



La microscopie électronique à balayage appliquée à la microbiologie

Complémentarité de techniques de microscopie

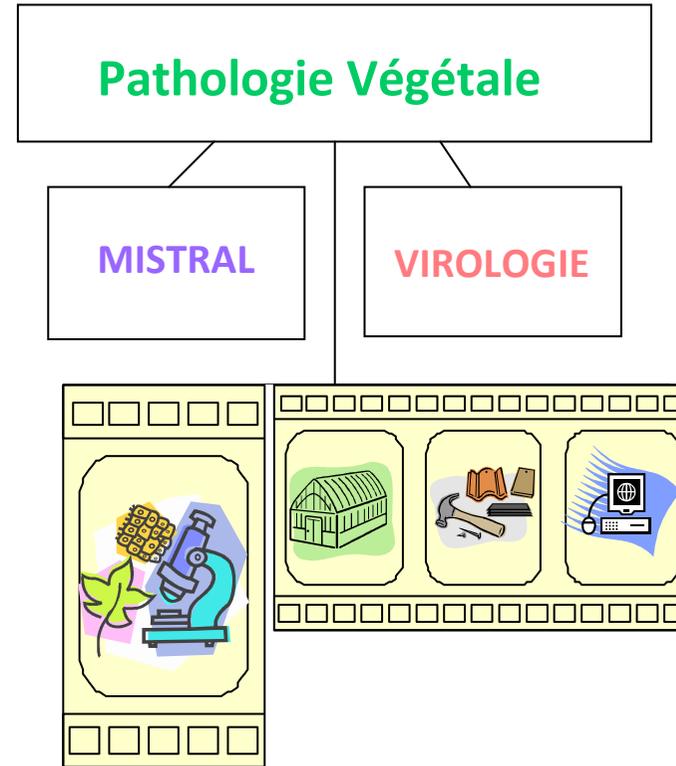
Isabelle Bornard (INRA Avignon)



L'unité :

Equipes de recherches

Services collectifs



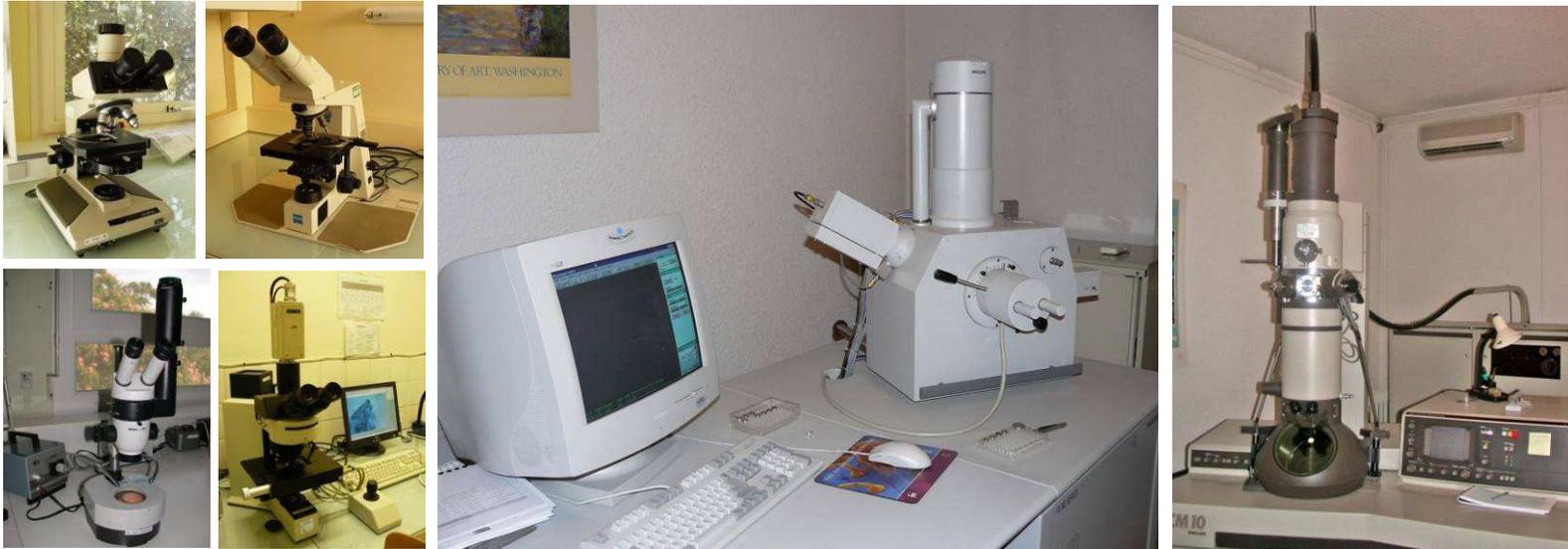
Laboratoire de microscopie

➔ fonctionnement de type plateau ouvert à l'extérieur



le laboratoire de microscopie :

Les appareils



Le personnel





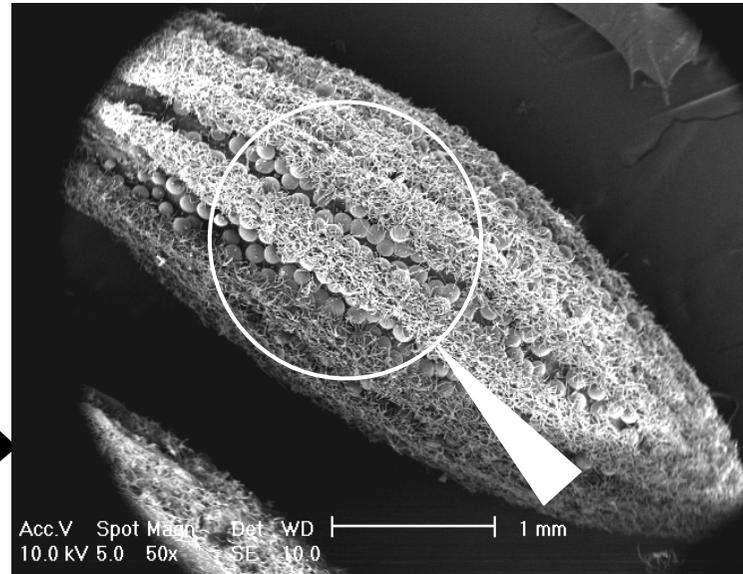
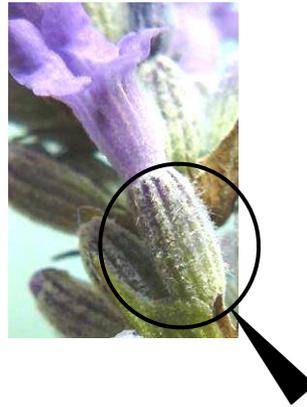
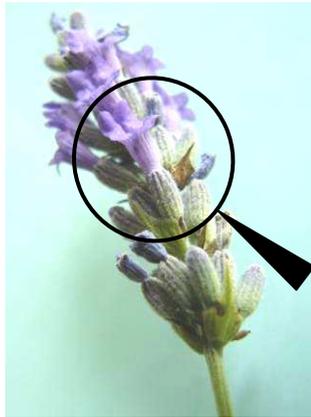
unité	- Détections et/ou caractérisations de virus	MO, MET
	- Observations diverses et assistance en microbiologie	MO, MEB, MET
Prestations externes	- « simples » Illustrations	MEB
	- Observations diverses et assistance	MEB, MET



- 1 - **pour illustrer des résultats d'analyses chimiques** spécifiant la composition et la pureté de l'huile essentielle (lavande).
- 2 - **pour vérifier l'effet de la lumière pulsée** comme procédé de décontamination par inactivation de spores de bactéries
- 3 - **pour caractériser une souche du champignon** *Botrytis cinerea*
- 4 - **pour évaluer l'effet du champignon** *Coniothyrium minitans* sur l'infection, la dégradation et la destruction des sclérotés de *Sclerotinia minor*, agent pathogène majeur des cultures.

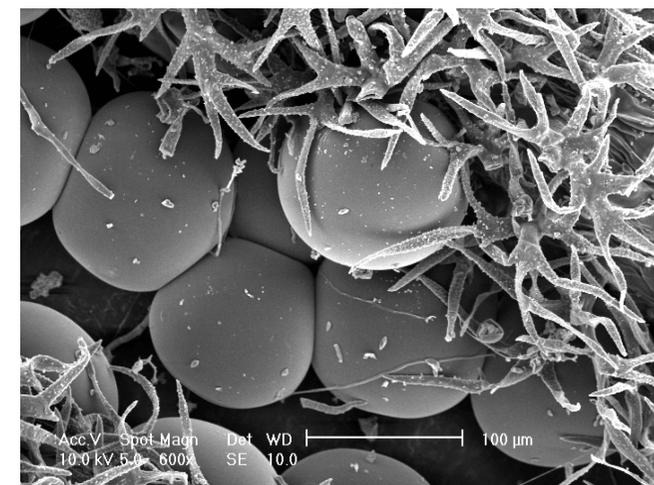
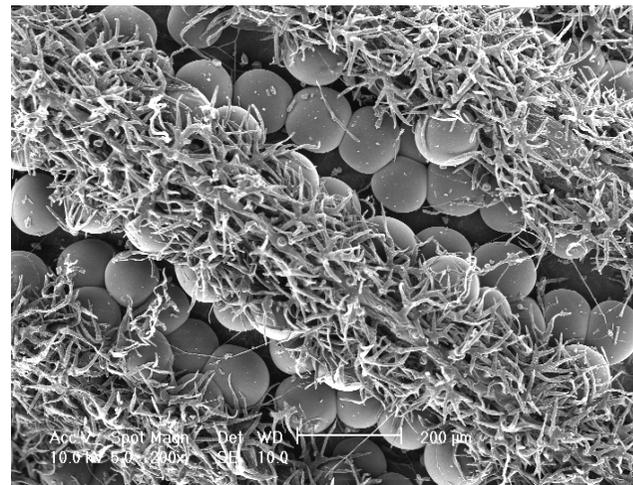


- **Observation de l'effet de différents procédés mécaniques d'extraction d'huiles essentielles** à partir de plantes aromatiques
- valider leur efficacité, en observant les différences à la surface des échantillons.



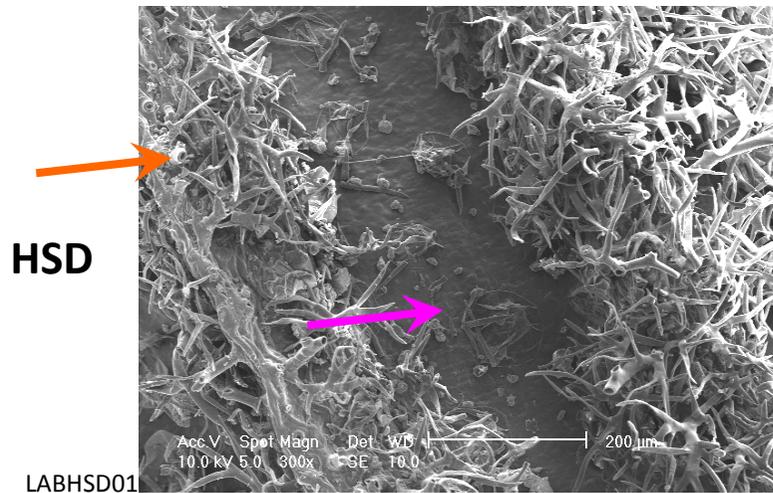
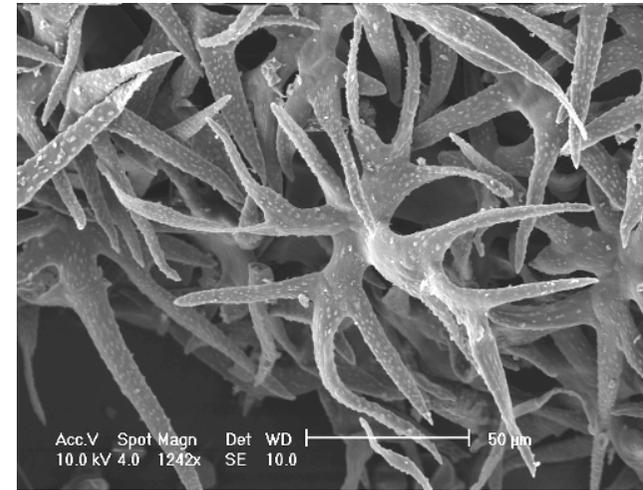
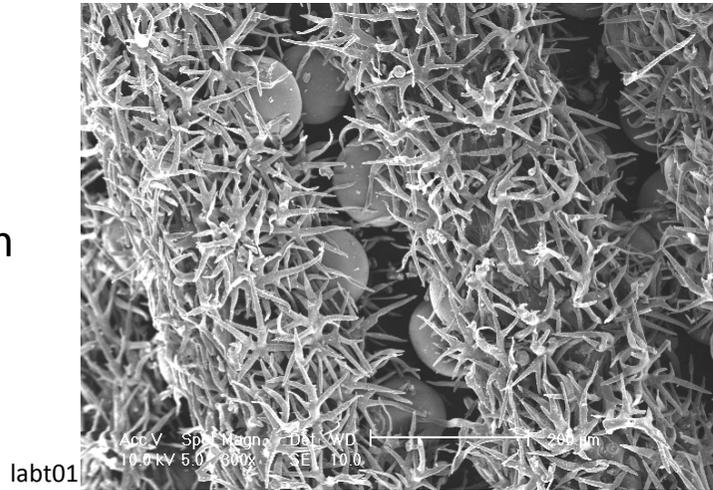
Zoom

