

Microscope confocal à fluorescence laser

TCS SP8 Leica®

Les travaux présentés sont réalisés par des équipes de recherche grenobloises sur le microscope confocal à fluorescence laser hébergé au Laboratoire Interdisciplinaire de Physique.



Etude en champ large du réseau de porosité mésoscopique cellulaire osseux¹

De fines coupes du tissu osseux (~100 µm) sont imprégnées de Rhodamine B et visualisées sous excitation à 633 nm. Grâce à la platine motorisée du microscope, des zones contiguës sont imagées successivement permettant la reconstruction d'images large champ.



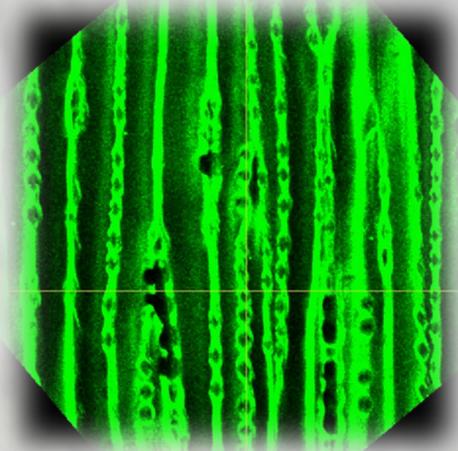
© A Gourrier, R Genthial, D Débarre Taille de l'image : 200 µm

Ces travaux valident la preuve de concept d'utilisation de la microscopie confocale pour la caractérisation des tissus osseux. L'intégration de cette technique dans le projet ANR Multips (Evaluation multi-physique et multi-échelle de la qualité osseuse) est en discussion (coordinateur : Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, UPMC).

Cette technique donne accès à la micro-structure d'échantillons pouvant aller jusqu'au cm², une surface qui devient compatible avec des études histologiques pertinentes.

Imagerie de la structure hydraulique des canaux de sève dans les arbres²

De fines lamelles (50 µm d'épaisseur) prélevées au microtome dans le bois sont exposées à différentes conditions d'hygrométrie proches de celles subies par l'arbre lui-même en période de sécheresse, et observées en fluorescence autour de 600 nm (révélation de la rhodamine 6G en vert).



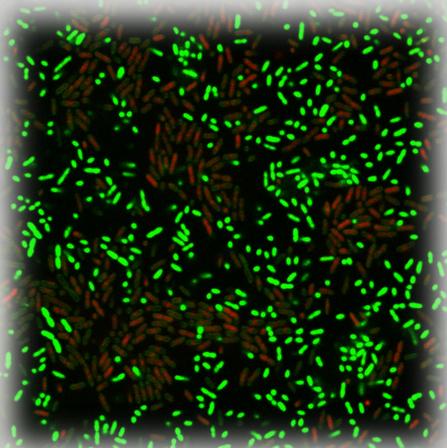
© Philippe Marmottant Taille de l'image : 400 µm

Ce modèle microscopique, grâce auquel la formation et le transfert de bulles de gaz peuvent être observés dans un réseau de vaisseaux du bois intacts, constitue un puissant outil pour l'étude du phénomène de cavitation de la sève (projet mené en collaboration avec l'INRA de Clermont-Ferrand).

Le phénomène d'apparition des bulles ainsi que leurs mouvements dans le réseau sont étudiés grâce à l'acquisition systématique d'images selon un pas de temps de 5 secondes environ.

Effets de l'hydrodynamique sur la structure des biofilms en procédés de biofiltration³

Pour obtenir l'image ci-contre, un biofilm bactérien (*Pseudomonas putida*) a été marqué avec deux fluorochromes permettant de différencier les cellules mortes (marqueur rouge – propidium iodide), des cellules vivantes (marqueur vert – syto9).



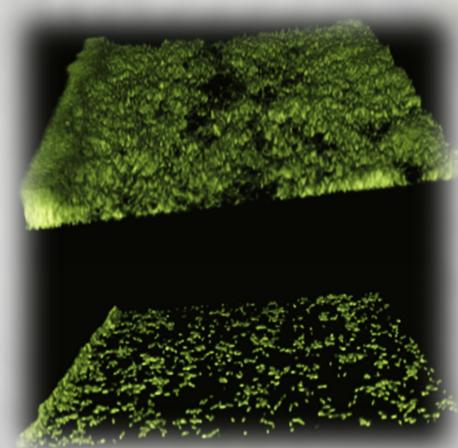
© Ana Medeiros Taille de l'image : 80 µm

Ce travail s'intègre dans un projet plus large visant à relier les caractéristiques de croissance des biofilms aux conditions hydrodynamiques subies et aux capacités épuratoires des bio-réacteurs de dépollution (projet associant 4 laboratoires grenoblois).

Le marquage par un troisième fluorophore (concanavalline A) permet la localisation fine des exopolysaccharides produits par les bactéries et structurant le biofilm (non présenté ici).

Dans cette étude, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* porteuse d'un gène GFP (Green Fluorescent Protein) est cultivée pendant 12 heures dans un canal microfluidique. La GFP est visualisée à 488 nm et la reconstruction de l'image 3D obtenue par superposition de 30 plans focaux horizontaux (temps d'acquisition total ~ 2 minutes).

Reconstruction 3D de la croissance d'un biofilm sous écoulement⁴



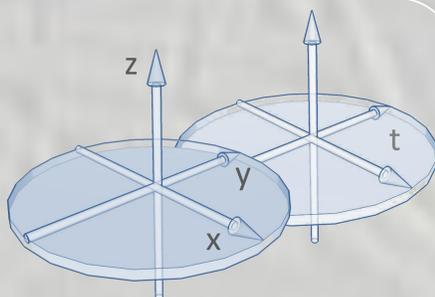
© Sigolène Lecuyer Taille de l'image : 250 µm

Le mode « time lapse » a été utilisé de manière à suivre la croissance du biofilm en 3D sur 12 heures (une image 3D toutes les 30 minutes). En parallèle, la distribution et l'évolution des zones de croissance du biofilm est étudiée par marquage des individus chez lesquels la production des molécules constituant la matrice du biofilm est en cours.

Ces travaux visent à mieux comprendre quels facteurs extérieurs déclenchent et contrôlent la prolifération des biofilms bactériens, notamment dans les cathéters et tubulures à usage médical (collaboration avec le CEA Grenoble, groupe Pathogénèse Bactérienne).

Quelques spécifications techniques

- Le microscope confocal est équipé d'une platine motorisée automatique permettant un échantillonnage systématique en x, y, z et t (imagerie plane, 3D et suivi temporel – time lapse)
- Un mode scan permet la reconstitution d'images à large champ
- 3 longueurs d'ondes différentes peuvent être imagées simultanément
- Une chambre climatique a été récemment installée pour la réalisation d'expérimentations en conditions contrôlées.



Contact : sigolene.lecuyer@ujf-grenoble.fr

¹ A Gourrier, R Genthial, D Débarre (LIPhy)

² P Marmottant (LIPhy)

³ P Séchet, Z Huang, A Medeiros (LEGI), F Pignon (LRP), S Rolland du Roscoat (3SR), S Lecuyer (LIPhy)

⁴ S Lecuyer (LIPhy)



tec21
the engineering
of complexity

Equipement co-financé par le
Laboratoire d'Excellence Tec 21
www.tec21.fr