



HAL
open science

Apports du FIB pour des applications en biologie végétale

Didier Le Thiec

► **To cite this version:**

Didier Le Thiec. Apports du FIB pour des applications en biologie végétale. Réunion GNMEBA : Techniques associées à la microscopie électronique à balayage et Applications Biologiques, Nov 2006, Paris, France. 1 p. hal-02817659

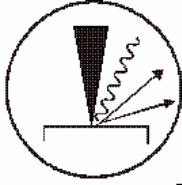
HAL Id: hal-02817659

<https://hal.inrae.fr/hal-02817659>

Submitted on 6 Jun 2020

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.



Techniques associées à la Microscopie Electronique à Balayage et Applications Biologiques

Jeudi 30 novembre 2006

Techniques associées à la Microscopie Electronique à Balayage

8h45 - 9h00 Accueil

9h00 - 9h40 **Micro-XRF excitation in an SEM - Dr Michel Haschke**

IfG – Institute for Scientific Instruments GmbH, Berlin, Germany

Electron microscopes are often used for position sensitive elemental analysis of non-homogeneous material by x-ray fluorescence. Due to the high spectral background this method is limited in sensitivity. The availability of x-ray optics allows the generation of focussed x-ray beams with spot sizes in the range of tens of μm . X-ray excited spectra have no bremsstrahlung background and therefore a better peak-to-background ratio and allow a higher sensitivity for trace analysis. The excitation efficiency for both electrons and photons varies with the atomic number. Therefore light elements can be analysed better with electron excitation but heavy elements better with x-ray excitation. The combination of analytical results from electron and x-ray excitation therefore improves the accuracy of quantification.

Further the information depth for x-ray excitation is larger due to less absorption. This opens the possibility to examine systems of thick or multiple layers.

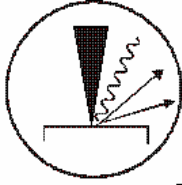
The paper presents a μ -XRF excitation unit as option for SEM's. Some applications for this excitation are described. A special quantification model is prepared for this device that allows a standardless quantification and the combination of both EPMA and XRF results. This procedure is demonstrated for few samples. The results show a good accuracy for a standardless quantification. In case of light elements like C, O or N the XRF results can be improved by consideration of results from EPMA.

9h40 - 10h15 **Essais in situ en Microscopie Electronique à Balayage, Intérêts et limitations – Eva Héripé *, Jérôme Crépin**

LMS, CNRS 7649, Département de Mécanique, Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex

** adresse actuelle : CdM, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, Evry*

Le développement des mesures de champs cinématiques au court de la dernière décennie permet dorénavant d'appréhender le comportement mécanique des matériaux à la fois à l'échelle de leur volume élémentaire représentatif, qui est de l'ordre du millimètre carré pour un polycristal constitué de grains, dont la taille est de l'ordre de la dizaine de microns, mais aussi d'obtenir des mesures de champs locaux intragranulaires, puisque définies sur



une base de mesure de quelques micromètres. Cette analyse multi-échelle permet donc d'obtenir, en une seule expérimentation, des données statistiques du comportement du matériau tout en caractérisant les portées de ses hétérogénéités. Ces mesures mécaniques peuvent de plus être reliées à une caractérisation microstructurale du matériau via, par exemple, des analyses de champs d'orientation cristallographique à l'aide de l'EBSD ou des cartographies de composition chimique dans le cas de matériaux multiphasés. L'ensemble de ces données, tant microstructurales que cinématiques servent ensuite d'éléments de base dans le cadre de simulations numériques par éléments finis, dont l'objectif peut être l'identification des paramètres de lois de comportement. Les mesures de champs cinématiques correspondant alors aux conditions aux limites imposées aux contours du maillage de la simulation.

