eau amorphe peut présenter en surface des interactions avec des molécules par des mécanismes rencontrés avec l'eau liquide. Nous ne pouvons pas affirmer que des molécules, d'eau notamment, présentes en surface de la coupe, interagissent avec le film par un des mécanismes cités ci-dessus mais nous ne pouvons exclure une implication partielle de ces phénomènes dans l'amélioration de l'adhésion rencontrée avec ces films.

En **conclusion**, si la fabrication de films de TiSi n'a pu être réalisée dans le cadre de cette thèse, les résultats obtenus sont néanmoins encourageants sous certains aspects :

- Tout d'abord, la conductivité électrique du film semble être un paramètre crucial, comme nous l'avions pressenti, et les films de TiO₂ peuvent améliorer les problèmes d'adhésion rencontrés pour l'imagerie haute résolution.
- Il n'est pas exclu de pouvoir mettre au point les conditions de préparation pour obtenir des films de TiSi ou de TiO₂ plans et sans cassures tout en maintenant une épaisseur suffisamment faible pour assurer la transparence aux électrons car nous avons constaté que des films d'épaisseur ≥ 3 nm ne permettent pas l'analyse de détails moléculaires.
- L'ensemble des conditions requises pour la production de film adhésif de TiSi utilisable en CEMOVIS est donc particulièrement stricte, à la limite des possibilités méthodologiques à notre disposition dans notre laboratoire. Son développement futur et l'élargissement de son utilisation au sein de la communauté de cryo-microscopie passe sans doute par le développement de films texturés sur le modèle des films Quantifoil® et C-flat® recouverts ou non d'un film fin continu selon la géométrie de la texture (type Quantifoil S7/2 ou R2/2) de TiSi comme dans le cas du carbone utilisé pour le moment (chapitre II). Des contacts ont été établis avec la société Quantifoil (Jena, Allemagne) et les premiers films de ce type viennent d'être produits et doivent encore être testés.

II- Analyses des structures biologiques par CEMOVIS

1-Choix du matériel biologique

Afin de déterminer le matériel biologique le plus adapté à notre étude, nous avons sélectionné quatre types cellulaires en raison, soit de leurs particularités intéressantes pour l'étude de la chromatine et du noyau (Levures, Euglènes, KE37), soit de leur facilité de culture et d'obtention en grande quantité (HT29). Dans un premier temps, nous avons testé la faisabilité d'une étude CEMOVIS c'est à dire la capacité des cellules à être vitrifiées (ce qui nécessite une teneur en eau inférieure à 85-90%) puis à être coupées (en résistant aux contraintes mécaniques).

A-Levures : *S. cerevisiae*

La levure (*Saccharomyces cerevisiae*) permet de disposer d'un grand nombre de mutants pour une étude de la relation structure-fonction de la chromatine. C'était donc un matériel très adapté à nos objectifs. Nous avons préparé des levures en phase exponentielle et en phase stationnaire. Dans les deux cas, mais de manière plus marquée pour les cellules en phase exponentielle, les échantillons congelés par « slam-freezing » présentent un aspect opaque caractéristique des échantillons non vitreux (voir Matériel et Méthodes). La surface des échantillons présentait également des crevasses ou plissures et la réalisation des pyramides et des coupes s'est avérée difficile ou impossible en raison d'une certaine porosité du matériel. Nous avons pu identifier que ces problèmes de vitrification, reproductibles, provenaient de la présence de bulles gazeuses dans la suspension cellulaire et étaient liées au métabolisme des levures. Le problème était moindre pour les levures en phase stationnaire, probablement en raison de leur métabolisme ralenti.

Par contre, les levures marquées à la desoxyuridine iodée (IdU) ont été vitrifiées sans problème et sans bulles piégées dans les échantillons. Les cellules exposées à l'IdU produisent un dégagement gazeux très modeste par rapport au lot témoin, ce qui laisse penser que l'activité métabolique des levures marquées à l'IdU était perturbée. L'observation des cryosections au microscope électronique confirme l'effet néfaste de l'IdU. Une vingtaine de cellules ont été observées. Quelques unes présentent une morphologie normale (Figure III.15A). On peut reconnaître la paroi de la levure, et différents organites cellulaires. Lorsqu'un noyau est observé, il n'apparaît pas plus dense aux électrons que le reste de la

cellule, ce qui suggère une absence de marquage à l'IdU. La plupart des cellules présentent des altérations plus ou moins sévères de leur ultrastructure. Une galerie des différentes morphologies est présentée Figure III.15 B-E. Dans la plupart des cas, la paroi cellulaire a disparu. On observe des réorganisations des membranes intracellulaires et une accumulation de matériel en périphérie de la cellule (Figure III.15B). Dans d'autres cas, on peut distinguer une zone plus claire rappelant la paroi des levures entourant une région beaucoup plus dense aux électrons et morcelée que nous attribuons à une accumulation homogène d'iode dans le cytosol sans que les structures cellulaires soient reconnaissables (Figure III.15C). On peut observer également la présence d'agrégats denses aux électrons en périphérie de la cellule, correspondant probablement à des régions à forte concentration d'iode. Enfin, on peut observer des cellules « fantômes » dont la paroi et la membrane plasmique ont disparu, formées d'amas non structurés de matériels cellulaires et d'amas denses aux électrons (Figure III.15E).

L'incorporation d'IdU dans les cellules s'avère extrêmement toxique pour les levures, et conduit à leur destruction. Cette méthode ne peut donc pas être utilisée pour augmenter le contraste de l'ADN dans les noyaux cellulaires. Par ailleurs, nos observations montrent qu'il n'est pas possible de préparer des échantillons vitreux de levures en conditions normales en raison de leur métabolisme, à l'origine de la production de gaz dans les échantillons. Seules certaines souches au métabolisme ralenti pourraient éventuellement se prêter à de telles études. Il existe des données bibliographiques présentant des images CEMOVIS de levures (Ladisnsky et al, 2006 ; Pierson et al, 2010). A la lumière de nos résultats, il serait bon de s'interroger sur l'état physiologique des cellules analysées par ces auteurs. En effet, il est possible que l'état observé ne soit pas l'état natif d'une cellule à métabolisme normal, mais corresponde à une cellule en condition de stress (osmotique par exemple en raison d'un temps de mélange trop long avec le cryoprotectant). Nous ne pouvons cependant être catégoriques car les méthodes de vitrification diffèrent dans les deux cas (« slam-freezing » ou « HP freezing »). Dans le cas de la congélation HP, la haute pression utilisée peut conduire à la dissolution des gaz dans le milieu de culture, ce qui expliquerait l'absence de bulles dans les échantillons.

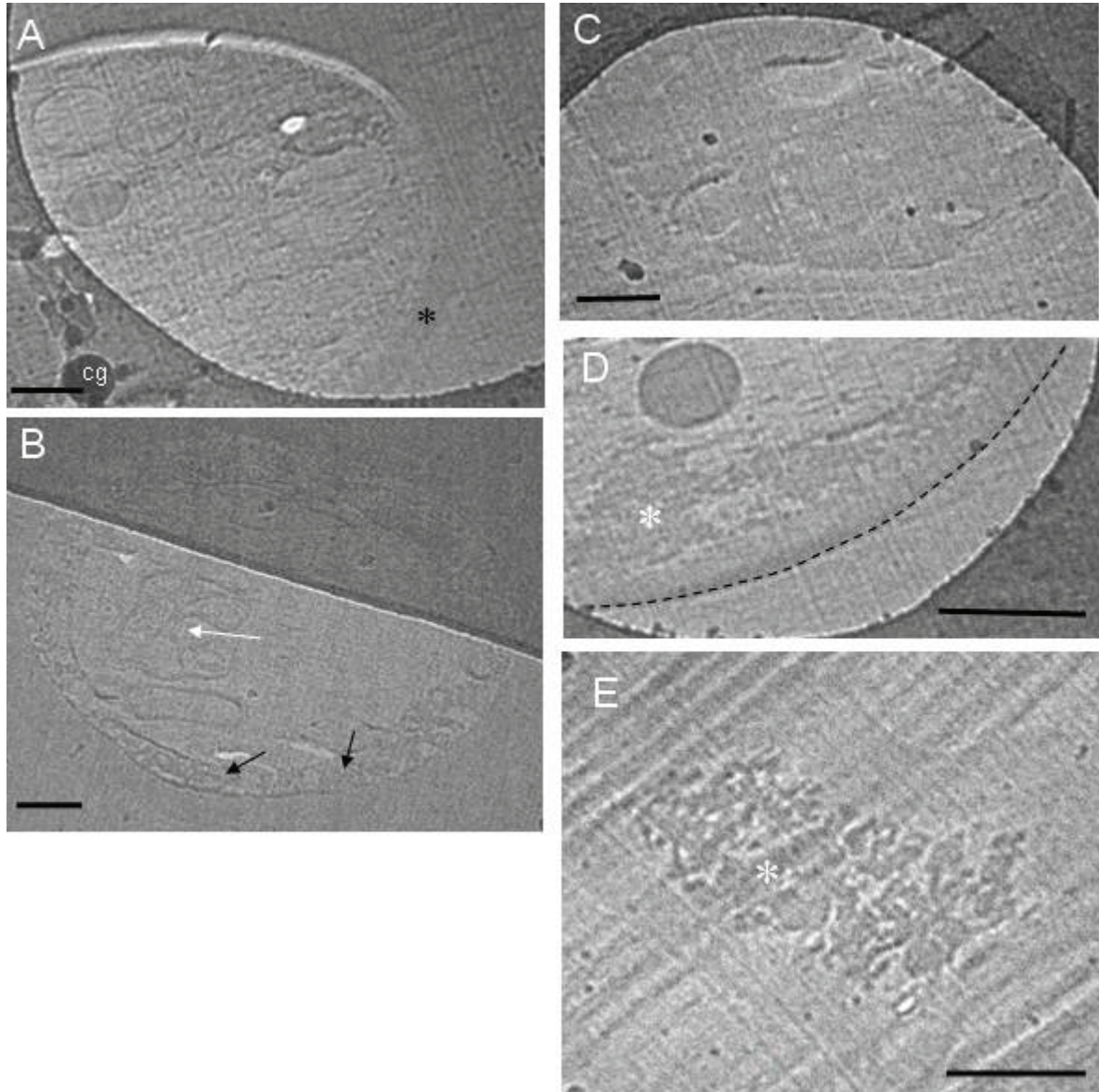


Figure III.15: Vues générales de levures marquées à l'IdU. (A) Cellule limitée par sa paroi cellulaire (*) présentant un aspect normal. En noir, des cristaux de glace posés sur la coupe (cg). (B) Cellule présentant des réorganisations de ses structures membranaires (flèche blanche). On observe une accumulation de matériel en périphérie (flèches noires). (C) Cellule présentant un cytosol d'aspect homogène, dense aux électrons. Les structures cellulaires ne sont pas reconnaissables. En périphérie de la cellule, on observe une zone plus claire, trace de la paroi cellulaire. (D) Des amas denses aux électrons sont accumulés en périphérie de la cellule (astérisque blanche). La limite cellulaire est indiquée par le pointillé. (E) Observation de débris cellulaires et d'amas denses aux électrons (astérisque blanche). Les structures cellulaires ne sont plus reconnaissables ainsi que les limites de la cellule. Echelles 1 μ m.

B-Cellules KE37

Cette lignée de cellules lymphocytaires présente un intérêt majeur, la grande taille du noyau par rapport à la cellule qui favorise ainsi les chances que les coupes passent par une région nucléaire. Nous n'avons toutefois pas réussi à préparer des culots de cellules suffisamment concentrés pour obtenir des images. Pour tenter d'augmenter la concentration, nous avons augmenté la vitesse de centrifugation entre 285 g (recommandé par l'équipe de l'Institut Curie qui nous a fourni les cellules) et 1000 g. Mais cette modification n'a pas permis d'obtenir des échantillons concentrés, ce qui nous a conduit à abandonner ce modèle.

C-Euglène

L'algue unicellulaire *Euglena gracilis* a une forme d'ellipsoïde de 20 à 50 µm de longueur et de 5 à 10 µm de diamètre. Elle a l'avantage de présenter des chromosomes condensés tout au long du cycle cellulaire, localisés dans un noyau toujours limité par l'enveloppe nucléaire et donc facilement identifiables sur les cryosections. Elle ne constitue cependant pas un modèle très favorable pour une étude fonctionnelle ultérieure en raison de l'absence de mutants disponibles. Nous avons pu préparer en grande quantité des échantillons vitreux suffisamment concentrés pour une étude par CEMOVIS. La confection des coupes n'a pas posé de problèmes majeurs visibles à la loupe binoculaire. Les cellules ont pu être observées sur cryosections au microscope électronique (Figure III.16A). Nous avons pu estimer la profondeur de vitrification pour ce matériel, à partir du nombre de cryosections vitreuses obtenues par échantillon. Celle-ci est assez faible, de l'ordre de 10 µm mais elle permet de vitrifier une couche de cellules entières, dans l'hypothèse où, comme dans les cas des paramécies (A. Leforestier, communication personnelle), la cellule s'oriente préférentiellement parallèlement à la surface de l'échantillon.

Sur les cryosections obtenues, on reconnaît l'ensemble des organites cellulaires : chloroplastes, mitochondries, noyau, Golgi, etc ... Néanmoins, dans certains cas, les cellules présentent des déchirures autour des compartiments cellulaires (Figure III.16B) qui peuvent même être complètement arrachés lors de la coupe. Selon les séries d'échantillons, ces phénomènes sont rares (cultures jeunes ou échantillons centrifugés à 100 g) ou très fréquents (cultures vieilles ou échantillons centrifugés à forte vitesse (300-1000 g). Même dans les

meilleurs échantillons, ce phénomène n'est jamais complètement absent. Il est connu que les conditions de stress (appauvrissement du milieu de culture par exemple) favorisent le déclenchement des processus d'enkystement. Un début d'enkystement pourrait expliquer les difficultés que nous avons rencontrées. Ces défauts n'excluent pas la possibilité d'obtenir des images dans les régions exploitables. Nous avons donc conservé ce modèle mais il n'a pas constitué notre principal objet d'étude.

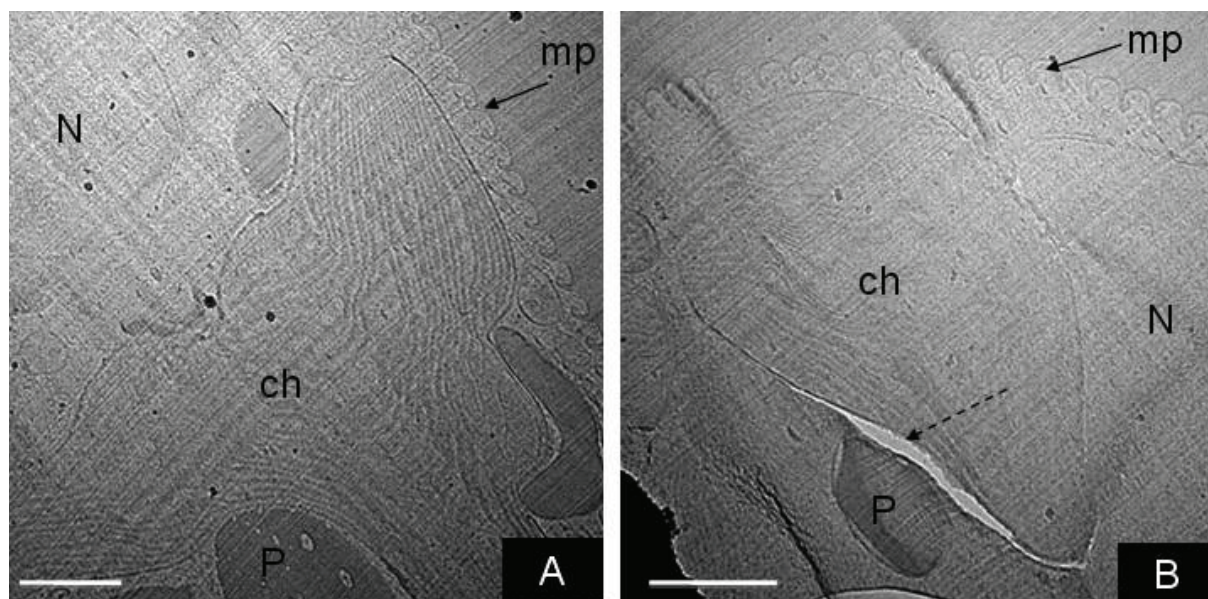


Figure III.16: Vues générales d'Euglènes. (A) Cellule dont l'intégrité est conservée. On remarque le noyau (N), le chloroplaste (ch) et ses réseaux membranaires de thylakoïdes et des vésicules de stockage des produits de la photosynthèse, les paramylons, structures cristallines denses aux électrons (P). La surface de la cellule, ou pellicule sous tendant la membrane plasmique (mp) présente un aspect caractéristique en sillons. (B) Cellule présentant une déchirure sur le pourtour du chloroplaste qui se détache de la section. Echelles 1 µm.

D-HT29

Les cellules épithéliales de la lignée HT29 ne présentent à priori aucune caractéristique particulière pour l'étude de la structure de la chromatine. Cependant ces cellules se sont avérées bien adaptées à une analyse par CEMOVIS en raison i) de leur résistance à la pression osmotique générée par le cryoprotectant ajouté à leur milieu de culture (survie de 24 h), ii) la possibilité d'obtenir facilement des échantillons concentrés, et iii) la vitrification des échantillons sur une profondeur de l'ordre de 15 µm, c'est à dire toute l'épaisseur de la cellule (10 µm). Ceci nous a permis d'obtenir des cryo-sections et des images des cellules HT29, dont l'analyse est présentée ci-dessous.

2-Présentation de la cellule HT29

Les cellules épithéliales en culture forment des tapis cellulaires. Remises en suspension puis concentrées pour notre étude, elles adoptent une forme globale sphérique. Nos images montrent qu'elles ont un contour très irrégulier (schématisé Figure III.17A), avec, dans certains cas, des repliements de la membrane plasmique (Figure III.17B).

Les images de cellules obtenues par CEMOVIS présentent un contraste beaucoup plus faible que celles obtenues par des méthodes de microscopie conventionnelle, après coloration par des atomes lourds. Selon les conditions d'imagerie (grandissement et conditions de sous-focalisation), on obtient différents types d'images et d'informations. Les images acquises à faible sous-focalisation (généralement à plus fort grandissement, 25-30000x) présentent peu de contraste et permettent d'observer des détails de l'ultrastructure cellulaire à moyenne ou haute résolution (1 à 3 nm). Les images acquises à fort défocus et faible grandissement (15000x) présentent plus de contraste et permettent de repérer des zones d'intérêt et de visualiser l'architecture générale de la cellule et des organites avec une résolution de quelques nm. Nous présentons ci-dessous quelques vues générales du noyau et du cytoplasme (Figures III.17-19). On remarque immédiatement la présence de quelques artefacts liés à la confection des cryo-sections en particulier les marques de couteau, striations plus ou moins prononcées présentes sur toute la photo (doubles flèches blanches). L'image est aussi ponctuée de taches sombres, denses aux électrons. Ces taches sont des cristaux de glace qui contaminent la surface de la coupe. Quelques crevasses sont également observables (Figure III.19, flèches blanches).

Le noyau cellulaire, reconnaissable à sa double enveloppe percée de pores nucléaires, est lobé (Figure III.17C).

La Figure III.18 présente deux images d'une même région, acquises à deux valeurs de sous focalisation différentes, 3 et 7 μm (Figure III.18A et III.18B respectivement). Sur l'image la moins sous focalisée, le noyau apparaît assez homogène. A plus forte sous-focalisation, plusieurs régions peuvent être distinguées :

- des régions présentant une texture granulaire caractéristique de la chromatine décrite dans les noyaux interphasiques (Bouchet-Marquis et al, 2006) ou dans les chromosomes métaphasiques (McDowall et al, 1986 ; Eltsov et al, 2008). Cette texture granulaire couvre une surface importante de plusieurs μm^2 .

- des régions moins denses et plus hétérogènes correspondant à l'espace interchromatinien (IC), décrites par Bouchet-Marquis et al (2006). Localement, on peut distinguer des striations périodiques, de période 11 nm (Figure III.18B, encart), correspondant probablement au signal détecté à 11 nm par McDowall et al (1986).

