



Sommaire

SPONSORS	page 2
PROGRAMME	page 3
COMMUNICATIONS ORALES	page 7
POSTERS	page 33
LISTE DES PARTICIPANTS	page 42





SPONSORS



FRANCE-BIOIMAGING



PHOTON IS OUR BUSINESS





11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

JST 2022 RENNES

11^{èmes} journées Scientifiques et Techniques du Rµi

« Imagerie du chromosome à l'organisme entier »

Du mercredi 23 au Vendredi 25 Novembre 2022

Lieu : Pôle Numérique de Beaulieu - Université de RENNES 1

PROGRAMME

Mercredi 23 Novembre

12h00-13h00 : Accueil des participants : distribution des badges, documents, mise en place des posters

Introduction des journées

13h15-13h30 : Introduction des JST (Membre du COPIL)

13h30-13h45 : Biogenouest - présentation Axe Bio-Imagerie (Laurence DUBREIL - INRAE ONIRIS-NANTES)

13h45-14h00 : Présentation de France Bioimaging : Nœud Bretagne-Loire (Marc TRAMIER-CNRS-RENNES)

SESSION 1. CARACTERISATION DU MICROENVIRONNEMENT TISSULAIRE GRACE A LA TECHNOLOGIE D'IMAGERIE MULTIPLEXEE.

Modérateur : Marc Tramier

14h00-14h20 : Microscopie multimodale sans marquage pour l'étude d'échantillons biologiques pour le préclinique. (Anthony SEBILLOT - Biogenouest SFR Biosit RENNES)

14h20-14h40 : Automatisation de la microscopie de fluorescence pour le suivi et l'analyse de la progression des cellules dans le cycle cellulaire. (Julia BONNET-GÉLÉBART - CNRS UMR IGDR RENNES)

14h40-15h00 : Le CellDIVE, une méthode d'imagerie hyperplexe pour une cartographie spatiale des biomarqueurs. (Alain FAUTREL PF H2P2 RENNES)

Temps d'échange (5')

15h00 - 15h30 : *Pause-café*

SESSION 2. IMAGERIE 3D D'ECHANTILLONS EPAIS APRES TRANSPARISATION.

Modérateur : Laurence Dubreuil

15h30 - 15h50 : La transparisation des échantillons épais : pourquoi, comment ? (Manon THOMAS INRAE UR LPGP RENNES)



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

15h50 - 16h10 : Utilisation de l'imagerie 3D pour étudier le développement ovarien chez le Médaka (Violette THERMES – INRAE LPGP RENNES)

16h10 - 16h30 : Caractérisation des tissus adipeux chez la truite arc-en-ciel par imagerie 3D (Isabelle HUE – INRAE LPGP RENNES)

Temps d'échange (10')

16h40 - 17h15 : Pitch des partenaires 5' (FRANCE SCIENTIFIQUE, NIKON, LFG, HAMAMATSU, JEULIN, DIAGOMICS, MILEXIA, HIROX, KAER LABS)

17h15 – 18h30 : Séance posters - Stands fournisseurs

Cocktail puis soirée libre

Jeudi 24 Novembre

SESSION 3. APPORT DE L'INTELLIGENCE ARTIFICIELLE POUR L'ANALYSE QUANTITATIVE DES IMAGES.

Modérateur : David Legland

8h30 - 8h50 : Evolution des méthodes d'analyse d'images en microscopie avec l'arrivée du Deep-Learning (Thierry PECOT – UR1 BIOSIT RENNES)

8h50- 9h10 : L'Intelligence Artificielle pour segmenter facilement les images biologiques (Jérôme BUGEON – INRAE LPGP RENNES)

9h10 - 9h30 : Mise en application d'algorithmes *open-source* de *Deep-Learning* pour l'analyse d'images 3D d'ovaires de Médaka (Manon LESAGE – INRAE LPGP RENNES)

Temps d'échange (5')

SESSION 4. L'IMAGERIE AVEC OU SANS MODULE APOTOME APPLIQUEE A LA RECHERCHE SUR LES ANIMAUX DE RENTE.

Modérateur :

9h35-9h45 : Présentation générale de la technologie d'imagerie avec ou sans module ApoTome (Sandra WIART-LETORT - INRAE UMR PEGASE SAINT GILLES)

9h45-10h05 : Caractérisation d'organoïdes intestinaux porcins par étude morphologique et par typage cellulaire sur coupes (Gwénaëlle RANDUINEAU - INRAE UMR NUMECAN St-GILLES)

10h05-10h25 : *Pause-café*



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

10h25-10h45 : Appréhender le fonctionnement de la glande mammaire (en développement, lactation ou tarissement) chez le bovin par le typage des cellules mammaires en microscopie (Laurence Finot- INRAE UMR PEGASE SAINT GILLES)

10h45-11h05 : Immunohistologie sur tissu mammaire de chèvres laitières soumises à des régimes alimentaires supplémentés avec un acide aminé. (Sandra WIART-LETORT - INRAE UMR PEGASE St-GILLES)

Temps d'échange (5')

11h10-11h50 : Assemblée Générale du Réseau (coordinateurs du Réseau)

11h50-12h30 : Séance posters, Stands expositions fournisseurs

12h30-13h30 : Buffet

13h45 : Départ des bus pour les ateliers (au choix) (inscriptions obligatoires)

Atelier 1 : Site INRAE RENNES

Présentation du plateau d'histologie et d'imagerie 2D/3D.

L'atelier se déroulera sous la forme d'exposés sur la transparence, l'acquisition d'image au confocale, ainsi qu'une visite des équipements accompagnée de démonstrations (transparence, confocal, analyse d'images).

Atelier 2 : Site INRAE LE RHEU

Présentation de la plate-forme de Cytogénétique Moléculaire Végétale

L'atelier se déroulera sous la forme de présentation des différentes prestations FISH chez les plantes proposées sur la PF ainsi qu'une partie pratique « les chromosomes dans tous leurs états » avec la préparation de lames de chromosomes en mitose et méiose. Visite des équipements.

Atelier 3 : Site INRAE ST GILLES

Présentation de l'atelier Histologie

L'atelier se déroulera sous la forme d'animations autour du cycle de vie d'un échantillon inclus en paraffine ou inclus en OCT congélation, de la coupe en passant par la coloration avec l'automate Gemini AS jusqu'à l'obtention de l'image avec le microscope Zeiss équipé du module ApoTome. Visite et démonstration.

16h30 : Départ Bus pour le centre-ville de Rennes

VISITE GUIDÉE DU PARLEMENT DE BRETAGNE (1h30) inscriptions obligatoires



Groupe 1 : 17h45-19h15

Groupe 2 : 18h-19h30



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

Dîner de gala au restaurant La Chope à 20h (inscriptions obligatoires)



3 Rue de la Chalotais, 35000 Rennes

Vendredi 25 Novembre

8h30-8h45 : Restitution des ateliers

SESSION 5. L'IMAGERIE MULTI-ECHELLE APPLIQUEE AUX PRODUITS AGRICOLES ET ALIMENTAIRES ET LA CONSTRUCTION DE LEUR STRUCTURE

Modérateur :

8h45-9h05 : Multi-scale characterization of food matrices using a combined MRI and confocal and multiphoton microscopy approach; focus on bread and vegetable tissues (Nanci CASTANHA – INRAE UMR OPAALE RENNES)

9h05-9h25 : Multi-scale characterization of food matrices using a combined MRI and confocal and multiphoton microscopy approach; focus on bread and vegetable tissues (Héliciane Clément - INRAE UMR OPAALE RENNES)

9h25-9h45 : Apport de la microscopie confocale pour les caractérisations de matrices (Marie-Hélène FAMELART - INRAE UMR STLO RENNES)

9h45-10h05 : *Pause-café*

10h05-10h25 : Digestion des aliments chez l'Homme : Comment la microscopie aide à comprendre l'évolution des structures dans le tube digestif (Steven Le Feunteun - INRAE UMR STLO RENNES)

10h25-10h45 : Apport de la microscopie confocale pour la microbiologie. (Eric GUEDON- INRAE UMR STLO RENNES) (TEM, SEM, AFM, confocal et epifluorescence + Cryo-EM)

Temps d'échange (5')

SESSION 6. L'IMAGERIE MULTI-ECHELLE CHEZ LES PLANTES

Modérateur : Olivier Coriton

10h45-11h20 : De l'intérêt des approches de microscopie confocale à l'étude du polyphénisme de reproduction chez le puceron (Stéphanie LE BRAS – INRAE UMR IGEPP Le RHEU)

11h20-11h40 : Etude par microscopie confocale du cycle infectieux d'*Aphanomyces euteiches* dans des racines de lignées quasi-isogéniques de pois protéagineux (*Pisum sativum*) (Théo LEPREVOST – INRAE UMR IGEPP Le Rheu)

11h40-12h15 Remise prix Poster - Conclusions des journées

- Récupération des questionnaires d'évaluation, des badges
- Clôture des journées
- *Panier repas*



Communications Orales



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

Interventions du Mercredi 23 Novembre 2022



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

L'axe Bio-Imagerie du réseau interrégional Biogenouest

Laurence Dubreil

INRAE UMR703 PAnTher INRAE Oniris

laurence.dubreil@oniris-nantes.fr

Biogenouest est un réseau interrégional de plates-formes technologiques en sciences du vivant et de l'environnement. Ce Groupement d'Intérêt Scientifique (G.I.S) fédère des unités de recherche dans le Grand Ouest et coordonne 37 plates-formes technologiques ouvertes à l'ensemble de la communauté scientifique (publique et privée). Il soutient la recherche en sciences du vivant et de l'environnement en coordonnant les plates-formes technologiques regroupées selon 6 axes : génomique, protéomique, exploration fonctionnelle, analyse structurale et métabolomique, bio-informatique et bio-imagerie. L'axe bio-imagerie comprend 11 plateformes MRic (Rennes), PRISM (Rennes et Angers), H2P2 (Rennes), MicroPicell (Nantes), Neurinfo (Rennes), PFCMV (LE Rheu), APEX (Nantes), Merimage (Roscoff), Hyperion (Brest), Platimed (Brest). Ces plateformes développent des expertises complémentaires en imagerie pour une exploration multiéchelle et multimodale, de la molécule à l'organisme entier.



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

Nœud Bretagne-Loire de l'infrastructure nationale France Bio-Imaging

Marc Tramier^{*a, b}

^a IGDR UMR6290 CNRS/Univ Rennes

^b Plateforme MRic, US Biosit, CNRS/INSERM/Univ Rennes,

* marc.tramier@univ-rennes1.fr

Le nœud Bretagne-Loire est constitué de trois plates-formes d'imagerie cellulaire et tissulaire H2P2, MicroPICell et MRic-de l'axe Bio-imagerie du GIS Biogenouest et des équipes R&D qui soutiennent les activités de ces plates-formes (IGDR, Numecan, Cesam, Serpico@IRISA, LS2N). Localisées à Nantes et à Rennes, les trois plates-formes sont labellisées IBiSA et leurs expertises en imagerie du vivant et en anatomie pathologique sont complémentaires. Toutes ont déjà une forte expérience de la mutualisation et du travail en commun au sein de Biogenouest. Le nœud ainsi constitué se donne pour mission de mettre à disposition les dernières avancées technologiques et méthodologiques en microscopie pour une compréhension intégrée des activités cellulaires et tissulaires en recherche préclinique. Il présente une expertise dans le transfert de technologie et en recherche translationnelle et bénéficie d'un environnement scientifique privilégié du fait de son adossement aux Centre Hospitaliers Universitaires.

Marc Tramier est Ingénieur de recherche hors classe au CNRS. Pionnier de la technique de Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) en France et responsable de l'équipe Microscopie for Cell Biosensing à l'Institut de génétique et développement de Rennes1 où il développe des techniques et des méthodes de microscopie de fluorescence quantitative appliquées à la biologie cellulaire, il est également directeur scientifique de la plateforme Microscopy Rennes Imaging Centre (MRic) et coordinateur du nœud Bretagne-Loire de l'infrastructure nationale France Bio-Imaging.



Microscopie multimodale sans marquage pour l'analyse d'échantillons biologiques lors d'évaluation préclinique

^{abcd} Anthony Sébillot, ^e Sébastien Core, ^d Karl Rouger, ^e Marie-Dominique Galibert, ^d Laurence Dubreil, ^b Alain Fautrel, ^b Nicolas Mouchet, ^a Stéphanie Dutertre, ^a Xavier Pinson, ^c Philippe Hulin, ^c Steven Nedellec, ^d Mireille Ledevin, ^d Thibaut Larcher, ^f Thierry Pécot, ^c Perrine Paul-Gilloteaux and ^a Marc Tramier

^a Plateforme de microscopie de Rennes (Mric), UMS CNRS 3480-US INSERM 018, Université de Rennes 1, Biosit, Rennes, Fra

^b Plateforme histopathologie haute précision (H2P2), Université de Rennes 1, Biosit, Rennes, Fra

^c Plateforme MicroPICell, SFR-Santé, INSERM, CNRS, Université de Nantes, CHU Nantes, Nantes, Fra

^d UMR703 PAnTher APEX : Expertise en anatomie pathologique pour la recherche, INRAE/ONIRIS - La Chantrerie, Nantes, Fra

^e CNRS, IGDR, UMR6290, Université de Rennes 1, Rennes, Fra.