Toutefois, une des limitations de cette démarche réside dans le côté discret de la mesure de champ cinématique, qui nécessite, pour avoir un bon rapport signal sur bruit, une durée d'acquisition des images de l'ordre du quart d'heure. Cette durée est incompatible avec un enregistrement continu de l'essai mécanique. Il nous faut donc reconstruire l'évolution du champ cinématique au cours du temps. L'exposé permettra notamment de mettre en évidence qu'une linéarisation de cette évolution peut conduire à l'introduction de composantes non réalistes du tenseur des contraintes

10h15 – 10h45 Caractérisation automatique des inclusions par un système MEB-EDS piloté par analyse d'images – Eric Hénault

Ascométal CREAS, Groupe Lucchini

La description des populations inclusionnaires dans les produits sidérurgiques est réalisée de manière très fréquente, selon de nombreuses méthodes différentes, basées sur des normes ou des spécifications internes ou de clients. L'utilisation de l'analyse d'images peut être un atout important, grâce à l'automatisation de la méthode, au gain de temps généré et/ou à la meilleure précision de la mesure.

Un système a été mis au point au CREAS pour caractériser automatiquement les inclusions observées sur des plans polis d'échantillons d'acier. Un exemple est donné dans le cas d'une nuance d'acier pour laquelle la connaissance de la répartition et des caractéristiques des différentes populations inclusionnaires permettent d'estimer les propriétés d'usage de la matière.

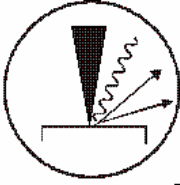
Présentation du système

Bien que les constructeurs de systèmes d'analyse EDS proposent des applications clés-en-main pilotant le système, celles-ci sont peu adaptables à une méthodologie différente de celle qui est définie en standard et l'automatisation est souvent très limitée.

Pour avoir une application logicielle à la fois totalement automatique et évolutive, il a été nécessaire de la concevoir à partir des éléments indispensables à l'obtention des données à analyser (microscope électronique et analyseur EDS) et au traitement et à l'analyse de ces données (logiciel d'analyse d'images).

Le système souhaité devait être capable de contrôler le déplacement de l'échantillon, de sélectionner le détecteur, de réguler l'intensité des images, de définir la vitesse de balayage, de récupérer les images provenant des différents détecteurs (SEI, BEI) et le spectre des raies atomiques.

Une interface au JEOL JSM-6500F et à l'analyseur PGT Spirit a été développée par la société ADCIS et intégrée au logiciel de traitement et d'analyse d'image Aphelion sous



forme de composants ActiveX afin de rendre les fonctions de contrôle du système MEB-EDS appelables depuis tout programme Visual C++ ou Visual Basic.

Présentation de l'application "Caractérisation des populations inclusionnaires"

Suivant les besoins des études, des mesures sont effectuées sur des temps pouvant dépasser quelques dizaines d'heures sans aucune intervention humaine. Quelles que soient les conditions d'observation et d'analyse, plus de 100 inclusions peuvent être caractérisées par heures, ce qui peut représenter à titre d'exemple environ 2000 images traitées pour une densité de 0,5 inclusion/mm². Sur chaque inclusion, les données morphologiques et analytiques sont sauvegardées dans un fichier de résultats qui est ensuite post-traité en fonction des besoins.

Une application est présentée sur une nuance contenant des inclusions dont la nature chimique, la densité, la taille et la répartition favorisent les opérations d'usinage en limitant l'usure des outils.

La méthode développée permet de distinguer précisément les phases de sulfure et d'oxyde. Elle fournit des données sur la nature chimique des oxydes et des sulfures.

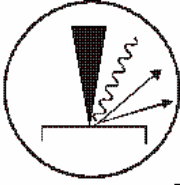
L'échantillon est observé à un grossissement de balayage qui permet de détecter les inclusions de taille supérieure à 3 microns. Le grossissement est choisi de manière à observer une surface suffisante dans un temps raisonnable. Les mesures morphologiques et chimiques sont ensuite réalisées à un grossissement supérieur.