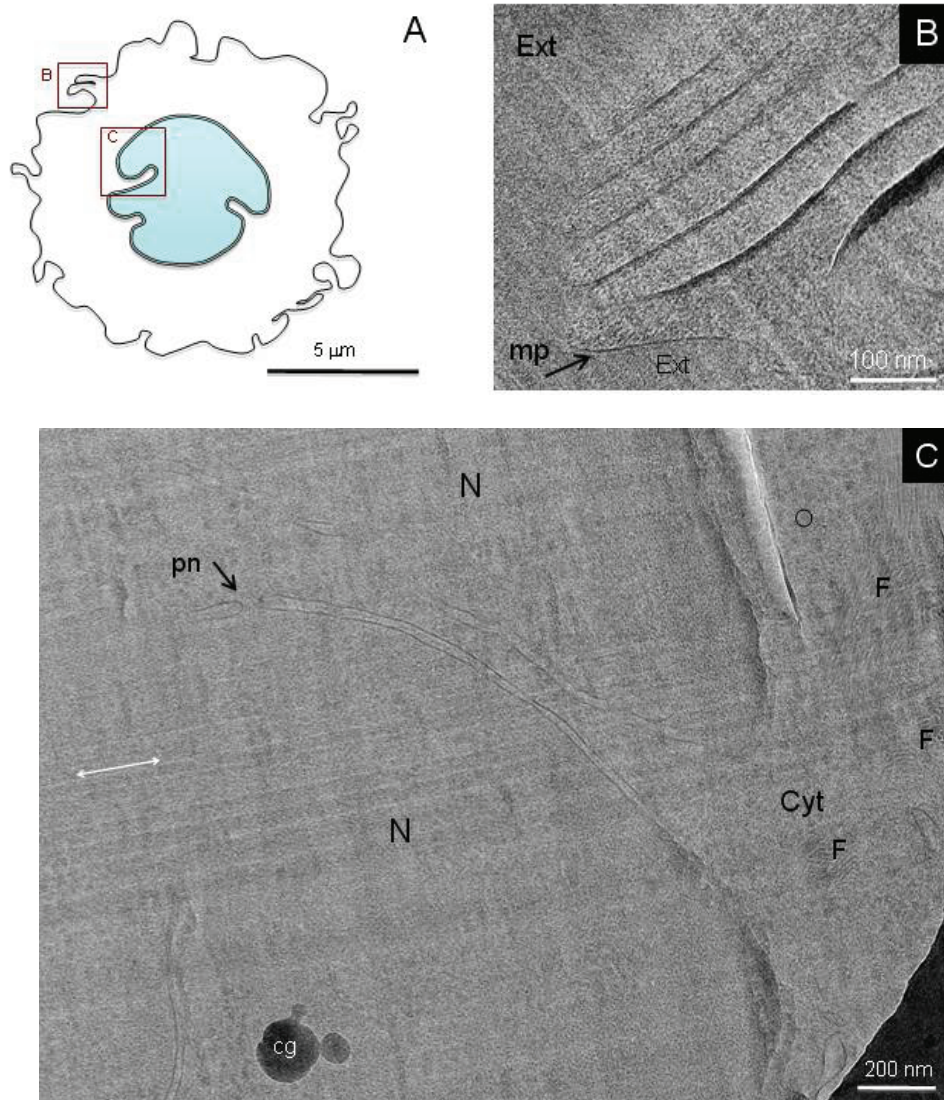


Figure III.17. (A) Schéma d'une cellule HT 29 avec sa surface irrégulière et son noyau lobé (N). (B) Détail de repliements de la membrane plasmique (mp) observés sur cryo-section. Ext : milieu extérieur à la cellule. (C) Vue générale d'une cellule HT 29 avec son noyau lobé (N). On reconnaît la double enveloppe et les pores nucléaires (pn). Les fines stries sont des marques de couteau formées lors de la coupe. Elles soulignent la direction de coupe (double flèche blanche). Dans le cytoplasme (Cyt) on observe des faisceaux de fibres (F) et des particules denses correspondant probablement aux ribosomes. L'une d'entre elles est encerclée. cg : cristal de glace déposé en surface.

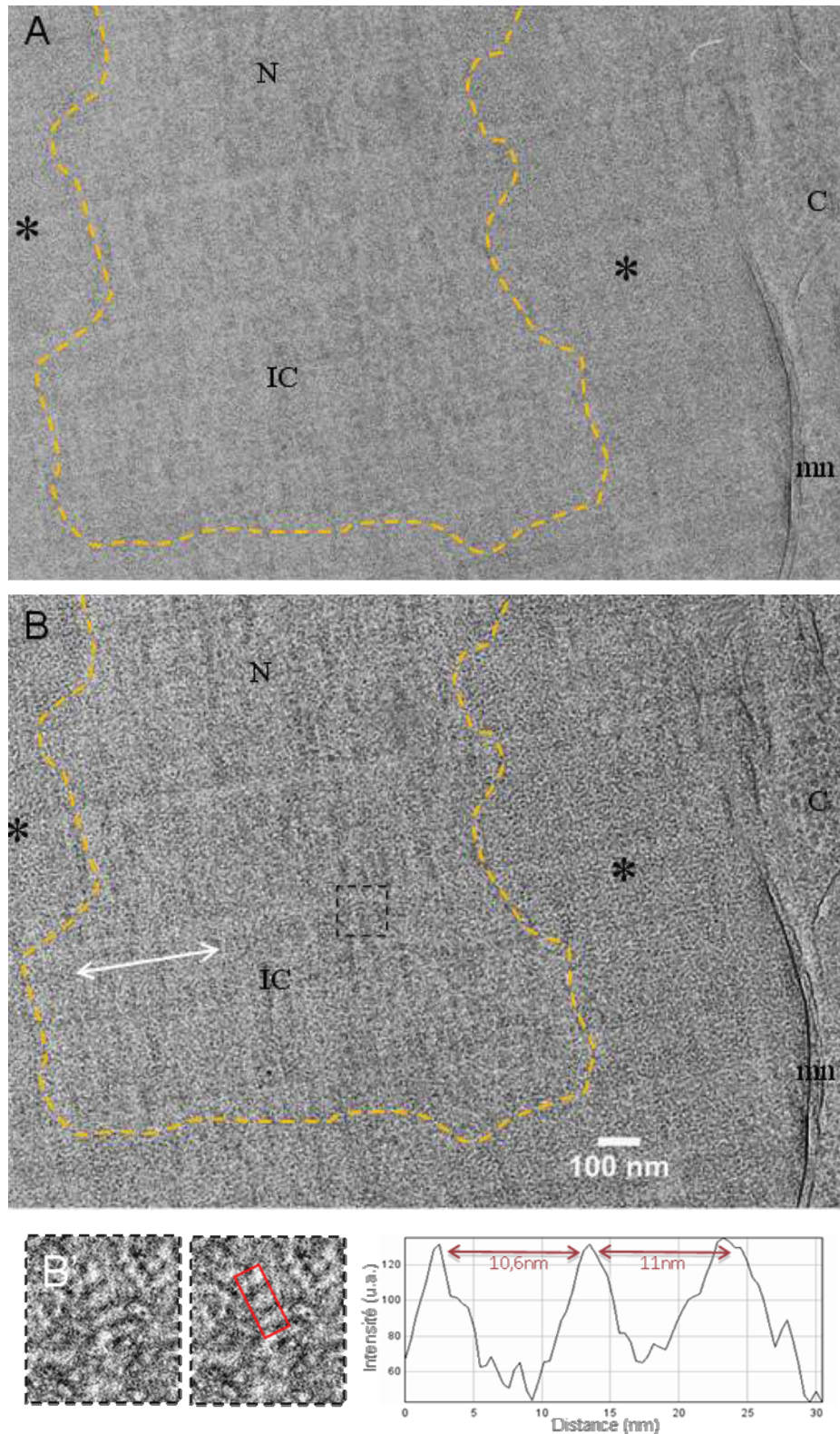


Figure III.18 : Noyau de la cellule HT29 présentant deux régions de chromatine condensée (A) Image acquise à 15000x, sous-focalisée de 3 μ m présentant peu de contraste, et (B) la même image fortement sous-focalisée (-7 μ m). Le noyau (N), séparé du cytoplasme (C) par la membrane nucléaire (mn) présente des régions de matériel dense (*) caractérisées par une granulosité homogène. La région située entre ces zones denses, ou région interchromatinienne (IC) présente un aspect moins homogène. Localement des striations peuvent être observées dans cette zone (encart agrandi en (B')). (B') Motif strié et ligne de profil d'intensité correspondante. La distance entre stries est de l'ordre de 11 nm. La direction de coupe, soulignée par les marques de couteaux est indiquée par la double flèche.

La Figure III.19 présente une vue générale de cytoplasme acquise à un grossissement de 15 000x avec une sous-focalisation de 3 μm . Dans ces conditions, on peut repérer les principaux organites et composants de la cellule. On identifie facilement les mitochondries (M) reconnaissables à la double membrane qui les délimite. Chaque membrane est une bicouche phospholipidique, qui apparaît sur cette image sous la forme d'une ligne dense aux électrons. Les conditions d'imagerie utilisées ne permettant pas ici de distinguer les feuillettes de la membrane. La membrane externe (flèche pointillée noire) entoure toute la mitochondrie et l'isole du reste du cytosol. La membrane interne (flèche noire) forme des invaginations (cristae) dans la matrice mitochondriale, augmentant ainsi la surface membranaire. Entre les membranes externe et interne, se trouve l'espace inter-membranaire. La matrice mitochondriale présente une plus grande densité aux électrons que le cytosol. D'autres organites sont également visibles sur cette image comme l'appareil de Golgi (G), caractérisé par la présence de saccules empilés (têtes de flèches) et par des vésicules qui s'en détachent.

Le cytoplasme de ces cellules contient également des complexes macromoléculaires solubles qui confèrent au cytosol une densité importante et inhomogène. On observe de nombreux granules denses aux électrons, de 25nm de diamètre environ, présents dans tout le cytosol. Ces caractéristiques nous permettent d'émettre l'hypothèse que ce sont des ribosomes. Leur densité aux électrons, supérieure à celle de la plupart des molécules biologiques s'explique par la présence d'acides nucléiques qui entrent dans leur constitution. Bien que leur présence soit ubiquitaire dans le cytosol, on remarque des régions où ces complexes macromoléculaires s'accumulent (Figure III.19, astérisque noire).

Le cytoplasme de HT29 présente aussi d'autres types d'organites plus polymorphes, qui appartiennent à la famille des corps multi-lamellaires (CML) et multi-vésiculaires (CMV). Plusieurs d'entre eux sont observés sur les Figures III.19 et III.20. Ce sont des organites ubiquitaires dans les cellules de mammifères, impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques

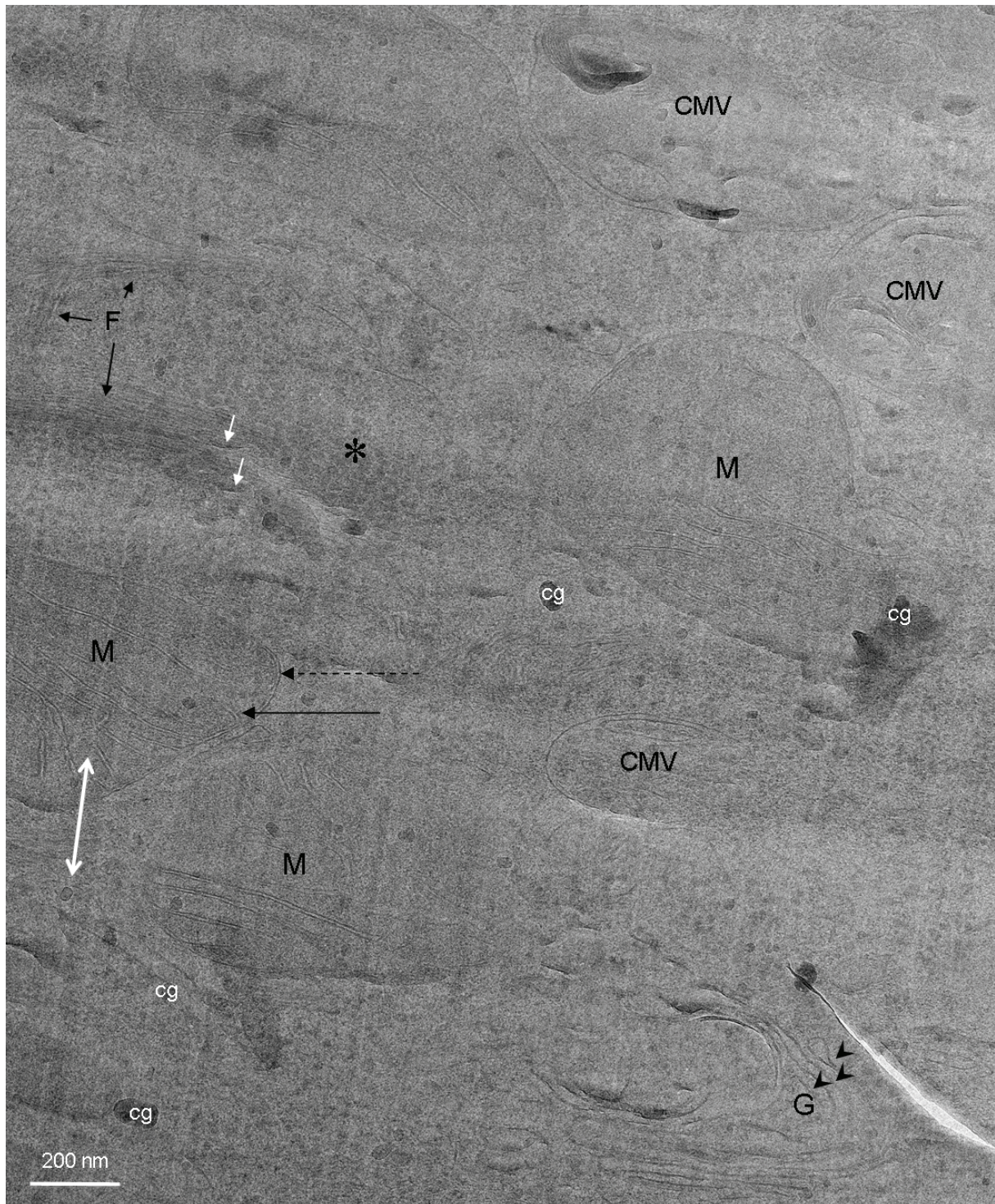


Figure III.19 : Vue générale du cytoplasme de cellule HT29. Plusieurs organites cellulaires sont présents sur la section dont les mitochondries (M), l'appareil de golgi (G) et des corps multi-vésiculaires (CMV). Des faisceaux de fibres (F) et des régions riches en ribosomes (*) sont également visibles. La coupe présente des cristaux de glace contaminants (cg). Les stries du couteau (doubles flèches blanches) indiquent la direction de coupe. Quelques crevasses sont visibles (flèches blanches).

Les corps multi-lamellaires sont impliqués dans des processus cellulaires variés comme le stockage de lipides (Schmitz et Muller, 1991), la sécrétion du surfactant par les cellules pulmonaires (Hatasa et Nakamura, 1965), ou encore l'adressage d'organites aux lysosomes pour assurer leur dégradation lors des processus d'autophagie. L'autophagie, voie de dégradation lysosomale des composants cytoplasmiques (protéines, organites), est particulièrement développée dans les lignées de cellules cancéreuses comme HT29 (Houri et al, 1995). Les corps multi-vésiculaires dérivent des endosomes tardifs et sont également impliqués dans les processus d'autophagie (Fader et Colombo, 2009). Ces deux types d'organites correspondent à différentes étapes des mêmes voies métaboliques. Les corps multi-lamellaires peuvent dériver de corps multi-vésiculaires au cours de leur maturation (Statton, 1978 ; Hatasa et Nakamura, 1965 ; Sud, 1977). Les corps multi-vésiculaires, de 500 à 1000 nm de diamètre (Figure III.19) sont limités par une membrane. Ils contiennent des systèmes lamellaires empilés ainsi que, dans certains cas, des vésicules, granulaires ou non, en nombre variable, de 50 à 200 nm de diamètre.

Les corps multi-lamellaires (Figures III.20) sont constitués pour l'essentiel d'empilements de membranes et sont séparés du cytosol par une membrane visible sur certaines images (Figure III.20B). Les empilements de membranes forment en section des motifs concentriques ou des striations unidirectionnelles (Figure III.20). Ces empilements s'étendent sur des distances de l'ordre de 27 à 80 nm, correspondant à une dizaine de membranes empilées de manière plus ou moins compacte. Sur l'ensemble de nos images, nous avons pu mesurer des distances entre membranes variant de 3 nm à 14 nm. Certains corps présentent des empilements compacts assez homogènes (Figure III.20B), alors que d'autres sont plus hétérogènes, caractérisés par des distances entre membranes très variables au sein du même organite (Figure III.20A). Cette variabilité de la compacité des empilements membranaires a déjà été décrite par Statton (1978) dans des cellules pulmonaires humaines. Par ailleurs, plusieurs de nos images montrent l'existence de réseaux membranaires complexes, liés aux corps multi-lamellaires, qui se propagent dans le cytoplasme sur de très grandes distances, jusqu'à plusieurs micromètres (Figure III.20A). Certaines de ces images sont reprises dans l'article sur les systèmes membranaires joint en annexe.

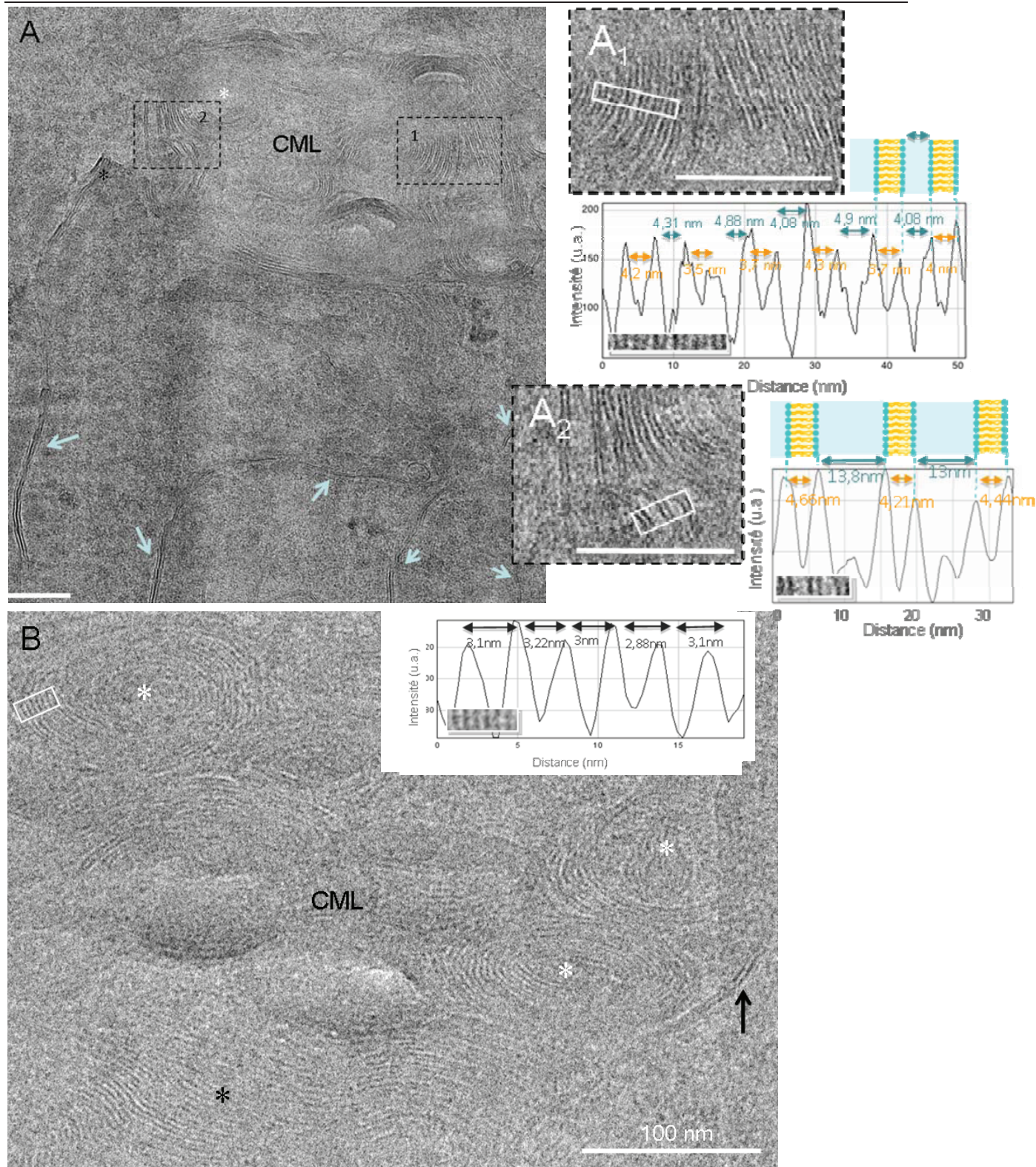


Figure III.20. Observation de corps multi-lamellaires (CML) dans les cellules HT 29. Les CML sont formés d'empilements membranaires présentant des motifs concentriques (astérisques blanches) ou unidirectionnels en section (astérisques noires). (A) CML relié à un vaste réseau membranaire se propageant à travers le cytoplasme de la cellule (flèches). L'empilement des membranes au sein du CML est lâche et irrégulier. (A₁, A₂) Détails des encarts 1 et 2 et profils correspondants aux régions encadrées en blanc. La structure en bicouche des membranes peut être déduite du profil. Les distances entre membranes empilées sont mesurées sur les profils (doubles flèches bleues). L'épaisseur de la région intra-membranaire est indiquée par les doubles flèches jaunes. (B) CML présentant un empilement, concentrique (astérisque blanche) ou planaire (astérisque noire), plus compact et homogène de membranes. Sur le profil de la région encadrée en blanc, on ne peut pas discriminer les régions inter- et intra-membranaires. La membrane entourant le CML est indiquée par la flèche noire. Echelles 100 nm.

Des microtubules peuvent également être observés. En coupe transversale, on peut visualiser individuellement les protofilaments (Figure III.21A). Au coeur des microtubules, on retrouve la présence des particules déjà observées par CEMOVIS, CET et CETOVIS dans des axones de cerveau de rat et des cellules CHO (Bouchet-Marquis et al, 2007 ; Garvalov et al, 2006). Ces particules ont été décrites comme des structures globulaires de 6-7 nm de diamètre se succédant sur toute la longueur du microtubule. Nos images de sections transverses ne permettent pas de suivre cette succession mais mettent en évidence des sous-domaines. Six sous-domaines sont visibles sur la Figure III.21B. Ils sont alignés, selon deux directions presque perpendiculaires dans le plan de coupe et sont probablement ordonnés en réseau.

