



*Forum des microscopies à sonde locale
Juvignac, 20 Avril 2017*

GT Repositionnement-Relocalisation

Frédéric Foucher (RéMiSoL), Isabelle Paintrand (RCCM, RTMFM), Astrid Canivet-Laffite (RTMFM), Isabelle Gillot (RTMFM), Lorena Klein (RéMiSoL), Adeline Mallet (RCCM), Anna Sartori-Rupp (RCCM) et Jean-François Bergamini (RéMiSoL)

frederic.foucher@cnrs.fr

gt_repositionnement@services.cnrs.fr



GT ?

Groupe de Travail inter-réseaux des Réseaux Métiers et Technologiques de la Mission pour l'Interdisciplinarité du CNRS.

Objectif: rassembler des personnes issues de différents domaines autour d'une problématique scientifique/technique.





Le GT-repositionnement- relocalisation

Une problématique transdisciplinaire

Problématique de microscopiste

- Analyses à petite échelle sur des échantillons hétérogènes



Il faut pouvoir retrouver un endroit déjà étudié :

- Sur le même instrument
- Sur d'autres instruments



Repositionnement et relocalisation

**3 réseaux impliqués: RéMiSoL,
MFM (Microscopie de Fluorescence Multidimensionnelle),
RCCM (Réseau des Centres Communs de Microscopie)**

Le GT, c'est:

Jean-François Bergamini (RéMiSoL, laboratoire Matière Condensée et Systèmes Electroactifs, MaCSE, CNRS, Rennes), AFM, STM, électrochimie

Astrid Canivet (MFM, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, CPTP, INSERM-CNRS), 2PEM (Two-photon excitation microscopy), imagerie cellulaire,

Frédéric Foucher (RéMiSoL, Centre de Biophysique Moléculaire, CBM, CNRS, Orléans), AFM/Raman, exobiologie

Isabelle Gillot (MFM, Univ. Côte d'Azur, INSERM, CNRS, iBV, France), biologie cellulaire, microscopie électronique, microscopie optique

Lorena Klein (RéMiSoL, Institut de Recherche de Chimie Paris, IRCP, CNRS, Paris), AFM, STM, physicochimie des surfaces

Adeline Mallet (RCCM, Institut Pasteur, Paris), Lumière Corrélative et Microscopie Electronique (CLEM), MEB, FIB, biologie cellulaire

Isabelle Paintrand (RCCM, MFM, Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique, LMGP, Univ. Grenoble Alpes-CNRS), microscopie optique, confocale, AFM, MEB, interface matériaux-matière biologique

Anna Sartori-Rupp (RCCM, Institut Pasteur, Paris), CLEM, MEB, FIB, biologie cellulaire



Repositionnement vs. relocalisation

Mécanique vs. imagerie

Repositionnement

- Mécanique

Platines manuelles, motorisées et/ou piézoélectriques



AFM/Raman WITec Alpha500 RA, CBM, Orléans



Microscope optique Olympus BX-51, CBM, Orléans

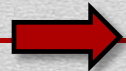
Repositionnement

- **Utilisation**

- Retour sur un endroit précis à partir des coordonnées
- Analyses couplées sur un même instrument
- Repositionnement continu pour compenser une dérive

- **Limitations**

- Nécessite de ne pas ôter l'échantillon du système ou d'être capable de le remettre de manière identique
- Délicat à l'échelle micrométrique
- Quasi-impossible à utiliser sur des systèmes différents



Relocalisation

Relocalisation

- **Imagerie**

Détection de structures distinctives permettant de se repérer, qu'elles soient originelles (fissures, trous...) ou volontaires (gravures, marques...)

