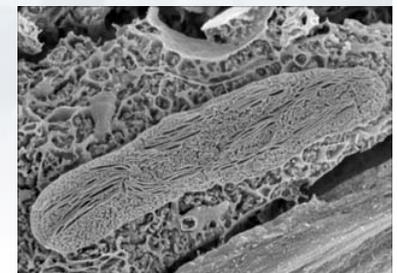
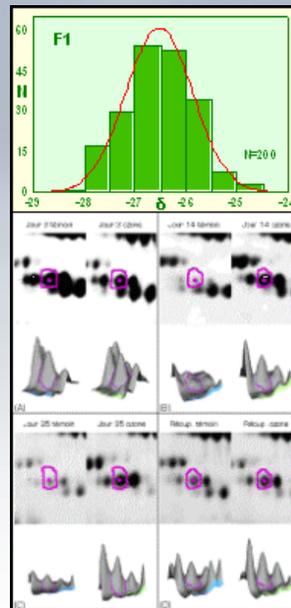
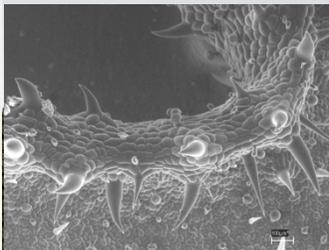
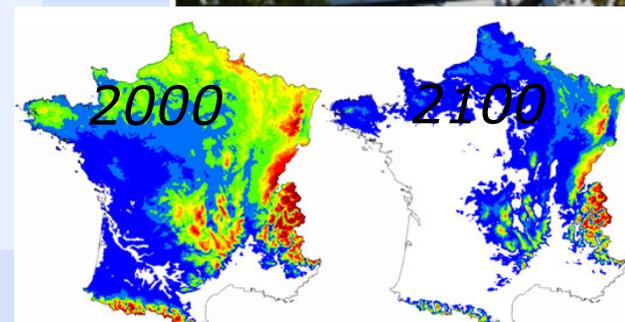


Microscopie électronique à balayage à pression contrôlée - couplage cryo - traitement d'image

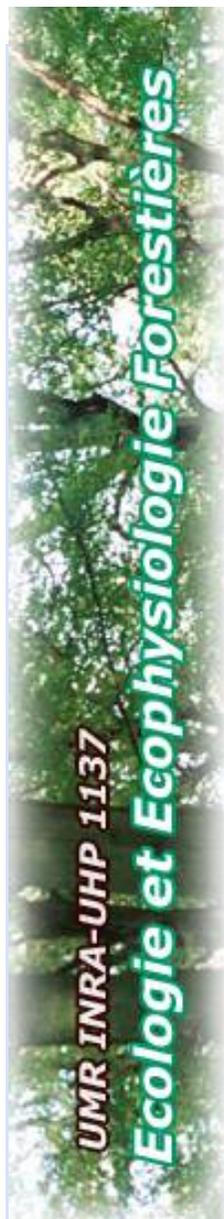
Didier Le Thiec - Christophe Rose - Sylvère Vialet-Chabrand
INRA - UMR Ecologie et Ecophysologie Forestières
Centre INRA de Nancy-Lorraine



Trois grandes thématiques de recherche dans l'UMR EEF

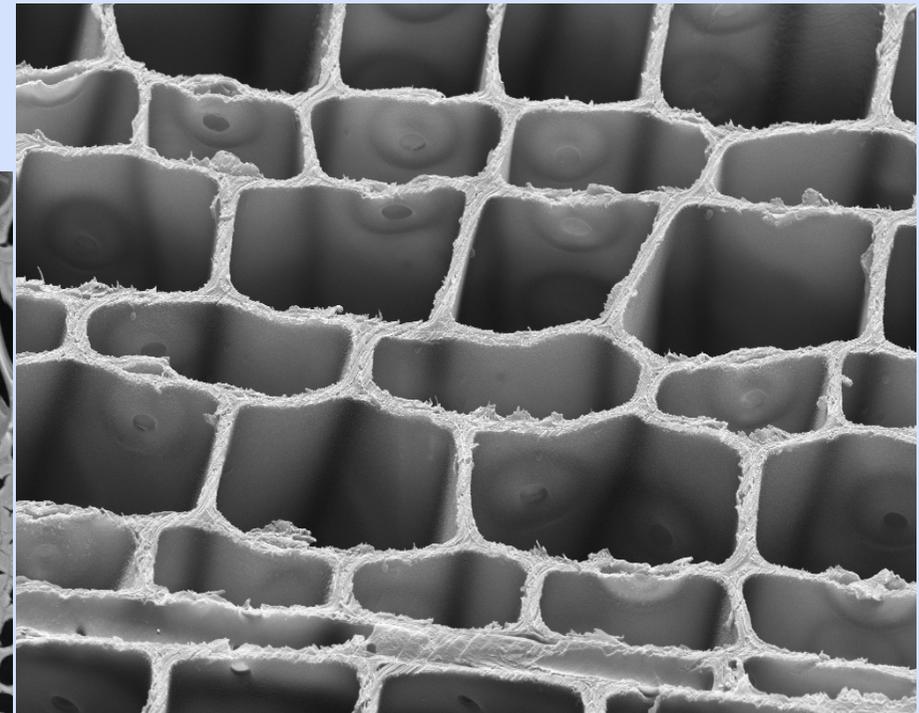
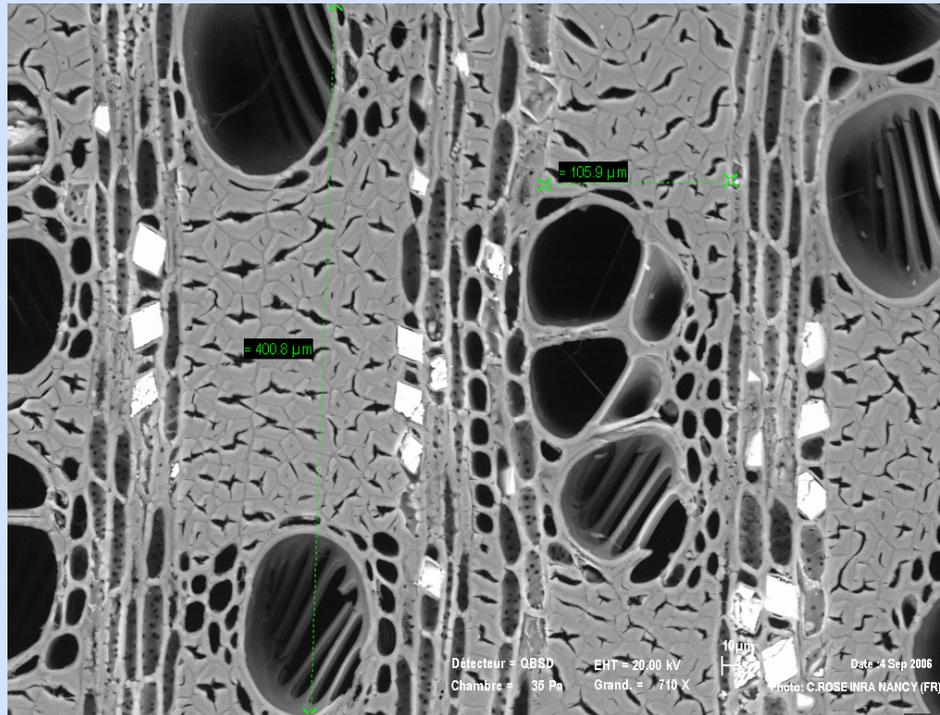


- **Physiologie et diversité de la réponse des arbres aux contraintes de l'environnement** : approches biochimiques, moléculaires, microscopiques, gènes-candidats, biologie intégrative en réponse à: la lumière, la sécheresse, l'excès d'eau, la température, l'ozone, le CO₂,...
- **Fonctionnement intégré de l'arbre et de l'écosystème** : flux et cycles de l'eau et du carbone. Propriétés et fonctionnement des interfaces (sol-racine, feuille-atmosphère), réserves carbonées et azotées, hydraulique végétale.
- **Dynamique à long terme et dysfonctionnements des écosystèmes forestiers** : leur sensibilité aux accidents climatiques et aux changements globaux, impact de l'usage ancien des sols, pollution atmosphérique.



2 grands types de structures cellulaires sont observés :

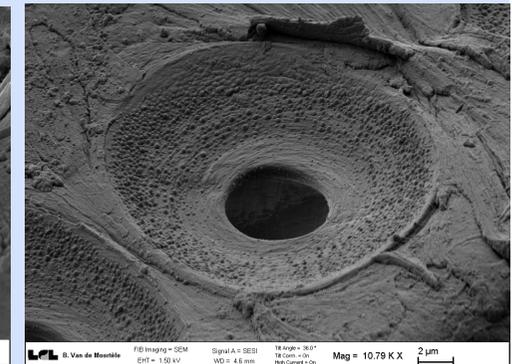
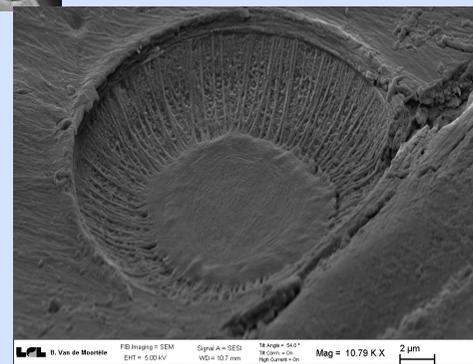
- bois



FEG

tungstène

**Cristaux d'oxalate de calcium dans
Rhizophora mucronata, pression
contrôlée 35 Pa**

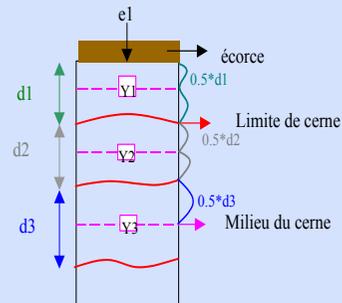
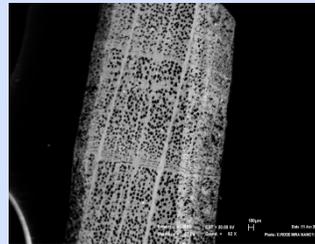


Microanalyse sur bois

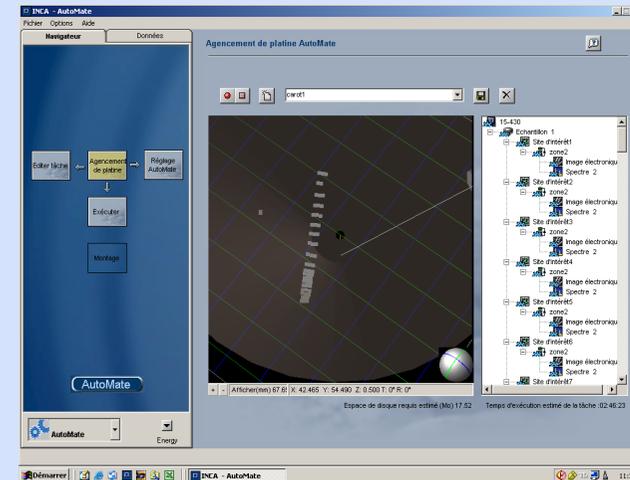
DENDROCHIMIE DES CERNES ANNUELS D'ACCROISSEMENT



CAROTAGE

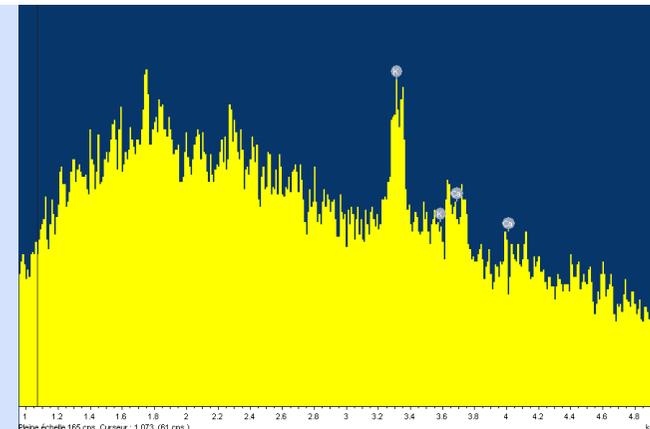


DETERMINATION DES ZONES D'ANALYSES (cernes)



Acquisition automatique de la composition chimique des cernes de carottes de bois lyophilisées, «métallisées» (carbone) et analysées sous vide secondaire .