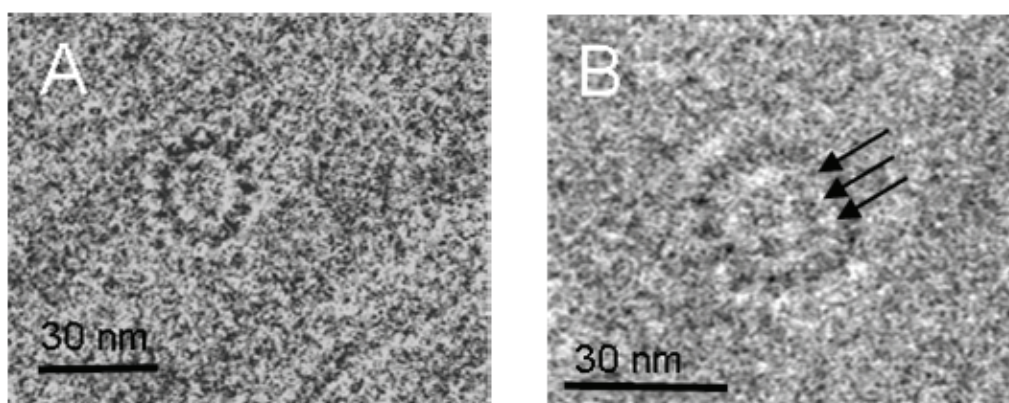


Figure III.21 (A) Microtubule observé en coupe transversale ($\Delta z = -3 \mu\text{m}$). On reconnaît les protofilaments composant les microtubules, ici au nombre de 14. (B) Détail du cœur d'un microtubule en coupe transversale ($\Delta z = -2 \mu\text{m}$). On observe une série de six particules. Trois d'entre elles sont indiquées par les flèches noires. Les particules sont alignées selon deux directions presque perpendiculaires.

Enfin, des faisceaux de fibres (F) aisément reconnaissables se propagent sur des distances de l'ordre du micromètre (Figure III.19). Quelques faisceaux de fibres sont présentés sur les Figures III.22 et III.23, observés en coupes longitudinales, obliques ou perpendiculaires.

Dans certaines régions, on observe des superpositions de faisceaux d'orientations différentes. Le diamètre des faisceaux observés sur l'ensemble de nos images varie de 30 à 200 nm. Les sections perpendiculaires aux fibres sont des plans de coupes favorables à leur visualisation. La fibre occupe toute l'épaisseur de la coupe ce qui permet d'obtenir un contraste optimum. Leur section est généralement circulaire avec un diamètre de 6 à 10 nm.

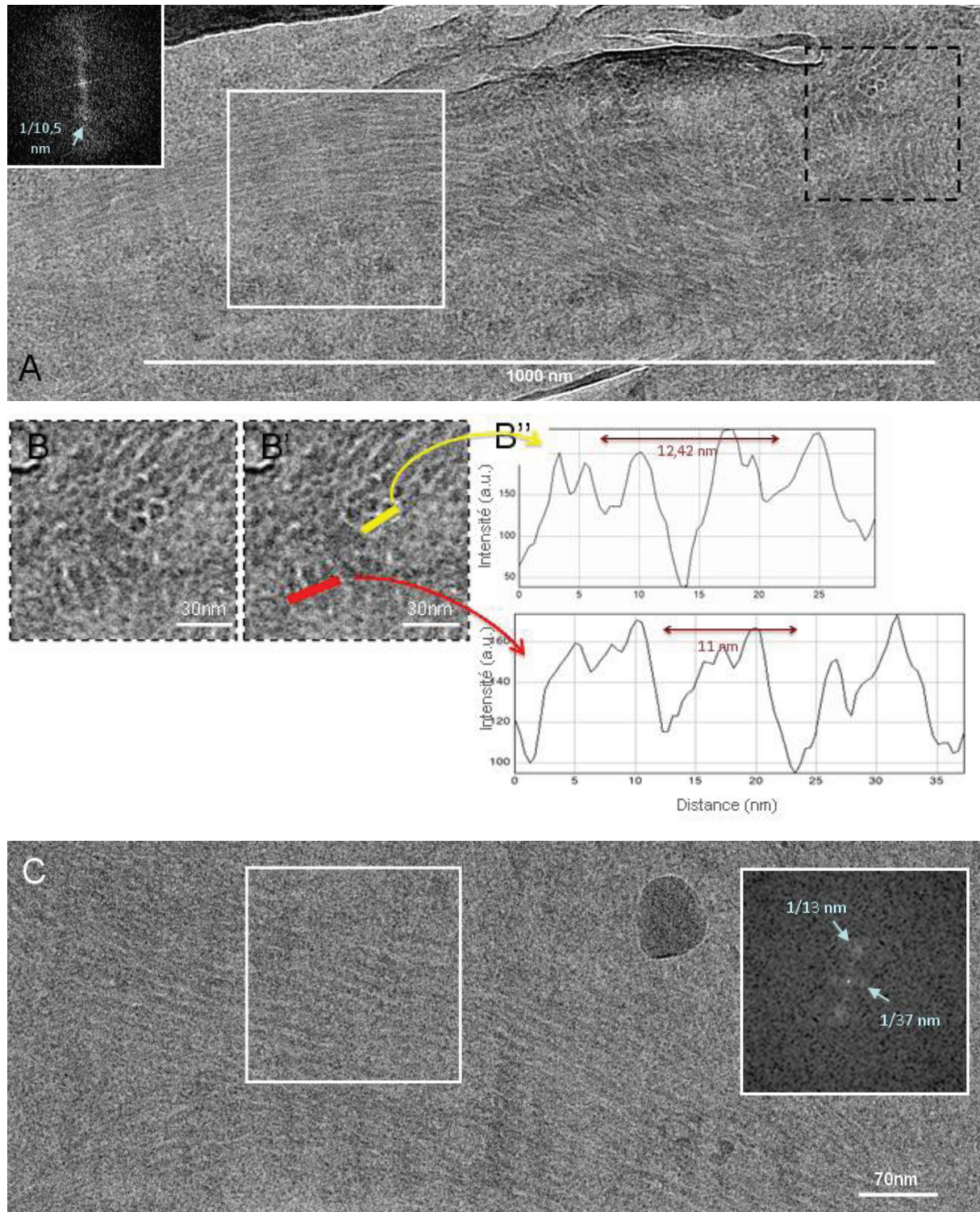


Figure III.22. Faisceaux de fibres. (A) Faisceaux de fibres en vue longitudinale (encart blanc), oblique et transversale (encart pointillé noir). La transformée de Fourier de l'encart blanc montre une périodicité de 10,5 nm. (B,B') détail de l'encart pointillé en (A). Les sections transversales mettent en évidence un ordre hexagonal entre fibres. La distance entre fibres est mesurée directement (profil jaune en B'). La période des motifs striés correspondant aux sections obliques est mesurée sur le profil rouge en B''. Elle correspond à la distance entre les plans réticulaires du réseau hexagonal. (C) Faisceau de fibres en coupe longitudinale ou légèrement oblique. La transformée de Fourier de l'encart en blanc montre un ordre dans deux directions orientées à 90°. Dans la direction perpendiculaire à l'axe d'allongement des fibres, on observe une striation de période 13 nm. Dans la direction des fibres, on observe une striation de période 37 nm.

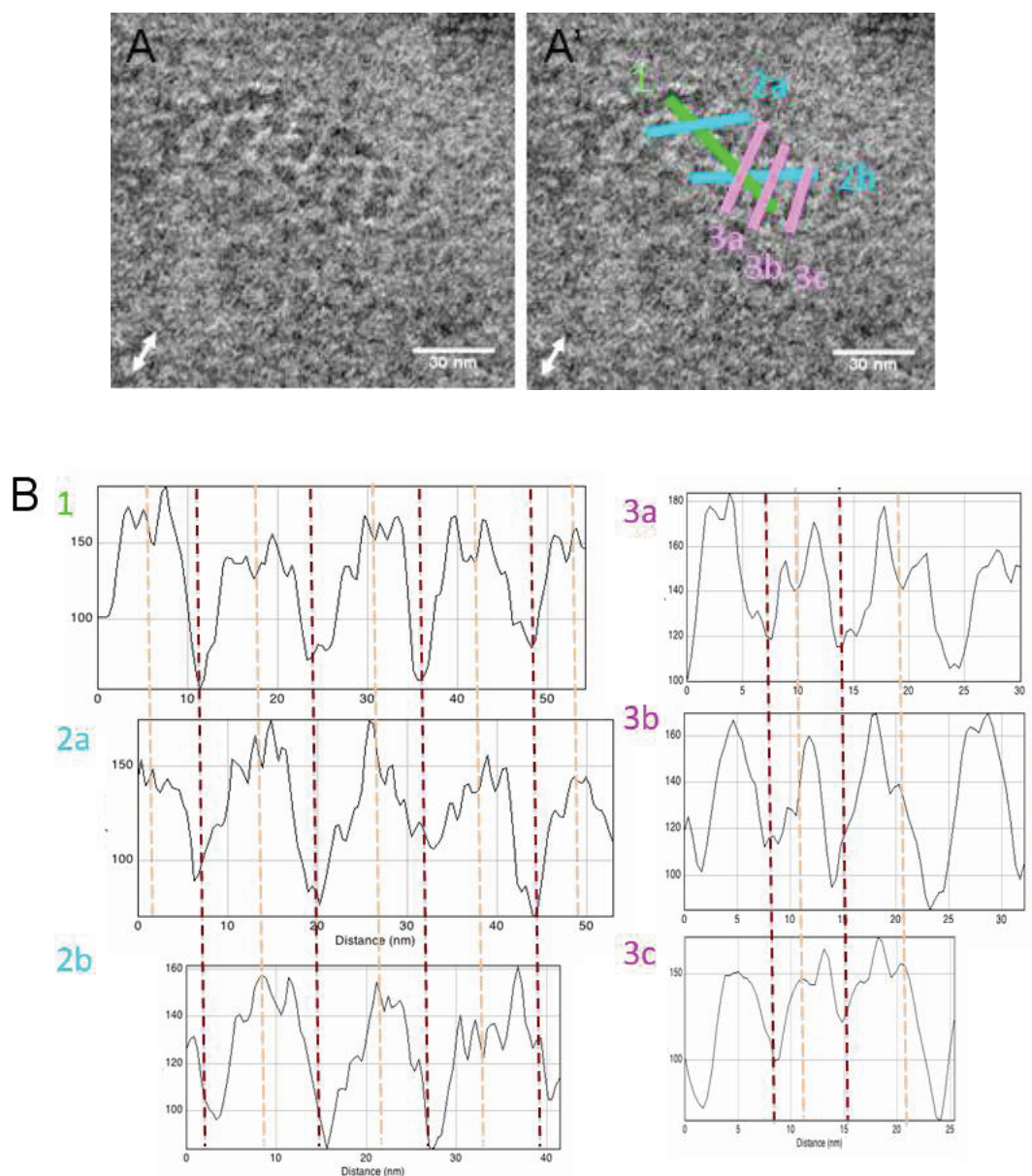


Figure III.23. Faisceau de fibres observé sur coupe transversale

(A, A'). Les fibres présentent des sections de densité homogène et plus ou moins elliptiques. Le grand axe des ellipses est orienté perpendiculairement à la direction de coupe (double flèche blanche). Les fibres sont organisées en réseau hexagonal. (B) Les distances a_H entre fibres sont mesurées sur les profils indiqués en (A') dans les trois directions 1 ($a_H=12,15$ nm), 2 ($a_H=11,7-12,5$ nm), et 3 ($a_H=7-8$ nm) du réseau hexagonal et indiquées au dessous des profils. La direction 3 (en rose) est orientée parallèlement à la direction de coupe.

Deux types de fibres ont été mis en évidence, des fibres à « cœur clair » (Figure III.22B), présentant une densité plus importante en périphérie, et des fibres à cœur plein, dont la densité est homogène sur toute la section (Figure III.23). Les sections transverses permettent également de visualiser directement l'ordre entre fibres et en particulier des réseaux hexagonaux (Figure III.22A, B et III.23A, A'). Les sections obliques et longitudinales

présentent souvent des motifs striés. La période des striations varie de 10 à 13 nm, mesurée directement sur l'image ou sur sa transformée de Fourier (Figure III.22). Comme indiqué sur la Figure III.24, cette période des striations correspond à la distance d entre les plans réticulaires du réseau hexagonal et est reliée à la distance a_H (12 à 14 nm) mesurée entre fibres sur coupes transversales par la relation $d = a_H \sqrt{3}/2$.

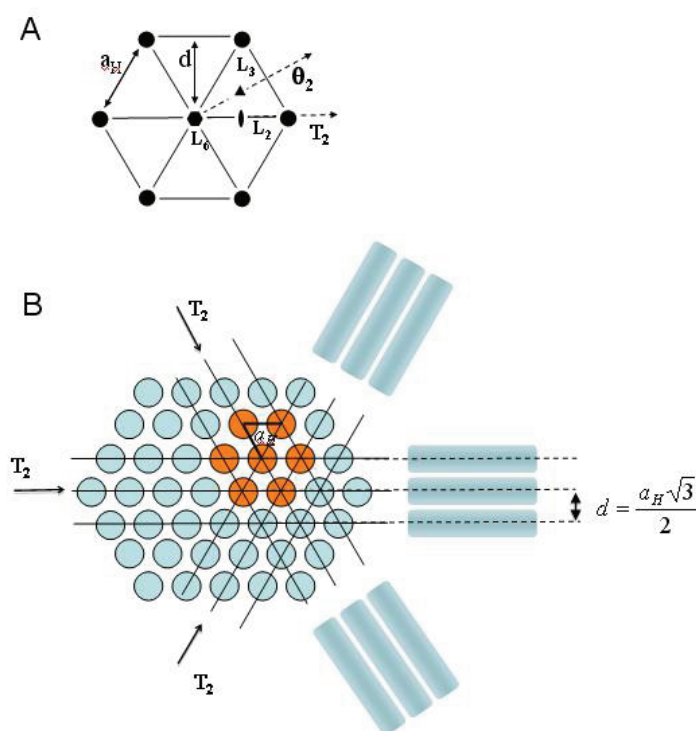


Figure III.24. (A) Schéma d'un réseau hexagonal avec ses axes de symétries d'ordre six (L6), trois (L3) et deux (L2, θ_2 et T2). (B) Sur les vues perpendiculaires à l'axe d'allongement des fibres on peut mesurer directement la distance entre fibres a_H . Sur les vues obliques et longitudinales, des striations de période d apparaissent lorsque le réseau est observé dans la direction d'un des axes T2. On mesure alors la distance d entre plans réticulaires.

Notons que certaines images présentent des déformations de la structure des fibres et de leur empilement liées à la compression de l'échantillon durant la coupe. Lorsque la compression est importante, la section transverse du filament peut être elliptique, le grand axe de l'ellipse étant orienté perpendiculairement à la direction de coupe (Figure III.23). De même, les distances entre fibres, mesurées parallèlement à la direction de coupe sont beaucoup plus faible que selon les deux autres directions du réseau hexagonal (Figure III.23A'). On peut estimer ici une compression de l'ordre de 40 %. Notons qu'il s'agit là d'un cas extrême. Dans le cas général, la compression à cette échelle est plutôt de l'ordre de 10-15 %.

Sur certaines images, on peut mettre en évidence l'existence d'un ordre dans la direction des fibres, perpendiculairement au réseau hexagonal. La période mesurée sur la Figure III.22C est de l'ordre de 37 nm. Dans ce cas, on a donc une structure fibrillaire ordonnée à trois dimensions. Bien qu'il ne soit pas possible d'identifier sans ambiguïté les filaments observés ici, la période de 37 nm suggère qu'il s'agit probablement de faisceaux d'actine, caractérisés par un diamètre de 7 nm et un pas hélicoïdal de 37 nm. Il pourrait également s'agir de filaments intermédiaires mais les analyses CEMOVIS antérieures des filaments intermédiaires montrent que ceux-ci ont un diamètre légèrement plus grand que ceux mesurés en moyenne sur nos images (12 à 14 nm, Kirmse et al, 2010 ; Al-Amoudi, 2004).

Plus généralement, le cytoplasme des métazoaires contient plusieurs types de filaments, constituant, avec les microtubules, le cytosquelette de la cellule. La méthode de CEMOVIS a été déjà utilisée avec succès pour l'analyse de l'organisation de filaments d'actine (Salje et al, 2009), de myosine (Trus et al, 1989), ou de plusieurs types de filaments intermédiaires (Norlen & Al-Amoudi, 2004 ; Kirmse et al, 2010). Si les études par CEMOVIS ont l'avantage d'analyser les structures macromoléculaires dans leur état et leur environnement natif, elles ont l'inconvénient de ne pas permettre jusqu'à présent de marquages spécifiques, et donc de ne pas toujours permettre l'identification des complexes et des macromolécules observées, seules des comparaisons morphologiques étant possibles. L'ultrastructure du cœur des filaments observés en section transverse devrait également permettre de différencier, voire d'identifier certains filaments. Des cœurs clairs avec couronne périphérique dense et des cœurs denses homogènes ont été observés ici, et pourraient correspondre à deux types de filaments différents. Par exemple, les filaments de kératine observés par CEMOVIS se caractérisent par une couronne dense et un cœur clair présentant une densité centrale supplémentaire (Norlen et Al-Amoudi, 2004). Cette identification nécessiterait une analyse comparative précise avec la structure des différents types de filaments intermédiaires.

3-Structure de la chromatine au sein du noyau

A-Description générale du noyau

La Figure III.25a montre une partie du noyau d'une cellule HT29, limité par l'enveloppe nucléaire (en) percée de pores (pn). Sa structure, finement granulaire et assez homogène ne permet pas d'identifier les territoires chromosomiques dans cette cellule en interphase. Une portion d'un autre noyau est présentée sur la Figure III.26. Ces deux figures correspondent à des images de deux noyaux différents prises respectivement à des grossissements de 20 000x et 30 000x avec une sous-focalisation de 2 μm et 1,7 μm . Dans ces conditions d'imagerie, le premier maximum de la fonction de transfert se situe au voisinage de 2,8-3 nm, conditions optimisées pour voir les détails structuraux des nucléosomes et de leur empilement en milieu dense. Ces conditions permettent également l'identification des nucléosomes (diamètre 11 nm et hauteur 6 nm) et éventuellement de la fibre de 10 ou de 30 nm dont l'existence *in vivo* a été envisagée mais reste largement débattue.

Nous avons tenté d'améliorer le rapport signal sur bruit afin de détecter des signaux au sein de la matrice nucléaire. Nous avons pour cela testé différents filtres de type « passe-bande » pour éliminer les hautes et basses fréquences parasites. Nous avons également corrigé la fonction de transfert de contraste du microscope par l'utilisation d'un filtre de Wiener pour rehausser l'intensité du signal des petits objets (voir matériels et méthodes). A titre d'exemple, nous présentons sur la Figure III.25 une région d'intérêt dans le noyau (zone encadrée en pointillés) permettant de comparer l'image brute (Figure III.25b), l'image filtrée à l'aide d'un passe-bande de type gaussien pour ne garder que les objets de taille comprise entre 7 Å et 220 nm (Figure III.25b') et l'image après correction de la fonction de transfert de contraste du microscope à l'aide d'un filtre de Wiener (Figure III.25b'').