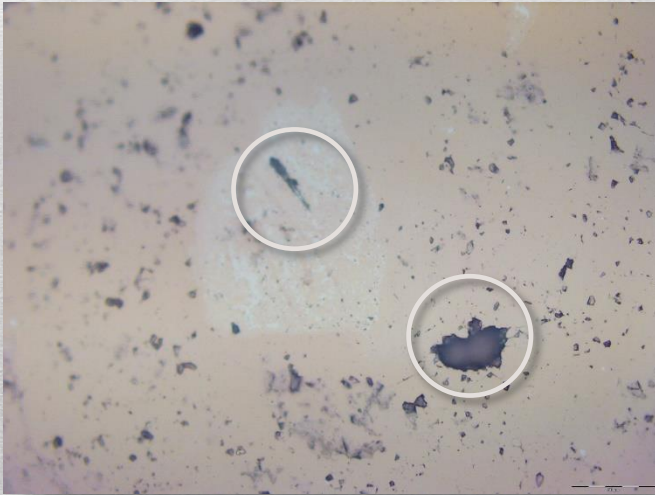


Image de microscopie optique

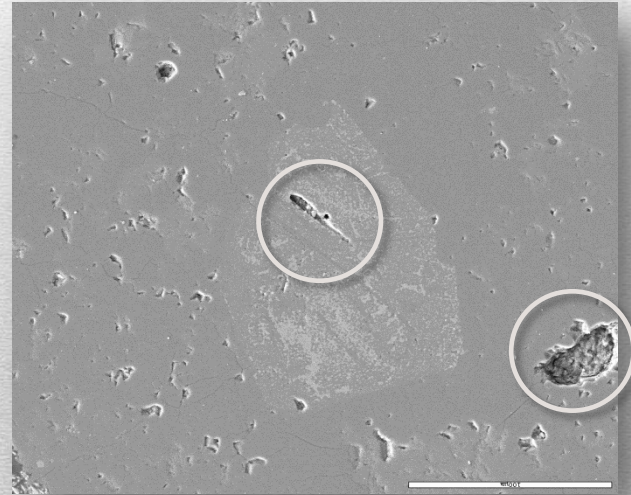


Image MEB

Relocalisation

- **Utilisation**

- Retour sur un endroit précis (aucune limite)
- Multi-analyses sur plusieurs instruments

- **Limitations**

- Techniques différentes = contrastes différents
- Techniques différentes = échelles souvent différentes



Méthode souvent délicate



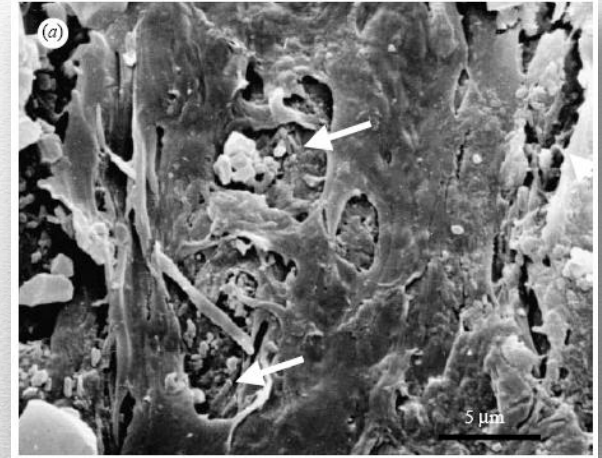
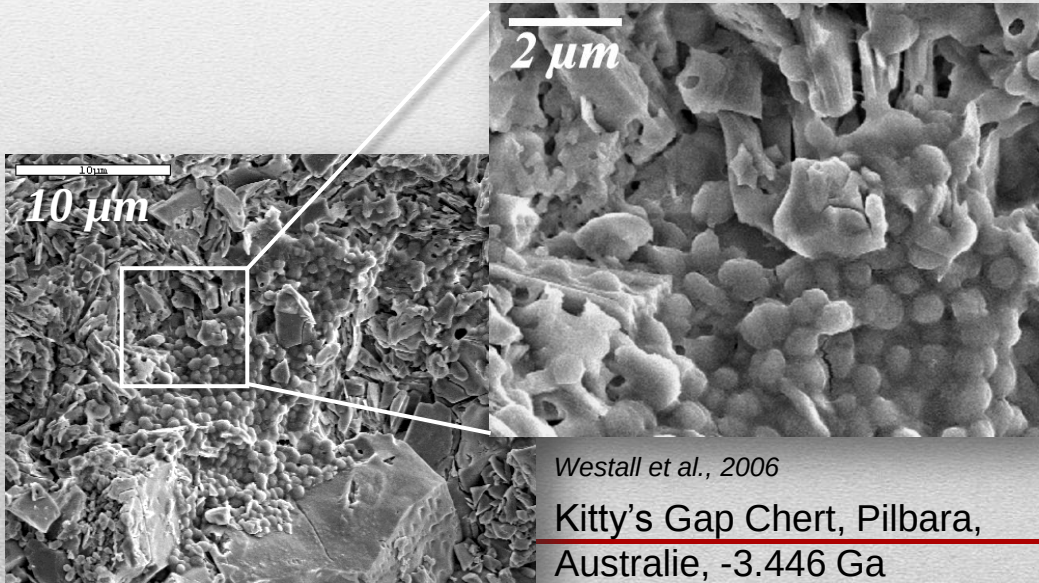
Relocalisation

Exemple d'une analyse multi-échelle et multi-instrumentale

Analyse de microfossiles

Les plus anciennes traces de vie

Fossiles submicrométriques



Westall et al., 2006

Josefsdal, Barberton,
Afrique du Sud, -3.333 Ga

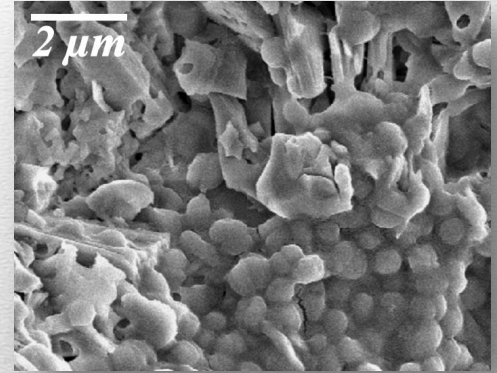
Comment détecter des microfossiles de plusieurs milliards d'années?

