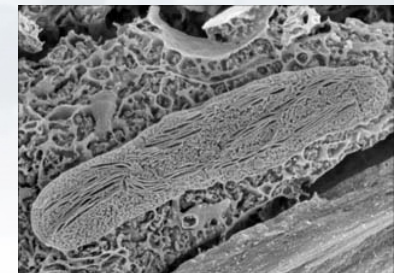
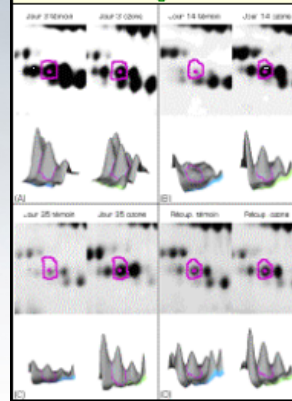
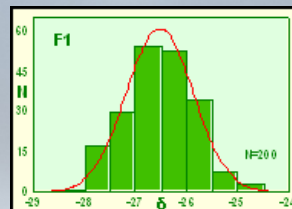
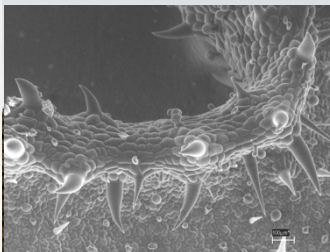
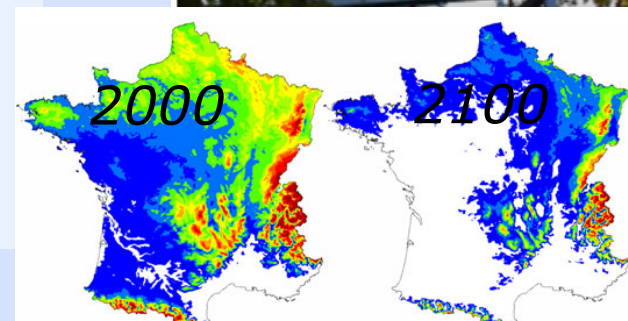


## *Microscopie électronique à balayage à pression contrôlée - couplage cryo - traitement d'image*

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



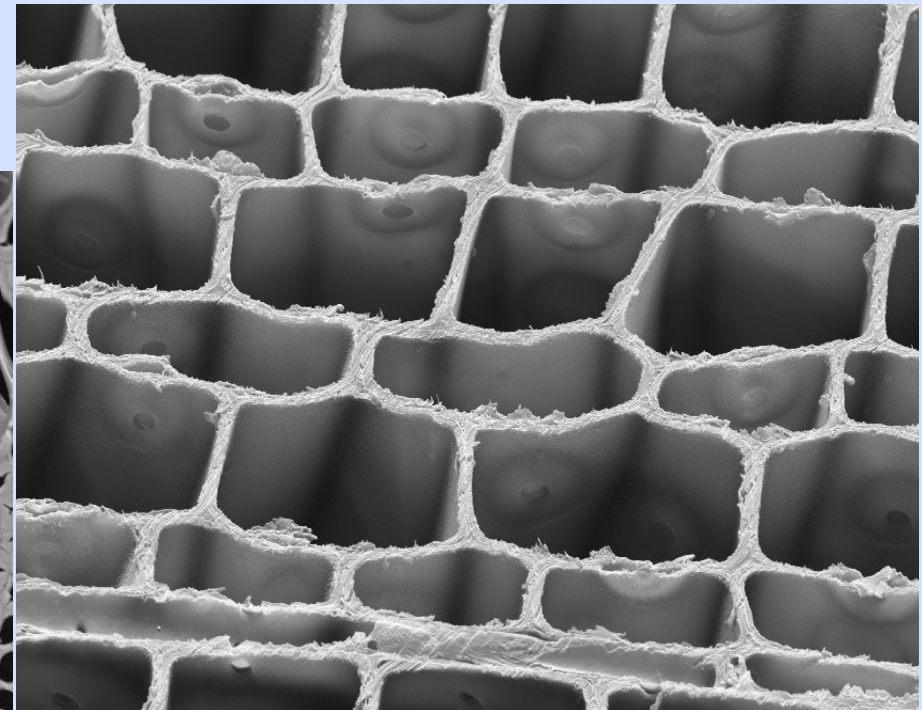
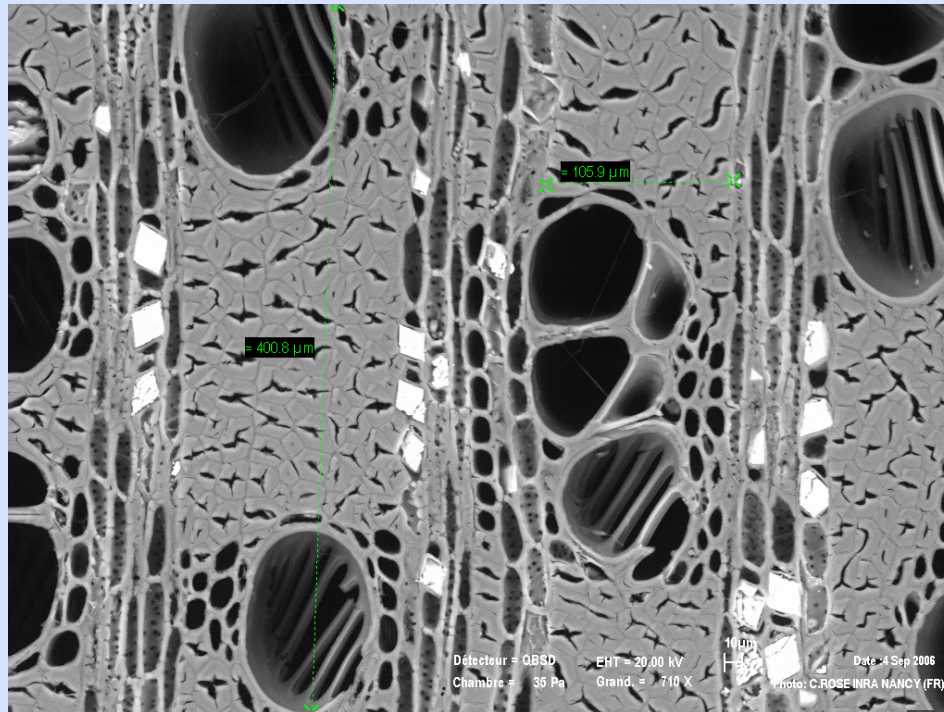
# Trois grandes thématiques de recherche dans l'UMR EEF



- **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 CO<sub>2</sub>,...
- **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 :

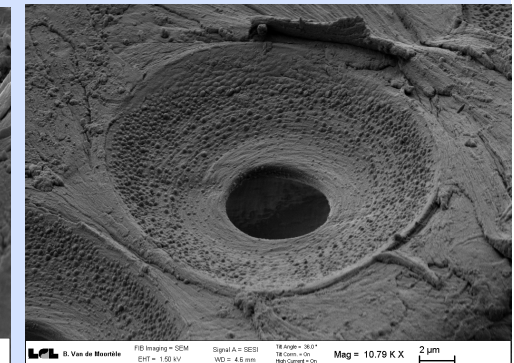
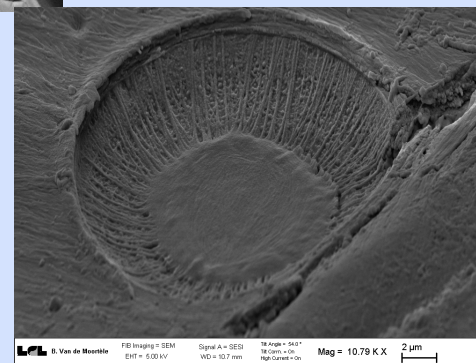
- bois



FEG

*tungstène*

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

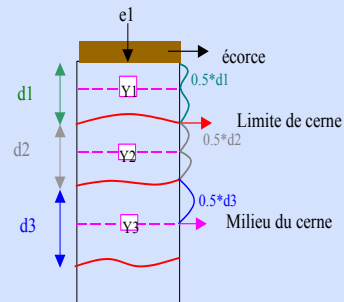
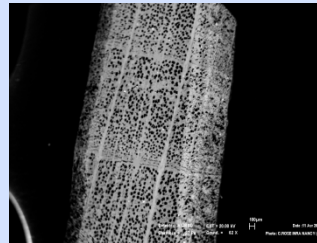


# Microanalyse sur bois

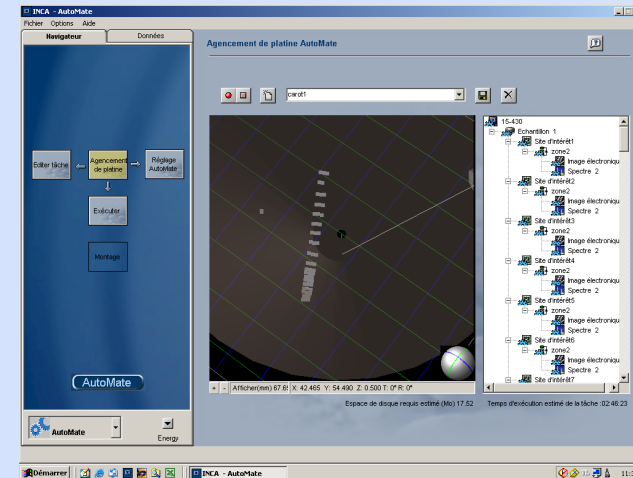
## DENDROCHIMIE DES CERNES ANNUELS D'ACCROISSEMENT