PLANAGE SURFACAGE

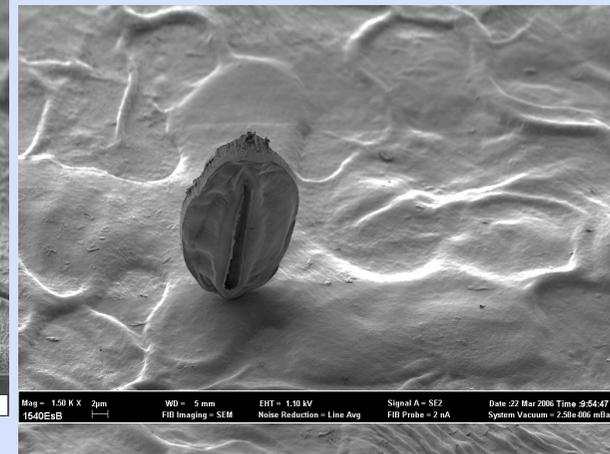
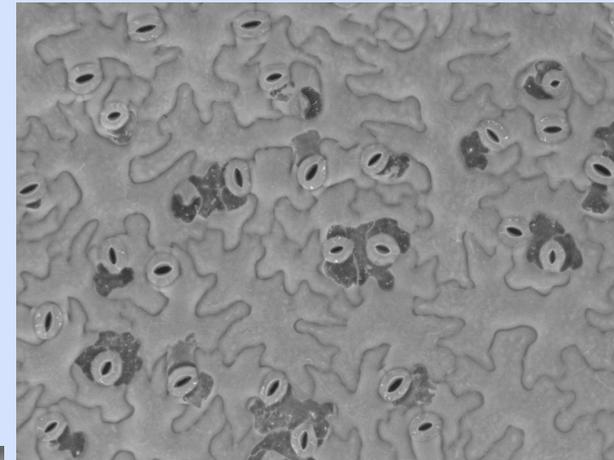
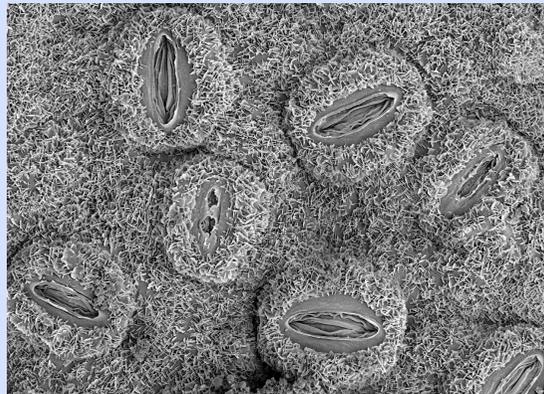
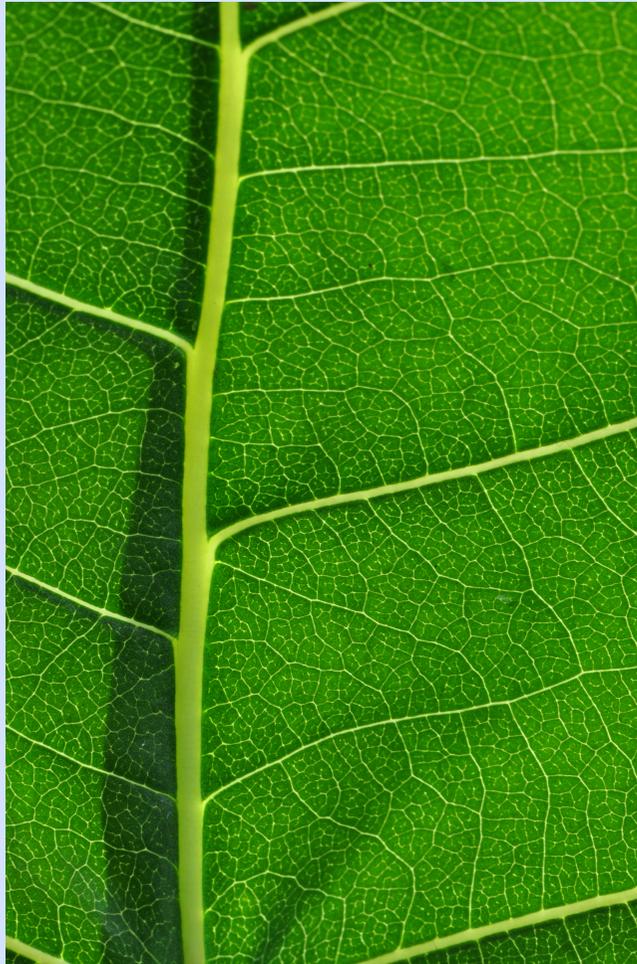


2 grands types de structures cellulaires sont observés :

- **feuille**

**Stomates de feuille de
chêne (cryo, vide
secondaire, FEG)**

tungstène

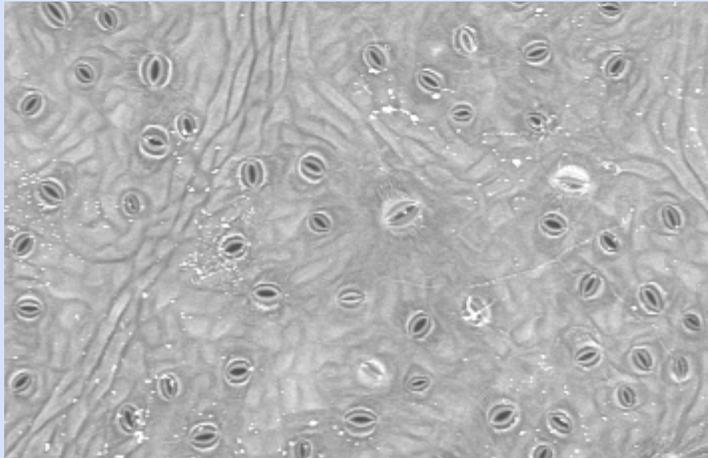


**Stomates de feuille de peuplier
(cryo, vide secondaire,
tungstène)**

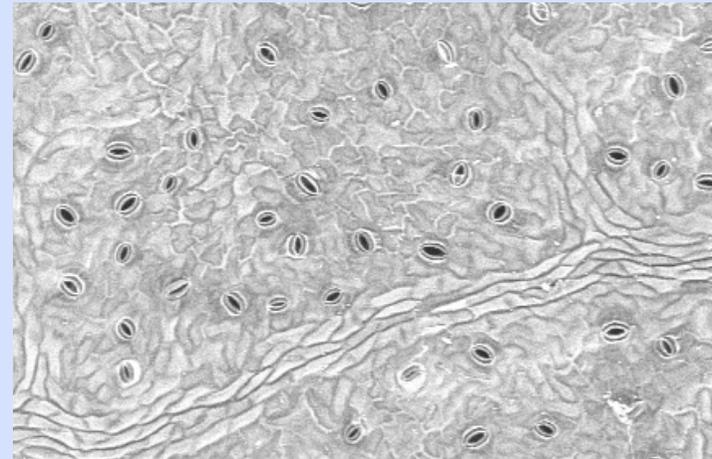
FIB

Diversité fonctionnelle et adaptation

Contrôle génétique et environnemental de l'efficacité d'utilisation de l'eau ($\Delta^{13}\text{C}$)



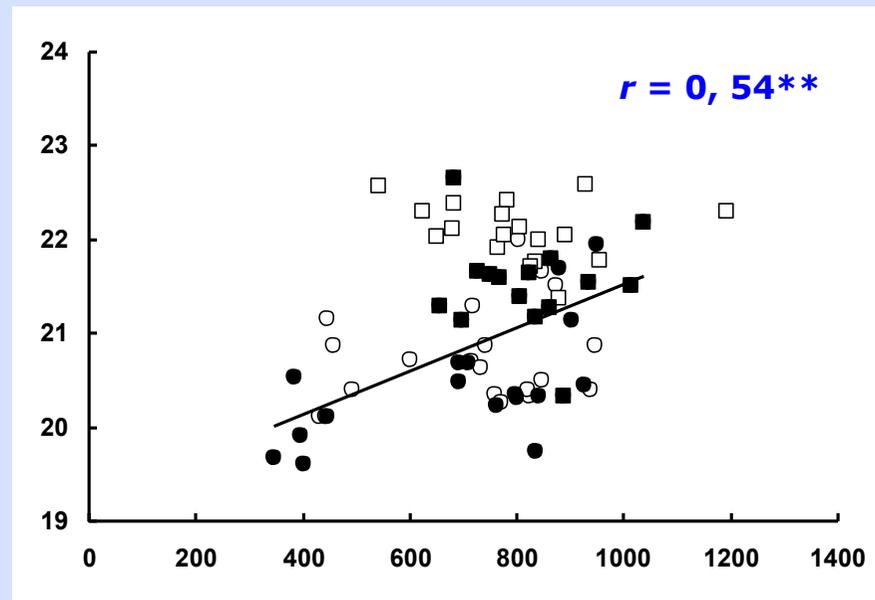
Peuplier I45-51 (abaxiale)



Peuplier Agathe-F (abaxiale)

Acquisitions de photos de surface de feuilles.
Traitement ultérieur (analyse d'images) pour le comptage des stomates par unité de surface.

Δ (‰)



Densité stomatique (nb sto/mm⁻²)

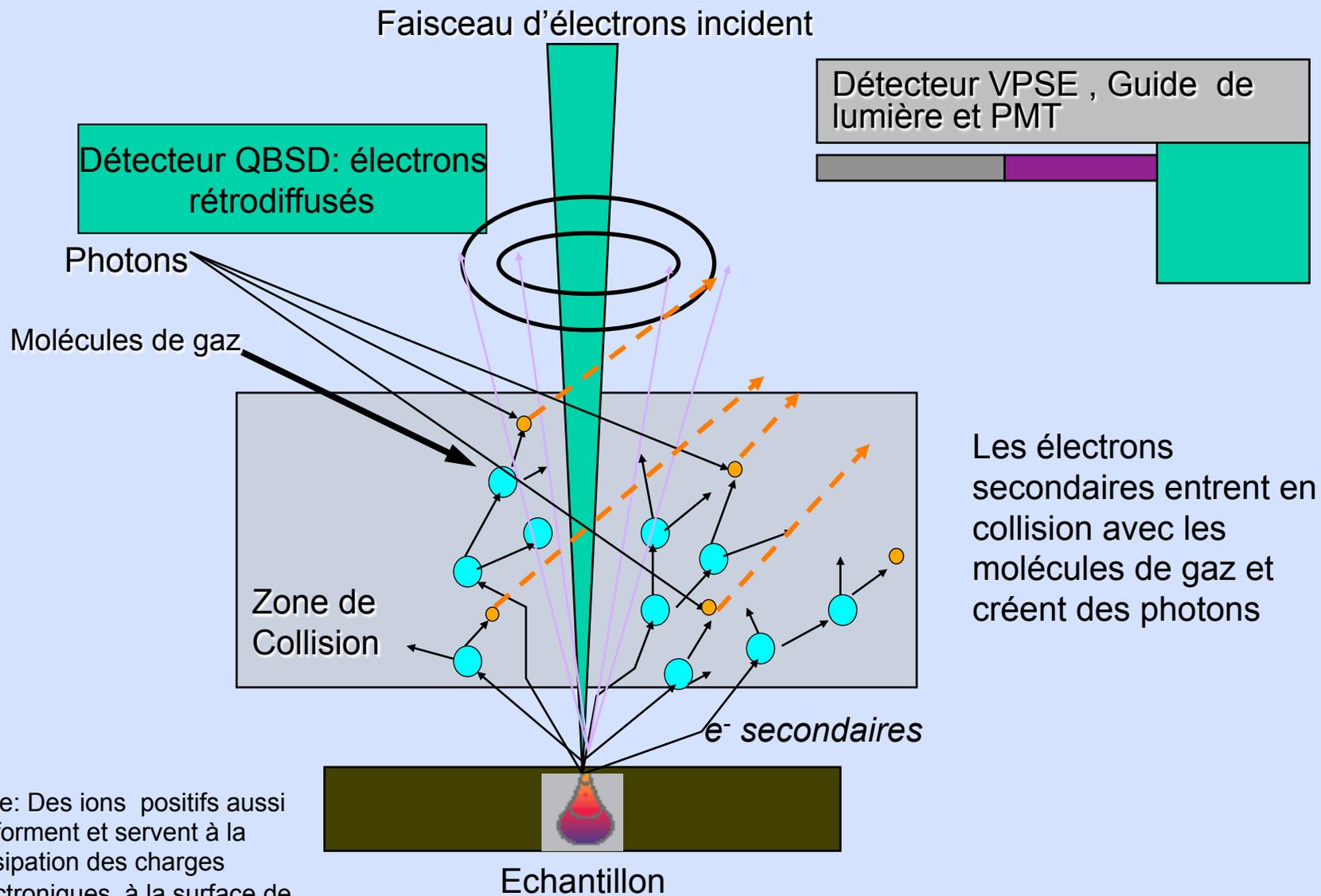
quelques problèmes

- *des échantillons mous*
- *des échantillons hydratés*
- *des échantillons non conducteurs*

des solutions

- *le froid*
- *la pression*
- *l'automatisation*

Rappels pression contrôlée



Les électrons secondaires entrent en collision avec les molécules de gaz et créent des photons

