

Communications orales

Liste des intervenants

Nicolas ANGELI
Julien RUELLE
Annegret KOHLER
Michel BARITEAU
Laurent MANIGUET
Isabelle ANSELME-BERTRAND
Brigitte GAILLARD-MARTINIE
Thierry ASTRUC
François LE TACON
Jeannine LHERMINIER
Isabelle BORNARD
Perrine BOMME
Christophe ROSE
Bertrand VAN DE MOORTELE
Marco CANTONI
Didier LE THIEC
Sylvère VIALET
Raphaël PASSAS
Thierry MEYLHEUC
Cédric GAILLARD

Rôle du référent réseau

Michel Bariteau

Président du Centre de Recherche INRA PACA

Délégué Régional Provence-Alpes-Côte-d'Azur

Rédacteur en Chef du Cahier des Techniques de l'INRA

Site d'Avignon :

Domaine Saint Paul, Site Agroparc

84914 Avignon Cedex 9 –

Site de Sophia-Antipolis

400 route des Chappes

BP 167 - 06903 Sophia-Antipolis Cedex

https://intranet.inra.fr/cahier_des_techniques

Depuis plus de 30 ans, le Cahier des Techniques de l'Inra publie et assure la diffusion d'articles présentant les réalisations techniques et les méthodologies conçues et mises en œuvre au sein de notre Institut. Le Cahier est doté d'un Comité de lecture et il est accessible depuis peu dans le monde entier via le lien : https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques.

Le Cahier des Techniques de l'Inra occupe une place originale : c'est pratiquement le seul support de publication permettant aux techniciens de faire connaître leurs réalisations. Pour autant, le Cahier n'est pas réservé aux seuls techniciens de l'Inra : toutes les catégories de personnel peuvent participer et de plus en plus souvent les réalisations et les méthodologies sont issues de travaux en collaboration avec d'autres établissements et organismes. Au cours des années, le Cahier s'est modernisé. En 2012 le Comité éditorial a été renouvelé et réactivé ; une nouvelle charte graphique a été adoptée. Un réseau de référents de Centres Inra a été mis en place permettant ainsi une meilleure interactivité entre les auteurs, les lecteurs et la rédaction et favorisant la promotion du Cahier des Techniques et les actions de formation sur les centres (ateliers d'écriture). Le Cahier souhaite également mieux accompagner les collectifs qui s'expriment dans le Cahier des Techniques : des référents « réseaux-métiers » (comme par exemple : « le réseau des microscopistes ») seront à l'avenir mobilisés avec l'appui des Départements concernés.

Principes de base et évolution de la microscopie électronique à balayage

Laurent MANIGUET, Francine ROUSSEL, Frédéric CHARLOT, Florence ROBAUT

Directeur du CMTC - Consortium des Moyens Technologiques Communs Institut Polytechnique de Grenoble – Grenoble Institut of Technology 1260 rue de la piscine - Bât. PHELMA - BP 75 - 38402 Saint Martin d'Hères Cedex

laurent.maniguet@cmtc.grenoble-inp.fr

La microscopie électronique à balayage (MEB ou « Scanning Electron Microscopy » SEM) est une technique puissante d'observation de la topographie des surfaces. Elle est fondée principalement sur la détection des signaux émergents de la surface sous l'impact d'un faisceau d'électrons qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur élevé et une grande profondeur de champ. Grâce aux progrès de la technologie, les microscopes électroniques à balayage ont beaucoup évolué depuis 1965, même si le principe de formation de l'image reste inchangé. Cette évolution est liée notamment au développement des microscopes à pression contrôlée ainsi qu'au développement des canons à effet de champ qui permettent d'améliorer considérablement la résolution même à basse tension, d'une nouvelle optique électronique, de nouveaux détecteurs et d'une multitude d'accessoires greffés sur le microscope qui offrent de nombreuses applications. Il n'y a plus d'architecture unique. Ces microscopes sont optimisés en fonction des applications recherchées et la réponse ou plutôt les réponses en matière de détection sont spécifiques à chaque instrument. Plus récemment, il est possible d'ajouter à la colonne électronique une colonne ionique qui ouvre encore de nouvelles perspectives vers des instruments multifaisceaux. Cet exposé introductif est consacré à des rappels généraux sur la microscopie électronique à balayage et ses évolutions.