**CAROTAGE**

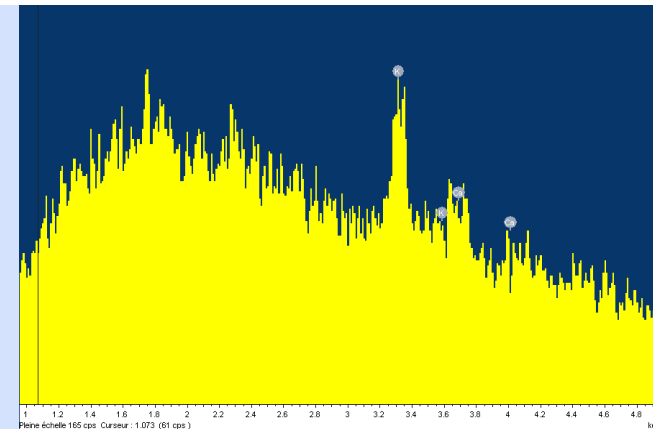


**DETERMINATION DES ZONES D'ANALYSES (cernes)**



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

## PLANAGE SURFACAGE

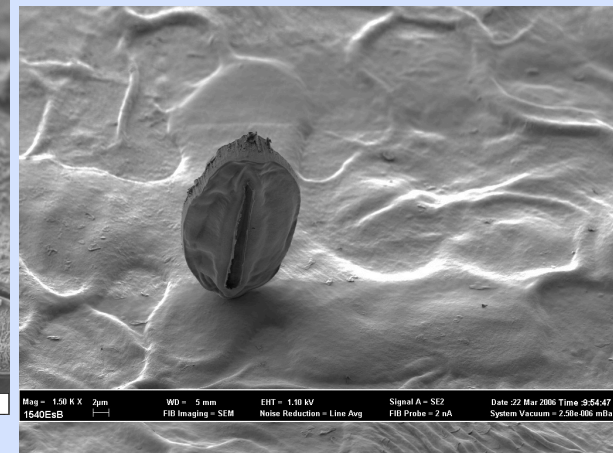
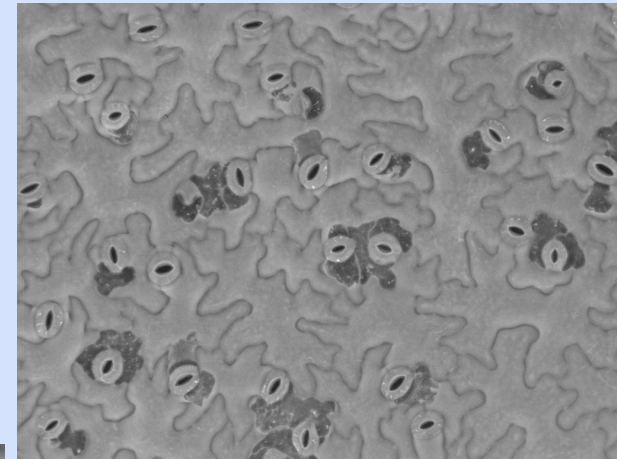
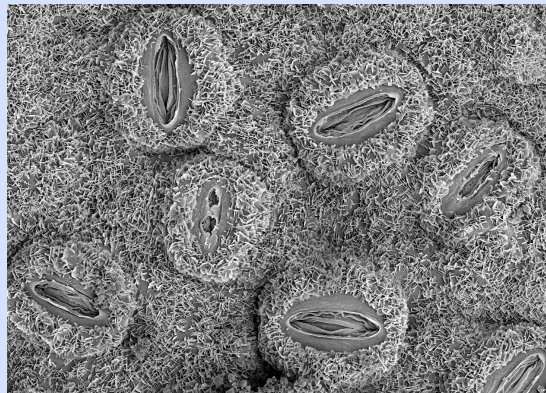
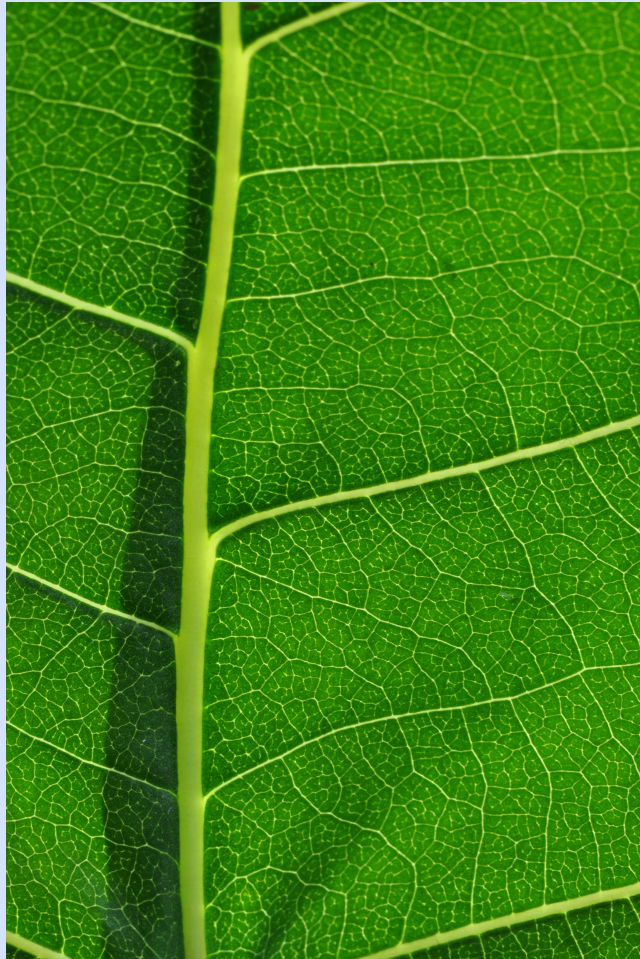


## 2 grands types de structures cellulaires sont observés :

- **feuille**

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

*tungstène*

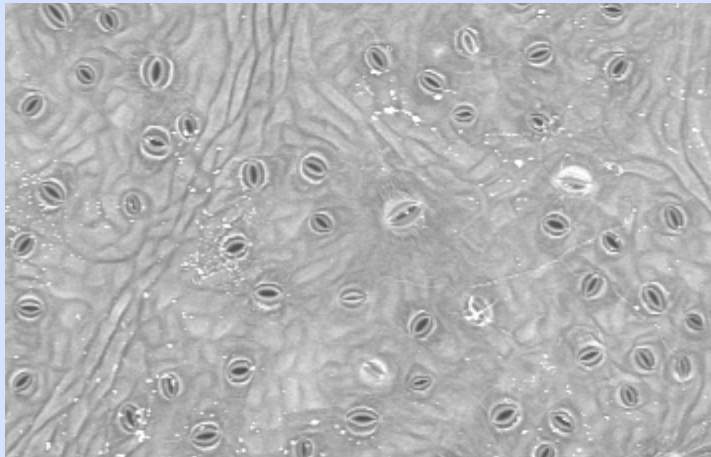


**Stomates de feuille de peuplier  
(cryo, vide secondaire,  
tungstène)**

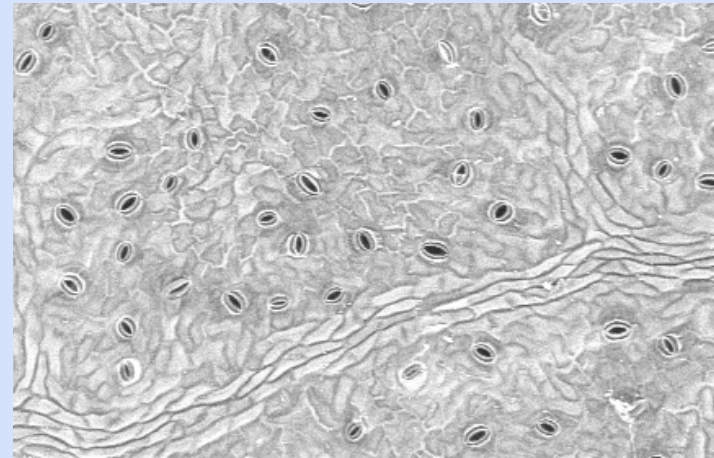
*FIB*

## Diversité fonctionnelle et adaptation

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



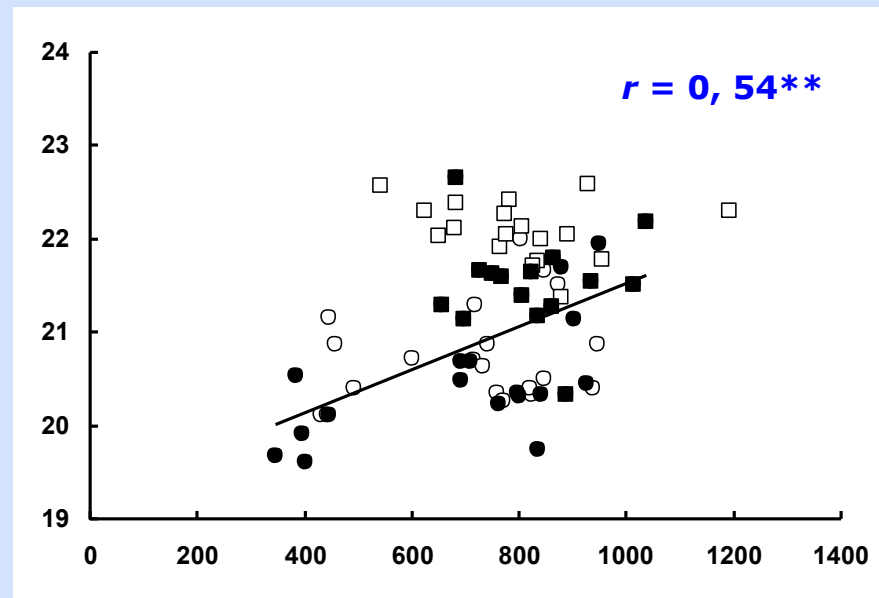
Peuplier I45-51 (abaxiale)



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.

$\Delta$  (‰)



Densité stomatique (nb sto/mm<sup>-2</sup>)

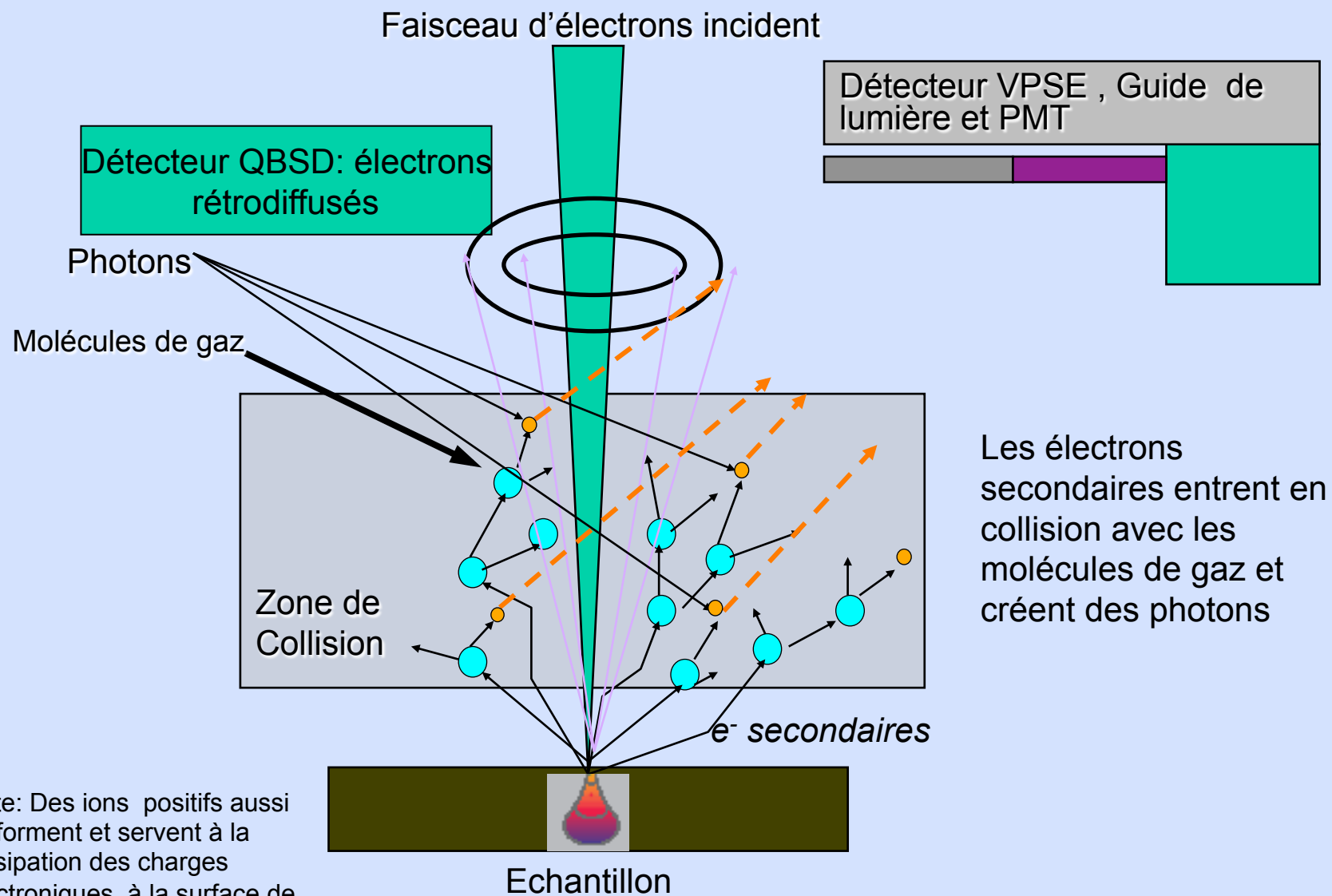
## ↪ quelques problèmes

- *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... )