Preuve directe

- Observation de colonies microbiennes fossilisées. Pas suffisant.

Preuves indirectes

- ~~- Biomolécules~~ → matière carbonée. Pas suffisant.
- ~~- Biogaz (e.g. méthane)~~
- Biominéraux → quelques biominéraux. Pas suffisant.
- Biostructures (e.g. stromatolithes fossilisés). Pas suffisant.



→ Nécessite un faisceau de preuves!



Appareils photo



Microscopes



Spectromètres



Microscopes électroniques



Synchrotron

DU GLOBAL

Quels instruments?

AU LOCAL

Méthodologie

Vue globale (zoom « out » max)



Zoom à l'échelle d'intérêt

Zoom out



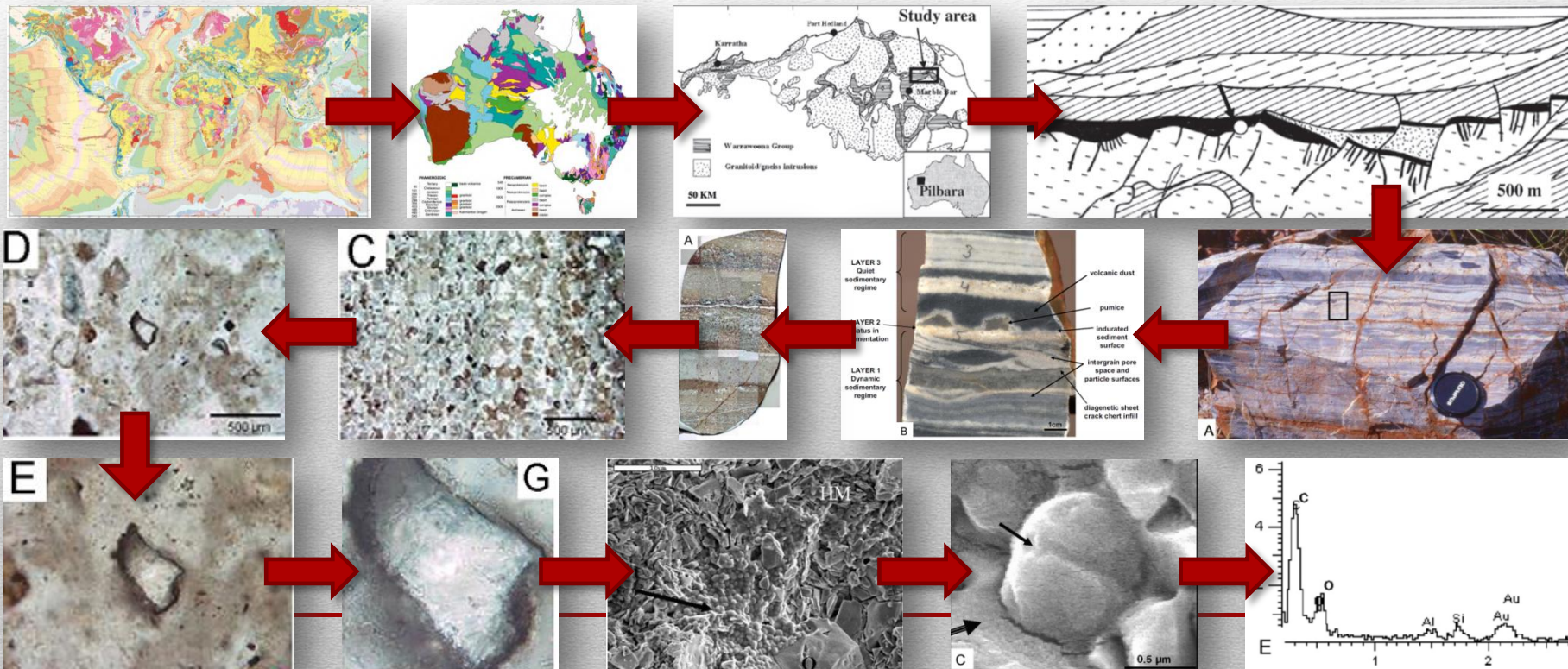
Localisation de zones d'intérêt et prise d'images à différents
grandissements



