



La France renforce sa recherche fondamentale en biologie structurale par l'acquisition de trois cryo-microscopes électroniques de dernière génération : les Titan Krios G4 !

Financé dans le cadre de l'initiative nationale « Equipex+ » du Programme d'investissement d'avenir 3 (PIA3), l'IBS à Grenoble, l'IGBMC à Illkirch-Graffenstaden et le Synchrotron Soleil à Saint-Aubin ont le privilège, grâce au projet France Cryo-EM, d'accueillir dans leurs locaux des Titan Krios G4 de Thermo Fischer Scientific, des cryo-microscopes électroniques de pointe dédiés à la biologie.

L'intérêt pour la biologie d'un cryo-microscope électronique

Une des méthodes pour comprendre le fonctionnement du vivant est de l'observer. Les microscopes permettent la visualisation des objets pour lesquels l'œil n'est pas suffisant. Il existe un grand nombre de microscopie différente, basée sur des principes différents, et qui sont utilisées pour observer et étudier le monde du vivant. Les plus connues sont :
- la microscopie optique qui utilise la lumière visible et qui est la plus ancienne mais elle est limitée à une résolution d'environ 200 nanomètres maximum car elle utilise des photons de longueur

d'onde comprise entre 380 et 780 nm.

- la microscopie à champ proche qui inclue la microscopie à force atomique (AFM) et permet d'avoir accès à la topographie de l'échantillon.

- la microscopie électronique à balayage qui utilise les électrons et qui offre un accès à la surface de l'échantillon grâce à la détection des électrons rétrodiffusés.

- la microscopie électronique à transmission qui utilise également les électrons mais dans laquelle les électrons vont traverser l'échantillon et générer une image correspondant à une projection de l'échantillon.

Le Titan Krios est un cryo-microscope électronique à transmission.

Observer un échantillon biologique dans un microscope électronique n'est pas trivial. En effet, comme les électrons interagissent très fortement avec la matière, un vide très poussé doit régner à l'intérieur du microscope pour que ces derniers puissent y circuler librement. De plus, les échantillons biologiques sont majoritairement composés d'eau et celle-ci s'évapore instantanément dans le vide. Il faut donc absolument avoir recours à une préparation spécifique de l'échantillon à analyser pour que celui-ci survive malgré cette contrainte environnementale et pour que l'on puisse avoir accès à sa structure.

Deux grandes méthodes de préparation existent :

- La coloration négative qui consiste à enrober l'échantillon dans un sel d'atome lourd. Elle permet d'avoir accès à l'image de l'empreinte de l'échantillon (ie uniquement l'extérieur de l'échantillon).

- La vitrification de l'échantillon ou cryo-microscopie électronique. En congelant très rapidement l'échantillon biologique, l'eau qui l'entoure l'échantillon n'a pas le temps de cristalliser mais est transformée en glace vitreuse en préservant l'échantillon dans son état natif hydraté. L'échantillon congelé est insensible au vide qui règne dans la colonne de microscopie. Dans ce cas, le faisceau d'électrons va complètement traverser l'échantillon natif et l'image obtenue est cette fois-ci une projection 2D de sa structure 3D, et non simplement une représentation de sa surface.

Le fonctionnement du cryo-microscope électronique Titan Krios G4

La préparation de l'échantillon en cryo-microscopie électronique et son chargement dans le microscope

Toutes les opérations de préparation se font à la température de l'azote liquide (-196°C). L'échantillon étudié est déposé sur de petites grilles (3 mm de diamètre) puis vitrifié dans de l'éthane liquide. Ces grilles sont ensuite insérées dans des supports plus rigides et plus facilement manipulables appelés autogrid. Douze de ces autogrid peuvent être chargées en même temps dans le Titan Krios par

l'intermédiaire d'un système de transfert appelé cassette. Une fois chargée dans le microscope, la cassette peut être stockée plusieurs jours dans une partie du microscope appelé autoloader sous vide et à la température de l'azote liquide.

Le transfert de la grille d'intérêt (parmi les 12 chargés dans le microscope) sous le faisceau d'électrons est ensuite automatique.

Le microscope électronique Titan Krios

Le microscope électronique peut être décomposé en différentes parties :

Tout en haut du microscope se situe le canon à électrons qui comprend une petite source d'électrons à partir de laquelle les électrons sont extraits puis accélérés à l'aide d'une haute tension à 300 000 volts. Le faisceau d'électrons ainsi créé est ensuite condensé par une série de lentilles condenseurs et projeté sur la grille. Cette grille est située au milieu de la lentille objectif qui permet d'obtenir une image grandie de l'échantillon. L'image obtenue est projetée sur des systèmes de visualisation et/ou d'enregistrement (écran fluorescent ou caméra) par l'intermédiaire lentilles projectrices.

