

Le Centre de Microscopie regroupe au sein du nouveau bâtiment CMSE un panel de différents équipements sophistiqués dans le domaine de la microscopie, indispensables aux développements des recherches actuelles en biologie : microscope optique classique, à fluorescence, électronique à transmission, à balayage, confocal, à dissection laser...



L'imagerie du vivant commence tout d'abord par l'invention de la photographie. Au début du XIX^e siècle Joseph Nicéphore Niepce, Bourguignon né à Chalon-sur-Saône, réalise la première photographie. Puis au cours de ce siècle, d'autres savants perfectionnent ses recherches, et améliorent la qualité des images, la sensibilité à la lumière des surfaces réactives et simplifient la procédure de prise de vue. L'apparition du premier appareil photo noir et blanc en Allemagne en 1925, puis de la première pellicule couleur en 1949, continuera à moderniser le domaine de l'imagerie. La région Bourgogne est de nos jours, une région historiquement liée à la photographie avec l'installation de la société Kodak, puis du musée « Joseph Nicéphore Niepce » à Chalon-sur-Saône. Elle est également une région très active dans l'exploitation de ces techniques pour l'observation du vivant. En effet, au niveau du Grand Campus le Centre de Microscopie regroupe au sein du nouveau bâtiment CMSE un panel de différents équipements sophistiqués dans le domaine de la microscopie, indispensables aux développements des recherches actuelles en biologie: microscope optique classique, à fluorescence, électronique à transmission, à balayage, confocal, à dissection laser. Ces équipements dits « équipements lourds » du fait de leur coût sont issus de progrès technologiques réalisés grâce à la volonté de scientifiques du début du XX^{ème} siècle (1930-40) qui, limités par la physique de la lumière pour observer les détails inférieurs aux micromètre, eurent l'idée de remplacer le faisceau de lumière par un faisceau d'électrons. La longueur d'onde associée à l'électron est en effet très inférieure à celle du photon et la résolution finale est beaucoup plus élevée : de l'ordre du nanomètre contrairement à celle du photon qui reste de l'ordre de 200 fois moins (0,2 μ m). Grâce à cette étape, dans les années 1950 la biologie cellulaire a fait un réel pas de géant suite à l'invention des microscopes à faisceau d'électrons. La physique de la lumière dans un microscope photonique ne permet pas d'observer des objets grossis au delà de 500 à 1000 fois. L'élaboration des faisceaux d'électrons accélérés, l'utilisation de lentilles magnétiques, et la mise au point de préparation de coupes fines d'échantillons (90 nm) fait qu'il devient tout à fait possible de repousser cette limite de grossissement et observer les détails fins des structures intérieures des cellules (noyau, mitochondries..).

Le domaine de la microscopie instrumentale dite « électronique à transmission », puis « à balayage » a permis l'exploration du vivant au niveau cellulaire. Les biologistes observent l'anatomie cellulaire en transmission et les détails de surfaces d'échantillons en microscopie à balayage. Afin de résister au bombardement du faisceau d'électrons, les tissus vivants sont fixés par des fixateurs chimiques (formaldéhyde, tétroxyde d'osmium) et enrobés dans un support à base de résines araldites ou époxy, puis coupés finement pour la microscopie électronique à transmission, ou métallisés en surface pour la microscopie électronique à balayage. Les observations cytologiques ultra-structurales, par exemple des interactions plantes-micro-organismes (champignons, bactéries), en microscopie électronique sont archivées à l'aide de photos issues de développement de plans films impressionnés par le faisceau d'électrons.

La microscopie électronique à transmission a acquis un nouvel essor avec l'apparition des outils immunologiques qui permettent la localisation des complexes antigènes grâce aux anticorps secondaires

marqués à l'or. Actuellement, les techniques de microscopie électronique évoluent vers l'utilisation de nouveaux produits (fixateurs, résines) ou de nouveaux procédés et instruments limitant les artefacts structuraux ou l'altération de composés cellulaires, et supprimant toutes fixations chimiques, comme la technique de cryo-fixation qui par une brusque congélation fige l'état cellulaire.