Le MEB : des images en réponse à différents domaines d'applications

Isabelle ANSELME-BERTRAND
Brigitte GAILLARD-MARTINIE

CMES Faculté de médecine de St Etienne

Isabelle.Anselme.Bertrand@univ-st-etienne.fr

Plateau Technique de Microscopie INRA Clermont-Fd-Theix

brigitte.gaillard-martinie@clermont.inra.fr

La microscopie électronique à balayage se décline selon plusieurs modes d'observation en fonction de la configuration des équipements, des détecteurs utilisés et des équipements périphériques et accessoires disponibles.

Cette présentation va permettre de s'intéresser aux équipements ayant permis les observations : du plus ancien (SEM 505 Philips en détection électrons secondaires avec étage cryogénique Hexland) au plus récent (Quanta 200 Feg FEI) en passant par l'intermédiaire (S 3000 N Hitachi à pression contrôlée équipé d'un détecteur ESED et d'un détecteur BSE électrons rétro-diffusés) Différents types d'échantillons biologiques seront imagés (cultures de cellules, bactéries, échantillons végétaux ou agro-alimentaires...) tout en associant les protocoles employés. Pour certains exemples, plusieurs protocoles de préparation et différents modes d'observation auront été testés et comparés sur le même échantillon. D'autres auront été visualisés sur différentes machines avec le même protocole.

Pour la préparation des échantillons en mode haut vide dite classique, plusieurs techniques seront présentées : la déshydratation par contournement du point critique, par HMDS ou en employant des cryo-méthodes.

L'observation d'échantillons à l'état naturel sera illustrée avec le mode pression contrôlée ou avec le mode environnemental.

Applications dans le domaine animal : vers une complémentarité des techniques

Thierry ASTRUC

INRA de Clermont-Ferrand-Theix - Unité "Qualité des Produits Animaux"
63122 saint Genès Champanelle
thierry.astruc@clermont.inra.fr

La microscopie électronique à balayage (MEB) est utilisée de longue date pour caractériser la surface d'échantillons de différentes natures. Dans le secteur animal, cette technique est particulièrement adaptée à l'étude de petits organismes tels que bactéries, acariens ou encore larves et insectes de petite taille. L'excellente résolution du MEB permet de mettre en évidence des détails morphologiques impossible à caractériser par les techniques de microscopie optique (loupe binoculaire, microscope numérique). Divers exemples concrets seront présentés dans l'exposé. Le MEB, pourtant destiné à une imagerie de surface, est cependant utilisé pour caractériser la forme de cellules eucaryotes composant des tissus biologiques complexes. Nombre de cellules sanguines ont été analysées en MEB, permettant d'appréhender leur morphologie tridimensionnelle. La microscopie à balayage a également été utilisée pour caractériser et comprendre l'agencement de molécules fibreuses dans différents tissus biologiques tels le tissu musculaire, le tissu conjonctif ou encore le tissu osseux. Dans ce contexte, c'est la préparation de l'échantillon qui revêt une importance capitale. Il convient en effet de ne pas détériorer la structure interne des tissus dont les cellules seront observées en MEB. Certains auteurs ont développé des techniques de digestions sélectives qui donnent l'opportunité d'accéder aux composants cibles. Par exemple, la technique de digestion du tissu musculaire à la collagénase permet de séparer les fibres musculaires et par la suite d'observer leur structure tridimensionnelle en MEB. A l'inverse, un traitement à la soude solubilise les protéines contractiles pour ne conserver que le tissu conjonctif de soutien qui peut ensuite être observé en MEB (des exemples seront donnés). Le MEB a aussi permis de comprendre l'évolution structurale des viandes au cours des procédés de transformation (salage, cuisson, séchage ...) en vue d'améliorations des qualités des aliments carnés. Enfin, les nouvelles générations de MEB à pression contrôlée et environnementaux (ESEM) donnent la possibilité de suivre l'effet de traitements physico-chimiques (température, pH, force ionique...) sur l'évolution ultrastructurale du tissu de façon dynamique. Les connaissances apportées ont des applications aussi bien dans le secteur médical que dans le secteur agroalimentaire.