Note: Des ions positifs aussi se forment et servent à la dissipation des charges électroniques à la surface de l'échantillon

Principales différences pour l'observation d'échantillons biologiques entre le mode **Vide Secondaire (HV)** et le mode **Pression Contrôlée (PC)**

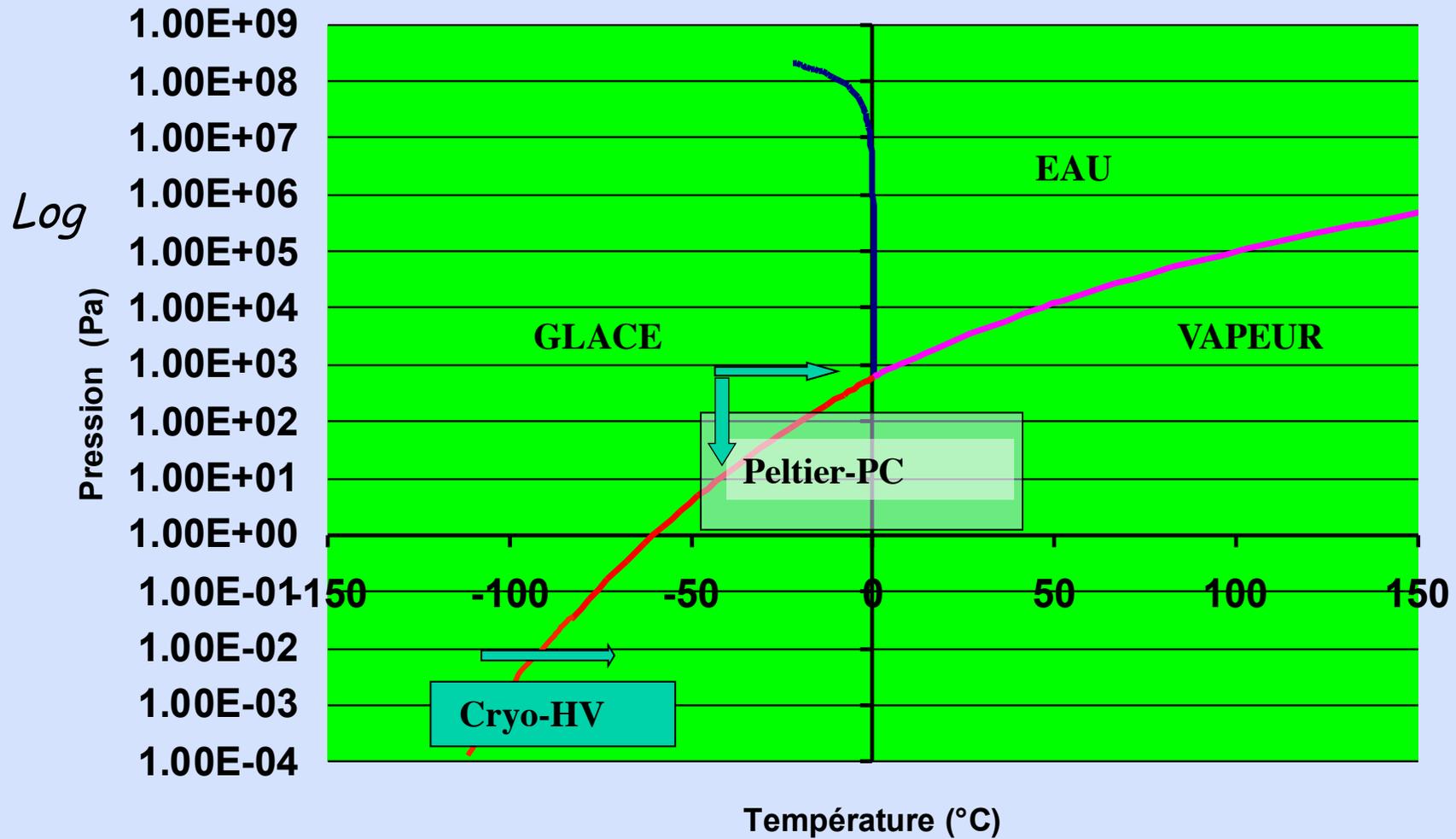
Mode HV (pression chambre $< 5 \cdot 10^{-2}$ Pa)

- *Echantillon :*
 - déshydraté
 - conducteur aux électrons
 - rigide
- *Préparations obligatoires pour l'observation et l'analyse :*
 - lyophilisation, congélation, point critique,...
 - métallisation
 - rigidification

Mode PC (pression de la chambre variable de 1 à 300 Pa et plus...)

- *Echantillon :*
 - tous types même hydratés (eau ou milieux aquatiques à température ambiante exclus, mode environnemental).
- *Préparations conseillées pour limiter la déshydratation pendant l'observation :*
 - congélation
 - observations sur platine froide (effet Peltier) ou platine cryogénique

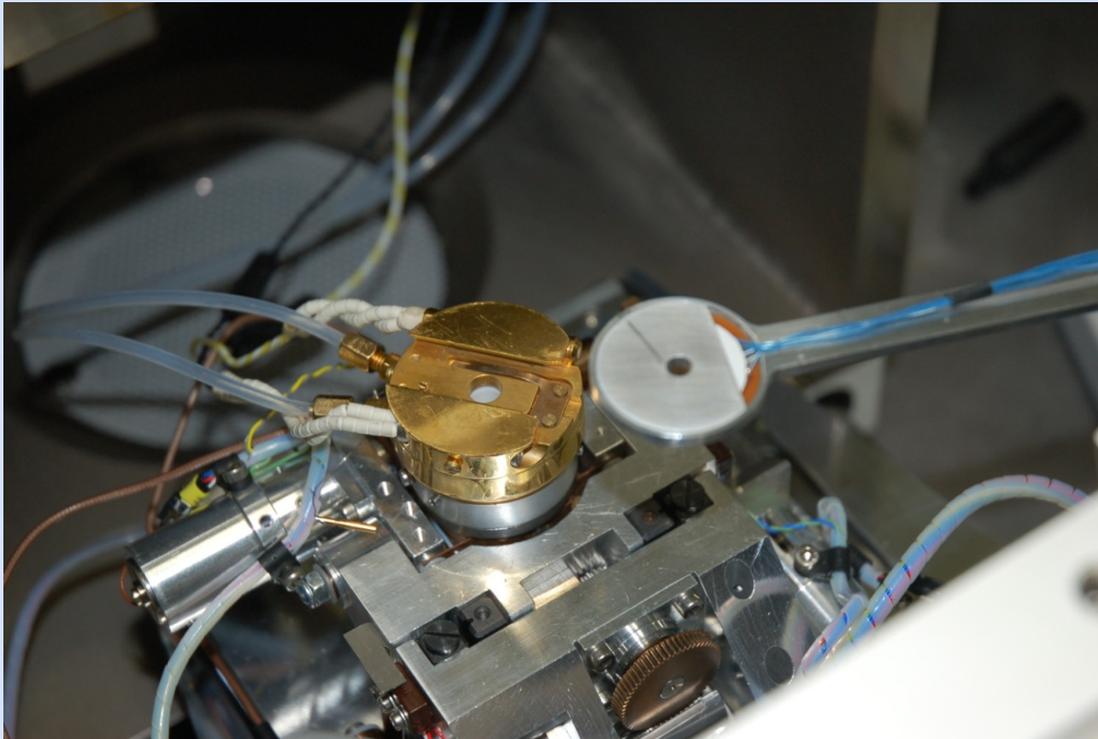
Pression et température : paramètres physiques ajustables



La platine cryogénique

L'utilisation d'un système de platine cryogénique est le moyen le plus performant pour l'observation en mode conventionnel (vide secondaire):

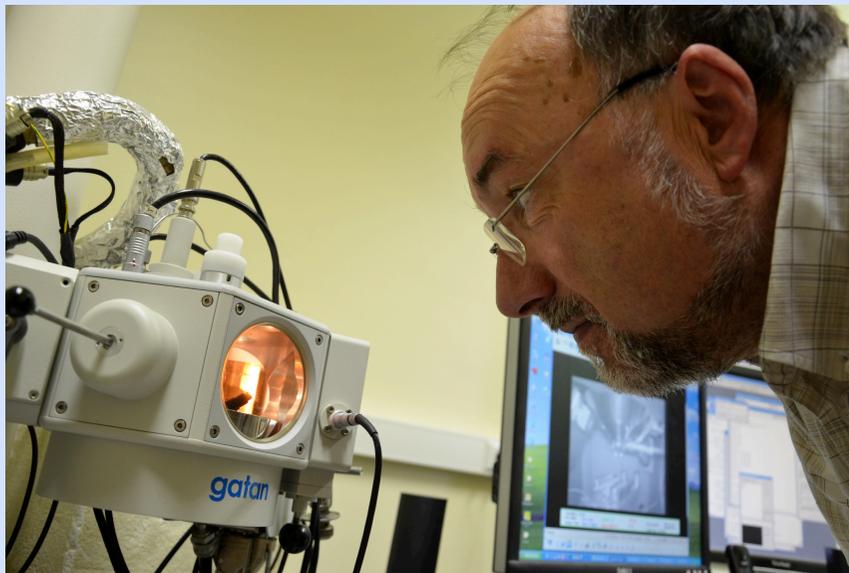
- conservation des structures cellulaires et visualisation des structures internes
- limitation des altérations dues à l'intensité du faisceau