Conclusion sur les résultats obtenus

Les possibilités d'automatisation du système de microscopie électronique à balayage et de son système d'analyse EDS nous ont permis de mettre en place un logiciel très complet de caractérisation inclusionnaire. Les méthodes de cotation sont ainsi adaptées aux produits à qualifier.

L'utilisation du système de manière automatique permet d'obtenir de nombreux résultats statistiquement exploitables et une utilisation beaucoup plus importante (en temps) du microscope.

- 10h45 - 10h50** **Annnonce concernant la réunion de décembre 2007 – Luc Beaunier**
- 10h50 - 13h45** **Rencontres techniques et pause-café & lunch offerts aux adhérents par les constructeurs et le GN-MEBA**
- 14h00 - 15h00** **Assemblée Générale du GN-MEBA**
- 15h00 - 15h10** **Intervention de *Hélène Maury***
- 15h10 - 15h15** **Remise du prix MAS « Castaing Award » à Mlle Hélène Maury par *R. Gauvin***

**15h15 - 16h00 Optique ionique: principes et applications - Tom Wirtz**

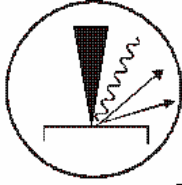
*Département Science et Analyse des Matériaux - Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann
41, rue du Brill, L-4422 Belvaux - Luxembourg*

Les principes de l'optique des particules chargées sont analogues à ceux de l'optique classique. Ce papier passe en revue les principes les plus importants de l'optique classique (éléments cardinaux, construction d'image, aberrations, ...) pour faire le lien avec l'optique des particules chargées. Ensuite, les propriétés et champs d'application des éléments optiques les plus courants (lentille, déflecteur, secteur magnétique, secteur électrostatique, ...) sont discutés.

Pour illustrer les applications des éléments optiques mentionnés, nous étudions le cas concret d'un canon à ions en détaillant les rôles des différents composants.

16h00 - 16h30 Pause**16h30 – 17h30 La microlithographie , le FIB et ses applications – Thierry Fournier**

CNRS Grenoble



Vendredi 1^{er} décembre 2006
Applications biologiques

9h00 – 9h35 Apports du FIB pour des applications en biologie végétale - Didier Le Thiec

*INRA- Département EFPA- UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières
IFR 110 Génomique, Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelle 54280 Champenoux
lethiec@nancy.inra.fr*

Que ce soit en génomique ou en écophysiologie, la diversité entre tissus masque souvent les réponses pertinentes que nous nous posons. La grande diversité des profils d'expression de gènes obtenue avec des analyses classiques à l'échelle de l'organe et les récents progrès de la génomique ont permis d'identifier des gènes exprimés de façon différentielle entre arbres soumis à un stress ou non. De même, des transcrits différentiellement exprimés peuvent être identifiés entre différents génotypes placés en conditions de culture optimales.

Mais ces études bien qu'aidant à la compréhension générale des réponses des plantes à un stress ne renseignent pas sur la réponse catégorielle intercellulaire des composants clés que ce soit au niveau génomique ou protéomique. C'est pourquoi des microméthodes sont devenues essentielles pour élucider des processus physiologiques de cellules spécialisées ou même de compartiments subcellulaires que ce soit en biologie moléculaire, en biochimie, ou en biophysique. L'utilisation d'outils mécaniques pour séparer manuellement les cellules intéressantes à partir de coupes histologiques est un processus long qui demande des manipulations fastidieuses. Aucune de ces méthodes n'offre la facilité, la précision, et l'efficacité nécessaires pour une étude moléculaire moderne.

Depuis quelques années, une méthode, la Laser Capture Microdissection (LCM) offre, aux laboratoires de recherche et d'anatomie pathologique, une avancée technologique pour la microdissection. Mais cette méthode présente quelques inconvénients comme son coût, la préparation de l'échantillon sur lame mince qui rend une grande partie de l'ADN ou des ARNm non-extractible et de qualité moindre ainsi que la difficulté de son utilisation chez les plantes (la double paroi pectocellulosique étant très rigide).

