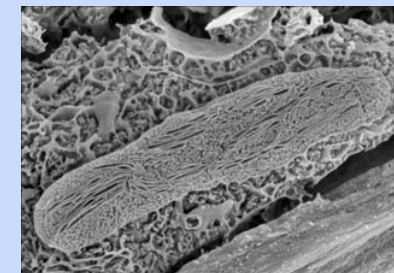
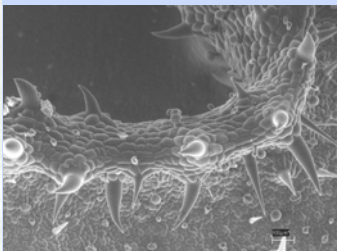
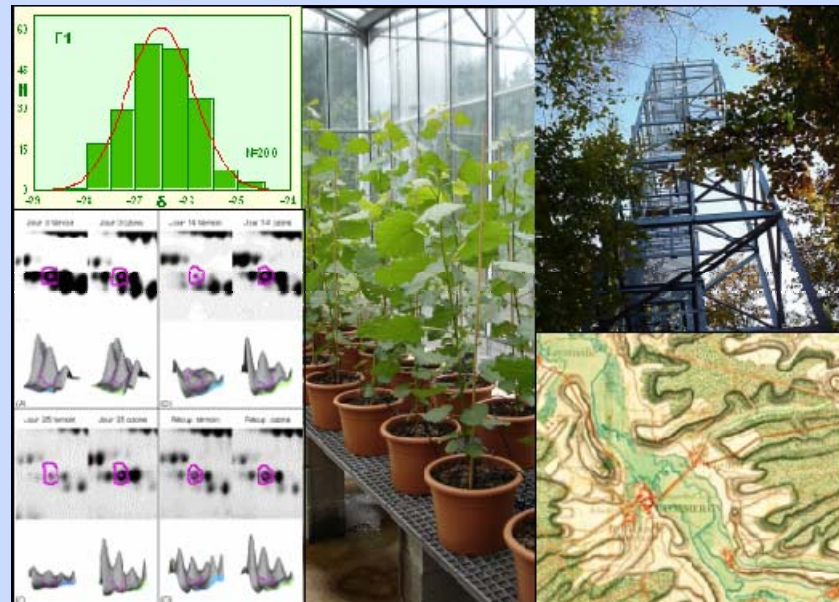


# Utilisation des techniques du froid et de la pression contrôlée pour l'observation et l'analyse X d'échantillons biologiques

Christophe Rose et Didier Le Thiec

INRA - UMR Ecologie et Ecophysologie Forestières

Centre INRA de Nancy

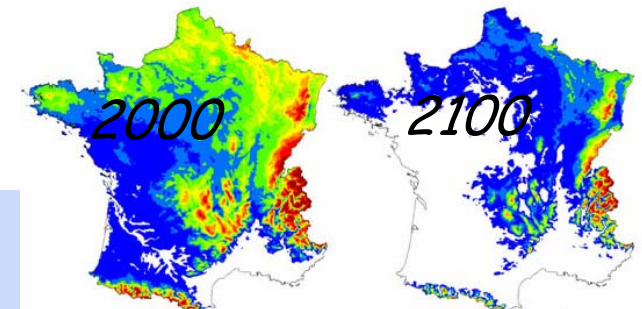


# Trois grandes thématiques de recherche dans l'UMR EEF

■ **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.

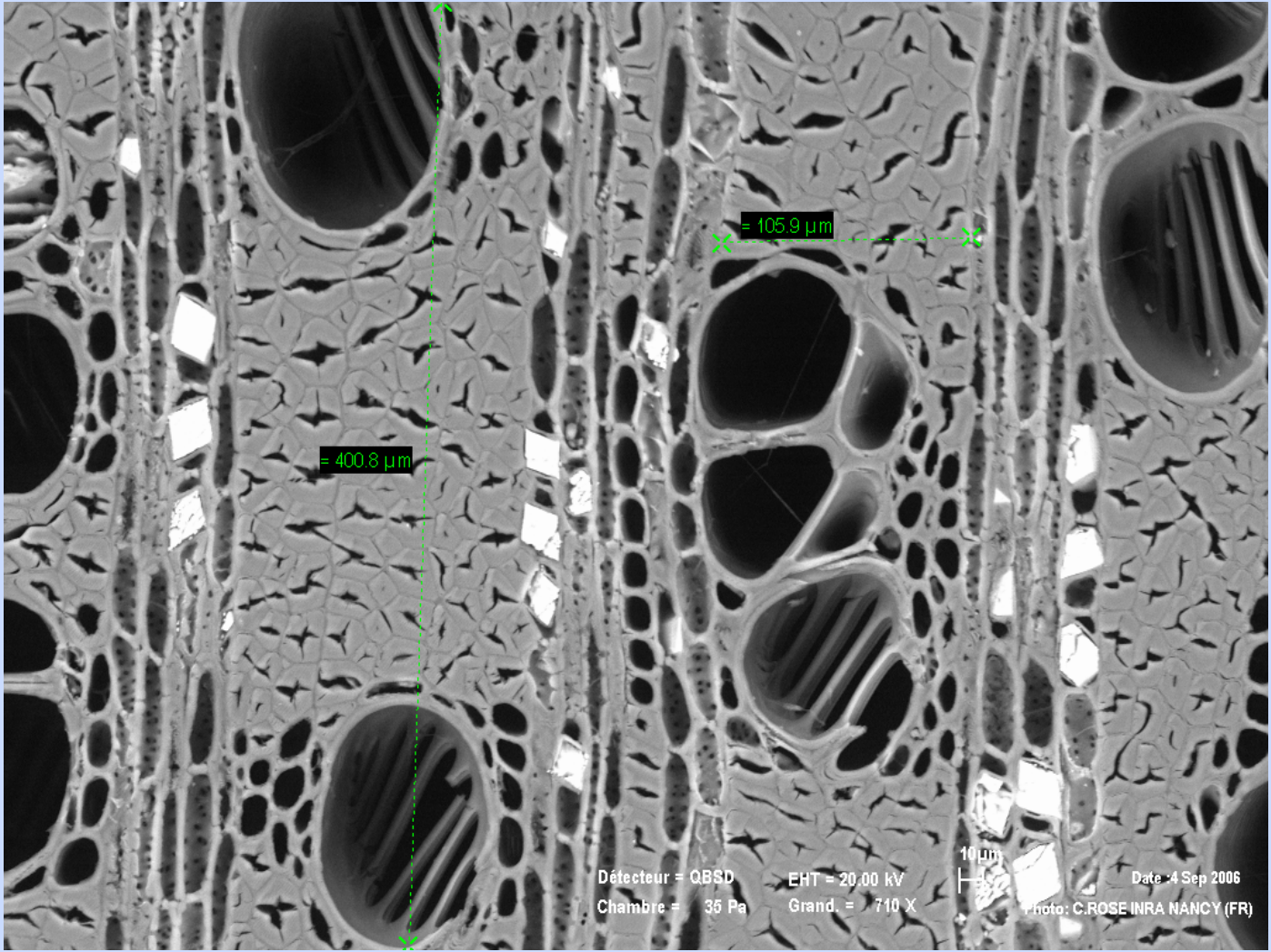


## *Plateau Technique d'Ecologie Fonctionnelle: des outils d'analyse parmi d'autres.*



- **MEB** canon tungstène
- chambre à pression contrôlée
- détecteur électrons rétrodiffusés
- détecteur électrons secondaires mode HV
- détecteur électrons secondaires mode PC
- **platine effet Peltier -50°C**
- **platine et système de cryo-transfert**
- spectromètre à sélection d'énergie (EDS-SDD).
- spectromètre à dispersion de longueur d'onde (WDS)
- logiciels d'imagerie et environnements informatiques.
- appareils de préparation des échantillons: lyophilisateurs, cryostat, vibratome, microtomes,...