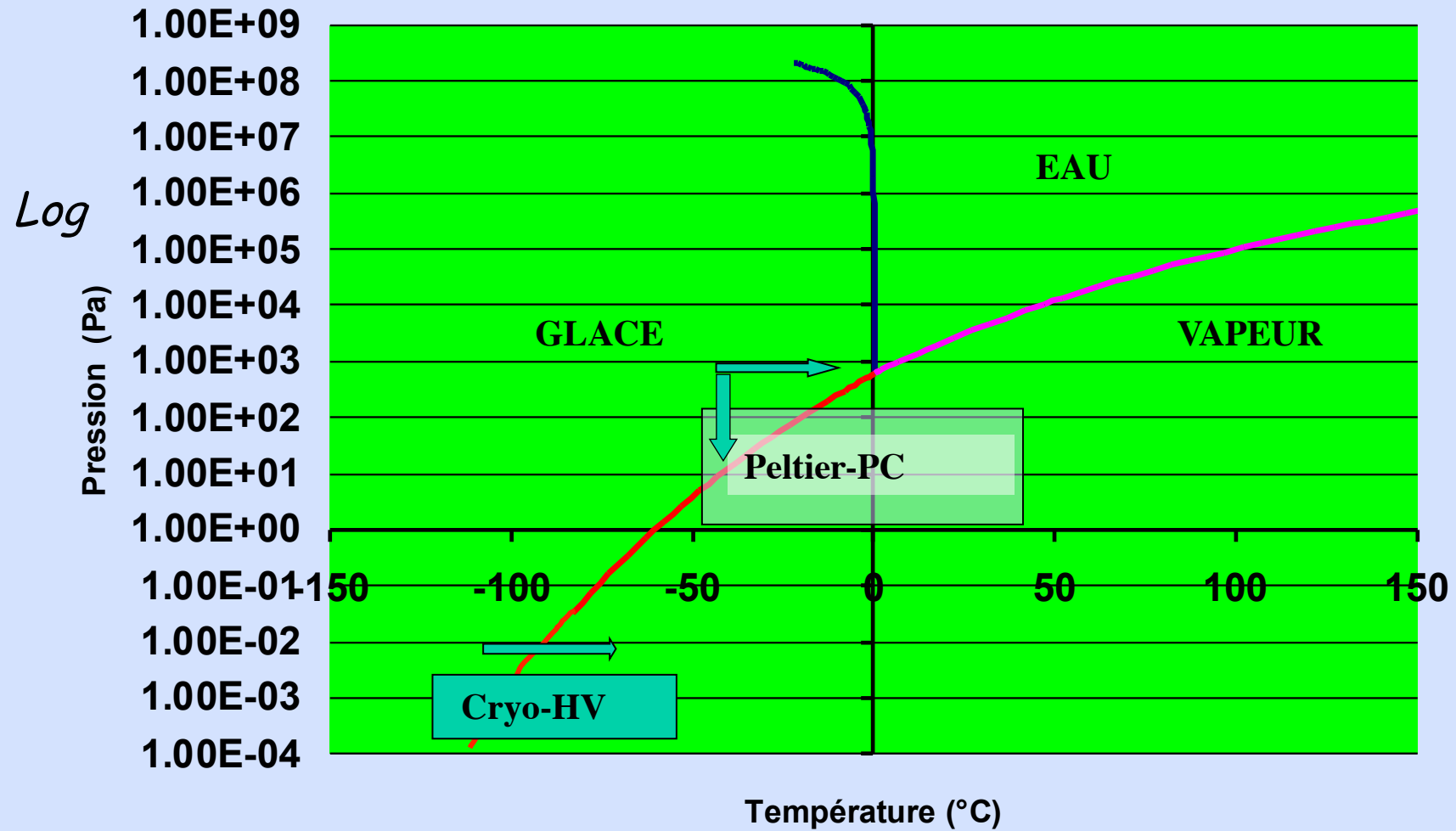
- *Echantillon :*

- 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

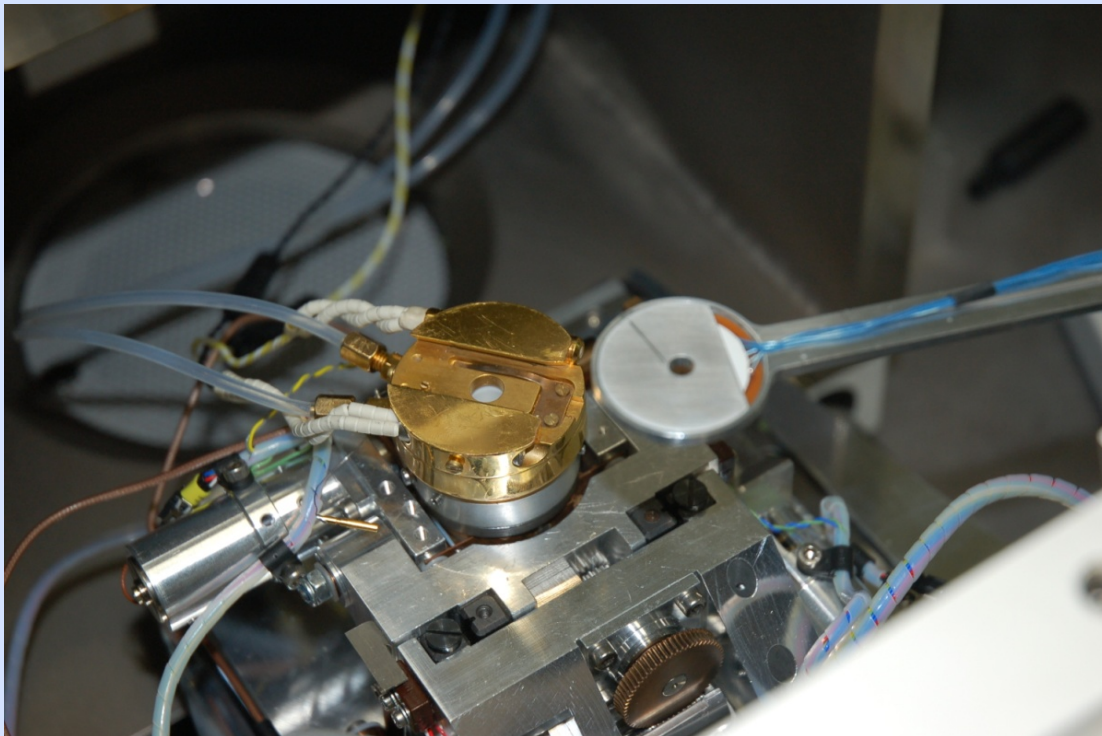
## Pression et température : paramètres physiques ajustables



## *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):

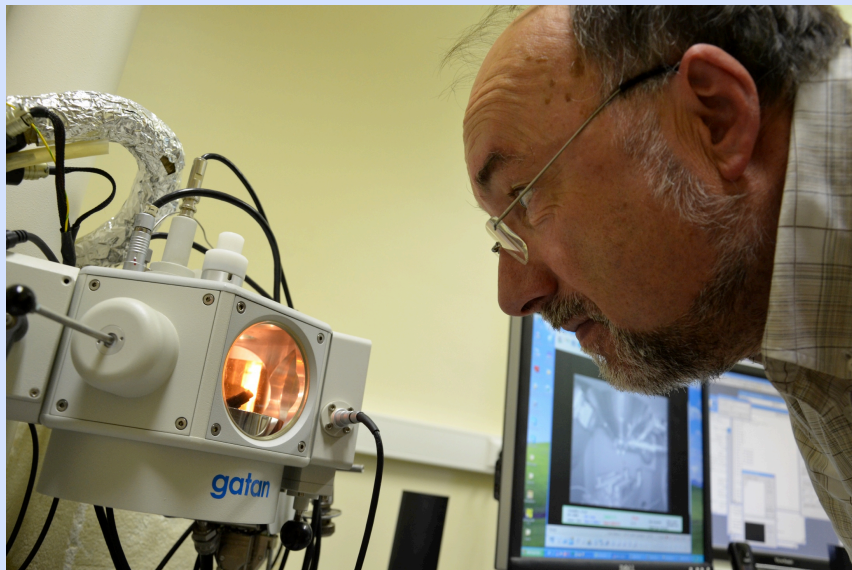
- conservation des structures cellulaires et visualisation des structures internes
- limitation des altérations dues à l'intensité du faisceau



## *Le sas de cryo-transfert*

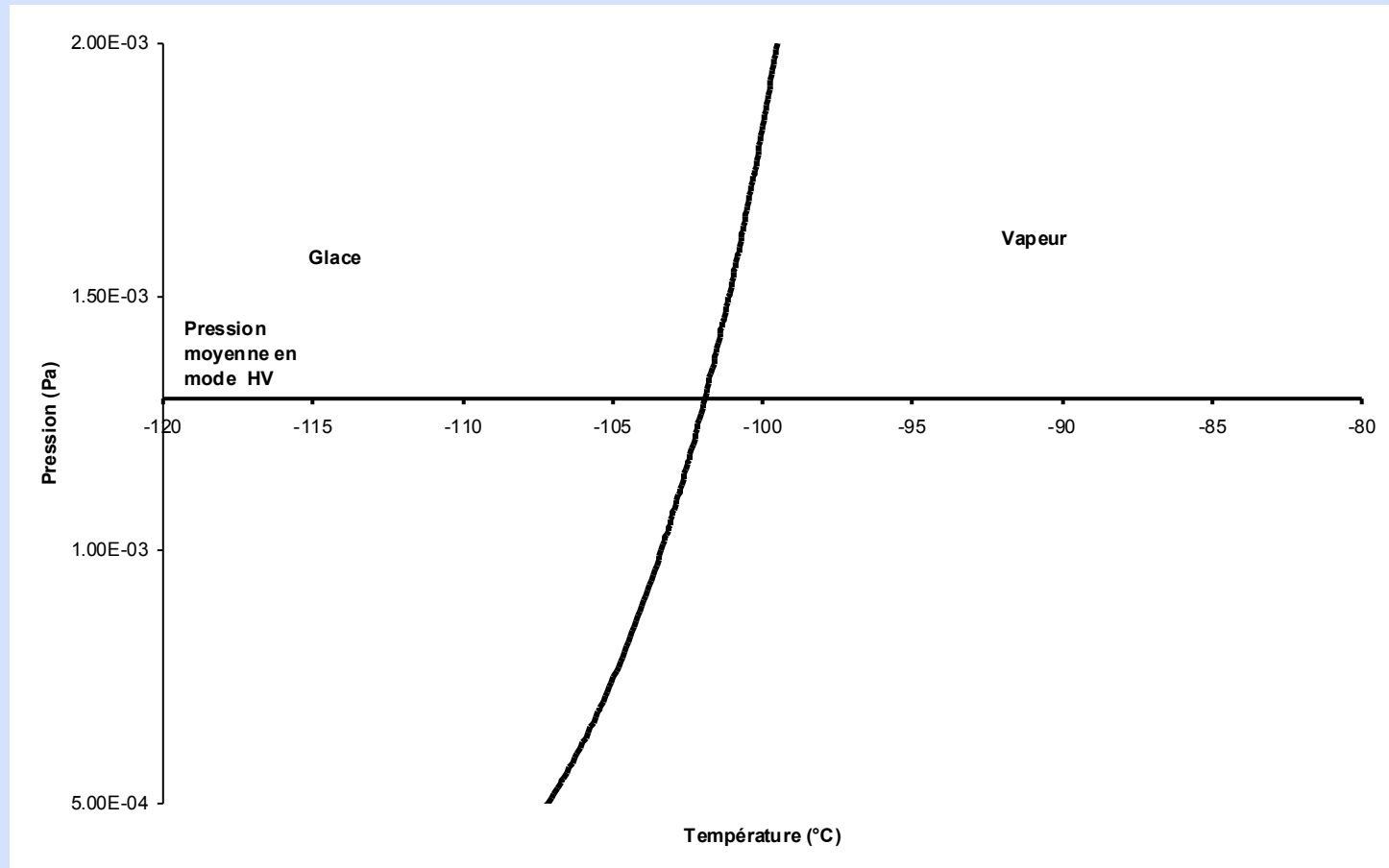


## *La chambre de préparation*



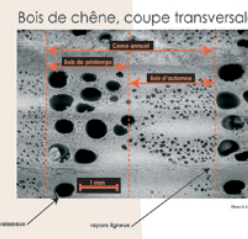
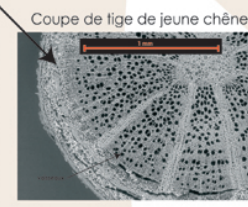
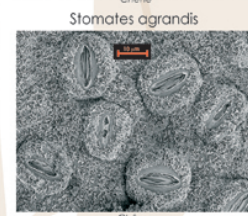
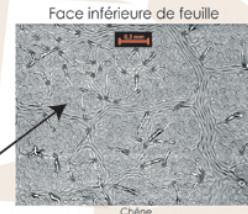
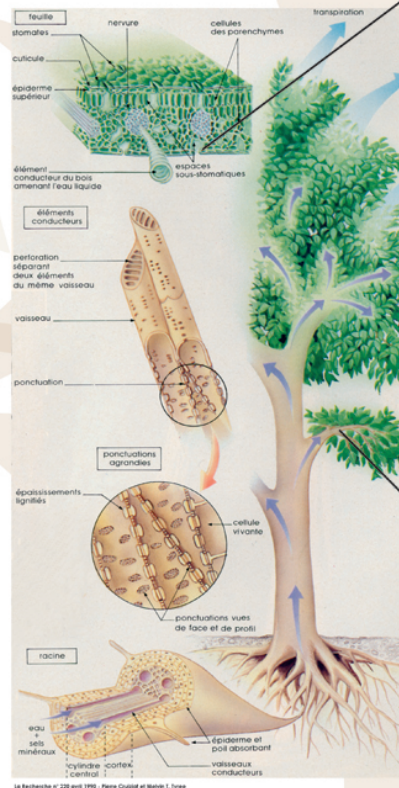
## Observations en vide secondaire et avec la platine cryogénique