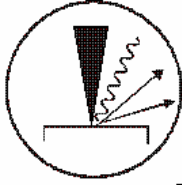
Dans cet exposé, nous allons montrer quelques découpes de cellules végétales en utilisant un FIB. De même nous montrerons quelques exemples de couplage FIB et spectromètre de masse afin d'analyser certains isotopes.

9h35 – 10h10 NanoSIMS et biologie - Jean-Luc Guerquin-Kern

*INSERM U759/Institut Curie Recherche, Lab. de Microscopie Ionique, 91405 Orsay Cedex.)
Courriel : Jean-Luc.Guerquin-Kern@curie.u-psud.fr*

Basée sur l'émission de particules secondaires sous l'effet du bombardement de la surface d'un échantillon solide par un faisceau d'ions primaires, les techniques SIMS permettent une analyse chimique locale. Très répandues dans les domaines des Sciences des Matériaux et des Sciences de la Terre, ces techniques restent en revanche encore mal connues et peu utilisées dans le domaine des Sciences du Vivant. Ce domaine offre toutefois un fort potentiel d'applications pour l'identification, la localisation et la quantification intracellulaires d'éléments chimiques.

Le NanoSIMS-50 correspond à la dernière génération des microsondes ioniques fonctionnant sur un processus d'émission dynamique (doses d'ions primaires > à 1013 ions



par cm²). Equipée d'un système multidétection permettant les cartographies simultanées de cinq éléments avec une résolution spatiale d'environ 100nm, cette microsonde est principalement utilisée dans notre laboratoire pour l'étude d'échantillons biologiques au niveau sub-cellulaire. A travers quelques exemples, recouvrant trois axes principaux d'application: i) la pharmacologie antitumorale, ii) la bio-minéralisation, iii) l'analyse isotopique nous soulignerons les potentialités de cette méthode de micro-analyse permettant une détection de la plupart des éléments et de leurs isotopes, sans recours à aucune molécule de marquage spécifique (fluorescence ou radioactive)

10h10 - 10h45 Nouvelles applications biologiques du TOF-SIMS avec les sources d'ions polyatomiques - Alain Brunelle

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif sur Yvette

Les techniques d'imagerie biologique par spectrométrie de masse connaissent actuellement un essor important. En particulier, l'imagerie TOF-SIMS connaît un regain d'intérêt dans le domaine biologique grâce à son couplage avec les sources d'ions agrégats d'or et surtout de bismuth (Bi³⁺). La grande augmentation de sensibilité qu'apportent de tels faisceaux d'ions fait que des expériences d'imagerie par spectrométrie de masse sont maintenant réalisées directement sur des coupes tissulaires avec des résolutions latérales de l'ordre du micron.

L'intérêt de cette technique, outre la sensibilité et la résolution spatiale, réside dans le fait qu'elles permettent d'enregistrer simultanément un grand nombre d'images correspondant chacune à une molécule donnée, et donc de corrélérer leur répartition spatiale et leur signification biologique. Après une description des différents instruments existants, des exemples seront donnés, comme l'étude de coupes de patte de souris modèles de la myopathie de Duchenne, l'analyse de biopsies cutanées de patients atteints de la maladie de Fabry, ou l'analyse d'échantillons archéologiques.

10h45 – 11h15 Pause

11h15 – 11h50 L'organisation d'un centre commun de Microscopie. Mise en place de la démarche qualité - Brigitte Gaillard-Martinie

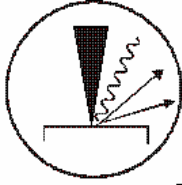
INRA CR de Clermont-Fd-Theix, Plateau Technique de Microscopie Electronique - 63122 St Genès Champanelle

Email : martinie@clermont.inra.fr

Comme Mr Jourdain qui faisait de la prose sans le savoir, nous travaillons déjà avec des éléments de la qualité sans le savoir. C'est à partir de ce constat que nous avons été sensibilisés à la démarche qualité et qu'au sein du Réseau des Centres Communs de Microscopie (RCCM) un groupe de travail s'est constitué dans ce domaine.