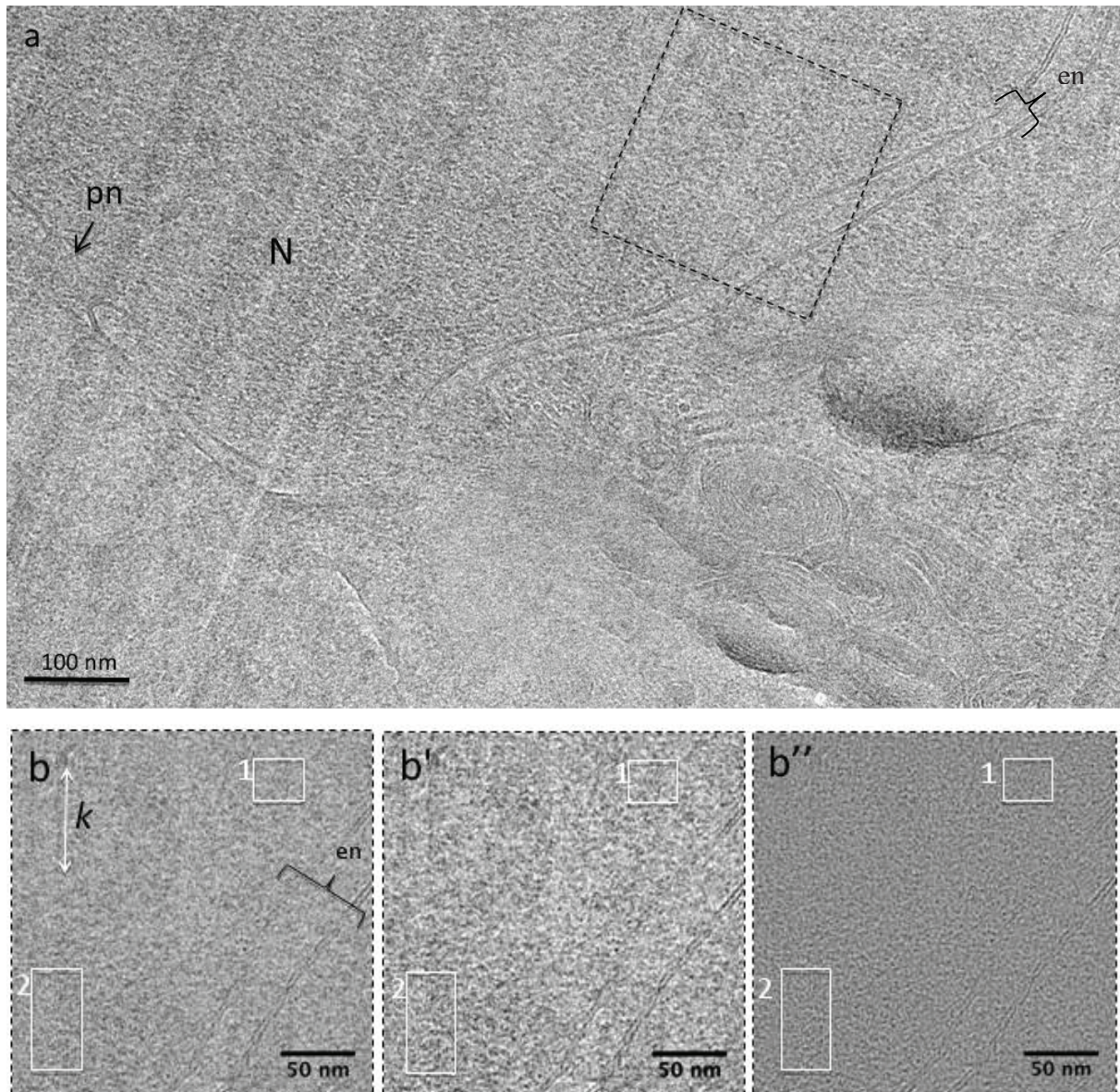


Figure III.25 : Cryosection d'une portion du noyau (N) limitée par l'enveloppe nucléaire (en) et présentant un pore nucléaire (pn). La photo a été prise à un grandissement de 20 000x avec une sous-focalisation de 2 μm . Une partie de l'image brute (b) est comparée à l'image filtrée à l'aide d'un passe-bande de type gaussien pour éliminer les fréquences hautes ($> 220 \text{ nm}$) et basses ($< 7 \text{ \AA}$) (b'), et à l'image corrigée de la CTF par un filtre de Wiener (b''). Les encarts 1 et 2 sont présentés sur la figure III.28

Les images brutes, filtrées et corrigées de ces deux noyaux comme les transformées de Fourier réalisées sur de larges domaines de chromatine ne révèlent pas de signaux pertinents qui permettraient de démontrer l'existence d'une fibre de 10 ou 30 nm. Au vu de ces quelques images, la chromatine de ces noyaux apparaît donc peu organisée à grande distance. Ces fibres n'apparaissent pas non plus dans les images plus sous-focalisées, ce qui confirme les observations de McDowall et al, (1986) et Eltsov et al (2008). Nous nous sommes focalisés sur l'analyse de détail des structures chromatinienne, l'objectif étant d'identifier la présence de nucléosomes puis éventuellement d'analyser leur organisation mutuelle à une échelle

locale dans le noyau de la cellule. Sur la Figure III.26, le noyau présente une texture granulaire et l'on distingue quelques zones légèrement plus denses aux électrons, notamment près de l'enveloppe nucléaire. La région sélectionnée (encadrée en noir), agrandie, est présentée en (b) après correction de la fonction de transfert de contraste. Plusieurs régions présentent des striations (zones encadrées ou encadrées) dont certaines (notées 1 à 4) sont analysés sur la Figure III.29

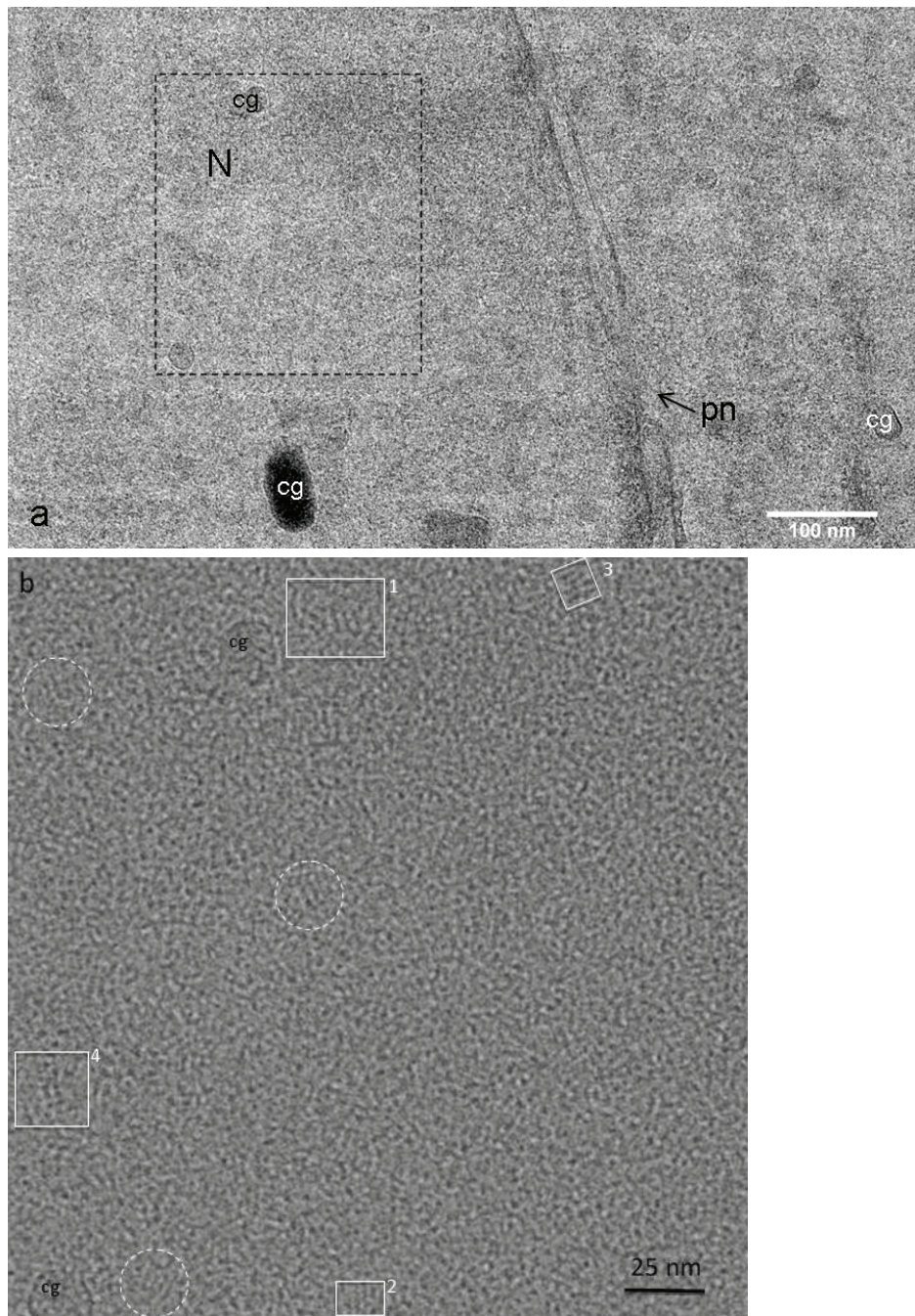


Figure III.26 : (a) Cryosection d'une portion de noyau N avec la double membrane nucléaire et un pore nucléaire (pn). La photo a été prise à un grandissement de 30 000x avec une sous-focalisation de 1,7 µm. (b) Région sélectionnée en (a) après correction de la CTF. Les zones encadrées ou encadrées présentent des striations dont certaines (notées 1-4) sont analysées sur la Figure III.29. Les tâches sombres correspondent à des cristaux de glace (cg) contaminant la coupe.

B-Projections théoriques de particules cœur de nucléosomes

Pour faciliter la recherche de nucléosomes, nous avons utilisé la structure cristallographique de la particule cœur du nucléosome (NCP) obtenue par Davey et al 2002 pour visualiser l'aspect d'un NCP en projection sous différents angles de vue (Figure III.27). Nous avons négligé la contribution des histones du cœur de la particule et nous n'avons considéré que la contribution de l'ADN dans la formation du signal en raison de son intensité plus marquée due aux atomes de phosphore largement présents dans la molécule. Nous avons réalisé les projections de la super-hélice d'ADN selon trois axes X, Y et Z. Les trois axes ont été positionnés à la main sur la structure cristallographique. L'axe Y est proche de l'axe dyade. Les deux autres axes sont perpendiculaires à ce dernier et passent par le centre du nucléosome. Une rotation de l'objet a été effectuée sur 360° avec un incrément de 10° pour chacun des trois axes choisis. Les projections résultantes sont regroupées en galeries A, B et C (Figure III.27). Ces projections ne rendent pas compte de l'intégralité des vues possibles du NCP mais elles illustrent bien la grande variabilité de ces dernières. On reconnaît les vues de la face et de profil classiquement représentées (encadrées en vert et jaune respectivement) mais aussi un grand nombre de vues où l'hélice d'ADN dessine des formes complexes comme une boucle ou encore deux formes ovoïdes accolées (flèches blanches). On peut noter que le signal est beaucoup plus intense lorsque les deux tours de la superhélice d'ADN sont superposés. Le signal est ainsi bien visible selon les projections apicales (encadrées en jaune) qui permettent de distinguer le côté « dos » et le côté « ventre » du NCP avec les deux extrémités du fragment d'ADN qui encadrent une zone où le signal est moins intense puisque le deuxième tour d'ADN est incomplet (tête de flèche orange). Sur les projections latérales du NCP, l'ADN dessine deux traits (bras) parallèles et distants de 2,8 nm bien distincts l'un de l'autre à l'une de leurs extrémités (tête de flèche orange) et se raccordant à leur autre extrémité ce qui leur confère une forme en épingle à cheveux. Selon ces vues, l'intensité du signal n'est pas homogène sur toute la longueur des deux bras d'ADN. Le signal est plus intense lorsque l'hélice d'ADN est localement parallèle à la direction de projection et souligne trois points d'intensité maximum aux deux extrémités des bras et au point de jonction. Il existe certaines projections (encadrées en rose) présentant des motifs variés et quelquefois de faible intensité mais soulignés par 1 à 4 points très intenses. Les 3 points sont disposés en triangle, les 4 points, visibles en regardant dans la direction de l'axe dyade, sont disposés aux sommets d'un rectangle (flèches roses sur la figure III.27).

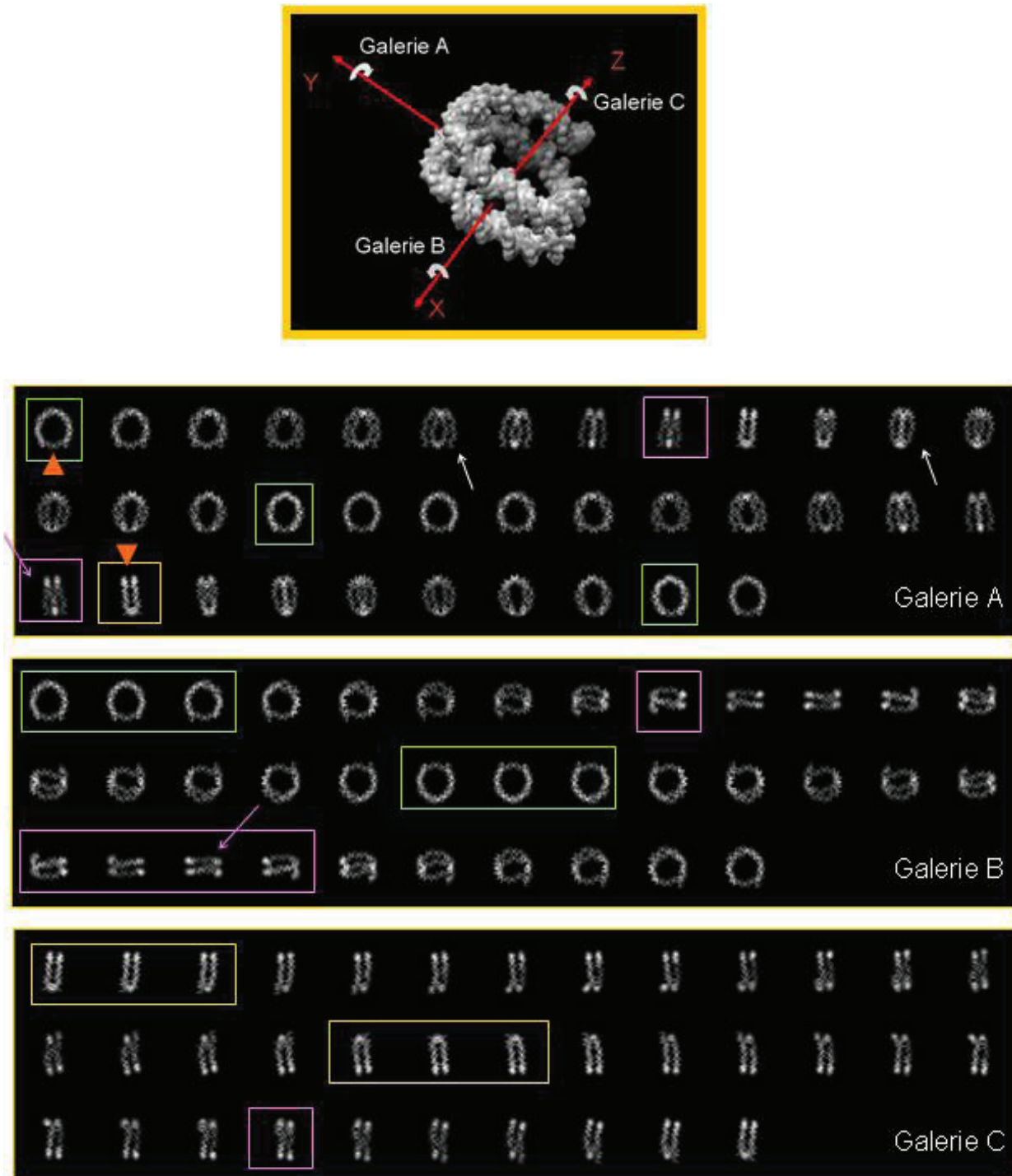


Figure III.27 : Structure cristallographique de la particule cœur du NCP (Davey, 2002) dont seul l'ADN a été conservé. Cet objet a été projeté sous différentes orientations selon chacun des trois axes Y, X et Z pour obtenir les collections A, B et C correspondantes. Chaque projection est décalée de 10° par rapport à la suivante.

Certaines de ces projections sont bien évidemment plus favorables à une visualisation sur les cryosections de noyau. Par ailleurs, ces objets sont de taille bien inférieure à l'épaisseur des coupes. Il y a superposition des NCP dans l'épaisseur de la coupe. Ils ne peuvent être

identifiés que lorsqu'ils sont « en phase » (même orientation) ou lorsque le signal d'une particule domine. Les vues de profil seront donc plus facilement reconnaissables dans ce cas.

C-Identification de structures compatibles avec les nucléosomes

En nous appuyant sur ces images de projections, nous avons donc exploré la structure fine de la chromatine dans les images filtrées et corrigées, et recherché les motifs de dimensions compatibles avec la structure de la particule cœur du nucléosome et les plus probables en terme d'intensité. Pour chacun des motifs retenus, nous nous sommes assurés qu'ils étaient initialement présents dans les images brutes. Certains de ces détails sont présentés sur les Figures III.28 et III.29.

Sur la Figure III.28, les régions 1 et 2 de la Figure III.25b (agrandies en a et b) contiennent des objets remarquables et sont caractérisées par des striations plus denses aux électrons que le reste de l'image, présentes à la fois sur l'image brute (a, b), sur l'image filtrée (a', b') et sur l'image corrigée (a'', b''). Ces objets sont indiqués sur la Figure III.28a par une flèche noire. Un profil d'intensité a été réalisé perpendiculairement aux stries sur l'image corrigée. Des profils similaires, légèrement plus bruités, ont été obtenus sur l'image brute et l'image filtrée. L'examen de ce profil montre quatre pics d'intensité comparable que l'on peut regrouper deux à deux. Les deux premiers comme les deux derniers sont séparés de 2,6 nm environ. Les deux groupes de pics sont distants de 2,75 nm. Ces dimensions sont compatibles avec la présence de deux NCPs superposés, observés en vue latérale, et séparés par une distance voisine de la distance entre les deux brins d'ADN enroulés autour du nucléosome. Les lignes sombres correspondraient aux « bras » d'ADN entourant le cœur d'histones moins dense aux électrons. L'intensité plus forte entre les deux groupes de pics qu'entre les pics de chaque groupe proviendrait de la présence des histones au cœur du nucléosome. Si on observe ces lignes sombres plus en détail, on remarque que leur densité n'est pas parfaitement homogène, l'intensité est plus marquée à l'extrémité de chaque ligne. La comparaison entre ces motifs et les projections de la structure cristallographique (Figure III.27) indique qu'il pourrait s'agir de vues « de profil » comme nous l'illustrons sur la Figure III.28a'''. Sur la Figure III.28b-b'', les striations correspondant à des vues « de profil » et indiquées par les flèches se propagent à plus longue distance, sur plusieurs dizaines de nm, mais il n'est pas possible d'identifier clairement des projections particulières.

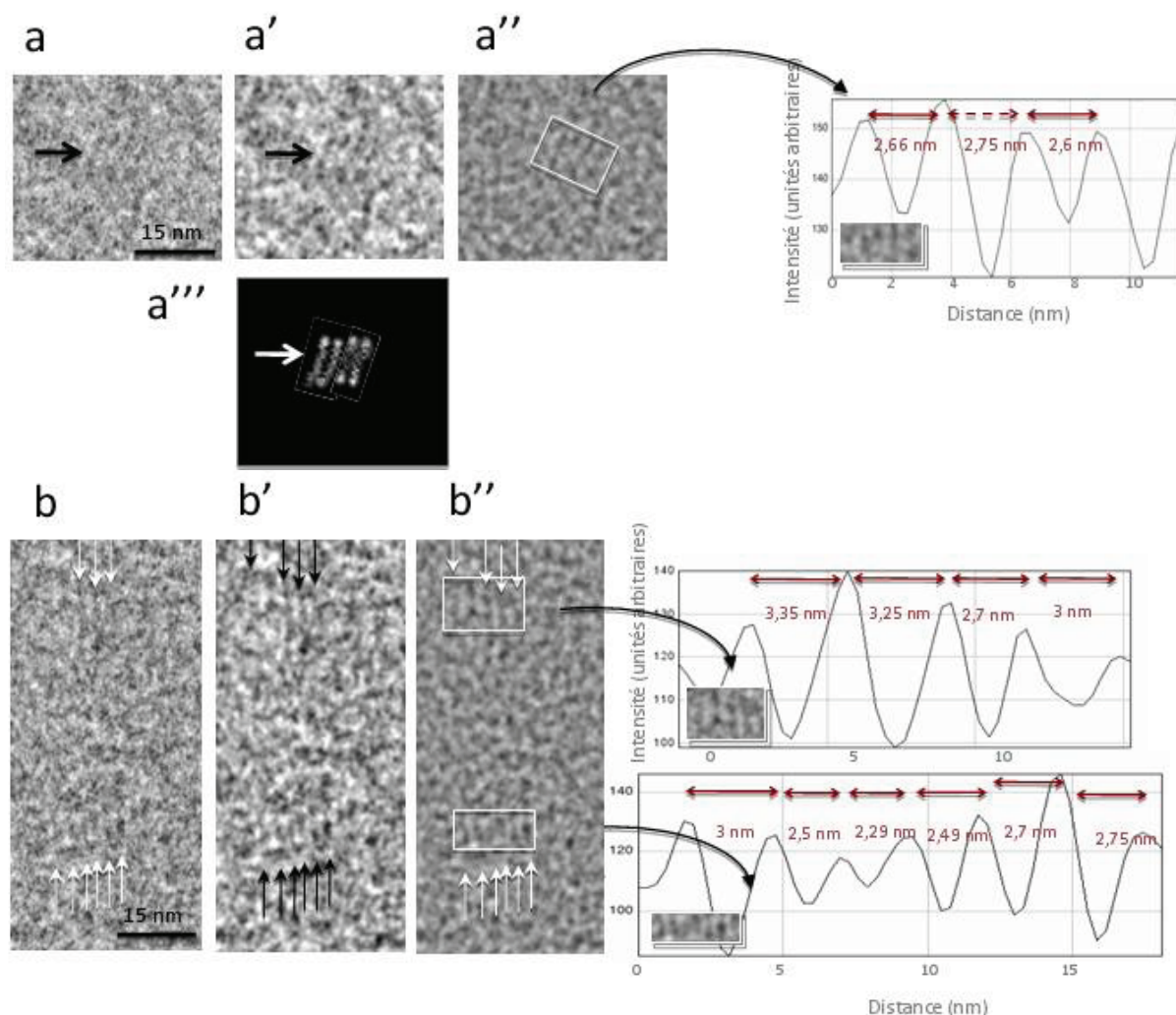


Figure III.28 : Analyse des régions 1 et 2 sélectionnées sur la Figure III.25 agrandies en a et b. Les images brutes (a et b) sont comparées aux images filtrées à l'aide d'un filtre passe-bande de type gaussien pour éliminer les fréquences hautes (> 220 nm) et basses (< 7 Å) (a', b') et aux images corrigées de la CTF par un filtre de Wiener (a'', b''). (a''') Projections de la structure cristallographique de la particule cœur de nucléosome pouvant correspondre aux motifs observés en a-a''. Les profils ont été réalisés à l'aide d'ImageJ sur les portions sélectionnées des images a'' et b''.