Trichomes
= Poils glandulaires
= Glandes sécrétrices

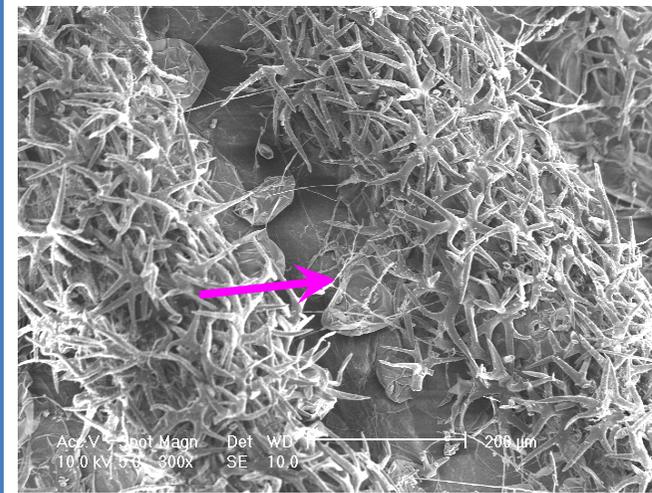




témoin



procédé classique



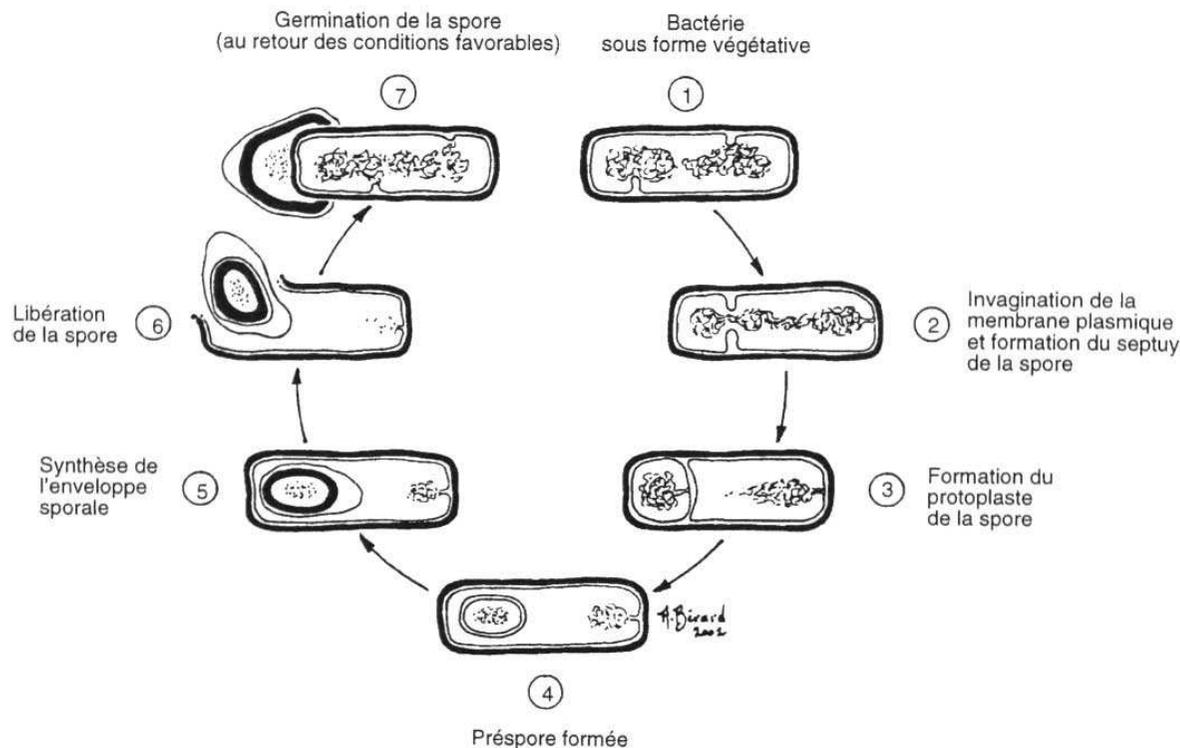
micro-ondes



Exemple d'observation au MEB pour illustrer **l'effet de la lumière pulsée** comme procédé de décontamination par inactivation de spores de bactéries et comparaison lumière pulsée et UV



- Qu'est-ce qu'une spore ? Ou endospore ?



Les endospores sont des structures formées par les bactéries quand les conditions leur sont défavorables.

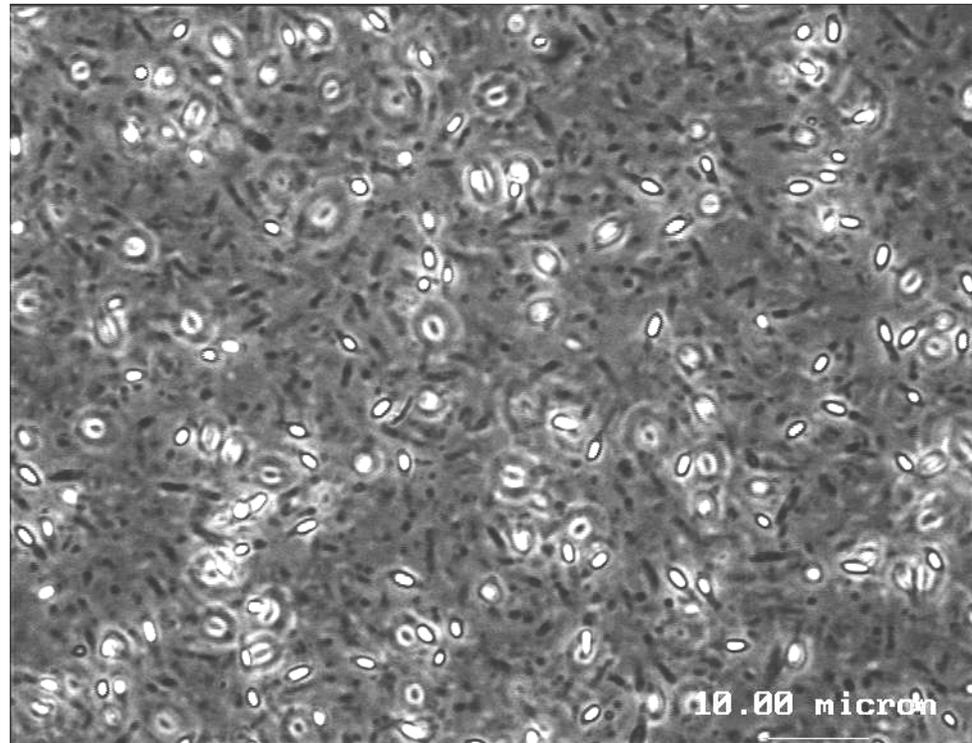
Ces structures à paroi épaisse et résistante renferment du matériel génétique ainsi qu'un peu de cytoplasme.

Elles sont très résistantes aux températures extrêmes, à la déshydratation, à différentes substances chimiques, aux radiations et a différents antibiotiques et antiseptiques



- Contrôle en optique : en contraste de phase

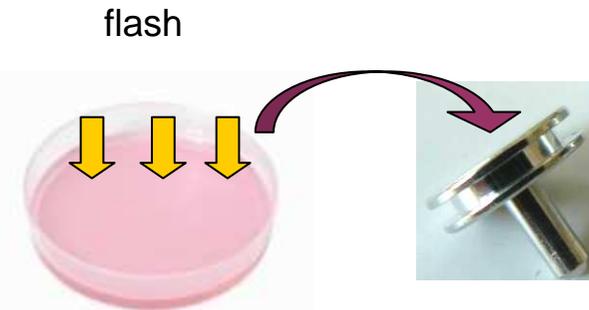
Pureté de la suspension,
présence de cellules
végétatives ou autres
débris, concentration
...etc



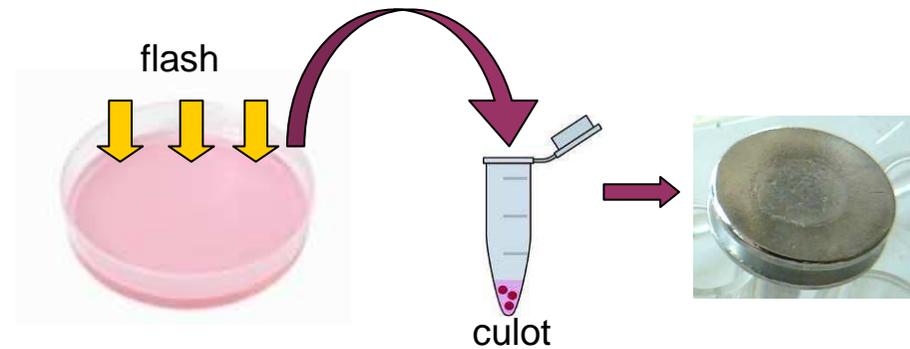


- Préparation pour le MEB : différents essais

- Traitement sur cellules en suspension

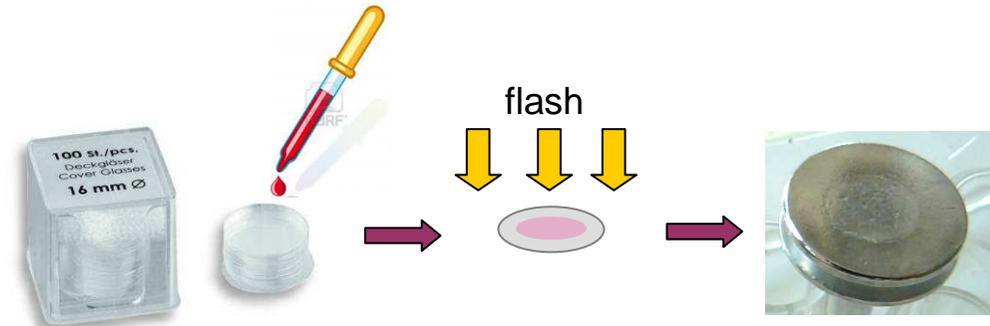


- Traitement sur cellules en suspension avec reprise du culot





- Traitement sur cellules déposées sur lamelle en goutte puis en spray

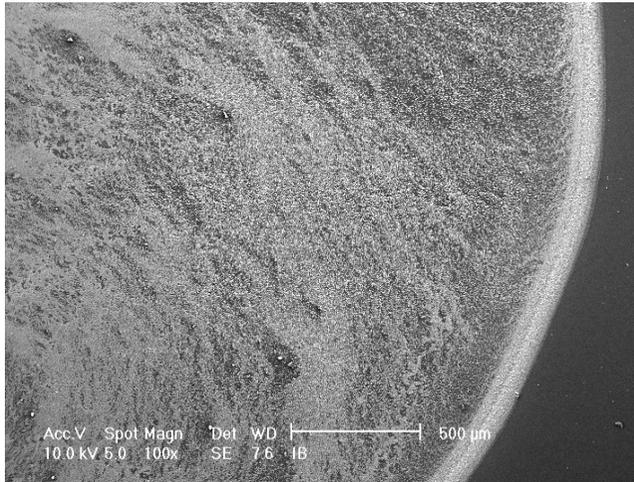


- Augmentation du nombre de Flash et augmentation de l'intensité des flashes

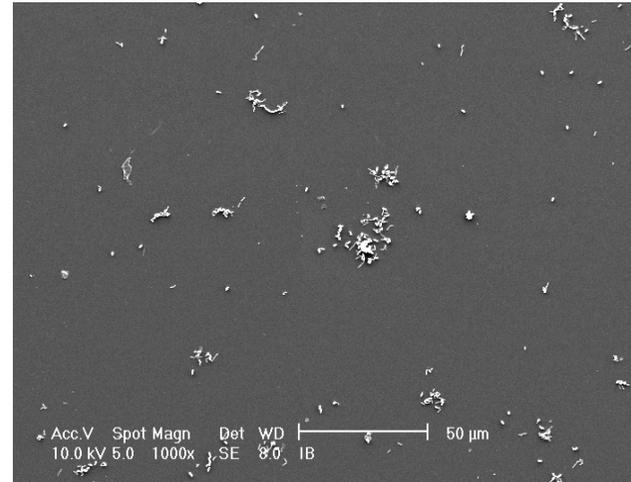
- essai sur différents supports : lamelle plastique, lamelle verre...