La réflexion de ce groupe a permis de créer une dynamique de travail puisque nous parlions tous le même langage et que nous étions confrontés au même type d'analyse : traiter un échantillon biologique pour son observation en microscopie électronique. Nous avons tous des utilisateurs ou clients internes ou externes à notre structure et les étapes pour parvenir à un résultat étaient identiques.

Dans cette optique, ce groupe a élaboré un certain nombre de documents facilement utilisables et s'est doté récemment d'un sous-groupe « prévention » de manière à intégrer parallèlement les consignes d'hygiène et sécurité



11h50 - 13h50 Déjeuner libre

13h50 – 14h25 Observation des effets antibactériens d’huiles essentielles (HE) chémotypées en microscopie électronique à balayage - Laurence Mayaud

*L. Mayaud¹, I. Anselme-Bertrand², A. Carricajo¹, A. Zhiri³, G. Aubert¹
1 Laboratoire de Bacteriology, CHU Hôpital de Bellevue, 42055, Saint-Etienne France
2 CMES – Faculté de Médecine – Saint-Etienne
3 Pranarom International S.A., B-7822 Ghislenghien, Belgique*

L'émergence de résistance bactérienne aux antibiotiques et aux antiseptiques est de plus en plus préoccupante dans les hôpitaux. Nous avons démontré une activité bactériostatique et bactéricide de nouvelles molécules, les huiles essentielles (HE), avec des techniques de microbiologie sur des bactéries présentant des différents niveaux de résistance aux antibiotiques. Par la technique de cinétique de bactéricidie nous avons observé une bactéricide (diminution de 5 log de l'inoculum bactérien) en moins d'une heure de 5 HE. Afin d'observer l'effet sur 3 souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*) de l'HE la plus active en bactéricidie (Cannelle écorce) nous avons entrepris une observation en microscopie électronique à balayage, avant et après traitement par l'HE.

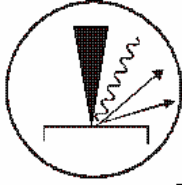
14h25 – 15h00 Tomographie électronique: principes et applications – Cedric Messaoudi, Thomas Boudier, Sergio Marco

*Institut Curie/INSERM U759 Centre Universitaire d'Orsay. Bât 112, 91405 Orsay CEDEX -
cedric.messaoudi@curie.u-psud.fr*

La tomographie électronique est en train de devenir un outil incontournable dans l'étude des structures biologiques souscellulaires. Cette méthode permet de calculer des reconstructions tridimensionnelles (3D) depuis les projections d'un objet individuel enregistrées à plusieurs angles d'inclinaison dans le microscope électronique [1]. Récemment, des techniques tomographiques de reconstruction ont été combinées à la filtration en perte d'énergie dans une nouvelle approche structurale dénotée "energy filtering transmission electron tomography" (EFTET). Cette approche permet d'analyser la distribution 3D des éléments chimiques [2,3,4]. Ainsi, des informations concernant la distribution de fer dans les bactéries magnétotactiques [5,6] ont été obtenues, la distribution de nanoparticules d'oxyde de fer dans les noeuds lymphoïdes de rat [7] a pu être analysée.

Dans ce contexte, des nouvelles approches méthodologiques pour améliorer les résultats obtenus par la tomographie électronique sont en fort développement. D'abord, pour améliorer la qualité des images enregistrées, les méthodes de cryo-microscopie permettent une meilleure conservation des échantillons biologiques. En second lieu, les nouveaux algorithmes pour l'alignement de volume rendent possible de combiner plusieurs volumes d'un spécimen acquis à différentes orientations et d'augmenter ainsi la résolution finale du volume. Finalement, dans le cas de l'EFTET, le développement d'algorithmes pour la soustraction du bruit de fond en 3D rend possible l'obtention de cartes élémentaires des éléments ayant des valeurs de perte d'énergie supérieures à 400eV, tels que l'oxygène et le fer.