Des stries bien marquées visibles sur la Figure III.29a présentent un profil d'intensité avec trois pics distants de 3,56 et 3,6 nm, valeurs significativement supérieures aux 2,8 nm séparant les deux tours d'ADN du nucléosome canonique. La projection correspondante est indiquée en dessous (Figure III.29a1'). Les encarts 2 et 3 de la Figure III.26b présentent des motifs très similaires où les lignes denses sont finement striées obliquement (Figure III.29b, c). Les périodes mesurées se situent dans la gamme 2,5-3 nm. Dans l'hypothèse où nous visualisons bien ici les brins d'ADN enroulés entre NCPs empilés, il est difficile de distinguer deux ADN enroulés autour du même cœur protéique ou deux segments d'ADN enroulés autour de deux NCPs successifs car les distances sont très voisines.

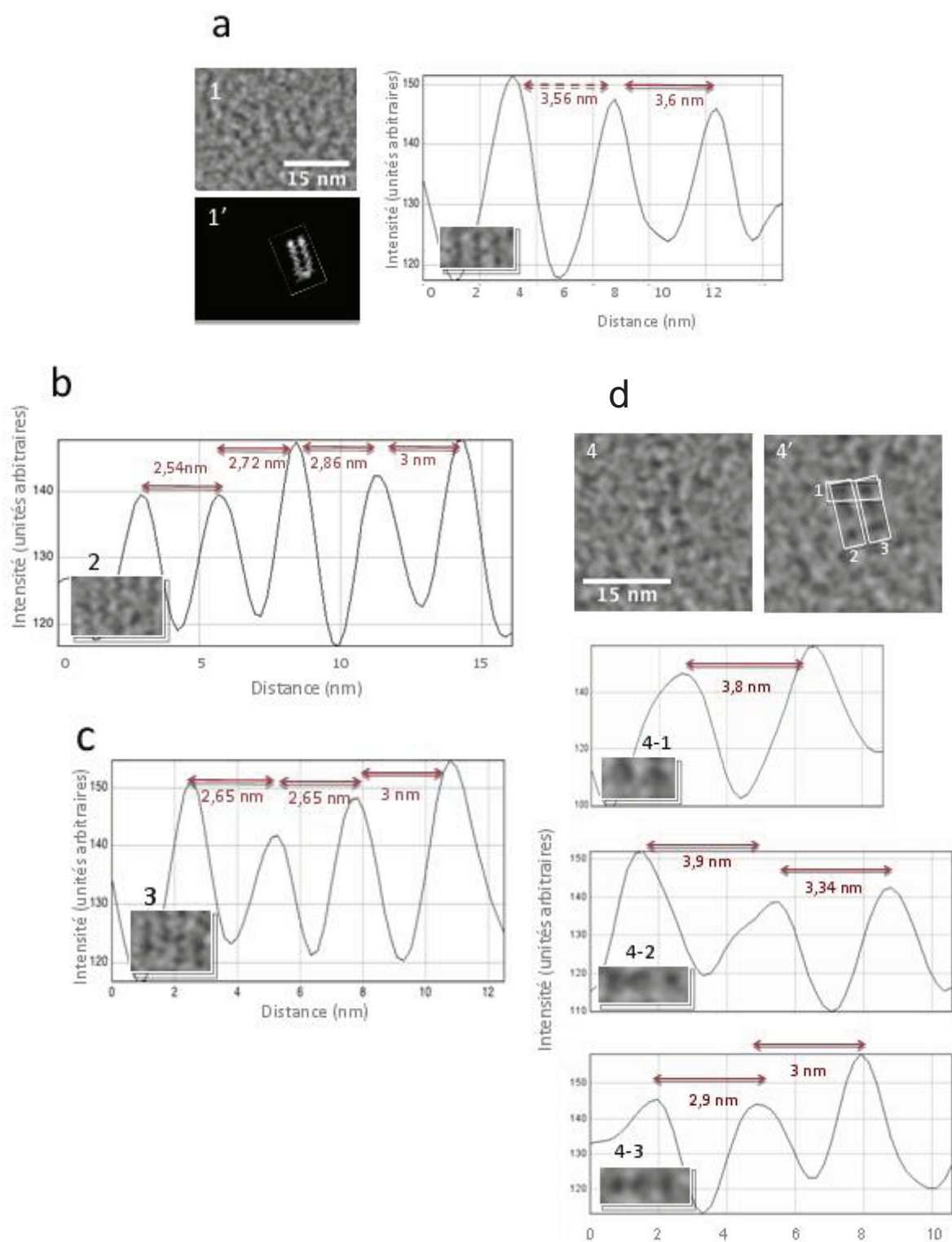


Figure III.29 : Analyse des domaines 1 à 4 sélectionnés sur la Figure III.26 (a-d) avec les profils d'intensité correspondant aux sous-domaines sélectionnés, réalisés à partir d'ImageJ.

La dernière région sélectionnée sur la Figure III.26 permet de distinguer assez nettement une série de points denses aux électrons, organisés selon deux directions perpendiculaires dessinant des motifs rectangulaires (Figure III.29d). On retrouve ce type de motif dans plusieurs autres régions du noyau. La transformée de Fourier de cette région fait apparaître deux points orientés à 87° correspondant à des distances de 3 nm et 3,7 nm mais qui ressortent à peine du bruit de fond, ce qui peut s'expliquer par la petitesse de la zone analysée (non illustré). Nous avons donc réalisé des profils d'intensité selon les deux directions du motif rectangulaire comme indiqué sur la Figure III.29d 4-4' (profils 4-1, 4-2, 4-3). La distance entre les pics varie de 2,9 nm à 3,34 nm dans une direction et est égale à 3,8 nm dans l'autre, en accord avec la position des points sur la TF de cette région. Les distances mesurées sont supérieures aux mesures réalisées sur les projections du NCP selon son axe dyade (Figure III.27, flèche rose).

D-Tests à l'aveugle

Si les fines striations locales dont nous avons repéré la présence correspondent aux nucléosomes, il est important de montrer qu'elles sont spécifiques du noyau. Serions-nous capables de différencier à l'aveugle une région nucléaire d'une région cytoplasmique ? Pour répondre à cette question, trois régions ne présentant pas de structures distinctives (membranes, filaments, structures macromoléculaires, enveloppe nucléaire) ont été sélectionnées par un membre de l'équipe dans le noyau et hors du noyau (Figure III.30a).

L'échelle des images a été volontairement modifiée de manière à supprimer tout point de repère lors de l'analyse à l'aveugle. Les trois régions ont ensuite été analysées en parallèle par trois membres de l'équipe qui ignoraient leur grandissement réel et leur origine. Aucun des participants au test n'a été à même de déterminer *a priori* l'origine des régions analysées, nucléaire ou cytoplasmique. Dans les trois régions, plusieurs motifs striés ont été mis en évidence par chacun des participants.

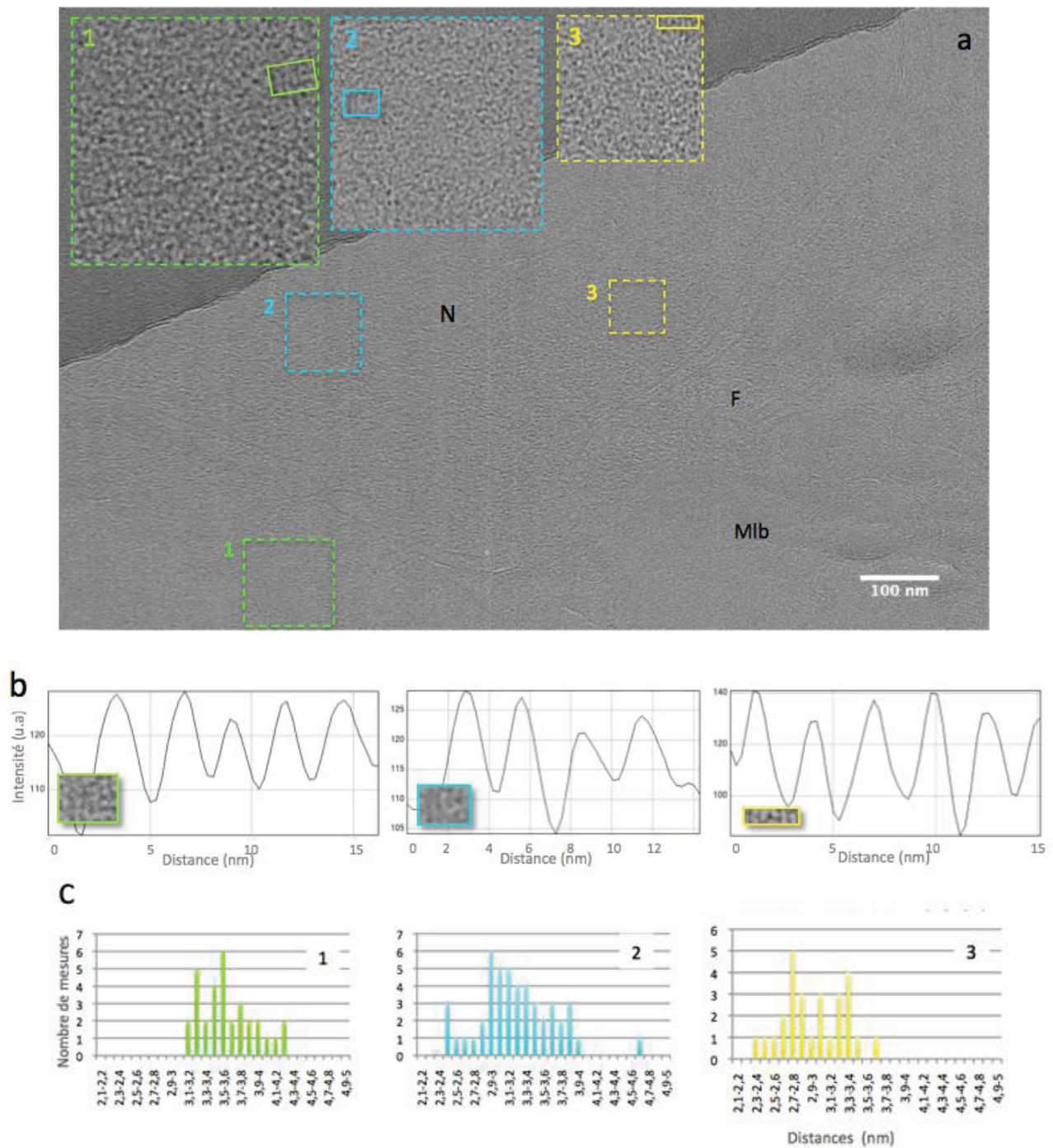


Figure III.30 : Test à l'aveugle. a) Régions 1, 2, et 3 sélectionnées pour les analyses, dans le noyau (N) et dans le cytoplasme d'une cellule HT29. Dans le cytoplasme, la région sélectionnée se trouve hors des zones présentant des structures reconnaissables tels que les réseaux de filaments (F) ou les corps multilamellaires (Mlb). Un exemple de motif strié est encadré dans chaque cas. b) Profils correspondant aux motifs encadrés. c) Histogrammes des distances mesurées dans les trois régions 1, 2 et 3.

Un exemple de motif strié est encadré dans chaque cas sur la Figure III.30b. Les mesures réelles ont ensuite été calculées après introduction du facteur correctif de grandissement.

L'ensemble des valeurs obtenues pour chacune des trois régions est présenté sur la Figure III.30c. Les distances entre stries varient de 2,3 à 4,6 nm sur l'ensemble des régions. Les valeurs moyennes sont respectivement égales à $3,6 \pm 0,21$ nm, $3,24 \pm 0,45$ nm et $2,96 \text{ nm} \pm 0,34$ nm pour les régions 1 (cytoplasme), 2 et 3 (noyau). La valeur moyenne pour les deux régions nucléaires est égale à 3,13 nm, significativement plus faible que pour la région cytoplasmique. Si les répartitions des distances se recouvrent entre domaines nucléaire et cytoplasmique, on n'enregistre pas de stries $< 3,1$ nm dans le cytoplasme. Par ailleurs, le nombre de motifs striés identifiables par unité de surface est plus important dans les régions nucléaires. Ce test a été répété sur un deuxième jeu de micrographies avec des résultats similaires.

E-Analyse des NCPs en solution

- Solutions diluées de NCP observées en film mince

L'analyse de nos images de noyau montre qu'il est difficile de distinguer les nucléosomes et de les identifier avec certitude. Face à ces difficultés, nous avons cherché à comparer nos observations aux images de particules cœur de nucléosomes (NCPs) isolées réalisées en cryomicroscopie électronique avant mon arrivée dans l'équipe. Nous avons analysé deux types d'échantillons, des solutions concentrées de NCPs ($C_{\text{NCP}} = 110$ mg/ml) préparées en film mince (Leforestier et al, 2001) (Figure III.31) et une phase dense de NCPs, la phase lamello-colonnaire ($C_{\text{NCP}} \sim 300$ mg/ml) analysée sur cryosection (Leforestier et al, 2001) (Figure III.32). Dans les deux cas, les images ont été collectées à faible dose d'électrons à l'aide d'un MET Philips CM12.

Les films minces permettent d'observer quelques vues de dessus des NCPs et de visualiser la couronne d'ADN dense aux électrons (flèche sur la Figure III.31a). On observe beaucoup plus fréquemment des vues latérales des nucléosomes caractérisées par deux stries denses aux électrons correspondant aux deux tours d'ADN autour du cœur protéique. Aux concentrations étudiées, les NCPs sont le plus souvent empilés les uns sur les autres pour former des colonnes qui donnent naissance à des motifs striés en vue latérale (Figure III.31a, a') et dans lesquels on peut identifier certains nucléosomes et leur orientation (Figure III.31a''). Le profil d'intensité de la région sélectionnée, permet d'identifier trois nucléosomes (distances entre ADN de 3,05 - 3,1 - 2,8 nm). Les distances entre ADN de nucléosomes voisins sont très comparables (3,15 et 3,5 nm) distinguables grâce au contexte et à la plus faible intensité du

signal entre les stries. Toutefois, cette identification n'est pas possible partout sur l'image. De grandes régions peuvent présenter des striations sans que la reconnaissance des nucléosomes ne soit possible. La concentration en NCPs est localement plus importante sur la Figure III.31b, ce qui rend l'identification des nucléosomes plus difficile, voire impossible, mais permet néanmoins de caractériser les distances séparant les brins d'ADN alignés en parallèle. Nous voyons sur ces deux clichés et les profils correspondants que les distances entre ADN varient entre 2,7 et 3,5 nm. Elles encadrent la valeur canonique de 2,8 nm mais peuvent s'en écarter significativement. La Transformée de Fourier (TF) réalisée sur un champ large de la micrographie dont est extrait l'encart (a) (Figure III.31c) ainsi que son profil intégré sur l'ensemble du cercle (Figure III.31c') permettent d'identifier les pics d'intensité à 5,9 et 2,95 nm que nous attribuons respectivement à l'empilement des NCPs dans les colonnes (période proche de l'épaisseur du NCP) et à la distance moyenne entre ADN dans ces colonnes. Ces signaux, superposés aux anneaux de Thon de la fonction de transfert de contraste, sont de relativement faible intensité alors que la solution ne contient que des NCPs. Pourtant les conditions d'imagerie ont été optimisées, comme dans le cas de l'imagerie du noyau, pour détecter des périodes de l'ordre de 3 nm.

En effet, la simulation de la Fonction de transfert de contraste dans les conditions d'imagerie utilisées (80 kV, $C_s = 2,2$ mm, $C_c = 2,2$ mm, sous-focalisation 900 nm, CM12 Twin) réalisée par CTFSimu (<http://ncmi.bcm.tmc.edu/homes/wen/ctf/>) montre le premier maximum, le premier zéro et le deuxième maximum respectivement localisés à 2,8 nm, 1,95 nm et 1,6 nm (indiqués par les flèches vertes) (Figure III.31d). La zone de fréquence analysée sur la Figure III.31c' où l'on reconnaît les positions du premier et second maximum de la fonction de transfert de contraste (indiquées par les flèches vertes) et celle du premier zéro (flèche pointillée verte) est encadrée en vert sur la simulation de la Figure III.31d. Ainsi les nucléosomes peuvent être difficiles à reconnaître sur une image de cryo-microscopie électronique en film mince malgré l'absence d'autres molécules biologiques pouvant gêner l'interprétation du signal.

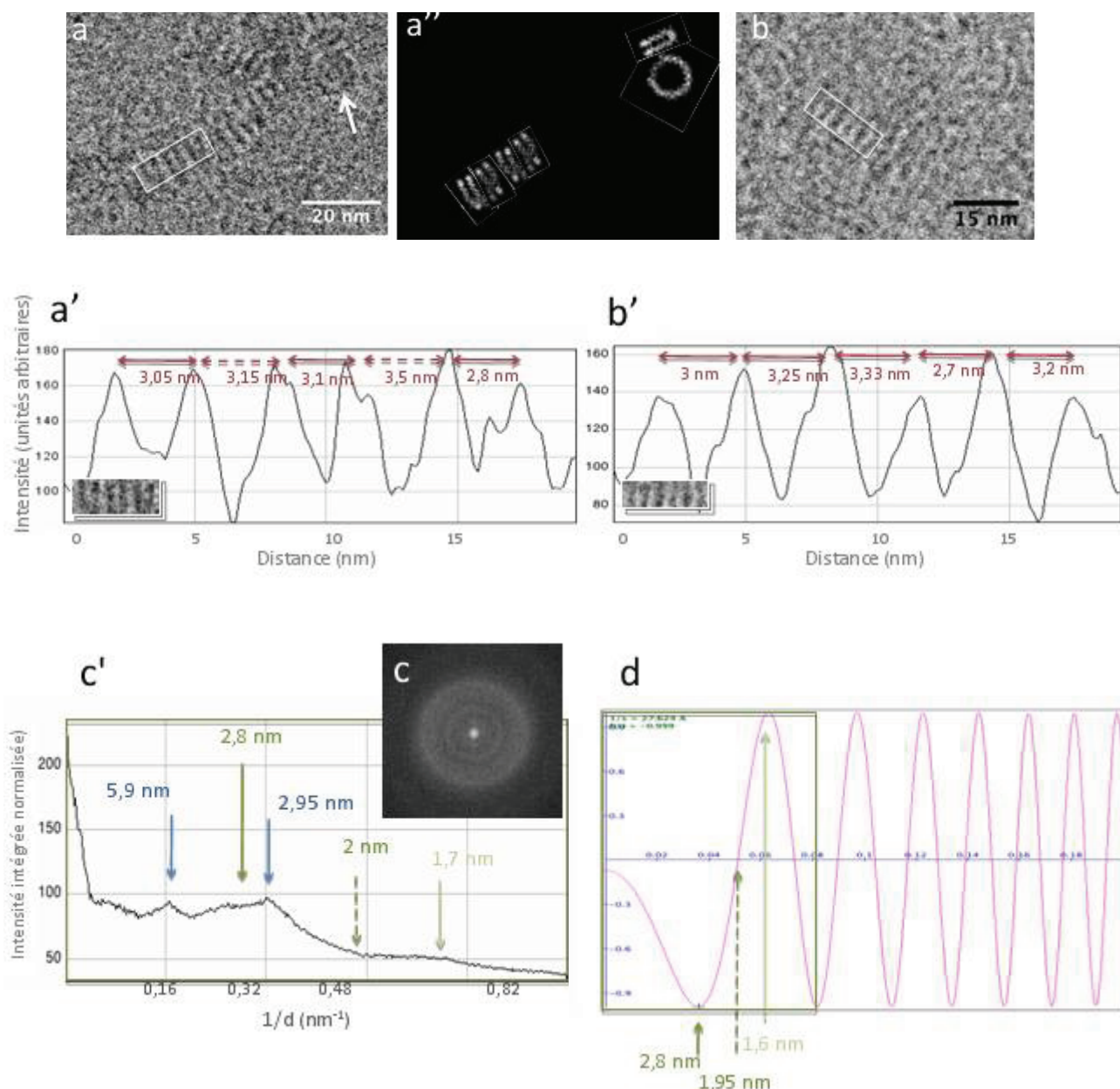


Figure III.31 : a, b : CryoEM d'une solution concentrée de particules cœur de nucléosomes (NCPs) en film mince ($C_{NCP} = 110$ mg/ml) observée à l'aide d'un TEM Philips CM12 (cliché A. Leforestier, LAU, Lausanne). On remarque les NCPs empilés les uns au dessus des autres pour former des colonnes vues ici de profil ainsi qu'un NCP vu de dessus (a, a'). Les profils d'intensité (a', b') correspondent aux régions sélectionnées sur chacun des clichés. (c) Transformée de Fourier d'un champ large de la micrographie dont est extrait l'encart (a) et profil de la TF correspondante intégré sur l'ensemble du cercle. Les flèches bleues soulignent les pics d'intensité à 5,9 et 2,95 nm superposés aux anneaux de Thon de la fonction de transfert de contraste. Les positions du premier et second maximum (2,8 et 1,7 nm) sont indiquées par les flèches vertes, celle du premier zéro (2 nm) par la flèche pointillée verte. (d) Simulation de la Fonction de transfert de contraste dans les conditions d'imagerie des NCPs en solution (80 kV, $C_s = 2,2$ mm, $C_c = 2,2$ mm, sous-focalisation 900 nm, CM12 Twin). Simulation réalisée par CTFSimu (<http://ncmi.bcm.tmc.edu/homes/wen/ctf/>). Le premier maximum, le premier zéro et le deuxième maximum respectivement localisés à 2,8 nm, 1,95 nm et 1.6 nm sont indiqués par les flèches vertes. La zone de fréquence analysée en (c') est encadrée en vert.