Le sas de cryo-transfert

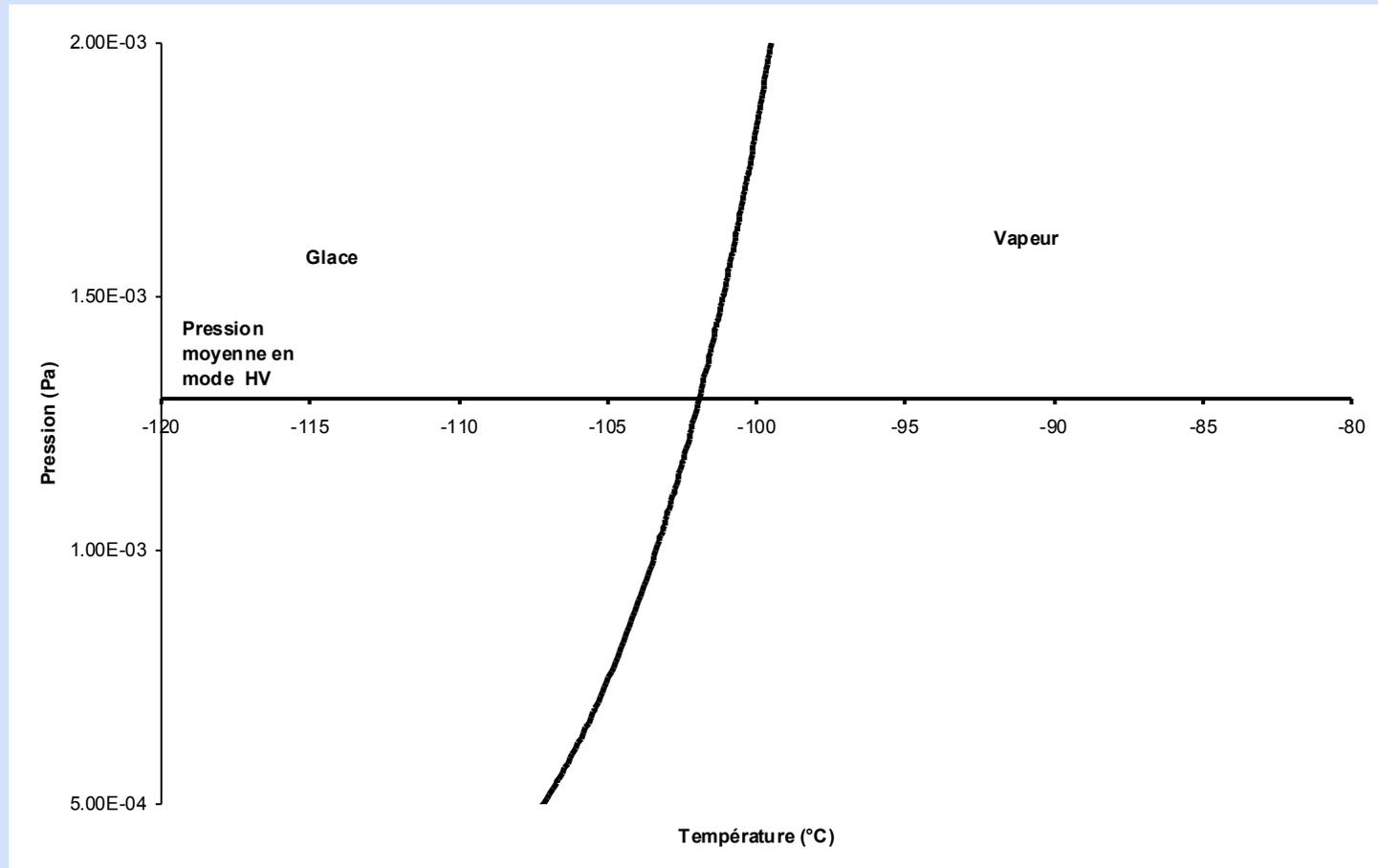


La chambre de préparation



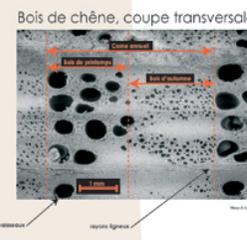
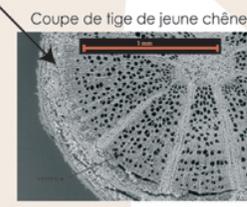
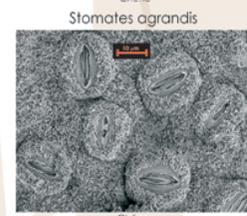
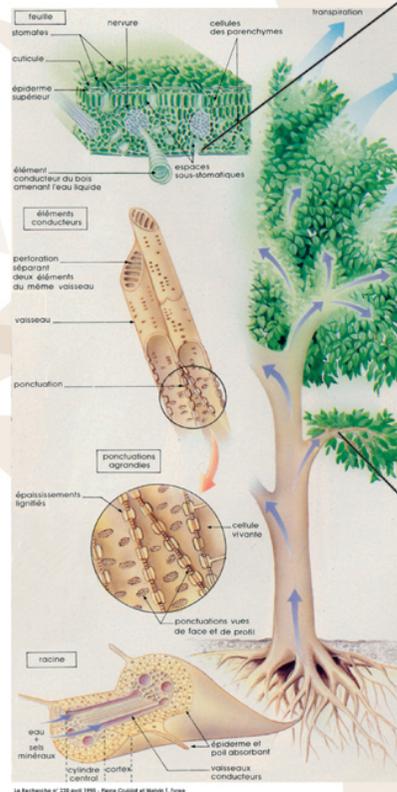
Observations en vide secondaire et avec la platine cryogénique

Pression non ajustable dans la chambre.
Température de la platine ajustable (-120° C ; +80° C).
Régulation de la température de l'échantillon.



Courbe d'équilibre Pression-Température

Les voies de circulation de l'eau dans l'arbre



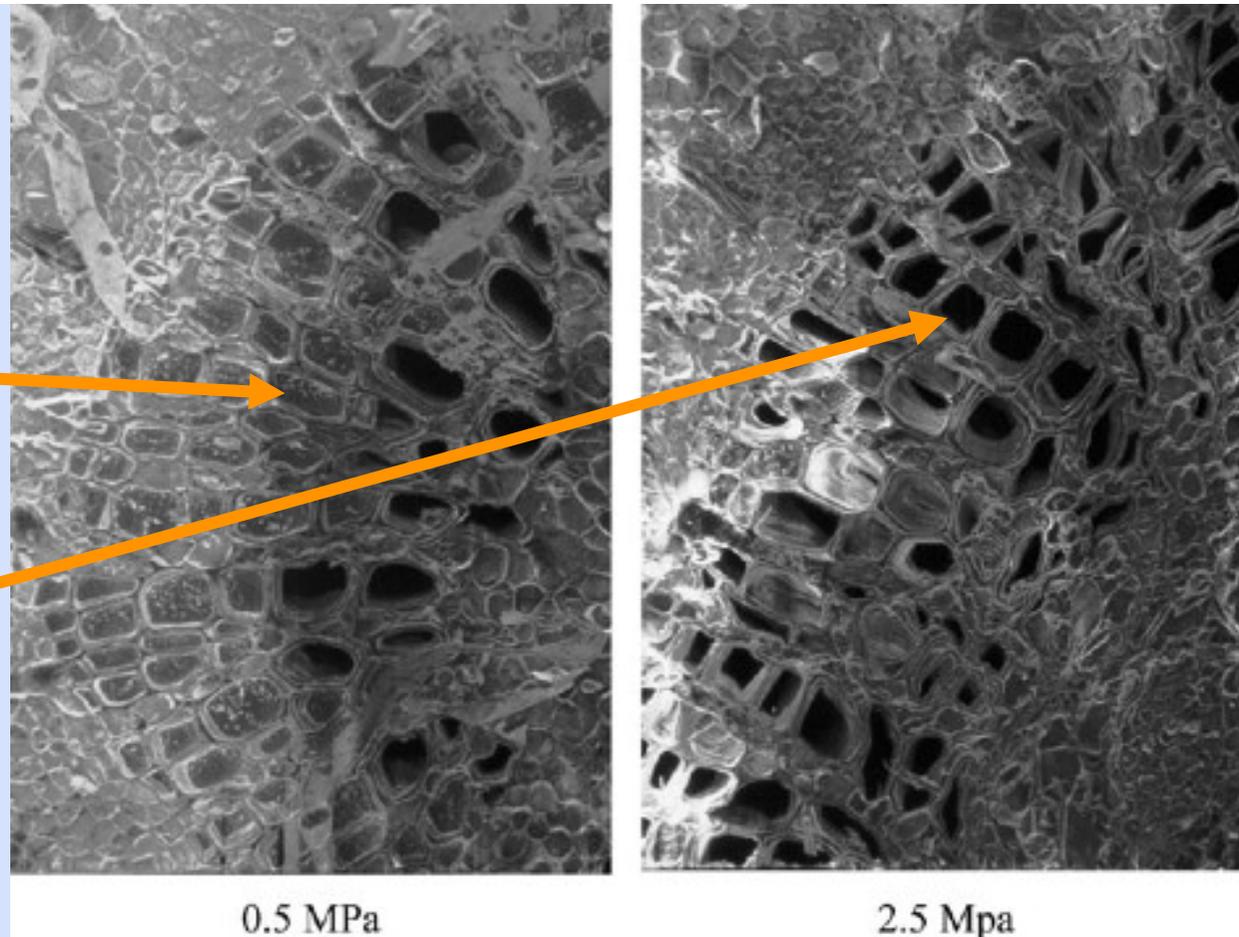
Vulnérabilité à la cavitation chez le peuplier en cas de sécheresse Visualisation de l'embolie vasculaire sur échantillon de petite taille

- échantillon coupé sous eau, congelé dans N2 liquide, fracturé et observé en conditions cryo .
- une méthode de mesure du taux d'embolie (% vaisseaux embolisés)

Populus alba
nervure

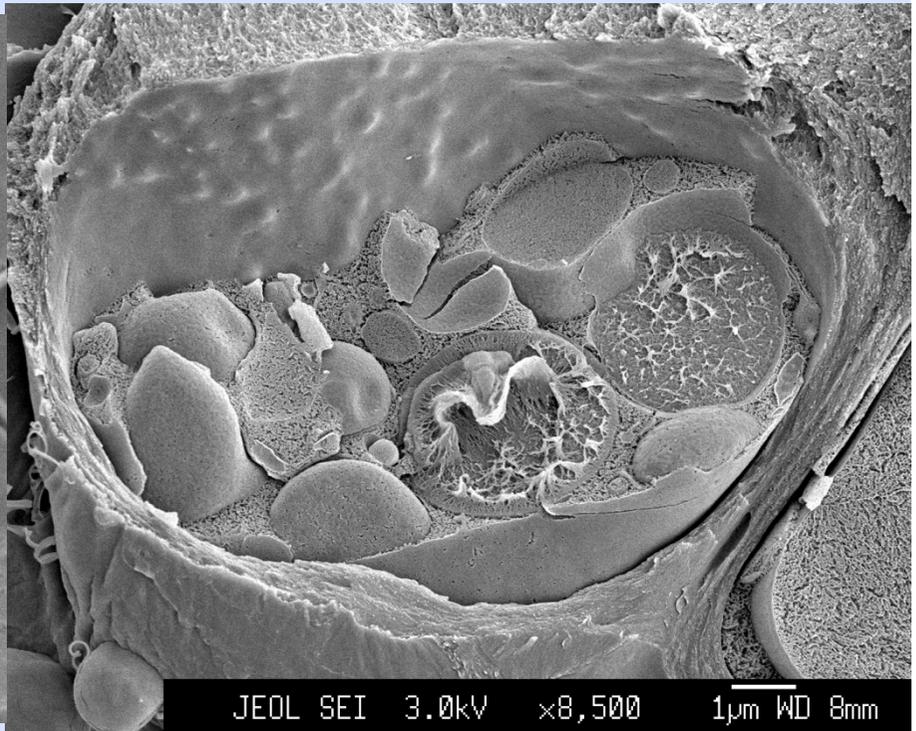
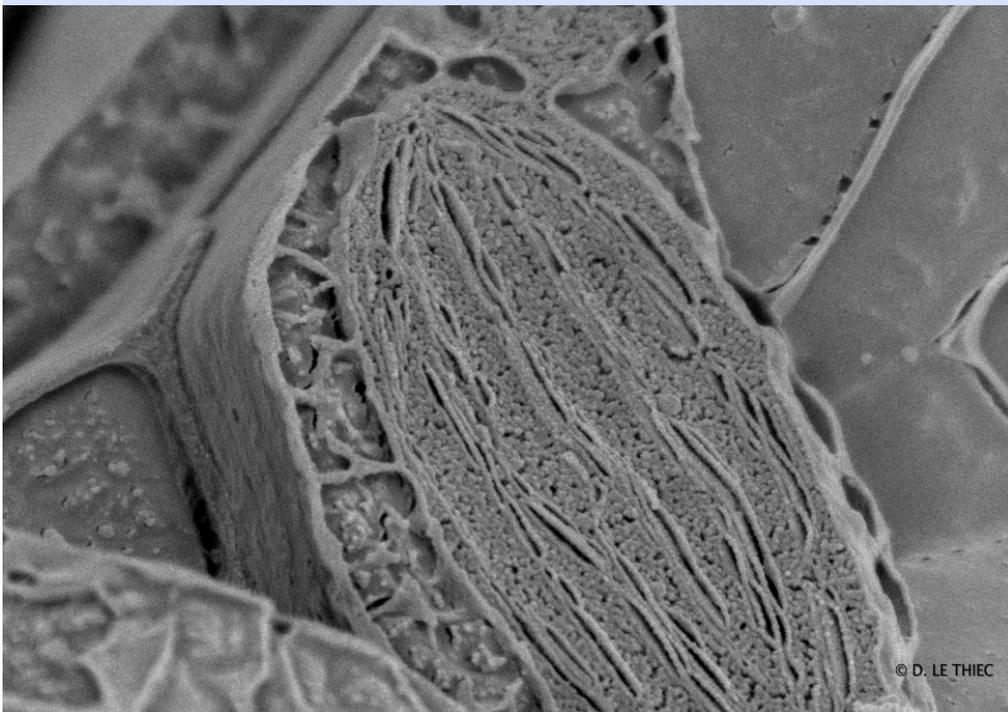
vaisseau plein

