

Les trois réseaux technologiques de la
Mission pour l'Interdisciplinarité du CNRS
RTMFM, RéMiSoL, RCCM
organisent une

Journée thématique Repositionnement-Relocalisation

Mercredi 29 Juin 2016 de 9h30 à 17h30

*Institut Pasteur, Amphithéâtre François Jacob
28 Rue du Docteur Roux,
75 015 Paris*

*Inscription gratuite et obligatoire à partir du 9 Mai sur
<http://jtreposition.sciencesconf.org/>
Soumission des résumés avant le 29 Mai*

Programme Prévisionnel Conférences et tables-rondes

Préparation des échantillons

Christopher Peddie

CRUK, London Research Institute

Supports et repères

Anna Sartori

Institut Pasteur, Paris

Techniques de couplage

Yannick Anguy

ENSAM, Bordeaux

Traitement des images

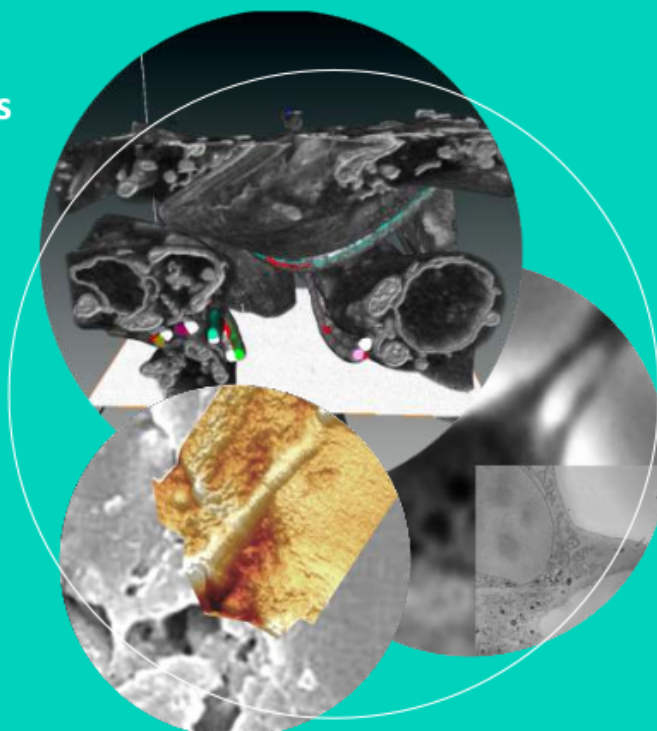
Maïtine Bergounioux

Université d'Orléans

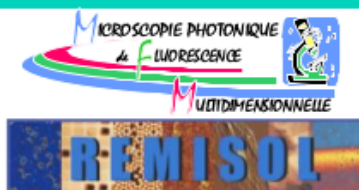
Repositionnement multi-échelle

Luc Arnold

OHP, Saint-Michel-l'Observatoire



Contact : gt_repositionnement@services.cnrs.fr



3 réseaux de microscopie (RTMFM, RCCM et REMISOL) de la Mission pour l'Interdisciplinarité du CNRS se regroupent pour **une journée thématique sur le repositionnement et/ou la relocalisation d'échantillons.**

9:30 – 9:45 Accueil des participants

Conférences (9:30 – 12:30)

9:45 – 10:00	Introduction de la journée et de la problématique du repositionnement au travers d'un exemple d'analyse en microscopie multi échelle et multimodale	Frédéric FOUCHER (Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans)
10:00 – 10:30	Sample preparation for integrated light and electron microscopy,	Christopher PEDDIE (CRUK, London Research Institute, Londres)
10:30 – 11:00	Utilisation des supports avec repères pour faciliter le repositionnement	Anna SARTORI (Institut Pasteur, Paris)
11:00 – 11:30	Application du couplage MEB/spectroscopie Raman à quelques matériaux industriels et naturels	Yannick ANGUY (ENSAM, Bordeaux)
11:30 – 12:00	Traitement des images en vue de leur recalage/repositionnement	Maitine BERGOUNIOUX (Université d'Orléans)
12:00 – 12:15	Repositionnement en astronomie	Luc Arnold (OHP, St-Michel-L'Observatoire)

Pause déjeuner (12:15 – 13:30)

Tables rondes "Trucs et Astuces" sur 3 thèmes (13:30 – 16:30)

1. Repères sur le support ou sur l'échantillon
2. Repositionnement de l'échantillon en microscopie multi échelle ou multimodale, techniques couplées ou non
3. Traitement des images pour leur recalage/repositionnement

Clôture de la journée, perspective du GT sur le repositionnement, I. Paintrand et F. Foucher (17:15 – 17:30)

Introduction de la journée et de la problématique du repositionnement au travers d'un exemple d'analyse en microscopie multi-échelle et multimodale¹²

Frédéric Foucher (RéMiSoL), Jean-François Bergamini (RéMiSoL), Astrid Canivet (RTMFM), Isabelle Gillot (RTMFM), Lorena Klein (RéMiSoL), Adeline Mallet (RCCM), et Isabelle Paintrand (RCCM, RTMFM)

L'augmentation constante du nombre de techniques d'imagerie et d'analyse permet maintenant d'obtenir une multitude d'informations complémentaires pour caractériser un échantillon (topographie, microstructure, composition élémentaires, composition moléculaire, cristallographie...). Cependant, la spécificité d'un objet peut impliquer de devoir obtenir toutes les informations sur une seule et même structure, et à différentes échelles. C'est alors qu'interviennent les problèmes de repositionnement et de relocalisation.

Le **repositionnement** consiste à replacer un objet dans un système de manière reproductible puis à le bouger à l'aide d'une platine de déplacement afin de retrouver une zone particulière déjà étudiée. Il permet de passer d'une technique à une autre sur les systèmes couplant plusieurs méthodes d'analyse. Il peut également être utilisé pour réaliser des analyses sur différents instruments disposant d'une platine calibrée à condition d'avoir préalablement défini un système de coordonnées XY(Z), à partir d'un coin de l'échantillon par exemple. Enfin, il peut être utilisé pour compenser une dérive thermique ou mécanique et rester sur la structure d'intérêt tout au long de l'analyse (repositionnement continu). Malheureusement, le repositionnement n'est pas toujours possible pour des raisons instrumentales ou parce que l'on cherche à identifier une structure particulière n'ayant pas encore été observée sur l'échantillon étudié. L'approche générale consiste alors à réaliser des images à différentes échelles de façon à disposer de zones de recouvrement suffisamment larges pour pouvoir reconnaître la zone d'intérêt à partir de structures caractéristiques originelles (trous, fissures...) ou artificielles (gravures, traits de feutre...). On parle alors de **relocalisation**. Pour faciliter la reconnaissance ou pour additionner des données, il peut être utile de superposer les images obtenues pour les recaler les unes par rapport aux autres en les redimensionnant, en les faisant pivoter, voir en les déformant. Ce recalage d'images peut également être utilisé pour le repositionnement continu.