- Phase lamello-colonnaire de NCP analysée par CEMOVIS

La phase dense lamello-colonnaire de NCPs, formée à faible sel, dans laquelle la concentration en NCPs est de l'ordre de 300 mg/ml se caractérise par un empilement des NCPs dans des colonnes, elles-mêmes alignées en parallèle pour former une bicouche (ou lamelle). Les lamelles sont séparées les unes des autres par une couche de solvant dont l'épaisseur dépend de la concentration en particules. L'orientation des colonnes peut varier d'une lamelle à la suivante. L'organisation des NCPs dans cette phase a été décrite plus haut (chapitre I). La capacité à reconnaître des motifs spécifiques dans les images des cryosections dépend encore une fois des régions observées et en particulier de l'orientation de la coupe par rapport à la direction des colonnes. Quelques exemples en sont donnés sur la Figure III.32. Sur de nombreuses régions, l'information est très difficilement exploitable et seules quelques striations locales sont détectables (Figure III.32a). Les distances mesurées sur les profils d'intensité correspondants (2,8 à 3,8 nm) suggèrent néanmoins qu'il s'agit bien de la périodicité du surenroulement de l'ADN. Sur d'autres régions où les colonnes sont orientées parfaitement dans le plan de la coupe, la détection des motifs est beaucoup plus évidente et les striations peuvent s'étendre sur de longues distances (Figure III.32b). Les nucléosomes peuvent alors être identifiés et les profils d'intensité semblent montrer que la densité mesurée entre nucléosomes est moindre que la densité mesurée entre les deux tours d'hélice de l'ADN d'un même NCP. On peut ainsi apparier les pics d'intensité par groupes de deux. Les distances mesurées entre pics d'une paire (2-2,6 nm) et entre deux groupes de pics (3,44 nm) sont distinctes dans le cas présent (Figure III.32b) mais ce n'est pas toujours aussi net.

D'autres motifs sont beaucoup plus complexes à analyser mais intéressants à relever pour permettre une comparaison avec les données collectées dans le noyau. On note ainsi des motifs striés et ponctués qui peuvent s'étendre sur plusieurs centaines de nanomètres (Figure III.32c). Le détail de la Figure III.32d, montre bien cette répartition régulière de points denses aux électrons formant un réseau presque carré. Les profils réalisés selon deux directions orthogonales mettent en évidence des pics à 2,95-3 nm selon la direction 1, et des valeurs légèrement plus faibles (2,3 à 2,7 nm) selon les directions 2 et 3, en accord avec les valeurs moyennes visibles sur la TF du domaine sélectionné à 2,7 et 3 nm (Figure III.32d'). Ces motifs rectangulaires ne sont pas sans rappeler les points denses disposés en rectangle que nous observons très localement dans les noyaux

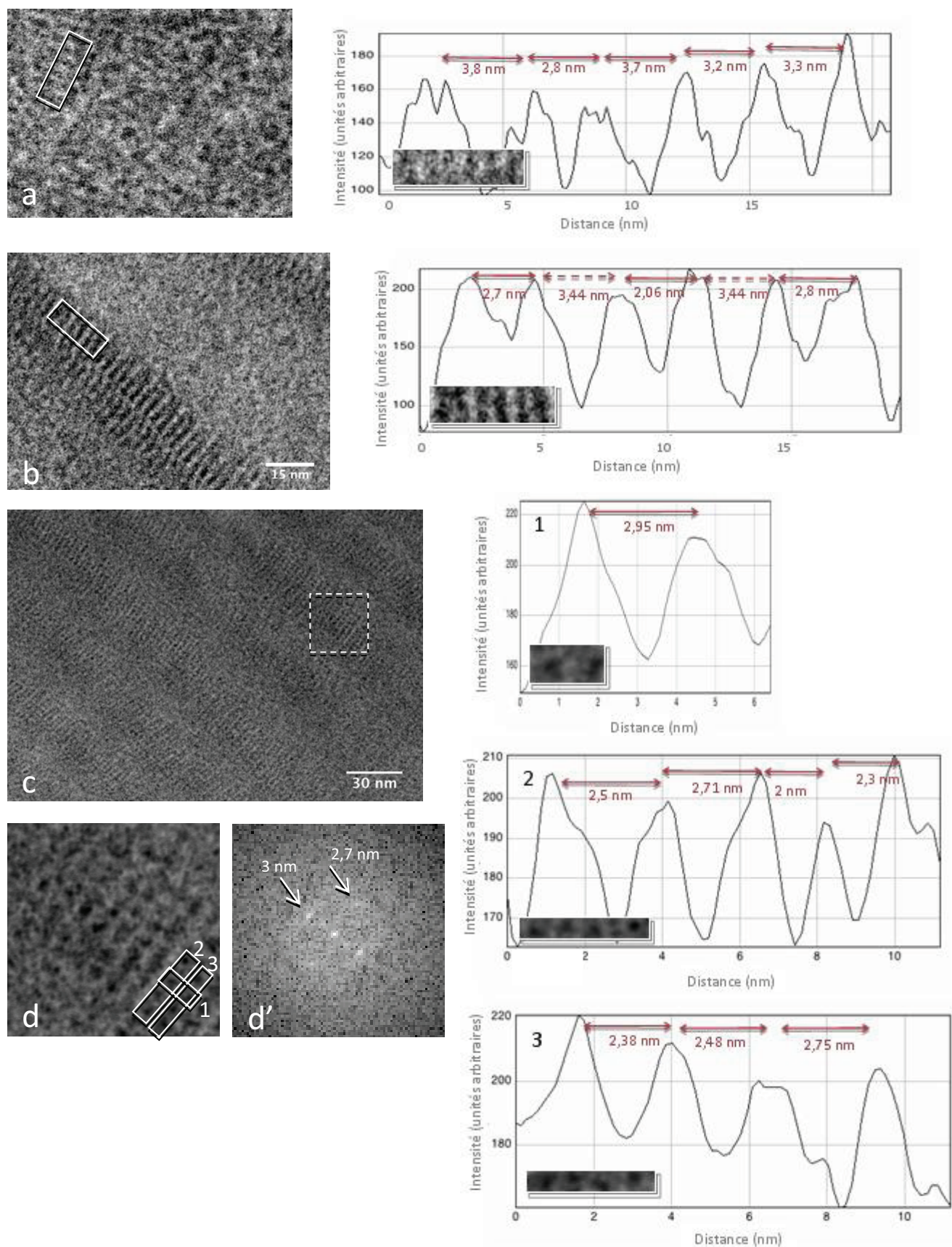


Figure III.32 : Cryosections de la phase lamello-colonnaire formée par les NCPs en solution concentrée ($C_{NCP} \sim 300 \text{ mg/ml}$) et à faible concentration saline (TE 10mM, NaCl 5mM) (clichés A.Leforestier). Plusieurs régions (a-d) ont été choisies et permettent de visualiser les patterns striés formés par les NCPs ordonnés dans ces phases. Les profils d'intensités enregistrés à l'aide d'ImageJ correspondent aux régions sélectionnées.

Les analyses effectuées sur les films minces et les cryosections de NCPs, dans des systèmes ne contenant que des nucléosomes à des concentrations inférieures ou voisines de celle du noyau cellulaire nous confortent dans l'idée que les motifs striés dus à l'organisation de l'ADN autour des nucléosomes sont associés à la présence des NCPs. Les mesures locales que nous avons effectuées nous montrent également que les valeurs mesurées sur les profils d'intensité fluctuent de manière significative. Cette analyse comparative nous a donc confortés dans l'idée que les striations visibles dans les noyaux pouvaient correspondre aux ADN enroulés autour des nucléosomes. Si tel est bien le cas, les nucléosomes que nous avons identifiés seraient localement empilés les uns sur les autres dans la plupart des cas mais cet ordre ne se propagerait qu'à très courte distance puisque nous n'avons jamais pu mesurer les profils correspondant à plus de 4-5 nucléosomes (2 ou 3 le plus souvent).

F-Discussion

Notre étude de la chromatine *in situ* par CEMOVIS avait pour objectif de visualiser les nucléosomes dans le noyau de la cellule et, si possible, d'analyser leur organisation relative. L'enjeu est de taille puisque les nucléosomes n'ont jamais été visualisés *in situ* sauf dans le cas particulier de noyaux isolés d'érythrocyte de poulet (Scheffer et al, 2011).

On comprend aisément les difficultés qui doivent être dépassées pour permettre la visualisation des nucléosomes dans leur environnement biologique et fonctionnel. Ce sont tout d'abord des objets petits dans les trois dimensions, à la différence des structures membranaires (qui s'étendent sur de grandes distances à 2D) et filamenteuses (1D) que nous avons analysées dans le chapitre précédent. Sur les coupes les plus fines que nous ayons pu imager (épaisseur environ 40 nm) il faut imaginer que 5-7 NCPs sont superposés dans l'épaisseur de la coupe et que l'image projetée intègre l'ensemble des densités électroniques. Nous avons montré précédemment que dans le cas de phases ordonnées de NCPs il est possible d'imager les nucléosomes, leur organisation et des détails de leurs structures (Leforestier et al, 2001) mais ceci n'est facile que lorsque l'orientation des sections est favorable.

Dans le noyau de la cellule HT29, nous avons mis en évidence des structures denses aux électrons caractérisées par des groupes de stries de longueur maximale voisine de 11 nm (le diamètre du nucléosome), mais souvent beaucoup plus courtes, distantes de 2,7 à 3,7 nm que nous pensons être des candidates possibles pour des structures nucléosomiques vues de profil. Ces motifs ne sont pas sans rappeler les stries denses observées par Scheffer et al (2011) sur

de la chromatine d'érythrocyte de poulet isolée. L'absence d'autres partenaires protéiques de l'ADN dans ce cas leur permet de dire qu'il s'agit bien de nucléosomes. Toutefois, dans ces travaux, les nucléosomes sont observés à forte sous-focalisation (6 μm) qui ne leur permet pas de résoudre la distance séparant les deux tours de la superhélice. Chaque strie correspond donc à un nucléosome entier. Les mesures faites dans le noyau montrent une certaine dispersion autour de la valeur cristallographique qui nous a amenés à questionner l'origine de ces motifs striés. La comparaison avec les mesures réalisées sur les solutions de nucléosomes est intéressante à ce stade. La Figure III.33 présente les histogrammes des mesures réalisées sur les films minces d'une solution concentrée dans laquelle les NCPs forment des colonnes (Figure III.31), et sur les cryosections d'une phase ordonnée, plus dense (Figure III.32) et sont comparées aux valeurs collectées sur les cryosections des noyaux. Dans les trois cas, les valeurs mesurées sont assez largement distribuées, avec une valeur moyenne de $3,05 \pm 0,44$ nm, $3,05 \pm 0,23$ nm et $3,1 \pm 0,44$ nm. Nos trois jeux de données sont comparables et apportent du crédit aux mesures réalisées dans le noyau. Les motifs que nous avons identifiés correspondraient donc vraisemblablement à des groupes de quelques nucléosomes empilés.

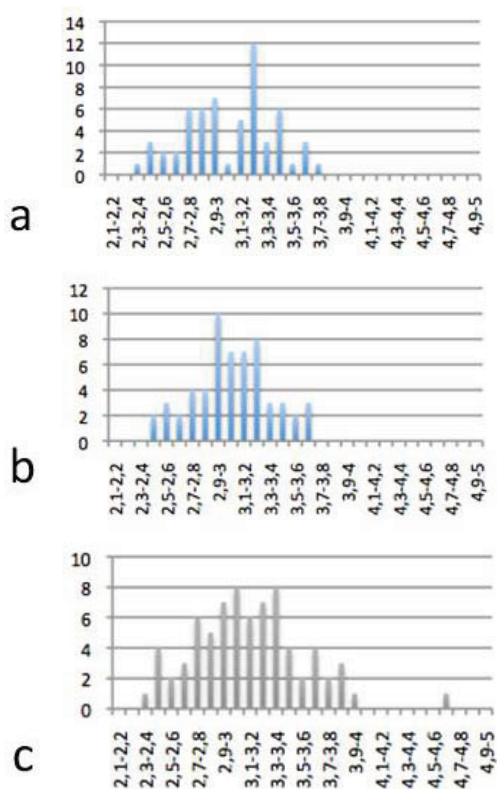


Figure III.33 : Comparaison des histogrammes des mesures réalisées par cryomicroscopie électronique sur des solutions de particules cœur de nucléosomes en films minces (a), sur des cryosection de la phase lamello-colonnaire de NCPs (b) ou dans le noyau de la cellule HT29. Les mesures correspondent aux distances séparant les tours d'ADN consécutifs le long de colonnes de NCPs (a, b) et à ce que nous pensons être les mêmes périodes caractérisant les nucléosomes dans le noyau (c).

Quel que soit le jeu de données, les valeurs mesurées en cryomicroscopie sont supérieures aux valeurs canoniques déterminées par cristallographie (Davey et al, 2002). Il faut souligner que nous observons dans le noyau comme dans les solutions concentrées, des nucléosomes en

solution, non cristallisés et polydispersés dans leur séquence d'ADN et probablement dans leurs conformations natives. Par contre, les NCPs ayant servi à la détermination des structures à haute résolution ne présentent aucune polydispersité, ayant été reconstitués à partir d'histones et de fragments d'ADN recombinants. Il n'est pas exclu que les conformations/dimensions des nucléosomes natifs fluctuent par rapport à la forme canonique. Si nous sommes capables de détecter les nucléosomes et de les caractériser par la distance entre les deux tours d'ADN enroulés autour du cœur protéique, pourquoi voit-on si peu de nucléosomes dans les noyaux où ils sont pourtant abondants, puisque leur concentration peut être estimée à environ 250 mg/ml ?

Nous pensons que les conditions expérimentales ne sont pas encore optimisées. En effet :

- L'épaisseur de la cryo-section est un paramètre essentiel pour distinguer des complexes macromoléculaires relativement petits comme des nucléosomes (~11 x 6 nm). Il est évidemment préférable d'avoir des coupes ultrafines (25-30 nm) afin de minimiser les effets de superposition. Nous avons réalisé des coupes dont l'épaisseur variait entre 25 et 40 nm, les plus minces étant à la limite de ce que l'on peut atteindre avec les cryo-ultramicrotomes actuels. Malheureusement, seules les coupes de 40 nm ont permis d'obtenir des images exploitables. La détection des nucléosomes et la reconnaissance de leur orientation seraient beaucoup plus aisées avec des cryo-sections plus fines et ce point peut être amélioré.
- Les conditions d'imagerie revêtent une importance capitale en cryomicroscopie. Les valeurs de sous-focalisation considérées comme correctes pour visualiser l'empilement de nucléosomes en solution se situent entre 1 et 2 μm avec une valeur optimale à 1,3 μm . Les images des noyaux présents dans les cryo-sections ont été prises avec des valeurs de sous-focalisation choisies dans cette gamme (1,7 et 2 μm). Ces valeurs ont l'avantage de permettre l'identification des membranes et donc des compartiments cellulaires pour se repérer, mais ne sont peut-être pas optimales pour des nucléosomes. Nous n'avons pas obtenu un nombre suffisant de cryosections présentant les caractéristiques nécessaires (finesse, adhésion sur le support, stabilité sous le faisceau) pour prendre un grand nombre de clichés à des grossissements supérieur à 20 000x qui nous auraient permis de déterminer expérimentalement la (les) valeur(s) de sous-focalisation idéale(s) pour optimiser la visualisation des nucléosomes.

L'organisation de la chromatine eucaryote est sans doute également en cause. Les études précédemment menées en CEMOVIS ont mis clairement en évidence l'absence de structures

ordonnées au delà de 11 nm dans les cellules CHO et HeLa (McDowall et al, 1986 ; Eltsov et al 2008) et nos observations du noyau de HT29 confortent ces travaux sur un nouveau type cellulaire. Pourtant, les méthodes de CEMOVIS permettent l'analyse de l'organisation des nucléosomes en milieu dense (Leforestier et al, 2001; Livolant et al, 2006). Il apparaît donc clairement que l'organisation à grande distance des nucléosomes dans le noyau diffère de leur organisation dans les phases mésomorphes décrites précédemment (Mangenot et al, 2003). Cette absence d'ordre à grande distance est *a priori* défavorable à la détection des nucléosomes. Nous avons vu en effet avec les solutions de nucléosomes observées en film mince que certaines régions denses mais peu ordonnées étaient plus difficiles à analyser. Les conditions de visualisation optimum sont obtenues dans deux situations : i) quand les solutions sont suffisamment diluées et les films suffisamment minces pour qu'il n'y ait pas (ou peu) de superposition des particules cœur de nucléosomes. C'est le cas dans certaines régions des films minces (Figure III.31a) ou ii) lorsque les NCPs sont suffisamment ordonnés les uns par rapport aux autres et que la direction des colonnes de NCPs est favorablement orientée par rapport au plan de la coupe. Il y a alors renforcement du signal (Figure III.32b) et les NCPs comme leur organisation mutuelle sont clairement observées.

Dans nos images de noyaux, nous détectons rarement plus de deux ou trois nucléosomes consécutifs empilés. Il ne nous est pas possible d'attester ou d'infirmar l'existence de longues colonnes de 11 nm. Les observations que nous faisons ne sont aucunement en contradiction avec le modèle CT-IC (Cremer et al, 1993) proposé pour décrire l'organisation de la chromatine à l'échelle micronique ni avec la description de la chromatine comme un objet fractal initialement proposée par Grosberg (1988) et largement confortée par les études les plus récentes (Lieberman-Aiden et al, 2009 ; Lebedev et al, 2005, Munkel et al, 1999).

En conclusion, si nous avons tenté de nous placer dans les conditions optimales permettant de visualiser ces objets, il est clair que nous n'avons pas disposé pour cette analyse d'un jeu de données suffisant (seulement deux images de noyaux à fort grandissement) et exploré une gamme suffisante de valeurs de sous-focalisation. Nous considérons donc cette étude comme une première approche de la structure du noyau par CEMOVIS, qui devra être reprise en reconsidérant un certain nombre de paramètres, si possible sur un autre type cellulaire après avoir optimisé les conditions de stabilité des sections sur les grilles.

Discussion

Le CEMOVIS est une technique qui permet d'atteindre des résolutions nanométriques au sein des cellules mais elle reste encore peu répandue en raison de la difficulté de collecte des coupes et de leur instabilité sous le faisceau d'électrons lors de l'acquisition d'images à fort grandissement. Une partie importante de ma thèse a consisté à améliorer ces deux aspects de la technique. Nous avons développé un micromanipulateur destiné à optimiser le positionnement de la grille près du tranchant du couteau afin de faciliter le dépôt des coupes ou des rubans. Le prototype que nous avons développé donne satisfaction et la plupart des images de ce manuscrit ont été obtenues avec celui-ci. Nous avons par ailleurs montré que les charges électriques qui peuvent s'accumuler sur les films supports sont défavorables à la stabilité des coupes. Le recours à des films conducteurs (à base de titane) à la place des films de carbone semble améliorer l'adhésion des coupes sur les grilles, ce qui devrait améliorer le rendement en imagerie haute résolution. Néanmoins ces films sont très difficiles à produire actuellement et les conditions de préparation (évaporation, épaisseur....) doivent encore être améliorées. D'autres matériaux conducteurs peuvent également être envisagés à condition que ceux-ci permettent de maintenir la transparence aux électrons. Des alliages à base de titane ou des films de graphène par exemple peuvent donc constituer des pistes intéressantes pour développer de nouveaux supports.

✓ *Peut-on résoudre ce problème d'adhésion ou s'en affranchir par d'autres moyens ?*

Nous avons montré que la réduction de la dose d'électrons devrait permettre de limiter ces problèmes si toutefois des capteurs CCD de sensibilité suffisante peuvent être utilisés sur ce type de caméra. Les négatifs sont encore très utilisés pour l'imagerie haute résolution en raison de leur plus grande efficacité de détection dans le domaine des hautes fréquences spatiales. Ce paramètre est mesuré par le carré du quotient des rapports signal/bruit entrant et sortant du détecteur (McMullan et al, 2009) ou DQE (« Detection quantum efficiency »). Les caméras équipées de capteurs CMOS capables de collecter directement les électrons avec une vitesse de détection élevée, en cours de développement (McMullan et al, 2011), devraient permettre d'obtenir prochainement la même information que sur les négatifs tout en réduisant la dose d'électrons nécessaire.