vaisseau embolisé

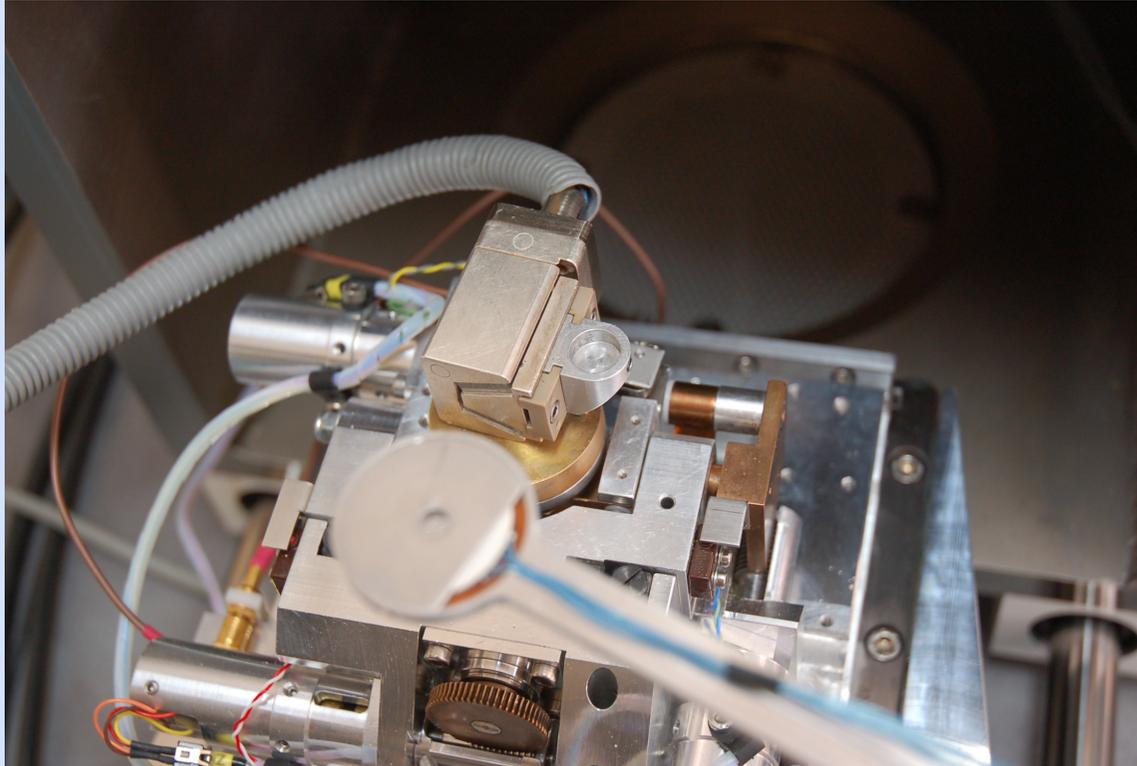


Conclusions mode conventionnel et platine cryogénique

- ✓ **Très bonne résolution pour l'observation d'échantillons biologiques maintenus congelés sous vide secondaire (métallisation Au-Pd)**
- ✓ **Bonne gestion de la sublimation de surface de l'échantillon avec de l'expérience**
- ✓ **Possibilité de micro-analyse en EDS et WDS**
- ✓ **Inertie de la réponse de la platine aux modifications de température**
- ✓ **Interaction des pics Au-Pd avec les éléments majeurs en biologie.**
- ✓ **Taille réduite de l'échantillon sur la platine cryo**
- ✓ **Consommation expérimentale (azote liquide et gazeux) et humain (temps) importants**



La platine à effet Peltier

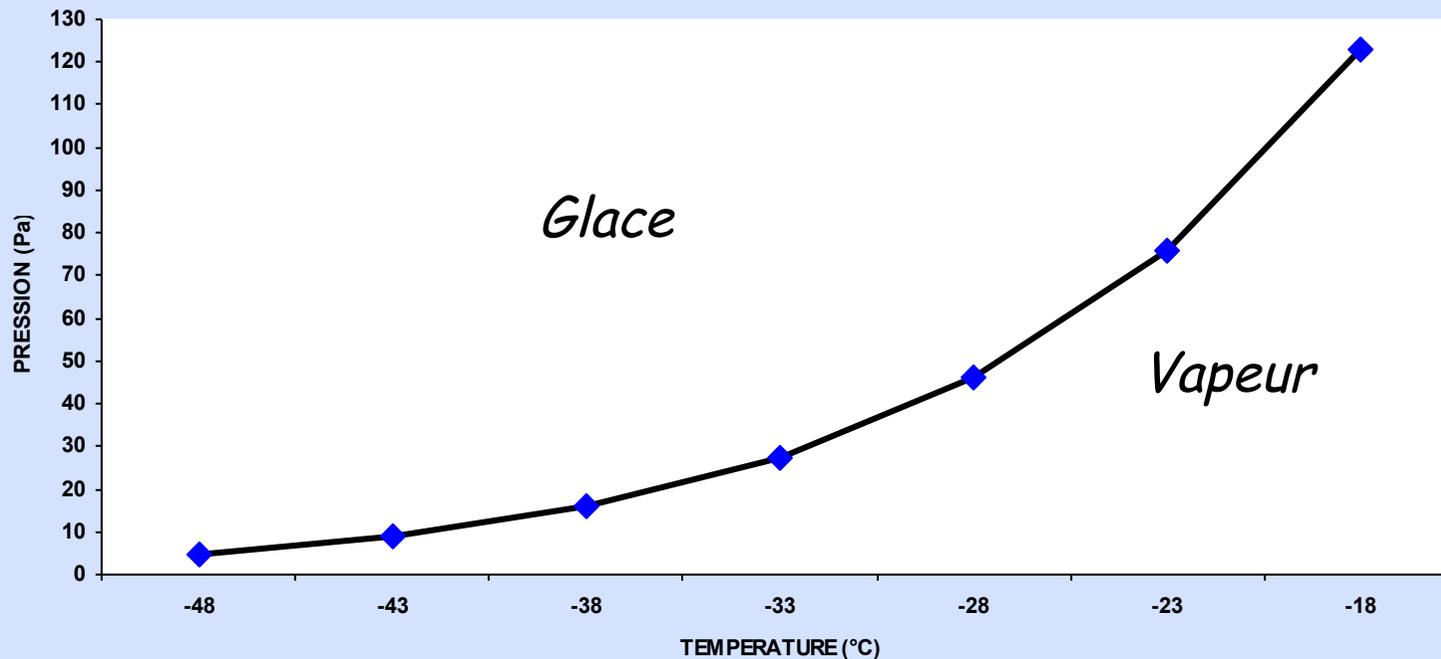


L'utilisation dans la chambre d'un porte échantillon à effet Peltier ($-50^{\circ}\text{C}/+50^{\circ}\text{C}$) réduit considérablement la déshydratation des échantillons en mode pression contrôlée.

Inconvénients : perte des axes rotation et tilt et la taille du support échantillon ne convient que pour l'observation d'échantillons de taille réduite (40 mm de diamètre et quelques mm d'épaisseur).

Observations en vide contrôlé et avec la platine Peltier

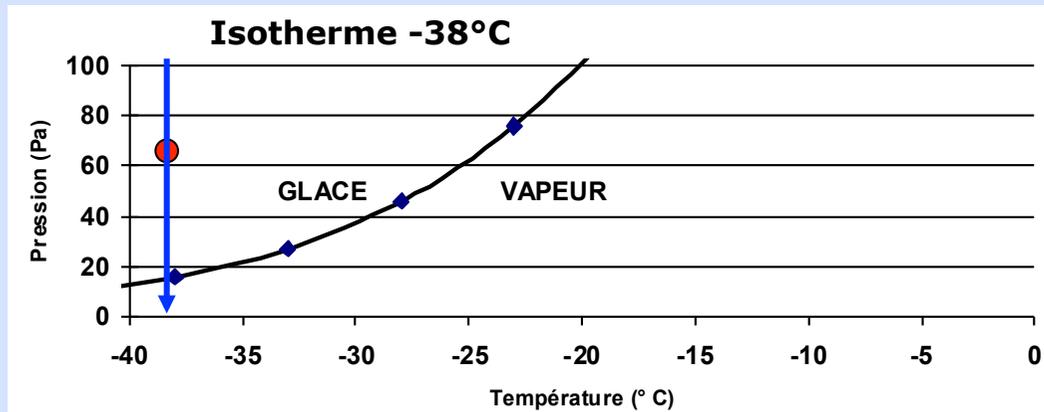
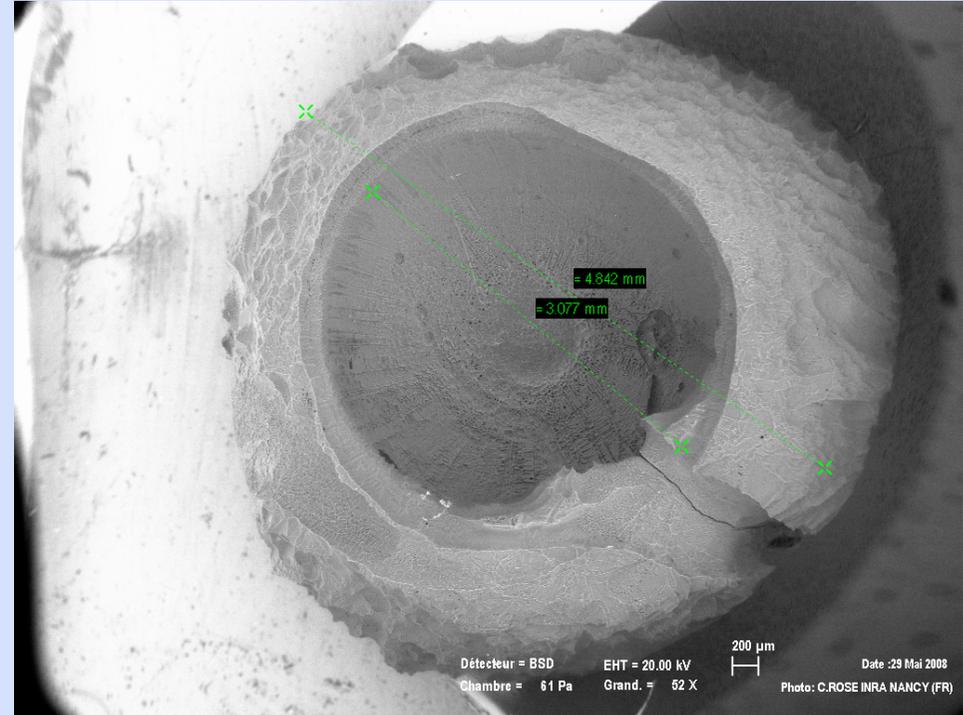
Pression variable ajustable dans la chambre (10-400 Pa) .
Température de la platine ajustable (-50° C; +50° C).
Régulation de la **température** de l'échantillon.



Courbe d'équilibre Pression-Température

Observations en vide contrôlé et avec la platine Peltier

Effet de la variation de pression sur une goutte d'eau congelée maintenue à une température fixe

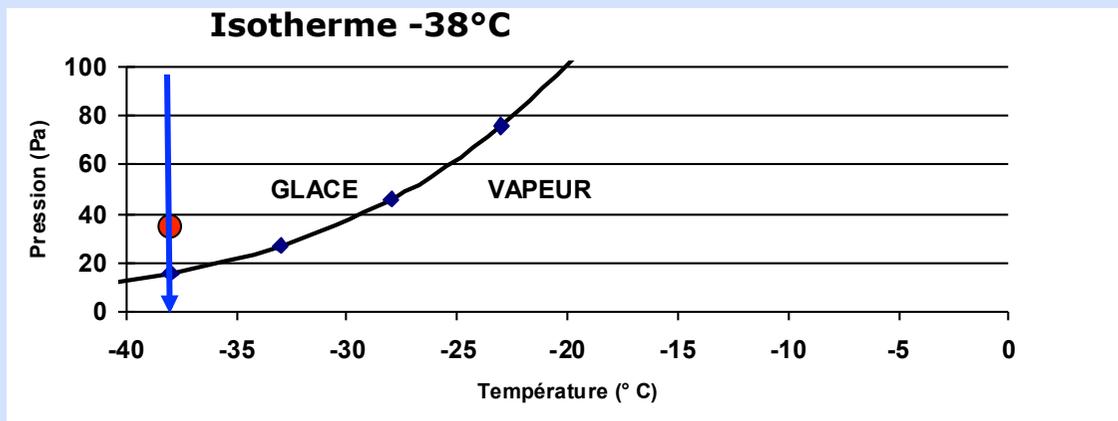
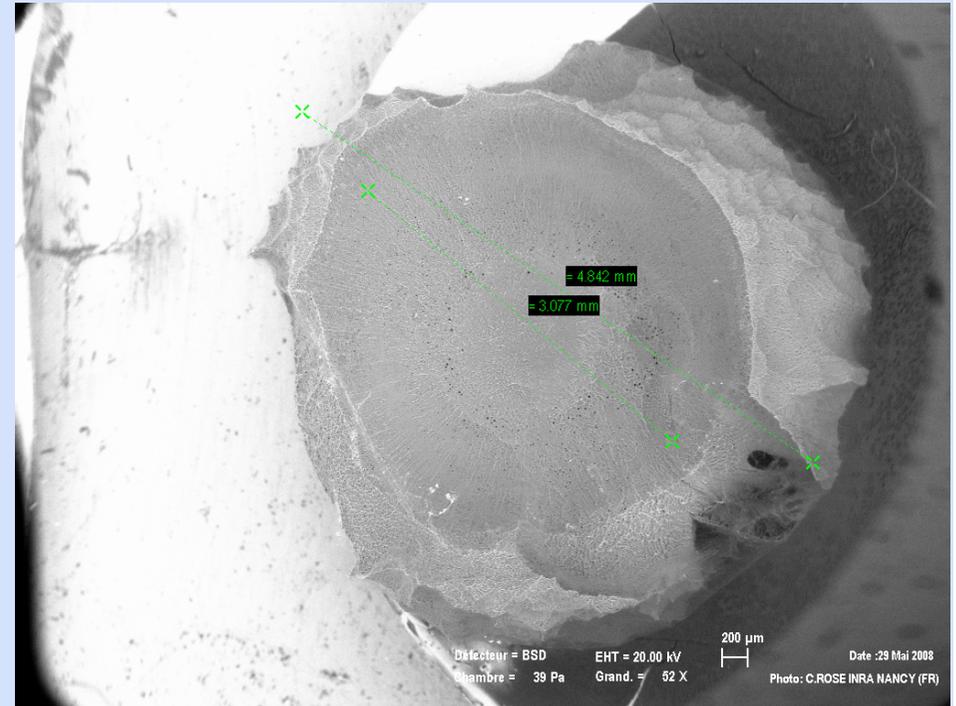