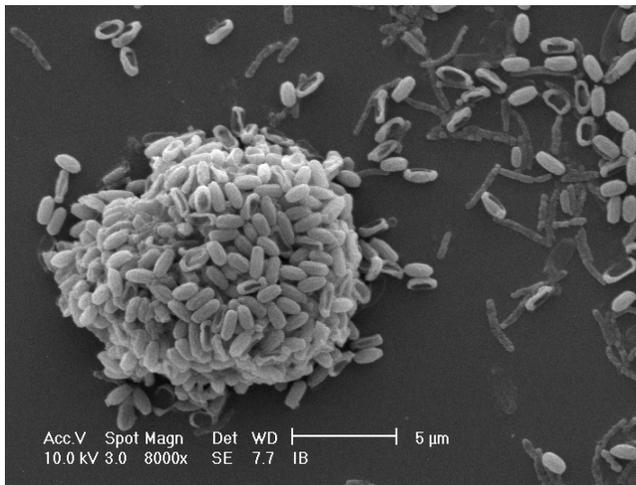
Hétérogénéité du dépôt : concentration, amas



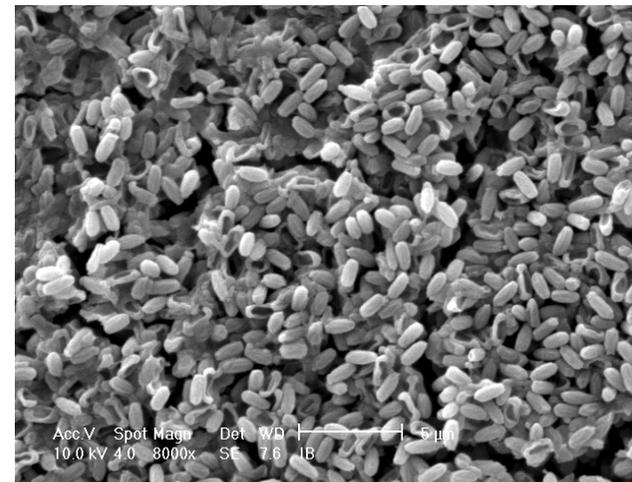
TP1ND01



TP310



TP1ND07



TP1ND03



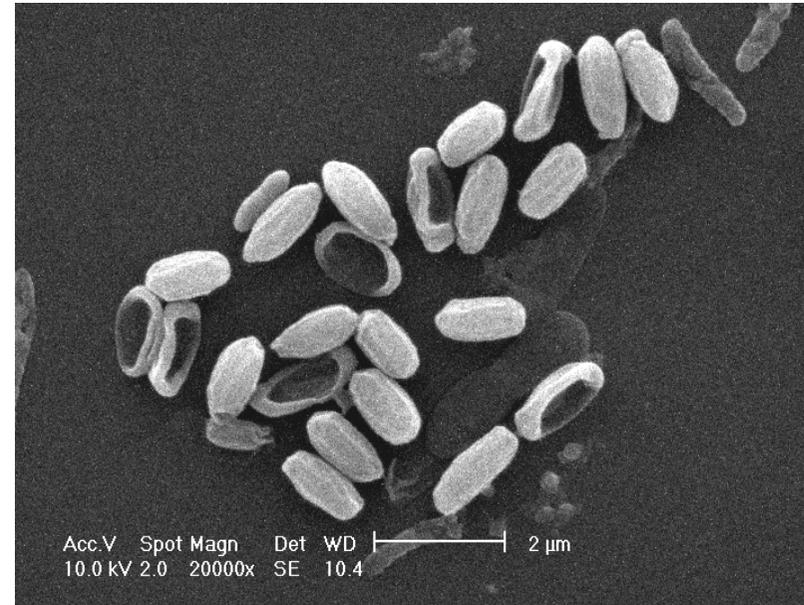
Pulvérisation de 100 µl sur la boîte – plusieurs lamelles observées

Témoin



T2plas02

Échantillon Flashé



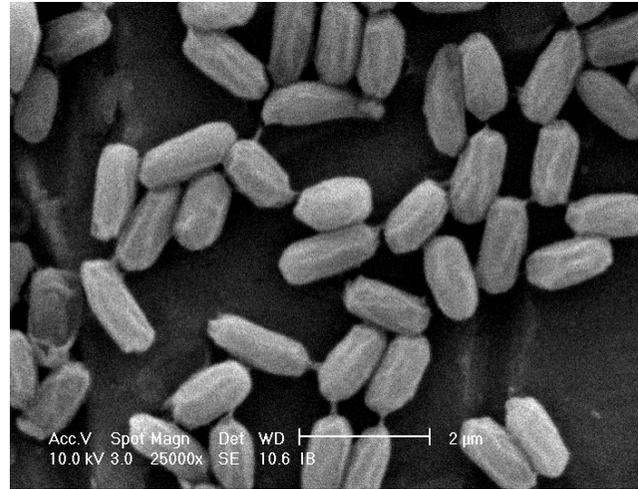
F1plas09

4 flash lampe à 7 cm ~3.6 joule/ cm²

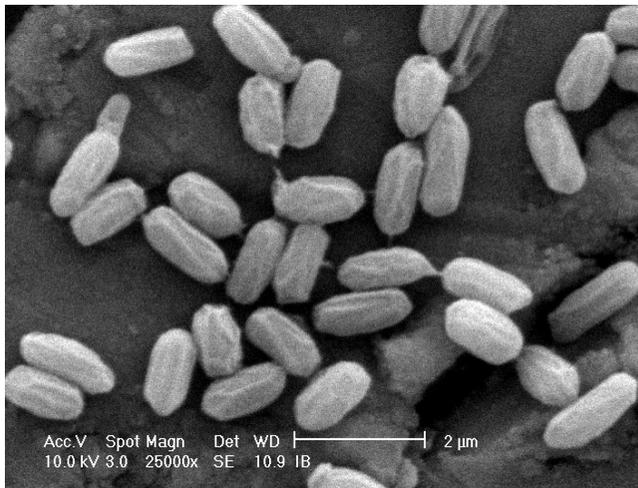
➡ Pas de différence significative entre témoin et flashé



Témoin



TWT02



UVWT02

UV continuus



Lpwt9f02

Lumière pulsée



Conclusion :

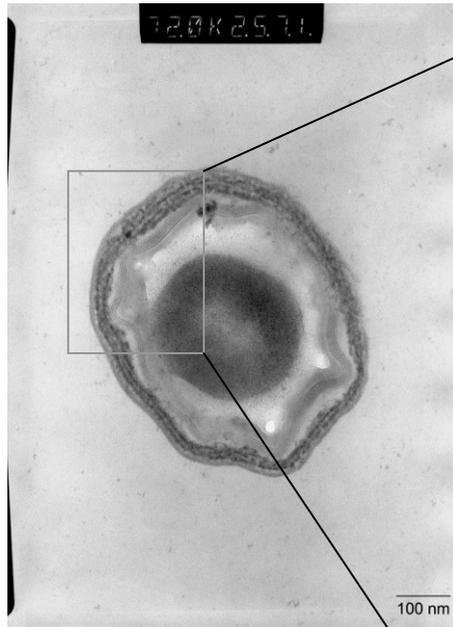
- Les différences ne sont sans doute pas visible au niveau de la surface mais plus tôt au niveau de la structure interne des spores



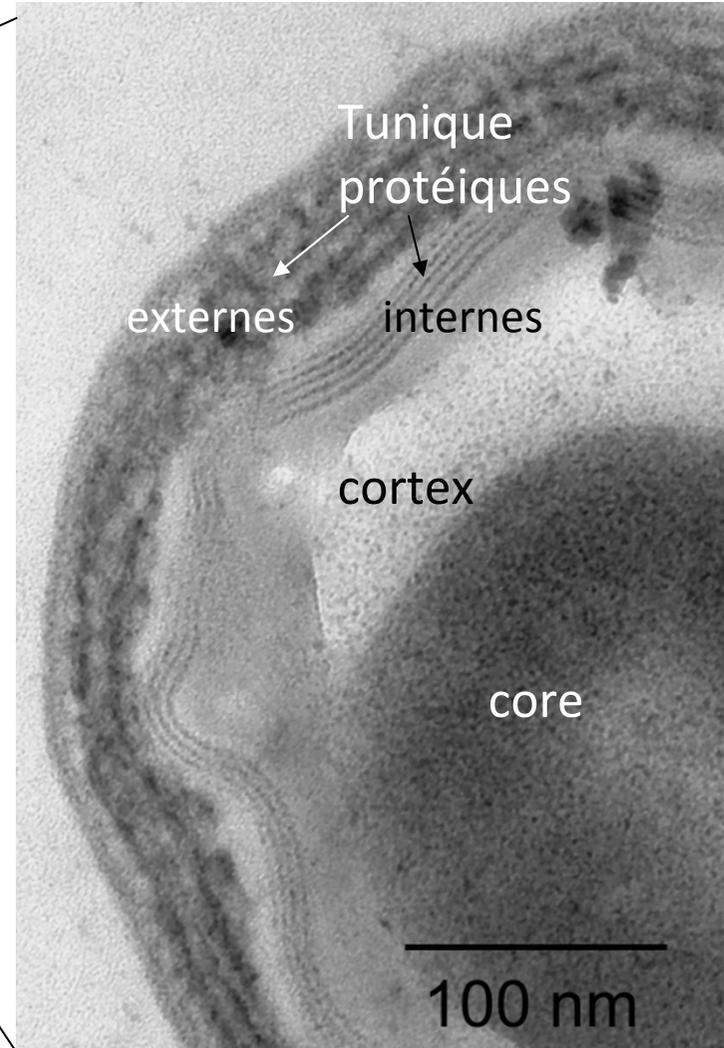
Essai en MET



MET :

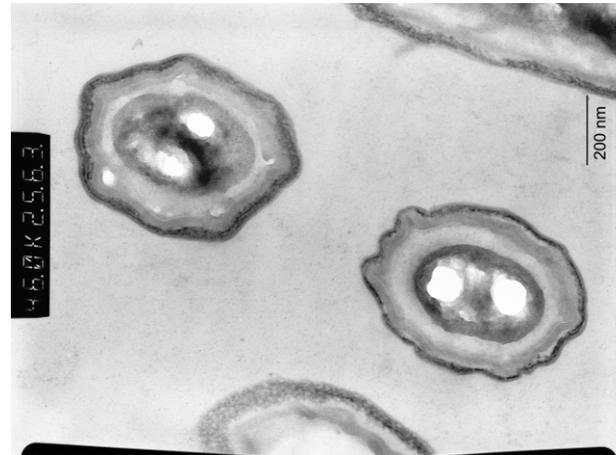


Coupe transversale

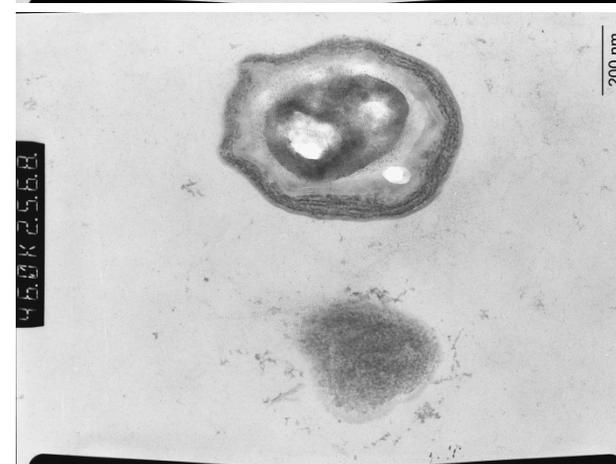




témoin



Lumière pulsée





Conclusion :

- Il semblerait qu'il y ait plus de « cœurs » seuls et de membranes isolées
- Mais il faudrait quantifier car lorsque les cellules sont intactes, il n'y a pas de différences

- Des essais ont également été réalisés à partir de Mutant cotE ou souche sauvage décoâtée (par traitement chimique)



Caractérisation d'une souche mutante du champignon *Botrytis cinerea*
Afin d'expliquer sa perte d'agressivité par rapport à la souche sauvage.