^f Guichet analyse d'images, Biosit, Rennes, Fra

* anthony.sebillot@univ-rennes1.fr

L'analyse d'échantillons biologiques complexes est un défi technologique et la combinaison des modalités d'imagerie permet de corréler des informations complémentaires sur le contenu d'un même échantillon.

Nous avons investigué des modèles 3D (sphéroïde) et du tissu musculaire en utilisant l'imagerie corrélée, multimodale et sans marquage pour créer une vue composite du même spécimen avec un traitement d'images spécifique.

Deux champs d'application ont été abordés; le mélanome cutané et la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Notre objectif sur l'application mélanome cutané a consisté à identifier des marqueurs pour aider à la compréhension des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées (BRAFi). Un changement métabolique des cellules vers une augmentation de la néosynthèse lipidique s'opère lors de la mise en place de cette résistance (Kemper K et al. 2014 ; Bristot IJ et al., 2020). Par approche de microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC), nous avons observé un phénotype différent des gouttelettes lipidiques dans les lignées sensibles et résistantes ou KO pour des facteurs de transcription impliqués dans l'agressivité et la résistance aux BRAFi. En utilisant une approche non destructive et sans marquage, nous avons également démontré l'intérêt de la cartographie chimique par microspectroscopie raman ainsi que celui de la microscopie multiphotonique de troisième harmonique (THG) pour la discrimination des lignées sensibles et résistantes.

La DMD est une maladie neuromusculaire progressive d'origine génétique qui entraîne une nécrose des fibres musculaires et une paralysie progressive. Elle est causée par des mutations ou des délétions dans le gène codant la dystrophine à l'origine de l'absence totale de la protéine. Il en résulte des cycles répétés de dégénérescence des fibres musculaires ainsi qu'une fibrose musculaire caractérisée par l'accumulation des protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène (Wynn TA et al., 2007, 2008). Dans ce contexte, nous avons démontré la pertinence de la cartographie spectrale raman pour explorer le tissu fibreux et caractériser son empreinte dans le modèle gros animal de la DMD représenté par le chien Golden Retriever Muscular Dystrophy. De plus, nous avons corrélé les biomarqueurs impliqués dans la discrimination des tissus sains et dystrophiques avec l'analyse phénotypique par approche immunohistopathologique et de microscopie multimodale corrélée: microscopie multiphotonique de seconde harmonique (SHG), technique de rupture d'orthogonalité de polarisation (PolarBio). Cette approche multimodale, par combinaison de la microspectroscopie raman, des signaux de fluorescence et d'harmoniques, du DIC et des analyses histopathologiques, représente un intérêt réel pour bénéficier de la complémentarité des informations et augmenter la sensibilité pour qualifier un état tissulaire complexe tel qu'un muscle pathologique.

Références :

Metabolic rewiring in melanoma drug-resistant cells. Bristot IJ, Dias CK, Chapola H, Parsons RB, Klamt F. Crit Rev Oncol Hematol. 2020 Sep;153:102995.

Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. Kemper K, de Goeje PL, van Amerongen R. Cancer Res. 2014 Nov;74(21):5937-41.

Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.

Wynn TA. J Pathol. 2008 Jan;214(2):199-210.

Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.

Wynn TA. J Clin Invest. 2007 Mar;117(3):524-9.



Automatisation de la microscopie de fluorescence pour le suivi et l'analyse de la progression des cellules dans le cycle cellulaire

Julia Bonnet Gélébart

Les analyses par microscopies de fluorescences nécessitent bien souvent la création de modèles cellulaires complexes (lignées et/ou marquages spécifiques) dont les durées d'acquisitions peuvent être plus ou moins longues, où la présence de l'utilisateur peut être requise lors de photo manipulations précises, suivi d'analyses post-acquisitions pour trier les données générées. Ces contraintes spécifiques requièrent alors des compétences et du matériel dédié, des logiciels implémentés et du temps de traitement par l'utilisateur ainsi qu'une capacité de stockage importante des images brutes et traitées. L'automatisation des acquisitions combinée à l'intelligence artificielle a alors pour objectif de s'affranchir de ces contraintes via l'utilisation de modèles simples, le ciblage d'évènements spécifiques reconnus via des algorithmes développés et modulables permettant alors la sauvegarde ciblée des éléments d'intérêt. Ce projet multidisciplinaire nommé Roboscope correspond à une technologie embarquée sur un microscope de fluorescence permettant d'automatiser les acquisitions à partir d'un entraînement du système en apprentissage profond et l'intégration de modèles algorithmiques semi-supervisés. Pour simplifier, il s'agit d'un microscope combiné à une intelligence artificielle créée pour aider les chercheurs à automatiser des acquisitions de fluorescences spécifiques leur permettant de sauver à la fois du temps et de l'espace de stockage.

Les champs d'application sont très larges : ils peuvent aller du suivi de la progression des cellules dans le cycle cellulaire à des analyses spécifiques des organelles/protéines/événements biologiques pouvant être suivis, quantifiés ou encore activés au sein des cellules. L'idée principale est de générer un dispositif intégré pouvant être adaptés à plusieurs applications biologiques avec un travail du chercheur en amont qui soit moins important en termes de temps et de matériel. La plupart des acquisitions de fluorescence devant être réalisées plusieurs fois, durant des durées longues et qui peuvent avoir recours à des photo manipulations visant à cibler des événements précis peuvent être automatisées au sein de la solution Roboscope.

Ici nous présentons une application Roboscope sur le suivi et la classification des cellules dans le cycle cellulaire basée uniquement sur un marquage nucléaire. Dans cet exemple, l'intelligence artificielle permettra non seulement de classer des événements mitotiques très identifiables en amont par l'utilisateur mais également de discriminer la progression des cellules au point de restriction sans ajout de marquage spécifique, uniquement sur la base d'un apprentissage profond du réseau. A partir de ces deux algorithmes générés, nous présenterons des applications biologiques réelles correspondant à des thématiques de recherche en cours dans notre laboratoire.



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

Le CellDIVE, une méthode d'imagerie hyperplexe pour une cartographie spatiale des biomarqueurs

Alain Fautrel

Univ Rennes, CNRS, Inserm, Biosit UAR 3480 US_S 018, France-BioImaging (ANR-10-INBS-04), plateforme H2P2, F-35000, Rennes, Fra

alain.fautrel@univ-rennes1.fr

La microscopie à fluorescence est un outil fondamental pour les sciences de la vie qui a évolué en parallèle des stratégies de marquages multicolores. La capacité à marquer plusieurs cibles dans un tissu a naturellement conduit à créer des outils pour identifier plusieurs marqueurs fluorescents sur un même échantillon. Avec l'avènement de l'hyperplex, le multi-marquage est devenu incontournable pour visualiser et extraire des informations de plusieurs dizaines de marqueurs si nécessaire. Le Cell DIVE (Leica Microsystem), est une solution ouverte qui permet de rapidement accéder à l'hyperplexing. Les anticorps utilisés sont conjugués à un fluorochrome (Cy2 ou Cy3 ou Cy5 ou Cy7) ce qui permet d'utiliser les anticorps déjà validés et, si besoin, de les conjuguer. Le protocole d'utilisation du CellDIVE comprend une première étape de démasquage antigénique, puis des cycles de marquage/inactivation (répétés n fois) de 4 anticorps conjugués. Pendant les séquences d'acquisition des images, des traitements sont réalisés (correction de l'illumination, soustraction de l'autofluorescence, ...) automatiquement. Les images obtenues peuvent ensuite être analysées pour réaliser du clustering, de l'analyse de voisins proches (...) afin de caractériser au mieux le microenvironnement cellulaire.



La transparisation des échantillons épais : pourquoi, comment ?

Manon Thomas*^a

^a INRAE LPGP UR1037 Rennes, Fra

* manon.thomas@inrae.fr

Cette présentation sera une introduction à la transparisation pour l'imagerie en 3D des échantillons épais. Nous expliquerons en quoi consiste la technique de transparisation des tissus, quelle est sa raison d'être, et ferons des références à son histoire pour introduire les différentes stratégies mises en place pour l'imagerie des échantillons en 3D par microscopie confocale.

Références:

Douglas S. Richardson and Jeff W. Lichtman. Clarifying Tissue Clearing. Cell (2015)

Robin J. Vigouroux, Morgane Belle and Alain Chédotal. Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. Molecular Brain. (2017)

Vivien Marx. Microscopy: seeing through tissue. Nature Methods- Technology Feature. (2014)

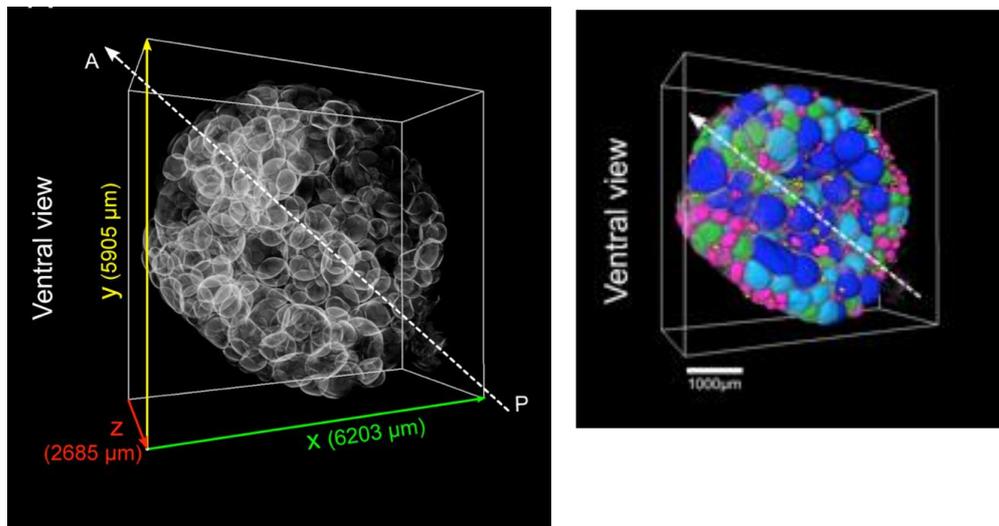
Manon THOMAS, technicienne de recherche sur le plateau imagerie 3D au laboratoire de physiologie et génomique des poissons. Je m'occupe notamment de développer les techniques de transparisation et de montage adaptées à l'imagerie confocale des échantillons de poisson.

Utilisation de l'imagerie 3D pour étudier le développement ovarien chez le Médaka

Lesage Manon, Thomas Manon, Jérôme Bugeon, Branthonne Adèle, Thermes Violette*
INRAE LPGP UR1037 Rennes, Fra
[*violette.thermes@inrae.fr](mailto:violette.thermes@inrae.fr)

L'ovaire est un organe épais et opaque, constitué en grande majorité de cellules germinales (e.g. ovocytes). De part leur grande taille (jusqu'à 1 mm de diamètre) et leur teneur importante en lipides, les ovocytes rendent l'imagerie 3D de l'ovaire particulièrement complexe et freine l'acquisition de nouvelles données pour décrypter les mécanismes de développement ovarien chez les poissons. En effet, l'imagerie en profondeur des ovaires de poissons, comme la plupart des tissus épais, est limitée par son opacité qui réduit considérablement la pénétration de la lumière à travers l'échantillon. Et malgré les avancées considérables en microscopie et le développement de microscopes à fluorescence performants pour imager les échantillons épais à une résolution cellulaire (confocal, Lightsheet), l'acquisition d'images en profondeur reste limitée à quelques dizaines de microns. Nous avons tiré parti du développement récent de nouvelles méthodes de transparensation des tissus pour développer un protocole complet de transparensation, de marquage et d'imagerie 3D des ovaires par microscopie confocale. La méthode de transparensation à l'ECi s'est révélée être une méthode de choix pour ses nombreux avantages qu'elle possède (indice de réfraction élevé, non-toxicité, simplicité d'utilisation, compatibilité avec différents types de marquages fluorescents). Pour plus d'efficacité et afin de transparensifier les ovaires de grande taille (ovaires de femelles adultes), nous avons combiné la méthode ECi à la méthode CUBIC (C-ECi) (1). L'association de ces deux méthodes a permis d'améliorer la qualité du marquage fluorescent et l'acquisition des images en profondeur d'ovaires entiers. Que ce soit dans sa forme simple (ECi) ou combinée (C-ECi), l'utilisation de l'ECi nous a ainsi permis d'imager en 3D des ovaires entiers à différents stades de développement (larvaire, juvénile et adulte) et d'analyser finement la dynamique de développement de l'ensemble des ovocytes au cours du cycle de vie chez le médaka.