Conditions initiales
Pression **61 Pa**
Température **-38°C**

Observations en vide contrôlé et avec la platine Peltier

Effet de la variation de pression sur une goutte d'eau congelée maintenue à une température fixe

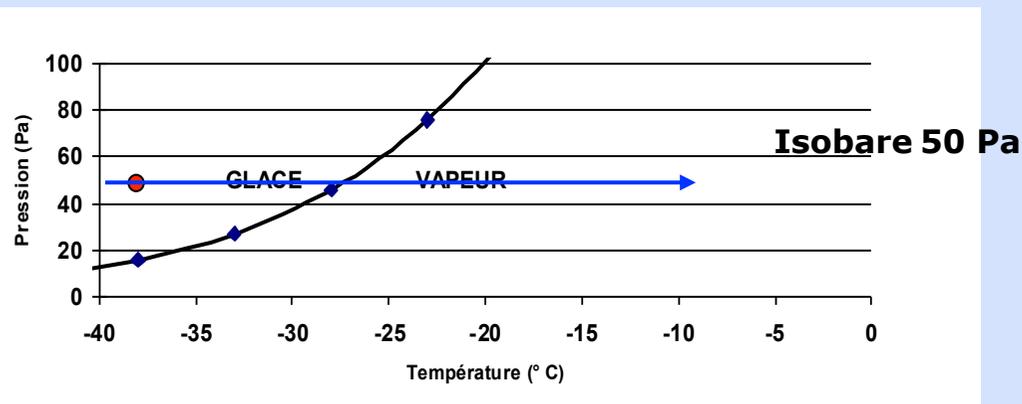
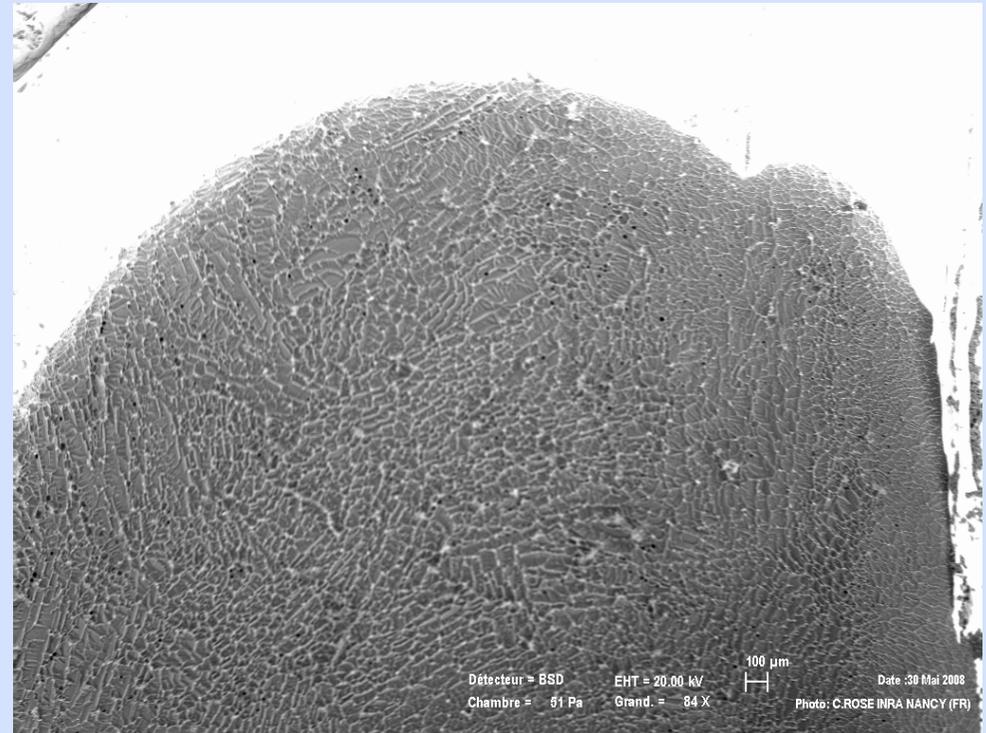
Delta pression : 20 Pa
Balayage faisceau permanent (20 KV; 800 pA)
Temps d'exposition : 6 min



Conditions finales
Pression 39 Pa
Température platine -38°C

Observations en vide contrôlé et avec la platine Peltier

Effet de la variation de **température** sur une goutte d'eau congelée maintenue à une **pression fixe** dans la chambre



Conditions initiales
Pression **50 Pa**
Température platine **-38°C**

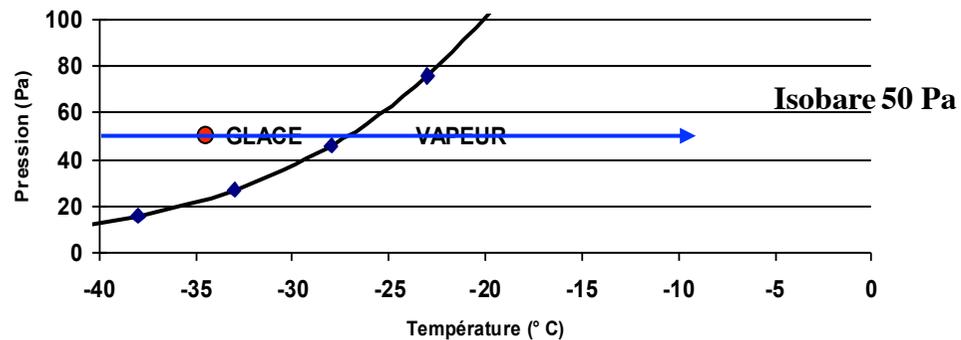
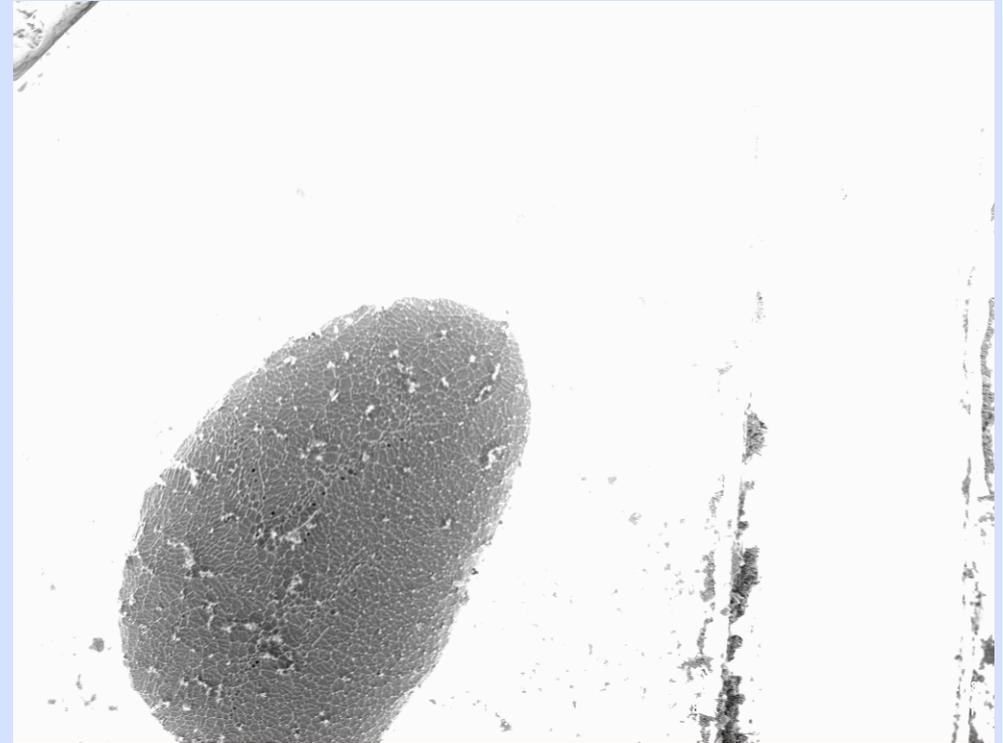
Observations en vide contrôlé et avec la platine Peltier

Effet de la variation de **température** sur une goutte d'eau congelée maintenue à une **pression fixe** dans la chambre

Delta température: 3°C

Balayage faisceau permanent (20Kv; 800pA)

Temps d'exposition : 6 min

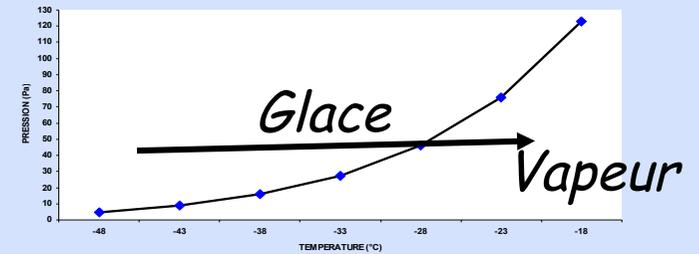
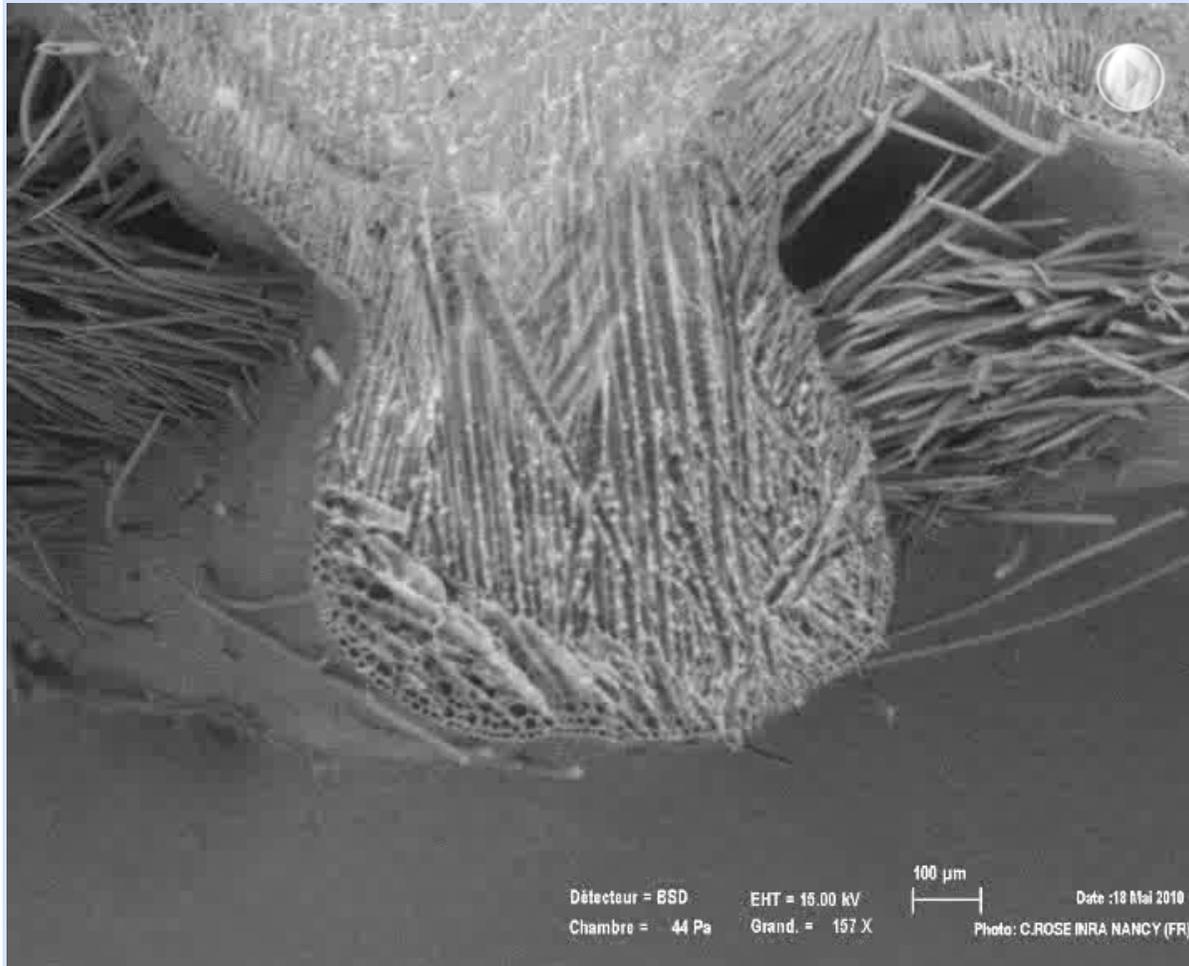


Conditions finales

Pression 50 Pa

Température platine -35°C

Par réchauffement de la platine : sublimation de la glace à la surface d'un pétiole de feuille de charme fracturée.