**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



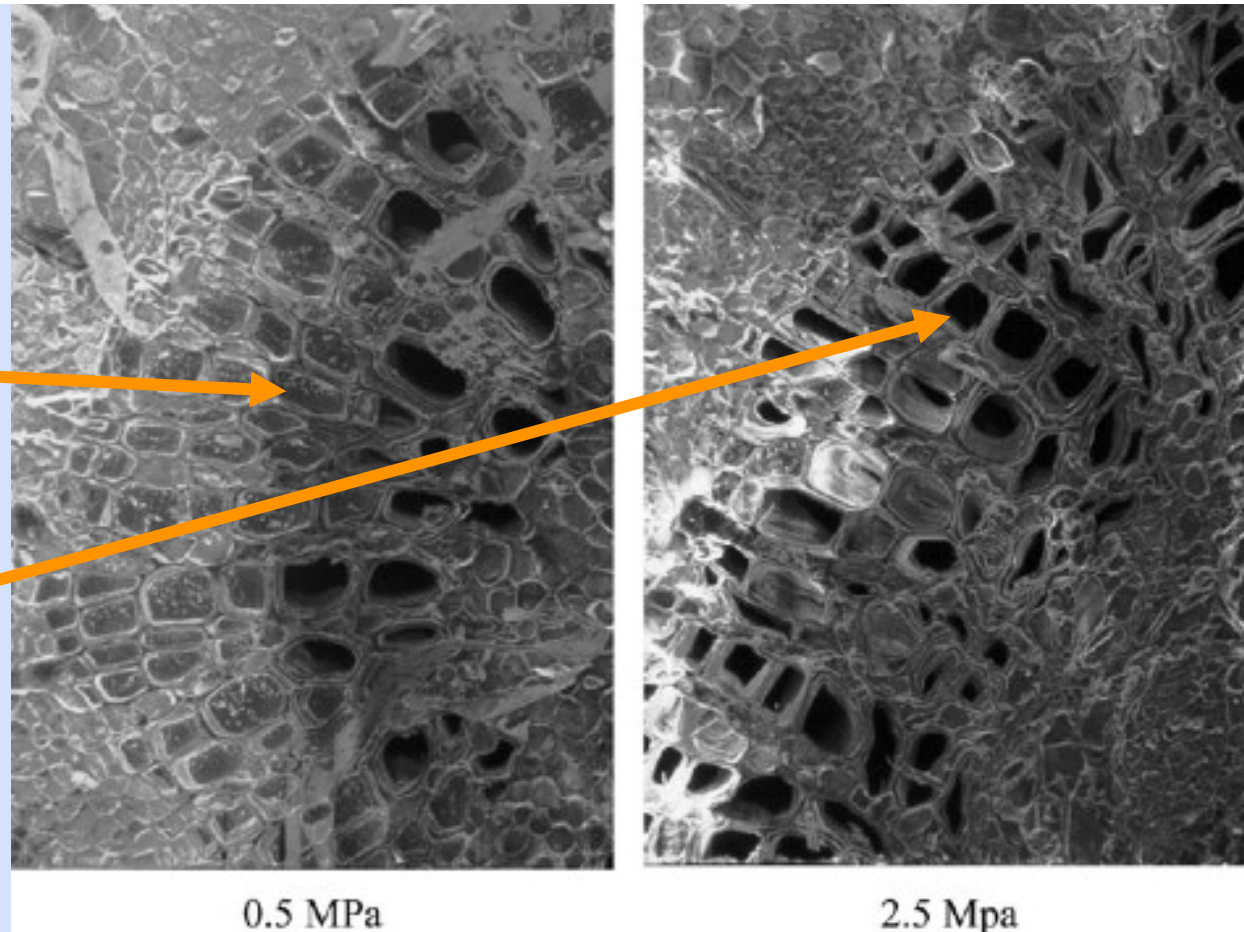
## ***Vulnérabilité à la cavitation chez le peuplier en cas de sécheresse Visualisation de l'embolie vasculaire sur échantillon de petite taille***

- 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*

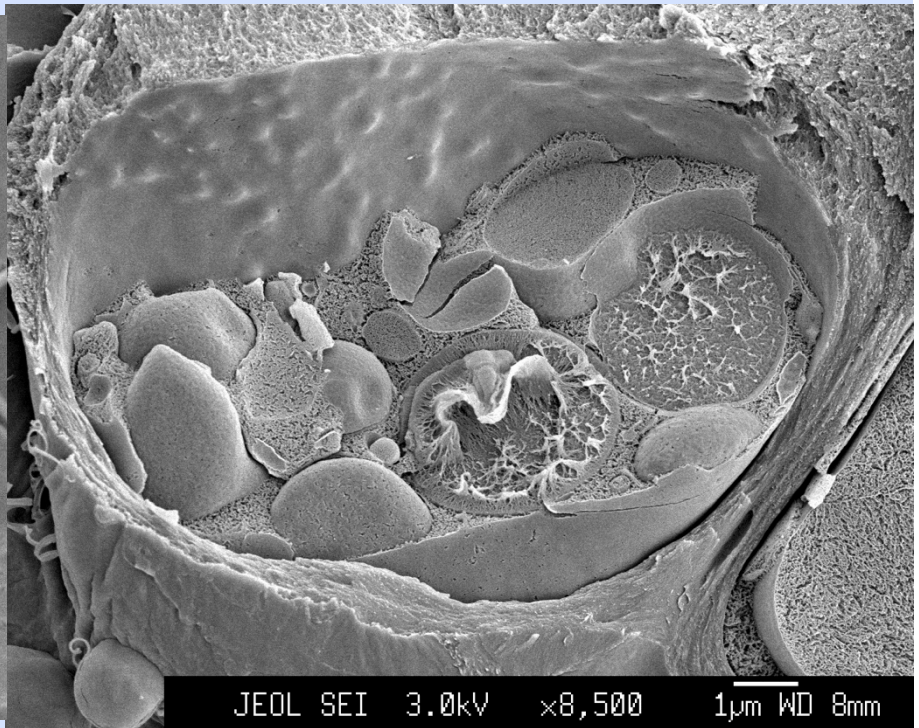
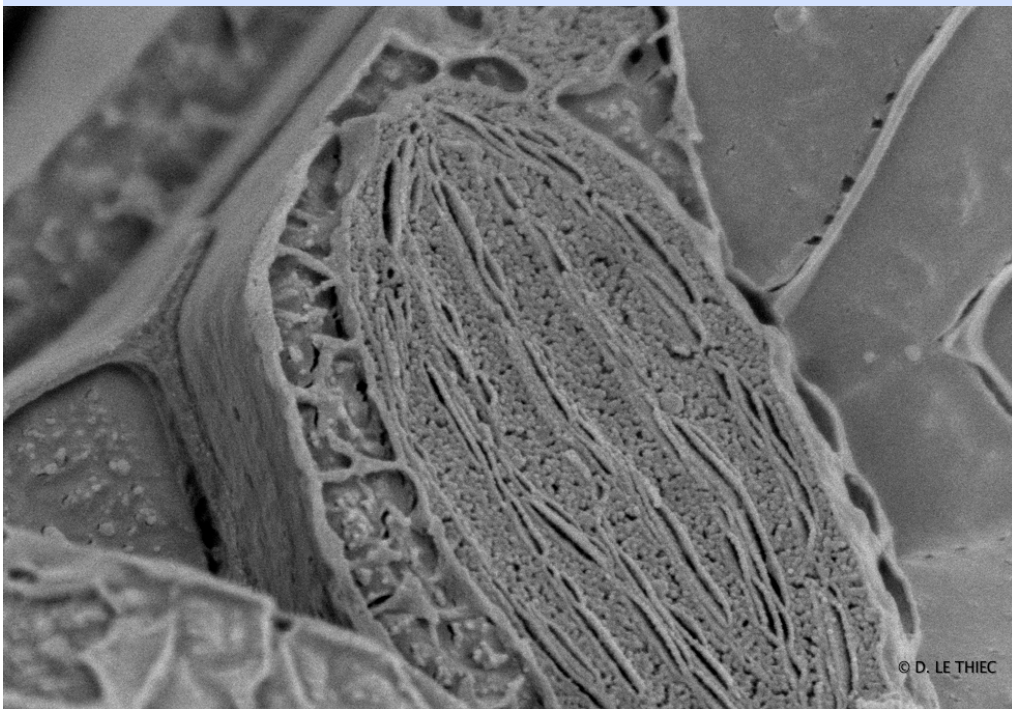
*vaisseau embolisé*



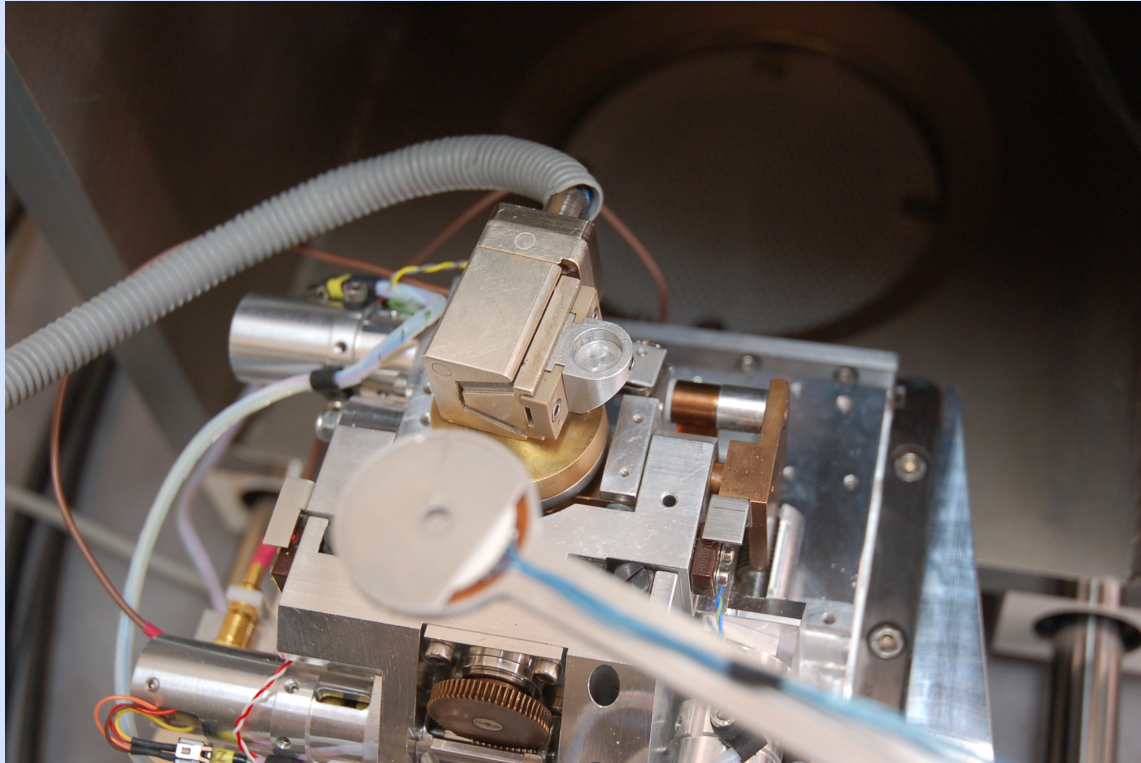
## Conclusions mode conventionnel et platine cryogénique