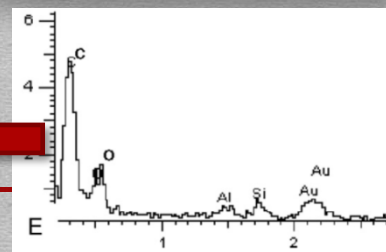
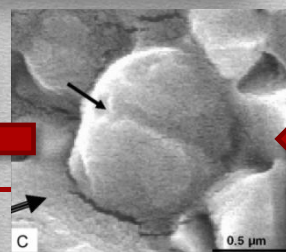
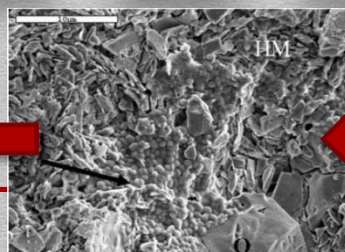
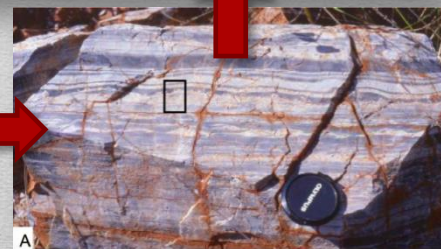
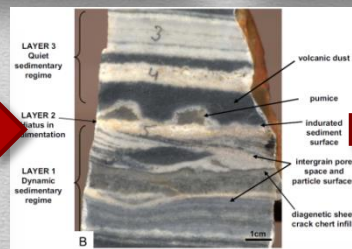
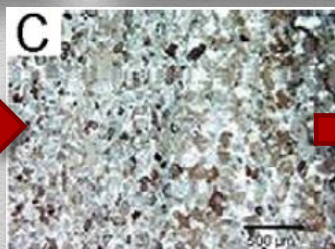
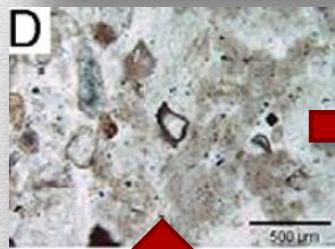
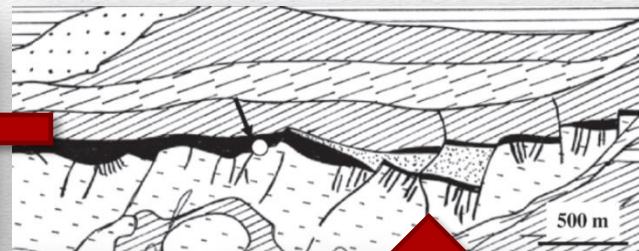
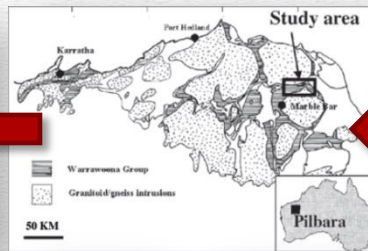
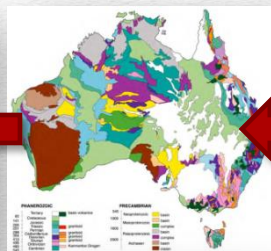
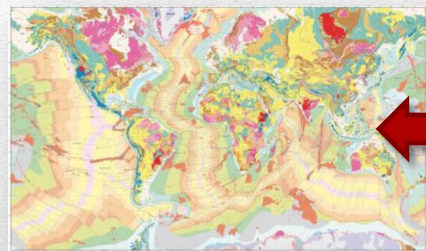
Changement de technique et relocalisation



En pratique, ça...



...mais aussi ça !



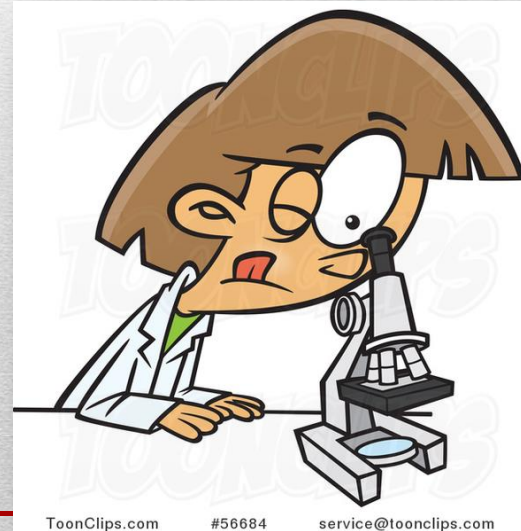
Méthodes « à l'arrache »

Méthode papier et méthode « facile »

Les images papier!

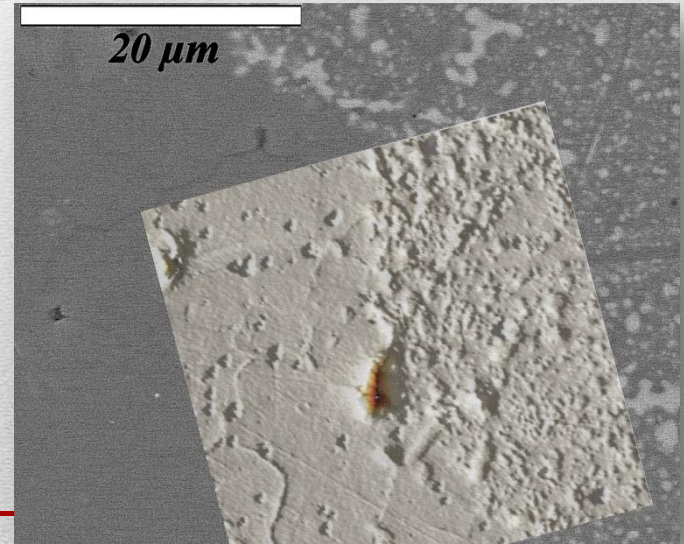
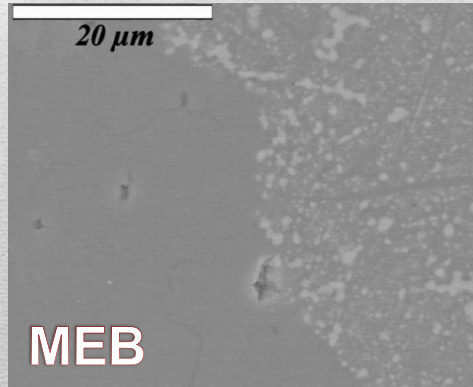
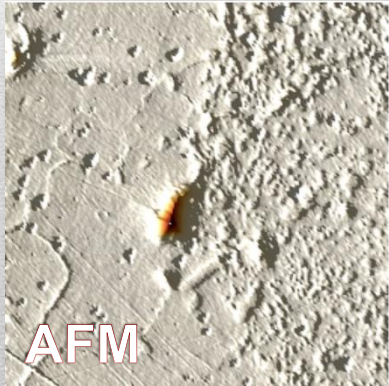
L'image = le lien entre les différentes techniques