# Observations de structures cellulaires du bois:



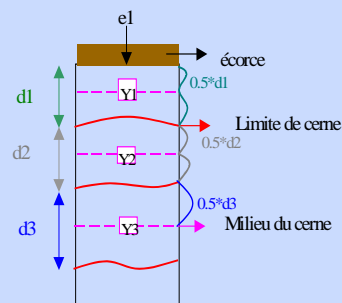
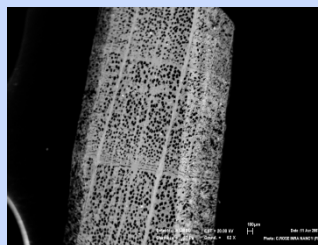
Cristaux d'oxalate de calcium dans *Rhizophora mucronata*, pression contrôlée 35 Pa

# Microanalyse d'échantillons biologiques (bois)

## DENDROCHIMIE DES CERNES ANNUELS D'ACCROISSEMENT



**CAROTAGE**

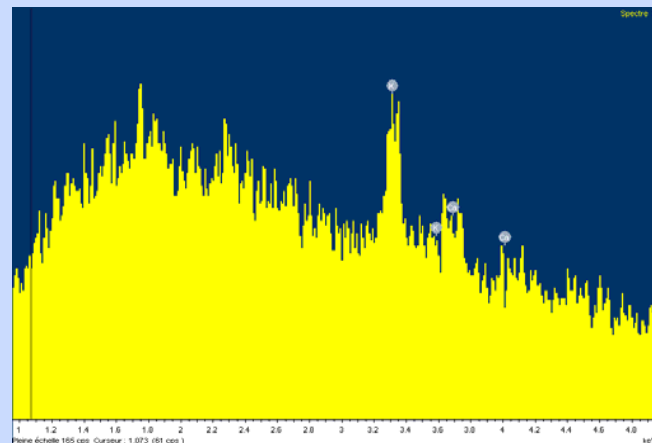


**DETERMINATION DES ZONES D'ANALYSES (cernes)**

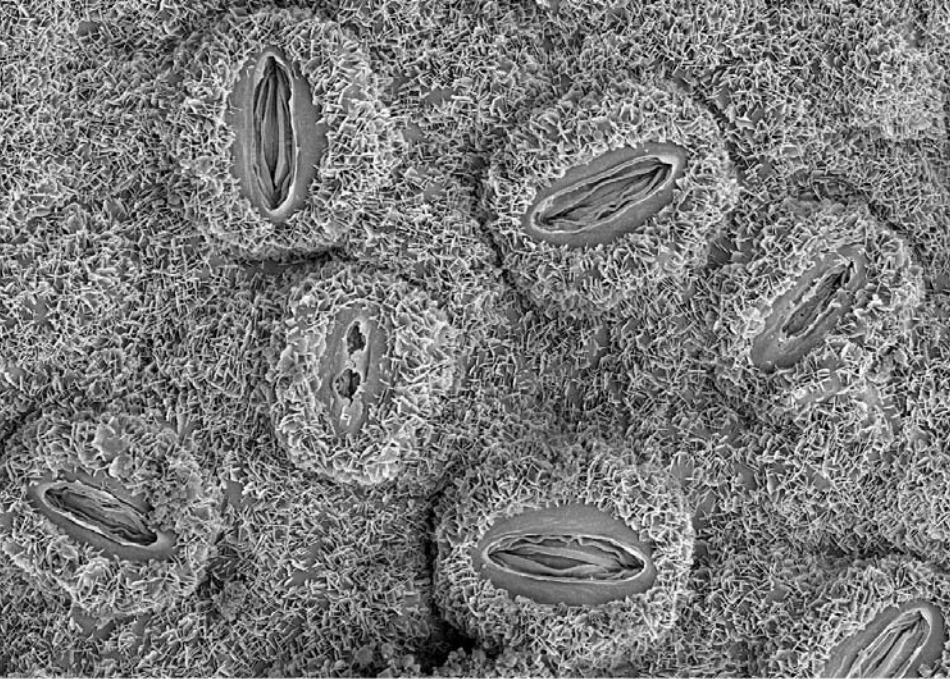


**Acquisition automatique de la composition chimique des cernes de carottes de bois lyophilisées, 'métallisées'(carbone) et analysées sous vide secondaire .**