- ✓ **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*

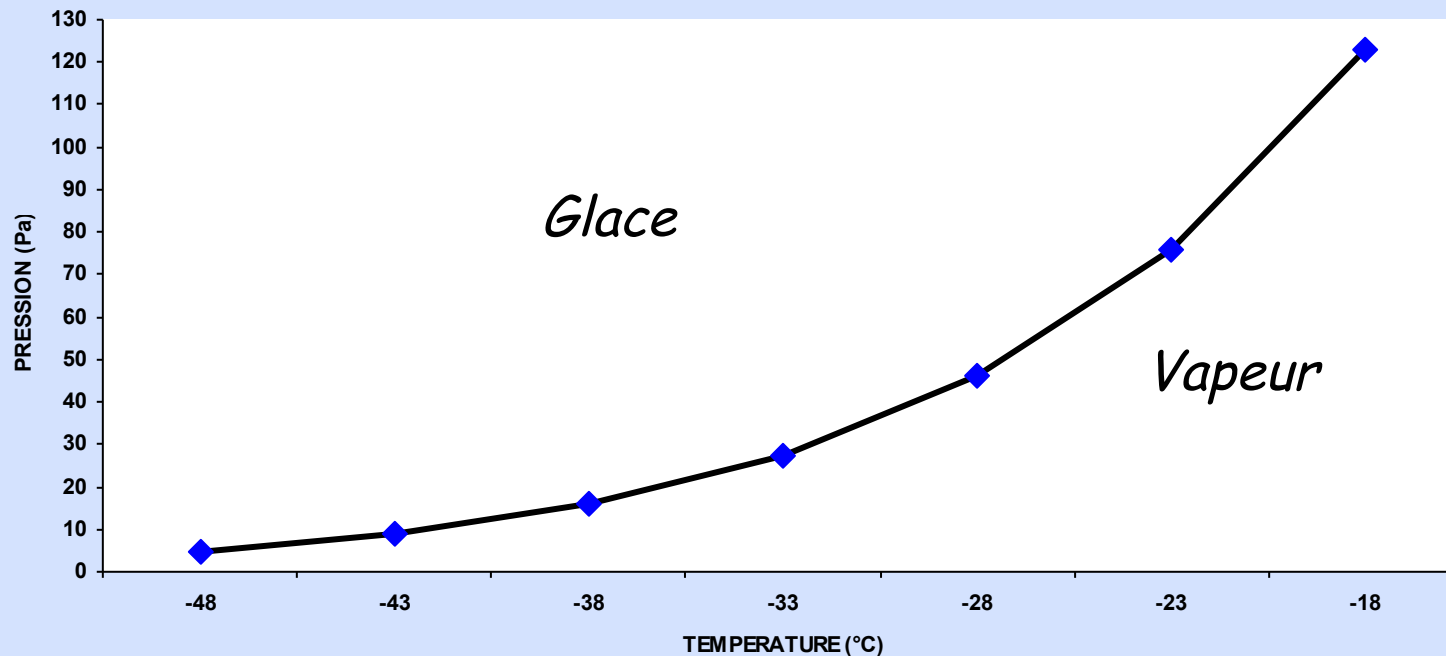


L'utilisation dans la chambre d'un porte échantillon à effet Peltier ( $-50^{\circ}\text{C}/+50^{\circ}\text{C}$ ) réduit considérablement la déshydratation des échantillons en mode pression contrôlée.

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*

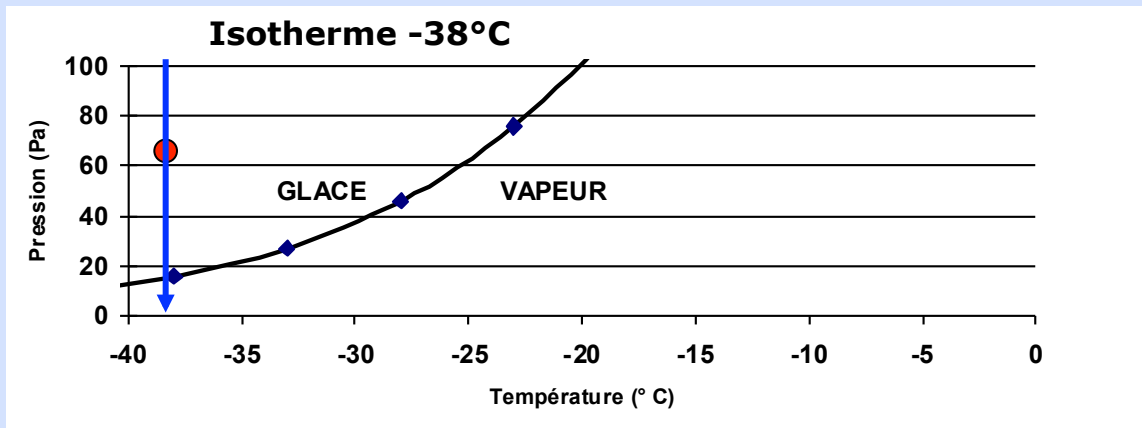
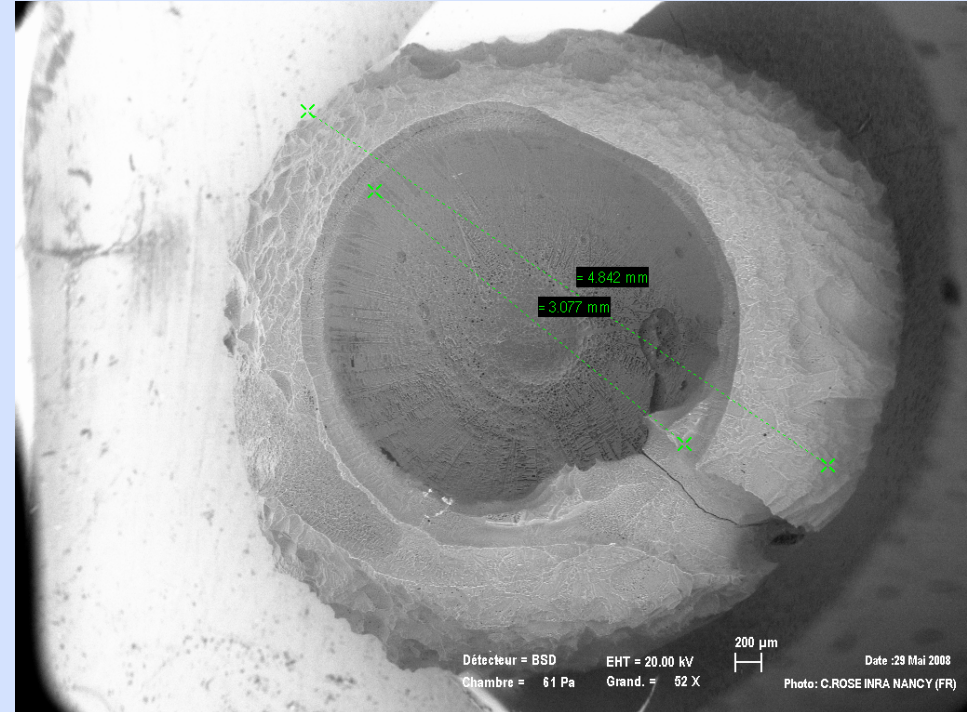
**Pression** variable ajustable dans la chambre (10-400 Pa) .  
**Température** de la platine ajustable (-50° C; +50° C).  
Régulation de la **température** de l'échantillon.



*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

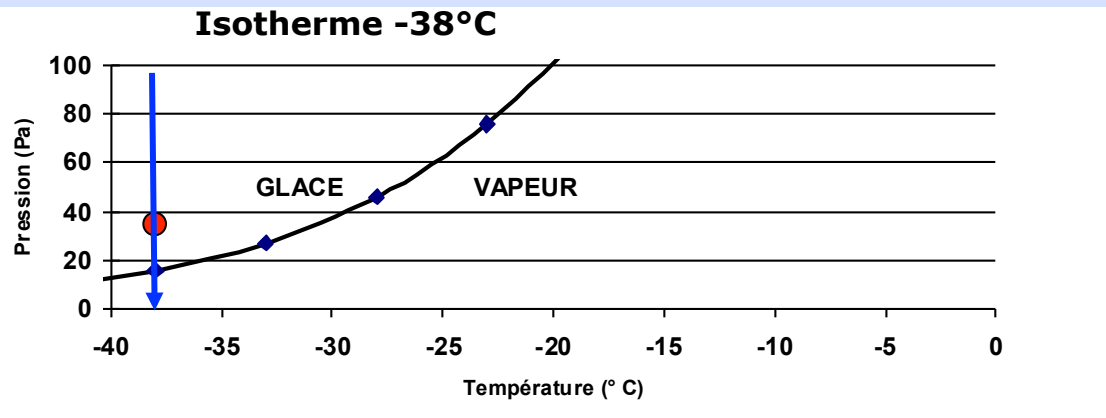
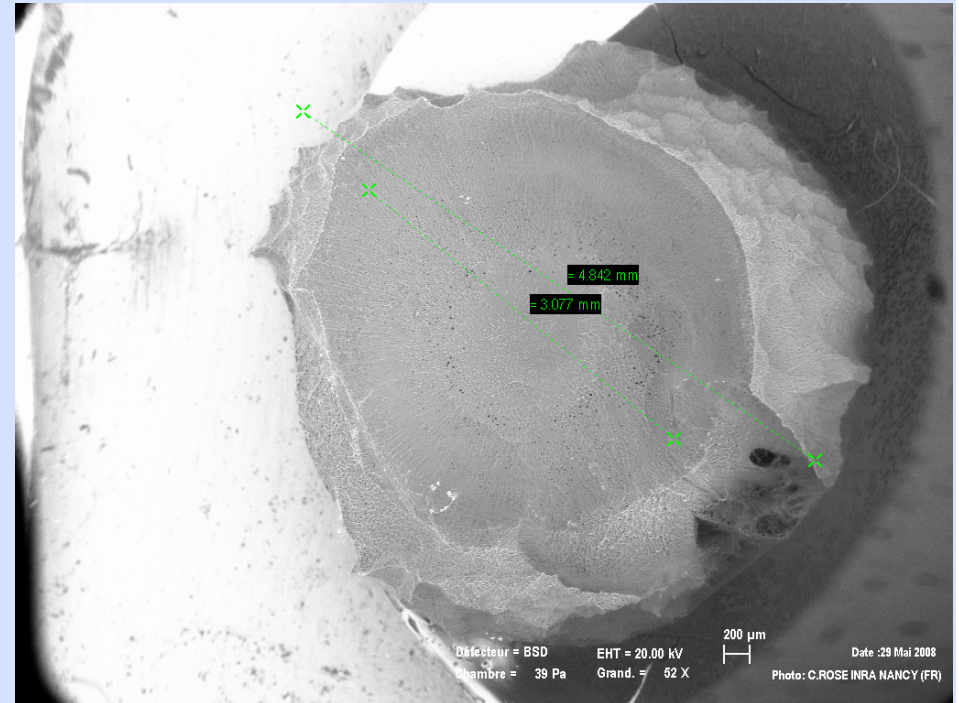