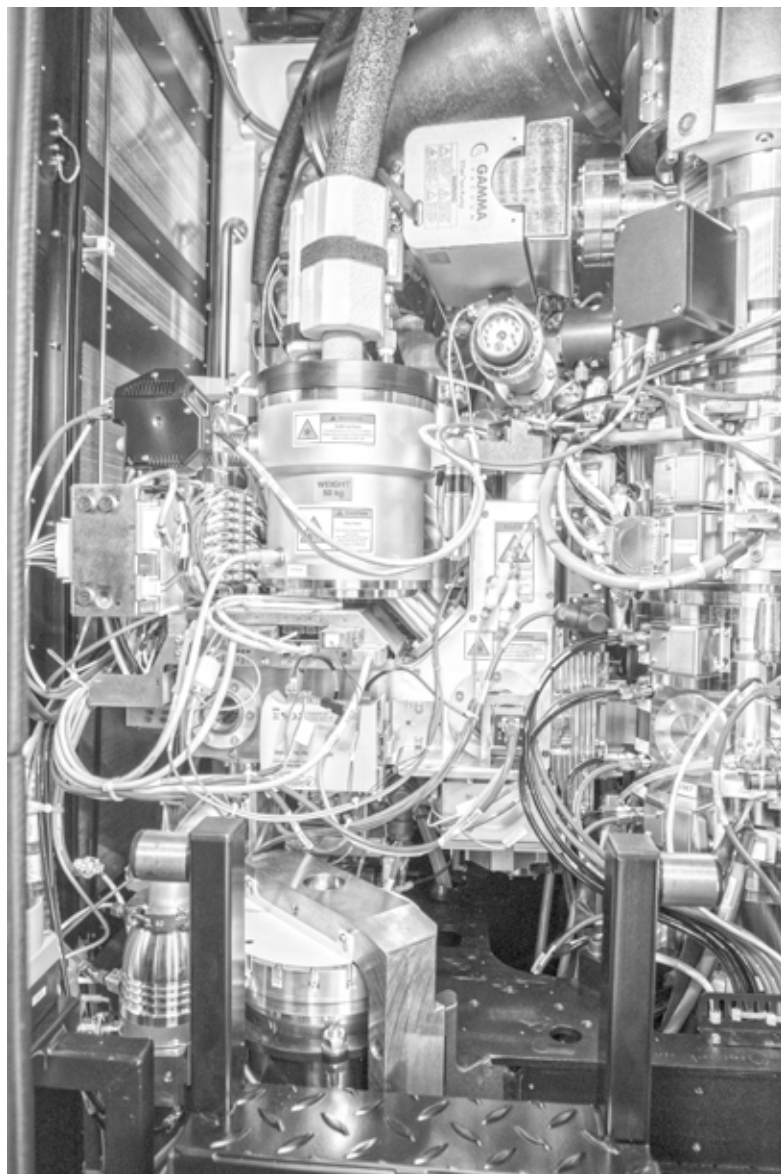
Les caméras actuelles, de dernière génération (détecteur direct d'électrons), couplées au microscope au Titan Krios G4 permettent d'enregistrer jusqu'à 10,000 images à très haute résolution par jour.

Les avantages du cryo-microscope électronique de dernière génération

Installé sur coussin d'air, au sein d'une enceinte qui l'isole du point ►►►



Le Titan Krios G4 vu de l'extérieur - © A Delos / CEA



Zoom sur le cryo-EM Titan Krios G4 - © A Delos / CEA

de vue acoustique et thermique des perturbations extérieures et sur une dalle de béton anti-vibration de 1,5 m d'épaisseur, le Titan Krios G4 permet l'observation d'échantillons d'une épaisseur allant jusqu'à 600 nm. La tension d'accélération de 300kV génère de plus un faisceau d'électrons qui induits moins de dommages d'irradiation sur l'échantillon qu'un cryo-microscope électronique classique fonctionnant avec une tension moins importante. Ce microscope est également équipé d'un filtre d'énergie qui permet d'éliminer les électrons qui ont interagit de manière inélastique avec l'échantillon. Toutes ces caractéristiques font que les images finales ainsi obtenues seront « nettoyées » d'une partie importante du bruit de fond et porteront des informations allant jusqu'à l'échelle atomique ! Le record de résolution obtenu sur le Titan Krios de Grenoble est de 1.26 Å !

Trois Titan Krios G4 en France

A la suite du constat d'une France sous-équipée en cryo-microscopes électroniques de très haute qualité (en 2019, seulement trois microscopes de pointe étaient présents sur le sol national comparé à 25 en Allemagne et 25 en Angleterre), un projet a été rédigé entre 2019 et 2020 en réponse à un appel du PLIA3 pour doubler le parc d'équipements français par l'achat de trois microscopes de dernière génération, amenant ainsi les Titan Krios G4 dans nos laboratoires français.