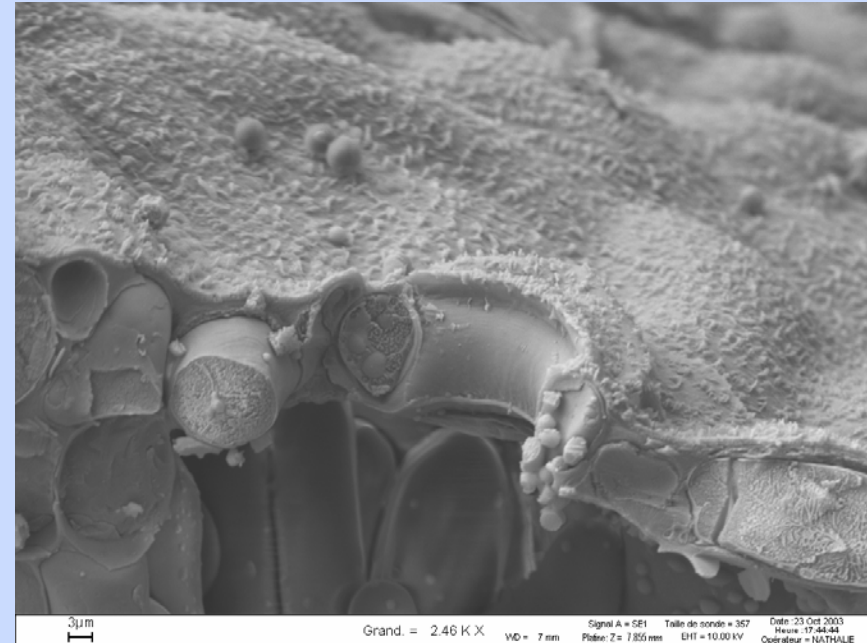
**PLANAGE SURFACAGE**



# Observations sur des surfaces foliaires



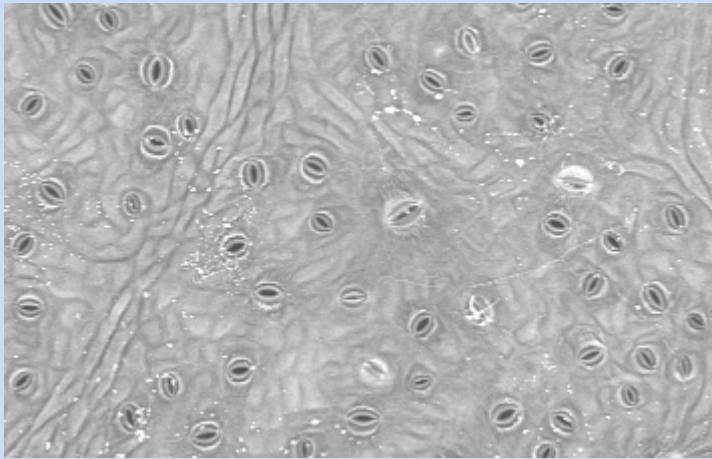
**Stomates de feuille de chêne (cryo, vide secondaire)**



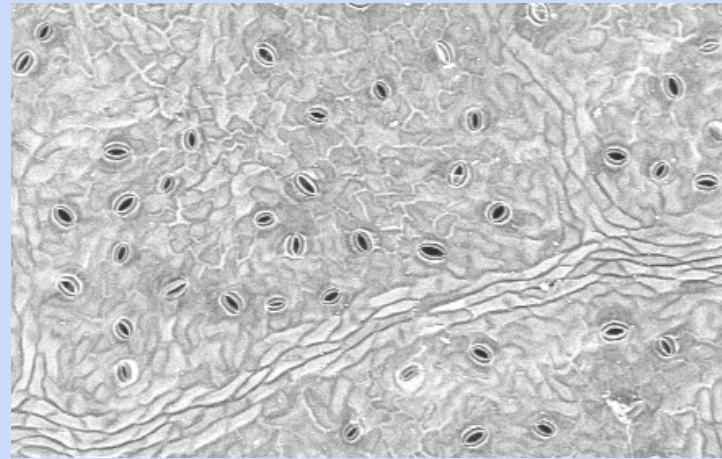
**Stomates de feuille de peuplier (cryo, vide secondaire)**

# Diversité fonctionnelle et adaptation

Contrôle génétique et environnemental de l'efficacité d'utilisation de l'eau ( $\Delta$ )



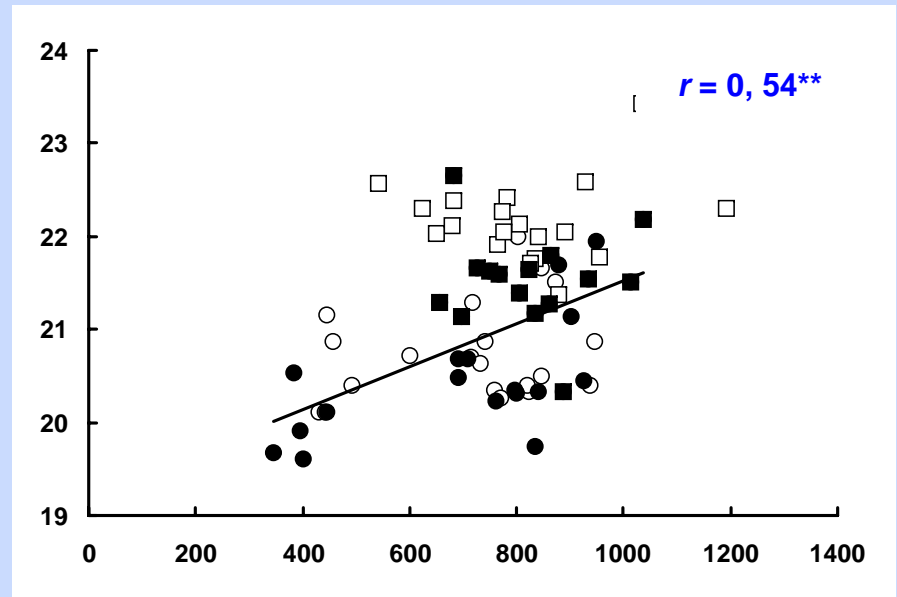
I45-51 (abaxiale)



Agathe-F (abaxiale)

Acquisitions de photos de surface de feuilles congelées placées en pression contrôlée sur la platine Peltier.

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



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

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

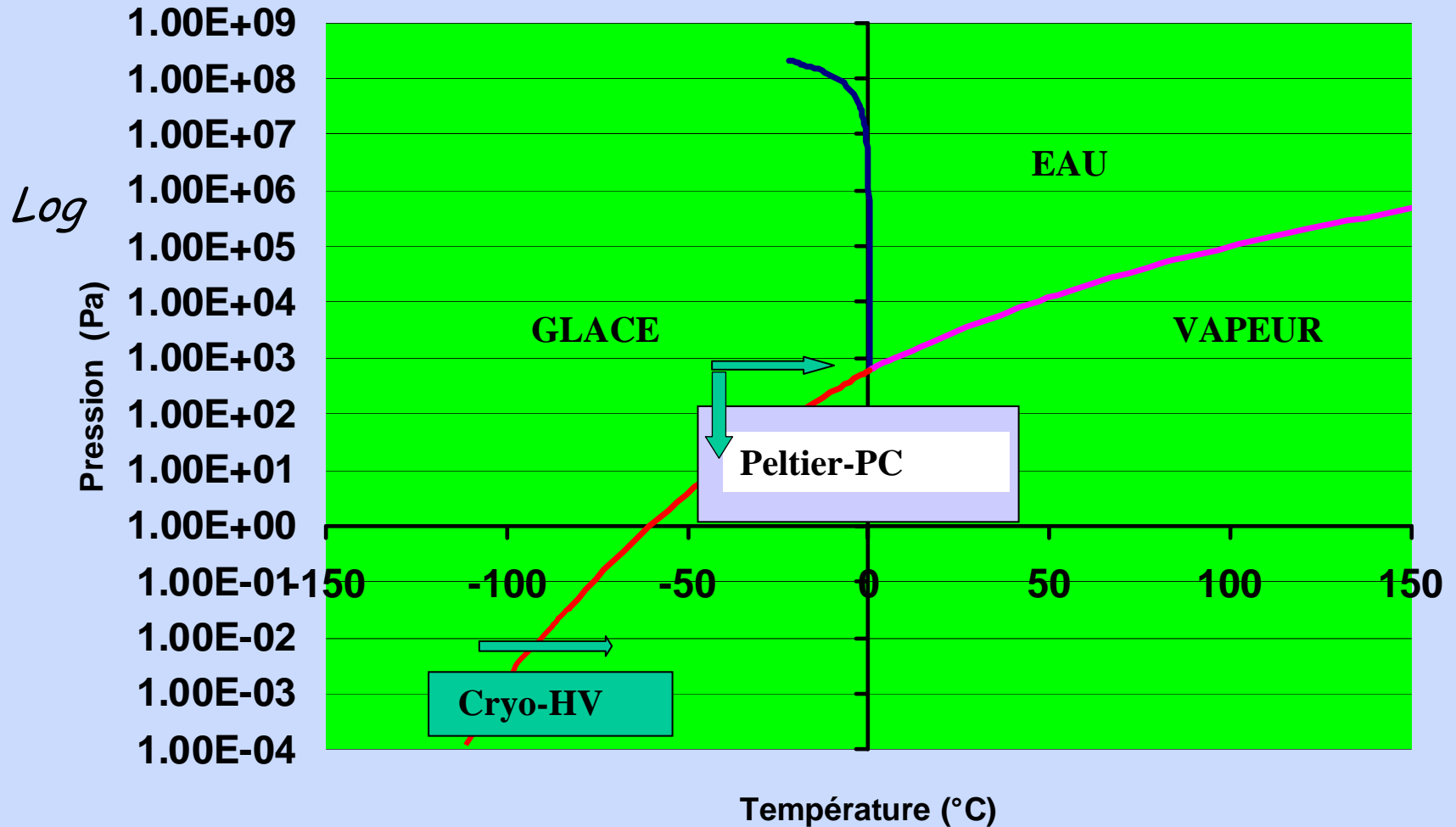
### **Mode HV** (pression chambre $< 5 \cdot 10^{-2}$ Pa)