Les principes de la tomographie électronique, ainsi que les nouvelles approches pour l'observation d'échantillons, l'alignement des volumes et l'EFTET seront illustrés par plusieurs exemples biologiques.


Références

- [1] Frank, J. 1992. Electron tomography. Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope. Plenum Press. New York
- [2] Thomas J.M. and Midgley P.A. 2004. High-resolution transmission electron microscopy. The ultimate nanoanalytical technique. Chem Commun (Camb). 7:1253-1267.
- [3] Thomas J.M., Midgley P.A., Yates T.J., Barnard J.S., Raja R., Arslan I., Weyland M. 2004. The Chemical Application of High-Resolution Electron Tomography: Bright Field or Dark Field? Angew Chem Int Ed Engl. 43(48):6745-7.
- [4] Boudier T, Lechaire JP, Frebourg G, Messaoudi C, Mory C, Colliex C, Gaill F, Marco S. 2005. A public software for energy filtering transmission electron tomography (EFTET-J): application to the study of granular inclusions in bacteria from *Riftia pachyptila*. J Struct Biol. 151(2):151-9.
- [5] Weyland, M., and Midgley, P.A. 2003 Extending energy-filtered transmission electron microscopy (EFTEM) into three dimensions using electron tomography. Microsc Microanal 9: 542-555.
- [6] Scheffel A, Gruska M, Faivre D, Linaoudis A, Plitzko JM, Schuler D. 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. Nature. 440(7080):110-4.
- [7] Bordat, C., Sich, M., Rety, F., Bouet, O., Cournot, G., Cuenod, C.A., and Clement, O. 2000 Distribution of iron oxide nanoparticles in rat lymph nodes studied using electron energy loss spectroscopy (EELS) and electron spectroscopic imaging (ESI). J Magn Reson Imaging 12: 505-509.

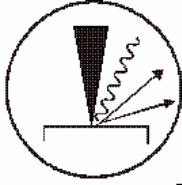
15h00 – 15h35 Pause

15h35 – 16h10 **Corrélation entre la microscopie à fluorescence et la cryo-tomographie électronique en conditions cryogéniques: études structurales et morphologiques de cellules intactes - Anna Sartori**

Max Planck Institute of Biochemistry, Dept. of Structural Biology, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, GERMANY- sartori@biochem.mpg.de

La cryo-tomographie électronique (cryo-ET) d'échantillons biologiques congelés, hydratés et cultivés sur des grilles de microscopie électronique est une puissante technique pour l'étude quasi in vivo de structures cellulaires avec résolution sur l'échelle nanométrique [1]. Un inconvénient majeur de cette technique est lié à la difficulté de localiser et d'identifier sans ambiguïté les structures d'intérêt sur un échantillon congelé dans la glace amorphe. En établissant une corrélation directe entre la cryo-microscopie à fluorescence et la cryo-microscopie électronique (cryo-EM), nous proposons une méthode efficace pour franchir ces limites, en prospectant une nouvelle direction pour un large spectre de nouvelles applications. Notre conception de microscopie de corrélation se base sur la possibilité d'identifier et de déterminer la position de structures marquées à fluorescence sur des échantillons vitrifiés directement sur les grilles de microscopie électronique (grilles TEM) en utilisant la cryo-microscopie à fluorescence, et la récupération de ces positions pendant la subséquente analyse par cryo-EM [2].