Figure : Imagerie 3D et segmentation 3D d'un ovaire de médaka adulte.



Références

1. Lesage M, Thomas M, Bugeon J, Branthonne A, Gay S, Cardona E, et al. C-ECi: a CUBIC-ECi combined clearing method for three-dimensional follicular content analysis in the fish ovary. *Biol Reprod.* 10 août 2020;ioaa142.

Violette THERMES, chercheuse à INRAE dans l'équipe Sexe Ovogenèse et Comportements (SOCS) au Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP) à Rennes et responsable du plateau d'imagerie 3D du LPGP.



Caractérisation des Tissus Adipeux chez la truite arc en ciel par imagerie 3D

Isabelle Hue^{*a}, Adèle Branthonne^a, Manon Thomas^{a,b}, Morgane Chesnais^a, Violette Thermes^{a,b}, Cécile Duret^a,
Jérôme Bugeon^a

^a LPGP

^b Plateau Imagerie 3D LPGP

[*isabelle.hue@inrae.fr](mailto:isabelle.hue@inrae.fr)

Chez la truite, les tissus adipeux majeurs se situent au niveau péri-viscéral, sous-cutané et intramusculaire (Weil, 2009). La teneur et la répartition de ces tissus ont un impact direct sur la qualité des carcasses (rendements de découpe/transformation) et de la chair (qualités nutritionnelles et sensorielles). La caractérisation des tissus adipeux, comme par exemple l'analyse de la cellularité des adipocytes, passe généralement par l'isolement des adipocytes (analyse ex situ ou in vitro). Les adipocytes sont plus rarement étudiés dans leur contexte tissulaire. L'histologie de ce tissu est rendue difficile par la solubilisation des lipides dans les solvants organiques lors de l'inclusion en paraffine et par la difficulté à réaliser des coupes au cryostat sur ces tissus très riches en lipide. Des oxydants forts comme le tétr oxyde d'osmium permettent d'insolubiliser les lipides mais nos essais préliminaires ont montré que les tissus adipeux n'étaient fixés qu'en surface. Depuis peu des travaux imagent ces tissus en 3D non plus à partir de coupes mais de morceaux de tissus, décrivant cellules, stroma, vascularisation ou innervation (Dichamp, 2019 ; Chi, 2018). Nous avons mis au point pour chaque tissu adipeux un protocole qui consiste à : i) choisir les sites et le mode de prélèvement le plus adapté (taille échantillon, mode de découpe), ii) fixer et à conserver les échantillons avant traitement, iii) marquer à la fois les lipides, les structures de soutien, les membranes et les noyaux (Nile Red ; LipidTox, Bodipy, Cell mask, 5DTAF, Methyl green), iv) transparer les tissus, v) les imager en 3D avec un microscope confocal (Fig. 1), vi) analyser en 3D le nombre et la taille des adipocytes avec des algorithmes de segmentation basés sur de l'intelligence artificielle (CellPose).

Ainsi, grâce à ce protocole, nous avons observé une hétérogénéité cellulaire propre à chaque tissu : viscéral et sous-cutané, potentiellement variable selon les poissons. Un continuum de tailles semble prévaloir, des plus petites aux plus grosses cellules, faisant apparaître de nouvelles questions : ces cellules sont-elles toutes des adipocytes matures ? ont-elles toutes la même fonction ? Isoler les cellules nous permettrait peut-être d'y répondre. Les conditions de marquages et d'observations définies pour les tissus pouvant désormais s'appliquer à des cellules isolées, nous tenterons également de les caractériser tout en les mettant en culture.

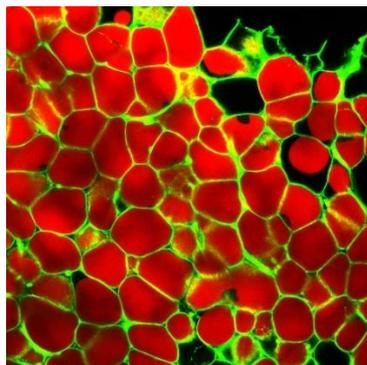


Figure 1 : Tissu adipeux viscéral de truite : lipides marqués avec le Nile Red et tissus de soutien avec le 5DTAF ; observation : microscope confocal.

Références

Chi, 2018, Cell Metabolism 27, 226–236
Dichamp, 2019, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43130-9>
Weil, 2019, Comp Biochem and Physiol, Part D4, 235-241

Je travaille dans l'équipe "Croissance et qualité de la chair" au laboratoire de physiologie et génomique des poissons à INRAE (LPGP) sur des questions d'interactions moléculaires et cellulaires entre les tissus (adipeux, conjonctif, musculaire) du muscle de truite. Les méthodes sont celles de l'histologie, de la microscopie et de la culture cellulaire.



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

Interventions du Jeudi 24 Novembre 2022



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

Evolution des méthodes d'analyse d'image en microscopie avec l'arrivée du Deep-Learning

Thierry Pécot

Thierry Pécot, Ph.D. - Research Engineer
Chan Zuckerberg Initiative Imaging Scientist

Univ Rennes - Biosit (UAR 3480 US_S 018) - 2 avenue du Professeur Léon Bernard - 35042 Rennes, Fra

thierry.pecot@univ-rennes1.fr

Le deep learning a révolutionné la vision par ordinateur. Les avancées dans ce domaine ont abouti à de nombreuses nouvelles applications en microscopie, de la classification la segmentation d'images, du pré-traitement au diagnostic clinique.



Utilisation de l'intelligence artificielle pour segmenter facilement les images biologiques

Bugeon Jérôme*, Lesage Manon, Branthonne Adèle, Hue Isabelle, Thomas Manon, Thermes Violette
INRAE LPGP UR1037 Rennes, Fra
* jerome.bugeon@inrae.fr

Le phénotypage des tissus biologiques en microscopie passe notamment par la quantification des structures d'intérêts (cellules ou noyaux) avec des mesures de taille ou de nombre à partir d'images numériques. Pour cela, il est nécessaire au préalable de segmenter ces structures, c'est-à-dire de classer les pixels en régions qui appartiennent aux cellules et noyaux que l'on veut quantifier. Cette étape est souvent complexe du fait de la forte hétérogénéité des images biologiques en termes d'intensité du marquage, de la forme, de la taille des cellules à quantifier et des caractéristiques du tissu en lui-même. De plus un même type cellulaire peut être observé selon différentes modalités de microscopie : fond clair, fluorescence, contraste de phase ce qui génère des images de caractéristiques très différentes. La segmentation est une étape de traitement d'image qu'il faut mettre au point pour chaque modalité, il est difficile de l'automatiser au vu des variabilités observées. Cependant, le développement récent d'algorithmes basés sur des technologies d'apprentissage profond (Deep Learning) permet désormais de simplifier l'étape de mise au point du processus de segmentation. En effet, après une phase d'apprentissage, l'algorithme va trouver automatiquement des paramètres de calcul pour obtenir la segmentation la plus adaptée. Récemment nous sommes passés d'algorithmes spécialisés à des algorithmes de plus en plus généralistes comme Cellpose (Stringer et al 2021) et Stardist (Schmidt et al 2018) qui permettent de segmenter des noyaux et/ou des types cellulaires variés et imagés de différentes manières aussi bien en 2D qu'en 3D. Ces outils sont désormais accessibles aux biologistes et intégrés dans des outils libres et faciles d'accès comme Fiji pour permettre de réaliser la segmentation puis la quantification. Nous illustrerons l'utilisation de ces nouveaux outils sur différents types cellulaires et modalités de microscopie utilisées au laboratoire afin de démontrer leur intérêt (Figure 1), nous présenterons quelques méthodes pour adapter les images à ces algorithmes et ainsi éviter de passer par une phase d'entraînement du réseau de neurones.

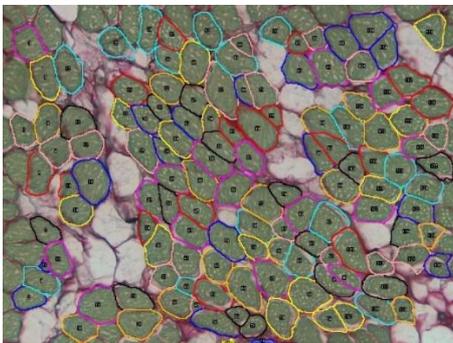


Figure 1 : Segmentation avec Cellpose des cellules musculaires du muscle rouge chez la truite arc-en-ciel

Références

- Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., & Myers, G. (2018). Cell Detection with Star-Convex Polygons. In *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018* (pp. 265–273)
- Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. (2021). Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature methods*, 18(1), 100-106.



Jérôme BUGEON 50 ans Ingénieur de recherche INRAE dans l'équipe croissance et qualité de la chair au laboratoire de physiologie et génomique des poissons. Je développe des outils de phénotypage basés notamment sur l'imagerie de l'échelle macroscopique à microscopique. Je m'intéresse plus particulièrement à la caractérisation des tissus musculaires et adipeux.



Mise en application d'algorithmes *open-source* de *Deep-Learning* pour l'analyse d'images 3D d'ovaires de Médaka

LESAGE, Manon ^{a*}, BUGEON, Jérôme^a, THOMAS, Manon^a, PECOT Thierry^b, THERMES Violette^a

^a INRAE, Fish Physiology and Genomics Institute, 16 Allée Henri Fabre, Rennes 35000, Fra.

^b BIOSIT, UAR 3480 US 018, Université de Rennes 1, 2 rue Professeur Leon Bernard, Rennes 35042, Fra
*manon.lesage@inrae.fr

En biologie de la reproduction, l'étude des mécanismes de l'ovogenèse repose en partie sur la compréhension de la dynamique de croissance des follicules (e.g ovocytes entourés de cellules somatiques de soutien) dans un contexte ovarien sain ou pathologique. L'avancée des méthodes de transparence et d'imagerie 3D permet aujourd'hui la production de nouvelles données quantitatives, spatiales et structurelles à l'échelle de l'ovaire entier et ouvre la voie à une meilleure compréhension du développement ovarien, notamment chez le poisson¹. De plus, l'analyse computationnelle de telles images a connu d'importants progrès depuis le développement d'algorithmes de *deep-learning* (DL) spécifiquement adaptés à divers types cellulaires ou modalités d'acquisition. Leur application reste toutefois limitée en raison d'un manque de généralisation de ces algorithmes ou de la quantité de données nécessaire à l'entraînement d'algorithmes spécialisés. Cette limitation est d'autant plus prononcée dans le cas de larges tissus en 3D qui peuvent (1) présenter une grande variabilité d'intensité des signaux fluorescents, réduisant l'efficacité des algorithmes disponibles ou (2) nécessiter un temps d'annotation considérable pour la préparation du jeu de données à entraîner.

Pour analyser le contenu folliculaire des ovaires de médaka à partir d'images d'ovaires entiers et s'affranchir de ces limitations, nous avons développé une stratégie permettant d'utiliser des outils de DL disponibles en *open-source* adaptés au débruitage d'images (Noise2Void²) et à la segmentation de cellules (Cellpose³). Ces outils ont été intégrés à des pipelines d'analyse comprenant trois étapes principales : le pré-traitement, la segmentation et le post-traitement des images. Une étape de filtration et de combinaison des follicules segmentés a notamment permis l'utilisation de l'algorithme généraliste Cellpose sur des ovaires adultes présentant des variations extrêmes de tailles de follicules (de 20 à plus de 1000 μm de diamètre), constituant normalement une limitation majeure de ce modèle.

Notre stratégie fournit ainsi des solutions abordables et efficaces pour extraire des informations quantitatives exhaustives à partir d'images d'ovaires entiers, à des stades variés du cycle de vie et présentant des modalités de fluorescence différentes⁴. L'application de cette méthodologie permet dorénavant l'analyse précise de la dynamique de croissance folliculaire et constitue une ressource adaptable à l'étude de modifications du contenu ovarien dans d'autres contextes génétiques ou en toxicologie.

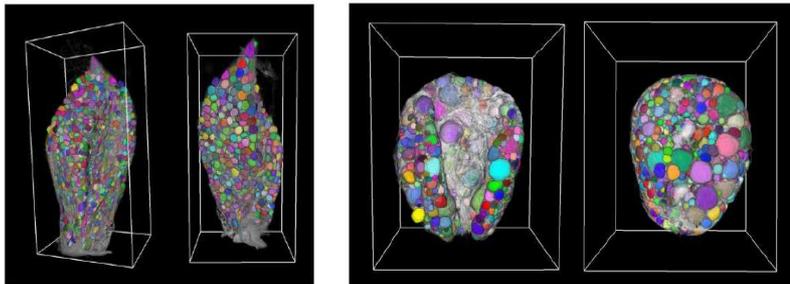


Figure : Segmentation 3D d'ovaires entiers de médaka au stade larvaire et adulte

Références

¹ M Lesage, M Thomas, J Bugeon, A Branthonne, S Gay, E Cardona, M Haghebaert, F Mahé, J Bobe, V Thermes. (2020). *Biology of Reproduction*, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa142>

² Krull, A., Buchholz, T.-O., and Jug, F. (2019). *Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)* (Long Beach, CA), 2129–2137.

³ Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M. *et al.* Cellpose. (2021). *Nat Methods*, <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>

⁴ M Lesage, J Bugeon, M Thomas, T Pécot, V Thermes. (2022), bioRxiv 2022.08.03.502611; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.03.5026>



Manon LESAGE, Doctorante dans l'équipe Sexe Ovogenèse et Comportements (SOCS) au Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP) sous la Direction de Violette THERMES. Mes travaux de thèse se concentrent sur l'étude de la dynamique de l'ovogenèse et sa régulation par le micro-ARN-202 sur le modèle médaka.



Présentation générale de la technologie d'imagerie avec ou sans module ApoTome

S. Wiart¹, G.Randuneau²

¹PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590, Saint-Gilles, Fra

²Institut Numecan, INRAE, INSERM, Univ Rennes 1, Rennes, Fra

sandra.wiart-letort@inrae.fr

Le microscope Zeiss Axio Imager M2 est un microscope optique droit motorisé. Comme tous les microscopes photoniques, il est composé notamment de plusieurs objectifs du EC Plan-Neofluar 5x au Plan-Apochromat 63x en immersion et d'oculaires en grossissements x10. Il peut être utilisé en microscopie en champ clair ou en fluorescence. Le microscope est aussi équipé d'une plateforme motorisée avec Joystick et d'une caméra Hamamatsu Orca Flash.

La source lumineuse est à LEDs Colibri 7, 8 LEDs qui couvrent le spectre standard complet des UV jusqu'au rouge foncé. Auxquelles sont associés 4 jeux de filtres (49 DAPI, 38 Endow GFP, 46 HE Cy3, 50 Cy5). Le microscope Zeiss est équipé d'un module ApoTome 2. L'apotome permet d'obtenir une coupe optique en utilisant une illumination structurée c'est-à-dire sans lumière dispersée. Seul le plan focal apparaît sur l'image. Il est composé de 3 grilles avec des fréquences différentes.



Sandra WIART-LETORT, assistante ingénieure, référente de l'atelier Histologie du site INRAE St Gilles. Elle travaille à l'Institut national de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) au sein de l'UMR PEGASE de Saint-Gilles. Elle travaille sur la glande mammaire de bovins, caprins et ovins depuis 20 ans à travers l'histologie.

Elle met à disposition ces connaissances et ces compétences au service de tous les chercheurs de l'unité désirant développer des projets en lien avec l'histologie.



Caractérisation d'organoïdes intestinaux porcins, par étude morphologique et par typage cellulaire sur coupes

Randuineau G.*^a, Duchesne C.^a, Boudry G.^a

^a Institut Numecan, INRAE, INSERM, Univ Rennes 1, Rennes, Fra
* gwenaelle.randuineau@inrae.fr

Le projet de créer une plateforme partagée d'organoïdes intestinaux porcins entre les équipes du tremplin Carnot AgriFood Transition a été pensé et proposé dans l'optique de disposer de modèles *ex vivo* plus complexes que les modèles de cultures cellulaires classiques, et de limiter l'utilisation d'animaux expérimentaux. Ainsi, par leur structure multicellulaire en 3 dimensions présentant la plupart des types cellulaires de l'épithélium intestinal, les organoïdes intestinaux permettraient notamment l'étude des effets sur l'intestin de diverses molécules (ingrédients, additifs), mais aussi des interactions hôte-pathogènes.

Au sein de notre unité, la mise en place et l'analyse de ce modèle a débuté par le développement des conditions de culture des organoïdes, à partir de cellules souches adultes issues de tissus intestinaux porcins. Dans l'objectif d'évaluer l'impact des différents stades de culture, de l'âge du donneur, mais aussi la conservation du phénotype d'origine, des organoïdes intestinaux ont été cultivés durant 30 jours, à partir de donneurs d'âges différents, et à partir d'échantillons de jejunum et de colon. Les entéroïdes et colonoïdes produits ont ensuite été caractérisés d'abord d'un point de vue morphologique (taille, nombre) par analyse d'images en lumière blanche, puis par typage cellulaire via l'observation de diverses protéines « marqueurs ». Ce travail histologique a nécessité la mise au point de divers marquages immuno-fluorescents spécifiques aux tissus porcins, et les analyses ont été réalisées à partir d'acquisitions obtenues en fluorescence avec un microscope Zeiss équipé du module ApoTome 2.

Les données concernant la croissance des organoïdes intestinaux ont ainsi participé à l'optimisation des conditions de culture et à la standardisation de la méthode. Quant à celles concernant leur composition cellulaire, elles permettent de mieux appréhender ce modèle qui constitue un outil original d'étude de l'épithélium intestinal et de ses interactions avec l'environnement (nutriments, pathogènes, métabolites bactériens, toxines).



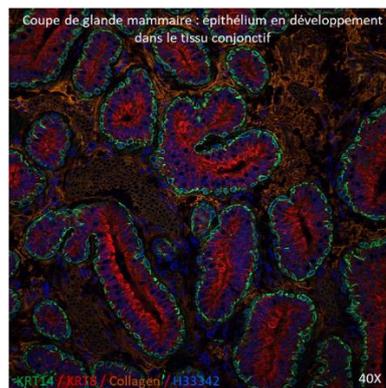
Appréhender le fonctionnement mammaire chez le bovin par typage des cellules en microscopie

Finot L.^a, Chanat E.^a

^a PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590 Saint Gilles, Fra

* laurence.finot@inrae.fr

Chez les bovins laitiers, la production de lait dépend fortement du degré de développement de la glande mammaire. Le tissu mammaire présente une plasticité fonctionnelle exceptionnelle en réponse au statut physiologique de l'animal mais aussi aux conditions d'élevage et d'environnement. La glande mammaire se développe principalement pendant la puberté et la gestation. Elle devient mature pour synthétiser le lait lors de la parturition. Chez les vaches laitières, les cycles de reproduction-lactation se succèdent. Ils s'accompagnent d'un remodelage du tissu mammaire notamment de l'épithélium pour s'adapter à l'activité lactifère de l'organe. Plusieurs populations cellulaires interagissent pour contribuer à la production laitière : les cellules épithéliales, les fibroblastes, les adipocytes et les cellules endothéliales. De plus, l'épithélium mammaire, acteur majeur de la synthèse de lait responsable du potentiel laitier de l'animal, est constitué de différents types de cellules épithéliales (basal, myoépithélial et luminal). Pour appréhender la fonctionnalité de la glande mammaire chez la vache laitière aux stades physiologiques majeurs de la vie de l'animal que sont le développement, la lactation et le tarissement, nous avons entrepris d'identifier et de caractériser le tissu mammaire par des approches multiples, incluant l'immuno-histologie. L'utilisation d'anticorps spécifiques des différents types cellulaires d'intérêt, comme les cellules épithéliales lumorales (dont les cellules sécrétrices) et basales, ainsi que les fibroblastes, nous permet de comparer l'état de développement de la glande mammaire chez des génisses à peine pubères ou encore l'avancée du remodelage tissulaire au stade de tarissement des vaches. Ces observations permettent d'appréhender l'impact que peut avoir les conditions d'élevage des vaches (alimentation, fréquence de traite, stress thermique, tarissement) sur le tissu épithélial mammaire et son remodelage. Nous utilisons aussi cette approche d'immuno-histologie développée pour phénotyper le tissu mammaire dans le cadre de nos recherches sur les cellules souches adultes mammaires. Ces applications dans le domaine de la recherche agronomique sont essentielles pour comprendre la mise en place et le fonctionnement du tissu sécréteur de la glande mammaire chez des animaux de rente et améliorer nos connaissances sur les populations cellulaires engagées dans la fonction de lactation.



Laurence FINOT, biologiste cellulaire de formation, a soutenu une thèse de biologie et physiologie animale en février 2019. Elle travaille à l'Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) dans l'équipe « lactation » de l'UMR PEGASE de Saint Gilles. Ces dix dernières années, elle s'est intéressée aux cellules souches adultes de la glande mammaire chez les bovins laitiers. Ses travaux actuels se concentrent sur le développement de modèles mammaires in vitro cultivés en 3D pour reproduire les alvéoles sécrétrices du lait et étudier les mécanismes mis en jeu pendant la lactation.



Immunohistologie sur tissu mammaire de chèvres laitières soumises à des régimes alimentaires supplémentés avec un acide aminé

S. Wiart¹, S. Lemosquet¹, E. Chanaat¹, L. Bahlouf², M. Boutinaud¹

¹PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590, Saint-Gilles, Fra

²Center of Expertise and Research in Nutrition, Adisseo, France S.A.S, 03600, Commentry, Fra

sandra.wiart-letort@inrae.fr

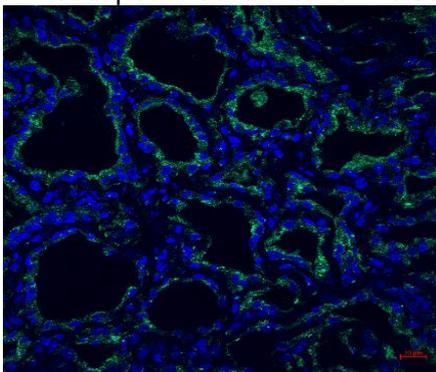
De nombreuses études ont été menées en élevages laitiers bovins pour adapter au mieux l'alimentation aux besoins des animaux. La supplémentation en acide aminé tel que la méthionine est connue pour augmenter le volume du lait et de protéines produits chez les bovins. Cependant peu d'études ont été faites chez les chèvres laitières. Pourtant la méthionine est considérée comme l'un des premiers acides aminés limitants dans la synthèse des constituants du lait. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène sont encore inconnus.

Au cours d'une expérimentation animale, nous avons étudié 4 régimes alimentaires administrés à 24 chèvres alpines qui se situaient autour de 85 jours de lactation. Les chèvres ont été réparties aléatoirement dans 4 groupes (Un régime avec un niveau bas en énergie +/- supplémentés en méthionine/un régime avec un niveau d'énergie recommandé +/- supplémentés en méthionine (incorporé à hauteur de 0,24% la matière sèche).

Les chèvres ont été euthanasiées après 5 semaines de traitement. Le tissu mammaire a été récolté puis fixé dans du formol puis cryoprotégé dans du sucrose. Après congélation dans du tissu teck, les tissus ont été coupés au cryostat. Les coupes ont été alors utilisées pour réaliser différents marquages immunohistologiques. Le marquage de prolifération cellulaire (PCNA) et le marquage TUNEL, mort cellulaire nous a permis d'étudier l'équilibre prolifération et mort cellulaire. Les marquages de protéines spécifiques de différents compartiments cellulaires (AP1 : vésicules de sécrétion, PDI : réticulum endoplasmique, GM130 : appareil de golgi) nous ont permis d'étudier l'activité des cellules épithéliales mammaires.

Après marquages, observations à l'apoptome et acquisition d'images, nous avons traité nos images (8 par analyse) à l'aide du logiciel ImageJ et obtenus des taux de prolifération cellulaire et de mort cellulaire ainsi que la détermination de l'intensité de marquage (c'est-à-dire l'intensité de fluorescence) pour les protéines spécifiques des compartiments cellulaires. La supplémentation en méthionine a augmenté de 15 % le taux de cellules en prolifération et a diminué de 51 % le taux d'apoptose dans le tissu mammaire.

Le niveau d'alimentation bas énergie par rapport au niveau recommandé n'a eu d'effet sur les protéines PDI et GM130. Mais une tendance à la hausse est observée pour AP1 (vésicules de sécrétion) dans le cas d'une alimentation au niveau énergie recommandé supplémenté en méthionine. Ces résultats suggèrent que la méthionine aurait un effet sur le nombre de cellules (+ de prolifération / - de mort) et pas d'effet sur les compartiments cellulaires mais une légère augmentation des vésicules de sécrétion. Ces phénomènes pourraient expliquer l'effet positif de la méthionine sur le volume de lait produit.



Coupe de glande mammaire de chèvre x40

Marquage (vert) AP1, protéine des vésicules de sécrétion

Marquage (dapi, bleu) , noyau



Sandra WIART-LETORT, assistante ingénieure, référente de l'atelier Histologie du site INRAE St Gilles. Elle travaille à l'Institut national de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) au sein de l'UMR PEGASE de Saint-Gilles. Elle travaille sur la glande mammaire de bovins, caprins et ovins depuis 20 ans à travers l'histologie.

Elle met à disposition ces connaissances et ces compétences au service de tous les chercheurs de l'unité désirant développer des projets en lien avec l'histologie.