- *Echantillon :*
  - déshydraté
  - conducteur électrique du faisceau électronique
  - 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 )

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

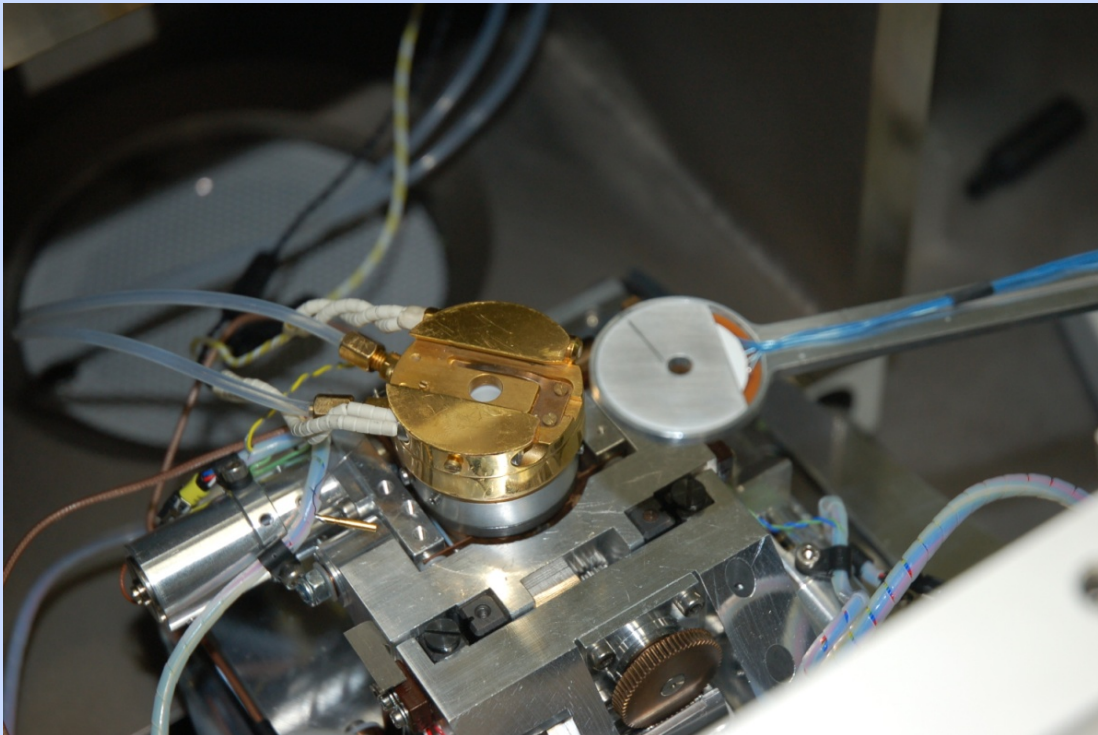
*Pression et température : paramètres physiques ajustables pour l'observation des échantillons biologiques*



## *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):

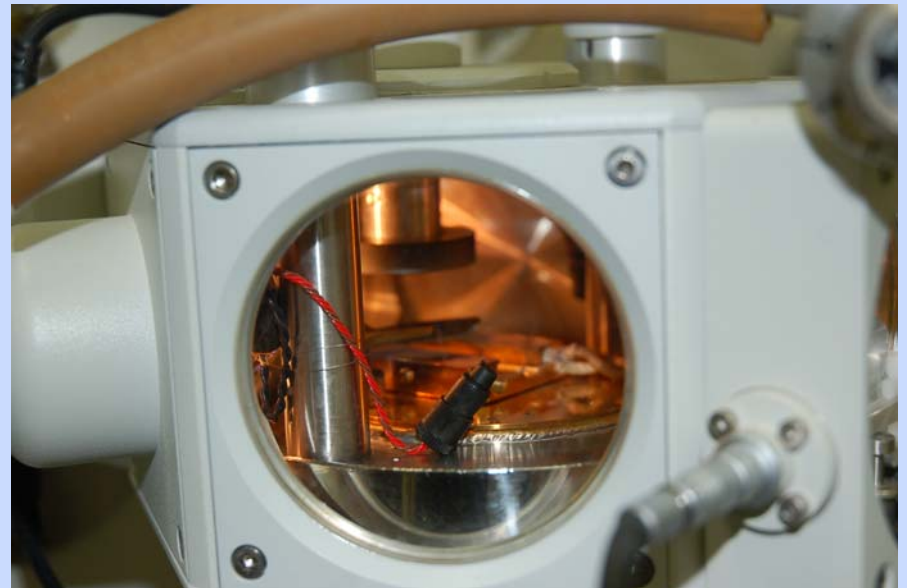
- conservation des structures cellulaires et visualisation des structures internes
- limitation des altérations dues à l'intensité du faisceau