A noter que ces problèmes ne sont pas spécifiques aux techniques de microscopies ; on les retrouve dans tous les domaines, depuis l'analyse moléculaire jusqu'à l'astronomie.

Lors de cet exposé, l'exemple sera donné de l'étude de microfossiles inclus dans des roches à l'aide de nombreuses techniques d'observation (appareil photo, microscope optique, AFM, MEB...) et d'analyse (spectroscopie Raman, EDX...) depuis l'échelle de l'affleurement (km) jusqu'à l'échelle micrométrique. Il est alors indispensable de pouvoir relocaliser avec précision une structure donnée afin de la replacer dans un contexte global comme local.

Sample preparation for integrated light and electron microscopy

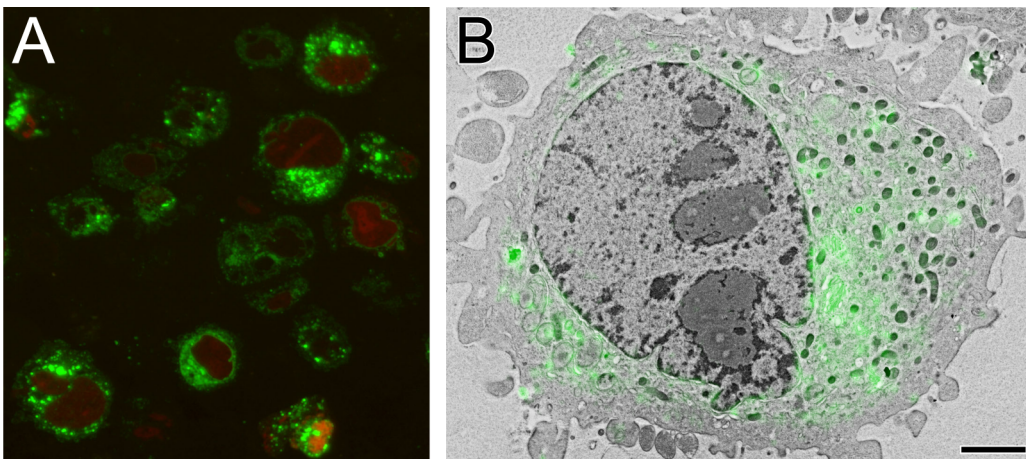
Christopher Peddie

Electron Microscopy STP, The Francis Crick Institute, London

Fluorescence microscopy is a fundamental tool in cell biology and provides powerful functional protein localisation data. For a complete understanding of cellular function however, the provision of structural context is crucial. Electron microscopy can provide this ultrastructural information, where the inherent resolution limit of light is no longer a problem. Indeed, protein localisation can itself be studied directly by electron microscopy using a variety of established immunolabelling techniques, each of which has its own merits; but, these methods are ultimately restricted by structural compromises and the availability of suitable antisera.

Correlative light and electron microscopy techniques allow direct translation of functional protein localisation data onto a detailed backdrop of cellular architecture. However, the disconnection between imaging modalities and requirement for complex intermediate specimen preparation steps present significant limitations. With the recent development of integrated light and electron microscopes, a revolution in correlative techniques is underway, and these instruments have the potential to increase the speed and precision of correlative experiments, whilst simultaneously widening accessibility.

Despite this, routine procedures for preserving fluorophores in specimens compatible with the vacuum of the electron microscope were until recently falling behind the rapidly moving technological front line. We have developed a protocol to preserve cloned fluorophores in cells and tissues embedded in resin with sufficient contrast for electron imaging, and have shown that several fluorophores are stable and active in resin-embedded cells in the vacuum of integrated light and electron microscopes. Here, I will outline our sample preparation method, and briefly discuss how super-resolution light microscopy and 3D electron microscopy will be integrated into future imaging workflows.



A: Light microscopy of GFP-C1 and mCherry-H2B in a 70 nm HM20 section using a widefield epifluorescence light microscope. **B:** Electron micrograph with overlaid GFP-C1 signal acquired from a 200 nm HM20 section using the SECOM integrated light and scanning electron microscope. The fluorescent signal corresponds to the nuclear envelope and nucleoplasmic reticulum, and other membranous structures within the cytoplasm including Golgi stacks and endoplasmic reticulum. Scale bar - 2 μ m.

Use of sample supports with landmarks to facilitate re-localisation

Anna Sartori
(Ultrapole / institut Pasteur)

Re-localisation of a fluorescently labelled structure of interest in the electron microscope is a key point of correlative light and electron microscopy methods. In this talk I will present different kind of supports with markers that we use in our lab in order to perform correlative light and electron microscopy, both at room temperature and in cryo-conditions. Markers on sample supports are usually used as prominent landmarks to align low magnification fluorescent-light and electron microscopy images of the object of interest with an intermediate spatial precision (~500 nm to a few μm). For a more accurate image registration recently published methods introduce the use of fluorescent nanobeads (50-200 nm in size) that can be detected in both imaging modes and used as landmarks to obtain a higher localisation accuracy (~ 50 nm). In my presentation I will discuss the implementation of these methods and its connection to the SerialEM (Boulder lab) open-source software for image registration and acquisition in 2 and 3D.

Application du couplage MEB / spectroscopie Raman à quelques matériaux industriels et naturels

Anguy Y⁽¹⁾, Gaborieau C⁽¹⁾, Verdet C⁽¹⁾, Battaglia J-L⁽¹⁾, Kusiak A⁽¹⁾, Sirieux C⁽¹⁾, Riss J⁽¹⁾, Souley Issiakou M⁽¹⁾, Fabre R⁽¹⁾, Saiyouri N⁽¹⁾, Longo M⁽²⁾, Sommier A⁽¹⁾ et Pradère C⁽¹⁾

(1) Institut de Mécanique et d'Ingénierie de Bordeaux – I2M, UMR CNRS 5295, Esplanade de Arts et Métiers, 33405 Talence cedex..

(2) Laboratorio MDM, IMM-CNR, Unità di Agrate Brianza, Via C. Olivetti 2, 20864 Agrate Brianza, (MB), Italie.

Notre communication porte sur l'utilisation conjointe de la spectroscopie optique et de sondes électroniques. On s'intéresse en particulier au couplage spectroscopie Raman / MEB / EDS / WDS. L'exposé débute par une courte présentation de la diffusion Raman complétée par quelques aspects technologiques sur l'interface permettant d'acquérir la diffusion Raman dans un MEB. L'intérêt de ce couplage original est ensuite illustré par quelques applications traitées au sein de notre institut de mécaniciens et de thermiciens.