En parallèle aux améliorations des techniques de microscopie électronique, la microscopie optique s'est affinée pour mieux étudier les tissus vivants. Les molécules à observer interagissent avec la lumière de plusieurs façons : soit en absorbant certaines longueurs d'ondes de la lumière (microscopie en lumière directe), soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux (microscopie en contraste de phase), soit en émettant de la lumière à une longueur d'onde qui fait fluorescer certains composés cellulaires (microscopie à fluorescence). Dans les années 1980, apparaît une nouvelle génération de microscope qui va révolutionner la microscopie optique : le microscope confocal à balayage laser « confocal laser scanning microscope » qui a la propriété de construire des images dans une profondeur de champ plus importante (environ 600nm) appelées « section optiques », à différents niveaux de profondeur dans un échantillon. Il est ainsi possible de réaliser une série d'images à partir desquelles on peut construire une représentation tridimensionnelle de l'objet. En partenariat, les nouveaux outils de marquages fluorescents (protéines, anticorps, amorces PCR couplés) ouvrent de nouvelles perspectives techniques.

Mais les événements les plus significatifs dans l'histoire actuelle de l'imagerie du vivant sont sans doute la découverte de la numérisation photonique (la première caméra numérique électronique compacte date de 1984) et, à partir de 1995, l'apparition du microscope dit « à dissection laser », qui permet la découpe et le recueil des cellules à partir d'un échantillon directement sous le microscope. Cette technologie a ouvert la voie aux analyses fines de génomique et protéomique indispensables à la compréhension, par exemple, des bases cellulaires des interactions plantes micro-organismes.

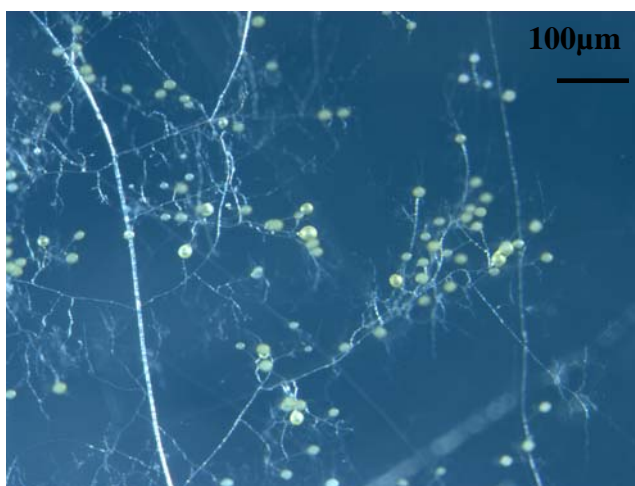
Toutes les nouvelles générations de microscopes optique, électronique, confocal et dissection laser possèdent des caméras numériques qui acquièrent les images et les transmettent à un moniteur d'ordinateur. Les progrès en informatique ont également permis le travail de ces images par des logiciels spécifiques d'analyse qui à l'aide de traitements mathématiques complexes traduisent des informations contenues dans l'image.

Depuis des millions d'années, des populations de champignons et de bactéries s'associent aux plantes pour former des relations bénéfiques (symbioses) ou provoquent des maladies souvent dévastatrices pour les cultures. Au niveau souterrain, la biodiversité du sol recèle des millions de micro-organismes peu connus qui cohabitent et prolifèrent sous nos pieds dans l'indifférence totale de la plupart d'entre nous. Grâce aux convergences de progrès scientifiques, il devient plus aisé d'étudier par observations aussi bien optique, confocale, électronique à transmission et à balayage, ces populations de microorganismes du sol et leurs relations avec les plantes. A l'aide de ces instruments sophistiqués et des nouvelles techniques de localisation, ce monde peut revêtir différents aspects qui peuvent aussi bien ravir notre intérêt scientifique qu'éveiller notre sensibilité artistique.