L'entière grille vitrifiée peut être visualisée et imagée en épifluorescence en conditions cryogéniques grâce à un nouveau « cryo-holder » fait maison pour grilles TEM, adapté à un microscope à lumière inversé (Zeiss Aviovert 200 M) avec des objectives à longue distance (grossissement 20X et 40X). Le cryo-holder est conçu pour maintenir l'échantillon à la température de l'azote liquide (LN2) et est efficacement isolé de l'ambiance externe de façon à empêcher des indésirables gradients de température ou la contamination de l'échantillon pendant l'analyse. Les coordonnées absolues de la zone d'intérêt sur la grille peuvent être déterminées et enregistrées en cryo-microscopie à lumière et récupérées directement dans le microscope électronique avec un programme basée sur le software MatLab et intégré dans le TOM toolbox [3].



Des cellules de neuroblastoma (NG108-15) marquées à fluorescence et cultivées sur des grilles TEM ont été congelées dans de la glace amorphe et utilisées avec succès pour des premières études. Dans le cas d'échantillons minces, qui conviennent à la cryo-tomographie électronique (où l'épaisseur de la glace amorphe ne dépasse pas les 200-400 nm), la résolution est comparable aux analyses en solution tampon. Le 'blurring' du signal en fluorescence et la diminution en résolution sont directement liés à l'épaisseur de la glace, qui peut être estimée à travers des mesures de lumière en transmission.

Nos actuelles applications comprennent le marquage et l'immuno-marquage de molécules extra-cellulaires dans des cellules vivantes avec des anticorps conjugués à des marqueurs fluorescents et à de l'or colloïdal ou à des Quantum Dots [4], qui sont des candidats idéaux pour la microscopie corrélative grâce à leur caractéristiques soit fluorescentes que denses électroniquement, ce qui permet la visualisation et le ciblage du marqueur soit avec la cryo-microscopie à fluorescence que avec la cryo-EM et surtout avec la cryo-tomographie électronique.

Nous nous focalisons d'un côté sur l'étude structurel de l'organisation de l'actine dans les fibres retraitantes des cultures primaires de keratinocytes. De l'autre côté, nous nous concentrons sur la localisation de terminaux pre- et post-synaptiques dans des cultures neuronales vivantes d'hippocampe de rat [5] et sur l'étude de l'organisation du cytosquelette dans les neurites de cellules NG108-15.

Références

- [1] W. Baumeister, *Biol. Chem.*, 385 (2004) 865-872.
- [2] A. Sartori et al., submitted to *J. Struct. Biol.* (2006).
- [3] S. Nickell et al., *J. Struct. Biol.*, 149 (2005) 227-234.
- [4] D. R. Larson et al., *Science*, 300 (2003) 1434-1436.
- [5] V. Lucic et al., submitted to *J. Struct. Biol.* (2006).
- [6] This project is supported by the Deutsche Forschungsgesellschaft (SFB 563) and by the EU network 3DEM.

16h10 – 16h45 Microscopie multiphotonique: principes et applications - Anne Colonna

L'Oréal Recherche

Les microscopes confocaux à balayage laser ont permis des avancées majeures dans les techniques d'imagerie tri-dimensionnelle. La microscopie confocale de fluorescence classique a permis de remplacer le découpage physique des échantillons par un découpage optique. Cependant elle se heurte aujourd'hui à des limitations liées à la nature même des tissus étudiés : les propriétés d'absorption et de diffusion des tissus limitent la profondeur de pénétration du faisceau excitateur.

L'arrivée de la microscopie multiphotonique a permis de repousser les limites de l'imagerie optique conventionnelle. Cette technologie, qui découle de la découverte des effets non-linéaires, permet d'augmenter sensiblement l'épaisseur observable en microscopie de fluorescence classique, grâce à l'utilisation de photons de plus faible énergie. Elle donne accès à une imagerie fonctionnelle tri-dimensionnelle des tissus épais et de cellules, et cela au niveau de régions profondes d'échantillons dans des contextes proches des conditions physiologiques (photodégradation limitée et excitation de sources de contrastes endogènes).

Après un rappel du principe de la microscopie multiphotonique, les principales applications de cette technologie chez L'Oréal seront exposées.

....Fin....