## *Le sas de cryo-transfert*



## *La chambre de préparation*

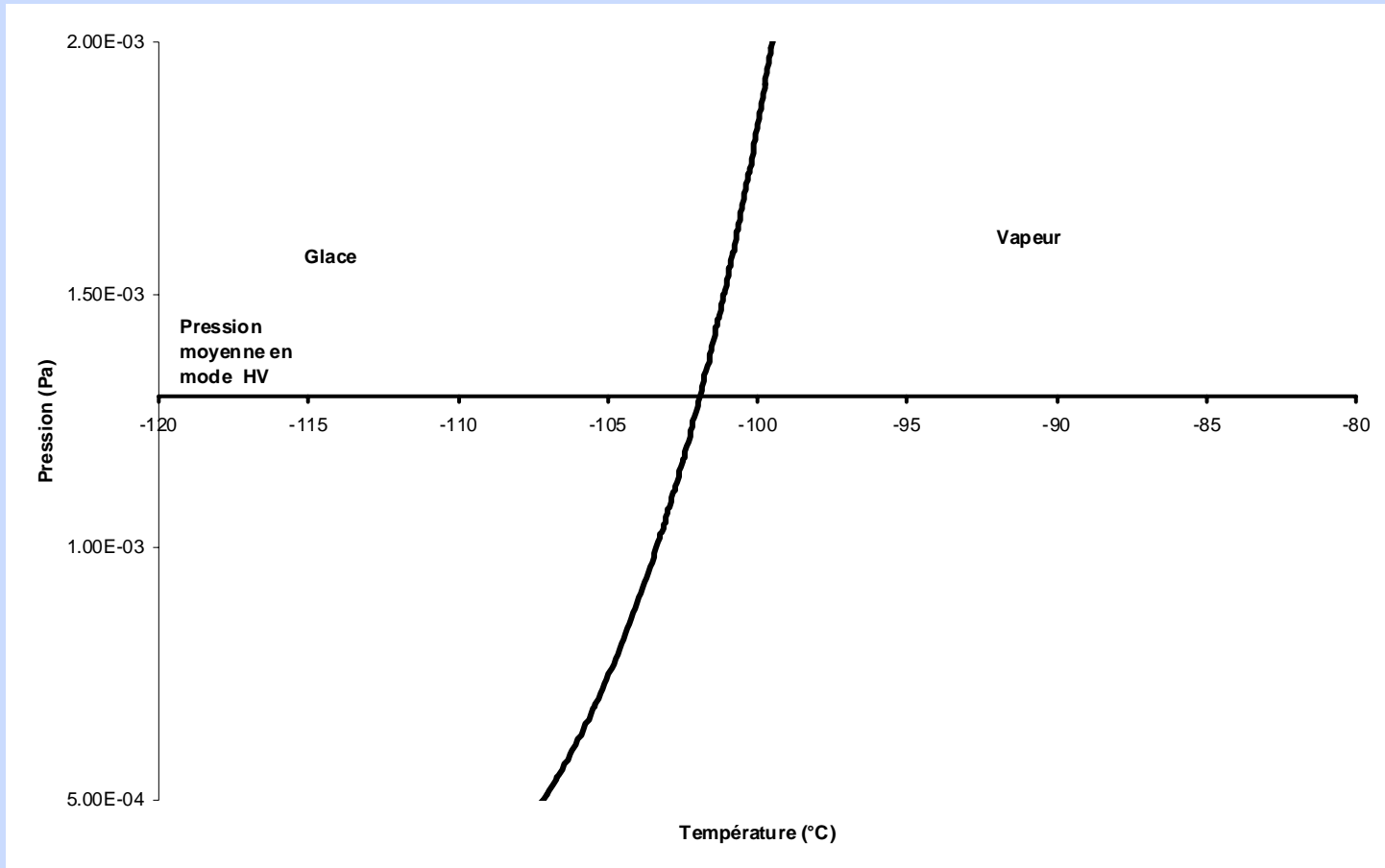


## Observations en vide secondaire et avec la platine cryogénique

Pression non ajustable dans la chambre.

Température de la platine ajustable ( $-120^{\circ}\text{C}$  ;  $+80^{\circ}\text{C}$ ).

Régulation de la température de l'échantillon.



*Courbe d'équilibre Pression-Température*

# *Vulnérabilité à la cavitation chez le peuplier en cas de sécheresse*

## *Visualisation de l'embolie vasculaire*

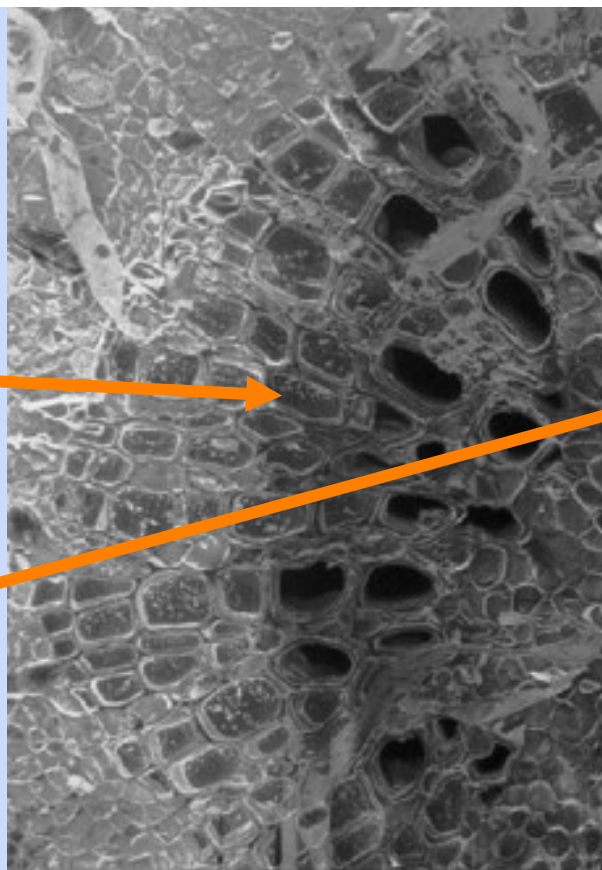
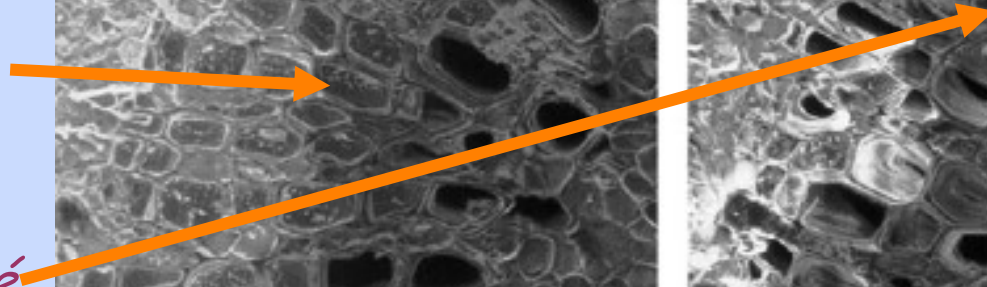
- échantillon coupé sous eau, congelé dans N2 liquide, fracturé et observé en conditions cryo .
- une méthode de mesure du taux d'embolie (% vaisseaux embolisés)