Le faible rendement en imagerie rend difficile la réalisation de séries focales indispensables pour déterminer la sous-focalisation optimale. Une solution consiste à insérer une plaque composée d'un film de carbone (type Zernike et Hilbert) ou d'une mini-lentille (type Boersch) au niveau du plan focal image de la lentille objectif pour générer le contraste de phase (Murata et al, 2010, Danev et Nagayama, 2008, Danev et Nagayama, 2010). Cette approche

avait été proposée initialement par Zernike (1942) et Boersch (1947) mais les avancées technologiques n'ont permis sa mise en œuvre que récemment. Cette solution présente l'avantage de permettre de travailler au focus, dans les meilleures conditions d'imagerie de la lentille objectif tout en conservant un contraste élevé dans l'image. Ce système permettrait d'obtenir la plus large gamme de fréquence spatiale transmise avec un contraste élevé sans les défauts de transmission liés à la sous-focalisation. La mise au point de ces plaques (« phase plates ») n'est pas encore achevée même si des résultats encourageants sont déjà disponibles sur des complexes protéiques en particule isolée (Danev et Nagayama, 2008), des virus (Murata et al, 2010), et de la cryotomographie de virus en films minces (Danev et al, 2010) ou encore des levure et des cellules PtK2 (Nagayama et Danev, 2008 ; Fukuda et Nagayama, 2011)

L'un des objectifs de ma thèse consistait à visualiser les nucléosomes au sein du noyau, nucléosomes qui n'ont jamais été observés *in situ* jusqu'à présent avec une résolution suffisante pour séparer les deux tours d'ADN autour du cœur protéique. Cette tâche s'est avérée difficile mais nous avons tout de même pu visualiser localement des striations dans les noyaux dont les dimensions suggèrent qu'il s'agit bien de nucléosomes. Ces objets ne sont visibles que très localement malgré leur abondance dans les noyaux. La taille des nucléosomes (11 nm) suppose une épaisseur de coupe à la limite des possibilités des microtomes actuels (proche de 25 nm) si on veut limiter les effets de superposition empêchant l'interprétation du signal. Les coupes que nous avons réalisées sont d'une épaisseur supérieure (40 nm). Le faible nombre de noyaux imagés est par ailleurs insuffisant pour une analyse exhaustive. Ces deux points (épaisseur des coupes et nombre d'images) devront être améliorés dans le futur de même que la valeur de sous-focalisation optimale pour la détection des nucléosomes pour tenter de détecter plus de nucléosomes

Des travaux récents réalisés sur des noyaux purifiés d'érythrocyte de poulet par cryotomographie électronique (Scheffer et al, 2011b) ou sur de la chromatine isolée à partir de ces mêmes cellules (Scheffer et al, 2011a) ont permis de reconnaître les nucléosomes au sein de structures fibrillaires de 30 nm. Chaque nucléosome apparaît comme un disque sombre, dense aux électrons. Dans le cas des cryotomogrammes obtenus sur la chromatine isolée, l'absence d'autres molécules assure qu'il s'agit bien de nucléosomes. Dans ces travaux de cryotomographie, les images sont acquises avec une forte sous-focalisation (6 μm) qui ne leur permet pas de résoudre la distance séparant les deux tours de la superhélice. Chaque strie correspond donc à un nucléosome entier. Sur nos images, la sous-focalisation beaucoup plus faible nous permet d'atteindre une meilleure résolution et d'identifier chaque nucléosome par

un ensemble de deux stries parallèles, qui correspondent aux deux tours de la molécule d'ADN autour du cœur d'histones. Les travaux de Scheffer et al (2011a) montrent également que les nucléosomes sont identifiables sur des sections du volume reconstruit, de 12 nm d'épaisseur. Cette valeur est particulièrement faible et largement inférieure à l'épaisseur d'une cryosection réalisée avec un ultramicrotome (l'épaisseur minimum accessible est actuellement de 25 nm). Il serait intéressant de voir si les nucléosomes peuvent être identifiés sur des sections de tomogrammes d'épaisseur double. Il est en effet possible que les coupes les plus fines que nous puissions réaliser actuellement soient encore trop épaisses pour pouvoir détecter un plus grand nombre de nucléosomes, en raison d'effets de superposition défavorables dans l'épaisseur de la coupe.

✓ *Mais pouvons-nous espérer détecter un ordre local au sein de la chromatine ?*

Grosberg et al (1988, 1993) ont proposé un modèle fractal pour l'organisation de la chromatine dans le noyau interphasique. Il repose sur l'assimilation de la fibre de 11nm à un polymère, effondré sous forme globulaire en raison des conditions du milieu et des contraintes topologiques. La preuve expérimentale de l'existence réelle de ce globule a été apportée récemment par les travaux de Liebermann-Aiden et al (2009) qui ont observé la proximité spatiale de certains fragments de chromatine dans les noyaux et montré que cette organisation satisfaisait à un modèle fractal. A priori, l'existence d'une organisation fractale n'est pas en contradiction avec l'existence d'un ordre local, consistant en un empilement de quelques nucléosomes par exemple mais il impose quelques conditions. Pour le comprendre il faut rappeler qu'un objet fractal est constitué d'éléments identiques à l'objet lui-même. Celui-ci présente donc la même organisation et le même aspect à toutes les échelles. En pratique, les objets fractals rencontrés dans la nature possèdent cette caractéristique sur une gamme d'échelle restreinte, avec une limite inférieure (le plus petit élément constitutif de l'objet et identique à celui-ci) et une limite supérieure (l'objet lui-même, identique à chaque élément qui le constitue). La présence d'ordre au sein d'un objet fractal implique donc que les éléments les plus petits (limite inférieure) soient caractérisés par une organisation similaire, ordonnée de la même manière. Les travaux de Lebedev et al (2005) réalisés par diffusion des neutrons aux petits angles sur des noyaux purifiés montrent que l'organisation de la chromatine suit une loi d'échelle caractérisée par une dimension non entière ($D=2,4$) comme attendu dans le cas d'un objet fractal (dimension d'Hausdorff). Ces travaux montrent que cette loi d'échelle s'étend entre 1 μ m environ (taille des territoires chromosomiques) et 15 nm pour la limite inférieure. Cette dernière valeur est très proche de la taille d'un nucléosome individuel et bien inférieure aux dimensions d'un amas ordonné de nucléosomes, ce qui

suggère qu'il n'existe pas d'ordre au delà de la taille des nucléosomes. La chromatine serait donc fortement désordonnée au sein du noyau interphasique. Par ailleurs, la valeur très élevée de D signifie que la chromatine est fortement compacte et donc que les nucléosomes doivent être très proches les uns des autres. L'existence d'une organisation fractale de la chromatine n'a pas encore été démontrée chez de nombreuses espèces mais uniquement à ce jour chez le poulet et chez l'homme. Néanmoins, l'éloignement de ces deux espèces sur le plan évolutif suggère que ce type d'organisation est assez conservé. Si la chromatine des cellules que nous avons étudiées répond à ce type d'organisation, il sera très difficile de comprendre l'agencement des nucléosomes dans le noyau par simple analyse des images (projections) en raison des effets de superposition défavorables qu'induisent le désordre et la compacité. Dans ce cas, nous pouvons améliorer les conditions d'imagerie en réduisant l'épaisseur des coupes, mais le recours à une analyse bidimensionnelle de la chromatine à partir de projections sera insuffisant pour comprendre son organisation dans les noyaux. Il sera sans doute nécessaire de recourir à une reconstruction tridimensionnelle de l'objet par cryotomographie (CETOVIS), à condition d'atteindre une résolution suffisante pour séparer les nucléosomes les uns des autres dans les noyaux.

Bibliographie

- Al-Amoudi A., Norlen L. P. O, Dubochet J. (2004) Electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues, *J. Struct. Biol.* **148**, 131-135
- Al-Amoudi A., Castano Diez D., Betts M. J., Frangakis A. S. (2007) The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes, *Nature* **450**, 832-839
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff, M., Roberts K., Watson J.D. (2002) *Molecular biology of the cell*, Garland
- Arents G., Burlingame R. W., Wang B. C., Love W. E., Moudrianakis E. N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1Å: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10148-10152
- Baker L. A., Rubinstein J. L. (2010) Radiation damage in electron cryo-microscopy, *Methods Enzymol.* **481**, 371-388
- Bates D. L., Thomas, J. O. (1981) Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome? *Nucleic Acids Res.* **2**, 5883-5894
- Behrman E. J. (1984) *The chemistry of osmium tetroxide fixation*. In: Revel J. P., Barnard T., Haggis G. H. *The science of biological specimen preparation*. SEM Inc, AMF O'Hare, Illinois, 1-5
- Bennett M. D., Heslop-Harrison J. B., Smith J. B., Ward J. P. (1983) DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals, *J. Cell Sci.* **63**, 173-179
- Bernal J. D., Fowler R. H. (1933) A theory of water and ionic solution with particular reference to hydrogen and hydroxyl ions, *J. Chem. Phys.* **1**, 515-548
- Boersch H. (1947) Über die Kontraste von Atomen im Elektronenmikroskop. *Z. Naturforsch. A* **29**, 615-633
- Bohrmann B., Haider M., Kellenberger E. (1993) Concentration evaluation of chromatin in unstained resin-embedded sections by means of low-dose ratio-contrast imaging in STEM. *Ultramicroscopy* **49**, 235-251
- Bouchet-Marquis C., Dubochet J., Fakan S. (2006) Cryo-electron microscopy of vitrified sections : A new challenge for the analysis of functional nuclear architecture. *Histochem. Cell. Biol.* **125**, 43-51
- Bouchet-Marquis C., Zuber B., Glynn A. M., Eltsov M., Grabenbauer M., Goldie K. N., Thomas D., Frangakis A. S., Dubochet J., Chrétien D. (2007) Visualization of cell microtubules in their native state, *Biol. Cell.* **99**, 45-53
- Bouchet-Marquis C., Fakan S. (2008) Cryoelectron microscopy of vitreous sections: A step further towards the native state in *The Nucleus: volume 2: Chromatin, transcription, envelope, proteins, dynamics and imaging* Humana Press
- Bouchet-Marquis C., Starkunviene V., Grabenbauer M. (2008) Golgi apparatus studied in vitreous sections, *J. Microsc.* **230**, 308-316

- Bouchet-Marquis C., Hoenger A. (2010) Cryo-electron tomography on vitrified sections: a critical analysis of benefits and limitations for structural cell biology, *Micron* **42**(2), 152-162
- Boyle P. J., Conway E. J. (1941) Potassium accumulation in muscle and associated changes *J. Physiol.* **100**, 1-63
- Brüggeller P., Mayer E. (1980) Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions, *Nature* **288**, 569-571
- Bustamante C., Bryant Z., Smith S. B. (2003) Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics, *Nature* **421**, 423-427
- Butler P. J., Thomas J. O. (1980) Changes in chromatin folding in solution *J. Mol. Biol.* **140**, 505-529
- Butler P. J. (1984) A defined structure of the 30nm chromatin fibre which accommodates different nucleosomal repeat lengths *EMBO J.* **3**, 2599-2604
- Chang J. J., McDowall A. W., Lepault J., Freeman R., Walter C. A., Dubochet J. (1983) Freezing, sectioning and observation artefacts of frozen hydrated sections for electron microscopy, *J. Microsc.* **132**, 109-123
- Cheung W. L., Briggs S. D., Allis C. D. (2000) Acetylation and chromosomal functions, *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 218-224
- Christensen A. K. (1971) Frozen thin sections of fresh tissue for electron microscopy with a description of pancreas and liver, *J. Cell. Biol.* **51**, 772-804
- Cong Y., Baker M. L., Jakana J., Woolford D., Miller E. J., Reissmann S., Kumar R. N., Redding-Johanson A. M., Batth T. S., Mukhopadhyay A., Ludtke S. J., Frydman J., Chiu W. (2010) 4.0Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**(11), 4967-4972
- Conway J. F., Trus B. L., Booy F. P., Newcomb W. W., Brown J. C., Steven A. C. (1993) The effect of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV1 capsids, *J. Struct. Biol.* **111**, 222-233
- Conway J. F., Steven A.C. (1999) Methods for reconstructing density map of single particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution, *J. Struct. Biol.* **128**, 106-118
- Cremer T., Kurz A., Zirbel R., Dietzel S., Rinke B., Schrock E., Speicher M. R., Mathieu U., Jauch A., Emmerich P. (1993) Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **58**, 777-792
- Cremer T., Kupper K., Dietzel S., Fakan S. (2004) Higher order chromatin architecture in the cell nucleus on the way from structure to function, *Biol. Cell* **96**, 555-567
- Cremer T., Cremer C. G. (2005) Chromatin in the cell nucleus: higher-order organization, *Encyclop. Of Life Sciences*.

Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Müller S., Solovell I., Fakan S. (2006) Chromosomes territories a functional nuclear landscape, *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 307-316

Cremer T. Cremer C. (2001) Chromosomes territories nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells, *Nat. Rev. Genet.* **2**, 292-301

Daban J. R. (2000) Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures, *Biochemistry* **39**, 3861-3866

Daban J. R. (2003) High concentration of DNA in condensed chromatin, *Biochem. Cell Biol.* **319**, 91-99

Daffé M., Draper P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity, *Adv. Microb. Physiol* **39**, 131-203

Danev, R., Nagayama, K. (2008) Single particle analysis based on Zernike phase contrast transmission electron microscopy, *J. Struct. Biol.* **161**, 211-218

Danev R., Kanamaru S., marko M., Nagayama K. (2010) Zernike phase contrast cryo-electron microscopy, *J. Struct. Biol.* **171**, 174-181

Davey C. A., Sargent D. F., Luger K., Armin W. M., Richmond T. J. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9Å resolution, *J. Mol. Biol.* **319**, 1097-1113

De Gennes P. G., (1985) Kinetics of collapse for a flexible coil, *J. Phys. Lett.* **46**, 639-642

Dean R. (1941) Theories of electrolyte equilibrium in muscle *Biol. Symp* **3**, 331-335

Devlin J. P. (1992) Molecular Interactions with icy surfaces: infrared spectra of CO absorbed on microporous amorphous ice, *J. Phys. Chem.* **96**, 6185-6188

Donnan F. (1924) The theory of membrane equilibria *Chem. Rev.* **1**, 73-90

Dowben, R. M. (1969) *General Physiology: A molecular Approach*, Harper and Rowe, New York

Downing K. H. (2003) Support films with uniform hole size, *Microsc. Today* **11**, 54

Downing K. H., Glaeser R. M. (2008) Restoration of weak phase-contrast images recorded with a high degree of defocus: the “twin image” problem associated with CTF correction, *Ultramicroscopy* **108**, 921-928

Draper P. (1998) The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers, *Front. Biosci* **3**, 1253-1261

Dubochet J., McDowell, A. W. (1981) Vitrification of pure water for electron microscopy, *J. Microsc* **124**, RP3-4

- Dubochet J., Lepault J., Freeman R., Berriman J.A., Homo J.C. (1982) Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions, *J. Microsc* **128**, 219-237
- Dubochet J., McDowall, A. W., Menge, B., Schmid, E. N., Lickfeld K. G. (1983) Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria, *J. Bact* **155**, 381-390
- Dubochet J., Adrian M., Schultz P., Oudet P. (1986) Cryo-electron microscopy of vitrified SV40 minichromosomes: the liquid drop model, *EMBO J.* **5**, 519-528
- Dubochet J., Adrian M., Chang J.J., Homo J.C., Lepault J., McDowall A.W., Schultz P. (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens, *Q. Rev. Biophys.* **21**, 129-228
- Dubochet J., Sartori-Blanc N. (2001) The cell in absence of aggregation artefacts, *Micron* **32**, 91-99
- Eaves, J. D., Loparo J. J., Fecko C. J., Roberts S. T., Tokmakoff A., Geissler P. L. (2005) Hydrogen bonds in liquid water are broken only fleetingly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13019-13022
- Ebersold H. R., Luthy P., Cordier J. L., Muller M. (1981) A freeze-substitution and freeze-fracture study of bacterial spore structures, *J. Ultrastruct Res* **76**, 71-81
- Eltsov M., Zuber B. (2006) Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid, *J. Struct. Biol.* **156**, 246-254
- Eltsov M., MacLellan K. M., Maeshima K., Frangakis A. S., Dubochet J. (2008) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**(50), 19732-19737
- Escaig J. (1982) New instruments which facilitate rapid freezing at 83K and 6K, *J. Microsc* **126**, 221-229
- Fader C. M., Colombo M. I. (2009) Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death and Differentiation* **16**, 70-78
- Finch J. T., Klug A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1897-1901
- Finney J. L., Hallbrucker A., Kohl I., Soper A. K., Bowron D. T. (2002) Structures of high and low density amorphous ice by neutron diffraction, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 503-507
- Fogh J., Trempe G. (1975) New human tumor cell lines. In *Human tumor cells "in vitro"* p 115-141, (ed J.Fogh), New York: Plenum Publ. Corp.
- Frank J., Shimkin B., Dowse H. (1981) SPIDER-A modular software system for electron image processing, *Ultramicroscopy* **6**, 343-358
- Frank J. (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D, *J. Struct. Biol.* **116**, 190-199

Frank J. (2006) *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies* (Oxford University Press, New York)

Franks F. (1982) The properties of aqueous solutions at subzero temperatures In *Water: A comprehensive Treatise*, vol. 7 (ed. F. Franks), 215-338. New York Plenum Press

Fritzsche W., Henderson E. (1996) Volume determination of human metaphase chromosomes by scanning force microscopy *Scanning Microsc.* **10**, 103-110

Fukuda Y., Nagayama K. (2011) Zernike phase contrast cryo-electron tomography of whole mounted frozen cells J. Struct. Biol. Article in press

Garavalov B. K., Zuber B., Bouchet-Marquis C., Kudryashev M., Gruska M., Beck M., Leis A., Frischknecht F., Bradke F., Baumeister W., Dubochet J., Cyrklaff M. (2006) Luminal particles within cellular microtubules, *J. Cell. Biol.* **174**, 759-765

Garcia-Ramirez M., Rocchini C., Ausio J. (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation, *J. Biol. Chem.* **270**, 17923-17938

Grosberg A. Y., Nechaev S. K., Shakhnovich E. I. (1988) The role of topological constraints in the kinetics of collapse of macromolecules, *J. Phys. France* **49**, 2095-2100

Grosberg A. Y., Rabin Y., Havlin S., Neer A. (1993) Crumpled globule model of the three-dimensional structure of DNA *EPL. Europhys. Lett.* **23**, 373

Han H. M., Zuber B., Dubochet J. (2008) Compression and crevasses in vitreous sections under different cutting conditions, *J. Microsc* **230**, 167-171

Hatasa K., Nakamura T. (1965) Electron microscopic observation of lung alveolar epithelial cells of normal young mice with special reference to formation and secretion of osmiophilic lamellar bodies. *Z. Zellforsch* **68**, 266-267

Hayat M.A (1970) *Principles and techniques of Electron Microscopy. Biological Applications*, vol. 1. London: Van Nostrand Reinhold

He W., Cowin P., Stokes D.L. (2003) Untangling desmosomal knots with electron tomography, *Science* **302**, 109-113

Heslop-Harrison J. S., Leitch A. R., Schwarzacher T., Smith J. B., Atkinson M. D., Bennett M. D. (1989) The volume and morphology of human chromosomes in mitotic reconstructions *Hum. Genet.* **84**, 27-34

Hewish D. R., Burgoyne L. A. (1973) Chromatin sub-structure: the digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 504-510

Heymann, J. B. (2001) Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy, *J. Struct. Biol.* **133**, 156-169

Heymann, J. B., Belnap D. M. (2007) Bsoft: image processing and molecular modelling for electron microscopy, *J. Struct. Biol.* **157**, 3-18

Hixon H. G., Wojcik M. J., Devlin M. S., Devlin J. P., Buch V. (1992) Experimental and simulated vibrational spectra of H₂ absorbed in amorphous ice: Surface structures, energetics and relaxations *J. Chem. Phys.* **97** 753-767

Horowitz R.A., Agard D. A., Sedat J. W., Woodcock C. L. (1994) The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon, *J. Cell Biol.* **125**, 1-10

Houri J. J., Ogier-Denis E., De Stefanis D., Bauvy C., Baccino F. M., Isidoro C., Codogno P. (1995). Differentiation-dependent autophagy controls the fate of newly synthesized N-linked glycoproteins in the colon adenocarcinoma HT-29 cell line *Biochem. J.* **309**, 521-527

Hsieh C. E., Leith A., Mannella C. A., Frank J., Marko M. (2006) Towards high resolution three-dimensional imaging of native mammalian tissue: Electron tomography of frozen-hydrated rat liver sections, *J. Struct. Biol.* **153**, 1-13

Huang. Z., Baldwin P. R., Mullapudi S., Penczek P. A. (2003) Automated determination of parameters describing power spectra of micrograph images in electron microscopy, *J. Struct. Biol.* **144**, 79-94

Hunter W. R., Angel D. W., Tousey R. (1965) Thin films and their uses for the extreme ultraviolet, *Applied Optics* **4**(8), 891-898

Jain M. K. (1972) *The Biomolecular Lipid Membrane: A system*, Van Nostrand-Reinhold CO., New York

Kanda T., Sullivan K. F., Whal G. M. (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* **8**, 377-385

Kanno H., Speedy R. J., Angell C. A. (1975) Supercooling of water to -92°C under pressure, *Science* **189**, 880-881

Kaye W. (1949) An aluminium-beryllium alloy for substrate and replica preparations in electron microscopy, *J. Appl. Phys.* **20**, 1209-1214

Kellenberger E., Carleman E., Sechaud J., Ryter A., de Haller G. (1986) considerations on the condensation and degree of compactness in non-eukaryotic DNA containing plasmas. In *Bacterial chromatin*. Ed C.O. Gualerzi and Pon C. L. Springer-Verlag, Berlin, 11-25

Kellenberger E. (1987) *The response to biological macromolecules and supramolecular structures to the physics of specimen cryo-preparation*. In: Steinbrecht, R. A., Zierold K. *Cryo-techniques in Biological Electron Microscopy*, Springer, Berlin 35-63

Kelley R. I. (1973) Isolation of a histone IIB1-IIB2 complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 1588-1594