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

Interventions du vendredi 25 Novembre 2022



Multi-scale characterization of food matrices using a combined MRI and confocal and multiphoton microscopy approach; focus on bread and vegetable tissues

Nanci Castanha^{*a}, Héliciane Clément^a, Sylvain Challos^a, Elysa Le Corre^a, Patricia Le Bail^b, David Grenier^a, Maja Musse^a, Laurence Dubreil^{*c}, Tiphaine Lucas^{*a} × Authors contributed equally to this work

^a INRAE, UR OPAALE, F-35044, Rennes, Fra

^b INRAE, UR BIA 1268, F-44316 Nantes, Fra

^c INRAE, ONIRIS, APEX UMR PAnTher, F-44307, Nantes, Fra

* nanci.castanha-da-silva@inrae.fr

Bread dough is a complex matrix that can be described as a dispersion of gas cells in interwoven phases of gluten network and of highly concentrated aqueous suspension of starch granules [1]. During breadmaking, those gas cells undergo continuous expansion while the thickness of the gas cell walls (GCWs) separating them is reduced from several hundreds to a few μm , until their rupture [1]. It is well accepted that the GCW rupture moment is crucial to the good aeration and fine texture of crumb [2]. However, the exact mechanisms involved in the GCWs stability are not fully understood, especially those involving dough constituents other than gluten, such as starch for instance [3]. Macro and micro-scale observations of the bread, therefore, are crucial to differentiate the multiple roles played by starch in this complex matrix. In this context, this work was divided in two different approaches: a macroscale observation of the bread during its baking and cooling using MRI (*better described in a second abstract related to this work*); and a microscale observation at the level of GCWs using different microscopic techniques. For the microscopic observation, the aim was to characterize the 3D structure of the GCWs focusing on the starch granules' distribution, using an innovative label-free approach with multiphoton microscopy (NLOM) and a confocal microscopy (CLSM) with fluorescent labeling. NLOM integrated two photon excitation fluorescence (TPEF) and Second and Third Harmonic Generation (SHG, THG) imaging. Gluten network was observed by TPEF, starch granules from SHG and interfaces from THG [4]. SHG was obtained from linear polarized illumination (Nikon A1RMP+). CLSM (Zeiss LSM780) combined proteins' staining (Alexa Fluor 546) was used to locate starch granules from negative staining. 3D exploration of the GCWs was performed using Avizo software (Thermo Fisher Scientific). NLOM images allowed distinguishing starch granules using SHG and the gluten network using endogenous fluorescence, without labeling. Unexpectedly, the NLOM images showed poorly aligned granules and a higher concentration of granules than in bulk dough. A very thin envelope of gluten strands was observed using higher autofluorescence. CLSM combined to protein's labelling allowed to delimit the edges of the starch granules, with potential for a good 3D reconstruction of the GCWs. NLOM label-free approach is a promising tool to image dynamic processes in fermented dough. Furthermore, fluorescent gluten staining with Alexa Fluor allows detecting the starch granules using CLSM at different dough temperatures, with potential to analyze the morphological characteristics and the 3D structure of GCWs in bread dough.

References

- [1] Eliasson, A.C., Larsson, K.: Cereals in Breadmaking: A Molecular Colloidal Approach, CRC Press, 1st edition, (1993) 392 p., doi:10.1201/9781315139005
- [2] Grenier, D., Rondeau-Mouro, C., Dedey, K. B., Morel, M., Lucas, T.: Gas cell opening in bread dough during baking, Trends in Food Science & Technology 109 (2021) 482–498, doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.032
- [3] Park, S.H., Wilson, J.D., Chung, O.K., Seib, P.A.: Size distribution and properties of wheat starch granules in relation to crumb grain score of pup-loaf bread, Cereal chemistry 81 (2004) 699-704, doi: 10.1094/CCHEM.2004.81.6.699
- [4] Chouët, A., Chevallier, S., Fleurisson, R., Loisel, C., Dubreil, L.: Label-Free Fried Starchy Matrix: Investigation by Harmonic Generation Microscopy, Sensors 19 (2019) 2024, doi:10.3390/s19092024



Nanci CASTANHA is a Food Engineer by FEA/ UNICAMP and Food Technician by COTUCA/ UNICAMP (Brazil). She studied starch molecular characterization and modification during her Ph.D. and her M.Sc., both at ESALQ/ USP (Brazil). During this time, she spent 6 months as a visiting scholar at Purdue University (USA), working on a collaborative project. Currently, she is a MSCA post doc at INRAE/ Rennes (France), working on a multidisciplinary research project named MECASTARCH, focused on the mechanical contribution of starch granules in the stabilization/destabilization of cell walls during bread baking



Multi-scale characterization of food matrices using a combined MRI and confocal and multiphoton microscopy approach; focus on bread and vegetable tissues

Héliciane Clement^{*a}, Nanci Castanha^a, Yves Diascorn^a, Patricia Le Bail^b, David Grenier^a, Maja Musse^a, Tiphaine Lucas^a

^a INRAE, UR OPAALE, F-35044, Rennes, Fra

^b INRAE, UR BIA 1268, F-44316 Nantes, Fra

* heliciane.clement@inrae.fr

Bread is a staple food around the world. Yet, the mechanisms involved in bread making affecting bread quality are still not fully understood. The wheat gluten matrix is considered to play the main role in dough structure and bread final texture. However, the availability of wheat and its gluten content are expected to decrease, due to climatic changes and the reduction of nitrogen inputs in grain culture. On the other hand, starch is the main component of all cereals and tubers cultivated in the world and presents a high diversity of characteristics and properties. One of them is the amylose/amylopectin ratio, which has been shown to affect bread quality [1, 2]. Low-amylose starches, including waxy starches, were related to a higher bread volume at the end of baking followed by a significant shrinkage during cooling. This could be due to a higher resistance of gas cell walls made with waxy starch compared to normal wheat starch, reminiscent of gluten behaviour during baking. Low-amylose starches like tapioca starch were indeed shown to have merging behaviour [3]. This study aims to evaluate how the use of waxy or low-amylose starch in bread making leads to bread retraction. For this purpose, three sources of starch (wheat, waxy wheat, and glutinous rice) were used to substitute wheat flour in the French bread-making process. Magnetic Resonance Imaging (MRI) as a non-invasive technology was used to monitor the gas fraction evolution, globally and locally, during baking and cooling. Bread made with waxy wheat starch and glutinous rice showed retraction during baking and cooling. The retraction was more particularly localised in the lower and side parts of loaves. This could be explained by the non-opening of pores, preventing air from entering gas cells to compensate for the loss of water and CO₂. Crumb observation under a microscope revealed some pore openings at the bottom of big gas cells, suggesting some permeability to gas. Gas cell wall resistance to rupture might then not be the only factor involved in retraction. Crust softening could be that factor but this has to be confirmed by further experiments. These results underlined the importance of a multi-scale approach to better understand the effect of starch on bread retraction.

References

1. Hayakawa, K., et al., *End use quality of waxy wheat flour in various grain-based foods*. Cereal chemistry, 2004. **81**(5): p. 666-672.
2. Purna, S.K.G., et al., *Volume, texture, and molecular mechanism behind the collapse of bread made with different levels of hard waxy wheat flours*. Journal of cereal science, 2011. **54**(1): p. 37-43.
3. Kusunose, C., T. Fujii, and H. Matsumoto, *Role of starch granules in controlling expansion of dough during baking*. Cereal chemistry, 1999. **76**(6): p. 920-924.



Héliciane CLEMENT is a postdoctoral researcher at UR OPAALE, team IRMFOOD, INRAE located in Rennes. She obtained an M.Sc. in food microbiology after doing her master thesis at the SLU of Uppsala (Sweden). During her Ph.D. with Oniris Nantes, CNRS GEPEA, INRA BIA, and the bakery company Biofournil, she studied sourdough microbiology, biochemistry, dough rheology, bread texture, and sensory evaluation. She defended her Ph.D. thesis in 2018, entitled *Improvement of organic bread organoleptic properties by the study and optimization of its sourdough* (CIFRE funded by Biofournil). Her first postdoc in the grain technology group of the University of Helsinki was the opportunity to extend her knowledge in grain fermentation and bread making. Currently, she is working on a multidisciplinary research project named MECASTARCH, focusing on the role of starch in the evolution of bread structure during baking and cooling.



Concevoir des assemblages de protéines de lait techno-fonctionnels : exemples de l'apport de la microscopie de fluorescence confocale

Famelart Marie-Hélène, Science et Technologie du Lait et des œufs, INRAE-INSTITUT Agro Rennes

Une problématique actuelle en industrie agroalimentaire est de substituer les additifs texturants comme les amidons modifiés par des constituants fonctionnalisés endogènes au produit alimentaire, par exemple issus du lait pour les produits laitiers transformés, tout en maintenant les propriétés organoleptiques de ces produits, notamment leurs propriétés de texture.

Notre approche vise à concevoir des assemblages de protéines de lait, à comprendre les mécanismes de formation des interactions entre protéines à l'origine des assemblages et à caractériser les propriétés de ces assemblages, ainsi que leur propriétés techno-fonctionnelles. Deux exemples sont montrés dans cette présentation sur l'apport de la microscopie de fluorescence confocale pour cette thématique :

- 1- La production de particules fonctionnelles par étuvage, pour laquelle la microscopie s'est avérée une méthode stratégique pour comprendre les tailles/structures des assemblages;
- 2- Les propriétés texturales de yaourts modèles, thématique au cours de laquelle le rôle des assemblages de protéines de lait produit au cours du chauffage du lait a été étudié sur des yaourts modèles.

Cette présentation montre bien que la microscopie de fluorescence confocale est une méthode assez simple à développer, et qui s'avère puissante pour nos projets sur les protéines.



Digestion des aliments chez l'Homme : Comment la microscopie aide à comprendre l'évolution des structures dans le tube digestif

Steven Le Feunteun*^a, Didier Dupont^a

^a INRAE, Institut Agro, STLO, 35042 Rennes, Fra

* steven.le-feunteun@inrae.fr

Les thématiques de l'équipe Bioactivité et Nutrition de l'UMR STLO (Rennes) portent sur les processus de digestion gastro-intestinale des matrices alimentaires (lait, oeuf, mix lait-végétaux), incluant l'analyse des composés lors de la déconstruction des aliments et la biodisponibilité des nutriments.

L'équipe a recours à différentes approches de microscopie, principalement la microscopie confocal, pour suivre l'évolution des structures (agrégats protéiques, globules gras, etc.) au cours de leur digestion, et pour mieux comprendre les mécanismes d'action des enzymes digestives. Nous présenterons ici quelques résultats marquants traitant de la digestion de lait maternel et formules infantiles, de l'adsorption de la lipase gastrique sur des globules de gras laitiers, et de suivis de la digestion gastrique de gels laitiers sous microscope au synchrotron SOLEIL (ligne DISCO).

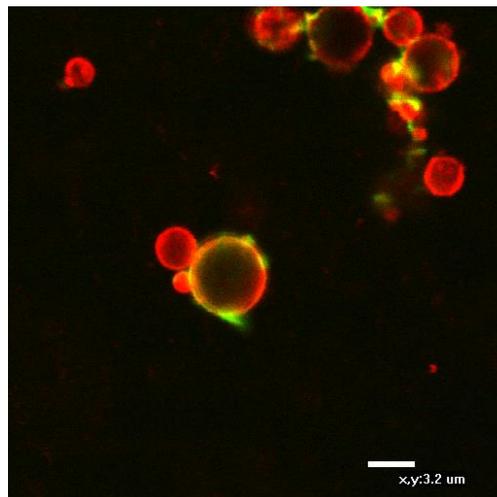


Figure : Immunolocalisation d'une lipase gastrique à la surface de globules de gras laitiers par microscopie confocal.

Steven LE FEUNTEUN est chargé de recherche à l'INRAE et co-animateur de l'équipe Bioactivité et Nutrition de l'UMR STLO depuis 2022.

Didier DUPONT est directeur de recherche à l'INRAE, directeur adjoint de l'UMR STLO et ancien animateur de l'équipe Bioactivité et Nutrition (2008-2022).



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

Apport de la microscopie en microbiologie pour l'étude des interactions bactérie/hôte

Eric Guedon - INRAE UMR STLO Rennes

Dans le cadre de cette présentation, nous illustrerons l'apport de la microscopie dans l'étude des bactéries et de leurs interactions avec les cellules hôtes. Pour cela, nous nous appuyerons sur des travaux réalisés au sein de l'unité STLO sur des bactéries d'intérêt alimentaire et des bactéries pathogènes. En particulier, des exemples de la caractérisation de cellule bactérienne et de certains de ses constituants lors de cultures planctoniques et en biofilms, et des interactions de ces cellules avec celles de leur hôte, par différentes approches de microscopie (confocale, fluorescence, SEM, TEM, Cryo-EM) seront présentés.