Méthode: j'imprime puis je cherche.



Superposition

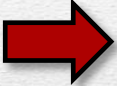
Méthode: superposition des images après rotation et redimensionnement,



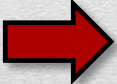
Rotation (2 points distincts), mise à l'échelle (barres d'échelle) et superposition (GIMP, Inkscape, ImageJ...)

Conclusion

- **Repositionnement**

Mécanique  ~ OK (e.g. *platines nano*)

- **Relocalisation**

Imagerie  ~ à l'arrache!

Des solutions plus abouties
existent !



Méthodes abouties

Logiciels et hardware dédiés

Journée thématique du 29 juin 2016

- Préparation d'échantillons
- Supports d'échantillons
- Systèmes de repositionnement
- Couplage
- Traitement d'image
- Méthodes utilisées en astronomie

Les trois réseaux technologiques de la
Mission pour l'Interdisciplinarité du CNRS
RTMFM, RéMiSoL, RCCM
organisent une

Journée thématique Repositionnement-Relocalisation

Mercredi 29 Juin 2016 de 9h30 à 17h30

*Institut Pasteur, Amphithéâtre François Jacob
28 Rue du Docteur Roux,
75 015 Paris*

*Inscription gratuite et obligatoire à partir du 9 Mai sur
<http://itreposition.sciencesconf.org/>
Soumission des résumés avant le 29 Mai*

Programme Prévisionnel Conférences et tables-rondes

Préparation des échantillons

Christopher Peddie
CRUK, London Research Institute

Supports et repères

Anna Sartori
Institut Pasteur, Paris

Techniques de couplage

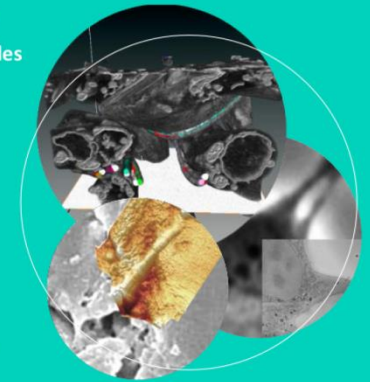
Yannick Anguy
ENSAM, Bordeaux

Traitement des images

Maïtine Bergounioux
Université d'Orléans

Repositionnement multi-échelle

Luc Arnold
OHP, Saint-Michel-l'Observatoire



Contact : gt_repositionnement@services.cnrs.fr



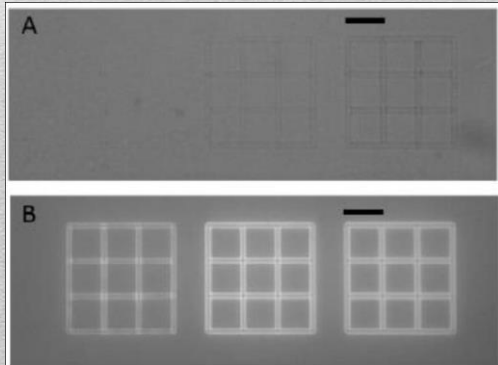
1 – supports dédiés

Supports particuliers :

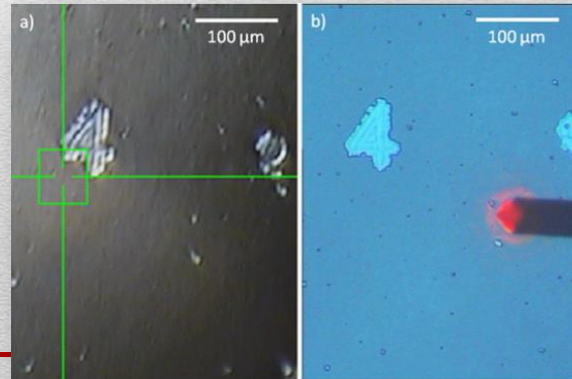
MatTek « Glass bottom dishes », Ibidi μ -dish, Aclar, Sapphir disks, EM finder grids, des lamelles gravées pour Shuttle and Find, des substrats vitreux gravés Argolight ou gravés par ToF-SIMS, des lamelles avec repère, ou encore des techniques telle que celle de la pointe d'aiguille ou des nanoparticules d'or fluorescentes.