*Populus alba*  
nervure

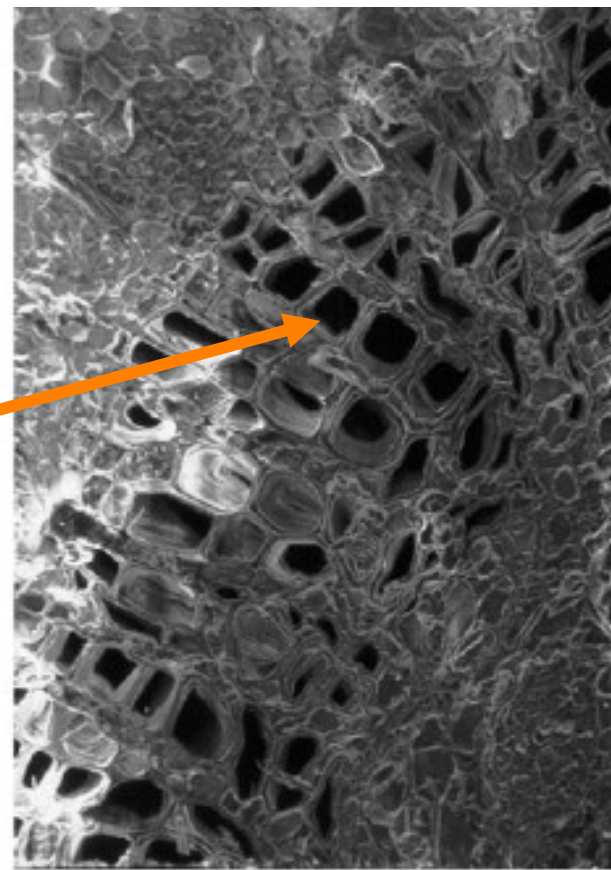
*vaisseau plein*



*vaisseau embolisé*



0.5 MPa

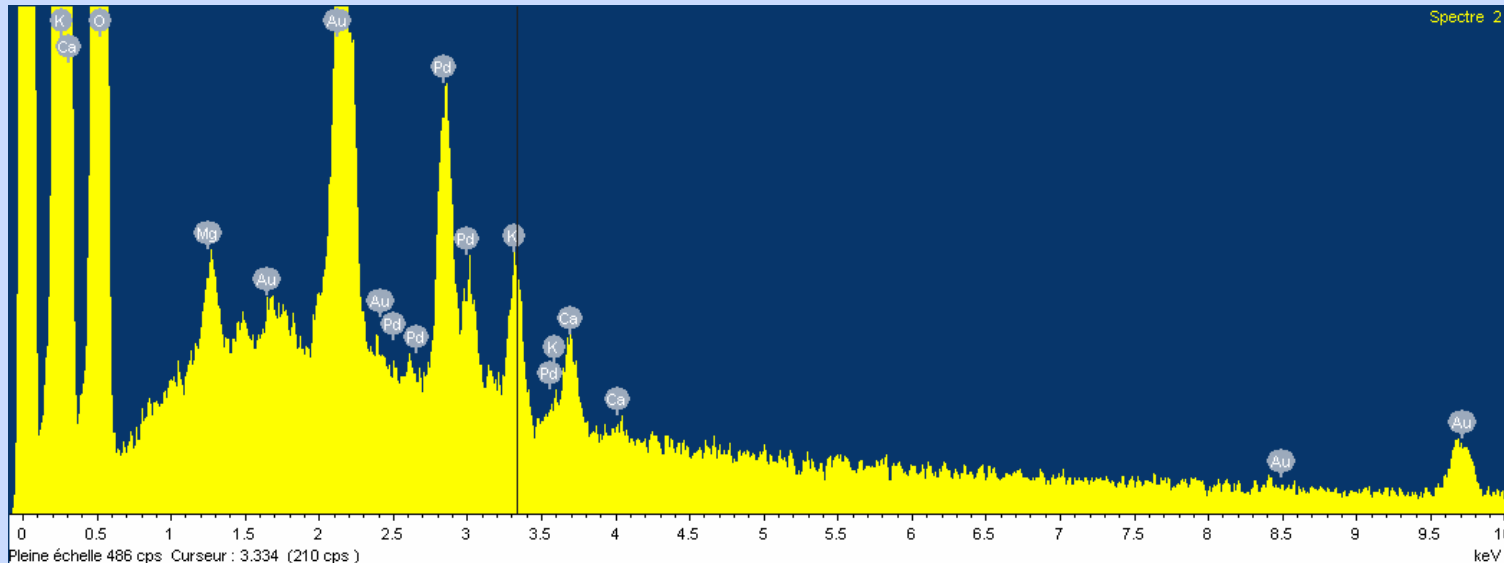
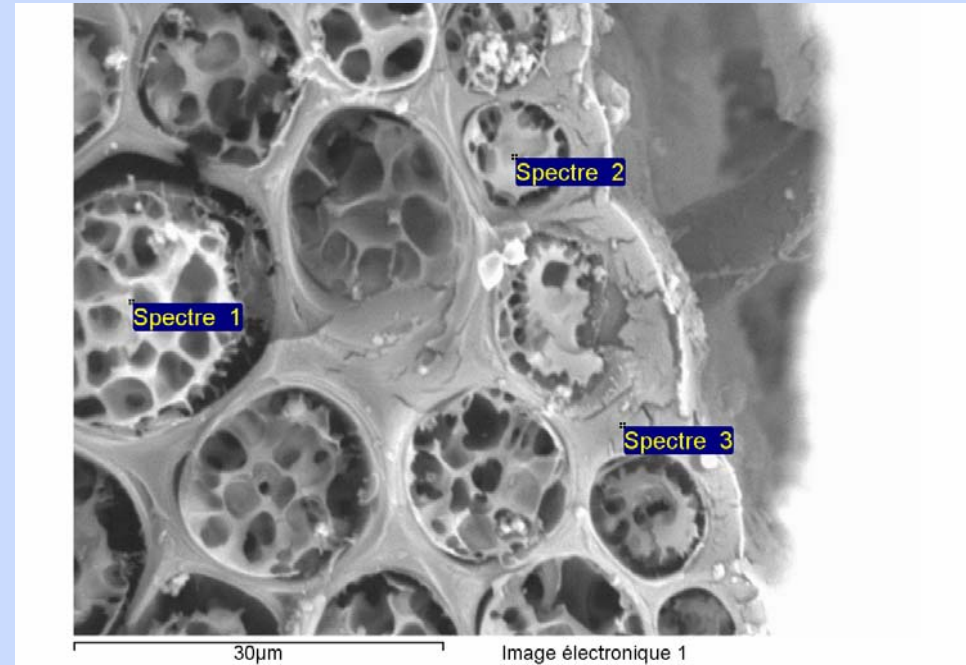