Pression contrôlée: 40 Pa
Température initiale: -45°C
Température demandée: -20°C

Conclusions mode Pression Contrôlée - Peltier

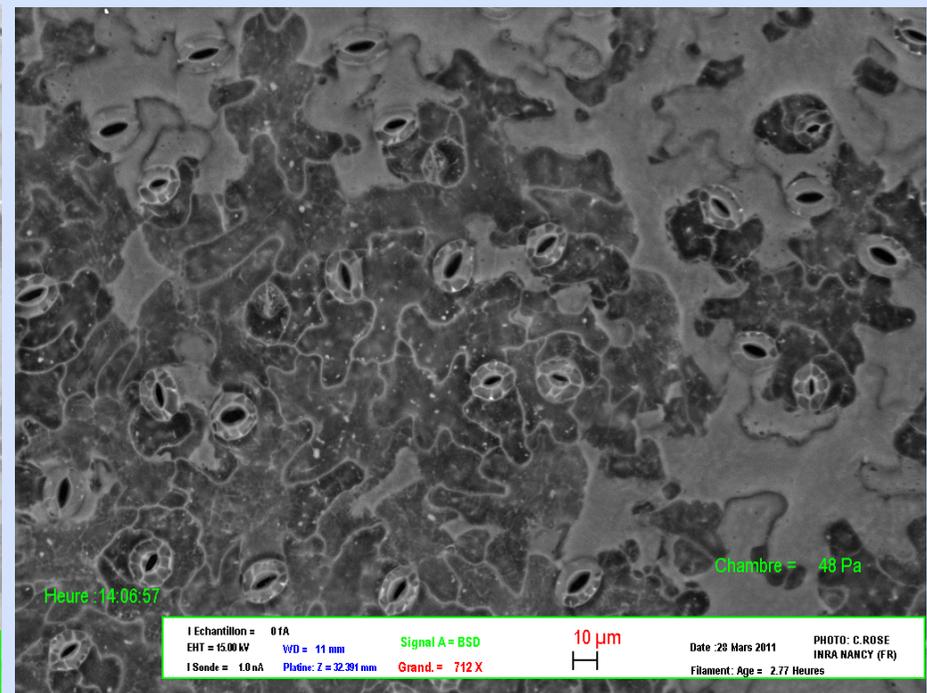
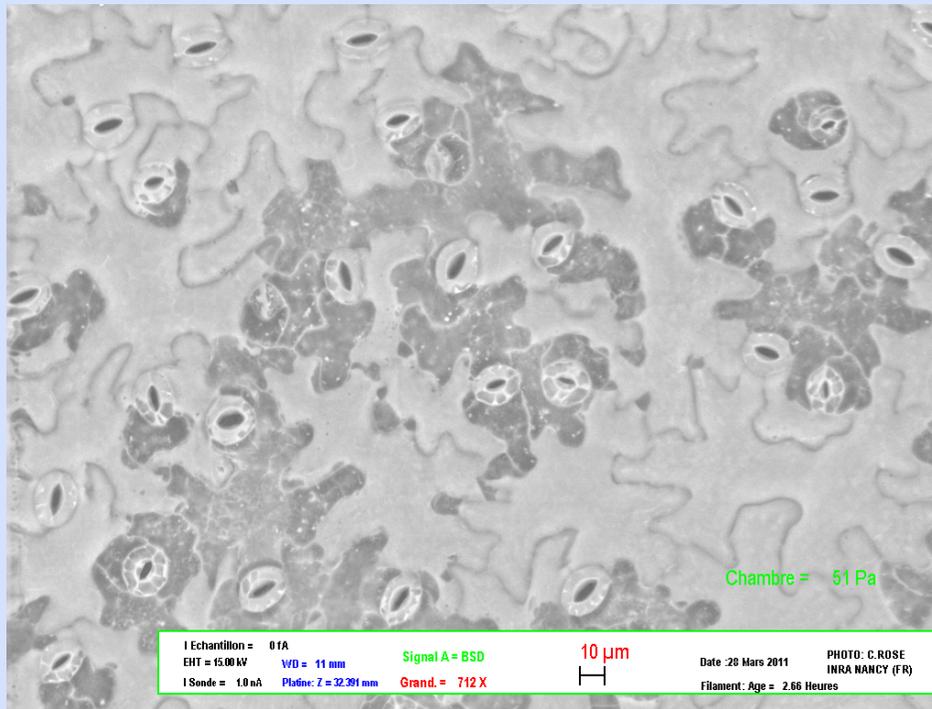
- Bonne résolution pour l'observation longue d'échantillons biologiques maintenus congelés.
 - Gestion du freeze-drying avec de l'expérience grâce à la maîtrise de la pression et surtout la gestion très 'réactive' de la température de la platine Peltier.
 - Pas de métallisation
 - Possibilité de micro-analyse en EDS (attention à l'effet skirt et aux charges)
 - Coût expérimental limité

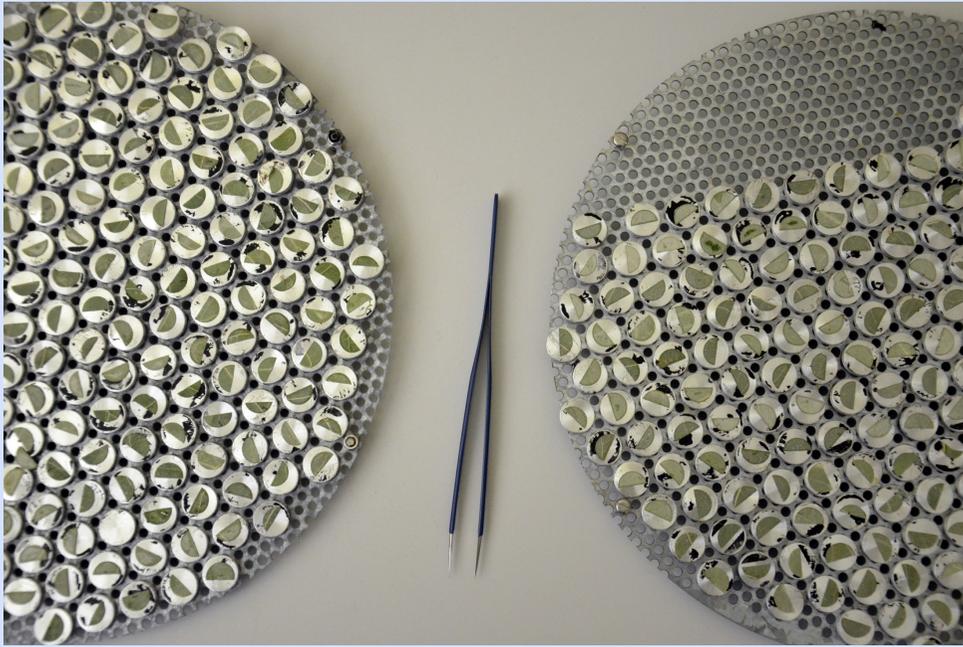
Avancées pour l'observation et l'étude des échantillons biologiques en pression contrôlée:

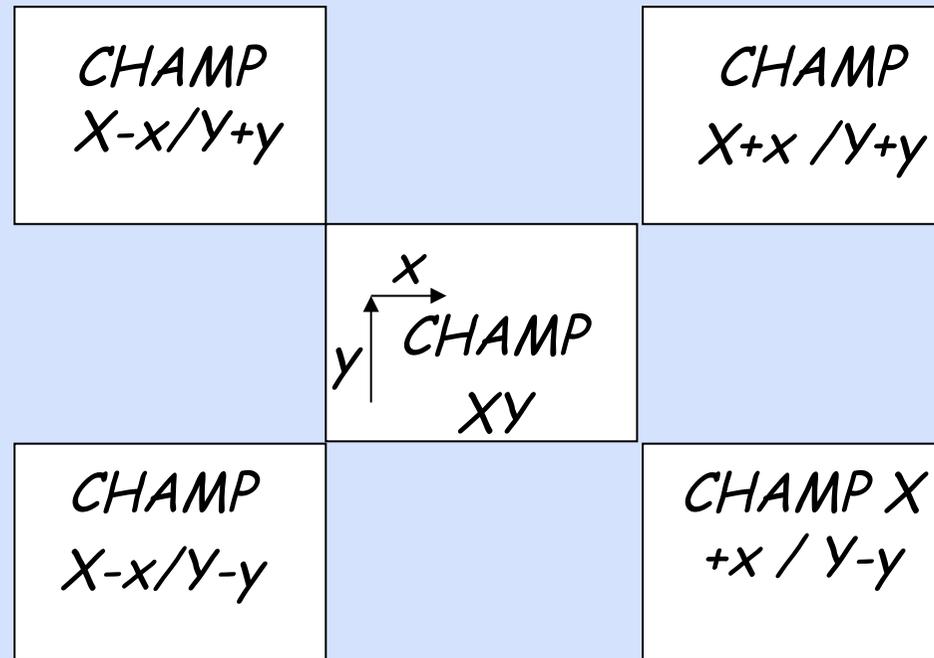
- Le principe d'insertion directe de l'échantillon par le sas -cryo et sur une platine refroidie en pression contrôlée améliore considérablement la conservation des structures cellulaires et les possibilités de l'étude approfondie des échantillons biologiques sans préparation lourde de ceux-ci.

Pourquoi automatiser ?