De l'intérêt des approches de microscopie confocale à l'étude du polyphénisme de reproduction chez le puceron

Stéphanie Le Bras

IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes1, 35653, Le Rheu, Fra

Au cours de leur cycle annuel, les pucerons du pois peuvent alterner entre une reproduction asexuée (parthénogenèse) au printemps et en été leur permettant de coloniser rapidement les agro-écosystèmes et une reproduction sexuée en automne conduisant à la production d'embryons diapausés en hiver. La diminution de la photopériode, avant l'automne, est le signal clé induisant ce changement de mode de reproduction. Les lignées de pucerons capables d'effectuer ce changement sont appelées CP (pour Cyclically Parthenogenetic) mais il existe d'autres lignées appelées OP (pour Obligatory parthenogenetic) qui ont perdu cette capacité et se reproduisent uniquement par parthénogenèse. Des approches de génomique des populations menées par notre équipe ont montré qu'un locus sur le chromosome X, contenant 32 gènes, discrimine génétiquement ces deux populations de pucerons. Ainsi, une ou plusieurs mutations dans les séquences codantes et/ou régulatrices d'un ou plusieurs de ces 32 gènes pourraient être responsables de l'incapacité des lignées OP à établir une reproduction sexuée. Afin d'identifier le (ou les) gène(s) impliqué(s) dans la réponse à la photopériode, nous souhaitons étudier la dynamique spatio-temporelle d'expression de ces 32 gènes au cours du développement du puceron par RT-qPCR et par hybridation fluorescente *in situ*. Nos premières mises au point nous ont permis de révéler des patrons d'expression dynamiques et spécifiques entre différents gènes candidats et de mieux cerner la fenêtre temporelle au cours de laquelle le puceron en développement répondrait à la diminution de la photopériode.



Quantitative fluorescence imaging: a valuable method to study the development of *Aphanomyces euteiches* in pea near-isogenic lines

Théo Leprévost^{a*}, Matthieu Dejean^b, Angélique Lesné^a, Henri Miteul^a, Jean-Philippe Rivière^a, Isabelle Glory^a, Clément Lavaud^a, Akiko Sugio^a, Geneviève Conejero^b, Marie-Laure Pilet-Nayel^a

^{a.} IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes1, 35653, Le Rheu, Fra

^{b.} PHIV, AGAP, CIRAD, 34398, Montpellier, Fra

* theo.leprevost@inrae.fr

The root rot caused by the oomycete *Aphanomyces euteiches* is a major disease of pea (*Pisum sativum*). Breeding for resistant varieties is promising since many advances have been made in the identification of quantitative trait locus (QTL) in the last twenty years [1,2]. Recently, resistance alleles at a major QTL named *Ae-Ps7.6* were successfully introgressed into pea agronomic lines and validated using pea near-isogenic lines (NILs) [3,4]. However, the mode of action and molecular pathways underlying the *Ae-Ps7.6*-mediated resistance to *A. euteiches* remain poorly documented. This study aimed to investigate the effect of the major *Ae-Ps7.6* QTL on the *A. euteiches* infection, by using four pea NILs whose genomes differ only in the absence vs presence or the size of the QTL. The development of root rot disease severity in the NIL roots was evaluated under controlled conditions during 10 days after inoculation. Infected roots were sampled and the development of *A. euteiches* was visualized by Alexa Fluor® 555 conjugate of wheat germ agglutinin and observed by epifluorescence microscopy. Disease severity scorings and fluorescence imaging revealed significant effect of the major QTL in delaying symptoms appearance and root colonization by *A. euteiches* in the epidermal and cortical cells. In addition, results suggested that early plant/pathogen interactions could occur from 2 to 4 days after inoculation. This study successfully compared progress of *A. euteiches* infection in the NILs and helps us to determine sampling time points for investigating the expression networks and metabolic pathways regulated by the major *Ae-Ps7.6* QTL upon *A. euteiches* infection.

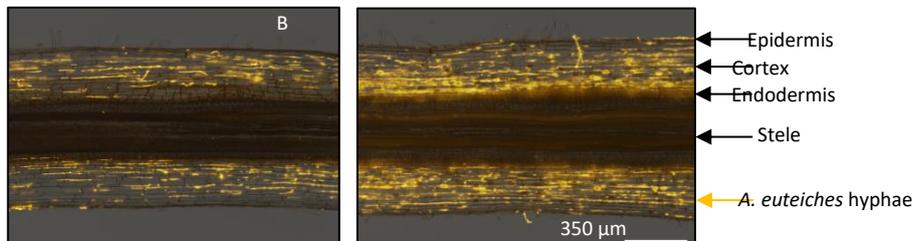


Figure: Wheat germ agglutinin labeling of *Aphanomyces euteiches* in pea NILs differing only in the (A) presence or (B) absence of the major *Ae-Ps7.6* QTL. Root longitudinal sections were incubated with an Alexa Fluor® 555 conjugate of WGA and observed by epifluorescence microscopy at 7 days post inoculation.



PhD student. **Théo LEPRÉVOST** graduated master courses of “Plant and Environment Protection” and “Genetics, Genomics, and Crop Breeding” from l’Institut Agro (Rennes) in 2019 and 2021, respectively. He joined the Institute for Genetics, Environment and Plant Protection (INRAE, Le Rheu) in 2021 to conduct a doctoral research project on comparative genomics and molecular mechanisms of quantitative resistance to *Aphanomyces euteiches* in main pulses.

Reference

[1] Hamon, C., Baranger, A., Coyne, C. J., McGee, R. J., Le Goff, I., L’Anthoëne, V., ... Pilet-Nayel, M.-L. (2011). New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(2), 261–281. doi:10.1007/s00122-011-1582-z

[2] Hamon, C., Coyne, C. J., McGee, R. J., Lesné, A., Esnault, R., Mangin, P., ... Pilet-Nayel, M.-L. (2013). QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. *BMC Plant Biology*, 13(1), 45. doi:10.1186/1471-2229-13-45

[3] Lavaud, C., Lesné, A., Piriou, C., Le Roy, G., Boutet, G., Moussart, A., ... Pilet-Nayel, M.-L. (2015). Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(11), 2273–2288. doi:10.1007/s00122-015-2583-0

[4] Lavaud, C., Baviere, M., Le Roy, G., & Pilet-Nayel, M. L. (2016). Single and multiple resistance QTL delay symptom appearance and slow down root colonization by *Aphanomyces euteiches* in pea near isogenic lines. *BMC Plant Biology*, 16(1). doi:10.1186/s12870-016-0822-4



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

POSTERS



Poster n°1

TRANSPARISATION DU TISSU CEREBRAL OVIN

M.Meurisse^{1,3}, M.Batailler², M.C.Blache³, J.P.Dubois², M.Morisse¹, M.L.Cateau^{1,3}, F.Lévy¹, E.Chailou¹, R.Nowak¹,
M.Migaud², X.Cayla³

Equipes NECOS ⁽¹⁾ et INRC ⁽²⁾, Plateforme d'Imagerie Cellulaire ⁽³⁾

Notre objectif est de transpariser des structures cérébrales de mouton (cortex, bulbe olfactif (BO), aire périaqueducale PAG, hippocampe et hypothalamus), et d'associer cette transparisation à l'immunohistochimie par fluorescence. L'enjeu est de pouvoir imager les pièces transparisées et immunomarquées au microscope confocal et d'étudier les protéines d'intérêt immunofluorescentes dans toute la profondeur d'échantillons d'épaisseur supérieure à 500 µm. A cette fin, nous avons testé et comparé 3 méthodes non toxiques utilisées chez les rongeurs, que nous avons adaptées aux ovins : Clarity actif (électrophorèse), PACT (méthode aqueuse passive dérivée de Clarity), et la méthode d'hyperhydratation CUBIC. Les meilleurs résultats de transparisation ont été obtenus avec les méthodes PACT et CUBIC qui conduisent à une transparisation totale en 6 à 10 jours sur des échantillons de 500 µm à 1 mm d'épaisseur, quelle que soit la structure cérébrale. Les structures riches en myéline comme le cortex cérébral sont plus longues à transpariser (>10 jours), certaines zones restant opaques, notamment sur les échantillons plus épais (2 à 4 mm). Cette difficulté s'explique par la présence des lipides de la myéline. En ce qui concerne le marquage immunohistochimique, 9 anticorps ont donné de bons résultats, en particulier l'anti-Tyrosine Hydroxylase pour la PAG, l'anti-parvalbumine pour le cortex, l'anti-Myelin Binding Protein pour le BO, l'anti-Iba1 pour l'hippocampe et l'anti-laminine pour l'hypothalamus. Avec certains anticorps primaires, une perte d'intensité de marquage au cœur des échantillons a pu être observée, vraisemblablement due à un problème de pénétration des anticorps. En ce qui concerne l'imagerie, l'utilisation de plusieurs milieux de montage d'indices de réfraction (IR) différents a été testée. Le Rapiclear (IR 1,49) et le glycérol 90% (IR 1,46) ont donné les meilleurs résultats. Un léger avantage est à noter pour le Rapiclear qui apporte un gain d'environ 50µm en profondeur d'imagerie par rapport au glycérol. Par ailleurs, la microscopie confocale nous a permis d'obtenir davantage de résolution cellulaire que le microscope à feuille de lumière (UltraMacroscope LaVision, Biotech) que nous avons testé sur la plateforme d'imagerie de l'Institut Pasteur de Paris. Toutefois, l'homogénéité des indices de réfraction étant cruciale pour une bonne résolution des images en profondeur, il sera nécessaire d'équiper notre microscope confocal d'un objectif à immersion et à longue distance de travail.



Poster n°2

Un groupe de travail pour vous aider à faire de la transparence

L. Dubreil (Nantes), D. Godefroy (Rouen), K. Belcram (Versailles) C. Chaumeton (Paris), F. Michel (Marseille), M. Simion (Paris-Saclay) J. Teillon (Bordeaux), R. D'Angelo (Toulouse)(coord. du groupe)

La « transparence », dans le domaine de l'imagerie, consiste à la mise en œuvre de différents processus pour optimiser le passage de la lumière à travers un échantillon biologique. Notre groupe de travail a pour objectif de faire découvrir à la communauté le potentiel des techniques de transparence. Nos principales actions consistent à : • mettre en place des tutoriels ("Kit Débutant") et "Carte Interactive Experts" partagés en ligne • promouvoir, avec la participation de spécialistes reconnus dans le domaine, des journées thématiques • organiser des sessions de formation sur les approches de clearing, l'utilisation de microscopes et de montages adaptés au type d'échantillons, le traitement d'images 3D - informer et échanger sur les nouveautés dans ce domaine.

Fiches pratiques et Tutoriels : <http://rtmf.fr/documentation/gt-transparence/>

Cartographie : <https://experts.tefor.net/transparence>

Contact : transparence@groupe.renater.fr





Poster n°3

Est-il possible de suivre des microplastiques au cours de la digestion grâce aux métaux qu'ils contiennent ?

Belkessa Nawel^a, Rivard Camille^{a,b}, Ropers Marie Hélène^c

^a Ligne LUCIA, Synchrotron SOLEIL, 91192 Gif-sur-Yvette, Fra

^b TRANSFORM, INRAE, , 44300 Nantes, Fra

^c BIA, INRAE, 44300 Nantes, Fra

nawel.belkessa@synchrotron-soleil.fr

Le polyéthylène (PE) est l'un des contaminants microplastiques les plus retrouvés dans les espèces marines, avec une concentration de 0,3 microparticules par gramme de tissus (poids sec) mesurée chez les moules par exemple¹. Dans l'industrie plastique, des composés métalliques sont ajoutés aux plastiques en tant qu'additifs ou colorants, tel que l'oxyde de titane (TiO₂) ou le sulfate de baryum (BaSO₄).

L'objectif de cette étude préliminaire est de déterminer s'il est possible d'utiliser les métaux associés au PE afin de suivre ces microplastiques lors des processus de digestion animale. Pour cela, des microsphères de PE de taille connue contenant du Ti ou du Ba ont été soumises à un processus de digestion humaine simulée *in vitro*.

Dans un premier temps, les microsphères de PE de départ ont été caractérisées par une combinaison de techniques de microscopie et de micro-spectroscopie : microscopie électronique à balayage (MEB), micro-spectroscopie UV (ligne DISCO), IR (ligne SMIS) et X (ligne LUCIA) afin d'évaluer leur morphologie, ainsi que la distribution et la spéciation des métaux. Les images MEB montrent une structure sphérique des PE et une surface filamenteuse et poreuse. Les cartographies de fluorescence X (XRF) montrent une distribution hétérogène des métaux dans les microsphères de PE. Les caractérisations par spectroscopie d'absorption X (XANES) mettent en évidence la présence de TiO₂ sous forme rutile et confirment la présence de BaSO₄.

Les microsphères de PE ont ensuite été soumises à un processus de digestion humaine simulée *in vitro* normalisé², comportant trois phases de digestion : salivaire, gastrique et intestinale.

Après digestion, les analyses par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES) des surnageants de digestion ne montrent pas de relargage significatif des métaux en solution. Dans la phase solide, une couche non-uniforme et discontinue recouvrant toutes les microsphères de PE est observée. Ponctuellement, cette couche apparaît riche en soufre. Une fragmentation des PE contenant du Ba est également mise en évidence. Aucune modification de la spéciation des métaux à la suite de la digestion n'a été mise en évidence. Ces résultats convergent pour considérer les PE contenant du Ti comme de bons candidats pour le suivi des PE au cours des processus de digestion.

Les perspectives sont d'approfondir l'étude de cette interface PE/matière organique par microspectroscopie UV et microscopie électronique en transmission (MET) afin de comprendre les mécanismes d'interaction entre les PE et les fluides digestifs. Il est également envisagé d'effectuer un suivi en temps réel du processus de digestion par spectroscopie UV afin d'identifier et de comprendre le mécanisme de réaction à chaque étape du processus. La suite du projet consistera à suivre les microsphères de PE au cours de la digestion *in vivo* chez la moule, suivie d'une simulation de digestion humaine.

¹Hermabessiere et al. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.051>

²Brodkorb et al. 2019 <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

Poster n°4

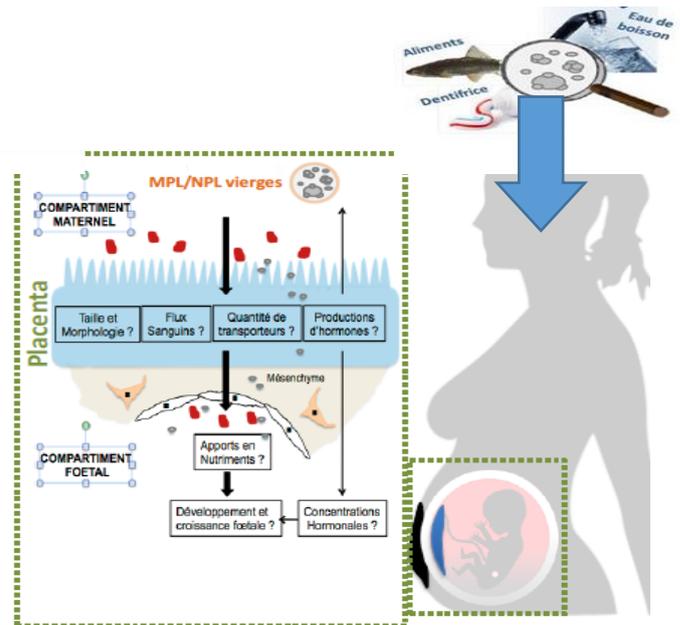
Effets de l'exposition sub-chronique maternelle à des microplastiques de polyéthylène par ingestion dans un modèle murin

Audrey Prézelin, Christophe Richard, Valérie Gelin, Baptiste Thenon, Michèle Dahirel, Delphine Ralliard-Rousseau, Maria-Jose Flores, Anne Couturier-Tarrade

Université Paris Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, 78350 Jouy en Josas, Fra.



Dans un contexte d'accroissement important de la production mondiale de plastique, le polyéthylène est le plus répandu et représente 40% de la production globale. La population, dont les femmes enceintes, est exposée par l'intermédiaire de l'environnement et de la chaîne alimentaire^{1,2,3}. L'environnement maternel peut avoir des conséquences sur la fonction placentaire et affecter la programmation et le phénotype foetal⁴. En effet, le placenta, situé à l'interface entre la mère et le foetus, est impliqué dans de nombreuses fonctions : échanges, productions d'hormones, immunitaires... indispensables au développement et à la croissance foetale⁵. Il n'existe que très peu de données sur les effets des plastiques en lien avec le placenta et concernent uniquement les particules de polystyrène. Dans ce contexte et afin de mieux appréhender les effets de l'exposition des mères et des unités foeto-placentaires aux microparticules de polyéthylène, un modèle murin a été généré.



Les souris ont été exposées à des microplastiques de polyéthylène d'une taille comprise entre 1 à 10µm par gavage (41,5 jours avant l'accouplement et tout au long de la gestation, soit 18,5 jours). Deux concentrations de particules ont été testées : une exposition par gavage avec 1mg de microparticules de polyéthylène/kg de poids corporel/jour (groupe MP1) et une exposition par gavage à 100mg de microparticules de polyéthylène/kg de poids corporel/jour (groupe MP100). La croissance foeto-placentaire a été évaluée par microéchographie à 13,5 jours de gestation. A 18,5 jours de gestation, une étude morphométrique du placenta par stéréologie a été réalisée afin de quantifier les structures placentaires.

A 13,5 jours de gestation, les mesures biométriques foeto-placentaires montrent un volume placentaire significativement augmenté dans le groupe MP100 par rapport au groupe contrôle. L'analyse factorielle multiple, incluant l'ensemble des mesures échographiques, montre que les groupes MP1 et MP100 diffèrent du groupe contrôle en raison d'une diminution de la fréquence cardiaque. De plus, le groupe MP100 se caractérise par rapport au groupe contrôle par une augmentation du volume placentaire.

A 18,5 jours de gestation, les mesures stéréologiques placentaires montrent une fraction volumique du trophoblaste significativement diminuée dans le groupe MP100 par rapport au groupe contrôle. La diminution de la fraction volumique du trophoblaste et celle de la surface trophoblastique expliquent la séparation entre les trois groupes dans l'analyse factorielle multiple.

L'ensemble de ces données indique des modifications morphologiques du placenta qui pourraient perturber les échanges foeto-maternels et ainsi conduire à une modification du phénotype de l'individu.

Nos perspectives sont d'étudier la biodistribution des microparticules de polyéthylène dans le placenta et d'évaluer l'organisation du réseau vasculaire placentaire par une méthode de clarification iDISCO.

1 A Karami, 2017, Chemosphere 184 : 841-48,doi : 10.1016/j.chemosphere.2017.06.048.

2 M. C. Rillig, 2012, Environmental Science & Technology 46, no 12 6453-54, doi : 10.1021/es302011r.

3 P. Mühlischlegel et al., 2017, Food Ad & Concs: Part A 34, no 11 : 1982-89, doi : 10.1080/19440049.2017.1347281.

4 P. Chavatte-Palmer et al., 2016, médecine/sciences 32, no 1 : 57-65, doi : 10.1051/medsci/20163201010.

5 P. Chavatte-Palmer et A. Tarrade, 2016, Annales d'Endocrinologie 77, no 2 : 67-74, doi : 10.1016/j.ando.2016.04.006.



Poster N°5

Evolution de la recombinaison méiotique pour optimiser le brassage de la diversité chez le colza

Anaël Brunet^{1,2}, Franz Boideau¹, Virginie Huteau^{1,2}, Gwenn Trotoux¹, Olivier Coriton^{1,2}, Anne-Marie Chèvre¹, Mathieu Rousseau-Gueutin¹

¹ INRAE, UMR 1349, IGEPP - BP 3532735653, Le Rheu cedex, Fra

² Plateforme de Cytogénétique, INRAE, UMR 1349, IGEPP - BP 3532735653 Le Rheu cedex, Fra

Le colza (*Brassica napus*, AACC, $2n=4x=38$), de la famille des *Brassicaceae*, est issu de l'hybridation interspécifique naturelle entre une navette (*Brassica rapa*, AA, $2n=2x=20$) et un chou (*Brassica oleracea*, CC, $2n=2x=18$). Cette plante à fort intérêt agronomique, a subi une sélection variétale importante à partir de la moitié du XXème siècle dans le but d'améliorer la qualité de son huile destinée à la vente. En conséquence, la diversité génétique chez le colza a été grandement diminuée, menant à des possibilités d'amélioration variétales fortement limitées. Ces dernières années plusieurs études ont montré que grâce à la recombinaison méiotique, il serait possible de répondre à ce problème (Leflon *et al.*, 2010 ; Pelé *et al.*, 2017). La recombinaison méiotique est un processus biologique faisant intervenir des crossing-overs (COs) permettant le brassage génétique à travers les générations. Ce processus est fortement contrôlé, à la fois en fréquence et en distribution, limitant ainsi le nombre de crossing-overs par chromosome. Des études ont permis de démontrer que lors d'un croisement d'un colza avec l'un de ses progéniteurs et particulièrement la navette, un allotriploïde AAC ayant un taux de recombinaison supérieur à un tétraploïde AACC était obtenu. Dans ce projet, nous avons voulu vérifier ceci à travers deux générations. Pour cette étude, nous avons utilisé les outils développés par la plateforme de cytogénétique moléculaire : l'immunolocalisation HEI10 qui a permis de localiser les foci HEI10 correspondant aux COs de classe I et du BAC-FISH permettant de repérer les chromosomes C du génome du chou et ainsi différencier le sous-génome A du sous-génome C chez les différents génotypes étudiés.



Poster N°6

Plateforme de Cytogénétique Moléculaire Végétale : Des outils au service de l'analyse des génomes

Virginie Huteau^{1,2} , Olivier Coriton^{1,2}

¹ INRAE, UMR 1349, IGEPP - BP 3532735653 – Le Rheu cedex, Fra

² Plateforme de Cytogénétique, INRAE, UMR 1349, IGEPP - BP 3532735653 Le Rheu cedex, Fra

Apport de la Cytogénétique Moléculaire Végétale - La cytogénétique moléculaire dont l'outil principal est l'**H**ybridation **In Situ** en **F**luorescence (FISH) sur préparation chromosomique a révolutionné l'approche de la cytogénétique traditionnelle. Le pouvoir de résolution permet de répondre à des projets d'étude des génomes par une analyse fine de la structure des chromosomes en méiose et mitose. Nous présenterons lors de cet atelier les différents outils proposés sur la PF. L'intérêt de cette technologie sera illustré au travers d'exemples développés sur la plate-forme portant sur la dynamique des éléments transposables visant à la compréhension de l'histoire évolutive de différents systèmes végétaux ou encore la compréhension de la structure des génomes polyploïdes.



Poster N°7

Observation de produits végétaux : de la macroscopie à la microscopie

Aurélie Putois*, Cécile Barron

UMR IATE, INRAE, Institut Agro, Univ. Montpellier, Montpellier, Fra

* : aurelie.putois@inrae.fr

La caractérisation de la structure et de la composition biochimique des produits végétaux (ex grain(e), coproduits, aliments céréaliers...) est un élément clé pour améliorer notre compréhension des processus de déstructuration/restructuration des matières premières agricoles. Elle doit être menée à différentes échelles (organe, tissu, structure sub-cellulaire, polymère) qui impliquent notamment des techniques d'imagerie (microscopie, macroscopie). Elles s'appliquent à des objets divers (particules, organes, coupes d'organes...) présentant une grande variabilité de taille et polydispersité. Les paramètres morphologiques des objets (ou des éléments constitutifs), et leur état de surface doivent être obtenus avec une bonne résolution spatiale. L'information structurale acquise à l'échelle du micron doit être couplée à une information de composition (notamment via des techniques d'histochemie ou la mise en œuvre d'imagerie multispectrale en autofluorescence). La prise en compte de la variabilité des matières premières impose par ailleurs d'acquérir des collections importantes d'images.



Poster N°8

RIS : Réseau Imagerie des Sols

Amenc Laurie^{*a}, Lacoste Marine^b, Watteau Françoise^c

^a INRAE, UMR Eco&Sols, F-34060, Montpellier, Fra

^b INRAE, URSOLS, F-45075, Orléans, Fra.

^c Université de Lorraine, Laboratoire Sols et Environnement, F-54505, Vandoeuvre-lès-Nancy, Fra

* Adresse électronique de l'auteur qui présentera

L'objectif du Réseau Imagerie des Sols (RIS) est de rassembler la communauté française (INRAE, mais aussi les autres instituts et universités) travaillant sur l'imagerie des sols, quelle que soit la technique, afin d'échanger sur la place que prennent aujourd'hui les travaux d'imagerie dans nos questions de recherche en science du sol.

De nombreuses thématiques de recherche sont concernées : pédogénèse, biogéochimie d'éléments majeurs ou traces, transport d'eau et de solutés, écologie des microorganismes ou de la macrofaune, écophysologie des racines, structure du sol, etc. Les techniques d'imagerie sont diverses (tomographie à rayons X ou à neutrons, NanoSIMS, MEB/MET, IRM, RMN 19F, μ XRF, scanner, stéréomicroscopie, confocal, caméras, etc.), évoluent vite, et permettent d'accéder à des échelles spatiales allant du nm à la dizaine de cm.

Les images produites peuvent être en 2D ou en 3D, et des techniques de traitements avancées permettent aujourd'hui de corréler des images produites par différents instruments pour étudier de manière intégrée différents composants ou processus des sols. L'imagerie permet également d'aborder la dynamique temporelle des processus étudiés, parfois à des résolutions très fines grâce à l'amélioration des techniques permettant des acquisitions rapides d'images. Liées à l'utilisation de ces différentes technologies, les images acquises génèrent beaucoup d'informations et des verrous scientifiques ont été identifiés pour chaque étape de la chaîne d'imagerie, depuis la préparation des échantillons et l'acquisition des images, jusqu'au traitement et l'exploitation de ces nombreuses données.

Fédérer les connaissances et compétences en Imagerie des Sols constitue donc un enjeu important pour une optimisation de l'utilisation de ces ressources pour tout utilisateur potentiel.