Approche histologique:
développement *in planta* d'un mutant résistant à la pyrrolnitrine

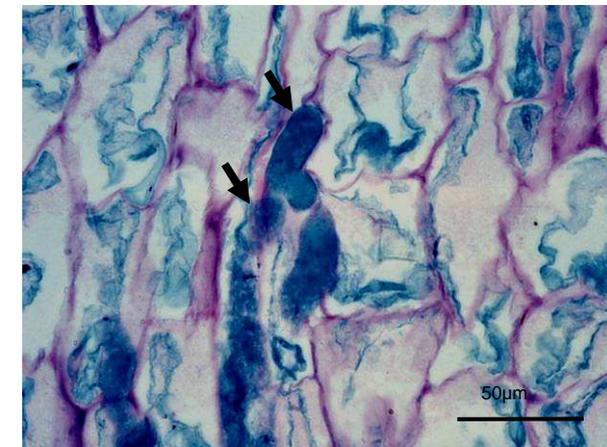
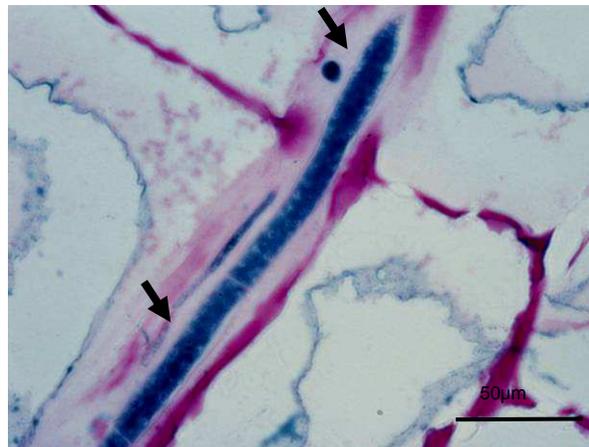
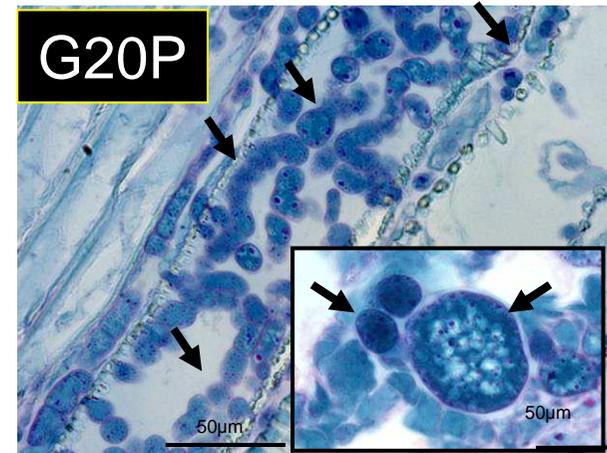
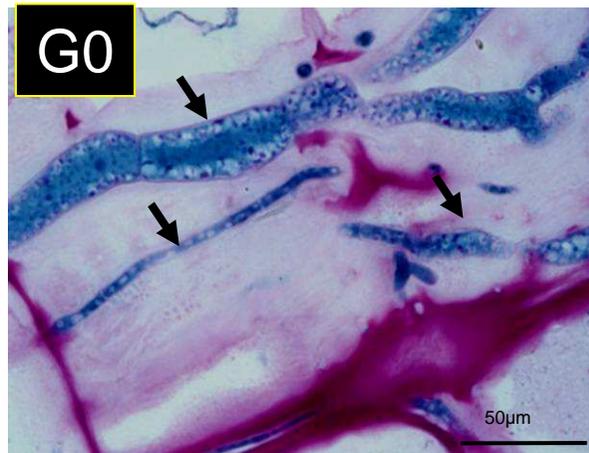
Comparaison de 2 souches : BC1G0 témoin sensible
et BC1G20P souche résistante



MO : *in planta*

Structure du mycélium à 72 heures

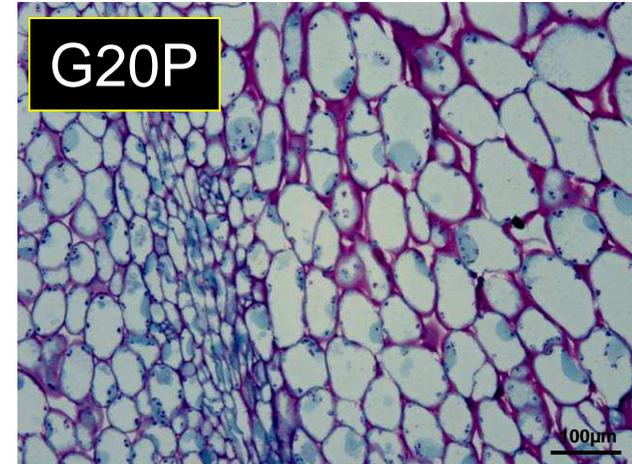
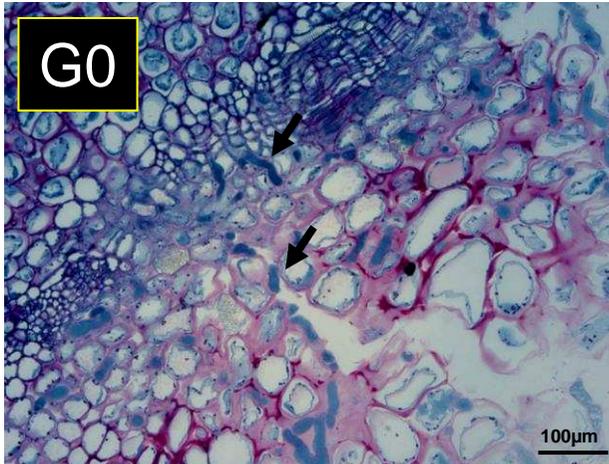
Développement
de BC1G0 et BC1G20P
in planta



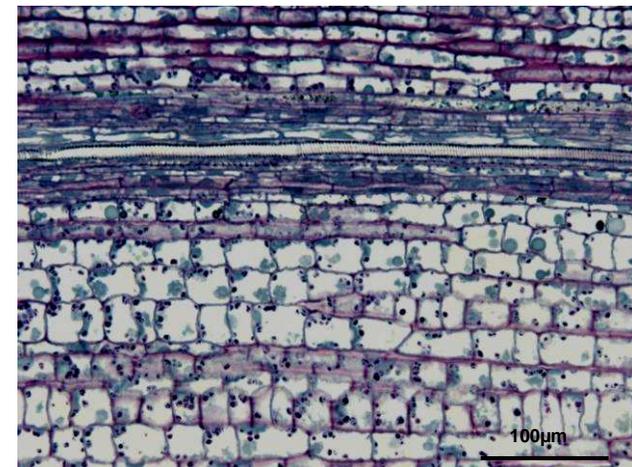
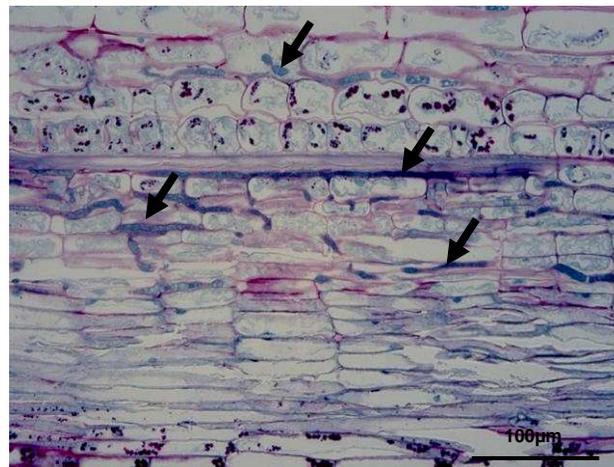


MO :

72H



120H



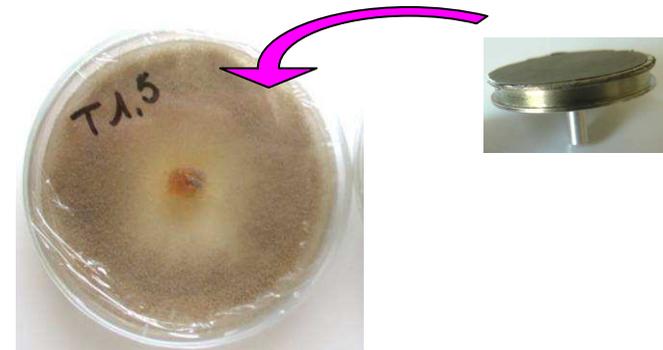
BC1G20P : Pas de croissance mycélienne dans la tige



MEB : Test in vitro

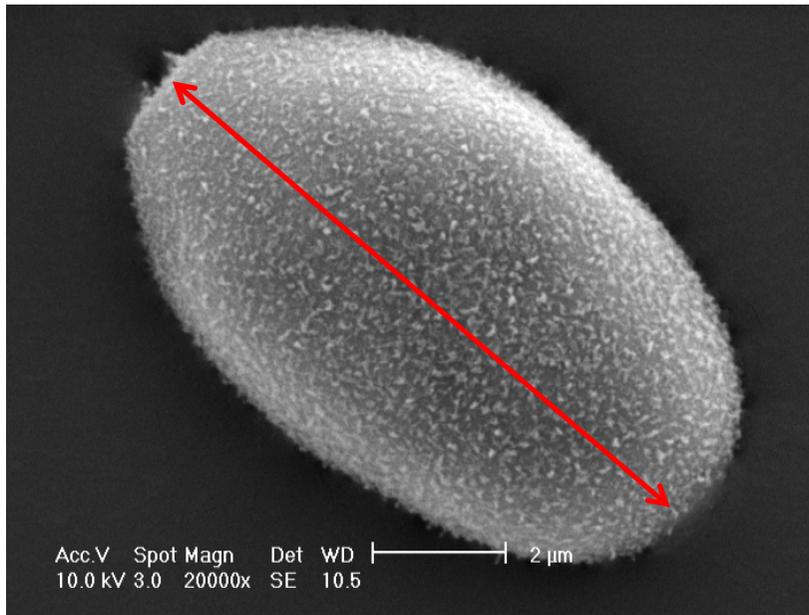
Caractérisation de la souche mutante :
spores, mycélium et étude du développement