La première application relève de la microélectronique et a été l'objet du Programme Européen SYNAPSE (*Synthesis and functionality of chalcogenide Nanostructures for Phase change memories*) portant sur le développement de nouvelles générations de nano mémoires à changement de phase. Les mémoires incriminées sont des alliages chalcogènes $\text{In}_3\text{Sb}_7\text{Te}_2$, déposés par MOCVD (*Metal Organic Chemical Vapor Deposition*) sous forme de nanofilms sur un substrat Si / SiO_2 . Dans cette application, les caractéristiques de l'alliage mises à profit sont (1) un fort changement de résistivité électrique entre le matériau déposé (sous forme polycristalline et/ou amorphe) et sa forme cristalline à l'issue d'une chauffe au-delà de sa température de cristallisation et (2) une conductivité thermique qui reste faible. Ces deux propriétés physiques fonction de la température ont été mesurées entre 20°C et 550°C par radiométrie photo thermique modulée (conductivité thermique) et par la méthode de Van der Pauw (résistivité électrique). Les variations observées sur cet intervalle de température sont expliquées par des transformations cristallines mises en évidence *in situ* sous un spectromètre Raman muni d'une platine chauffante et couplé à un microscope optique. Les données Raman collectées suggèrent que le matériau déposé (de forte résistivité électrique) est un mixte de $\text{In}_3\text{Sb}_7\text{Te}_2$ polycristallin et de Te amorphe. A partir de 300°C, la fraction amorphe cristallise progressivement et au-delà de 460°C, l'alliage est dominé par sa forme cristalline $\text{In}_3\text{Sb}_7\text{Te}_2$ peu résistive (mêlée à d'autres composantes : InTe et/ou InSb). La phase cristalline formée à haute température étant métastable, la caractérisation du matériau recuit (de retour à température ambiante) est une étape clé. On montre que sa résistivité reste faible permettant la lecture de chaque nano cellule via la mesure de sa résistivité à l'aide d'un pulse électrique : forte (resp. faible) résistivité : bit à 0 (resp. 1). Du point de vue cristallin, on retrouve une phase proche du binaire poly cristallin $\text{In}_3\text{Sb}_7\text{Te}_2$ du matériau dans sa forme *as deposited* combinée à d'autres composantes dont la nature et la formation sont étudiées par diffusion Raman dans le MEB et par WDS ainsi qu'à l'aide d'un essai de chauffe *in situ* dans le MEB.

La seconde application porte sur une étude multi-échelle de la colline de Lascaux où le calcaire a été altéré jusqu'à la formation de karst (grotte de Lascaux) difficile à caractériser. Des mesures géophysiques à l'échelle du terrain (tomographie de résistivité électrique) ont révélé différents niveaux et « structures », en particulier un horizon superficiel peu résistif et un horizon plus profond plus résistif pouvant être la signature d'un gradient d'altération. La nature de ces horizons n'est toutefois pas connue (site sensible sur lequel il est difficile de faire des forages). L'objectif est d'établir des critères pour différencier et caractériser les différents niveaux d'altération, du calcaire jusqu'à des résidus de type sable. Pour ce faire, on s'appuie sur l'analyse microscopique d'échantillons issus d'une trentaine de forages faits dans les années 60 et de sondages à la tarière. La bonne profondeur de champ du MEB combinée à la spectroscopie Raman dans le MEB et à la microanalyse X par sondes électroniques facilitent l'identification des minéraux issus de phénomènes d'altérations complexes.

Dans une troisième application, on s'intéresse aux latérites qui sont des sols intertropicaux riches en argiles et en oxydes de fer et d'aluminium issus du lessivage d'une roche mère, par exemple un granite. L'étude porte sur leur utilisation dans la partie inférieure des corps de chaussées au Niger. L'utilisation de ces sols en construction routière nécessite de connaître leurs caractéristiques géotechniques et mécaniques mesurées par des essais de laboratoire. Les caractéristiques de consolidation et de poinçonnement (indice portant Californien) sont expliquées par des reconstitutions de phases tirées de cartographies X en spectrométrie EDS. On montre en particulier que les oxydes de fer jouent le rôle de liant pour les autres particules (silice et argiles), augmentant la valeur de la portance du matériau. L'intérêt de la diffusion Raman (non affectée par l'ambiance environnante) est qu'elle permet de différencier les différents oxydes (hématite vs. goéthite), cette différenciation étant plus hasardeuse à l'EDS lié entre autres à l'augmentation de la teneur apparente en oxygène en modes pression contrôlée et ESEM (molécules de vapeur d'eau). La possibilité de différencier les oxydes renseigne en outre sur les conditions climatiques en vigueur lors de la formation des latérites.

Au cours de l'exposé on évoquera bien sûr les difficultés opératoires que l'on peut parfois rencontrer avec ce type de couplage ainsi que les « astuces » utilisées pour tenter de s'en affranchir, au moins partiellement.

Repositionnement d'images et de spectres en astronomie

Luc Arnold Observatoire
de Haute Provence CNRS

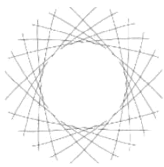
Institut Pythéas (UMS 3470)
04870 Saint-Michel-l'observatoire

Luc.Arnold@osupytheas.fr

Le repositionnement relatif d'une série d'images est une étape courante en traitement de données astronomiques, par exemple pour la mesure de position d'un objet mobile par rapport aux étoiles de fond (astrométrie) ou en imagerie planétaire à haute résolution. On va positionner les images dans un référentiel (résolution astrométrique des images) puis faire typiquement un *shift and add* pour augmenter le signal/bruit de l'objet d'intérêt. Par ailleurs la spectroscopie permet de mesurer la vitesse des astres par effet Doppler avec une précision de 1 m/s. Cette précision est atteinte grâce entre autres au repositionnement très fin du spectre par rapport à un spectre de référence d'une source sans mouvement (lampe spectrale), souvent mesuré simultanément. Dans ce référentiel, la vitesse de l'étoile, donnée par le décalage Doppler des raies spectrales de l'étoile, est obtenue par intercorrélation avec un spectre de référence *synthétique* d'une *étoile générique de vitesse nulle*. Si le décalage Doppler n'est pas mesurable à l'échelle d'une seule raie (décalage de l'ordre de 10^{-5} Ang soit 1/1000 de pixel sur le détecteur), l'intercorrélation du spectre entier de plusieurs milliers de raies avec le spectre synthétique de référence permet de mesurer ce décalage, correspondant à une variation de vitesse de l'ordre de 1m/s. Des séries temporelles d'observations étalées sur plusieurs mois sont ainsi parfaitement *repositionnées en vitesse*, soulignant la force de l'intercorrélation dans ce processus de mesure.

Audrey Salles

La microscopie corrélative électronique – photonique (CLEM) donne accès aux informations fonctionnelles et ultra- structurales de l'échantillon, cependant son utilisation dans les laboratoires exige une maîtrise à la fois de la préparation des échantillons, le choix d'un support compatible avec les deux modes d'imagerie et un repositionnement précis des deux images. Nous avons conçu un support d'échantillon constitué d'une lamelle gravée , compatible avec la méthode « Shuttle and Find » (Zeiss) permettant un repositionnement efficace de l'échantillon avec des conditions optimales de préparation et d'observation de l'échantillon.