Conditions initiales  
Pression 61 Pa  
Température -38°C

# 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

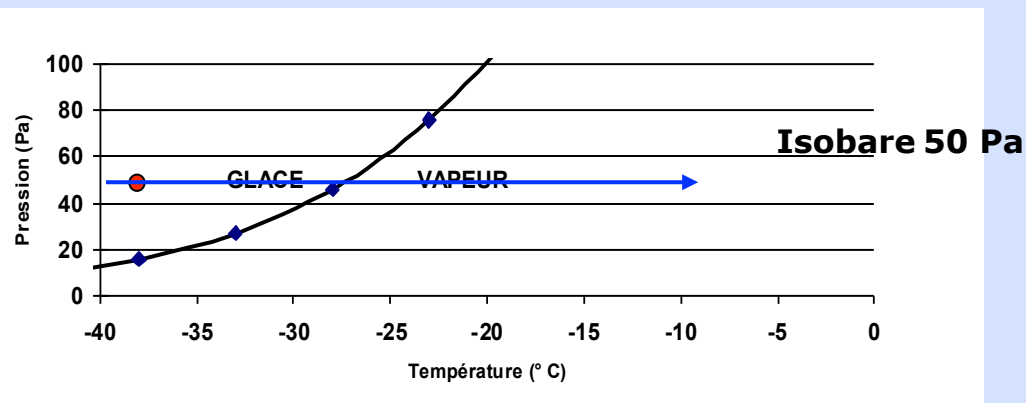
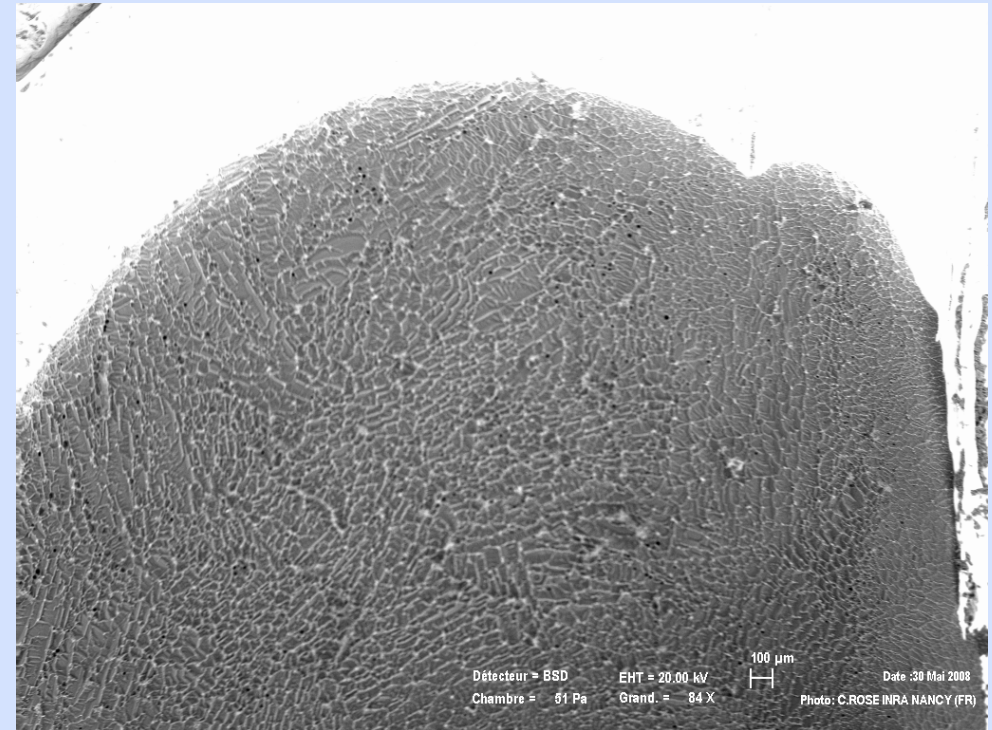
Delta pression : 20 Pa  
Balayage faisceau permanent (20 KV; 800 pA)  
Temps d'exposition : 6 min



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**

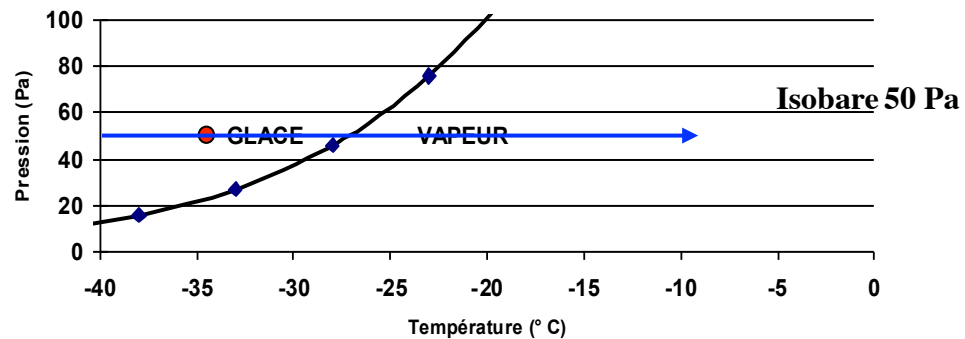
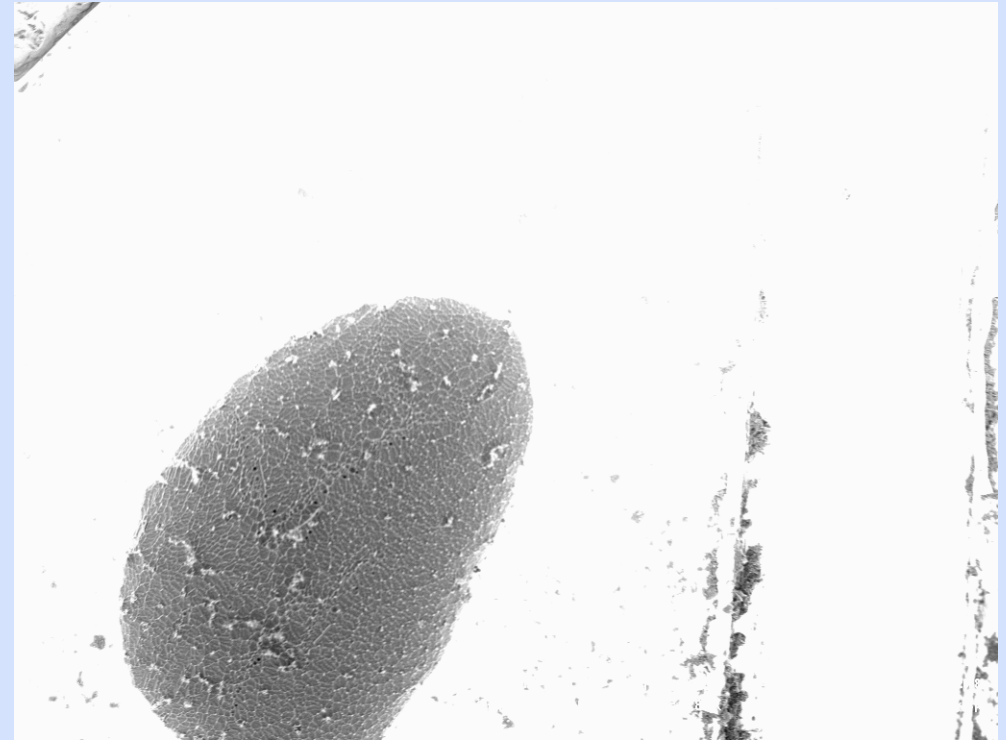
## Observations en vide contrôlé et avec la platine Peltier

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

Delta température:  $3^{\circ}\text{C}$

Balayage faisceau permanent (20Kv; 800pA)

Temps d'exposition : 6 min

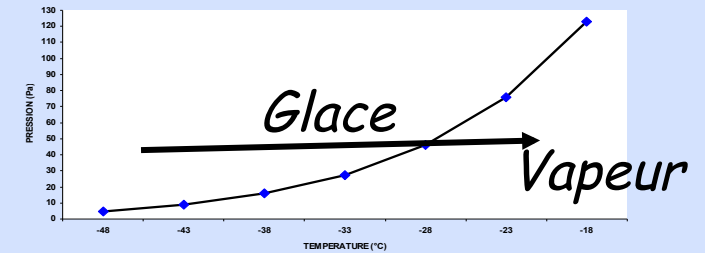
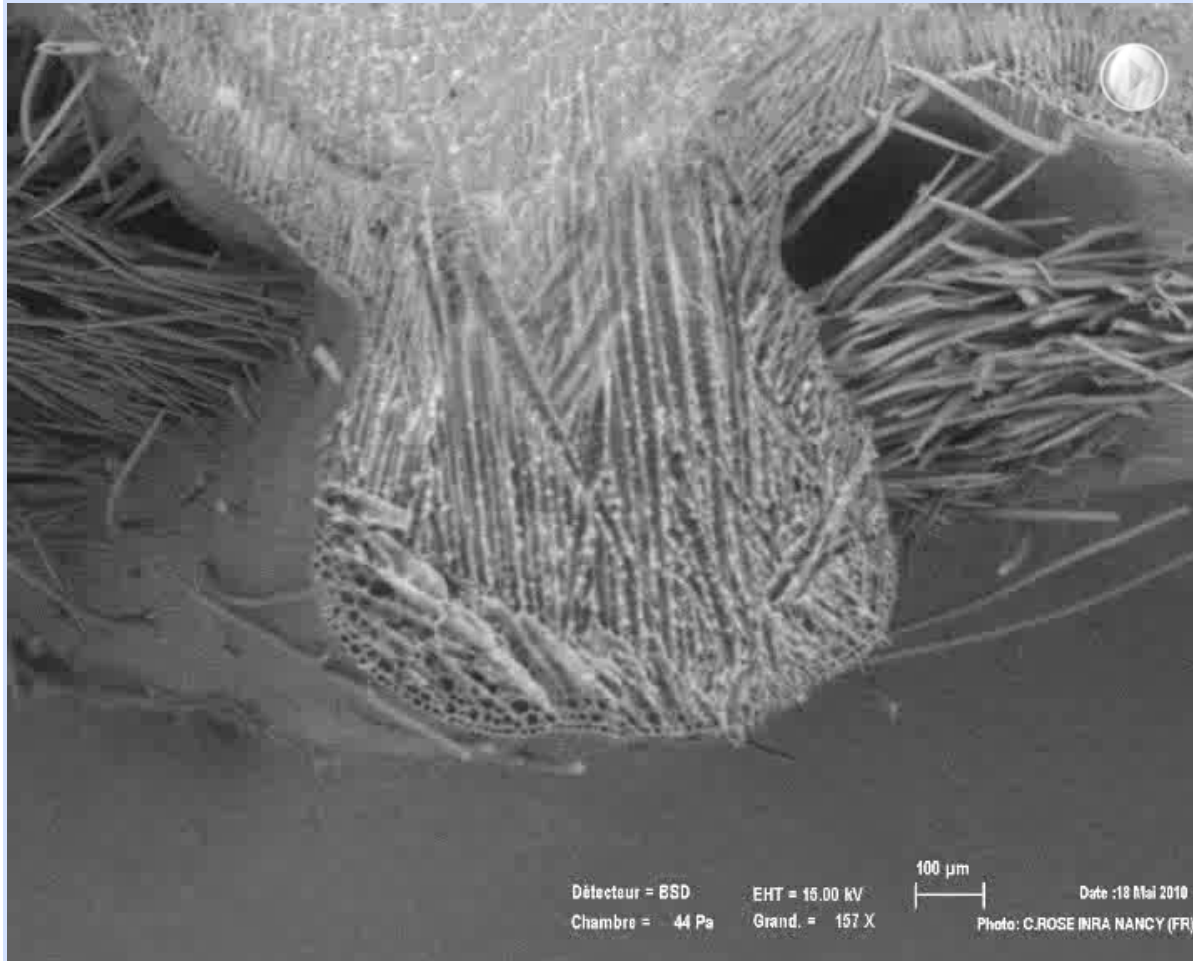