1 - prélèvement direct du mycélium
et des spores à partir de la boîte de culture

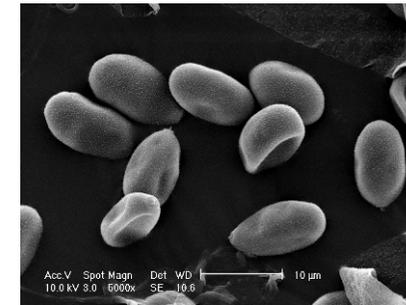




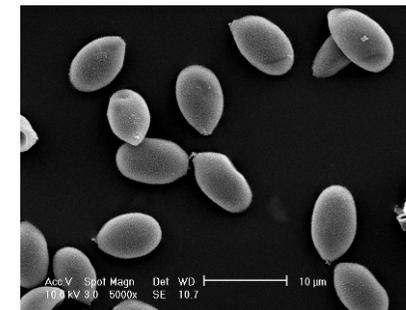
MEB : spores



spore de champignon



G0S12

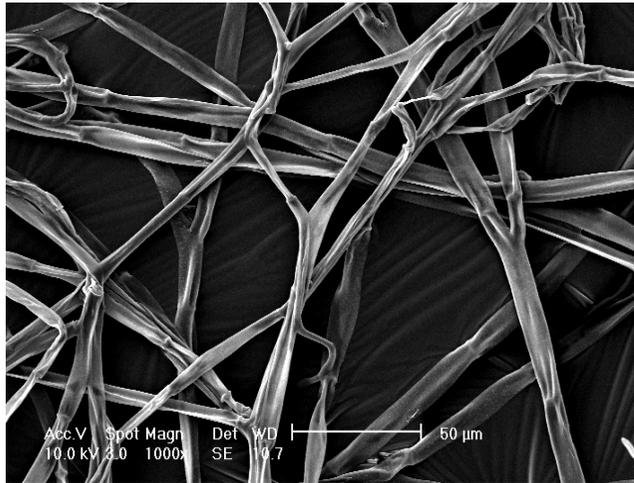


G20r12

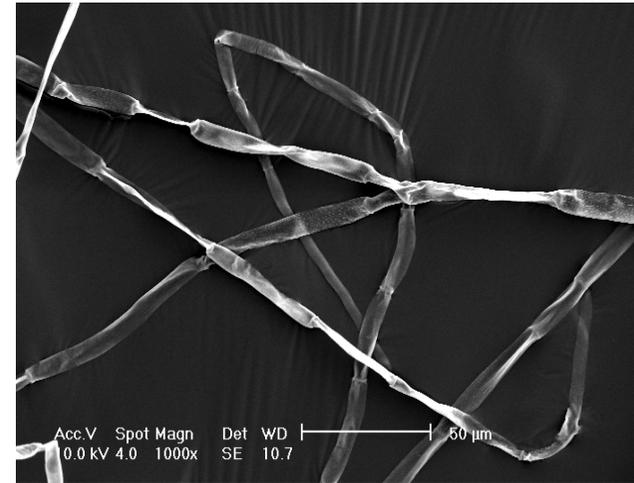
Une légère différence de taille de spores à été montré : G20P + petite



MEB : mycélium



8G03JP01



4G203J04

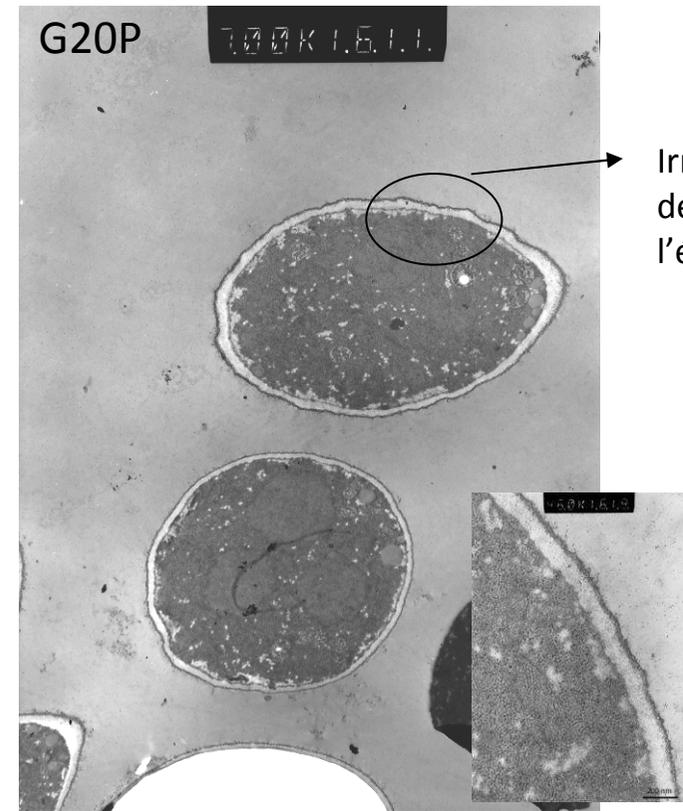
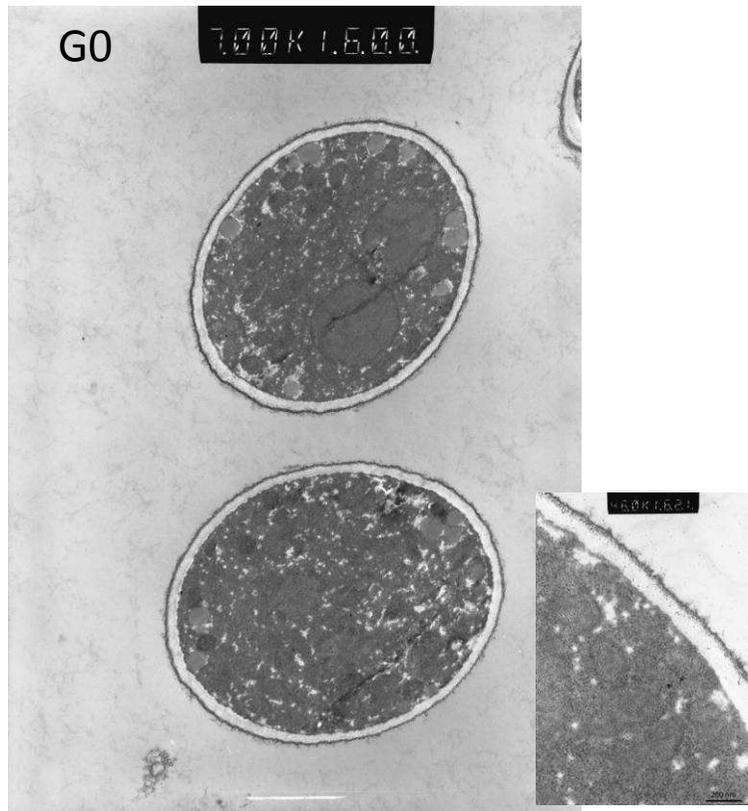
- Vide poussé : difficile pour échantillons fragile qui résistent mal aux traitements chimiques
- Amélioration de l'image après fixation chimique aux vapeurs d'oso4



Essai en MET



MET : comparaison de la taille et de l'ultrastructure des spores



Irrégularité
de
l'épaisseur

Besoin d'un grand nombre de photos pour mesures significatives : limites

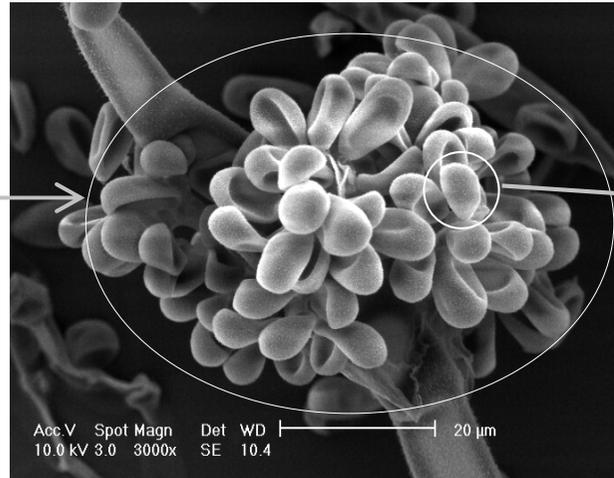


Microscopie optique

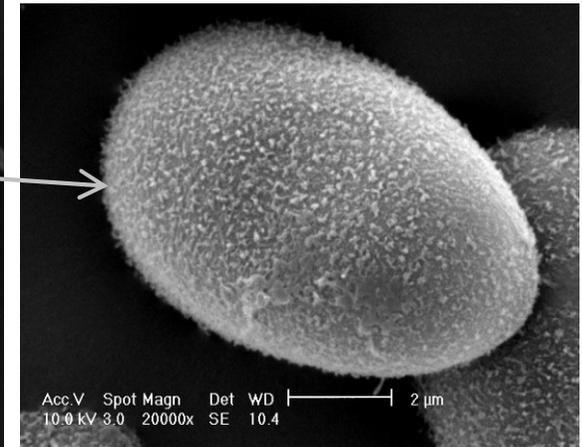


Loupe binoculaire

Microscopie électronique



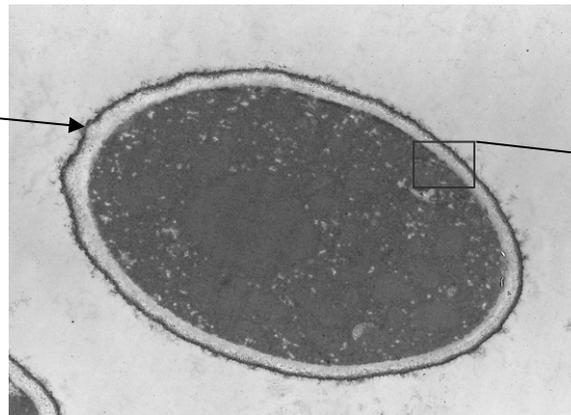
MEB



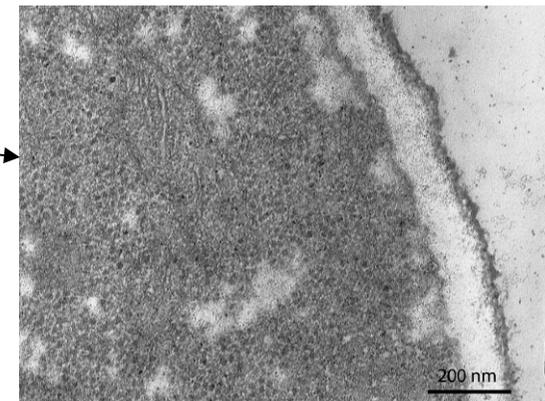
Zoom d'une spore



MO



MET





L'essai effectué a consisté à évaluer l'effet du champignon ***Coniothyrium minitans*** (matière active de CONTANS WG) sur l'infection, la dégradation et la destruction in vitro des sclérotes de ***Sclerotinia minor***, *agent pathogène majeur des cultures.*



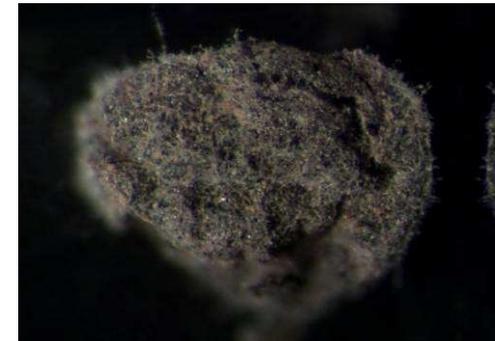


- **Qu'est-ce qu'un sclérote ?**

Un **sclérote** (du grec *sklêros* = dur) est un **organe de conservation** présent chez certains champignons.

C'est un **amas de filaments mycéliens** très serrés, qui sert à **stocker des nutriments**.