ARGOLIGHT

A Precision Company

Développement d'un substrat de verre pour microscopie corrélative LM/EM

Kevin BOURHIS, Argolight SA, Talence, France

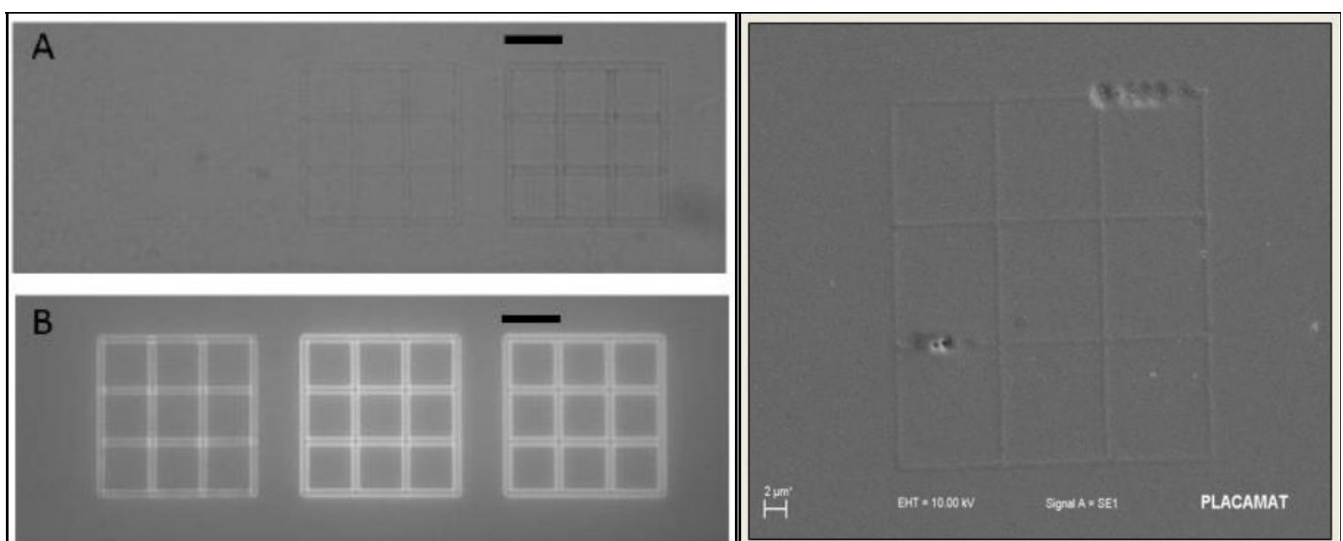
k.bourhis@argolight.com

1) Repères sur le support ou sur l'échantillon

La société Argolight commercialise des solutions matérielles et logicielles pour l'évaluation, le suivi et le contrôle qualité des systèmes d'imagerie en fluorescence. Les marchés de la recherche biologique, médicale et de l'industrie pharmaceutique utilisent quotidiennement des systèmes de fluorescence (microscopes, scanners de lames...). De tels systèmes nécessitent des tests périodiques afin d'assurer leur bon fonctionnement ainsi que la qualité des mesures réalisées. Argolight propose une solution de gestion de la qualité pour les systèmes en fluorescence, qui combine une lame de verre au cœur de laquelle sont gravés des motifs fluorescents, et un logiciel permettant une analyse instantanée des images et la génération automatique de rapports de données de suivi-qualité fiables. Un gain temporel d'un facteur 30 ainsi qu'une meilleure fiabilité des résultats permettent ainsi de diminuer le temps d'immobilisation des machines, de prévoir les pannes en amont et d'augmenter la productivité de chaque machine de plus de 5%.

En nous intéressant aux différentes technologies utilisant la fluorescence comme outil de diagnostic et d'analyse, la microscopie corrélative fluorescence/microscopie électronique à balayage est apparue comme présentant de nombreux défis, dont celui de la localisation des cellules à imager lors du passage d'un appareil de mesure à un autre. Nous avons mis à profit notre savoir-faire en gravure laser en inscrivant des motifs fluorescents sous forme de grille à la surface d'une lame de verre (matériau que nous développons et produisons en interne).

Il s'avère que ce type de structure fluorescente présente également un contraste en microscopie électronique à balayage. Avant de poursuivre plus avant le développement de ce premier prototype, nous souhaitons échanger sur le besoin de la communauté d'utilisateurs CLEM ainsi que sur leur intérêt pour un nouveau substrat à intégrer dans des supports et porte-échantillons plus complexe. Il convient aussi de discuter de la compatibilité de ce substrat avec les technologies de croissance/fixation de cellules ainsi que de sa viabilité industrielle comparé aux solutions existantes.



Images en microscopie optique en réflexion (à gauche, en haut), en microscopie de fluorescence (à gauche, en bas) (barre d'échelle : 10 μm) et en microscopie électronique à balayage (à droite) de grilles inscrites à la surface d'une lame de verre

Identification à l'échelle micrométrique d'une zone d'intérêt par gravure de la surface au moyen du faisceau d'ion primaire du spectromètre ToF-SIMS : Exemple de couplage ToF-SIMS / AFM

Antoine Seyeux, Lorena H. Klein

PSL Research University, CNRS-Chimie ParisTech, Institut de Recherche de Chimie Paris / Groupe de Physico-Chimie des Surfaces, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

Lorsque le suivi *in-situ* est impossible et/ou que différentes techniques d'analyses doivent être utilisées localement afin de caractériser finement un échantillon, le repositionnement sur une même zone d'intérêt est indispensable. Cette problématique est d'autant plus importante lorsque l'on souhaite suivre l'évolution, dans le temps, d'une même zone d'un échantillon.

Dans ce travail, des images topographiques et chimiques locales de couches minces modèles de sulfure de fer (FeS) obtenu par sulfuration d'acier à haute température (300°C) sous faible pression H₂S, ainsi que l'évolution de la surface de ces couches modèles lors de la corrosion par des solutions contenant des acides naphthéniques sont obtenues par microscopie de force atomique (AFM) et par spectrométrie de masse d'ions secondaire résolue en temps de vol (ToF-SIMS).

Afin d'analyser la même zone de l'échantillon par AFM et ToF-SIMS, une procédure d'identification (marquage) a été mise au point. Elle consiste en la gravure, à l'aide du faisceau d'ion du spectromètre ToF-SIMS, de marques caractéristiques sur la surface de l'échantillon. L'intérêt majeur de l'utilisation du faisceau primaire du ToF-SIMS est sa très bonne focalisation permettant d'obtenir une gravure locale de la surface avec des marques bien définies de tailles comprises entre quelques μm et quelques centaines de μm . Ces marques permettent ensuite de localiser les zones d'intérêts au moyen des caméras haute définition des appareillages ToF-SIMS et AFM et donc d'analyser systématiquement la même zone de l'échantillon. La figure 1 présente la surface de l'échantillon sulfuré après gravure d'une marque (chiffre 4) sur la surface à l'aide du faisceau d'ions primaire ToF-SIMS. Les figures 2a et b présentent des images optiques de la même zone de l'échantillon après 6 minutes d'immersion dans une solution contenant des acides naphthéniques après repositionnement dans le spectromètre ToF-SIMS et dans le microscope AFM, respectivement.