Conditions finales

Pression 50 Pa

Température platine  $-35^{\circ}\text{C}$

**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

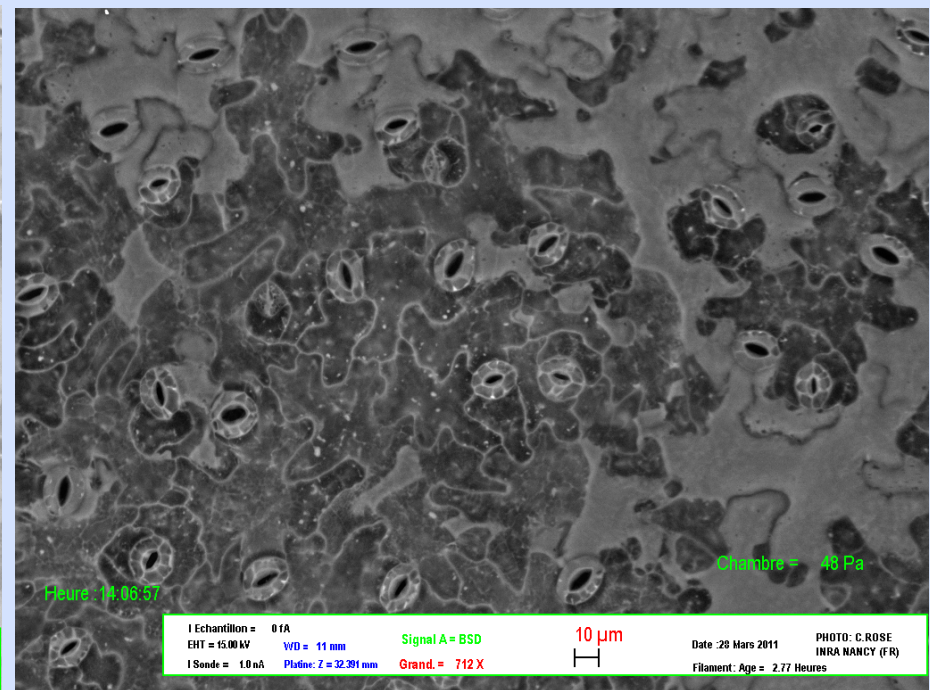
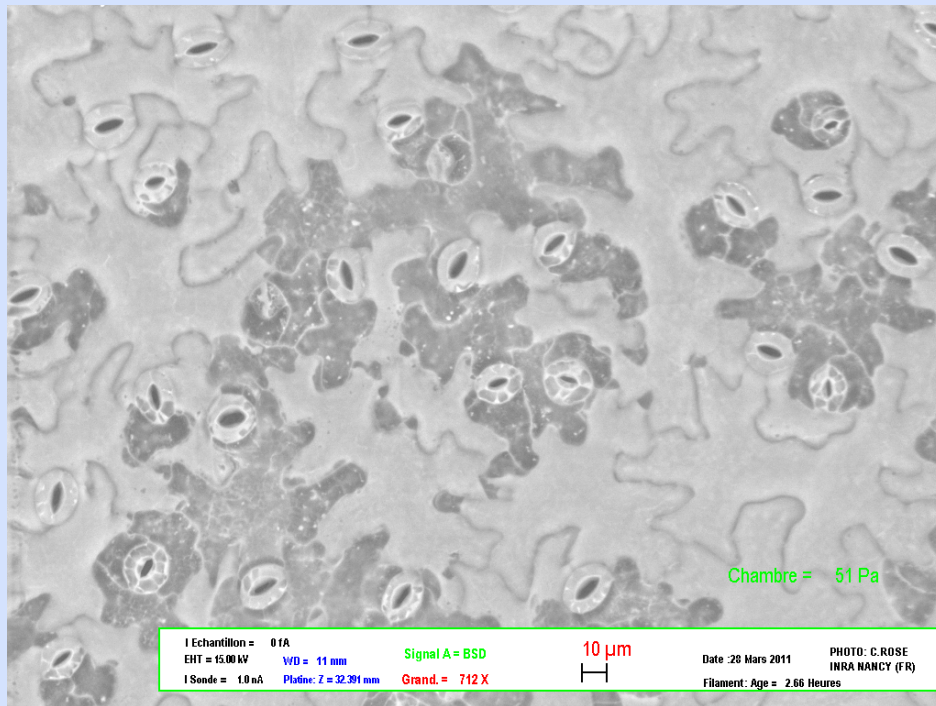
- Bonne résolution pour l'observation longue d'échantillons biologiques maintenus congelés.
  - Gestion du freeze-drying avec de l'expérience grâce à la maîtrise de la pression et surtout la gestion très 'réactive' de la température de la platine Peltier.
  - Pas de métallisation
  - Possibilité de micro-analyse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

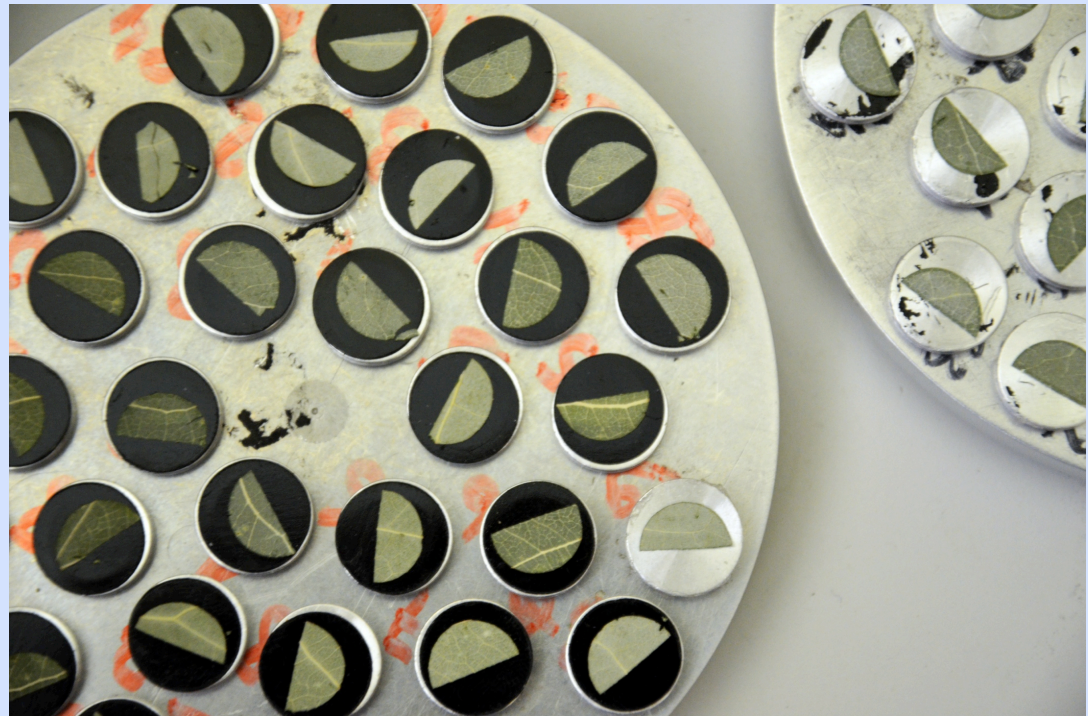
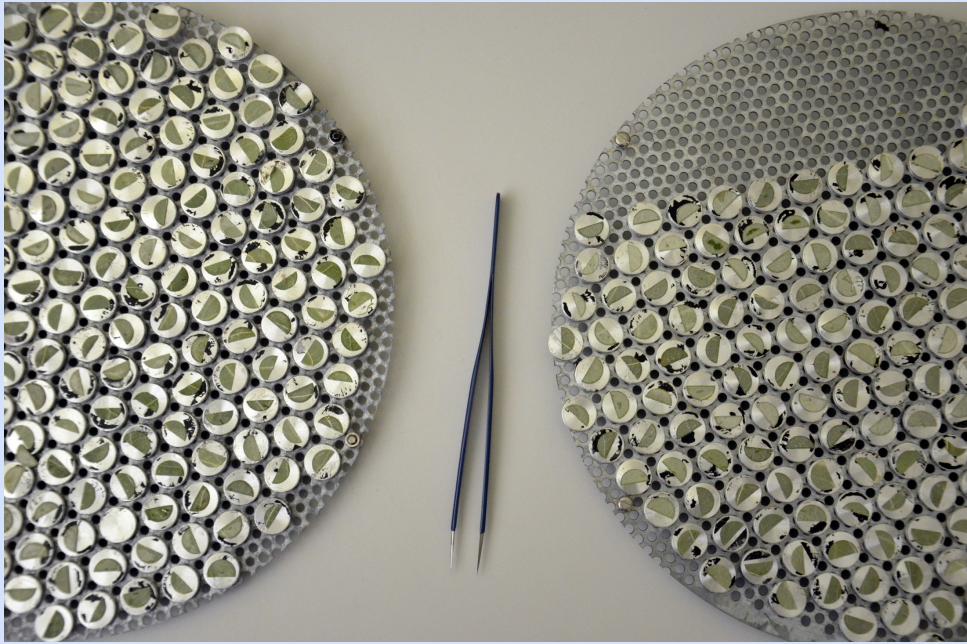
### Avancées pour l'observation et l'étude des échantillons biologiques en pression contrôlée:

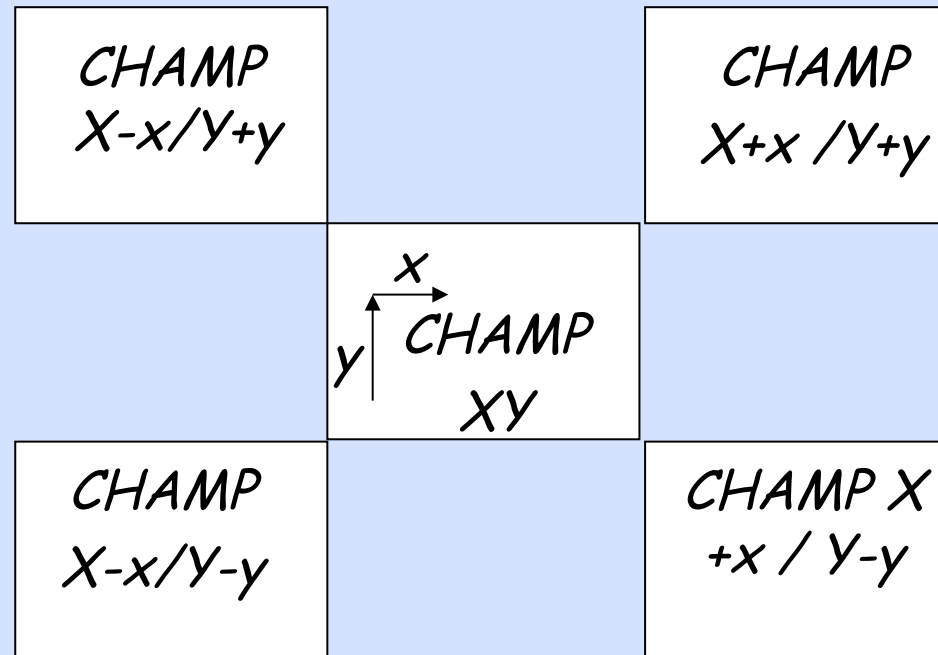
- Le principe d'insertion directe de l'échantillon par le sas -cryo et sur une platine refroidie en pression contrôlée améliore considérablement la conservation des structures cellulaires et les possibilités de l'étude approfondie des échantillons biologiques sans préparation lourde de ceux-ci.