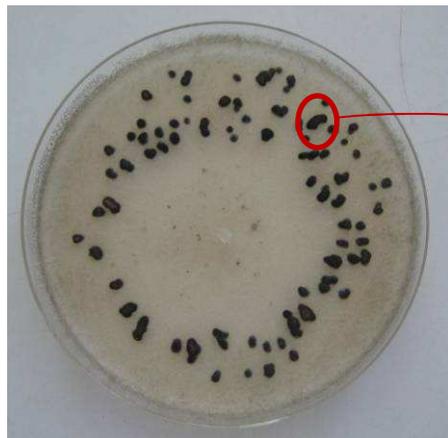
C'est une sorte de « **mode d'hibernation** » utilisé par certaines espèces afin de **cumuler l'énergie** nécessaire pour pouvoir **fructifier** lorsque les **conditions environnementales seront plus favorables** (après un hiver ou une période de sécheresse par exemple).



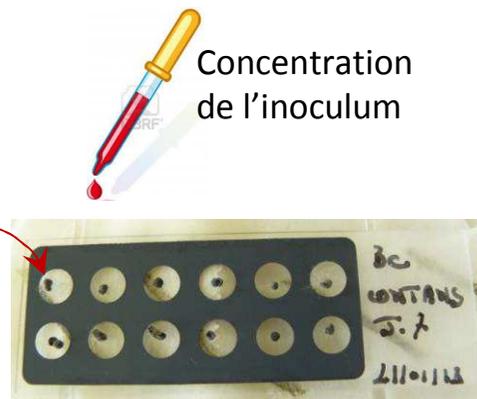


- Dispositif expérimentale pour validation in vitro :

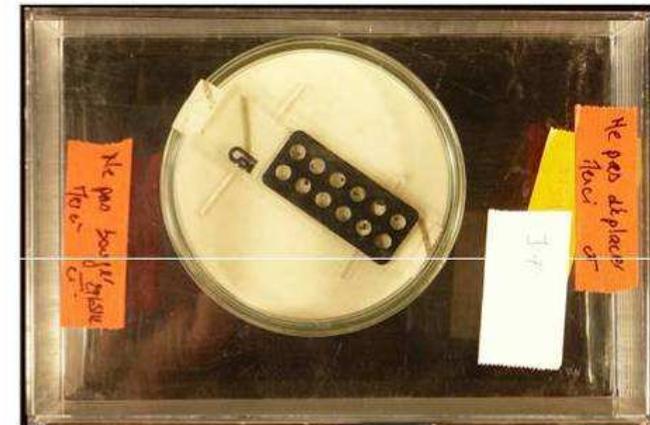
chambre climatisée à 21°C (photopériode 14h) pendant 4 semaines, temps nécessaire à la destruction totale des sclérotes.



Champignon sur milieu PDA en boite de pétri



5 μ l /sclérote
(10^5 spores/ml)

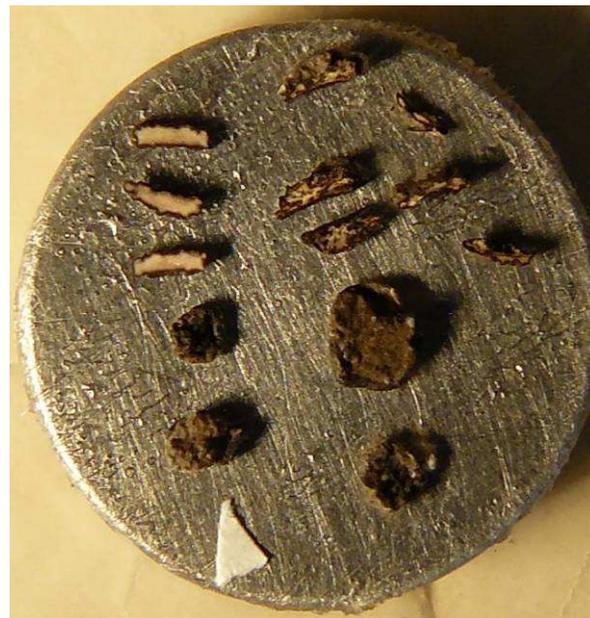


Réalisation d'une chambre humide stérile

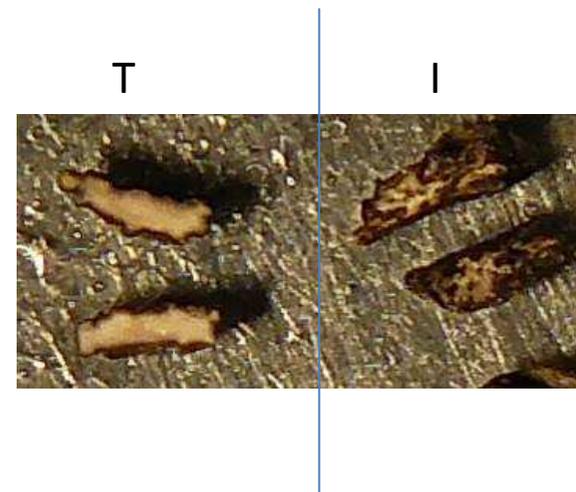


Les observations sont réalisées après 1, 4, 7, 14, 21 et 28 jours après inoculation
Sclérotés entiers et coupés

Sclérotés témoins (T) et/ou inoculés (I)

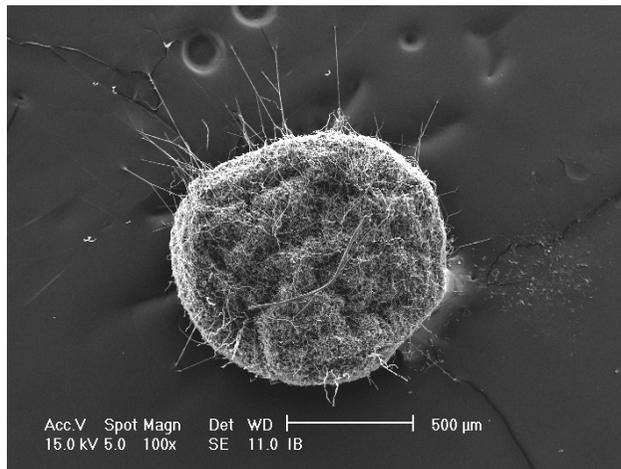


J28

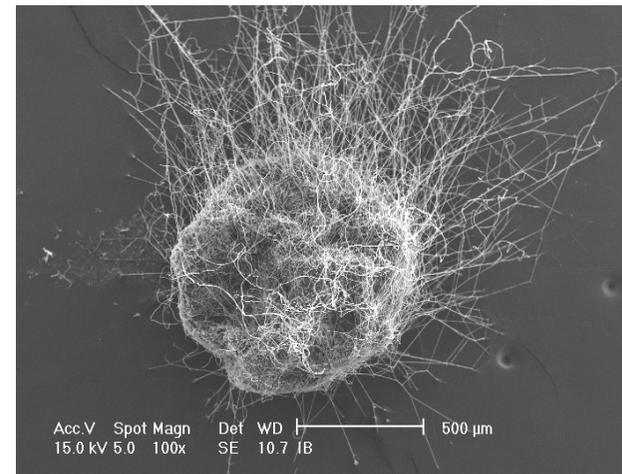




- Développement mycélien de *C. minitans* sur un sclérote de *S. minor*, après inoculation et incubation à 21°C



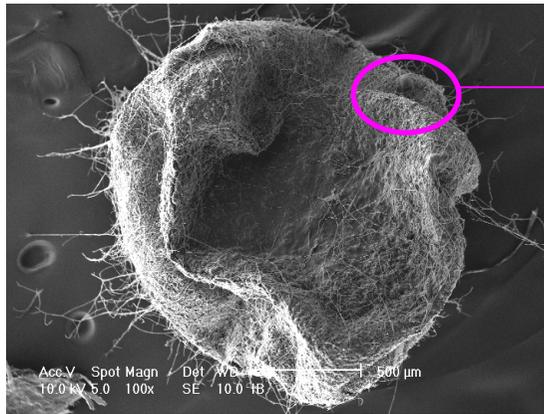
4 jours



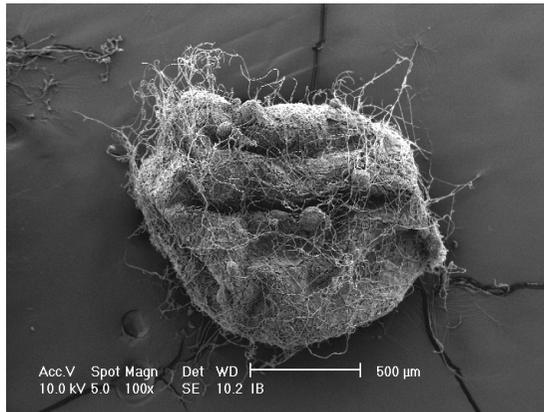
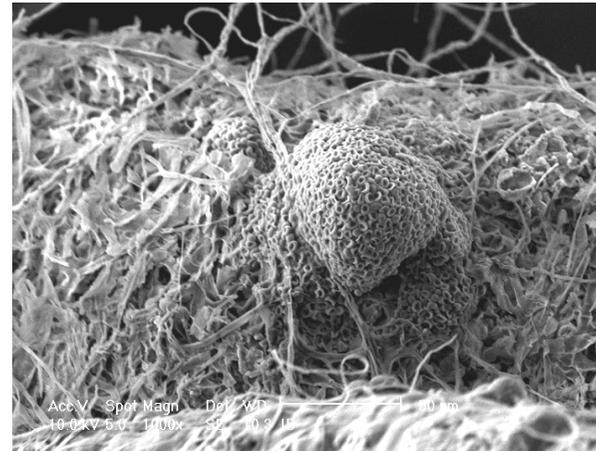
7 jours



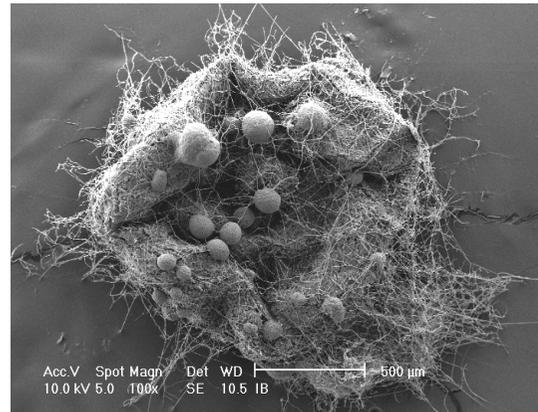
- Et apparition de Pycnides à la surface dès 14 jours :



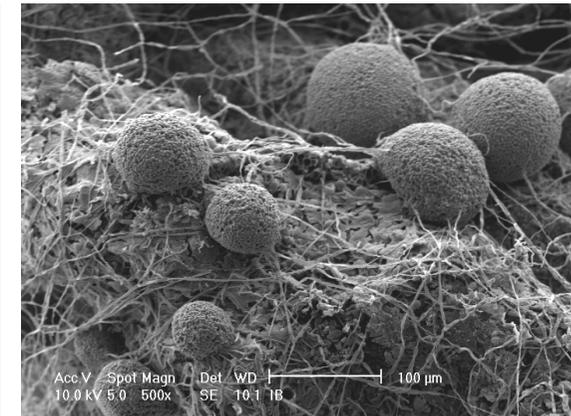
14 jours



21 jours



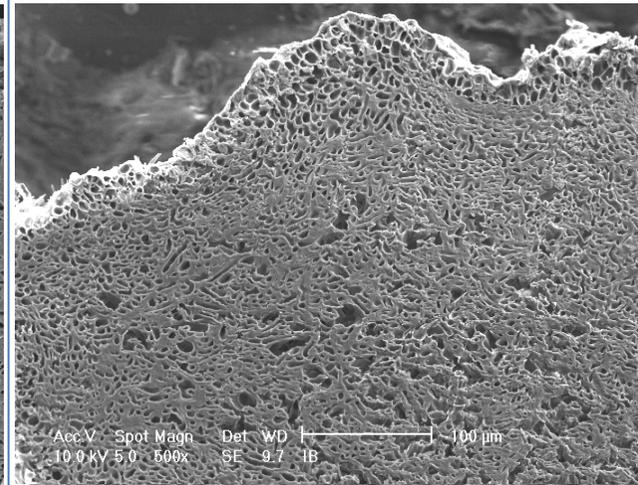
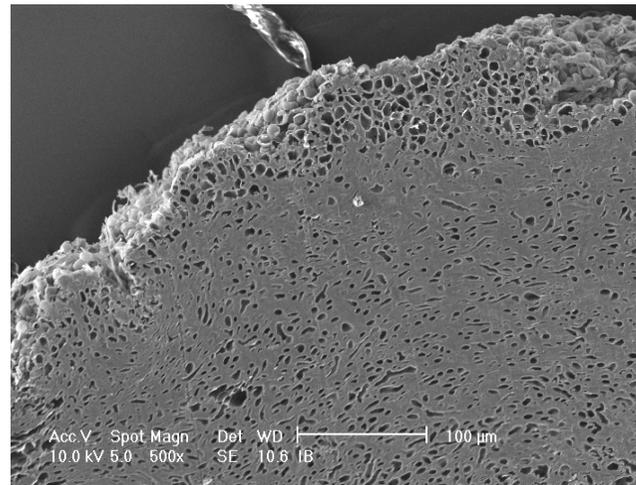
28 jours