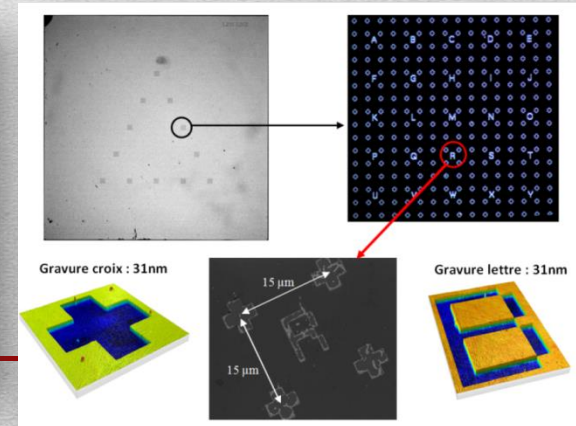
Ibidi μ -dish



Argolight



substrats gravés par ToF-SIMS



2 – repositionnement intelligent

- Serial EM et NanoMAPS.

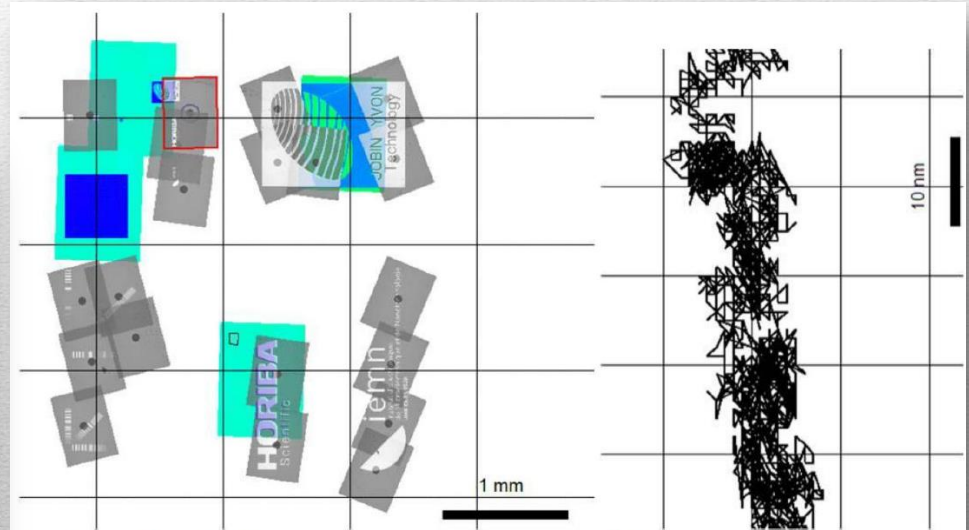
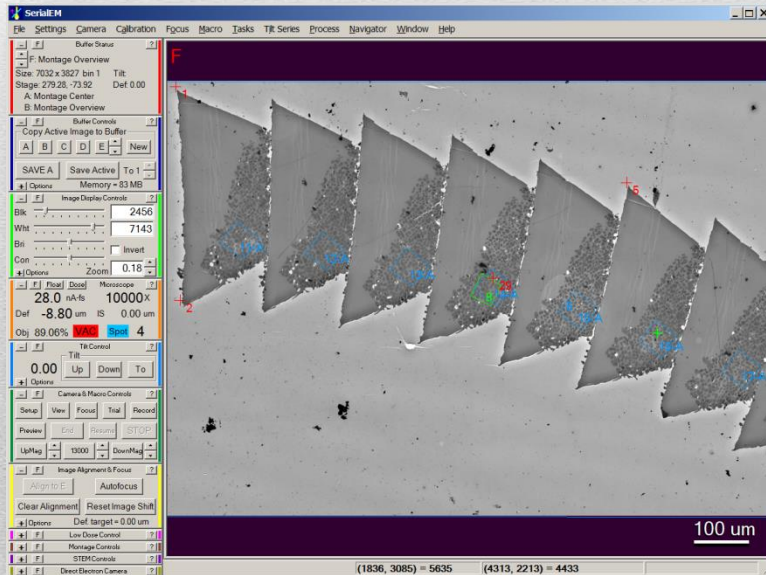


Figure 1 : carte d'un échantillon obtenue au cours de plusieurs sessions d'observation avec 2 microscopes.
Figure 2 : dérive en position observée sur un microscope Olympus BXX1 placé sur une table antivibration.