## Pourquoi automatiser ?

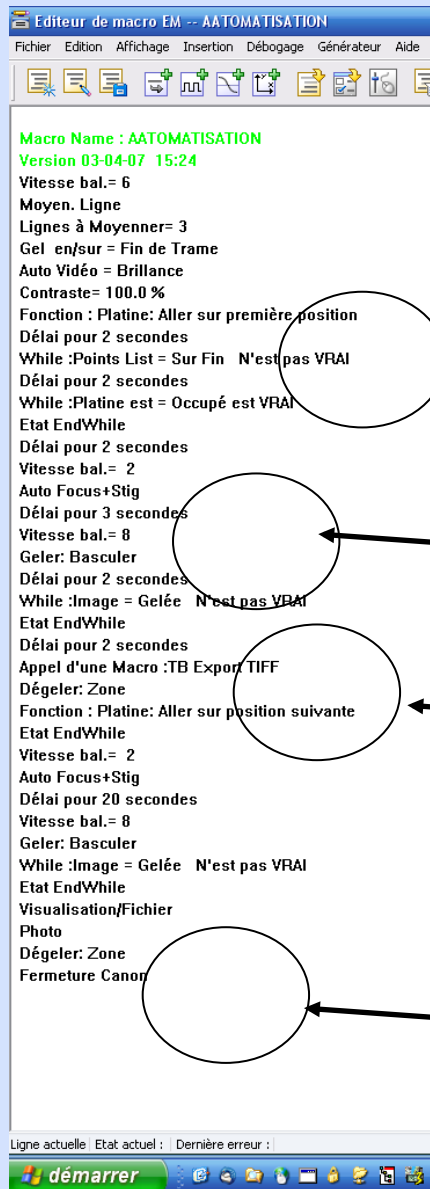
*En mode pression contrôlée l'échantillon se déshydrate plus ou moins rapidement*







*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*

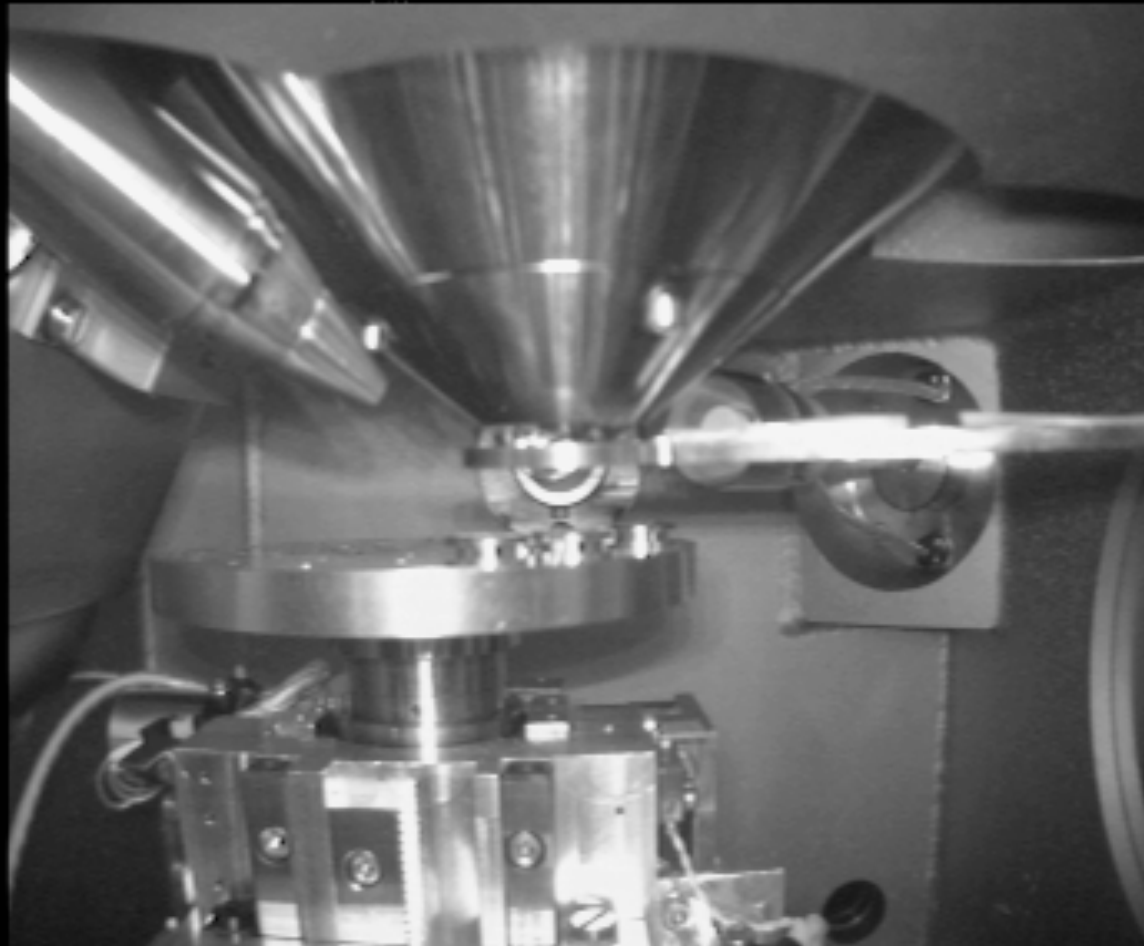
*Prise de photo*

*Enregistrement de la photo*

*Positionnement*

*Etc.*

*Coupure du filament*



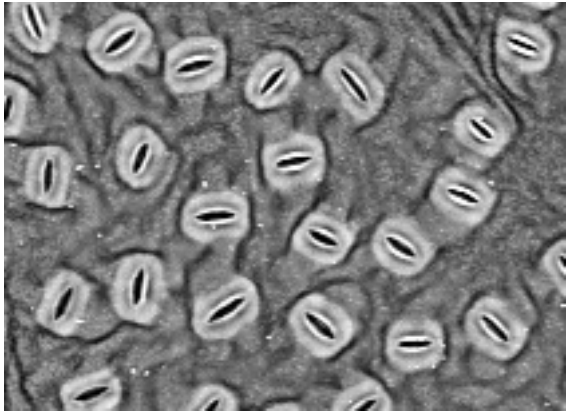
1:Schubikon = 8 HA	Signal A=TV	10 $\mu$ m	Date: 7 Nov 2013	PHOTO: C.ROSE
BFI = 20.00 kV	WD = 15 nm	H		MRA HANCY (PR)
I:Scand = 1.8 nA	Probe: C=26313 nm	Grand. = 500 X	Element Area = 1.53 Huma	

# Détection automatique d'objets et estimation de la densité stomatique

Silvère Vialet-Chabrand

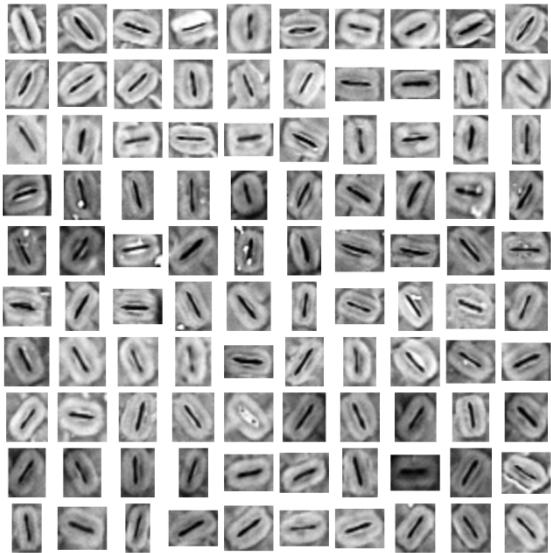
Oliver Brendel

# Méthodes d'estimation de la densité stomatique



**➔ couteux en temps**

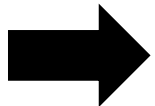
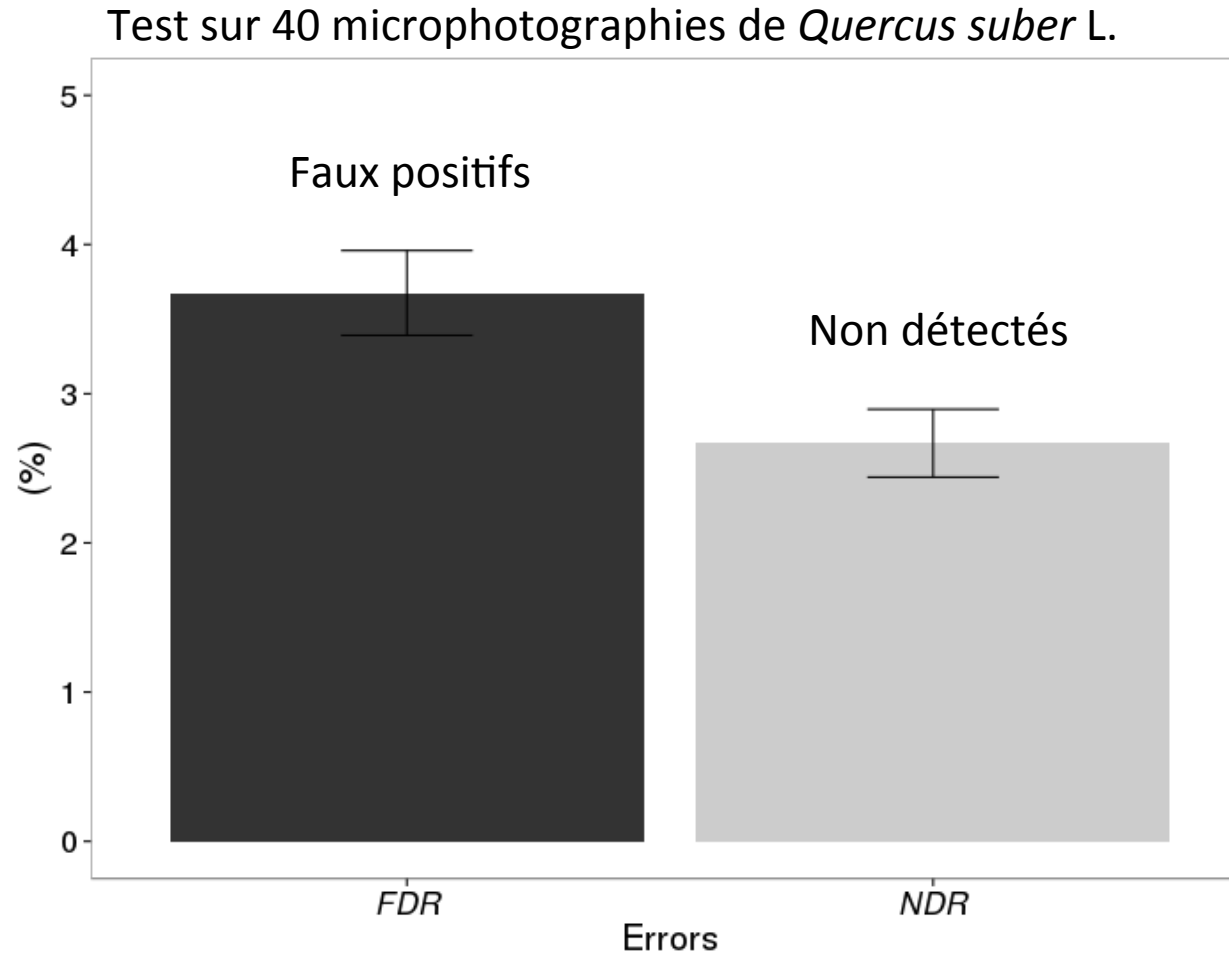
Comment compter rapidement les stomates ?





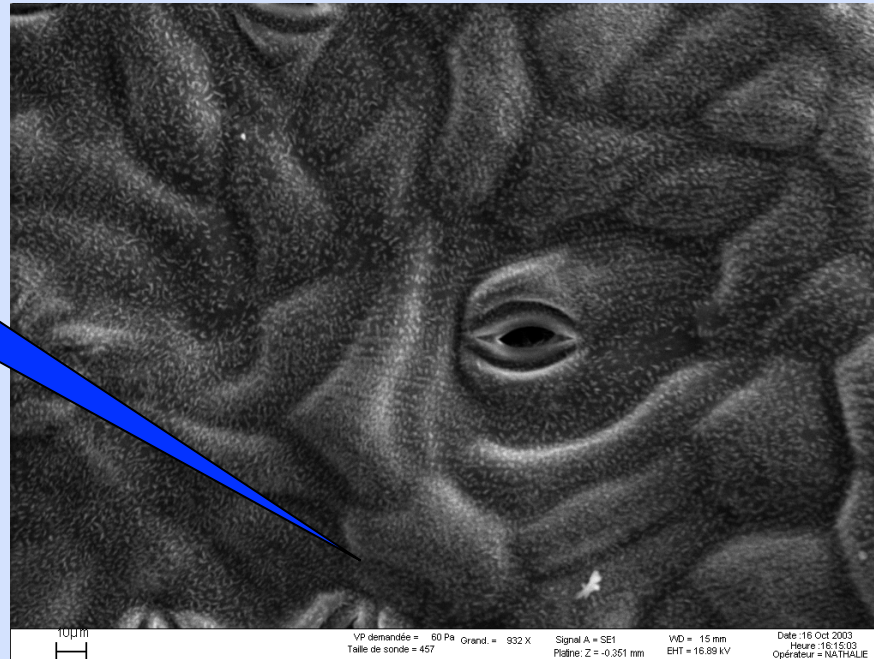


# Performance de détection des stomates



**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*