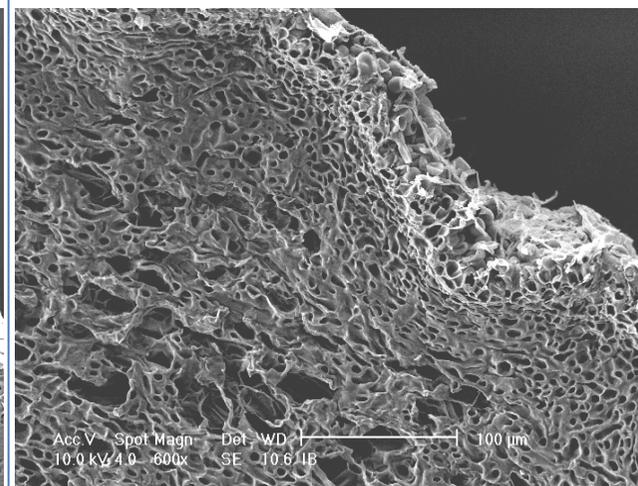
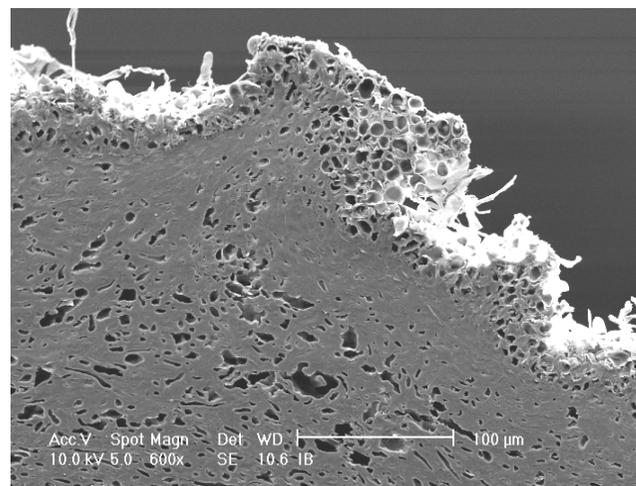


En coupe :

7 jours



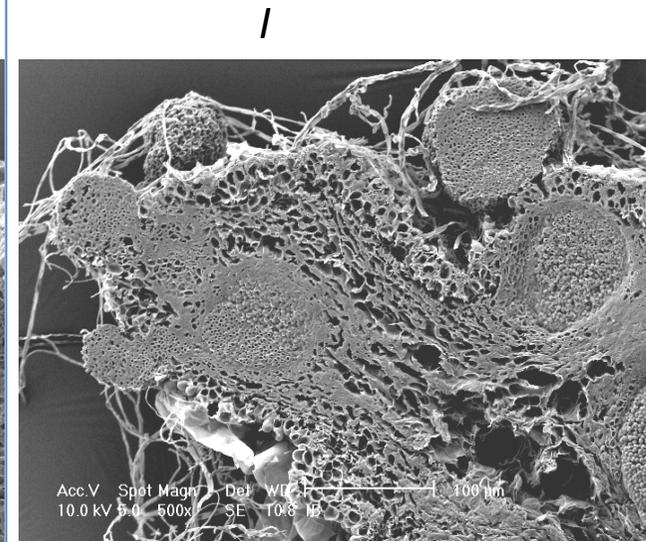
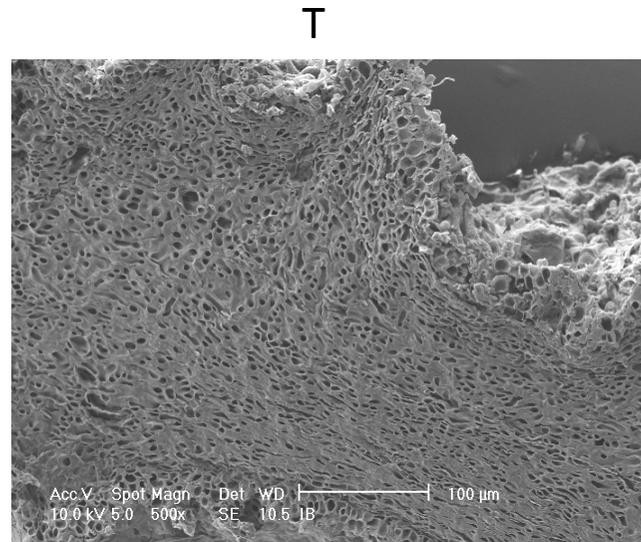
14 jours





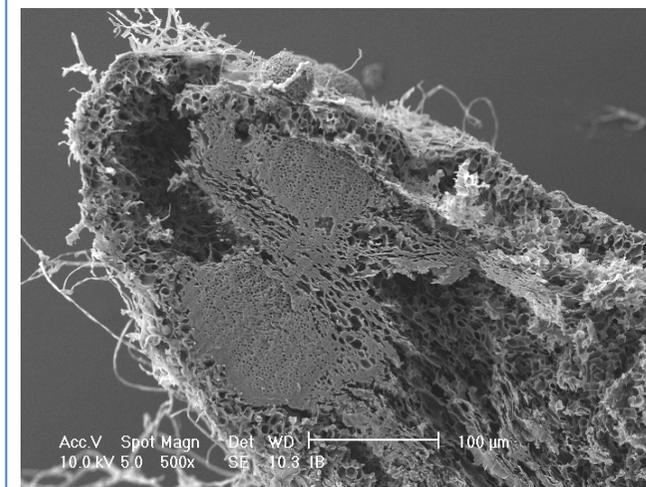
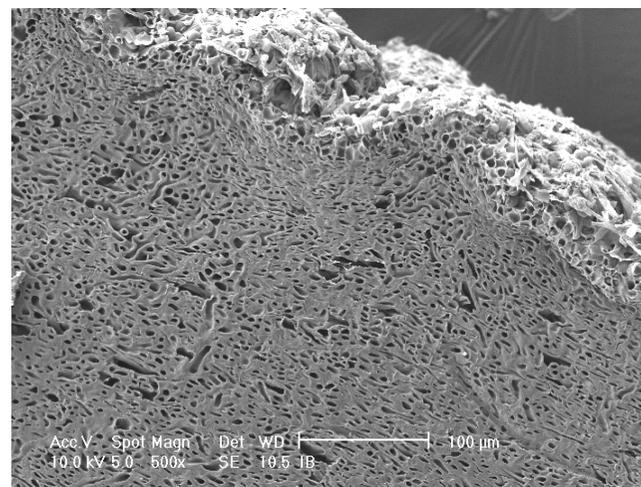
En coupe :

21 jours



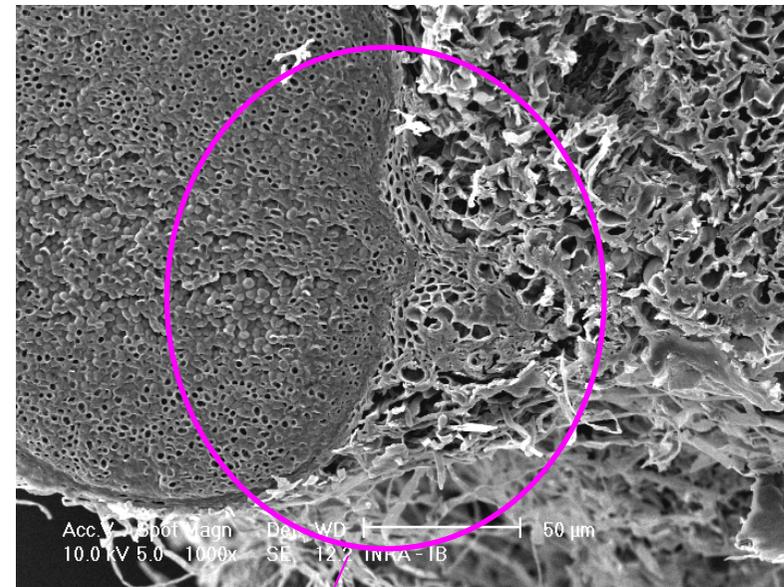
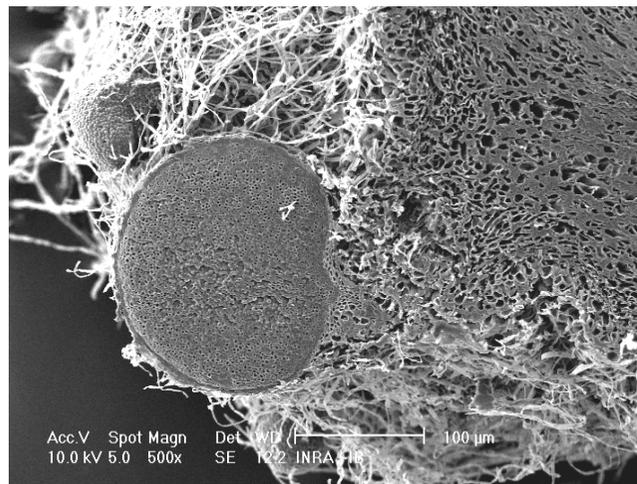
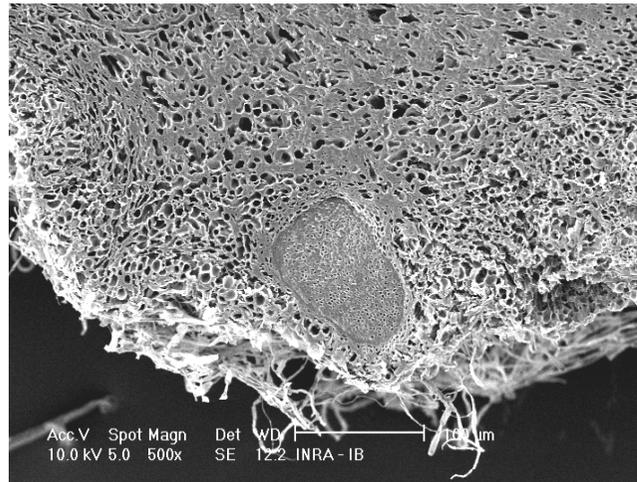
28 jours

*tissus internes
fortement dégradés*





Répétition avec vapeurs d'OSO4 : à 14 jours



Que ce passe-t-il à ce niveau là ?