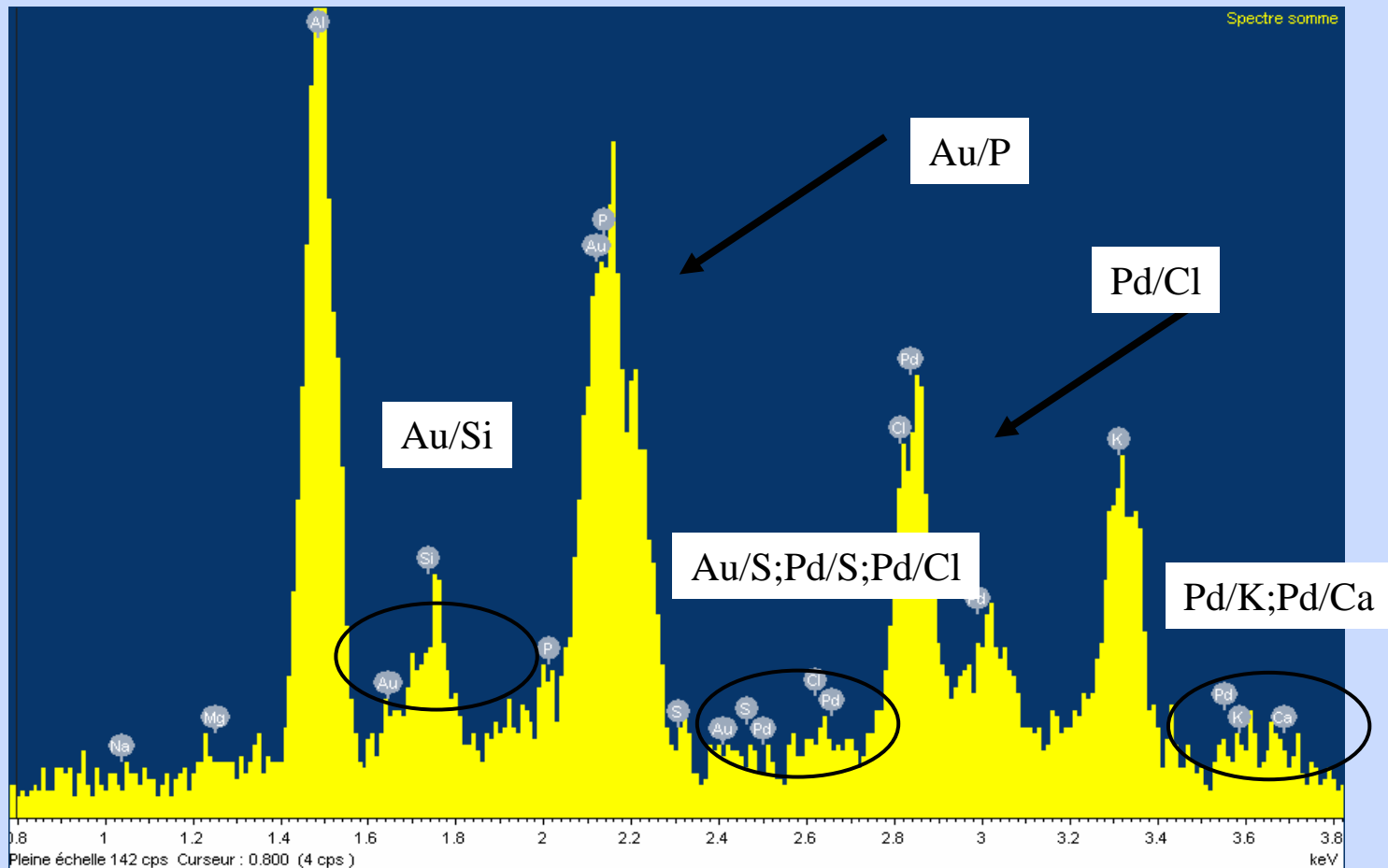
2.5 Mpa

# Microanalyse X

Cellules épidermiques d'un pétiole de  
feuille de charme congelé fracturé et  
métallisé (Au-PD).

Observation et microanalyses du contenu  
des cellules (platine cryo et mode  
conventionnel).



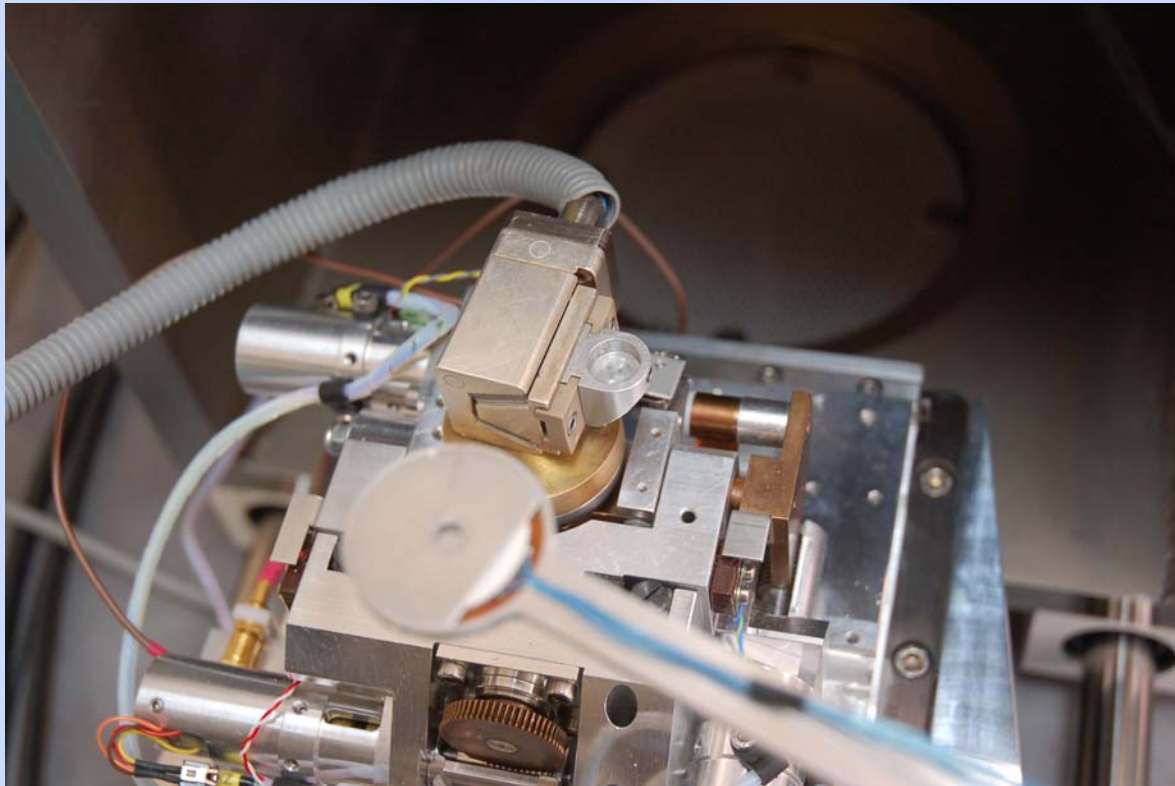


Un inconvénient pour la microanalyse d'échantillons biologiques, la métallisation Au-Pd.