La microscopie électronique à balayage au sein d'une Plate-Forme : applications « trans-règles » en synergie avec d'autres techniques d'imagerie

**Aline BONNOTTE, Christine ARNOULD, Joël MICHEL,
Elodie NOIROT, Jeannine LHERMINIER**

INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne, BP 86510, F-21000 Dijon, France
jeannine.lherminier@dijon.inra.fr

Au sein d'une PF d'imagerie, les échantillons traités pour des observations en MEB sont très diversifiés : échantillons biologiques (tissus végétaux, cellules animales, levures, films bactériens) ou biopolymères (mélanges de protéines/polysaccharides avec ou sans micro-organismes, émulsions, poudres...). Il s'agit d'observations ultrastructurales (en haut vide, pression contrôlée, cryo-MEB) ou de détection de sites antigéniques en surface de cellules. Les informations obtenues sont indispensables à la compréhension des phénomènes structuraux au sein des échantillons. De plus, certains questionnements scientifiques requièrent l'obtention d'informations morphologiques ou de détections immunocytologiques associées à des aspects quantitatifs. La microscopie électronique à balayage apporte des données complémentaires des microscopie confocale à balayage laser ou électronique à transmission et participe ainsi à la caractérisation d'évènements tissulaires et cellulaires. Nous nous proposons d'illustrer ces différentes approches, principalement dans les domaines de l'Agroécologie, Goût, Nutrition, Santé, Biotechnologies alimentaires et nanomédecine. Nous mettrons en évidence la synergie ces multi-modalités de bio-imagerie permettant de visualiser, caractériser, identifier *in situ* des molécules d'intérêt et d'analyser les résultats ou signaux obtenus de manière quantitative.

Microscopie électronique à balayage appliqué à la microbiologie : exemple de complémentarité de techniques de microscopie

Isabelle BORNARD

INRA PACA – UR 407 Pathologie Végétale, domaine saint Maurice 84143 Montfavet
cedex

isabelle.bornard@avignon.inra.fr

Le MEB présent dans notre unité est un outil qui permet aux chercheurs travaillant dans le domaine de la microbiologie d'illustrer et de caractériser certaines souches microbiennes (forme et taille de spores de champignon, compétition entre un agent de lutte biologique et un agent pathogène sur plante...). Ce microscope est également utilisé dans le cadre de prestations externes pour des applications variées allant de la simple illustration (échantillons biologiques ou matériaux) à des études plus complètes. A titre d'exemple il a permis de vérifier l'effet de différents procédés mécaniques d'extraction d'huiles essentielles à partir de plantes aromatiques (lavande, basilic, romarin...) et de valider leur efficacité, en observant les différences à la surface des échantillons.

Mais on ne répond pas à toutes les questions scientifiques posées à l'aide de la microscopie électronique à balayage et souvent il est nécessaire de coupler ces observations avec d'autres approches d'imagerie ou d'analyse.

Par quelques exemples d'études réalisées dans le domaine de la microbiologie, nous verrons l'apport de la microscopie électronique à balayage et sa complémentarité avec la microscopie optique et la microscopie électronique à transmission, comme : l'effet de la lumière pulsée comme procédé de décontamination par inactivation de spores de bactéries, la caractérisation d'une souche du champignon *Botrytis cinerea* résistante à un antibiotique et l'étude de l'interaction direct entre un agent de protection biologique et un agent pathogène responsable de la Sclérotiniose qui est une maladie de la laitue.