- Kirmse R., Bouchet-Marquis C., Page C., Hoenger A. (2010) Three-dimensional cryo-electron microscopy on intermediate filaments, *Methods in Cell Biol.* **96**, 565-589
- Kizilyaprak C., Spehner D., Devys D., Schultz P. (2010) In vivo chromatin organization of mouse rod photoreceptors correlates with histone modifications. *PLoS One* **5** e11039 1-11
- Klug A., Rhodes D., Smith J., Finch J. T., Thomas J. O. (1980) A low resolution structure for the histone core of the nucleosome *Nature* **287**, 509-516
- Kornberg R. D., Thomas J. O. (1974) Chromatin structure: oligomers of the histones, *Science* **184**, 865-868
- Ladinsky M. S., Pierson J.M., McIntosh J.R. (2006), Vitreous cryo-sectionning of cells facilitated by a micromanipulator, *J. Microsc.* **224**, 129-134
- Ladinsky M. S. (2010) Micromanipulator assisted vitreous cryosectioning and sample preparation by high-pressure freezing, *Methods in Enzymology* **481**, 165-193
- Larson D. M., Downing K. H., Glaeser R. M. (2011) The surface of evaporated carbon films is an insulating, high-bandgap material, *J. Struct. Biol.*
- Leapman R. D., Sun S. (1995) Cryo-electron energy loss spectroscopy; Observations on vitrified hydrated specimens and radiation damage, *Ultramicroscopy* **59**, 71-79
- Lebedev D. V., Filatov M. V., Kuklin A. I., Islamov A. K., Kentzinger E., Pantina R., Toperverg B. P., Isaev-Ivanov V. V. (2005) Fractal nature of chromatin organization in interphase chicken erythrocyte nuclei: DNA structure exhibits biphasic fractal properties, *FEBS Lett.* **579**, 1465-1468
- Leforestier A., Livolant F. (1992) Distorsion of DNA cholesteric liquid crystal quenched at low temperature: geometrical analysis and models *J. Phys.* **2**, 1853-1880
- Leforestier A., Richter K., Livolant F., Dubochet J. (1996) Comparison of slam-freezing and high-pressure freezing effects on the DNA cholesteric liquid crystalline structure, *J. Microsc* **184**, 4-13
- Leforestier A., Dubochet J., Livolant F. (2001) Bilayers of nucleosome core particles, *Biophys. J.* **81**, 2414-2421
- Lewin B. (2000) Genes VII. Oxford University Press, Oxford
- Lide D. R. (2001) *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, FL, 12-46
- Liebermann-Aiden E., Van Berkum N. L., Williams L. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome, *Science* **326**, 289-293
- Ling G. N. (1965) The physical state of water in living cell and model systems, *Ann. New York Acad. Sci* **125**, 401

- Ling G. N., Walton C. L. (1975) A simple, rapid method for the quantitative separation of the extracellular fluid in frog muscles, *Physiol. Chem. Phys.* **7**, 215
- Ling G. N. (2001) *Life at the Cell and Below-Cell Level: the Hidden History of a Fundamental Revolution in Biology*, Pacific Press, New York
- Ling G. N. (2004) What determines the normal water content of a living cell? *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* **36**, 1-19
- Livolant F., Mangenot S., Leforestier A., Bertin A., De Frutos M., Raspaud E., Durand D. (2006) Are liquid crystalline properties of nucleosomes involved in chromosome structure and dynamics? *Phil. Trans. R. Soc. A* **364**, 2615-2633
- Lüger K., Mäder A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature* **389**, 251-260
- Maeshima K., Hihara S., Eltsov M. (2010) Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 291-297
- Mangenot S., Leforestier A., Durand D., Livolant F. (2003) X-ray diffraction characterization of the dense phases formed by nucleosome core particles, *Biophys. J.* **81**, 2414-2421
- Manuelidis L., Chen T. L. (1990) A unified model of eukaryotic chromosomes. *Cytometry* **11**, 8-25
- Masich S., Ostberg T., Norlen L., Shupliakov O., Daneholt B. (2006) A procedure to deposit fiducial markers on vitreous cryo-sections for cellular tomography, *J. Struct. Biol.* **156**, 461-468
- Matias V. R. F., Al-Amoudi A., Dubochet J., Beveridge T. J. (2003) Cryo-transmission electron microscopy of frozen hydrated sections of Gram-negative bacteria *J. Bacteriol.* **185**, 6112-6118
- Maupin P., Pollard T. D. (1983) Improved preservation and staining of HeLa cell actin filaments, clathrin-coated membranes and other cytoplasmic structures by tannic acid-glutaraldehyde-saponin fixation, *J. Cell. Biol.* **96**, 51-62
- Mayer E. (1985) New methods for vitrifying water and other liquids by rapid cooling of their aerosols, *J. Appl. Phys.* **58**(2), 663-667
- Mayer E., Hallbrucker A. (1987) Cubic ice from liquid water, *Nature* **328**, 601-602
- McDowell, A. W., Chang J.J., Freeman R., Lepault J., Walter C.A., Dubochet J. (1983) Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples, *J. Microsc.* **131**, 1-9
- McDowell A. W., Smith J. M., Dubochet J. (1986) Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ. *EMBO J.* **5**, 1395-1402

- McGhee J. D., Nickol J. M., Felsenfeld G., Rau D. C. (1983) Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length, *Cell* **33**, 831-841
- McMullan G., Chen S., Henderson R., Faruqi A. R. (2009) Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy, *Ultramicroscopy* **109**, 1126-1143
- Mc Mullan G., Turchetta R., Faruqi A. R. (2011) Single event imaging for electron microscopy using MAPS detectors *12th International workshop on radiation imaging detectors* 1-9
- Meryman H. T. (2007), Cryopreservation of living cells: principles and practice, *Transfusion* **47**, 935-945
- Minton A. P. (1981) Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity, *Biopolymers* **20**, 2093-2110
- Mirny L. A. (2011) The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell, *Chromosome Res.* **19**, 37-51
- Misell D.L (1978) *Image Analysis, Enhancement and Interpretation*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam
- Misteli T. (2001) Protein dynamics implication for nuclear architecture and gene expression, *Science* **291**, 843-847
- Moor H., Bellin G., Sandri C., Akert K. (1980) The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue, *Cell Tissue Res* **209**, 201-216
- Munkel C., Elis R. , Dietzel S. (1999) Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment, *J. Mol. Biol.* **285**, 1053-1065
- Murata K., Liu X., Danev R., Jakana J., Schmid M. F., King J., Nagayama K., Chiu W. (2010) Zernike phase contrast cryo-electron microscopy and tomography for structure determination at nanometer and subnanometer resolutions, *Structure* **18**, 903-912
- Murk J. L., Posthuma G., Koster A. J., Geuze H. J., Verleij A. J., Kleijmeer M. J., Humbel B. M. (2003) Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography, *J. Microsc* **212**, 81-90
- Nagayama K., Danev R. (2008) Phase contrast electron microscopy: development of thin film phase plates and biological applications. *Phil. Trans. R. Soc. B* **363**, 2153-2162
- Norlen L., Al-Amoudi A. (2004) Stratum corneum keratin structure, function and formation: the cubic rod-packing and membrane templating model *J. Invest. Dermatol* **123**, 15-32
- Olins A. L., Olins D. E. (1974) Spheroid chromatin units (v bodies) *Science* **183**, 330-332

- Ortiz J. O., Förster F., Kürner J., Linaroudis A. A., Baumeister W. (2006) Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern, *J. Struct. Biol.* **156**, 334-341.
- Pearson E. C., Butler P. J., Thomas J. O. (1983) Higher order structure of nucleosome oligomers from short-repeat chromatin, *EMBO J.* **2**, 1367-1372
- Penczek P. A., Zhu J., Schröder R., Frank J. (1997) Three dimensional reconstruction with contrast transfer compensation from defocus series, *Scanning Microsc.* **11**, 147-154
- Penczek P. A. (2010) Image restoration in cryo-electron microscopy, *Methods in Enzym.* **482**, 35-72
- Pierson J., Fernandez J.J., Bos E., Amini S., Gnaegi H., Vos M., Bel B. Adolfsen F., Carrascosa J.L, Peters P.J (2010) Improving the technique of vitreous cryo-sectioning for cryo-electron tomography : electrostatic charging for section attachment and implementation on an anti-contamination glove box, *J. Struct. Biol.* **169**(2), 219-225
- Polk D. E., Calka A., Giessen B. C. (1978) The preparation and thermal and mechanical properties of new titanium rich metallic glasses, *Acta Met.* **26**, 1097-1103
- Pollack G. H. (2001) *Cells, Gels and the engines of life: A new unifying approach to cell function*. Seattle, WA, Ebner et Sons
- Ponder E. (1948) *Hemolysis and Related Phenomena*, Grune and Stratton, New York
- Puech V., Chami M., Lemassu A., Lancelle M. A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daffé M. (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria : importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane, *Microbiology* **17**, 1365-1382
- Quispe J., Damiano J., Mick S. E., Nackashi D. P., Fellman D., Ajero T. G., Carragher B., Potter C. S. (2007) An improved holey carbon film for cryo-electron microscopy, *Microsc. Microanal.* **13**(5), 365-371
- Rader R. S., Lamvik M. K. (1992) High-conductivity amorphous TiSi substrates for low-temperature electron microscopy, *J. Microsc* **168**(1), 71-77
- Rahman A., Stillinger F. H. (1971) Molecular dynamics study of liquid water, *J. Chem. Phys.* **55**, 3336-3359
- Rand R. P., Parsegian V. A. (1989) Hydration forces between phospholipids bilayers. *Biochem. Biophys. Acta* **988**, 351-376
- Rau D. C., Lee B., Parsegian V. A. (1984) Measurement of the repulsive force between polyelectrolyte molecules in ionic solution: hydration forces between parallel DNA double helices, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2621-2625
- Rand R. P., Parsegian V. A. (1989) Hydration forces between phospholipids bilayers, *Biochem. Biophys. Acta* **988**, 351-376

Rau D. C., Parsegian V. A. (1990) Direct measurement of forces between linear polysaccharides xanthan and schizophyllan, *Science* **249**, 1278-1281

Reid C., Rand R. P. (1997) Probing protein hydration and conformational states in solution, *Biophys. J.* **72**, 1022-1030

Reissig M., Orrell S. A. (1970) A technique for the electron microscopy of protein-free particle suspension by the negative staining method, *J. Ultrastruct. Res.* **32**(1), 107-117

Reznik G., Isaacson M. (1992) A technique for fabrication of textured thin carbon substrates, *Ultramicroscopy* **40**(2), 181-185

Rhinow D., Kühlbrandt W. (2008) Electron-microscopy of biological specimens on conductive titanium-silicon metal glass film, *Ultramicroscopy* **108**, 698-705

Richter K. (1994b) Cutting artefacts on ultrathin cryosections of biological bulk specimens, *Micron* **25**(4), 297-308

Richter K. (1994a) High-density morphologies of ice in high-pressure frozen biological specimens, *Ultramicroscopy* **53**, 237-249

Richter K. (1994) A cryoglue to mount vitreous biological specimens for cryoultramicrotomy at 110K, *J. Microsc.* **173**, 143-147

Riehle U., Hoechli M. (1973) *The theory and technique of high pressure freezing* In: Benedetti E. L., Favard P. *Freeze etching techniques and applications*. Société française de Microscopie Electronique, Paris, 31-61

Robertson J., O'Reilly E. P. (1987) Electronic and atomic structure of amorphous carbon, *Phys. Rev. B* **35**(6), 2946-2957

Robinson P. J., fairall L., Huynh V. A., Rhodes D. (2006) EM measurements define the dimensions of the « 30nm » chromatin fiber: evidence for a compact interdigitated structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6506-6511

Routh A., Sandin S., Rhodes D. (2008) Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 8872-8877

Ruiz T., Erk I., Lepault J. (1994) Electron cryo-microscopy of vitrified biological specimens: towards high spatial and temporal resolution, *Biol. Cell.* **80**, 203-210

Ruiz-Carillo A., Jorcano J. L. (1979) An octamer of core histones in solution: central role of the H3-H4 tetramer in the self assembly, *Biochemistry* **18**, 760-768

Sachs R. K., Van Den Engh G., Trask B., Yokota H., Hearst J. E. (1995) A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2710-2714

Sader K., Studer D., Zuber B., Gnaegi H., Trinick J. (2009) Preservation of high resolution sprotein structure by cryo-electron microscopy of vitreous sections, *Ultramicroscopy* **110**(1), 43-47

Salje J., Zuber B., Lowe J. (2009) Electron cryomicroscopy of E.coli reveals filaments bundles involved in plasmid DNA segregation. *Science* **323**, 509-512

Sapoval B. (2001) *Universalités et Fractales*, Ed. Flammarion

Sartori N., Richter K., Dubochet J. (1993) Vitrification depth can be increased more than 10-fold by high-pressure freezing, *J. Microsc* **172**, 55-61

Sartori-Blanc N., Senn A., Leforestier A., Livolant F., Dubochet J. (2001) DNA in human and stallion spermatozoa forms local hexagonal packing with twist and many defects, *J. Struct. Biol.* **134**, 76-81.

Schalch T., Duda S., Sargent D. F., Richmond T. J. (2005) X-ray structure of a tetranucléosome and its implications for the chromatin fiber, *Nature* **436**, 138-141

Scheffer M. P., Eltsov M., Bednar J., Frangakis A. S. (2011a) Nucleosomes stacked with aligned dyad axes are found in native compact chromatin, *J. Struct. Biol.* (article sous presse)

Scheffer M. P., Eltsov M., Frangakis A. S. (2011b) Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 16992-16997

Schiessel H. (2003) The physics of chromatin, *J. Phys. Condens. Mat.* **15**, 699-774

Schmitz G., Müller G. (1991) Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J. Lipid Res.* **32**, 1539-1570

Semmler K., Wunderlich J., Richter W., Meyer H.W. (1998) High-pressure freezing causes structural alterations in phospholipids model membranes. *J. Microsc* **190**, 317-327

Shaikh T. R., Gao H., Baxter W. T., Asturias F. J., Boisset N., Leith A., Frank J. (2008) SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs, *Nature Protocols.* **3**(12), 1941-1974

Shaw, B. R., Herman T. M., Kovacic R.T., Beaudreau G. S., Van Holde K. E. (1976) Analysis of subunit organization in chicken erythrocyte chromatin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 505-509

Sherman M. B., Chiu W. (2003) Electron beam coater for reduction of charging in ice-embedded biological specimens using Ti88Si12 alloy, *Microsc. Microanal.* **9**, 566-573

Sleytr U. B., Beveridge T. J. (1999) Bacterial S-layers, *Trends Microbiol* **172**, 55-61

Stack S. M., Brown D. B., Dewey W. C. (1977) Visualization of interphase chromosomes. *J. Cell. Sci.* **26**, 281-299

- Stanley H. E., Teixeira J. (1980) Interpretation of the unusual Behaviour of H₂O and D₂O at low temperatures: a test of a percolation model, *J. Chem. Phys.* **73**, 3404-3422
- Stiegler J. O., Noggle T. S. (1961), Victawet and sodium metaphosphate as parting agents for electron microscope replicas *Rev. Sci. Instr* **32**(4), 406-408
- Stratton C. J. (1978) The ultrastructure of multi-lamellar bodies and surfactant in the human lung. *Cell Tiss. Res.* **193**, 219-229
- Studer D., Michel M., Muller M. (1989) High pressure freezing comes of age. *Scanning Microsc. Suppl* **3**, 253-268
- Studer D., Michel M., Wohlwend M., Hunziker E. B., Buschmann M. D. (1995) Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing, *J. Microsc* **179**, 321-332
- Studer D., Graber W., Al-Amoudi A., Eggli P. (2001) A new approach for cryofixation by high-pressure freezing, *J. Microsc* **203**, 285-294
- Studer D., Humbel B.M., Chiquet M. (2008) Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution, *Histochem Cell Biol* **130**, 877-889
- Sud B. N. (1977) Electron microscopic study of the human type II pneumocyte and surfactant synthesis. *Anat. Rec.* **187**, 724-725
- Szczesny P. J., Walther P., Muller M. (1996) Light damage in rod outer segments: the effects of fixation on ultrastructural alterations. *Curr Eye Res* **15**, 807-814
- Takahashi T., Hirsh A., Erbe E., Williams R.J. (1988) Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes, *Biophys. J.* **54**, 509-518
- Thoma F., Koller T., Klug A. (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin, *J. Cell. Biol.* **83**, 403-427
- Thoma J. O., Butler P.J.G. (1977) Characterization of the octamer of histones free in solution, *J. Mol. Biol.* **116**, 769-781
- Thomas J.O, Kornberg R. D. (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2626-2630
- Toyoshima C., Unwin N. (1988), Contrast transfer for frozen-hydrated specimens: determination from pairs of defocused images, *Ultramicroscopy* **25**, 279-292
- Toyoshima C., Yonekura K. (1993), Contrast transfer for frozen-hydrated specimens II. Amplitude contrast at very low frequencies, *Ultramicroscopy* **48**, 165-176
- Trus B. L., Steven A. C., McDowall A. W., Unser M., Dubochet J., Podolsky R. J. (1989) Interactions between actin and myosin filaments in skeletal muscle visualized in frozen-hydrated thin sections *Biophys. J.* **55**, 713-724

- Vanhecke D., Studer L., Studer D. (2007), Cryoultramicrotomy, *Methods in Molecular Biology* **369**, 175-197
- Van Holde K., Zlatanova J. (2007) Chromatin fiber structure: where is the problem now?, *Seminars in cell and developmental biology* **18**, 651-658
- Verschure P. J., Van Der Kraan, I., Manders E. M. M., Van Driel R. (1999) Spatial relationship between transcription sites and chromosomes territories, *J. Cell Biol.* **147**, 13-19
- Visser A. E., Jaunin F., Fakan S., Aten J. A. (2000) High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J. Cell. Sci.* **113**, 2585-2593
- Wang M. D., Yin H., Landick R., Gelles J., Block S. M. (1997) Stretching DNA with optical tweezers, *Biophys. J.* **72**, 1335-1346
- Williams R. C. (1977) Use of polylysine for adsorption of nucleic acids and enzymes to electron microscope specimen films, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**(6), 2311-2315
- Widom J. (1986) Physicochemical studies of the folding of the 100Å nucleosome filament into the 300Å filament, *J. Mol. Biol.* **190**, 411-424
- Williams S. P., Athey B. D., Muglia L. J., Schappe R. S., Gough A. H., LAngmore J. P. (1986) Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length, *Biophys. J.* **49**, 233-248
- Wing R., Drew H., Takano T., Broka C., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R. E. (1980) Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA, *Nature* **287**, 755-758
- Woodcock C. L., Frado L. L., Rattner J. B. (1984) The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement, *J. Cell. Biol.* **99**, 42-52
- Woodcock C. L. (1994) Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length, *J. Cell Biol.* **125**, 11-19
- Worcel A., Strogatz S., Riley D. (1981) Structure of chromatin and the linking number of DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1461-1465
- Yokota H., Van Den Engh G., Hearst J. E., Sachs R. K., Trask B. J. (1995) Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human g0/g1 interphase nucleus, *J. Cell Biol.* **130**, 1239-1249
- Zenhausen F., Adrian M., Descouts P. (1993) TiO₂ thin films: new support materials compatible for transmission electron microscopy and scanning probe microscopy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1**, 133-137
- Zernike F. (1942) Phase contrast, a new method for the microscope observation of transparent objects. *Physica* **9**, 686-698

Zorn C., Cremer T., Cremer C., Zimmer J. (1979) Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp Cell Res.***1**, 93-106

Zuber B., Nikonenko I., Klauser P., Muller D., Dubochet J. (2005) The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (52), 19192-19197

Zuber B., Nikonenko I., Klauser P., Muller D., Dubochet J. (2005) The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 19192-19197

Zuber B., Chami M., Houssin C., Dubochet J., Griffiths G., Daffé M. (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state, *J.Bact* **190**(16), 5672-5680

Zweibaum A., Laburthe M., Grasset E., Louvard D. (1991) Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. *In handbook of Physiology. The Gastrointestinal System, Vol.IV Intestinal Absorption and Secretion*, p 223-255 (ed. S.J.Schultz, M.Field and R.A.Frizell), American Physiological Society, Bethesda.

Annexe :
Systèmes
Membranaires

Résumé

Nous avons utilisé la méthode de CEMOVIS (Cryo-Electron Microscopy Of Vitreous Sections) pour étudier l'ultrastructure des cellules HT29 (lignée cancéreuse colique humaine) et plus particulièrement l'organisation de la chromatine au sein du noyau.

Pour améliorer la méthode, nous avons développé un micromanipulateur qui facilite la collecte des coupes et leur transfert sur la grille. Nous avons également cherché à préparer de nouveaux films métalliques (en remplacement du carbone) permettant une meilleure adhésion des coupes sur le support. Au vu des premiers tests réalisés, les films de TiO₂ que nous avons fabriqués au laboratoire et caractérisés par microscopie électronique (HR, spectroscopie et cartographie EELS) semblent offrir des perspectives intéressantes que nous attribuons à leur propriétés de conducteur électrique à basse température (ce qui reste à démontrer).

Les organites cellulaires (noyaux, réseaux de filaments du cytosquelette, systèmes multilamellaires) ont été identifiés *in situ*. Les conditions d'imagerie choisies nous ont permis d'obtenir une résolution permettant d'identifier les deux feuillettes des bicouches membranaires. Dans le noyau, nous avons observé des motifs striés, distants de 2.7 à 3.5 nm que nous attribuons à la molécule d'ADN enroulée autour du cœur d'histones. Comparées aux images de phases denses de nucléosomes, ces images suggèrent que les nucléosomes (jamais identifiés *in situ* jusqu'à présent) présentent un ordre très local au sein de la chromatine, que nous discutons à la lumière des modèles polymériques actuels.

Mots-clés :

CEMOVIS, Cryo-microscopie électronique, cryosections, cryo-ultramicrotome, Particules Cœur de Nucléosome (NCP en Anglais), chromatine, noyaux, cellules HT29, Acide désoxy-ribonucléique (ADN), phase hexagonale, membranes, bicouches, film de carbone, alliage Titane-Silicium, EELS, conductivité électrique, micromanipulateur

Laboratoire :

Laboratoire de Physique des Solides (LPS)

UMR CNRS 8502/ Université Paris Sud

Orsay

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex