



RESEAU DES MICROSCOPISTES INRAE

BORDEAUX

20 au 22

Novembre

2024

13èmes Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRAE



Imagerie de l'organe à son ultrastructure :

Imagerie 3D et Imagerie de l'organe
Microscopie corrélative
Analyse d'images
Super résolution
Sondes fluorescentes



Table des matières

Nos partenaires	3
Programme.....	6
Résumés des présentations.....	9
Session 1: Super-Résolution	9
Session 2: Sondes fluorescentes	13
Session 3: Imagerie 3D – Imagerie de l'organe	16
Session 4: Analyse d'images	19
Session 5: Microscopie corrélative	23
Concours posters et résumés	28
Concours photo	41
Ateliers	42
Animations	50
Infos pratiques.....	52
Liste des participants	54



Nos partenaires

Nous remercions tous nos partenaires pour leur soutien !

Institutionnels

	147 rue de l'université 75338 Cedex 07 FRANCE Nous remercions tout particulièrement les départements TRANSFORM, PHASE, BAP, ECODIV pour leur soutien et leur confiance. Site : http://www.inrae.fr
> Pôle FTLV <i>se former tout au long de la vie</i>	Pôle Formation Tout au Long de la Vie Structure interne à INRAE
	Commission Nationale des Outils Collectifs Structure interne à INRAE
	351 cours de la Libération CS 10004 33405 Talence Cedex Site : https://www.u-bordeaux.fr
Grand Programme de Recherche BPS Bordeaux Plant Sciences	Grand Programme de Recherche labellisé par l'université de Bordeaux Site : GPR BPS
	6 Esp. des Arts et Métiers 33400 Talence Site : https://www.cnrs.fr
	Site : https://www.bic.u-bordeaux.fr/



	<p>Société Française des Microscopies</p>	<p>Sorbonne Université Campus P. et M. Curie - Case 243 4, place Jussieu 75 252 Paris cedex 05</p> <p>Site : https://sfmu.fr/fr/</p>
	<p>FRANCE-BIOIMAGING</p>	<p>France-BioImaging National Coordination Team BioCampus Montpellier UMS 3426 CNRS – US 09 INSERM – UM Montpellier</p> <p>Site : https://france-bioimaging.org/</p>

Privés

	<p>191 Av. Aristide Briand 94230 Cachan</p> <p>Site : https://www.abbelight.com/</p>	<p>Mehdi Madi mmadi@abbelight.com</p> <p>Aditi Jain ajain@abbelight.com</p>
	<p>Hans-Adolf-Krebs-Weg 6 37077 Göttingen Allemagne</p> <p>Site : https://abberior.rocks/</p>	<p>Frédéric Eghiaian f.eghiaian@abberior-instruments.com</p>
	<p>11 Avenue de Canteranne Cité de la Photonique Bâtiment Elnath 33600 Pessac</p> <p>Site : https://argolight.com/</p>	<p>Renaud Ginet r.ginet@argolight.com</p> <p>Arnaud Royon a.royon@argolight.com</p>
	<p>22B route de saint Ybars, 31190 Mauressac</p> <p>Site : https://www.deltamicroscopies.com/</p>	<p>Samia Souai samia@deltamicroscopies.com</p>
	<p>Parc Spirit 94 Av. du Progrès Bât. C 69680 Chassieu</p> <p>Site : https://france-scientifique.fr/</p>	<p>Pierre Forestier pierre.forestier@france-scientifique.fr</p> <p>Khalid Rbii khalid.rbii@france-scientifique.fr</p>
	<p>19 Rue du Saule Trapu 91300 Massy, France</p> <p>Site : https://www.hamamatsu.com</p>	<p>Jonathan Fanier jonathan.fanier@hamamatsu.eu</p>



		Mélanie Gaillet melanie.gaillet@hamamatsu.eu
	1 Allée de Giverny 78290 CROISSY-sur-SEINE Site : https://www.jeol.fr/	Grégoire Mercier mercier@jeol.fr Sophia Rajendirane rajendirane@jeol.fr
	1 Rue du 1er Mai Immeuble Axe Sur Seine, Hall C2 CS 50169 Nanterre Cedex 92752 France Site : https://www.leica-microsystems.com	Andy Tempez andy.tempez@leica-microsystems.com Clément Laigle clement.laigle@leica-microsystems.com
	Espace Technologique de Saint Aubin, Bâtiment Mercury II 91190 Saint Aubin France Site : https://milexia.com/fr/	Thierry Grenut thierry.grenut@milexia.com Fathi El Kholy fathi.elkholy@milexia.com
	191 Rue du Marché Rollay 94504 Champigny sur Marne Cedex France Site : https://www.microscope.healthcare.nikon.com	Christophe Machu christophe.machu@nikon.com Rémi Van Straaten remi.vanstraaten@nikon.com
	15, avenue Edouard Belin 92500 Rueil-Malmaison France Site : https://www.micro-shop.zeiss.com	Michael Gue michael.gue@zeiss.com Yann Godet yann.godet@zeiss.com
	64 bis chemin des Bruyères 69280 SAINTE CONSORCE – France Site : http://www.lfg-distribution.fr/	Leatitia Gilleron lgilleron@lfg-distribution.fr Frédéric Gilleron fgilleron@lfg-distribution.fr
	ZAC Saint-Charles, 3ème Avenue, n°95 13710 Fuveau Site : https://www.tescan.com/	David Barresi david.barresi@tescan.com Grégoire Mercier gregoire.mercier@tescan.com



Programme

Mercredi 20 novembre 2024

Introduction des JST - [Amphithéâtre C & J Bové](#)

12h00 – 13h45 Accueil des participants – Remise des badges et paniers-repas (distribution en salle ISPA)

13h45 – 14h00 Mots d'introduction par le comité du réseau Rμl et le comité d'organisation / présentation du Centre INRAE-Bordeaux

14h00 – 14h30 Présentation des structures par Patrick Moreau (FED/BIC)

Session 1 : Super-résolution - [Amphithéâtre C & J Bové](#)

14h30 – 15h00 Keynote speaker Magali MONDIN (BIC) : *25 ans de super-résolution, faisons le point*

15h00 – 15h20 Magali GRISON (LBM) : *Super resolution tau-sted microscopy applied at tissue scale in arabidopsis root tip*

15h20 – 15h40 Jim DOMPIERRE (IBGC) : *Microscopie d'expansion chez la levure*

15h40 – 16h00 Présentations flashes posters

16h00 – 16h30 Pause café / session posters - [salle IBVM](#)

Session2 : Sondes fluorescentes - [Amphithéâtre C & J Bové](#)

16h30 – 17h00 Keynote speaker Mayeul COLLOT (Université Strasbourg) : *Conjurer la malédiction d'Apollon par la photo-oxydation dirigée*

17h00 – 17h20 Yohann BOUTTÉ (LBM) : *The use of probes and dyes in plants*

17h20 – 17h40 Laurent COGNET (LP2N) : *Single-molecule localization microscopy and molecular diffusion in the biological tissue complexity*

17h40 – 18h10 Présentations flashes sponsors

Dégustation de vins et spécialités locales



Jeudi 21 novembre 2024

Session 3 : Imagerie 3D/ Imagerie de l'organe - [salle ISPA](#)

8h30 – 9h00 Keynote speaker Mathieu DUCROS (BIC) : *Défis et solutions pour la microscopie 3D*

9h00 – 9h20 Marilou CAMBOUE (EGFV) : *Tomographie par rayons X de l'interface de greffes de vigne*

9h20 – 9h40 Norbert BOLLIER (BFP) : *Meristem response to the heat stress in tomato*

9h40 – 10h10 Pause café / session posters - [salle IBVM](#)

Session 4 : Analyse d'images - [salle ISPA](#)

10h10 – 10h40 Keynote speakers Jérémie Teillon et Sébastien Marais (BIC) : *Analyse d'images à l'échelle du tissu et de l'organe*

10h40 – 11h00 Tatiana MORAES (LBM) : *Unraveling cell communication in aspen meristems through automated image data analysis*

11h00 – 11h20 Christelle LANGEVIN (INRAE Jouy-en-Josas) : *3D histology: developments for 3D imaging of large cleared tissues and recognition of patterns guided by AI*

11h20 – 11h50 Assemblée Générale RμI

11h50 – 13h20 Buffet - [salle IBVM](#)

14h - 17h Après-midi dédiée aux [ateliers et ateliers-demos des partenaires privés](#)

Ateliers localisés sur le Campus Carreire au Bordeaux Imaging Center : départ en bus à **13h20**

Ateliers localisés sur le Centre INRAE ([bâtiment IBVM](#)) : début des ateliers à **14h**

19h45 [Repas de gala](#) - Embarquement au ponton Les Bateaux Bordelais (face au 24 quai des Chartrons à Bordeaux) !

Les participants se rendent au ponton par leurs propres moyens.



Vendredi 22 novembre 2024

9h00 – 9h30 Retour sur les ateliers, quizz, sondage - [Amphithéâtre C & J Bové](#)

Session 5 : Microscopie corrélative - [Amphithéâtre C & J Bové](#)

9h30 – 10h00 Keynote speaker Clément CHAMBAUD (LBM/ WG CLEM FBI) : *Présentation du WG CLEM France Biolimaging et introduction à la microscopie corrélative et ses enjeux*

10h00 – 10h20 Rémi FRONZES (IECB) : *Cryo CLEM*

10h20 – 11h00 Photo de groupe + Pause café / session posters en [salle IBVM](#)

11h00 – 11h20 Thibault DHELEMME (IMN) : *Arraytomographie et CLEM chez un modèle murin double transgénique*

11h20 – 11h40 Anthony VIAL (CBMN) : *La microscopie corrélative afm-fluorescence, un outil pour l'étude des systèmes biologiques à l'échelle nanométrique*

11h40 – 12h10 Résultats concours photo et concours Poster

12h10 – Distribution des panier-repas, départ des participants



Résumés des présentations

Mercredi 20 novembre 2024

SESSION 1: SUPER-RESOLUTION

25 ANS DE SUPER-RESOLUTION, FAISONS LE POINT

Magali Mondin

Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, BIC, UAR 3420, F-33600 Pessac, France
magali.mondin@u-bordeaux.fr

Les techniques de super-résolution en microscopie photonique ne cessent de se développer depuis 25 ans. Les développements technologiques tels que le STED et le SIM ont permis de dépasser la barrière de diffraction de 200 nm pour atteindre une résolution latérale de l'ordre de 80 nm. En 2006, la démocratisation des techniques basées sur la détection de molécules individuelles (PALM, dSTORM) a permis d'obtenir des résolutions de quelques dizaines de nanomètres, ordre de grandeur jamais atteint auparavant en microscopie photonique. Ces techniques continuent de se développer, à la fois du point de vue de la préparation des échantillons (développement de sondes), mais aussi du point de vue de l'acquisition (développements optiques) et enfin du point de vue de l'analyse (développement du deep learning).

Au cours de cette présentation nous reviendrons sur les différentes familles de techniques, leurs principes et leurs applications, et nous discuterons de l'avenir de ces outils.



Biographie

Doctorat en neurosciences à l'université de Bordeaux obtenu en 2010. Etude de la synaptogenèse par des approches d'imagerie cellulaire et plus particulièrement de détection et suivi de molécules individuelles.

2 ans de CDD au BIC pour mettre en place les techniques de super-résolution basées sur la détection de molécules individuelles.

Responsable de la plateforme de microscopie de l'institut Biologie Valrose à Nice pendant 5 ans.

Depuis 2018, responsable de l'activité de microscopie de super-résolution en microscopie photonique au BIC.

SUPER RESOLUTION TAU-STED MICROSCOPY APPLIED AT TISSUE SCALE IN ARABIDOPSIS ROOT TIP

L. Fougère^{\$a}, M. Grison ^{\$*}^a, P. Laquela, M. Montrazy^a, Cordlières F.^b, Fernandez-Monreal M.^b, Poujol C.^b, Uemura T.^c, Nagano A.^c, Ito Y.^c and Boutté Y.^a

^a Laboratoire de Biogenèse Membranaire, CNRS-Université de Bordeaux, France

^b Bordeaux Imaging Center (BIC), US4, UAR 3420, F-33000 Bordeaux, France

^c Faculty of Core Research, Natural Science Division, Ochanomizu University, Tokyo, Japan

* magali.grison@u-bordeaux.fr

Many cutting-edge super resolution technologies and sample preparation workflows have emerged during the last decade. However, apart from techniques based on Single Molecule Localisation Microscopy such as SPT-PALM and STORM, a large part of them remains relatively unexploited or underexploited in plants. Moreover, in plants these technics are limited to the plasma membrane or the cell wall and do not allow access to subcellular compartments. To overcome this limitation, we established a partnership with the BIC to develop new super resolution methods applied to plant samples.

First, Tau-STED measures the fluorescence lifetime of the fluorophores during STED acquisition and using algorithm discriminates photons coming from the background and increase the balance of photons coming from the fluorophore resulting in an enhanced contrast image of the structures. This technic pushes the resolution beyond the limits of conventional gated-STED microscopy and allow the access to a 30-50 nm of resolution (xy) in *Arabidopsis* root tip. Using multi-colours imaging we were able to demonstrate that the cis-Golgi labelled by Membrin 12 is a tubulo-vesicular network which stabilizes close to the medial Golgi [1].

Second, we successfully set up expansion microscopy in *Arabidopsis* root tip. Expansion microscopy is a relatively recent method which, after anchoring and embedding of the sample followed by a random proteinase K digestion, allows an isotropic expansion of the sample. By increasing mechanically, the size of the sample and maintaining the spatial orientation of the molecules and subcellular ultrastructure (expansion factor = 4), this technic allows access to multi-colours super resolution microscopy in 3 dimensions and to reach a resolution of 60 nm (xy) when combined to Airyscan microscopy and less than 15 nm when combined to STED [2].

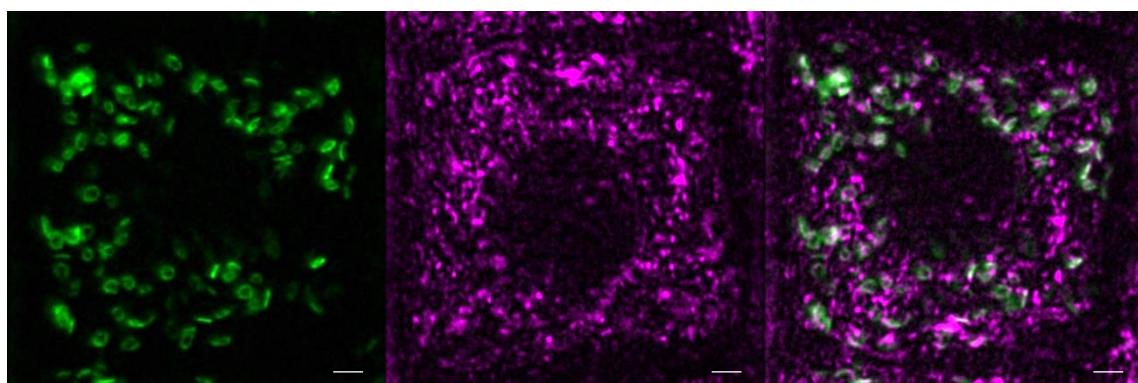


Figure 1 : medial-Golgi cisterna (green) and Cis-Golgi network (magenta) in epidermal cells of *A.thaliana* root tip imaged using tau-STED. Bar 1µm

References

- [1] Fougère L.^{\$}, Grison M.^{\$}, Laquel P., Montrazy M., Cordlières F., Fernandez-Monreal M., Poujol C., Uemura T., Nagano A., Ito Y. and Boutté Y. (2024), *Nature Cell Biology*, in revision
[2] Grison M., Maucort G., Dumazel A., Champelovier D., Shimizu Y., Boutté Y., Fernandez-Monreal M. and Bayer M. (2024), *The Plant Cell*, in press.

Biographie



Magali did her PhD in the group of Emmanuelle Bayer on plasmodesmata where she described the lipid composition of plasmodesmata and their capability to remodel their molecular composition upon stress condition. She then focused on light microscopy and since 2020 she develops or implements super resolution microscopy methods in *Arabidopsis* root tip.



ExS, A MEMBRANE AND 3D SHAPE PRESERVING EXPANSION MICROSCOPY PROTOCOL FOR BUDDING YEAST, SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Jim Dompierre¹

¹ CNRS, UMR5095, 1 rue Camille Saint-Saëns, 33077, Bordeaux cedex, France

Due to its relative ease of endogenous tagging and live-cell fluorescence microscopy, the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, has served as a very powerful model organism to study complex cellular processes. Super-resolution microscopy has in recent years paved the way to a better understanding of the spatial organization of molecules in cells, but its wide use in yeasts has remained limited due to the specific know-how and instrumentation required. By swelling the biological sample isotropically by a factor of 4 to 20 in each direction, Expansion Microscopy (ExM) allows visualization of molecules at nanoscale resolution with a simple wide-field microscope.

Today, few ExM protocols enabling super-resolution microscopy in yeasts exists, but invariably require enzymatic cell wall digestion, called spheroplasting. Inevitably, the overall cellular architecture is perturbed considerably in the resulting fragile spheroplasts and numerous membrane compartments are affected.

Here, we show a membrane and 3D shape preserving ExM protocol for *Saccharomyces cerevisiae*, ExS, avoiding spheroplastization. By optimizing cellular membrane detection, we demonstrate that ExS allows imaging of the mitochondrial membranes remodeling depending on cell metabolism.

We show that this protocol is compatible with iterative expansion providing visualization of budding yeast architecture at nanoscale resolution with a simple wide field microscope.

SESSION 2: SONDES FLUORESCENTES

CONJURER LA MALEDICTION D'APOLLON PAR LA PHOTO-OXYDATION DIRIGEE

Mayeul Collot*^a

^a Chimie des Systèmes Photoresponsifs, Laboratoire de Chémo-Biologie Synthétique et Thérapeutique (CBST) UMR 7199, CNRS, Université de Strasbourg, F-67400 Illkirch, France

* mayeul.collot@unistra.fr

Dans la mythologie grecque, Apollon frappe Laïos d'une malédiction le condamnant à être tué par Oedipe, le fils qu'il a engendré (Figure 1). Il semble que nos sondes fluorescentes soient frappées de la même malédiction. En effet, sous irradiation, celles-ci produisent, entre autres, de l'oxygène singulet, qui cause leur extinction. Nombre d'entre nous ont observé ce phénomène, bien connu sous le nom de « photobleaching ».

Dans cette conférence, nous verrons que cette malédiction peut être conjurée par un mécanisme que nous avons récemment établi : la photo-oxydation dirigée.^[1] En dirigeant l'attaque de l'oxygène singulet, il est possible d'obtenir des sondes fluorescentes présentant des propriétés de photoconversion, de photoactivation et de photo-commutation (Figure 1). En ciblant ces sondes vers différents compartiments cellulaires, il devient possible de réaliser leur photoconversion pour des applications de suivi en deux couleurs et de produire des images de microscopie à super résolution (SMLM) sur des cellules vivantes (Figure 1).^[2]

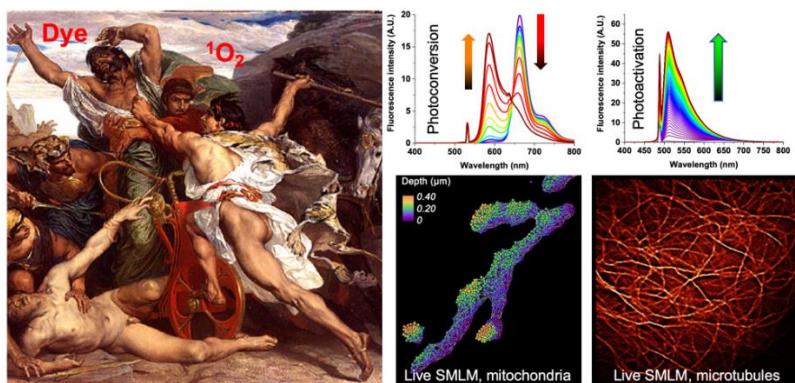


Figure 1: Conjurer la malédiction d'Apollon permet d'obtenir des sondes photomodulables

Références

- [1] Saladin, L.; Breton, V.; Dal Pra, O.; Klymchenko, A. S.; Danglot, L.; Didier, P.; Collot, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (4), e202215085. <https://doi.org/10.1002/anie.202215085>.
- [2] Saladin, L.; Breton, V.; Le Berruyer, V.; Nazac, P.; Lequeu, T.; Didier, P.; Danglot, L.; Collot, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146* (25), 17456–17473. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c05231>.



Biographie

Mayeul Collot a intégré le CNRS en 2013 à l'Université de Strasbourg, où il dirige actuellement l'équipe de recherche « Chimie des Systèmes Photoresponsifs » en tant que directeur de recherche. Ses travaux portent sur le développement de sondes fluorescentes moléculaires et nanostructurées ciblées pour des applications en bioimagerie. Il est notamment à l'origine des sondes commerciales CaRuby-nano, MemBright®, et LipiBright®.



THE USE OF PROBES AND DYES IN PLANTS

Yohann Boutté^a, Matheus Montrazi^a, Louise Fougère^a, Magali Grison^a

^a Laboratoire de Biogenèse Membranaire LBM UMR5200 CNRS Université de Bordeaux, France

* yohann.boutte@u-bordeaux.fr

The use of probes and dyes in cell biology is widely adopted as a way to label molecules of interests including proteins, lipids and carbohydrates molecules in living or fixed cells. This labeling can be either direct, by specific binding to the molecule of interest, or indirect through the binding to an intermediate such as specific antibodies or sensors. From the most well-known FM4-64, used to track endocytosis, to the most recent development in genetic encoded biosensors and click-chemistry tools, a novel full panel has now opened to researchers to visualize molecules of interests *in situ*. In this presentation I will summarize the traditional use of probes and dyes in plants as well as the most recent development we are performing in my team. This will include a selection of probes and dyes applied to conventional microscopy to label lipids and the cell wall, probes and dyes applied to super-resolution microscopy such as lifetime Stimulated Emission Depletion (STED) and live cell STED, genetic encoded biosensors, development of new click-chemistry tools to label lipids. This presentation will be oriented towards a comprehensive methodological point of view but will be supported by the biological question my team is working on: the function of Golgi-mediated trafficking in cellular processes and the role of lipids into this.



Biographie

Yohann Boutté did his PhD thesis at CNRS Paris XI University between 2002 and 2005 under the supervision of Béatrice Satiat-Jeunemaitre. He did two successive post-docs in Sweden, at the Umeå Plant Science Center (UPSC) (2006-2010 and 2010-2012) under the supervision of Markus Grebe and Rishi Bhalerao. He is a CNRS researcher since 2012 and started his own independent group in 2016. His team is aiming at deciphering lipid-dependent mechanisms involved in secretory sorting of proteins to polar domains of the plasma membrane. To reach this goal the team is using state-of-the-art quantitative lipidomics and proteomics on immuno-purified intact pre- and post-Golgi sub-domains in combination with super-resolution confocal imaging, genetics and cell biology approaches. His most recent achievement is the redefinition of the organization of the Golgi apparatus by identifying a tubulo-vesiculated ER-to-Golgi intermediated compartment (ERGIC) in plant cells using super-resolution microscopy and live tracking, a question that was debated for decades in the field (Fougère[#], Grison[#] et al., BioRxiv, revision in Nature Cell Biology:
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.10.27.563925v1>).



SINGLE-MOLECULE LOCALIZATION MICROSCOPY AND MOLECULAR DIFFUSION IN THE BIOLOGICAL TISSUE COMPLEXITY

Laurent COGNET *^a

^aInstitut d'Optique – LP2N, CNRS UMR5298, Université de Bordeaux, 33400 Talence, France.

* Laurent.cognet@u-bordeaux.fr

I will show how the combination of single-molecule optical microscopy approaches with the development of near-infrared emitting nanoparticles and analytical methods derived from super-resolution microscopy, has enabled us to shed new light on molecular diffusion and structural organization of brain or liver structures, with a particular focus on the extracellular space of the living tissue in healthy and pathological conditions.

References

- [1] A.G. Godin et al Nature Nanotechnology 12 (2017) 238-243
- [2] A. Mandal, et al Sci. Rep., 10 (2020) 5286
- [3] F.N. Soria, et al Nature Comm., 11 (2020) 3440
- [4] C. Paviolo, et al Nanoletters, 22, 17 (2022) 6849-6856
- [5] AA Simon, et al Advanced Science, 11, (2024) 2309267
- [6] A Lee, et al Nano Letters 24 (18), (2024) 5603-5609



Biographie

Laurent COGNET is Research Director at CNRS and Principal investigator in nano&biophotonics at the Institute of Optics - University of Bordeaux. He is also the director of the Laboratory for Photonics, Digital Sciences and Nanoscience (LP2N) in Bordeaux. He received his PhD in 1999 in cold atom physics from the Université Paris-Saclay under the supervision of Alain Aspect, after which he turned to the field of nano&biophotonics as a Marie Curie postdoctoral researcher at the University of Leiden (NL) in Thomas Schmidt's group. His current research focuses on the spectroscopy of single nanostructures, in particular single-walled carbon nanotubes, the design of new approaches to super-resolution microscopy, and the study of molecular diffusion processes in complex environments with a view to their application to neuroscience as part of an ERC SYNERGY project. He has published over 110 articles in leading international journals and has received several awards for his achievements.
Website: www.cognet-research.com

Jeudi 21 novembre 2024

SESSION 3: IMAGERIE 3D – IMAGERIE DE L’ORGANE

DEFIS ET SOLUTIONS POUR LA MICROSCOPIE 3D

Mathieu DUCROS ^a

^a Bordeaux Imaging Center Université Bordeaux, CNRS UAR 3420, INSERM US4

* mathieu.ducros@u-bordeaux.fr

Les échantillons biologiques sont par nature tridimensionnels. Une représentation complète de la structure ou de l’activité biologique étudiée passe nécessairement par une observation volumétrique. Idéalement la méthode d’imagerie doit également rester non invasive et présenter des résolutions spatiales et temporelle adaptées au phénomène étudié.

Dans cette présentation je présenterais tout d’abord une revue didactique non exhaustive de différentes méthodes de microscopie 3D en indiquant leurs avantages et inconvénients. Je présenterai ensuite plus en détail la microscopie à feuille de lumière (LSFM) qui est une solution simple présentant un bon compromis entre la résolution spatiale, temporelle et la phototoxicité. J’illustrerai mon propos en présentant le principe, les caractéristiques et les applications de la microscopie à feuille de lumière de type lattice light sheet (LLS). Nous avons construit au Bordeaux Imaging Center un LLS qui est disponible à tous les utilisateurs de la plateforme pour des études dans des domaines variés tels que les neurosciences, la cancérologie ou bien le végétal (Figure 1).

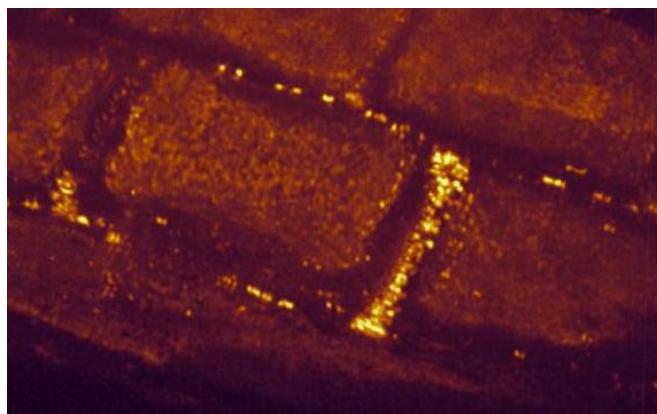


Figure 1 : Imagerie 3D haute résolution rapide des MCTP dans une racine d’arabidopsis réalisée par microscopie LLS.



TOMOGRAPHIE RAYON X DE L'INTERFACE DE GREFFES DE VIGNE

Marilou CAMBOUE. *^a, Sarah Jane COOKSON.^a

^a : UMR 1285 EGFV, INRAE, Villenave d'Ornon

* marilou.camboue@inrae.fr

Le greffage de la vigne est devenu presque systématique depuis la crise phylloxérique. La greffe en oméga est la plus utilisée en viticulture, représentant aujourd'hui 95 % des greffes [1].

La tomographie aux rayons X, associée à un agent de contraste couramment employé en médecine, le iohexol, permet d'obtenir, en plus des informations anatomiques et morphologiques, des données fonctionnelles sur la connexion des vaisseaux du xylème entre les deux partenaires greffés, de manière non destructive. Elle permet d'explorer divers points de greffe en 2D ainsi qu'en 3D (**Figure 1**).

Nous avons développé une méthodologie d'analyse d'images qui permet de segmenter avec précision les différents vaisseaux au niveau du point de greffe [2]. Cela ouvre des perspectives intéressantes pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au greffage, comme la soudure et la connexion des tissus.

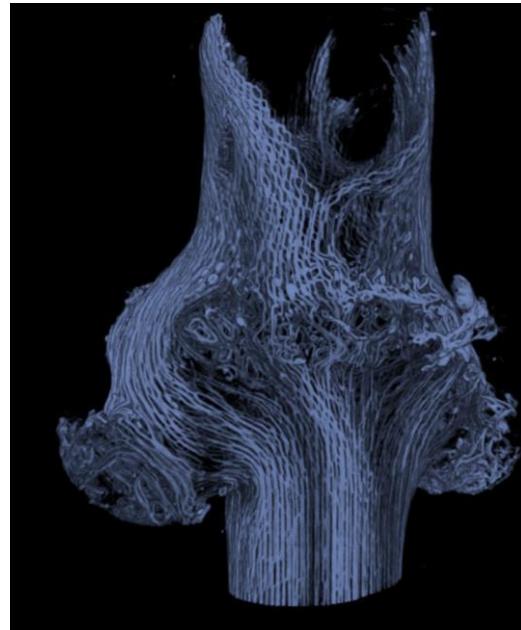


Figure 1: Représentation 3D du réseau vasculaire fonctionnel d'une greffe en oméga.

References

- [1] France AgriMer. (2018)..
- [2] Camboué M, Janoueix A, Tandonnet JP, Spilmont AS, Moisy C, Mathieu G, Cordelières F, Teillon J, Santesteban LG, Ollat N, Cookson SJ. (2024), *Plant Cell Environnement*, 47 (7), 2351-2361.



Biographie

Ingénieur d'étude pendant 3 ans sur différents projets, encadrée par Sarah Jane COOKSON, j'ai eu l'opportunité d'acquérir une expérience solide en microscopie, en histologie, en tomographie à rayon X, mais également en traitements d'images 3D. Je commence ma thèse depuis Octobre 2024, encadrée par Sarah Jane COOKSON, sur la caractérisation des modifications spatiotemporelles intervenant lors de la formation de l'union du greffon/porte-greffé, au sein de EGFV.

MERISTEM RESPONSE TO THE HEAT STRESS IN TOMATO

Norbert Bollier^{a*}, Eline Clerckx^a, Hélène Schaller^a and Nathalie Gonzalez^a

^aUniversité de Bordeaux, INRAE, UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie,
33140 Villenave d'Ornon, France

norbert.bollier@inrae.fr

The shoot apical meristem (SAM) is the source of all cells from which the aerial part of the plant is built and the maintenance of its function is necessary for plant reproduction and survival. Given its presence throughout the plant lifecycle, the SAM is subject to various environmental stresses, including heat stress (HS). However, despite its importance in plant vegetative and reproductive development, the current knowledge about the responses of the SAM to HS remains very limited.

Our project aims at understanding the consequences of HS on various stages of tomato meristem development across different scales including organ, cell, and molecular responses in different tomato genotypes. We showed that at the seedling stage, different tomato genotypes display distinct tolerance to a brief but intense HS, corresponding to several hours at 45°C. The HS differentially affects leaf initiation and growth depending on the genotype suggesting a genotype-dependent meristem HS tolerance. Using confocal microscopy on immunofluorescently labeled slices of fixed meristems, and live-imaging with an on-stage heating system, we detailed the succession of cellular events occurring during the HS. Our observations suggest that the different cell types in the meristem react differently to the HS. We recently obtained RNA-seq data from the SAM of four tomato genotypes during and after HS to evaluate transcriptional reprogramming and identify key molecular players of HS tolerance in tomato meristems.

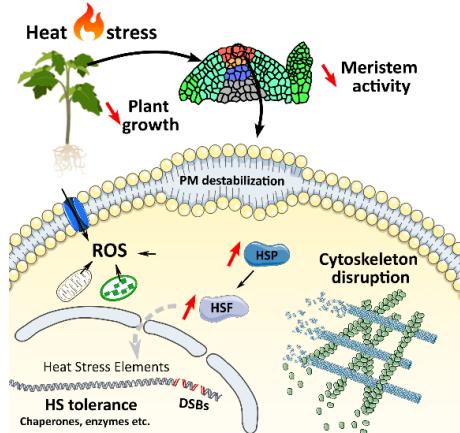


Figure 1: Schematic representation of the heat stress response and subcellular impact on meristem cells.



Biography

I'm a plant biologist with a strong focus on developmental biology

After a Bachelor degree in Cell Biology and Physiology and a Master degree in Plant biology and biotechnology at Bordeaux University I did my **PhD (2014–2016)** at **INRAE UMR1332** on the molecular regulation of meristems and floral development [1,2,3]. Then I continued in the same team with a **Post-doc (2017–2018)** on the impact of heat stress on tomato floral development [4]. After that, I moved to Belgium for a **Post-doc (2018–2020)** at the PSB-VIB lab (Belgium) in the team of Moritz Nowack to study the cell biology of programmed cell death (PCD) in *Arabidopsis* and *Marchantia polymorpha* [5,6] and genome editing [7,8]. I came back to France for a **Post-doc (2021–2023)** at INRAE UMR1332 to study the role of FW2.2 protein in cell-to-cell communication regulation during tomato fruit development [8]. I'm currently **assistant professor (2023–2027)** on a pre-recruitemet chair at Bordeaux University–INRAE UMR1332 to study the response of tomato meristem to heat stress using cellular and molecular biology approaches.



SESSION 4: ANALYSE D'IMAGES

ANALYSE D'IMAGES A L'ECHELLE DU TISSU ET DE L'ORGANE

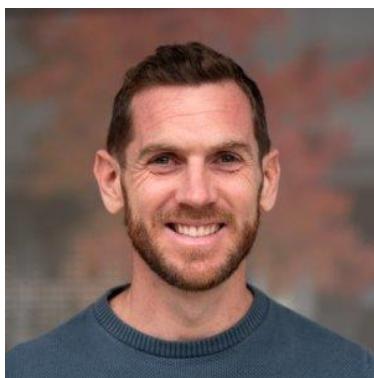
Sébastien Marais¹ et Jérémie Teillon¹

¹ Bordeaux Imaging Centre, UMS 3420, INRA-CNRS-INSERM-University of Bordeaux, Bordeaux, France

Les techniques d'imagerie actuelles permettent de générer de très grandes quantités de données 2D et 3D des échantillons grâce aux scanners de lames, aux systèmes d'acquisition haut-débit, aux microscopes light-sheet couplés aux méthodes de transparisation, etc....

Il est donc nécessaire de mettre en place des protocoles d'extraction de données efficaces sur des logiciels adaptés. Cette présentation aura pour but de présenter 2 logiciels utilisés dans le cadre de l'étape essentielle de l'analyse d'images pour :

- 1) les coupes de tissus 2D en très grand nombre obtenues avec un scanner de lames
- 2) les grands échantillons acquis en 3D sur un système à feuille de lumière.



Sebastien Marais



Jérémie Teillon



UNRAVELING CELL COMMUNICATION IN ASPEN MERISTEMS THROUGH AUTOMATED IMAGE DATA ANALYSIS

Tatiana, S. Moraes^{1*}; Bibek, Aryal²; Shashank, K. Pandey²; Aswin, Nair²; Fabrice, Cordelières³; Guillaume, Maucort³; Sara, I. Walker⁴; George, Bassal⁵; Rishikesh, P. Bhalerao²; Emmanuelle, Bayer¹

¹ University of Bordeaux, CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, F-33140 Villenave d'Ornon, France

² Umeå Plant Science Center, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, 90183 Umeå, Sweden

³ Bordeaux Imaging Centre, UMS 3420, INRA-CNRS-INSERM-University of Bordeaux, Bordeaux, France

⁴ School of Earth and Space Exploration, Arizona State University, Tempe, AZ 85287, USA

⁵ School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, UK

*Corresponding author: tatiana.de-souza-moraes@u-bordeaux.fr (postdoctoral researcher)

Plants face the challenge of adapting their growth and development to survive variable climatic conditions, requiring the ability to detect and integrate temperature fluctuations into robust multicellular decision-making processes. This study focuses on the mechanisms that govern the precise control of bud dormancy release in response to temperature signals, crucial for the survival of trees in temperate regions. We highlight the role of plasmodesmata (PD) in mediating cell communication during low-temperature responses, demonstrating that effective dormancy release is achieved through the regulation of PD dynamics. Utilizing advanced automated image data analysis, we extract critical parameters from primary confocal images, including PD, callose intensity, wall segments, and individual cells. Deep learning algorithms enable the identification and separation of objects of interest, facilitating the extraction of comprehensive data on cell outlines, wall segments, and PD states. By interconnecting this data within a relational database, we enable a quantitative analysis of PD behavior, revealing insights into how temperature input influences cell communication, contributing to the ability of aspen trees to respond and adjust to fluctuating environmental conditions.



Biography

Plant scientist with extensive knowledge in molecular and cell biology. MSc in Plant Physiology and Biochemistry from the Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ) and a PhD in Science from the Center for Nuclear Energy in Agriculture (CENA), both at the University of São Paulo, Brazil. PhD internship at Wageningen University & Research (WUR) in the Netherlands. Currently a member of Emmanuelle Bayer's team in the Laboratory of Membrane Biogenesis (LBM), focusing on cell-to-cell communication through plasmodesmata.

3D HISTOLOGY: DEVELOPMENTS FOR 3D IMAGING OF LARGE CLEARED TISSUES AND RECOGNITION OF PATTERNS GUIDED BY AI

Maxence Frétaud^a, Manon Mehraz^b, Dimitri Rigaudeau^b, Sébastien Rousselot^c, Karen Perronet^c, Thibaut Larcher^d, David Rousseau^e, François Marquier^c, Christelle Langevin^{b,*}

^a Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, Virologie et Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, France

^b Université Paris-Saclay, INRAE, Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et des Poissons, Jouy-en-Josas, France

^c Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS, CentraleSupélec, LuMIn, 91190 Gif-sur-Yvette, France

^d INRAE, Oniris, PAnTHER - APEX, Nantes, France

^e Université d'Angers, Laboratoire LARIS, UMR INRAe IRHS, Angers, France.

* christelle.langevin@inrae.fr

Recent imaging technologies advances have rendered possible the examination of whole-organ and organism in three-dimensions (3D) at high-resolution [1]. These cutting-edge methods have revolutionized several fields of biology like neurosciences, development and infectiology by allowing deep visualization of complex tissues at cellular resolution. Hence, 3D molecular phenotyping of complex tissues up to entire organism can promote significant progress in animal health diagnostic. In parallel with instrumental developments in imaging, the emergence of tissue clearing techniques which aim to render large tissues transparent (by reducing light scattering and absorption) is a significant step-forward allowing optical inspection of over cm biological organism.

IERP optimized such techniques and whole-mount immunostaining of large samples to process diverse livestock/mammalian organs [2-6] and fish species from zebrafish model organism to carp and trout [7-10]. We refined our protocols a step-further to a so-called “3D histology” pipeline for applications in development biology, comparative anatomy and infectiology [2-10]. Given the centimeter-size of such cleared samples, a dedicated imaging technology is necessary and IERP, together with physicists specialized in optics at ENS Paris-Saclay, build the first mesoscale Selective Plane Illumination Microscope in France, based on the [mesoSPIM](#) open-source design [11-12] able to image volumes up to 270 cm³, almost 8 times larger than commercial instruments while combining other specifications (double-sided horizontal excitation, horizontal detection path, automated rotation of the sample around a vertical axis) [11].

Ongoing developments aim to generate a morphological analysis pipeline of rainbow trout anatomy based on 3D imaging of whole-fish organism at cellular resolution. We will further develop novel tools for the detection and recognition of pathological patterns guided by AI leading to computer aided diagnosis of fish pathology.

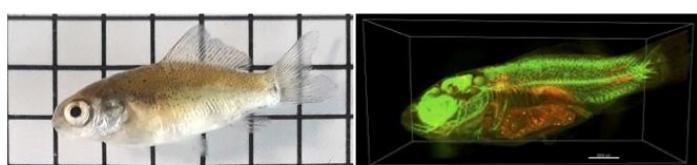


Figure 1 : Tissue clearing and lightsheet imaging of carp.
Left panel : carp before tissue clearing, right panel: 3D image of cleared carp immunolabelled for axonal tract (green), autofluorescence (red).

References

- [1] Cai R et al., (2019), *Nat. Neurosci.*, 2019 Feb;22(2):317-327.
- [2] Bordet E., *Front Immunol.* 2019 May 3;10:953.
- [3] Bernelin-Cottet C., *Viruses.* 2019 Jun 25;11(6):576.
- [4] Bryche B., *J Neurochem.* 2020 Sep;155(2):137-153.
- [5] Frétaud M, *Viruses.* 2021 Jan 28;13(2):201.
- [6] Chavatte-Palmer P., *Domest Anim Endocrinol.* 2022 Apr;79:106692.
- [7] Pérez-Pascual D., *PLoS Pathog.* 2021 Jan 29;17(1):e1009302.
- [8] Frétaud M., *Dev Dyn.* 2021 May;250(5):701-716.
- [9] Lelièvre E., *Dis Model Mech.* 2023 May 1;16(5):dmm049488.
- [10] Souto S., *PLoS Pathog.* 2024 Aug 5;20(8):e1012328.
- [11] Voigt FF., *Nat Methods.* 2019 Nov;16(11):1105-1108.
- [12] Vladimirov N., *Nat Commun.* 2024 Mar 27;15(1):2679.

Biography



Christelle Langevin studied microbiology at the University Paris XI, and received a PhD in Virology. She joined INRAE in 2003 during her post-doctorate studying prion diseases in rodent models (spreading mechanisms, species barriers and strain identity), and furthering her project using advanced dynamic imaging approaches at the Pasteur Institute. After securing a INRAE permanent position in 2010, she began using zebrafish to model infectious diseases and investigate the host pathogen interactions *in vivo*. There, she carry out a research activity and set up a zebrafish phenotyping platform at the infectiology experimental facility IERP equipped with a 2 photon microscope for 3D+t imaging of infectious diseases. Since 2020, she has headed IERP unit working in animal health to understand fish responses to aquaculture diseases and environmental stress. Her R&D activities open up new services for the academic community and private partners. Among recent developments, tissue clearing and three-dimensional imaging of fish body (zebrafish, trout and carps) has led to numerous collaborations. In 2022, she integrated of new equipment for high-throughput, high-content phenotyping of zebrafish larvae dedicated to drug screening applications and recently obtained funding to launch the MesoSPIM Paris Saclay initiative.

Vendredi 22 novembre 2024

SESSION 5: MICROSCOPIE CORRELATIVE

PRÉSENTATION DU WG CLEM FRANCE BIOLMAGING ET INTRODUCTION A LA MICROSCOPIE CORRELATIVE ET SES ENJEUX

Lysiane Brocard 1. *^a, Clément Chambaud 2.^{a,b}

^a Bordeaux Imaging Center UAR 3420, CNRS-INSERM-University of Bordeaux-INRAE, Bordeaux, France.

^b Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR5200, CNRS, Université de Bordeaux, Villenave d'Ornon, France.

* lysiane.brocard@inrae.fr

La microscopie corrélative connaît un essor considérable ces dernières années grâce à sa capacité de combiner plusieurs techniques d'imagerie sur un même échantillon, permettant ainsi de combiner les apports de chaque modalité pour un même échantillon. Ces avancées ouvrent la voie à des applications variées, notamment dans les domaines des neurosciences, de la cancérologie, des maladies infectieuses et de la biologie végétale, où une compréhension fine des structures et dynamiques cellulaires est cruciale.

Cependant, la mise en œuvre de la microscopie corrélative nécessite de relever de nombreux défis techniques. La préparation d'échantillons compatibles avec plusieurs types de microscopie, l'alignement des images obtenues à des résolutions différentes issues de ces technologies nécessitent des protocoles sophistiqués et des infrastructures de pointe. Face à ces enjeux complexes, il devient essentiel de promouvoir le partage de connaissances par la mise en place de réseaux d'expertises pour permettre à chacun d'identifier les infrastructures et les expertises permettant de conduire ces approches de pointes. Dans cette optique, le Work Group CLEM France Biolmaging permet de favoriser la synergie entre spécialistes et la diffusion d'informations pour accélérer les innovations méthodologiques et améliorer l'accessibilité de ces techniques de pointe pour la communauté scientifique.



Lysiane Brocard



Clément Chambaud



CRYO-CLEM

Rémi Fronzes

Institut Européen de Chimie et Biologie, University of Bordeaux , Pessac, France.



ARRAYTOMOGRAPHIE ET CLEM CHEZ UN MODELE MURIN DOUBLE TRANSGENIQUE

Thibault Dhellemmes 1.*^a, Mélina Petrel 2.^b, Isabelle Svahn 3.^b, Fabrice Cordelières 4.^b, Marc Landry 4.^a

^a IMN – CNRS UMR 5293 / 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux

^b BIC – INSERM US4 CNRS UAR 3420 / 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux

* thibault.dhellemmes@u-bordeaux.fr

L'objectif de cette étude est d'observer, chez un modèle murin, de potentielles interactions entre 2 populations de neurones GABAergique du cortex antérieur cingulaire (ACC) et des projections de neurones peptidergiques du pont. À travers notre hypothèse nous supposons que des projections de neurones du nucleus incertus (NI) coexprimant le neuropeptide relaxine-3 (RLN3) [1] entre en contact avec des interneurones GABAergique à somatostatine (SOM) ou à parvalbumine (PV) de manière direct ou indirect.

Afin d'observer ces interactions, nous avons utilisé un modèle murin double transgénique SOMFlp-RLN3Cre, chez lequel plusieurs injections stéréotaxiques ont été effectués. Ces injections ont pour but de permettre l'expression spécifique de peroxydase (APEX) au travers d'un vecteur viral, dans le cytosol des neurones RLN3 (AAV9-EF1a-DIO-dAPEX2) ou au sein des mitochondries des interneurones SOM (AAV9-EF1a-FDIO-cox4-dAPEX2-IRES-EGFP-WPRE). L'identification spécifiques de ces neurones est ensuite réalisée au travers d'une révélation avec de la diaminobenzidine (DAB) et par immunofluorescence.

La caractérisation de ce microcircuit est ensuite rendue possible via une approche par microscopie corrélative (CLEM) suivant un protocole d'arraytomographie [2] sur nos coupes de l'ACC traitées à l'osmium (rOTO, reduced osmium thiocarbohydrazide osmium). L'observation des coupes séries a été réalisée par microscopie électronique à balayage (SEM).

Au travers de la CLEM, nous avons pu effectuer une étude quantitative en 3D de la distribution des fibres à relaxine-3, dans un micro-environnement identifié, présentant des interneurones à somatostatine et à parvalbumine.

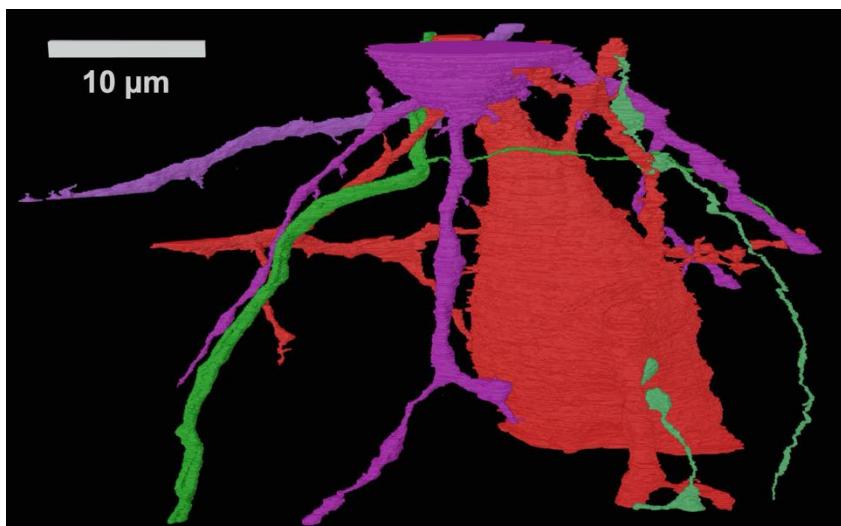


Figure 1 : Reconstruction 3D de neurones RLN3 (vert), SOM (rouge) et PV (violet) dans l'ACC. Echelle : 10µm



References

- [1] Ma, S., Smith, C. M., Blasiak, A., & Gundlach, A. L. (2017). Distribution, physiology and pharmacology of relaxin-3/RXFP3 systems in brain. *British Journal of Pharmacology*, 174(10), 1034-1048.
- [2] Micheva, K. D., & Smith, S. J. (2007). Array Tomography : A New Tool for Imaging the Molecular Architecture and Ultrastructure of Neural Circuits. *Neuron*, 55(1), 25-36.



Biographie

Actuellement étudiant en thèse dans l'équipe du Pr. Marc Landry au sein de l'institut des maladies neurodégénératives de Bordeaux, je suis spécialisé en neuroanatomie de la douleur. Mon travail est centré sur la compréhension des circuits corticaux impliqués dans le traitement des informations douloureuses. Plus particulièrement, mon intérêt se porte sur la caractérisation du système relaxine-3, au travers de différentes techniques d'imageries, dont la CLEM.

LA MICROSCOPIE CORRELATIVE AFM-FLUORESCENCE, UN OUTIL POUR L'ETUDE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES A L'ECHELLE NANOMETRIQUE

Anthony Vial *^a

^a Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac, France

* anthony.vial@u-bordeaux.fr

La microscopie à force atomique (AFM) est depuis de nombreuses années utilisée pour caractériser des échantillons biologiques. Son atout principal est de pouvoir mesurer la topographie ainsi que les propriétés mécaniques d'un échantillon à une résolution nanométrique dans des conditions physiologiques. Cependant, l'AFM ne permet pas directement d'identifier quel objet se trouve sous la pointe.

En combinant l'AFM à des techniques de microscopies optiques, il est possible de corrélérer une image de fluorescence avec les images AFM afin d'identifier les structures et propriétés d'éléments biologiques à l'échelle de tissus, cellules, assemblages moléculaires ou systèmes modèles.

Couplée à des techniques de super-résolution, l'AFM permet leur étude avec une résolution de l'ordre de la dizaine de nanomètres [1], tandis le couplage aux microscopies confocale ou TIRF permet d'accéder à la dynamique de phénomènes se déroulant sous la pointe [2]. La microscopie corrélative AFM et de fluorescence apparaît comme un outil biophysique puissant dans la compréhension des systèmes biologiques.

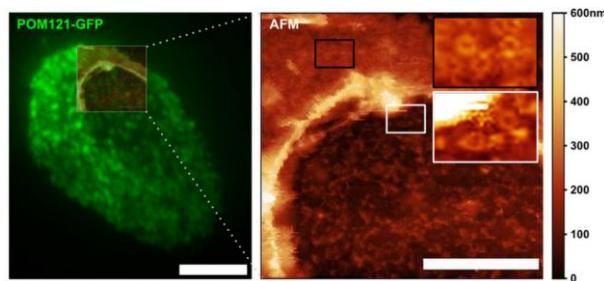


Figure 1 : Imagerie corrélative AFM-fluorescence de pores nucléaires [1].

References

- [1] A. Vial *et al.*, "Structure and mechanics of the human nuclear pore complex basket using correlative AFM-fluorescence superresolution microscopy," *Nanoscale*, vol. 15, no. 12, pp. 5756–5770, 2023, doi: 10.1039/D2NR06034E.
- [2] A. Vial *et al.*, "Correlative AFM and fluorescence imaging demonstrate nanoscale membrane remodeling and ring-like and tubular structure formation by septins," *Nanoscale*, vol. 13, no. 29, pp. 12484–12493, 2021, doi: 10.1039/d1nr01978c.

Biographie

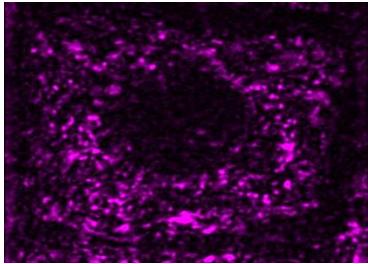


Anthony Vial est spécialiste en microscopie à force atomique (AFM) et de sa corrélation avec différentes techniques de microscopie de fluorescence. Il a commencé sa carrière en 2011 à l'European Synchrotron Research Facility (ESRF) à Grenoble avant de rejoindre le Centre de Biologie Structurale (CBS) à Montpellier comme ingénieur d'études en 2014 puis pour une thèse de doctorat durant laquelle il a étudié l'assemblage du complexe du pore nucléaire en corrélant l'AFM à la microscopie de super-résolution STORM. Depuis 2022 il travaille au CBMN comme ingénieur d'études dans l'équipe « Développements méthodologiques en AFM pour la biologie » du Pr Michael Molinari. Ses intérêts scientifiques comprennent le développement instrumental, l'étude des noyaux cellulaires et des pores nucléaires dans différents organismes ainsi que l'origine de la vie.



Concours posters et résumés

Les lots du concours poster sont offerts par la société **LFG Distribution, Hamamatsu** et par le **RMI**.



HAMAMATSU
PHOTON IS OUR BUSINESS



1^{er} prix : Un petit couteau suisse, une lime à ongle en éclat de diamant, un bon de réduction LFG, un thermos Hamamatsu, des Noisettines du Médoc et une bouteille de vin Couhins

2^{eme} prix : Un thermos Hamamatsu, des Noisettines du Médoc et des chaussettes « Microscopie »

3^{eme} prix : Un thermos Hamamatsu, des Noisettines du Médoc

La numérotation des posters correspond à celle du concours posters. Un QR code et un lien sont affichés près des posters pour accéder au sondage.

Numéros et titre des posters :

1. Lipid droplets : New actors of the plant virus infection
2. Impact Of Heat Stress On Tomato Meristem
3. Des outils de microscopie avancés permettent de découvrir des voies d'échange de nutriments inédites dans les symbioses d'insectes.
4. Présentation de la plateforme BISCEm de l'université de Limoges
5. Regulation of reproductive success by miR-202 in fish: a functional approach using 3D ovary imaging and serial bloc-face scanning electron microscopy
6. Imagerie moléculaire 2D/3D des lipides par spectrométrie de masse MALDI-TOF¹ et imagerie multimodale associant l'Imagerie par Résonnance Magnétique 3D
7. Multiphotonic Microscopy is a non-destructive label free approach for food and biomaterial microstructure analysis
8. Plateforme de cytogénétique moléculaire végétale
9. To Help You Make “Transparisation” an Effective Tool
10. Systematic 3D quantification to investigate cell and spindle architectures in root dividing cells
11. La plateforme cytologie et imagerie de l’Observatoire du Végétal
12. L’oligos-FISH, un nouvel outil pour la cytogénomique



1. LIPID DROPLETS : NEW ACTORS OF THE PLANT VIRUS INFECTION

Léna Jambou³, Nathalie Arvy¹, Charlotte Quinteau¹, Marguerite Batsale¹, Nathan Doner², Luc Sofer¹, Vincent Simon¹, Robert Mullen², Denis Coulon³, Claire Bréhélin³ and Sylvie German-Retana¹

¹Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, Equipe de Virologie, INRAE, University of Bordeaux, Villenave d'Ornon, France

²Department of Molecular and Cellular Biology, University of Guelph, Guelph, Canada

³Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR5200, CNRS, University of Bordeaux, Villenave d'Ornon, France

Corresponding authors (claire.brehelin@u-bordeaux.fr and sylvie.german-retana@inrae.fr)

Lipid droplets (LDs) are universal organelles found in most of organisms from archaea to eukaryotes. They are composed of a phospholipid monolayer embedding various proteins surrounding a neutral lipids core. They are essential for the cell lipid metabolism, in the energy storage in seed but also in vegetative tissues and in biotic and abiotic stresses. It has been shown that LDs are hijacked by some of animal positive-sense single-stranded RNA viruses for the replication. Like animal viruses, plant positive-strand RNA viruses have to reroute host proteins, intracellular membranes, and lipids to create an optimized lipid/membrane microenvironment for their efficient viral replication compartment (VRC) assembly. However, the possible involvement of LDs in plant virus infection process has not been explored. In this study, we monitored LD biogenesis upon infection by the turnip mosaic virus (TuMV, potyvirus) in *Aarabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. Using the confocal microscopy, we revealed that infection by TuMV induces LD biogenesis and a relocation of them close to VRCs. We also showed that, when ectopically expressed in *N.benthamiana* leaves the TuMV- 6K2 (the small transmembrane viral protein that induced ER-derived vesicles crucial for replication and movement) is sufficient to induce LD formation and to recruit LDs to those vesicles. Interestingly, we also showed that other potyviral species such as potato virus A and virus belonging to another genus, barley yellow dwarf virus (BYDV, luteovirus) can also induce an increase of LDs number during *N.benthamiana* infection.

2. IMPACT OF HEAT STRESS ON TOMATO MERISTEM

Norbert Bollier^{a*}, Eline Clerckx^a, Hélène Schaller^a and Nathalie Gonzalez^a

^aUniversité de Bordeaux, INRAE, UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie,
33140 Villenave d'Ornon, France

norbert.bollier@inrae.fr

The shoot apical meristem (SAM) is the source of all cells from which the aerial part of the plant is built and the maintenance of its function is necessary for plant reproduction and survival. Given its presence throughout the plant lifecycle, the SAM is subject to various environmental stresses, including heat stress (HS). However, despite its importance in plant vegetative and reproductive development, the current knowledge about the responses of the SAM to HS remains very limited.

Our project aims at understanding the consequences of HS on various stages of tomato meristem development across different scales including organ, cell, and molecular responses in different tomato genotypes. We showed that at the seedling stage, different tomato genotypes display distinct tolerance to a brief but intense HS, corresponding to several hours at 45°C. The HS differentially affects leaf initiation and growth depending on the genotype suggesting a genotype-dependent meristem HS tolerance. Using confocal microscopy on immunofluorescently labeled slices of fixed meristems, and live-imaging with an on-stage heating system, we detailed the succession of cellular events occurring during the HS. We first observed an arrest of the nuclei movement, concomitant with microtubule cytoskeleton dismantlement. Next, we observed plasma membrane permeabilization starting from the cells at the edge of the leaf primordia, using propidium iodide, a hallmark of cell death. These observations suggest that the different cell types in the meristem react differently to the HS. We recently obtained RNA-seq data from the SAM of four tomato genotypes during and after HS to evaluate transcriptional reprogramming and identify key molecular players of HS tolerance in tomato meristems.

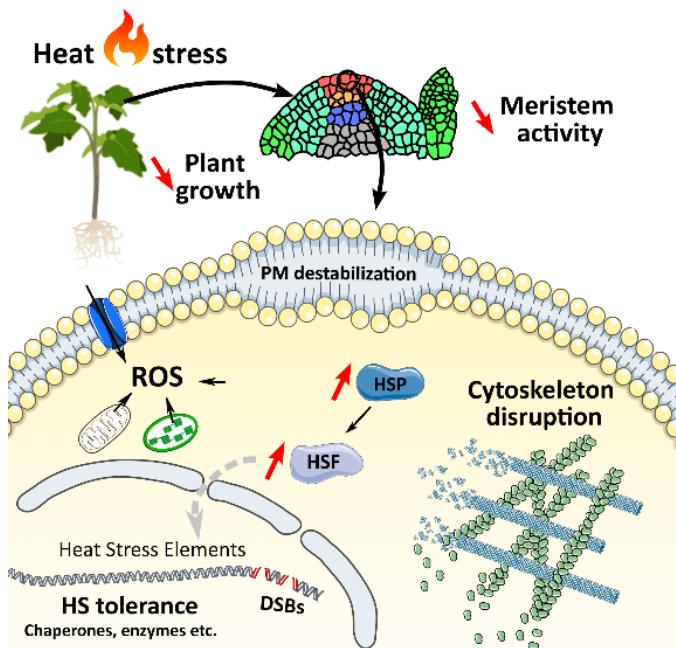


Figure 1: Schematic representation of the heat stress response and subcellular impact on plant cells.



3. DES OUTILS DE MICROSCOPIE AVANCES PERMETTENT DE DECOUVRIR DES VOIES D'ECHANGE DE NUTRIMENTS INEDITES DANS LES SYMBIOSES D'INSECTES.

(How advanced microscopy tools are uncovering unexpected ways of exchanging nutrients in insect symbiosis.)

Balmand S.¹, Rivard C.^{2,3}, Peignier S.¹, Santarella-Mellwig R.⁴, Ghanem-Debbache M.^{1,5}, Maire J.¹, Engl T.^{6,7}, Galvão Ferrarini M.¹, Dell'Aglio E.¹, Soriano-Saiz B.¹, Dalverny C.⁵, La Padula V.⁵, Turunen P.⁹, Vincent-Monégat C.¹, Vierne B.¹, Parisot N.¹, Condemine G.¹⁰, Da Silva P.¹, Jaurand X.⁵, Schwab Y.⁴, Kaltenpoth M.^{6,7}, Hedi A.¹ and Zaidman-Rémy A.^{1,10}

1- INRAE, INSA Lyon, BF2I, UMR203, Villeurbanne, France 2- SOLEIL Synchrotron, Gif-sur-Yvette, France ; 3- TRANSFORM, INRAE, 44316 Nantes, France ; 4- Electron Microscopy Core Facility, European Molecular Biology Laboratory, 69117 14 Heidelberg, Germany ; 5- CTμ, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France 6- Institute of Organismic and Molecular Evolution, Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Germany ; 7- Max Planck Institute for Chemical Ecology, Department of Insect Symbiosis, Hans-Knoell-18 Str. 8, 07745 Jena, Germany ; 8- CTμ, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France ; 9- Microscopy Core Facility, Institute of Molecular Biology, Mainz ; 10- MAP, UMR 5240, Univ Lyon, INSA Lyon, CNRS, Villeurbanne, France ; 10- Institut universitaire de France (IUF).

De nombreux insectes présentant un régime alimentaire pauvre en nutriments sont associés à des bactéries endosymbiotiques, permettant à l'hôte de bénéficier de nutriments essentiels tout en offrant un abri aux symbiotes. Parmi ces insectes, les charançons *Sitophilus* spp. (*Dryophthoridae*, *Curculionidae*) sont des ravageurs des céréales dont le succès évolutif dépend de l'association avec la bactérie *Sodalis pierantonius*, qui leur fournit des nutriments absents de leur régime alimentaire. Bien que les cellules dédiées à l'hébergement des symbiotes, appelées bactériocytes, ainsi que l'organe bactériome qu'elles forment, aient été décrits, les échanges métaboliques entre l'hôte et la bactérie restent mal compris, en raison notamment de l'impossibilité de cultiver ces bactéries *in vitro*.

L'utilisation d'une approche combinée de microscopie de fluorescence, microscopie électronique en transmission, tomographie électronique et microscopie STXM (scanning transmission X-Ray microscopy) nous a permis de contourner ces obstacles techniques. Les données obtenues nous ont permis de mettre en évidence un trafic vésiculaire intense de l'hôte ainsi que des réseaux membranaires complexes produits par la bactérie permettant un transport rapide et efficace des sucres issus du régime alimentaire des charançons des céréales vers leurs bactéries intracellulaires. De plus, ces techniques ont permis de confirmer que les sucres constituent les principaux nutriments fournis par l'hôte aux endosymbiontes.

De manière plus générale, cela illustre que de nouvelles approches basées sur l'imagerie peuvent permettre de progresser dans la compréhension de systèmes qui ont longtemps échappé aux analyses basées sur les méthodes traditionnelles de culture *in vitro*.

4. PRÉSENTATION DE LA PLATEFORME BISCEM DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Claire Carrion^a, Fabienne Baraige^{b *}

^a CRIBL CNRS 7276 INSERM 1262 Université de Limoges / BISCEm

^b EpiMaCT INSERM 1094 IRD 270 INRAE 1501 Université de Limoges / BISCEm

* fabienne.baraige@unilim.fr/contact.act@unilim.fr

Présentation du plateau de microscopie de fluorescence et d'analyse d'images de l'UAR 2015 CNRS – US42 INSERM BISCEm. La plateforme est adossée à l'Institut de Recherche OMEGA Health qui regroupe 9 laboratoires dans des domaines variés comme l'oncologie, l'immunologie, la résistance aux antibiotiques, le développement musculaire ou la chimie verte...

Equipements disponibles :

- Laser Scan Microscopy Zeiss LSM880, Spectral imaging , Living cells with XL chamber
- Macro confocal (spinning disk), Nikon AZ100 /CREST V2
- Widefield microscopy Nikon NiE (tile scanning)
- Time lapse system Sartorius IncuCyte S3
-

Logiciels disponibles :

- Fiji/ImageJ
- IMARIS
- QuPath
- Volocity
- Huygens
- BiofilmQ

Les appareils sont accessibles en autonomie pour les utilisateurs formés mais nous pouvons également les accompagner du conseil pour la préparation des échantillons jusqu'à l'analyse d'images en leur facilitant l'accès aux logiciels et plugins dédiés.

La plateforme comporte également une partie recherche et développement en interaction étroite avec les instituts de recherche Xlim (pôle photonique / plateforme Platinom) et IMPEO (UMR IRCER / plateforme Carmalim) autour du projet IRMA pour le développement d'un microspectrophotomètre multimodal (associant microscopie multiphotonique et Raman).



Figure 1 : CARS and multiphotonic spectro-microscopy system



5. REGULATION OF REPRODUCTIVE SUCCESS BY miR-202 IN FISH: A FUNCTIONAL APPROACH USING 3D OVARY IMAGING AND SERIAL BLOC-FACE SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Sarah JANATI-IDRISSI^{*a}, Remi LE BORGNE^b, Mariana ROZA DE ABREU^a, Manon THOMAS^a, Jean-Marc VERBARATZ^b, Violette THERMES^a, Julien BOBE^a

^a INRAE, LPGP UR1037, Fish Physiology and Genomics, F-35000 Rennes, France

^b Jacques Monod Institute, CNRS (RLB, J.-M.V.), Paris Cité University, Paris, France

* sarah.janati-idrissi@inrae.fr

Micro-RNAs are small non-coding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression by targeting messenger RNA to repress their translation. In medaka (*Oryzias latipes*), the knock-down (KO) of miR-202 induces a strong organism-level reproductive phenotype [1]. KO females exhibit reduced fecundity and fertility with a decrease in egg production and reduced fertilization success. Although the target of miR-202 responsible for fertilization success is not yet known, a target (*tead3b*) regulating fecundity was recently identified [2]. In this context, the aim of this study was to thoroughly characterize the effects of miR-202 KO and its target *tead3b*, using a suite of imaging techniques, to better understand why miR-202 KO females exhibit a reduced eggs production and fertilization.

To identify the origin of the reduced fecundity, the follicle content of 90 days mutant (*tead3b*) ovaries was analyzed using 3D *in toto* imaging [3]. In brief, ovaries were dissected, stained with methyl green, cleared, and imaged on both ventral and dorsal sides using a confocal microscope. Follicle counts were assessed using Amira software. To investigate the reduced fertilization success of miR-202 KO eggs, the functionality of the micropyle—a canal in the chorion through which sperm enters the egg—was assessed using serial block-face scanning electron microscopy imaging. Unfertilized miR-202 KO eggs were embedded in resin, and after locating the micropyle, 50 nm sections were cut and imaged by electron microscopy along its entire length to evaluate its structure. Immunostaining of the micropylar cell, responsible for micropyle formation, was conducted with acetylated tubulin as a cytoskeletal marker, which allowed a better understanding of the various observed micropyle phenotypes.

3D *in-toto* imaging of the whole ovary revealed that mutant fish exhibit smaller ovaries but an increased total follicle count. Density profiles and follicular distribution showed that mutant ovaries had a higher number of stage I and II follicles (20–90 µm) and lacked follicles at advanced stages of folliculogenesis (beyond stage V, >350 µm) compared to wild-type (WT) individuals. Finally, correlation analysis of follicular stages identified three major profiles: normal, moderate, and severe, with the normal profile comprising only WT individuals and the severe profile including only mutants. Serial block-face analyses of the micropyle revealed three phenotypes: normal, blocked, and interrupted. These phenotypes can be correlated with immunostaining results, which highlighted different shapes of micropylar cells, including normal and interrupted acetylated-tubulin structures.

In summary, our findings illustrate that miR-202 KO in medaka leads to reduced fecundity and fertility, primarily due to alterations in ovarian structure and function. The smaller ovaries and absence of advanced-stage follicles in *tead3b* mutants suggest disrupted folliculogenesis, while the impaired functionality of the micropyle, likely due to compromised maintenance of the micropylar cells, contributes to the decreased fertilization success. These results highlight the importance of integrating diverse microscopy approaches, to obtain a comprehensive and precise view of phenotypic alterations, enriching our understanding of the mechanisms underlying reproductive defects.

References

- [1] S. Gay, J. Bugeon, A. Bouchareb, L. Henry, C. Delahaye, F. Legeai, J. Montfort, A. Le Cam, A. Siegel, J. Bobe, V. Thermes, *PLoS Genet* 14 (2018) e1007593.
- [2] S. Janati-Idrissi, M.R. de Abreu, C. Guyomar, F. de Mello, T. Nguyen, N. Mechkouri, S. Gay, J. Montfort, A.A. Gonzalez, M. Abbasi, J. Bugeon, V. Thermes, H. Seitz, J. Bobe, *Nucleic Acids Res* 52 (2024) 738–754.
- [3] M. Lesage, M. Thomas, J. Bugeon, A. Branthonne, S. Gay, E. Cardona, M. Haghebaert, F. Mahé, J. Bobe, V. Thermes, *Biology of Reproduction* 103 (2020) 1099–1109.

6. IMAGERIE MOLECULAIRE 2D/3D DES LIPIDES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF¹ ET IMAGERIE MULTIMODALE ASSOCIANT L'IMAGERIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE 3D

A. Prézelin^{a,b}, E. Maugrion^{a,b}, A.P. Teixeira-Gomes^{a,b}, S. Uzbekova^a, H. Adriaensen^{a,b}, M. Migaud^a, E. Chaillou^a, L. Calandreau^a, V. Labas^{a,b}



a INRAE-CNRS-Université de Tours, PRC, 37380 Nouzilly

b INRAE-Université de Tours, CHU de Tours, Plateforme PIXANIM, 37380 Nouzilly

L'imagerie moléculaire par spectrométrie de masse (IMS) est une technologie qui permet d'analyser, sans aucun *a priori*, la distribution spatiale de biomolécules tels que des métabolites, lipides, peptides, protéines, ou molécules exogènes (médicaments, pesticides...), à partir de coupes de tissus cryosectionnés. Ainsi, l'IMS de coupes séries en 2D sert, après reconstruction 3D, à la création d'atlas moléculaires. Avec une très bonne résolution spatiale (pixel mini. 10x10µm), le phénotypage tissulaire par IMS donne accès à l'histologie moléculaire de tissus ou d'organes très différenciés, de petite et grande taille (50 X 75 mm).

Ici, à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF Rapiflex Tissuetyper (Bruker), nous avons procédé à l'analyse lipidomique (100-1200 m/z) de coupes entières d'ovaires de brebis, d'encéphale de caille ou de brebis, pour répondre à des questionnements en lien avec la reproduction. Les sections ovariennes ont notamment permis de générer des cartes de densité ionique montrant une distribution spatiale spécifique de nombreuses espèces lipidiques entre les différents compartiments de l'ovaire, particulièrement entre les follicules et le stroma, ainsi qu'entre des follicules à différents stades de la folliculogenèse. Après segmentation 2D et reconstruction 3D (72 coupes séries alignées), la caractérisation du liquide folliculaire et des différentes cellules du follicule s'est révélée être possible jusqu'à l'échelle de la cellule unique (ovocyte).

De plus, dans une volonté de développer l'imagerie multimodale corrélative *in/ex vivo*, nous avons combiné l'IMS et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), à l'aide d'un scanner IRM 3T Magnetom Verio (Siemens), permettant d'accéder, par une approche *in vivo* ou *ex vivo*, aux phénotypes des tissus mous constituant un organe. Ici, l'alignement des images d'IMS 2D et d'IRM 3D de l'ovaire ou de l'encéphale de brebis, ont à la fois donné accès à des informations, anatomiques, structurales et fonctionnelles avec la topologie fine des biomolécules au sein de l'organe. Ces dernières ont ensuite été identifiées par LESA-MS/MS² (Liquid Extraction Surface Analysis- Tandem Mass Spectrometry).

Aujourd'hui, de nouvelles voies d'investigation sont maintenant possibles pour le phénotypage animal, grâce à la combinaison de l'IMS et de l'imagerie biologique *in/ex vivo* (IRM, histologie classique, immunohistochimie, transpiration³...). La combinaison de ces approches multimodales et multi-échelles autour d'une cible d'intérêt permet ainsi de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliqués, selon différentes conditions physiologiques, pathologiques, infectieuses ou après exposition à divers xénobiotiques.

¹ Maugrion et al., « Extracellular Vesicles Contribute to the Difference in Lipid Composition between Ovarian Follicles of Different Size Revealed by Mass Spectrometry Imaging ». Metabolites 13, no 9 (9 septembre 2023) : 1001.

² Ellis et al., « Surface Analysis of Lipids by Mass Spectrometry ». Progress in Lipid Research 52, no 4 (octobre 2013) : 329-53

³ Blutke et al., « Light Sheet Fluorescence Microscopy Guided MALDI-Imaging Mass Spectrometry of Cleared Tissue Samples ». Scientific Reports 10, no 1 (2 septembre 2020) : 14461

7. MULTIPHOTONIC MICROSCOPY IS A NON DESTRUCTIVE LABEL FREE APPROACH FOR FOOD AND BIOMATERIAL MICROSTRUCTURE ANALYSIS

Nanci Castanha¹, Tiphaine Lucas¹, Nathalie Geneix², Bénédicte Bakan², Sylvie Chevalier³, Emilie Korbel³, Laurence Dubreil³

¹INRAE, UR OPAALE, 35044, Rennes, France

²INRAE, UR1268, BIA, Biopolymers, Interactions and Assemblies, Nantes, France

³Oniris, Univ Nantes, CNRS, GEPEA, UMR 6144, Nantes, France

⁴Oniris, INRAE, UMR703, APEX, Nantes, France

laurence.dubreil@inrae.fr

Multiphoton microscopy (MP) has emerged as a powerful tool for analyzing food product and biomaterial microstructure. One significant advantage of MP is its ability to provide three-dimensional images without the need for extensive sample preparation or labeling. This is crucial to characterize food samples, where preserving the integrity is essential for accurate analysis. MP can image both endogenous fluorescence from proteins, carbohydrates or lipids, second harmonic generation (SHG) signals produced by starch granules [1] or crystalline cellulose [2] and third harmonic (THG) signals generated from interfaces [3]. This non destructive label free imaging allows to study structures in their native state, further enhancing the understanding of the food matrix changes during different steps of food processing contributing to advancements in food science and technology.

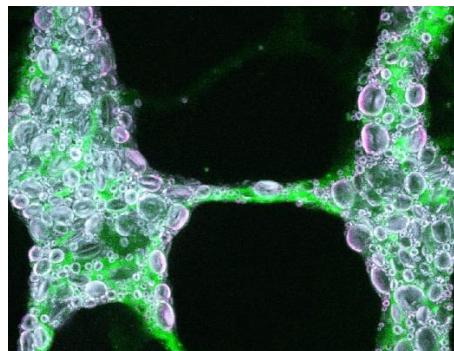


Figure 1 : 3D representation of Gas Cell Walls imaged from bread dough at the end of proving with combined endogenous fluorescence (green) and SHG from starch granules (magenta.+ cyan)

References

- [1] Castanha, N., Challois, S., Grenier, D. et al. (2023), *Sci Rep* **13**, 13971
- [2] Gaël Latour, Jean-Philippe Echard, Marie Didier, and Marie-Claire Schanne-Klein, "In situ 3D characterization of historical coatings and wood using multimodal nonlinear optical microscopy," *Opt. Express* **20**, 24623-24635 (2012)
- [3] Chouët A, Chevallier S, Fleurisson R, Loisel C, Dubreil L. (2019). *Sensors (Basel)*. Apr 30;19(9)



8. PLATEFORME DE CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE VEGETALE

Olivier CORITON & Virginie HUTEAU

INRAE UMR 1349 IGEPP Domaine de la Motte 35653 LE RHEU

* olivier.coriton@inrae.fr

L'objectif de cette plateforme est de participer au développement chez les plantes supérieures des programmes d'études de génomes faisant appel à l'hybridation *in situ* Fluorescente (FISH) pour accroître :

- la caractérisation cytogénétique du matériel végétal impliquant les hybrides interspécifiques afin de valoriser les gènes d'intérêt présents au sein des espèces apparentées, notamment les gènes de résistance,
- la compréhension de la structure des génomes chez des espèces polyploïdes

Cette plate-forme a également une mission de formation et d'information des chercheurs et techniciens pour un transfert de technologie.

References

- [1] Franz Boideau, **Virginie Huteau**, Anael Brunet, Loeiz Maillet, **Olivier Coriton**, Gwenn Trotoux, Maryse Lodé-Taburel, Gwenaelle Deniot, Frédérique Eber, Marie Gilet, Julien Boutte, Jérôme Morice, Cyril Falentin, Olivier Martin, Matthieu Falque, Anne-Marie Chèvre, Mathieu Rousseau-Gueutin. Playing with the ploidy level enables to switch on and off the strict recombination control even in the vicinity of *Brassica* centromeres - Plant Cell 2024
- [2] Mario Klesczewski, **Virginie Huteau** & **Olivier Coriton** À la recherche de la laîche d'Ascherson (*Carex xaschersonii* H.Lév. = *C. flacca* L. × *C. hispida* Willd. ex Schkuhr) Carnet Botanique 2024
- [3] Franz Boideau, Gautier Richard, **Olivier Coriton**, **Virginie Huteau**, Caroline Belser, Gwenaelle Deniot, Frédérique Eber, Cyril Falentin, Julie Ferreira de Carvalho, Marie Gilet, Maryse Lodé-Taburel, Loeiz Maillet, Jérôme Morice, Gwenn Trotoux, Jean-Marc Aury, Anne-Marie Chèvre, Mathieu Rousseau-Gueutin. Epigenomic and structural events preclude recombination in *Brassica napus* New Phytol. 2022 Apr;234(2):545-559.
- [4] D. Barloy, L. Portillo-Lemus, S. A. Krueger-Hadfield, **V. Huteau**, **O. Coriton**. Genomic relationships among diploid and polyploid species of the genus *Ludwigia* L. section *Jussiaea* using a combination of cytogenetic, morphological, and crossing investigations. 2022 PCI Evolutionary Biology
- [5] Boideau F, Pelé A, Tanguy C, Trotoux G, Eber F, Maillet L, Gilet M, Lodé-Taburel M, **Huteau V**, Morice J, **Coriton O**, Falentin C, Delourme R, Rousseau-Gueutin M, Chèvre AM. A Modified Meiotic Recombination in *Brassica napus* Largely Improves Its Breeding Efficiency. Biology (Basel). 2021
- [6] Giraud D, Lima O, **Huteau V**, **Coriton O**, Boutte J, Kovarik A, Leitch A, Leitch L, Ainouche M, Salmon A Evolutionary dynamics of transposable elements and satellite DNAs in polyploid *Spartina* species. Plant Sci. 2021 Jan;302
- [7] Boutte J, Maillet L, Chaussepied T, Letort S, Aury JM, Belser C, Boideau F, Brunet A, **Coriton O**, Deniot G, Falentin C, Huteau V, Lodé-Taburel M, Morice J, Trotoux G, Chèvre AM, Rousseau-Gueutin M, Ferreira de Carvalho Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in *Brassica rapa*. J. Front Plant Sci. 2020
- [8] Malika Ourari, **Olivier Coriton**, Guillaume Martin, **Virginie Huteau**, Jean Keller, Malika-Lily Ainouche, Rachid Amrouche, Abdelkader Ainouche. Screening diversity and distribution of *Copia* retrotransposons reveals a lineage-specific amplification of *BARE1* lines in genomes of the polyploid *Hordeum murinum* complex. 2020 Genetica Apr;148(2):109-123



9. TO HELP YOU MAKE “TRANSPARISATION” AN EFFECTIVE TOOL

Katia Belcram, Chloé Chaumeton, Romina D’Angelo, Laurence Dubreil, David Godefroy, François Michel, Matthieu Simion, Jérémie Teillon

Our working group’s aim is to help the community discover the extraordinary potential of "transparisation" techniques and to make clearing less "opaque".

We carry out different actions and pay particular attention on subjects & samples transversality (from methodology up to data management; from tissues-organs up to *in toto* organisms including plants).

Our main actions are :

- to establish tutorials ("Beginner's Kit") and " Experts Interactive Map" shared online
- to promote, with the participation of recognized specialists in the field, thematic days
- to organize training sessions on the Clearing approaches, microscopes and mounting strategies depending on the type of the samples and 3D images processing
- to inform and discuss about new developments in this field



10. SYSTEMATIC 3D QUANTIFICATION TO INVESTIGATE CELL AND SPINDLE ARCHITECTURES IN ROOT DIVIDING CELLS

Katia BELCRAM, Martine PASTUGLIA, Jasmine BURGUET

Institute Jean-Pierre Bourgin for Plant Sciences, INRAE Versailles, FRANCE – OV-cytology, SPACE team, MIN team

Because biological structures are spatially organised in 3D, 3D techniques are required to fully understand their spatial architectures. Confocal microscopy is a tool of choice for accessing 3D biological organisations. However, spatial characterisation of structures revealed in 3D images can be a complex task. The use of simpler 2D representations to quantify spatial organisation is thus a common strategy, but can lead to quantification errors. Here we propose a pipeline that allows the extraction and easy quantification of the spatial organisation of cellular and intracellular 3D structures. To illustrate our strategy, we used confocal images of the *Arabidopsis* root meristem, a zone of active division located at the tip of the root and composed of several cell types that differ in size and shape. Three channels per image were acquired, corresponding to the specific labelling of either microtubules, DNA, or cell wall. We focused on cells in metaphase, a specific cell cycle stage during cell division, manually identified by the presence of a specific microtubule structure, the mitotic spindle. The mitotic spindle forms on either side of the metaphase plate a medial plane where chromosomes regroup in metaphase. Each cell volume was automatically delimited based on the cell wall channel, then the spindle and metaphase plate were segmented within the cell volume based on microtubule and DNA channels. Ellipsoids were fitted to the envelopes of the cell, spindle, and metaphase plate volumes. The minor axis of the plate was used to define the spindle axis, which was then used as an internal orientation to align cells. Conjoint spatial quantification was then performed. Our approach allowed us to highlight, depending on the cell type, important characteristics of dividing cells along the root axis. In particular, we revealed the existence of a region at the poles of the spindle where this structure never extends in the cell.



11. LA PLATEFORME CYTOLOGIE ET IMAGERIE DE L'OBSERVATOIRE DU VÉGÉTAL

Alice Vayssières*^a, Katia Belcram^a, Néro Borrega^a, Aurélie Dewaele^a, Bertrand Dubreucq^a, Aurélie Hurel^a et Samantha Vernhlettes^a

^a Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), 78000 Versailles, France

*alice.vayssières@inrae.fr, responsable opérationnelle de la plateforme

La plateforme de cytologie et imagerie est une structure de l’Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) localisée à Versailles, et intégrée dans un ensemble plus vaste permettant de cultiver, phénotyper et analyser les plantes : l’Observatoire du Végétal. La plateforme de cytologie et imagerie regroupe un ensemble unique d’expertises et d’instruments dédiés à la cytologie et à la microscopie des tissus, des cellules végétales et des compartiments subcellulaires. La plateforme a été pionnière dans le développement de nouvelles techniques d’étude du végétal spécialement dans l’imagerie du matériel vivant. Elle a notamment hébergé le développement d’outils d’acquisition de signaux fluorescents dans des organes en croissance (racine et hypocotyle). Un des grands challenges en imagerie est de quantifier les processus observés de manière reproductible. En collaboration avec une équipe de l’institut dont l’objectif est de développer de nouvelles méthodes pour visualiser, quantifier et modéliser les données de microscopie, des outils pour la segmentation de signaux ont été implémentés pour des travaux sur la division cellulaire et la dynamique des chromosomes. Récemment, la plateforme a obtenu deux microscopes à super-résolution (dSTORM et STED). Ces microscopes vont permettre un gain en résolution pour la compréhension de mécanismes à l’échelle nanométrique pour l’observation, par les équipes de l’institut, de nanostructures, par exemple de la paroi, des chromosomes lors de la méiose et des filaments d’actine et des microtubules.



12. L'OLIGOS-FISH, UN NOUVEL OUTIL POUR LA CYTOGENOMIQUE

Virginie Huteau^{*a}, Franz Boideau.^b, Olivier Coriton^a

^a INRAe-UMR 1349 IGEPP-Plateforme de Cytogénétique moléculaire Végétale 35653 Le Rheu

^b Laboratory of Genome Biology -Adam Mickiewicz University in Poznań-Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań, Poland

* virginie.huteau@inrae.fr

La cytogénétique moléculaire, dont l'outil principal est l'Hybridation In Situ en Fluorescence ou FISH, permet par sa résolution une analyse fine de la structure des chromosomes en mitose et en méiose, du dénombrement chromosomique à la mise en évidence de remaniements chromosomiques. Cette technique a été développée en 1992 et se sont les sondes utilisées qui ont fait évoluer la méthode. Le FISH est une technique indispensable pour étudier les chromosomes chez les plantes. Cependant, le développement des sondes traditionnelles (ADN, BAC, séquences répétées) présente certaines limites, la difficulté. Les progrès récents dans le domaine du séquençage des génomes ont conduit au développement de nouveaux outils permettant la synthèse de sonde oligonucléotidiques. L'hybridation in situ par fluorescence de ses sondes ont donné naissance à l'oligoFISH. Cette technique permet d'acquérir une plus grande spécificité pour l'étude de l'évolution chromosomique, la recombinaison méiotique, la caractérisation et l'identification des remaniement chromosomiques (translocation, inversion, introgression, ...).

References

Boideau & al Plant Cell. 2024 Oct 3;36(10):4472-4490. doi: 10.1093/plcell/koae208.

J. Jiang Chromosome Res (2019) 27:153–165. <https://doi.org/10.1007/s10577-019-09607-z>



Concours photo

Les lots du concours photos sont offerts par la société, **Delta Microscopies**, **Hamamatsu**, **Abberior** et par le **RμI**.



1^{er} prix : Un appareil photo Polaroid, un bon cadeau Abberior, une bouteille de vin Couhins et un thermos Hamamatsu

2^{eme} prix : Une enceinte Bluetooth portable - étanche à l'eau, un thermos Hamamatsu et une bouteille de vin Couhins

3^{eme} prix : Une batterie Externe INIU, un thermos Hamamatsu, des chaussettes « microscopie » et une bouteille de vin Couhins

Un QR code et un lien sont affichés près des photos pour accéder au sondage. Les photos sont numérotées comme suit.

1	Tige de fougère en autofluorescence
2	Pointillisme
3	twins
4	Tomato Meristem Microtubules and Cell Wall
5	La vie en rose
6	Chloroplastes saupoudrés
7	Interface de greffe chez Arabidopsis thaliana.
8	Anthère d'Arabidopsis thaliana
9	Quand les photons rencontrent les grains d'amidon dans la pâte à pain
10	Nerfs
11	Noyau méiotique au stade pachytène
12	Colocalization of lipid droplets with viral replication complex of turnip mosaic virus in N. benthamiana infected leaf.
13	Gate to Life: Micropyle Structure in Medaka Eggs
14	Ice Scream
15	Mer de galets
16	Poisson lune... ou mollusque ?
17	Banana puzzle
18	Embryo



Ateliers

Les ateliers se dérouleront sur les trois pôles d'imagerie du [Bordeaux Imaging Center](#) : pôle d'imagerie photonique, pôle d'imagerie électronique, pôle d'imagerie végétale.

Le pôle d'imagerie végétale est situé sur le centre INRAE de Villenave d'Ornon, là où se tiendront les Journées Rul 2024. En revanche les pôles d'imagerie photonique et électronique sont situés sur le Campus Carreire de l'Université de Bordeaux. Un bus emmènera les participants concernés depuis le centre INRAE jusqu'au bâtiment du Bordeaux Imaging Center sur le Campus Carreire.

Pour des raisons d'organisation, il ne sera pas possible de faire un parcours regroupant des ateliers organisés sur des pôles différents.

Ateliers localisés sur le Campus Carreire au Bordeaux Imaging Center : départ en bus à 13h20

Description des parcours et ateliers

Pôle Imagerie Electronique

Parcours de 2 ateliers au choix par personne dans l'après-midi.

14h- 15h15	Atelier 1 Préparation TEM	Atelier 2 TEM Haute Résolution	Atelier 3 3D MEB par Serial Block face Imaging	Atelier 4 CRYO-MEB
pause 20 minutes				
15h35- 16h50	Atelier 1 Préparation TEM	Atelier 2 TEM Haute Résolution	Atelier 3 3D MEB par Serial Block face Imaging	Atelier 4 CRYO-MEB

Atelier 1 : Préparation TEM

ATELIER CUISINE OU COMMENT PREPARER DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Dans le domaine de la microscopie électronique en particulier, la préparation idéale des échantillons est une condition préalable et une étape cruciale. En effet, la préparation des échantillons permet de les rendre compatibles avec le système d'observation et ainsi obtenir le meilleur résultat possible.

Pour cela, différentes étapes sont nécessaires telles que des fixations, déshydratation, enrobage dans des résines plastiques et enfin découpe de l'échantillon en lame fine.



Au travers de cet atelier, nous aborderons les différents types de fixation (chimique, haute pression), les différents types de préparation (conventionnelle à chaud, à froid), les différentes résines utilisées (époxy, acrylique) et nous vous présenterons les équipements utilisés pour ces préparations disponibles sur notre plateforme.



Animateur : Etienne Gontier / Sabrina Lacomme

Atelier 2 : HR-TEM

EXPLORATION VERS L'ECHELLE ATOMIQUE GRACE A LA HR-TEM

La microscopie électronique en transmission (TEM) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre quelques nanomètres.

Au travers de cet atelier, nous vous présenterons ce qu'est la microscopie électronique en transmission à haute résolution (HR-TEM) en comparaison à la TEM classique et ce qu'elle offre comme possibilités d'analyse : entre autres l'analyse en champ sombre (STEM-HAADF), l'analyse élémentaire (EDS), l'analyse cristalline (diffraction).

Grâce à différents types d'échantillon dans des domaines variés (biologie, biomatériaux), nous vous démontrerons la puissance de la haute résolution sur notre plateforme et nous irons explorer l'infiniment petit.

Animateur : Etienne Gontier / Sabrina Lacomme

Atelier 3 : 3D MEB par Serial Block face Imaging

COMMENT A PARTIR D'IMAGES 2D EN NIVEAUX DE GRIS OBTENIR UN RENDU 3D EN COULEUR; METTEZ DES PAILLETTES DANS VOS RECHERCHES.

Comment acquérir de grand volume en microscopie électronique avec une haute résolution de manière automatisée, sur une grande variété d'échantillons ? Découverte du volume EM plus particulièrement de la technique serial block face scanning electron microscopy (SBF-SEM). Nous commencerons en discutant de la préparation d'échantillons par micro-ondes. Après avoir vu l'équipement et les différents paramètres d'acquisition, nous poursuivrons l'atelier autour des différents logiciels disponibles pour le traitement et l'analyse des images. Comment avoir un rendu rapide de vos stacks d'images ?



Animateur : Fanny Decoeur



Atelier 4 : CRYO-MEB

VOYAGE EN MEB AU CŒUR DES GLACES AMORPHES.

Le but de cet atelier est de présenter le workflow nécessaire à une observation au cryo MEB pour une exploration topographique d'échantillons, au plus proche de leur état natif.

L'atelier se décomposera dans un premier temps par la présentation de la méthode de congélation par slush-freezing via le système quorum suivi de l'étape de sublimation par remontée en température. Une métallisation au platine sera effectuée avant l'observation en mode cryo sur le MEB FEG GeminiSem300 (Zeiss).



Animateur : Isabelle SVAHN



Pôle Imagerie Photonique

Parcours de 4 ateliers au choix par personne dans l'après-midi.

14h-14h40	Atelier 1 Transparisation	Atelier 2 Microscopie par feuille de lumière	Atelier 3 Microscopie 2-photon
14h40-15h20	Atelier 4 Lifetime STED	Atelier 5 SMLM	Atelier 6 Visite de la plateforme
pause 20 minutes			
15h40-16h20	Atelier 1 Transparisation	Atelier 2 Microscopie par feuille de lumière	Atelier 3 Microscopie 2-photon
16h20-17h	Atelier 4 Lifetime STED	Atelier 5 SMLM	Atelier 6 Visite de la plateforme

Atelier Transparisation – Jérémie Teillon

Les échantillons biologiques sont traditionnellement sectionnés en coupes fines pour être observés au microscope. Or, ces coupes ne représentent qu'une infime portion de l'échantillon étudié (cerveau de souris par exemple) et ne reflète pas sa morphologie 3D. Pour explorer cet organe entier, il est possible de le rendre transparent et de le visualiser avec un microscope à feuille de lumière.

Lors de cet atelier nous discuterons des techniques de transparisation d'échantillons associées à des immuno-marquages et nous utiliserons un microscope à feuille de lumière pour faire l'acquisition d'images 2D en vue de faire leur reconstruction en 3D.

Atelier Microscopie par feuille de lumière - Mathieu Ducros

La microscopie par feuille de lumière (Light-Sheet Fluorescence Microscopie – LSFM) est présente dans un très grand nombre de plateformes d'imagerie. Il existe une grande variété d'instruments qui répondent à des besoins d'imagerie différents en terme de taille d'échantillon, de montage, de clarification ou de résolution. Le but de cet atelier est de présenter les principes généraux de la LSFM et d'illustrer les propriétés de 2 microscopes de niveau de complexité très différents : un Lemolish (construit en LEGO) et un microscope Lattice Light Sheet.

Atelier 2P : Observation de l'activité calcique des neurones d'un explant de tronc cérébral - Sébastien Marais

Le calcium est impliqué dans de très nombreux processus cellulaires, notamment dans les communications cellulaires dont la transmission synaptique. Pour étudier ce type de communication, il est possible d'utiliser des sondes fluorescentes sensibles au calcium.

Couplées à la microscopie 2-photon qui est adaptée à l'observation d'échantillons biologiques épais, il s'agit d'un outil puissant pour l'étude des circuits neuronaux dans des conditions les plus physiologiques possibles.

L'objectif de l'atelier sera donc d'observer la signalisation calcique d'un circuit neuronal dans un explant de tronc cérébral de souris maintenu vivant en microscopie 2-photon.

Atelier Lifetime STED - Christel Poujol



La microscopie à déplétion par émission stimulée (STED) est une technique de microscopie photonique à super-résolution qui permet d'obtenir une amélioration de la résolution par rapport à la microscopie confocale. Ces dernières années, la technologie STED a continué d'évoluer, notamment dans le but de réduire l'intensité des lasers de déplétion en utilisant la durée de vie de fluorescence pour sélectionner les photons d'intérêt.

Dans cet atelier, nous utiliserons un microscope STED combiné avec un système de mesure de durée de vie de fluorescence, microscopie Tau-STED. On appliquera cette technique à des racines de plantes d'arabidopsis pour observer les différents compartiments de l'appareil de Golgi.

Atelier SMLM – Magali Mondin

Au cours de cet atelier, les participants pourront se familiariser avec les grands concepts des techniques basées sur la détection de molécules individuelles. Les participants assisteront à la mise en place d'une expérience typique de SMLM (du DNA-PAINT ici). Lors de cet atelier, seront discutés les avantages, inconvénients, et conditions de mise en œuvre (préparation des échantillons, milieux de montage, contraintes optiques etc...).

Atelier « Visite de la plateforme » - Noémie Pied

Au cours de cet atelier, une visite de la plateforme vous est proposée. Cet atelier a pour but de présenter la variété des équipements disponibles sur la plateforme et leurs différentes applications. Une brève description des microscopes sera effectuée ainsi qu'une illustration de la diversité des projets menés sur quelques équipements. Ceci permettra de mettre en évidence la pluridisciplinarité et la complémentarité des systèmes d'imagerie disponible.



Pôle Imagerie Végétale

Parcours de 4 ateliers au choix par personne dans l'après-midi.

14h-14h55	Atelier 1 Argolight contrôle qualité	Atelier 2 Leica démo Stellaris 5	Atelier 3 cryofixation haute pression	Atelier 4 discussion sponsors
Pause 5 minutes				
15h-15h55	Atelier 1 Argolight contrôle qualité	Atelier 2 Leica démo Stellaris 5	Atelier 3 cryofixation haute pression	Atelier 4 discussion sponsors
Pause 5 minutes				
16h-16h55	Atelier 1 Argolight contrôle qualité	Atelier 2 Leica démo Stellaris 5	Atelier 3 cryofixation haute pression	Atelier 4 discussion sponsors

Atelier N°1 Argolight

REALISATION D'UN CONTROLE QUALITE EFFICACE SUR MICROSCOPE A FLUORESCENCE AVEC LES SOLUTIONS
ARGOLIGHT

L'une des tâches principales des plateformes est de fournir aux utilisateurs finaux, généralement des chercheurs en sciences de la vie, un parc de microscopes qui maintiennent des niveaux de performance compatibles avec leurs expériences. C'est un défi parce que les microscopes introduisent intrinsèquement des biais dans les images et parce que leurs performances ont tendance à fluctuer ou à se détériorer avec le temps en raison d'une mauvaise utilisation, de l'âge, des conditions environnementales, etc. Cela est particulièrement vrai pour les systèmes d'imagerie haut de gamme tels que les microscopes confocaux ou à super-résolution.



À l'ère du "big data", de l'intelligence artificielle, de l'apprentissage automatique et des modèles prédictifs, il est essentiel d'effectuer un contrôle et une assurance qualité à chaque étape d'une expérience de bio-imagerie : de la préparation de l'échantillon au système d'imagerie, en passant par l'analyse d'images, pour extraire des informations biologiques fiables. Le fait d'alimenter les algorithmes d'analyse d'images avec des données d'image corrompues donne naissance à l'adage bien connu : « garbage in, garbage out ».



Figure 1: An Argolight QC slide



Figure 2: One of the long-lasting fluorescents patterns

Pour obtenir des données quantitatives et reproductibles, l'évaluation des performances des microscopes à fluorescence est un prérequis avant toute campagne d'imagerie. Cela permet d'identifier, de mesurer et éventuellement de corriger les différents biais qu'ils peuvent introduire. Par exemple, l'évaluation de la précision de co-enregistrement du système est importante avant toute étude de co-localisation ; l'uniformité du champ du système et la réponse de l'intensité avant toute étude où l'intensité compte ; la « résolution spatiale » avant toute étude visant à compter des objets proches les uns des autres, etc.

Objectifs :

L'objectif de l'atelier est de montrer comment le contrôle et l'assurance qualité des systèmes d'imagerie par fluorescence peuvent être effectués et normalisés avec les solutions Argolight, et comment les données de qualité générées peuvent être gérées et centralisées pour un rapport ultérieur.

Vous apprendrez à faire un contrôle qualité essentiel sur un microscope à fluorescence en peu de temps.

Public cible :

- Ingénieurs de plateforme, chercheurs et autres utilisateurs de microscopes à fluorescence.

Contenu :

- Introduction aux solutions Argolight (lame de microscope, logiciel d'analyse et de management des données)
- Démonstration et manipulation sous microscope
- Présentation des résultats d'analyse des performances du microscope en direct
- Recherche des motifs fluorescents et acquisition des images par les participants
- Remise d'une présentation récapitulative PDF a posteriori

Animateurs :

- Renaud Ginet – Responsable commercial EMEA



Atelier N°2 Leica

UTILISATION DES MODALITES DE TEMPS DE VIE DE FLUORESCENCE EN MICROSCOPIE CONFOCALE ET/OU DES APPLICATIONS MULTIPLEX.

Venez à la découverte d'un nouveau système LEICA appelé STELLARIS 5 Laser Blanc ! Ce système de démonstration possède un laser blanc pulsé 485-790 nm + diode 405nm, nouveaux détecteurs HyD, scanner résonant, amélioration de résolution LIGHTNING, Navigator, modules de temps de vie de fluorescence rapide et intégrés, FRAP, microscopie autonome (IA), nouvelles fonctionnalités multiplex.



Animateurs :

-Andy Tempez - Product Specialist Confocal Microscopy LEICA

Atelier N°3 Pôle d'imagerie du végétal

CRYOFIXATION HAUTE PRESSION AVEC L'EM-ICE

Au cours de cet atelier seront abordés les principes cryofixation haute pression (EM -ICE), les cryoprotectants, les protocoles de freeze substitution (AFS2), les solvants, fixateurs et résines utilisées selon les objectifs visés (cryo-microscopie confocale, structure, immuno-marquage, microscopie corrélative entre photonique et électronique en transmission). Au cours de cet atelier nous réaliserons des "tirs" sur des échantillons végétaux.



Animateurs :

Personnels de la plateforme d'imagerie du vegetal du BIC - Lysiane BROCARD, Alizé CHAMBARD, Clément CHAMBAUD, Sandra PEDEMAY.

Atelier N°4 Temps privilégié avec les sponsors

Cet atelier est dédié entièrement à la discussion auprès de nos différents sponsors qui soutiennent nos 13èmes Journées. Les sponsors présents :

- Abbelight
- Abberior
- Argolight
- Hamamatsu
- LFG Distribution
- Leica
- Nikon
- Zeiss
- Jeol
- Tescan

Animations

Dégustation de vins et de spécialités locales (mercredi 20/11, 18h30)



Un moment convivial vous sera proposé autour d'une dégustation de vins de la région, avec des cuvées du Château Couhins, propriété et vitrine de l'INRAE, ainsi que des vins de Saint-Émilion. Cette dégustation sera accompagnée de spécialités de notre terroir afin de vous faire découvrir notre jolie région. Pour que chacun puisse participer à ce moment de convivialité, des boissons sans alcool seront également proposées. Horaire indicatif : 18h30 - 20h



Dîner de Gala (jeudi 21/11 de 20h à 22h30)



Le dîner de gala aura lieu sur la Garonne, conjuguant cocktail dînatoire et croisière à bord du Sicambre (Compagnie des [Bateaux Bordelais](#)). Le bateau-restaurant nous emmènera le long des quais illuminés de Bordeaux afin de nous faire découvrir la ville et le fleuve de nuit.

Embarquement à 19h45 au [ponton "Les Bateaux Bordelais"](#), face au 24 quai des Chartrons à Bordeaux (à côté de l'Ibaïa Café) ! Soyez à l'heure au rendez-vous, le bateau quitte l'embarcadère à 20h !

Les participants se rendront sur le lieu d'embarquement par leurs propres moyens, en sachant qu'il est accessible en tram ou bus ([plan des lignes](#) sur le site de TBM) : depuis le campus INRAE à Villenave d'Ornon prendre le tram C et s'arrêter à la station "Paul Doumer" ; depuis le Centre d'Imagerie de Bordeaux (où auront lieu l'autre partie des ateliers) prendre le tram A puis le B jusqu'à l'arrêt "CAPC Musée d'art contemporain".

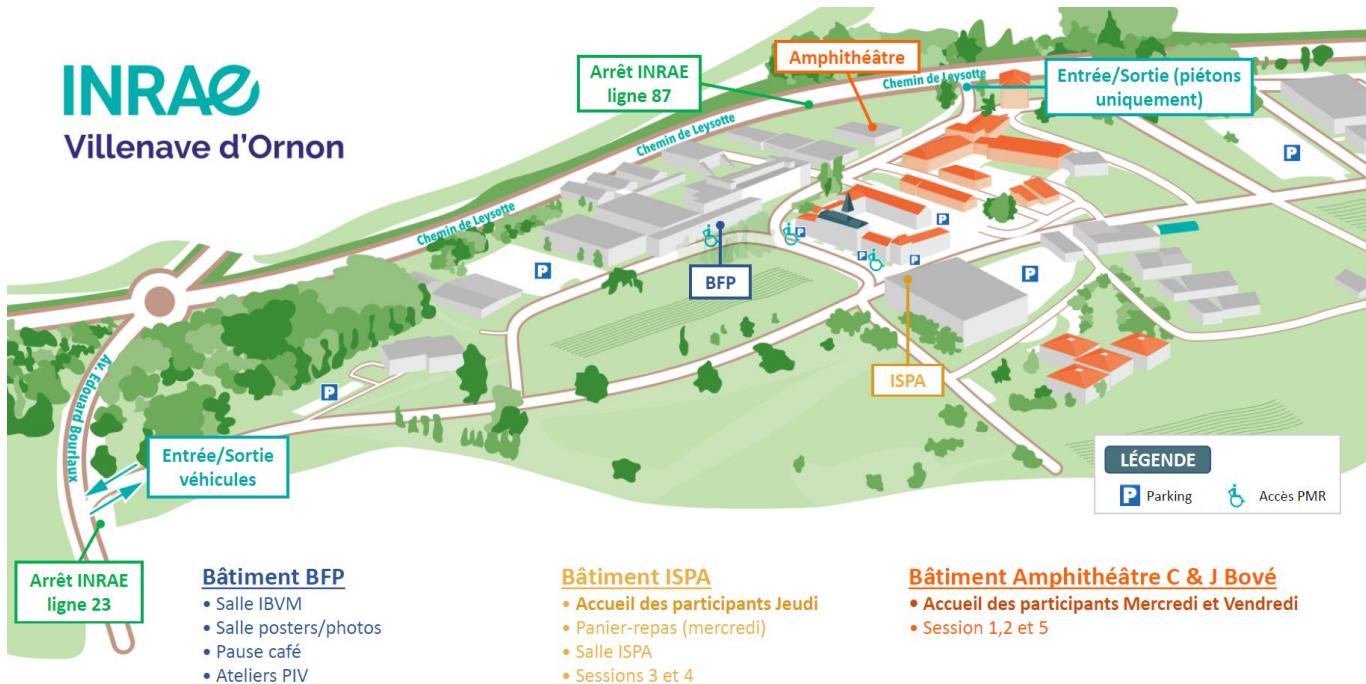
Retour à quai prévu à 22h30.

Infos pratiques

Les journées se tiendront sur le site de la Grande Ferrade du centre INRAE Nouvelle-Aquitaine Bordeaux (commune de Villenave d'Ornon). Les présentations scientifiques auront lieu à l'amphithéâtre Colette & Josy Bové (bâtiment B2) ainsi qu'en salle ISPA.

Adresse :

Centre INRAE
71 Avenue Edouard Bourlaux
33140 Villenave d'Ornon



Transports en commun : retrouvez toutes les infos sur le site de [TBM \(Transport Bordeaux Metropole\)](#)

En tram : Ligne C arrêt Vaclav Havel (15 mn de marche jusqu'au centre INRAE-Bordeaux)

En bus : Ligne 23, arrêt INRAE ; Ligne 87, arrêt INRAE (à proximité des entrées du centre INRAE-Bordeaux)

Voici un plan de situation avec les lignes B et C du tram, ainsi que les lignes de bus 87 et 23 (retrouvez un plan plus complet sur le site de [TBM](#)).