Le premier de ces microscopes a été installé à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch-Graffenstaden. Le second est localisé à SOLEIL à Saint-Aubin dans un environnement synchrotron et le dernier, placé à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble fonctionne comme une ligne CRG nationale (33% du temps machine est réservé aux utilisateurs des pays membres de l'ESRF dont la France, les 66% restant sont dédiés aux chercheurs académiques français et européens). Ce microscope est géré par l'Institut de Biologie Structurale et par l'Unité d'Appui à la Recherche ISBG grâce à une équipe de 5 personnes constituée d'un responsable scientifique et administratif, d'un responsable technique et opérationnel et de scientifiques de ligne.

Des microscopes moins puissants dans les laboratoires français
Les Titan Krios sont le dernier chaînon d'un pipeline de recherche en biologie structurale. Ils permettent l'acquisition des données ultimes pour résoudre des structures à la plus haute résolution possible. Ces microscopes seront nourris par les résultats et les échantillons pré-testés sur d'autres microscopes moins puissants installés dans les laboratoires de recherche français. Ainsi pour alimenter les 3 Titan Krios dernièrement acquis, la France s'est également équipée/ va s'équiper de cryo-microscopes électroniques de dernière génération moins puissants (à Strasbourg, Lyon, Grenoble, Marseille, Montpellier, Rennes, Paris, Toulouse et à Bordeaux)

Une machine de service pour faire avancer la recherche en biologie structurale

Grâce au Titan Krios G4, le travail de recherche fondamentale sur les complexes macromoléculaires biologiques – tels que les ribosomes, les microtubules ou encore les protéines membranaires comme les

porines dès lors qu'elles sont solubles (soit dans du détergent, soit insérées dans des nanodisques) – est possible et leurs structures 3D à haute résolution peuvent être obtenues en moyennant l'information provenant de milliers d'images.

Les virus entiers pathogènes quant à eux ne peuvent pas être étudiés via ce microscope, car leur manipulation nécessite un environnement de travail de type P2. Malgré tout, les scientifiques ont la possibilité de travailler sur certaines parties de ces virus pathogènes pour déterminer leurs structures. La nucléocapside du virus de la grippe ou les polymérase des virus à ARN négatif rentrent dans ces catégories. Les seuls virus entiers sur lesquels les scientifiques peuvent travailler directement sont les bactériophages qui infectent les bactéries mais pas les humains.

Les Titan Krios peuvent également fonctionner comme un scanner médical :

ils permettent l'acquisition de données par tomographie électronique. Un objet unique peut être observé sous différents angles au sein du microscope ce qui permet ensuite d'en déduire directement la structure tridimensionnelle.

Mais les scientifiques ne veulent pas s'arrêter là ! La structure d'un grand nombre de complexes macromoléculaires exprimés dans des systèmes d'expression, purifiés et isolés de leur environnement d'origine ont pu être déterminée au cours des années passées grâce à la RMN, la cristallographie aux rayons X et la cryo-ME. Le défi de la biologie structurale du futur est de replacer ces structures dans leur contexte cellulaire. Une observation directe *in cellulo* est encore impossible même avec un Titan Krios qui ne possède un pouvoir de pénétration que d'environ 600 nanomètres trop limité pour traverser une cellule entière.

La solution consiste à « découper » une tranche d'environ 100 à 200 nanomètres

d'épaisseur à partir d'une cellule par le biais d'un faisceau d'ions. Cela est possible grâce à un nouvel instrument qui vient d'être livré à l'IBS : un cryo-FIB/ SEM Aquilos2 de la société TFS. Il reste à mettre l'instrument en service et surtout à en maîtriser le fonctionnement !

Comprendre comment fonctionnent les bactéries et leurs interactions *in vitro* et *in cellulo* permet en effet de mieux les contrôler et de les combattre pour lutter contre des maladies émergentes directement liées aux enjeux climatiques et sanitaires de notre époque.

Pour en savoir plus :
Guy Schoehn
guy.schoehn@ibs.fr
<https://www.ibs.fr>

J Lopes
© La Gazette du Laboratoire

NOS EXPERTS POUR VOS RÉACTEURS

Unistats® – Thermorégulation optimisée de vos procédés



Inspired by **temperature**

Les Unistats thermorégulent vos réacteurs de manière sûre, dynamique et avec des résultats reproductibles. Ils sont extrêmement efficaces et faciles à utiliser. Plus de 50 modèles permettent de répondre précisément à votre besoin que ce soit au niveau du laboratoire, du pilote ou de la production.



www.huber-online.com

f i y i n