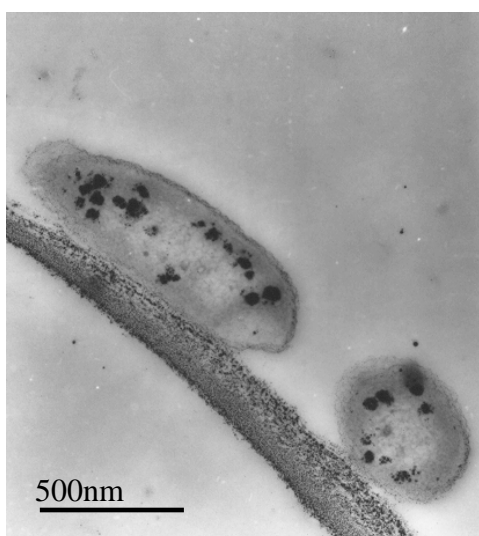
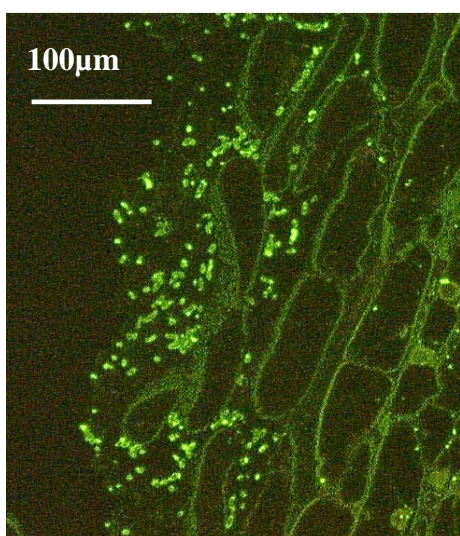
Voici ci-après, pour illustration, quelques aperçus d'analyses scientifiques réalisés à l'aide des équipements de microscopie du centre de microscopie: larves d'insectes vecteurs de maladie (microscopie photonique classique), réseau mycélien d'un champignon autour d'une racine (microscopie photonique classique), noyaux fongiques colorés au DAPI (microscopie à fluorescence), bactéries bénéfiques *Pseudomonas spp.* à la surface d'une racine (microscopie optique à fluorescence), attachement de bactéries bénéfiques *Pseudomonas spp.* à la surface d'une racine (microscopie électronique à transmission), détection de gènes dans des noyaux fongiques (microscopie confocale), microdissection laser de cellules de racine pour analyse (microscope à dissection laser), champignon pathogène (agent du mildiou) pénétrant une feuille de vigne via un stomate (microscopie à balayage).



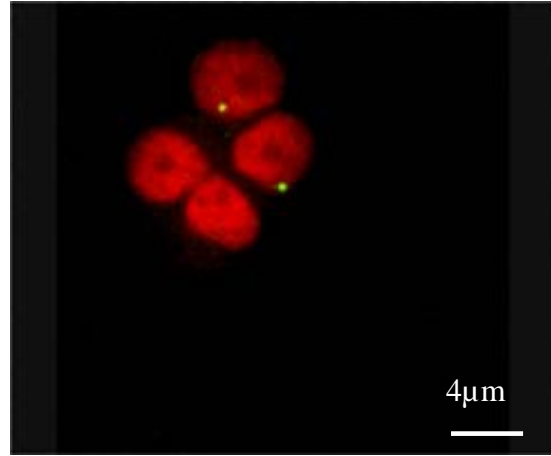
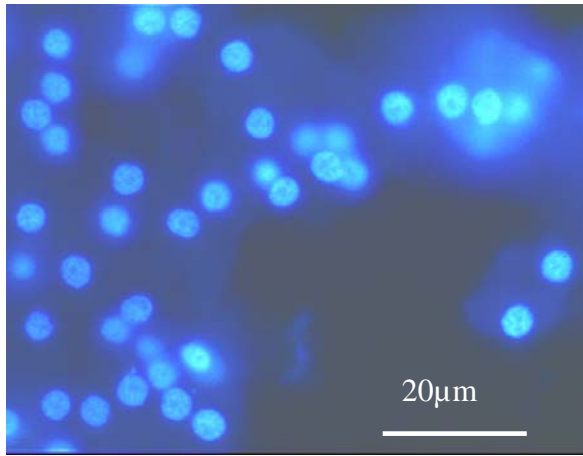
Larves de *Pentastiridius* (vecteur de la maladie du syndrome des basses richesses de la betterave)
Microscopie optique classique