3 – traitement d'images

- Semi-automatique avec *Icy* et le module *ec-CLEM*, ou avec *Registax 6* en utilisation détournée (logiciel d'astronomie)
- Automatique avec le module *Image Registration App* pour *MatLab*, les modules *TrackEM*, *iTomo* et *TurboReg* pour *Image J*, et les logiciels *Amira* et *Ilastik*

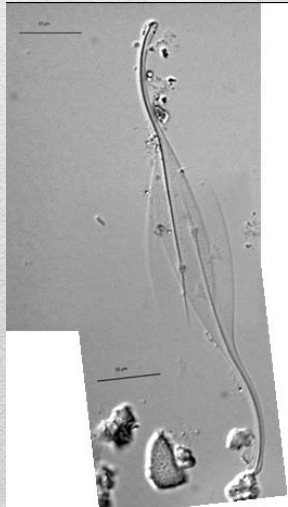
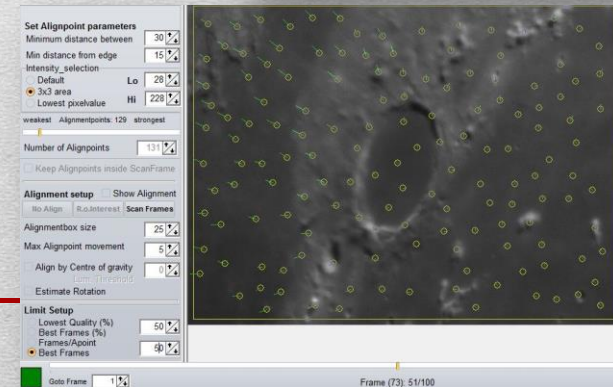
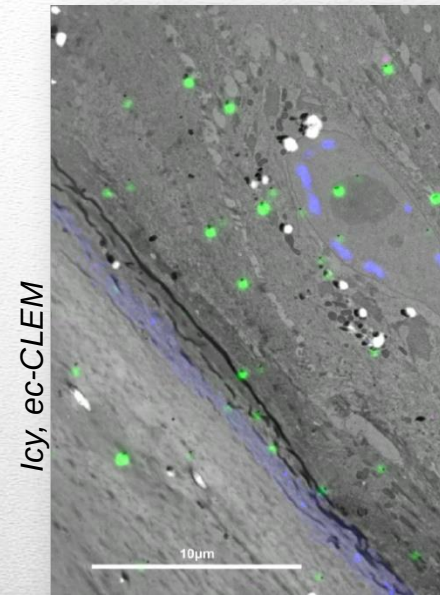


Image Registration App, MatLab

TurboReg, Image J

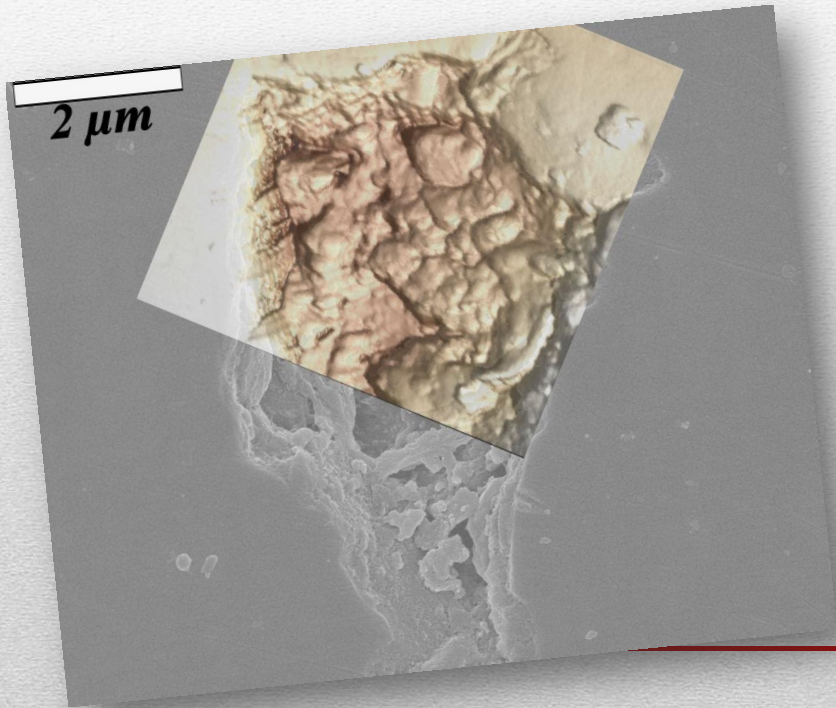
Registax 6



Bilan

- Repositionnement OK pour un même système, délicat dès qu'on change d'instrument.
 - Relocalisation facile avec utilisation de supports dédiés à condition d'avoir des contrastes avec les différentes techniques, délicat si changement d'échelle trop important et absence de système optique.
 - Relocalisation par traitement d'images OK mais plutôt en post-acquisition.
-

A venir: atelier sur la CLEM et le traitement d'image à l'Institut Pasteur (juin ou septembre)