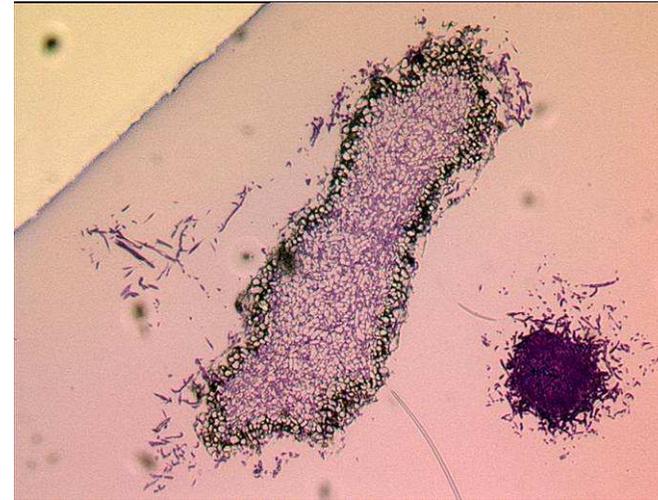
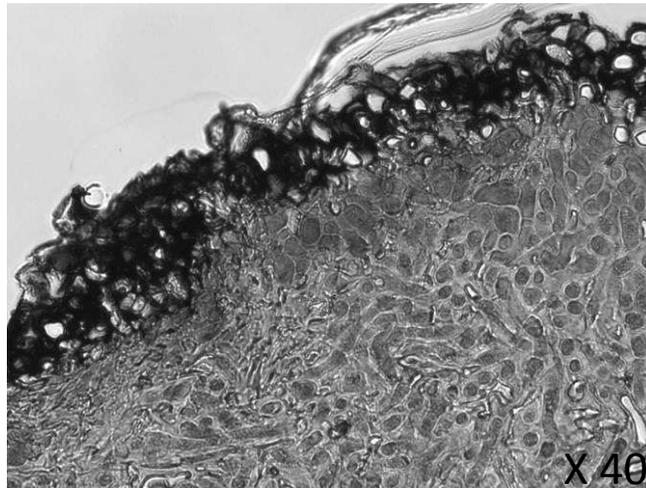
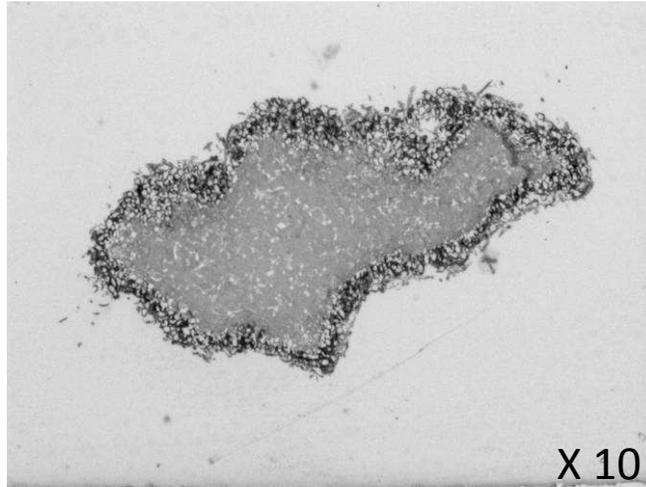


Essai en MET

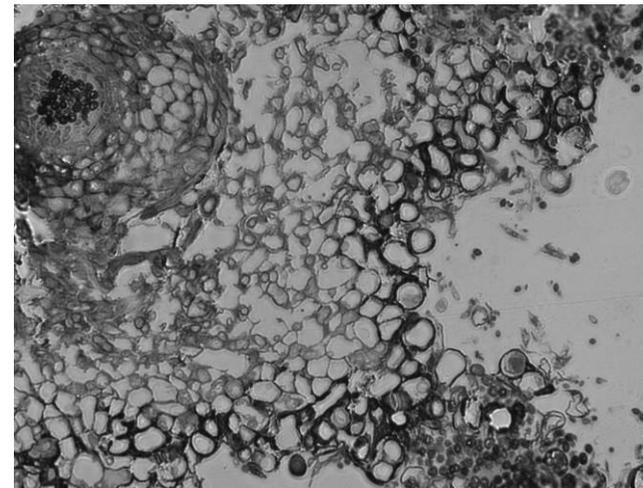


1^{er} essai d'inclusion des sclérotes: MO

Témoin

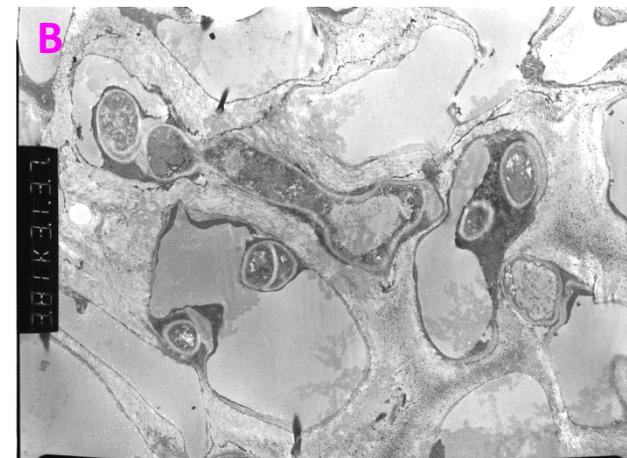
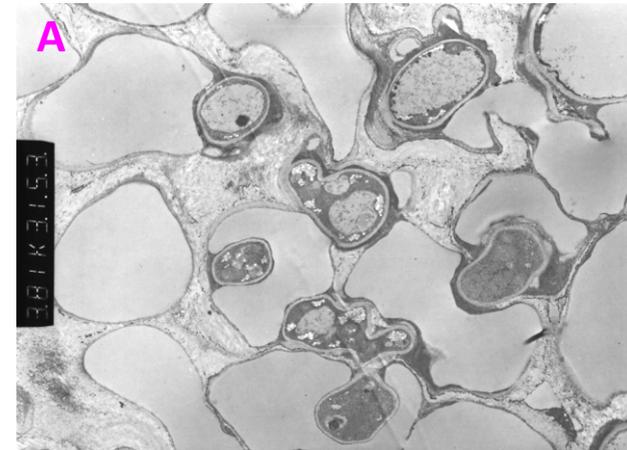
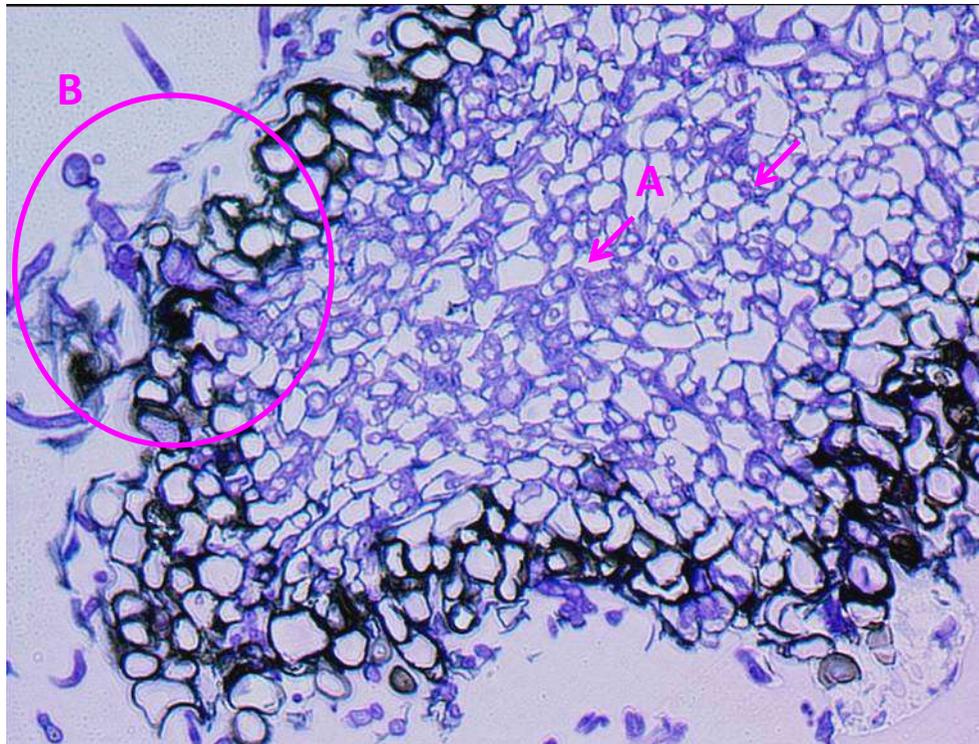


14 jours





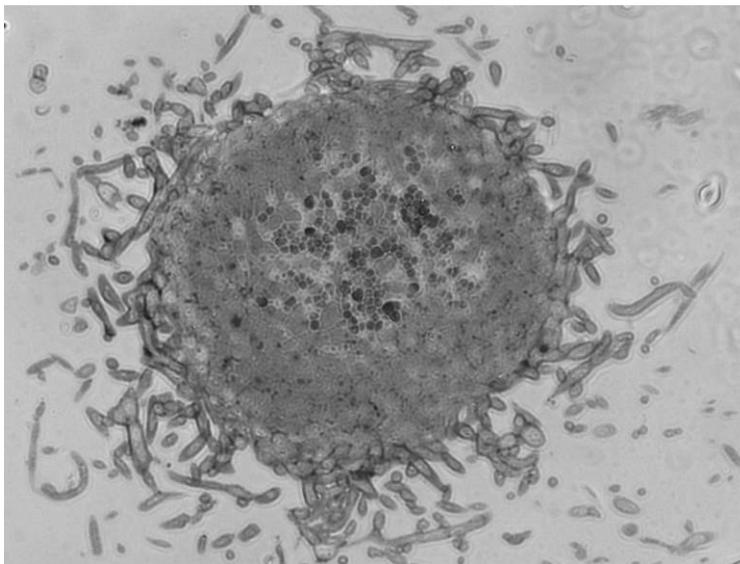
1^{er} essai d'inclusion des sclérotes à 14 jours



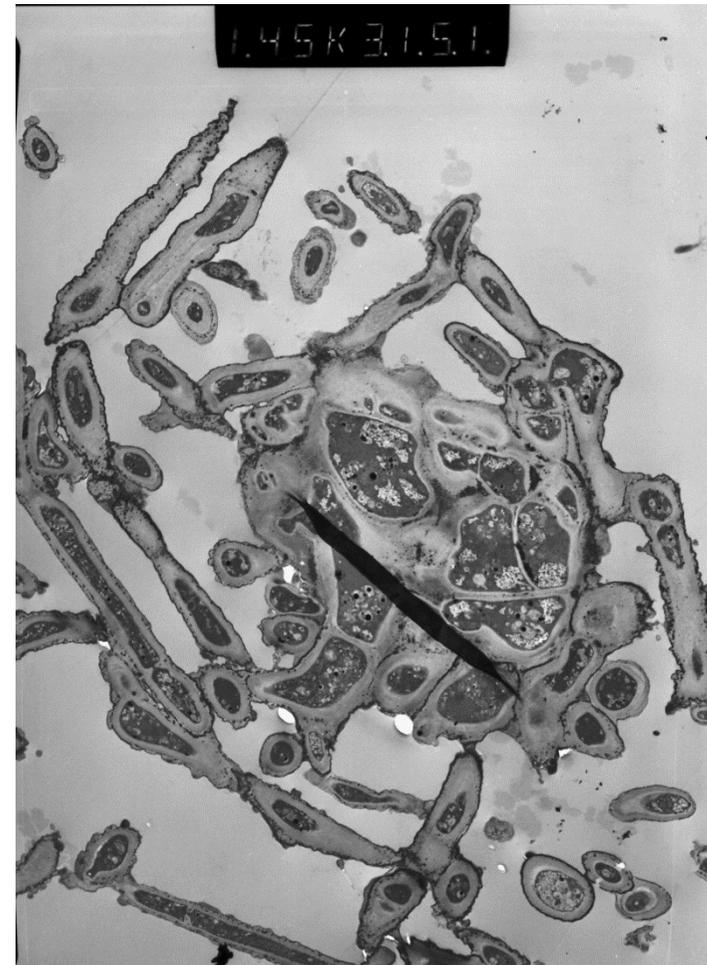
Coupes ultrafines assez fragiles. Observation à 7 jours nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'invasion et de destruction des sclérotes.



1^{er} essai d'inclusion des sclérotés à 14 jours



pycnides





Conclusion :

Ce travail met en évidence la capacité de *C. minitans* à parasiter les sclérotas de *S. minor*.

Les résultats suggèrent que ce parasitisme se met en place rapidement après le traitement des sclérotas *in vitro*.

A partir de 14 jours des pycnides se développent sur les sclérotas produisant ainsi des centaines de conidies (MEB) et le *traitement a un effet sur les tissus internes des sclérotas sûrement avant 14 jours. (Etude MET en cours)*