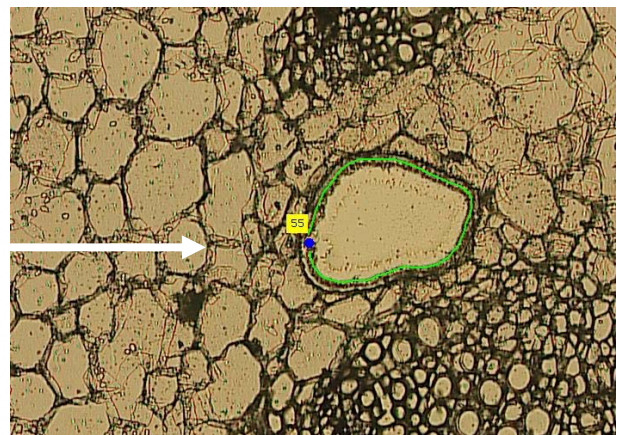
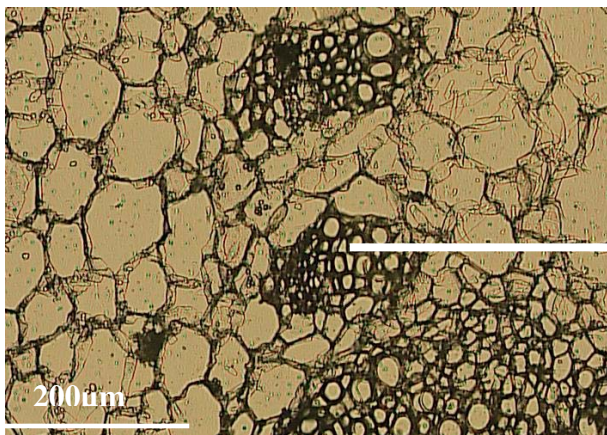
Réseau mycélien d'un champignon mycorhizogène autour d'une racine lui permettant d'exploiter les ressources du sol (microscopie optique classique)



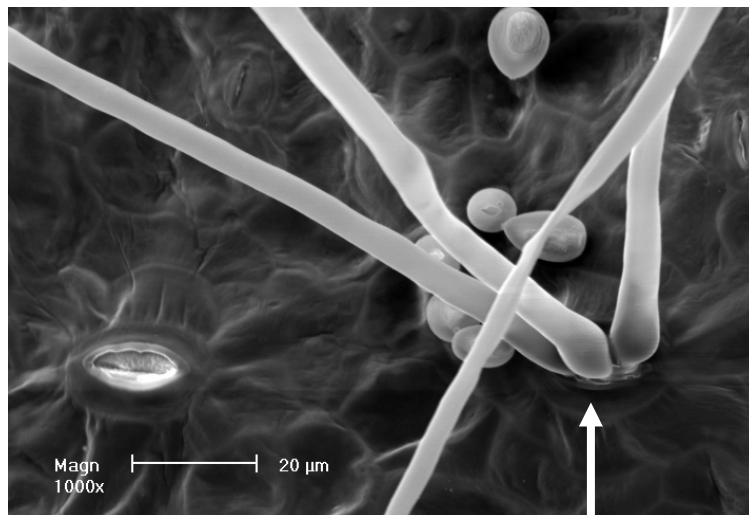
Immunolocalisation des bactéries bénéfiques (*Pseudomonas spp*) à la surface d'une racine (microscopie optique à fluorescence). Attachement des bactéries à la surface d'une cellule racinaire (microscopie électronique à transmission)



Noyaux fongiques colorés bleu au DAPI (microscopie à fluorescence)
 Détection de gènes (vert) dans des noyaux fongiques (rouge) (microscopie confocale)



Microdissection à l'aide du laser d'une zone de cellules dans une coupe transversale de racine
 pour analyse moléculaire (microscope à dissection laser)



Champignon pathogène (mildiou) pénétrant une feuille de vigne via un stomate
 (microscopie électronique à balayage)