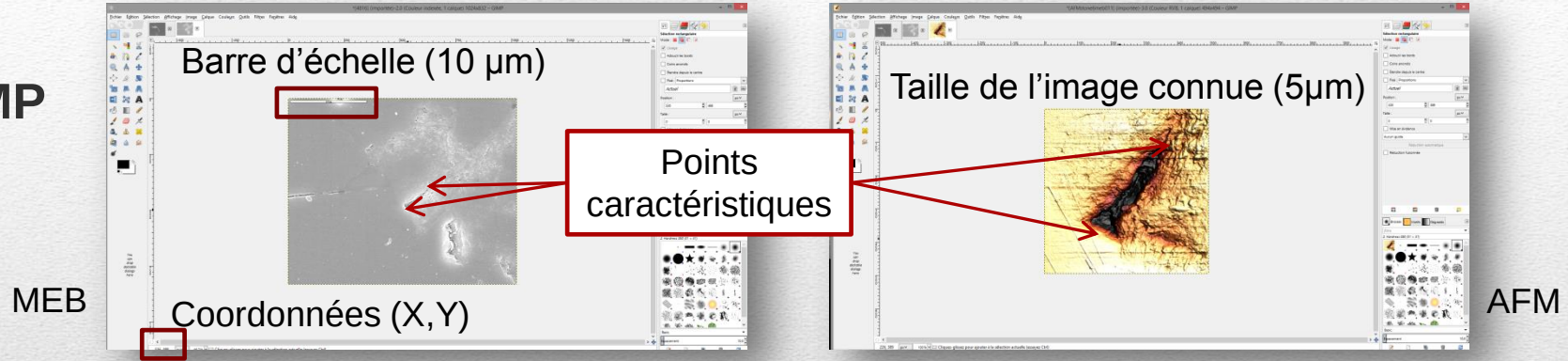


GT ouvert: vous êtes les bienvenus!

Merci

Redimensionnement et rotation: calcul

- **GIMP**



- **EXCEL**

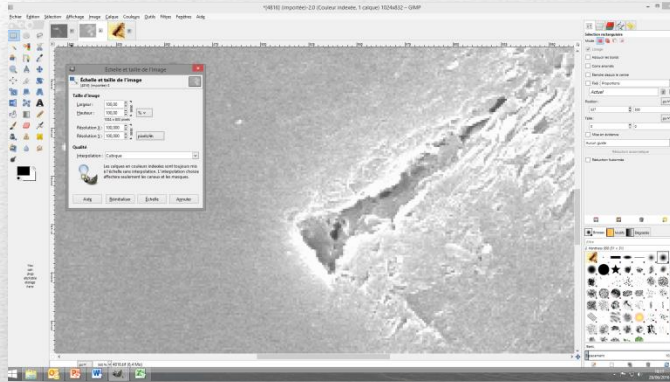
Mise à l'échelle

redimensionnement							
	Image 1					Image 2	
	longueur en pixel	taille réelle				longueur en pixel	taille réelle
Scale bar	245	10			Scale bar	494	5
Redimensionner image 1 à	286,38 %		ou image 2 à	34,91902834 %			
rotation							
	Image 1					Image 2	
	x	y				x	y
Point 1	537	500			Point 1	223	385
Point 2	606	429			Point 2	363	97
Pente	-1,028985507				Pente	-2,057142857	
		Theta	18,25664303°	si < 90° ou			198,256643° si > 90°

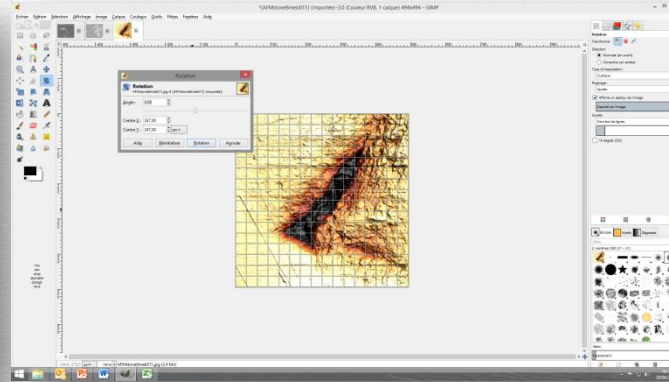
Angle de rotation

Redimensionnement et rotation: réalisation

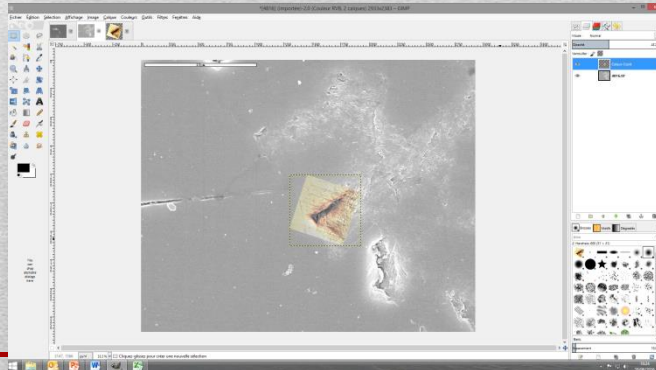
GIMP



Mise à l'échelle



Rotation + ajustement du canevas au calque



Copier/coller + transparence + calques

Inkscape

Calques plus pratiques