Contact RIS : reseau-imagerie-sols-anim@inrae.fr



Liste des participants

ADENOT Pierre
INRAE - UMR 1198 BREED
78350 Jouy en Josas
pierre.adenot@inrae.fr

AL HILALI Hana
JEULIN
468 rue Jacques Monod
27000 Evreux
halhilali@jeulin.fr

ALVARADO Camille
INRAE UMR BIA-PVPP
rue de la Géraudière
44300 Nantes
camille.alvarado@inrae.fr

AMENC Laurie
INRAE UMR 1222 Eco&Sols
2 place Viala
34060 Montpellier
laurie.amenc@inrae.fr

ANGENIEUX Magaly
INRAE Theix - QuaPA/ IT
63122 Saint Genès Champanelle
magaly.angenieux@inrae.fr

AVOSCAN Laure
INRAE Centre de Microscopie
DImaCell – Agroécologie
17 rue de Sully
21065 Dijon cedex
laure.avoscan@inrae.fr

BARRON Cécile
INRAE IATE
2 place Pierre Viala
34060 Montpellier
cecile.barron@inrae.fr

BATARD Sandrine
Nikon Instruments
191 Rue Du Marche Rollay
94504 Champigny Sur Marne
Sandrine.Batard@nikon.com

BELKESSA Nawel
Synchrotron SOLEIL
L'orme des merisiers
BP48
91190 Saint-Aubin
nawel.belkessa@synchrotron-soleil.fr

BLACHE Marie-Claire
INRAE UMR PRC/
Plateau d'Imagerie Cellulaire
37380 Nouzilly
marie-claire.blache@inrae.fr

BONNET GELEBART Julia
IGDR CNRS
2 avenue du Professeur Léon Bernard
35043 Rennes
julia.bonnet-gelebart@univ-rennes1.fr

BONNOTTE Aline
INRAE Centre microscopie DImaCell
Agroécologie
17 rue de Sully
21065 Dijon
aline.bonnotte@u-bourgogne.fr

BORNARD Isabelle
INRAE UR407 Pathologie Végétale
Domaine Saint Maurice
67 allée des chênes
84143 Montfavet
isabelle.bornard@inrae.fr

BOUTINAUD Marion
INRAE UMR PEGASE
16, le clos
35590 Saint-Gilles
marion.boutinaud@inrae.fr

BRANTHONNE Adèle
INRAE LPGP BAT 16A
Allée Henri Fabre
35042 Rennes cedex
adele.branthonne@inrae.fr



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

BUGEON Jérôme
INRAE LPGP
Campus de Beaulieu
35042 Rennes
jerome.bugeon@inrae.fr

CAHU Armelle
INRAE NUMECAN
15 le clos
35590 Saint-Gilles
armelle.cahu@inrae.fr

CASTANHA DA SILVA Nanci
INRAE OPAALE / IRM-Food
17 avenue de Cucillé
35000 Rennes
nanci.castanha-da-silva@inrae.fr

CAYLA Xavier
INRAE PRC
37380 Nouzilly
xavier.cayla@inrae.fr

CHABANAIS Julien
Diagomics
7 Avenue Didier Daurat
31702 Blagnac
j.chabanais@diagomics.com

CLEMENT Héliciane
INRAE OPAALE
17 avenue de Cucillé
35044 Rennes cedex
heliciane.clement@inrae.fr

CORITON Olivier
INRAE UMR 1349 IGEPP
Domaine de la Motte
35653 Le Rheu cedex
coriton.olivier@inrae.fr

COSTACHE Vlad
INRAE MIMA2 Micalis
Domaine du Vilvert
Bat. 440 R -2
78350 Jouy en Josas
vlad.costache@inrae.fr

DANCER Pierre-Alix
Kaer Labs
2 rue Alfred Kastler
44300 Nantes
pierrealix@kaerlabs.com

DANIEL Nathalie
INRAE STLO
85 rue de saint Briec
35000 Rennes
nathalie.daniel@inrae.fr

DE VILLEMAGNE Perrine
Kaer Labs
2 Rue Alfred Kastler
44300 Nantes
perrine@kaerlabs.com

DESSAUGE Frédéric
INRAE PEGASE
Le Clos
35590 Saint-Gilles
frederic.dessauge@inrae.fr

D'ORLANDO Angéline
INRAE BIA
3 Impasse Yvette Cauchois
La Géraudière
44316 Nantes
angelina.dorlando@inrae.fr

DUBREIL Laurence
INRAE UMR703 PAnTher
Oniris site de la chanterrie
Route de Gachet
44307 Nantes
laurence.dubreil@oniris-nantes.fr

FAMELART Marie-Hélène
INRAE-Institut Agro-Rennes STLO
65, rue de St Briec
35042 Rennes
marie-helene.famelart@inrae.fr

FANIER Jonathan
Hamamatsu Photonics France
19 rue du Saule Trapu
91300 Massy
jfanier@hamamatsu.fr

FAUTREL Alain
Plateforme H2P2 BIOSIT
Université de Rennes1
2 avenue du prof. leon Bernard
35043 Rennes
alain.fautrel@univ-rennes1.fr



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

FINOT Laurence
INRAE PEGASE
16 le clos
35590 Saint-Gilles
laurence.finot@inrae.fr

FLEURISSON Romain
Nikon Instruments
191 Rue Du Marche Rollay
94504 Champigny Sur Marne
R.Fleurisson@nikon.com

FLEUROT Renaud
INRAE PRC
domaine de l'Orfrasière
37380 Nouzilly
renaud.fleurot@inrae.fr

FORESTIER Pierre
France Scientifique Microscopie
69230 Saint Genis Laval
pierre.forestier@france-scientifique.fr

FRANCOIS Marie-Christine
INRAE IEES
Route de St Cyr
78026 Versailles
marie-christine.francois@inrae.fr

FRIBOURG Caroline
Diagomics
7 Avenue Didier Daurat
31702 Blagnac
c.fribourg@diagomics.com

GERMOND Arno
INRAE QuaPA
63450 Theix
arno.germond@gmail.com

GILLERON Laetitia
LFG Distribution
64 bis chemin des Bruyeres
69280 Sainte Consorce
laetitia_gilleron@yahoo.fr

GUEDON Eric
INRAE UMR1253 STLO
65 rue de Saint Brieuc
35000 Rennes
eric.guedon@inrae.fr

GUILLON Fabienne
INRAE BIA
Imp. Yvette Cauchois
44300 Nantes
fabienne.guillon@inrae.fr

HUE Isabelle
INRAE LPGP
Campus de Beaulieu Bat 16A
35042 Rennes Cedex
isabelle.hue@inrae.fr

HUREL Aurélie
INRAE IJPB
22 Rue de l'école
28320 GAS
aurelie.hurel@inrae.fr

HUTEAU Virginie
INRAE UMR IGEPP
Plate-forme de cytogénétique
Domaine de la Motte
35653 Le Rheu cedex
virginie.huteau@inrae.fr

LAURANS Françoise
INRAE UMR BioForA
45075 Orléans Cedex 2
francoise.laurans@inrae.fr

LE BRAS Stéphanie
INRAE IGEPP
Domaine de la Motte
35653 Le Rheu cedex
stephanie.lebras@univ-rennes1.fr

LE FEUNTEUN Steven
INRAE UMR STLO
65 rue de Saint Brieuc
35000 Rennes
steven.le-feunteun@inrae.fr

LE GOLVAN Hervé
HIROX EUROPE
n/a 300 RN 6 - Le Bois des Cotes Bâtiment A
69760 Limonest
herve@hirox-europe.com

LE GOUAR Yann
INRAE STLO
65 rue de Saint Brieuc
35000 Rennes
yann.le-gouar@inrae.fr



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

LEGLAND David
INRAE BIA-BIBS
rue de la Géraudière
44316 Nantes
david.legland@inrae.fr

LEPREVOST Théo
INRAE UMR IGEP
Domaine de la Motte
35653 Le Rheu Cedex
theo.leprevost@inrae.fr

LESAGE Manon
INRAE UR 1037 LPGP
16A All. Henri Fabre
35042 RENNES
manon.lesage@inrae.fr

LETHEULE Martine
INRAE BREED/GABI Bât.230
Domaine de Vilvert
78352 Jouy-en-Josas
martine.letheule@inrae.fr

LUCAS Tiphaine
INRAE OPAALE
17 avenue de Cucillé
35044 Rennes
tiphaine.lucas@inrae.fr

MEURISSE Maryse
INRAE UMR PRC
Plateau d'Imagerie Cellulaire
37380 Nouzilly
maryse.meurisse@inrae.fr

MEYLHEUC Thierry
INRAE Plateforme de microscopie
Unité de pathologie végétale
67 allée des Chênes Domaine St Maurice
CS 60094
84143 Montfavet cedex
thierry.meylheuc@inrae.fr

MILCENT Sylvain
JEULIN
468 rue jacques Monod
27000 Evreux
sylvain.milcent@jeulin.fr

MORISSE Mélody
INRAE UMR PRC Equipe NECOS
37100 Tours
melody.morisse@inrae.fr

OUAATTA Chaymae
Nikon Instruments
191 Rue Du Marche Rollay
94500 Champigny Sur Marne
chaymae.ouaatta@nikon.com

PECOT Thierry
Université de Rennes 1 – Biosit
2 avenue du Professeur Léon Bernard
35042 Rennes
thierry.pecot@univ-rennes1.fr

PERRIN Emilie
INRAE 1268URBIA
Rue de la Géraudière
44300 NANTES
emilie.perrin@inrae.fr

PERRUCHOT Marie-Hélène
INRAE UMR PEGASE
16 Le Clos
35590 Saint-Gilles
marie-helene.perruchot@inrae.fr

PICHON Julien
INRAE UMR1282 ISP (IMI team)
282 Route de crotelles
37380 Nouzilly
julien.pichon.1@inrae.fr

PORCON Béatrice
INRAE LPGP BAT 16A
Allée Henri Fabre
35042 Rennes
beatrice.porcon@inrae.fr

POUTHIER Adeline
Hamamatsu Photonics Biomedical
19 Rue du Saule Trapu
91300 Massy
apouthier@hamamatsu.fr

PREZELIN Audrey
INRAE UMR 1198 BREED
domaine de vilvert
78350 Jouy en Josas
audrey.prezelin@inrae.fr



11èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE

PUTOIS Aurélie
INRAE IATE
2 place Viala, Bât31
34060 Montpellier
aurelie.putois@inrae.fr

RAKSHI Elham
INRAE OPAALE
35760 Rennes
elham.rakshi@inrae.fr

RANDUINEAU Gwénaëlle
INRAE NUMECAN
16 Le Clos
35590 Saint-Gilles
randuineaug@inrae.fr

RAULT Lucie
INRAE STLO
65 rue de St Brieuç
35042 Rennes
lucie.rault@inrae.fr

RAVEL Christine
INRAE QuaPA/IT site de Theix
63122 Saint Genès Champanelle
christine.ravel@inrae.fr

RIVARD Camille
Synchrotron SOLEIL – INRAE UAR 1008
L'Orme des Merisiers
91190 Saint-Aubin
camille.rivard@synchrotron-soleil.fr

ROSSIGNOL Christelle
INRAE UMR1282 ISP
37380 Nouzilly
christelle.rossignol@inrae.fr

SEBILLOT Anthony
Biogenouest,
Université de Rennes 1, Biosit / R&D Bio Santé
2 Avenue du Professeur Léon Bernard
CS 34317
35043 Rennes
anthony.sebillot@univ-rennes1.fr

SIMONNOT Julien
Milexia
91190 Saint-Aubin
julien.simonnot@milexia.com

THERMES Violette
INRAE LPGP
Campus de Beaulieu, Bât.16A
35042 Rennes
violette.thermes@inrae.fr

THOMAS Manon
INRAE LPGP
16A Allée Henri Fabre
35042 Rennes
manon.thomas@inrae.fr

TRAMIER Marc
CNRS IGDR / Biosit
2 av du Pr Léon Bernard
35043 Rennes
marc.tramier@univ-rennes1.fr

VENIEN Annie
INRAE QuaPA
Centre de Theix
63122 Saint Genès Champanelle
annie.venien@inrae.fr

VINCENT Annie
INRAE PEGASE
La Prise
35590 Saint-Gilles
annie.vincent@inrae.fr

WIART Sandra
INRAE UMR PEGASE 1348
16 le clos
35590 Saint-Gilles
sandraletort.wiart@inrae.fr



ORGANISATION

Comité scientifique & d'organisation

Adèle Branthonne (LPGP - Rennes)

Jérôme Bugeon (LPGP - Rennes)

Olivier Coriton (IGEPP - Le Rheu)

Laurence Finot (PEGASE - Saint-Gilles)

Myriam Grundy (PEGASE - Saint-Gilles)

Virginie Huteau (IGEPP - Le Rheu)

Gwénaëlle Randuineau (NuMeCan - Saint-Gilles)

Violette Thermes (LPGP - Rennes)

Manon Thomas (LPGP - Rennes)

Sandra Wiart-Letort (PEGASE - Saint-Gilles)