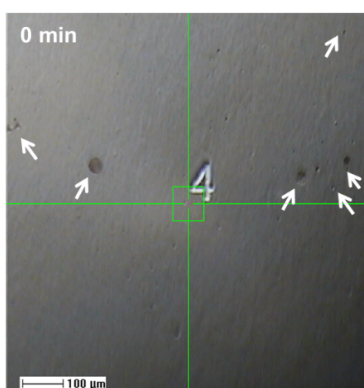


Figure 1 : Gravure du chiffre 4 sur la surface de l'échantillon par le faisceau d'ion primaire du spectromètre ToF-SIMS.

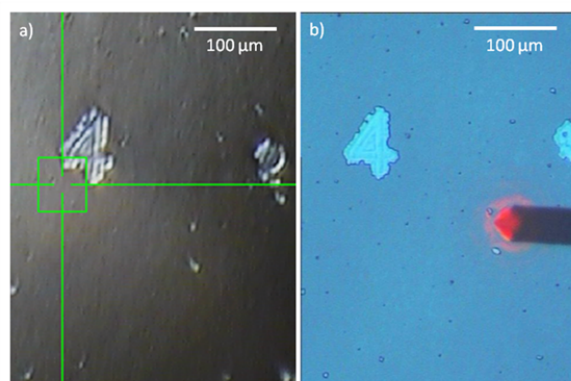


Figure 2 : Repositionnement de l'échantillon dans le spectromètre ToF-SIMS (a) et dans le microscope AFM (b) après immersion de l'échantillon dans une solution contenant des acides naphthéniques.

Utilisation de lamelle avec repères pour la culture cellulaire et l'observation des cellules en microscopie optique et électronique

Isabelle Pignot-Paintrand

Univ. Grenoble-Alpes, LMGP, F-38000 Grenoble, France, CNRS, LMGP, F-38000 Grenoble, France

Pour obtenir des informations en microscopie électronique, sur l'ultrastructure d'une cellule identifiée en microscopie optique ou de fluorescence il est possible d'utiliser des lamelles avec repères, pour repositionner facilement la cellule identifiée. Cependant si l'objet d'intérêt est un organite cellulaire, cela nécessite d'inclure et de couper la cellule et dans ce cas les repères présents sur la lamelle sont perdus.

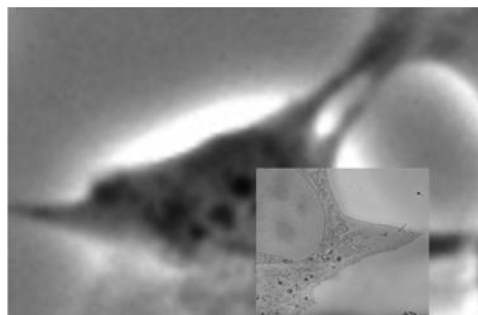
Nous présentons un moyen simple de créer de nouveaux repères qui pourront être visibles sur les coupes et faciliter le repositionnement, voir même la relocalisation de la section cellulaire dans l'image faite en contraste de phase.

Nous avons utilisé des lamelles de verre (PHOTO ETCHED WHITE GLASS COVERSLIPS, 25MM – EMS 72265-25). Ces lamelles comptent 200 carrés de 500 μ m de côté. Les cellules sont cultivées sur les lamelles, observées et photographiées en contraste de phase puis fixées par 2.5% de glutaraldéhyde en tampon cacodylate de sodium 0.1M pH7.2. Après rinçage, les cellules sont post-fixées par de l'osmium réduit, déshydratées et incluses dans une résine époxy par la technique de la gélule inversée.

Après polymérisation, la gélule est séparée de la lamelle de verre par un choc thermique. Les carrés numérotés de la lamelle sont visibles sous la loupe binoculaire de l'ultramicrotome, mais ils sont inversés. Pour repérer l'objet d'intérêt, il faut imprimer les photographies obtenues en microscopie optique en ayant au préalable réalisée une transformation en miroir. Nous délimitons la surface de coupe à l'aide d'une lame de rasoir et à l'aide d'une aiguille fine on réalise des trous dans le bloc d'inclusion pour créer des repères visibles sur les coupes.

Les sections sont récupérées sur des lamelles de verre de 9mm de diamètre. Ces sections pourront être observées en microscopie optique, puis après dépôt d'un film de carbone au microscope électronique à balayage. Il sera, de cette façon, aisé de retrouver la cellule, objet d'intérêt, et de réaliser l'étude à l'échelle ultrastructurale de cette même cellule.

En réalisant l'observation des sections de cellule en microscopie électronique à balayage en mode de détection des électrons rétrodiffusés, on s'affranchit de la perte d'information sous les barreaux d'une grille de microscopie électronique en transmission et l'échelle la plus petite permet un repositionnement précis et rapide par rapport à l'image obtenue en microscopie optique.



Développement de substrats marqués pour la relocalisation de nanoparticules sur différents microscopes (AFM, MEB)

S. Ducourtieux^a, N. Feltin^a, A. Delvallée^a, L. Devoille^a, C. Ulysseb^b

^aLaboratoire national de métrologie et d'essais (LNE)

^bLaboratoire de Photonique et de Nanostructures, UPR20 CNRS

Grace à la plateforme CARMEN (Caractérisation METrologique des Nanomatériaux), le LNE a développé un savoir-faire sur la métrologie des nanoparticules conduite à partir de techniques d'imagerie comme la microscopie à force atomique ou la microscopie électronique. Un de nos objectifs est la maîtrise de la mesure dimensionnelle de ces nanoparticules qui passe par l'étalonnage des instruments et l'évaluation des incertitudes de mesure. Pour évaluer la cohérence des mesures fournies par les différentes techniques d'imagerie, il est très intéressant de pouvoir mesurer exactement les mêmes particules au même endroit. Mais cela pose évidemment un problème de repositionnement : comment retrouver quelques nanoparticules éparpillées parmi des milliards déposées sur un substrat de 1 cm². Les premières tentatives de relocalisation effectuées faisaient appel aux défauts, rayures ou structures visibles par microscopie mais cette technique est fastidieuse et souvent impossible à mettre en œuvre sur des substrats extrêmement plats et propres comme ceux que nous utilisons (wafer Si, MICA,...) pour déposer les nanoparticules et faciliter l'imagerie par AFM.

Pour résoudre cette problématique, le LNE a développé en collaboration avec le LPN, un substrat de silicium gravé sur lesquels les nanoparticules sont déposées. Ce système de repositionnement possède la particularité de comporter des motifs gravés par lithographie qui permettent la colocalisation des nanoparticules ainsi que la comparaison des mesures par AFM et MEB.