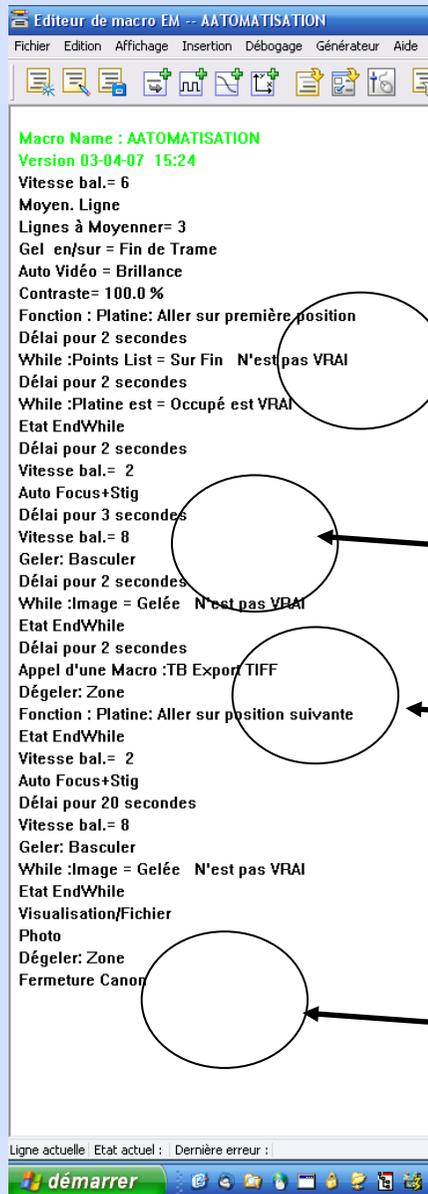
En mode pression contrôlée l'échantillon se déshydrate plus ou moins rapidement







La macro excel calcule les coordonnées des 4 champs jointifs du champ XY initial puis les enregistre dans un fichier final qui est lu par le logiciel du meb



*La macro (mcb) boucle sur la liste finale
calculée par la macro excel*

*Positionnement
Grandissement*

Auto focus

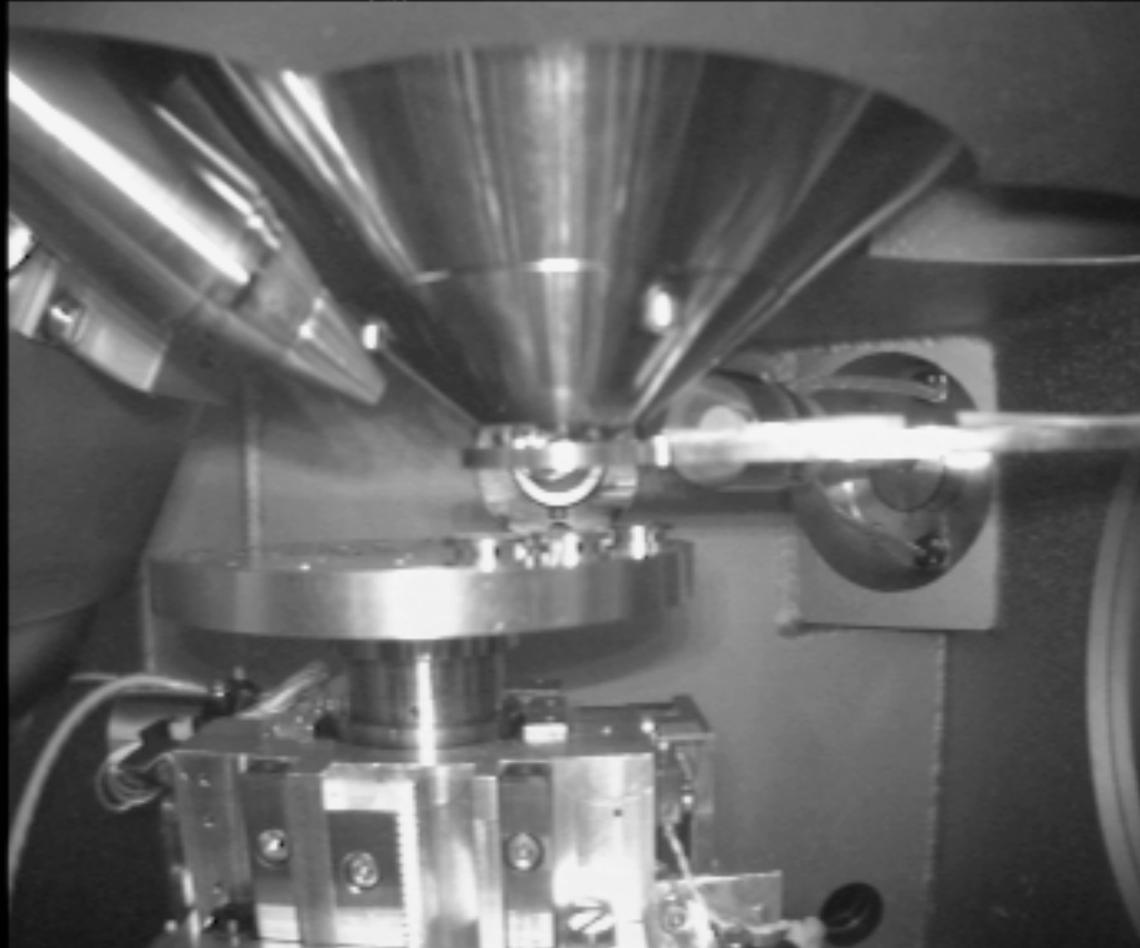
Prise de photo

Enregistrement de la photo

Positionnement

Etc.

Coupure du filament



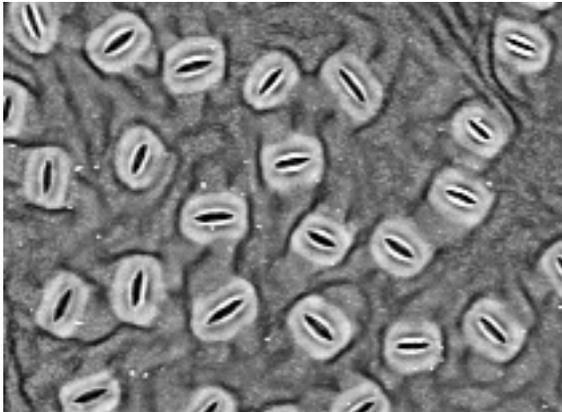
1:Schreiben = 8 NA	Signal A=TV	10 μ m	Date: 7 Nov 2013	PHOTO: C.ROSE
BFI = 20.00 kV	WD = 15 nm	H		BRANANCY (PR)
I:Scand = 1.8 nA	Probe: C=20.313 nm	Grand. = 500 X	Element: Arg = 1.53 Hertz	

Détection automatique d'objets et estimation de la densité stomatique

Silvère Vialet-Chabrand

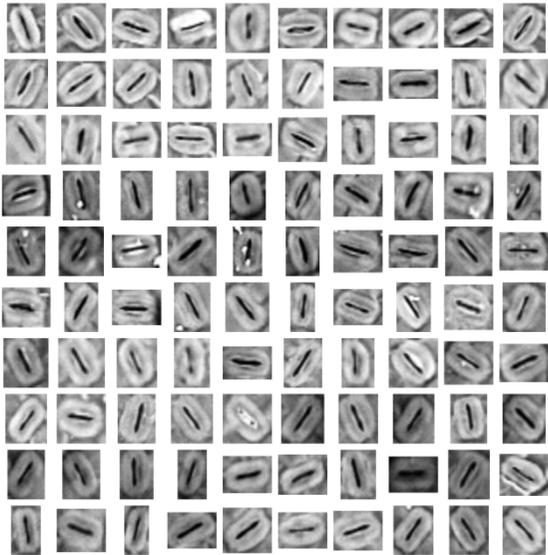
Oliver Brendel

Méthodes d'estimation de la densité stomatique



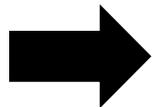
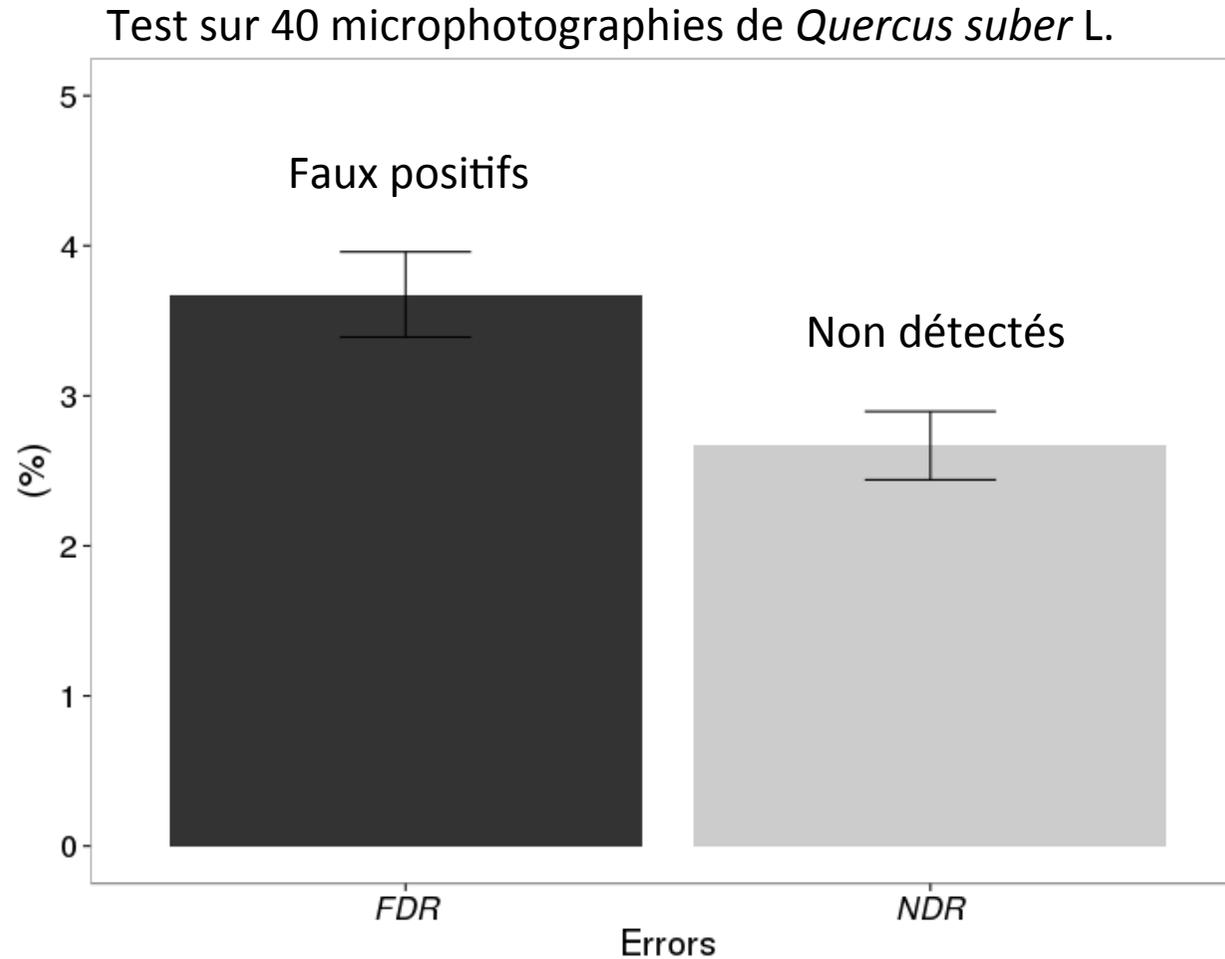
➔ couteux en temps

Comment compter rapidement les stomates ?



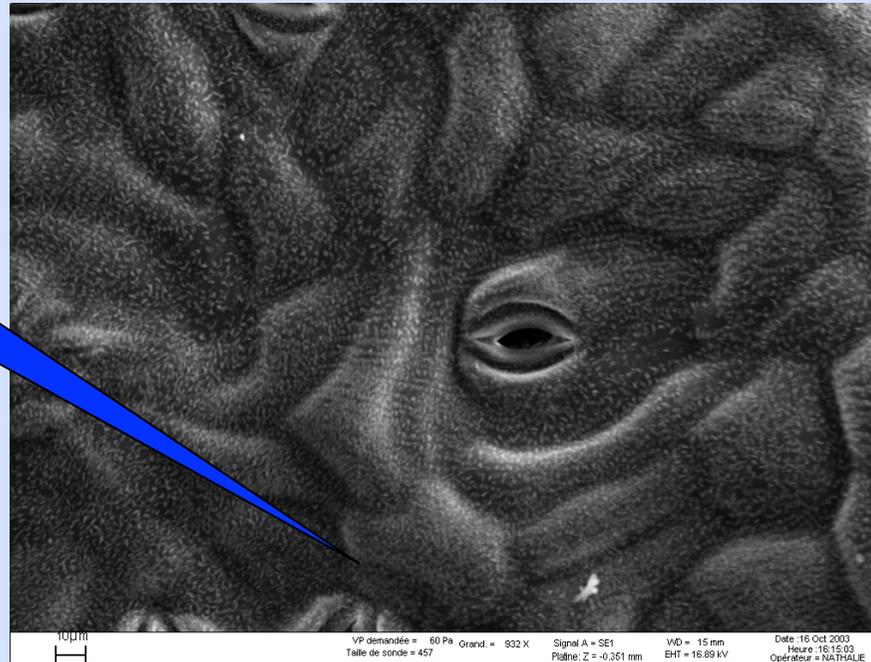


Performance de détection des stomates



Généralisable à d'autres espèces avec des stomates de forme similaire.

*Merci pour votre
attention*



↪ Photos : *JC Ménard, Bertrand Van de Moortele, Christophe Rose
Nathalie Ningre, Zeiss, FEI, JEOL*