La microscopie corrélative en biologie : méthodes et applications

A. MALLET¹, M. LELEK³, P. BOMME^{1*}, A. WEINER², A. SALLES^{1,4}, S. MOSTOWY², T. ROSE⁴, M.-C. PRÉVOST¹, C. ZIMMER³, P. COSSART², J. ENNIGA² S. SHORTE¹ & A. SARTORI¹

¹Imagopole, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris

²Department of Cell Biology and Infection, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris

³Computational Imaging and Modeling Unit, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris

⁴Department of Infection and Epidemiology, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris

perrine.bomme@pasteur.fr

Ces dernières années, la combinaison de différentes approches d'imageries, en particulier la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique, est devenu un challenge technologique. La microscopie corrélative ou CLEM (Correlative Light Electron Microscopy) permet de combiner les études ultrastructurales et les analyses cellulaires dynamiques et/ou fonctionnelles. De récentes avancées en microscopie optique, notamment grâce au développement des méthodes de super résolution, permet maintenant de contourner la limite de diffraction optique et d'atteindre des résolutions de 20nm. Bien que la microscopie à fluorescence permet d'atteindre des résolutions de plus en plus petites, ces méthodes sont limitées à l'observation de protéines fluorescentes et ne donne aucune indication quand à l'environnement cellulaire global d'où l'intérêt de corréliser ces données avec la microscopie électronique. *Shigella flexneri*, responsable d'infections intestinales spécifiquement humaines, est notre principal modèle pour mettre en place la microscopie corrélative au sein de la plateforme. Nous avons, grâce à la microscopie corrélative, étudié cette bactérie elle-même puis ces effets à l'échelle cellulaire. Pour ce faire, nous avons mis en place plusieurs outils et corrélé différents systèmes d'imagerie (FLM Fluorescent Light Microscope, STORM STochastic Optical Reconstruction Microscopy, SIM Structured Illumination Microscopy, SEM Scanning Electron Microscopy et FIB Focused Ion Beam).

Microanalyses par spectrométrie de rayons X en microscopie électronique à balayage

Christophe ROSE

INRA - UMR EEF 54280 Champenoux
rose@nancy.inra.fr

Le développement spécifique de spectromètres de rayons X couplés à un microscope électronique (à partir des années 1950) a permis en utilisant l'effet d'émission photonique, dû à l'interaction faisceau électronique-matière, de déterminer à une échelle microscopique la composition chimique élémentaire des échantillons.

Les principaux types de spectromètres actuellement sur le marché : spectromètre à sélection d'énergie (EDS) et spectromètre en dispersion de longueur d'onde (WDS) permettent des analyses spectrales sur une très large gamme d'éléments (bore jusqu'à l'uranium) avec des résolutions optimales de quelques dizaines de ppm (titres massiques) .

Les équipes de recherche en biologie ont, dès le début, développé des techniques de préparation d'échantillons pour pouvoir accéder à ces mesures particulièrement originales et précieuses.

A Nancy, l'arrivée d'un MEB à pression contrôlée et de deux spectromètres de microanalyse (EDS+WDS) nous a permis de développer des protocoles d'analyse spécifiques souvent automatisés et adaptés à de nombreux types d'échantillons biologiques

Microscopie à balayage à double faisceaux (FIB/SEM)

Bertrand VAN DE MOORTELE

Laboratoire de Géologie de Lyon, ENS de Lyon, Université de Lyon, France
bertrand.van.de.moortele@ens-lyon.fr

Depuis la fin des années 1970, les FIB à source gallium ont connu de nombreuses évolutions : ajout de micro-manipulateurs permettant la manipulation *in-situ* des objets ou de faire des mesures électriques, dépôt de gaz assisté aux ions permettant la réparation de circuits ou le collage d'objets, etc...Au milieu des années 1990, FEI ajouta au FIB une colonne électronique donnant naissance aux instruments à double faisceaux. Les surfaces préparées par FIB pouvaient être alors observées par faisceau électronique sans ajouter de défauts dans l'objet : la tomographie par FIB/SEM était née !

Après un rappel sur les principes de fonctionnement des sources à métal liquide (cas des sources Ga) nous passerons en revue les applications principales de ces appareils à double faisceaux : préparation de lame mince pour la microscopie électronique en transmission ou l'ebsd en transmission, nano-usinage, modification de circuits, tomographie FIB/SEM, EBSD-3D, EDS-3D, imagerie ionique, etc.