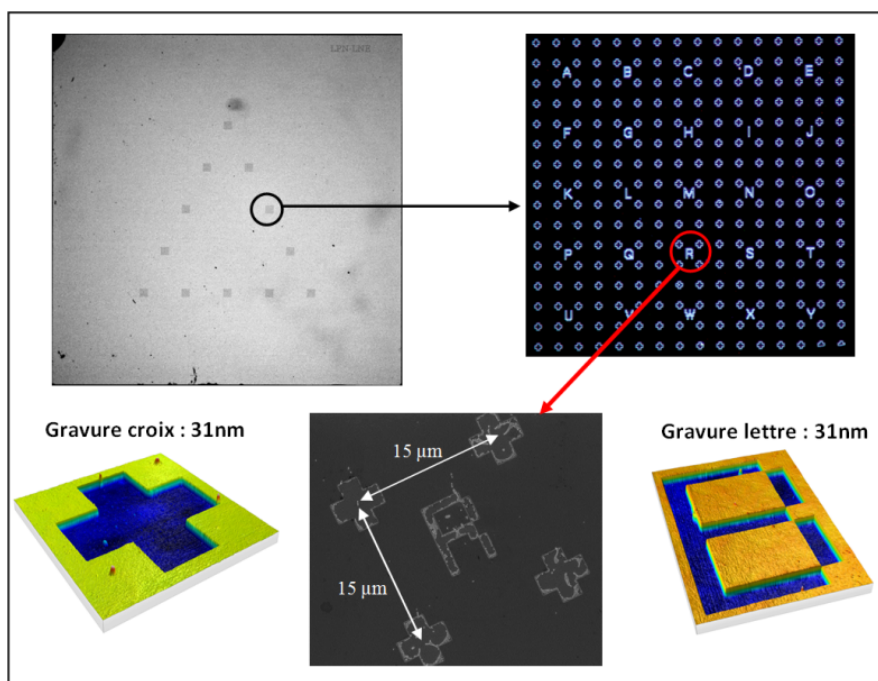


Figure 3-1 Caractéristiques des substrats fabriqués par le LPN

Microscopie corrélative et FIB-SEM en biologie

A.Mallet¹, P.Bomme¹, C. Fort², A. Weiner³, P. Bastin², J. Eminga³, J. Krijnse Locker¹

¹- Institut Pasteur Paris, Ultrapole

²- Institut Pasteur Paris, Unité de Biologie cellulaire des Trypanosomes

³- Institut Pasteur Paris, Unité de Dynamique des Interactions Hôte-Pathogènes (DIHP)

En biologie, le système FIB-SEM (focused ion beam – scanning electron microscopy) permet d'analyser des structures intracellulaires en trois dimensions des échantillons à l'échelle nanométrique. Pour cette analyse, les échantillons biologiques doivent être traités afin d'être suffisamment durs pour être abrasés sans déformation sous le faisceau ionique et contrastés pour pouvoir être imagés via un détecteur d'électrons rétrodiffusés.

A l'Institut Pasteur, l'Ultrapole s'est investi sur la mise au point d'une approche de microscopie corrélative combinant microscopie en fluorescence et FIB-SEM.

Cette méthode permet de localiser des événements d'intérêt transitoire et/ou rare par microscopie photonique avant une analyse ultrastructurale par microscopie électronique en FIB-SEM.

Mise en place d'une méthode de nano-indentation à l'aide de la pointe STM

Repositionnement ECSTM/EBSD

Mohamed Bettayeb, Lorena H. Klein

PSL Research University, CNRS-Chimie ParisTech, Institut de Recherche de Chimie Paris /
Groupe de Physico-chimie des Surfaces, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005, France

Le couplage de plusieurs techniques d'analyse de surface permet d'obtenir des informations complémentaires (topographie, composition chimique, cristallographie, etc.), ainsi le repositionnement pour retrouver la zone d'intérêt devient indispensable.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés aux informations de topographie et de cristallographie microstructurale. La microscopie à effet tunnel sous contrôle électrochimique

(ECSTM) est utilisée afin de suivre l'évolution de la topographie de la surface du cuivre microcristallin en fonction du potentiel. Ensuite, la cristallographie de cette même surface est obtenue par diffraction d'électrons rétrodiffusés (Electron backscatter diffraction, EBSD*).

Afin de pouvoir allier ces deux techniques d'analyse, et en raison de l'absence de camera optique sur l'ECSTM, la nano-indentation est une des possibilités se repositionner sur la zone préalablement analysée. A cet effet, nous avons mis en place une méthode de nano-indentation en utilisant la pointe STM à la fin de l'expérience d'ECSTM. En déplaçant la platine sur laquelle repose l'échantillon et en maintenant la pointe engagée sur la surface, des formes géométriques facilement identifiables (lignes, triangles etc.) sont gravées en périphérie de la zone analysée ($3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$). Ces formes sont ensuite identifiées à l'aide du microscope électronique à balayage, et la cristallographie de la microstructure est obtenue par EBSD. La figure 1 présente une image optique de la surface du cuivre indentée, la figure 2a une figure d'EBSD et 2b une image d'ECSTM d'une même zone de la surface de cuivre microcristallin. La longueur de la forme géométrique peut être contrôlée par le déplacement de la platine, mais la largeur du trait est imposée par la pointe STM.

* EBSD réalisé par Linsey Lapeire, Department of Materials Science and Engineering, Gent University, Belgique

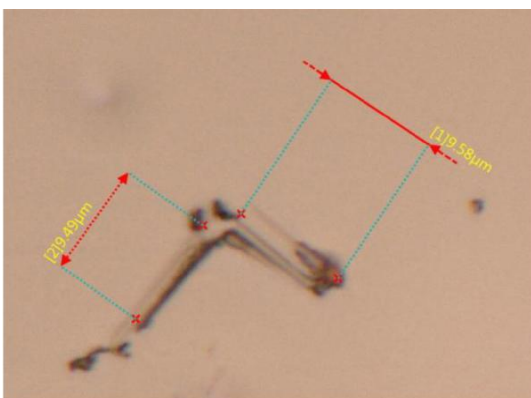


Figure 1 : image optique obtenue sur la surface de cuivre indentée par la pointe STM

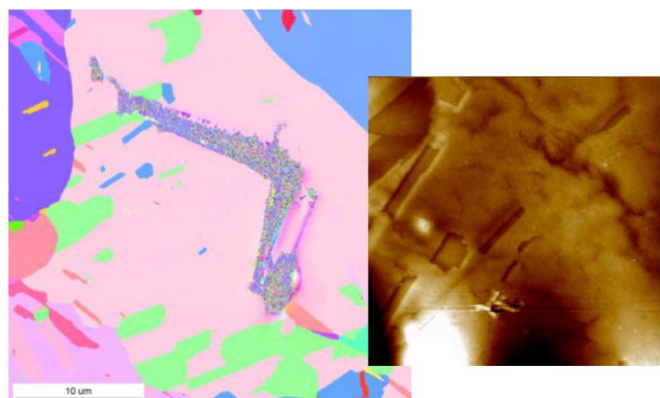


Figure 2 : (a) figure EBSD, (b) image ECSTM

Une solution de référencement de position absolue pour la relocalisation et la colocalisation en microscopie optique

O. Acher, A. Podzorov, A. Girgoriev, HORIBA Jobin Yvon, Palaiseau, France ; olivier.acher@horiba.com

Nous présentons un prototype d'add-on à un microscope optique qui permet de connaître la position et l'orientation absolue de l'échantillon observé. Pour permettre un gain de temps dans différents usages (relocalisation, colocalisation entre des observations observées sur plusieurs microscopes, mais aussi travail collaboratif et observations réparties sur plusieurs sessions), il est couplé à un logiciel de navigation cartographique adapté à l'échelle microscopique.

Dans notre approche, une lame ou une lamelle codée [1] est solidaire de l'échantillon. Un petit add-on fixé sur le microscope observe ce plan codé, et un module informatique détermine la position et l'orientation à partir de cette observation. Ce dispositif permet la détermination en temps réel de la position de l'échantillon [2] durant les observations en microscopie. La figure 1 donne un exemple d'une carte d'échantillon qui a été obtenue par une succession d'observations effectuées sur 2 microscopes différents, et avec des grossissements différents. Le rectangle rouge indique en temps réel la zone observée par la caméra du microscope.

On a étudié la précision de la position et de la mesure angulaire d'orientation. On a établi que l'écart type est inférieur à 1nm en ce qui concerne la position, et inférieur à $10\mu\text{rad}$ concernant l'orientation. Ces valeurs de précisions établissent que ce système fonctionne en régime de superrésolution optique, et plus précisément le régime connu sous le nom de « microscopie de localisation ». Si ces performances excèdent les besoins habituels en microscopie optique, elles sont néanmoins utiles pour étudier les dérives liées par exemple au statif du microscope. Pour illustrer cet usage, la figure 2 présente la dérive observée sur un microscope Olympus.

Le système présenté a vocation à être proposé aux chercheurs et aux fabricants d'instruments scientifiques (oem). Au contraire des systèmes propriétaires, il a vocation à être ouvert pour favoriser l'utilisation sur des systèmes différents. Des versions préliminaires peuvent être proposées à des Beta-Labs intéressés.

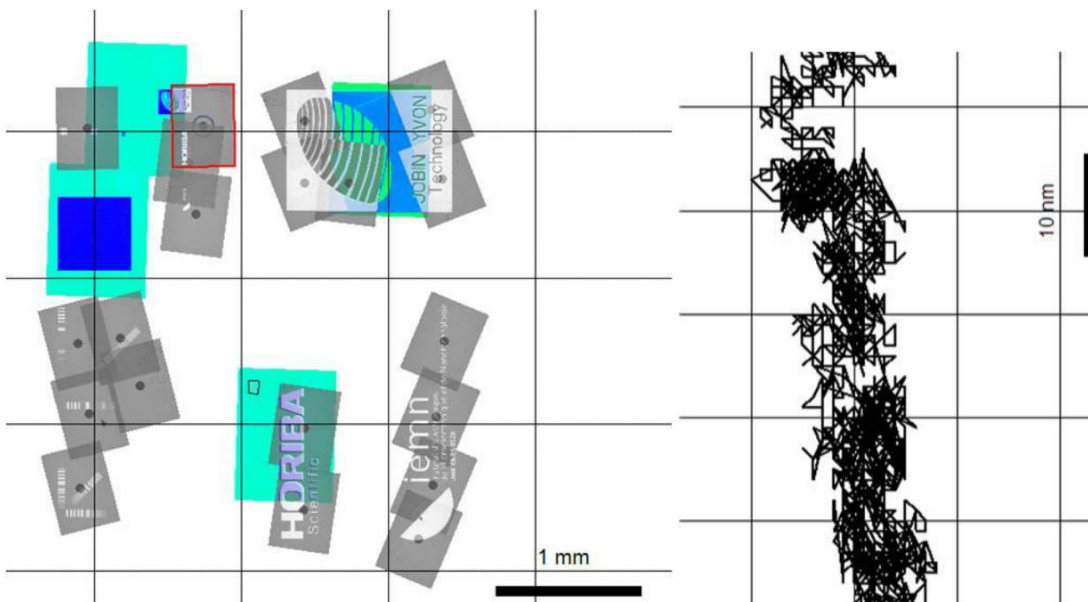


Figure 1 : carte d'un échantillon obtenue au cours de plusieurs sessions d'observation avec 2 microscopes.

Figure 2 : dérive en position observée sur un microscope Olympus BXX1 placé sur une table antivibration.

[1] Sandoz, P.; Zeggari, R.; Froehly, L.; Prétet, J.; Mougin, C., *J. Microsc.*, **225**, 293–303 (2007)

[2] O. Acher, A. Podzorov, PCT Pat. Appl. WO2014016526.

easy Cell CLEM: eC-CLEM a plugin to register correlative data

Xavier Heiligenstein^{1*}, Perrine Paul-Gilloteaux², Graça Raposo¹, Jean Salamero²

¹*Structure and Membrane Compartments, CNRS UMR144, Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, 75248, France*

²*Spatio-Temporal Modeling Imaging and Cellular Dynamics, CNRS UMR144, Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, 75248, France*

Correlative light and electron microscopy (CLEM) is taking an increasing part in imaging for electron microscopy laboratories. Many approaches are developed to address a large variety of biological specimen and phenotypes. Yet, aligning the light microscopy images with the electron micrographs remains common to all CLEM approaches. We have developed easy Cell CLEM (eC-CLEM) as a new and intuitive plugin to allow any biologist to align its CLEM images without any image processing prerequisite or mathematical background. We rely on the user expertise to identify corresponding landmarks between the different images to align them. Our plugin functions for two or three dimension datasets and contains some internal routines to pre-process the data and improve the signal to noise ratio, thereby facilitating the user's task.

Combining our global CLEM method to eC-CLEM, we address the formation of pigment granule in skin melanocytes and reconstructed epidermis.

Relocalisation « manuelle » par superposition

Frédéric Foucher, CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, Orléans (RéMiSoL)

Une des méthodes utilisées pour relocaliser une zone d'intérêt entre différentes techniques consiste à les superposer mentalement ou physiquement à l'aide de logiciels de traitement d'images. Ma technique consiste à localiser 2 points distinctifs présents sur les images à superposer. J'entre ensuite leur coordonnées, mesurées sous GIMP, dans un tableau Excel qui calcule le redimensionnement et la rotation à effectuer sur une des images pour en corriger l'échelle et l'orientation par rapport à l'autre. Toujours en utilisant GIMP, il est alors possible d'utiliser la transparence pour venir placer une image sur une autre. Cette technique rudimentaire présente l'intérêt de pouvoir superposer plusieurs images en utilisant des calques ce qui peut s'avérer particulièrement utile pour des images de composition élémentaire par exemple.

Présentation du logiciel Icy

Stéphane Dallongeville

Unité d'Analyse d'Images Biologiques (AIB)

Institut Pasteur de Paris

25 rue du Docteur Roux 75015 Paris - France



Participants

Olivier Acher	olivier.acher@horiba.com	Horiba Jobin Yvon	
Yannick Anguy	yannick.anguy@ensam.eu	Institut de Mécanique et d'Ingénierie de Bordeaux	
Luc Arnold	Luc.Arnold@osupytheas.fr	Observatoire de Haute Provence – Institut Pythéas (UMS3470)	RéMISOL
christine Arnould	christine.arnould@dijon.inra.fr	Centre de Microscopie Plateforme Dimacell INRA/Université de Bourgogne	RTMFM
Guillaume Audoit	guillaume.audoit@cea.fr	CEA Leti	
Nicolas Barois	nicolas.barois@ibl.cnrs.fr	Plateforme BICeL Lille	RCCM
Martin Belle	martin@cryocapcell.com	CryoCapCell	
Aména Ben Younes	amena.ben_younes@upmc.fr	Apoptose, Cancer et Immunité UMRS 1138 Equipe 11	RCCM, RTMFM
Jean-François Bergamini	jean-francois.bergamini@univ-rennes1.fr	UMR 6226 Institut des Sciences Chimiques de Rennes	RéMISOL
Maitine Bergounioux	maitine.bergounioux@univ-orleans.fr	MAPMO Université d'Orléans	
Mohamed Bettayeb	mohamed.bettayeb@chimie-paristech.fr	PCS chimie paristech	
Thomas Bonnal	thomas.bonnal@insa-lyon.fr	MATEIS INSA Lyon	
Stephan Borensztajn	borensztajn@ipgp.fr	IPGP, Paris	RCCM
Kevin Bourhis	k.bourhis@argolight.com	ARGOLIGHT SA	RTMFM
Astrid Canivet-Laffitte	astrid.canivet@inserm.fr	CPTP, Toulouse	RTMFM
Pascal Chretien	pascal.chretien@geeps.centralesupelec.fr	Laboratoire de Génie Electrique et Electronique de Paris	RéMISOL
Stéphane Dallongeville	stephane.dallongeville@pasteur.fr	Institut Pasteur	RTMFM
Anne Danckaert	anne.danckaert@pasteur.fr	Imagopole - Citech Institut Pasteur	
Chakib Djediat	djediat@mnhn.fr	PtMe – MNHM Paris	RCCM
Sébastien Ducourtieux	sebastien.ducourtieux@lne.fr	Nanométrie LNE Paris	
Amandine Durand-Terrasson	amandine.durand@univ-lyon1.fr	Centre d'imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE)	RCCM, RTMFM
Catherine Durieu	Catherine.DURIEU@gustaveroussy.fr	UMR 8126 – signalisation noyaux et innovations en cancérologie	RCCM
Frédéric Foucher	frederic.foucher@cnrs-orleans.fr	Centre de Biophysique Moléculaire	RéMISOL
Cécile Gaborieau	c.gaborieau@i2m.u-bordeaux1.fr	Institut de Mécanique et d'Ingénierie de Bordeaux	
Anastasia Gazi	anadegaz@gmail.com	Ultrapole Institut Pasteur	
Isabelle Gillot	gillot@unice.fr	Institut Biologie Valrose Université Nice Sophia Antipolis	RCCM, RTMFM
Maria Gîrleanu	maria.girleanu@intradef.gouv.fr	Unité Imagerie IRBA	
Olivier Gorgette	olivier.gorgette@pasteur.fr	Ultrapole Institut Pasteur	RCCM
Ruxandra Gref	ruxandra.gref@u-psud.fr	ISMO	
Alexandre Grigoriev	alexandre.grigoriev@horiba.com	Horiba Jobin Yvon	
Sébastien Janel	sebastien.janel@cnrs.fr	UMR 8204 Lille	RéMISOL
Mabel Jouve	mabel.san-roman@curie.fr	Laboratoire Immunité et Cancer - Inserm U932 Institut Curie	RCCM
Mohammad Khaywah	mohammad.khaywah@cea.fr	CEA Saclay, DSM-IRAMIS-NIMBE-LEDN	RTMFM
Lorena Klein	lorena.klein@chimie-paristech.fr	IRCP	RéMISOL
Rémi Le Borgne	remi.leborgne@ijm.fr	ImagoSeine Institut Jacques Monod	RCCM
Sophie Le Panse	lepanse@sb-roscoff.fr	La Station biologique de Roscoff	RCCM
Sandrine Lecart	sandrine.lecart@u-psud.fr	CLUPS	RTMFM
Mickaël Lelek	mickael.lelek@pasteur.fr	Imagerie et Modélisation Institut Pasteur	RTMFM
Nicolas Lemercier	lmercier@igbmc.fr	IGBMC, Strasbourg	RCCM
Laurent Loos	lloos@gatan.com	GATAN France – ROPER Scientific	
Adeline Mallet	adeline.mallet@pasteur.fr	Ultrapole Institut Pasteur	RCCM
Christian Marliere	christian.marliere@u-psud.fr	Institut de Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO)	RéMISOL
Pierre Maso	pierre.maso@uvsq.fr	Groupe d'étude de la matière condensée (GEMaC), Versailles	
Ophélie Nicolle	ophelie.nicolle@univ-rennes1.fr	IGDR Université Rennes 1	RCCM
Myriam Oger	myriam.oger@intradef.gouv.fr	Unité d'Imagerie IRBA	
Isabelle Paintrand	isabelle.paintrand@grenoble-inp.fr	LMGP UMR5628, Grenoble	RTMFM
Elisabetta Pancani	elisabetta.pancani@u-psud.fr	Institut de Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO)	
Alexander Podzorov	alexander.podzorov@horiba.com	Horiba Jobin Yvon	
Valerie Reita	valerie.reita@neel.cnrs.fr	Institut Néel, Grenoble	
Annie Richard	annie.richard@univ-orleans.fr	Centre de Microscopie Electronique Université d'Orléans	RCCM
Christophe Rose	rose@nancy.inra.fr	UMR1137 EEF-PTEF	RCCM
Pascal Roux	pascal.roux@pasteur.fr	Imagopole-Citech Institut Pasteur	RTMFM
Nathalie Ruscassier	nathalie.ruscassier@centralesupelec.fr	LGPM CentraleSupélec	
Audrey Salles	audrey.salles@pasteur.fr	Institut Pasteur	RTMFM
Anna Sartori-Rupp	anna.sartori-rupp@pasteur.fr	Ultrapole Institut Pasteur	
Audrey Sauldubois	audrey.sauldubois@univ-orleans.fr	Centre de Microscopie Electronique Université d'Orléans	RCCM
Marie-Noëlle Soler	marie-noelle.soler@curie.fr	Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire Institut Curie	RTMFM
Coralie Spiegelhalter	coralie@igbmc.fr	IGBMC, Strasbourg	RCCM
Géraldine Toutirais	getout@mnhn.fr	PtMe – MNHM Paris	RCCM
Cyril Willig	cwillig@mnhn.fr	UMR7245 CeMIM, Paris	RCCM, RTMFM

Organisation

L'équipe du groupe de travail sur le Repositionnement

Frédéric Foucher	RéMiSoL
Isabelle Paintrand	RCCM, RTMFM
Astrid Canivet	RTMFM
Adeline Mallet	RCCM
Isabelle Gillot	RTMFM
Lorena Klein	RéMiSoL
Jean-François Bergamini	RéMiSoL

Merci à la société Zeiss qui nous offre gracieusement les pauses café.