## 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*

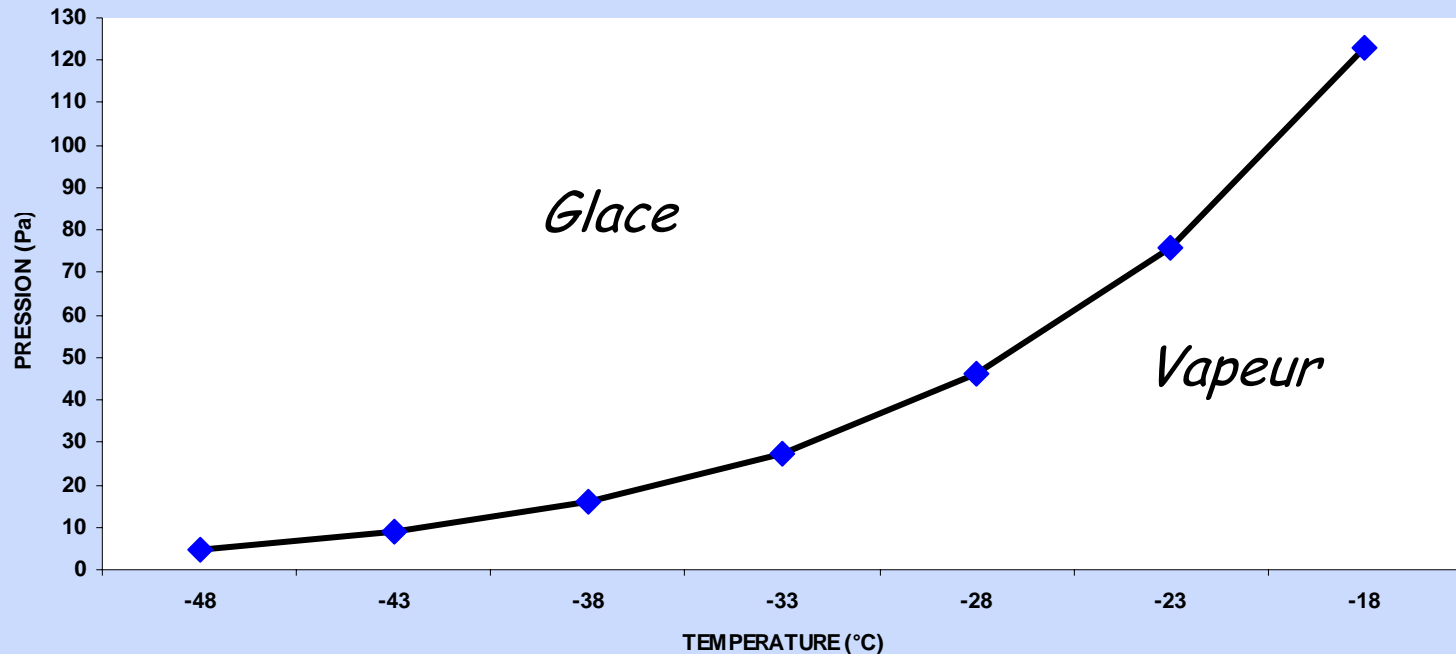


L'utilisation dans la chambre d'un porte échantillon à effet Peltier ( $-50^{\circ}\text{C}/+50^{\circ}\text{C}$ ) réduit considérablement la déshydratation des échantillons en mode pression contrôlée.

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*

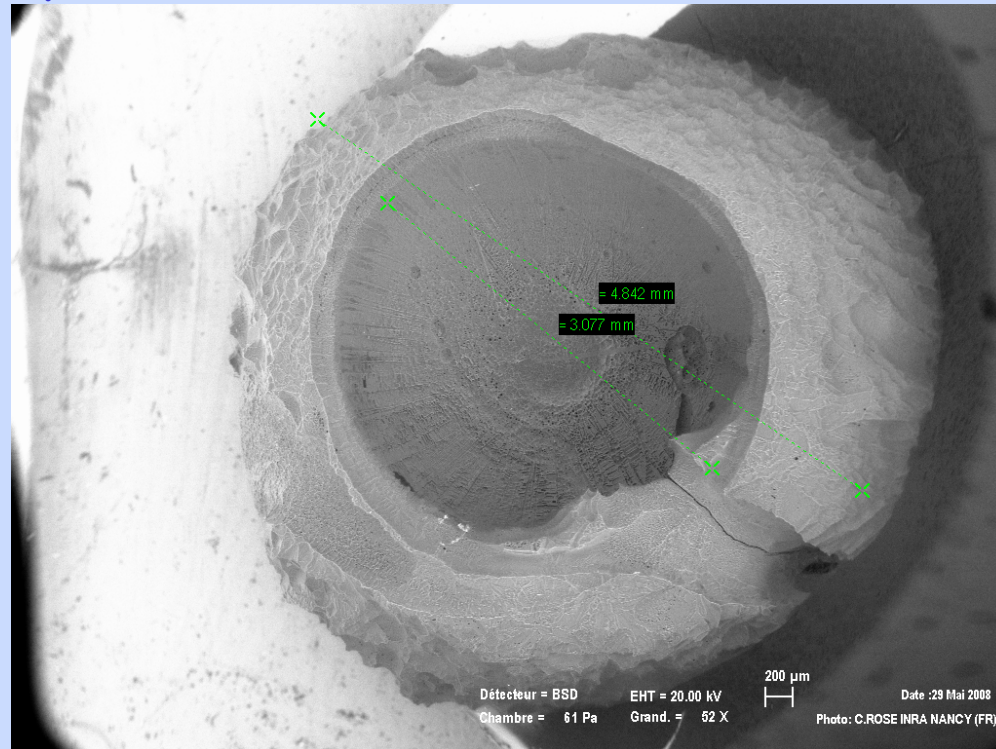
**Pression** variable ajustable dans la chambre (10;300 Pa) .  
**Température** de la platine ajustable (-50° C; +50° C).  
Régulation de la **température** de l'échantillon.



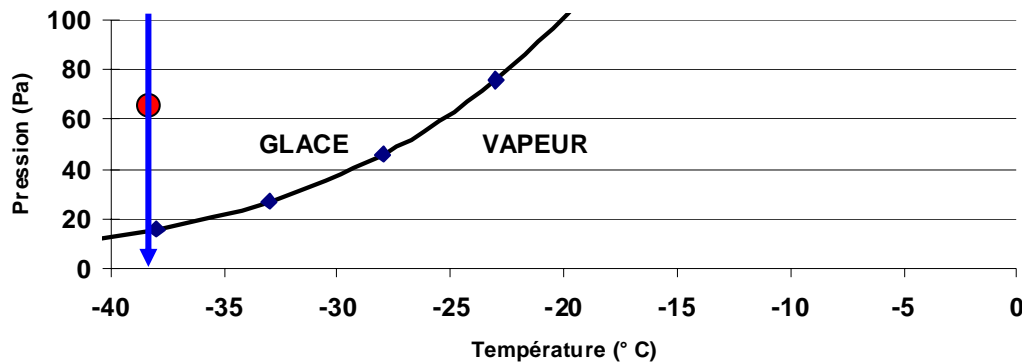
*Courbe d'équilibre Pression-Température*

# 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



Isotherme  $-38^\circ\text{C}$

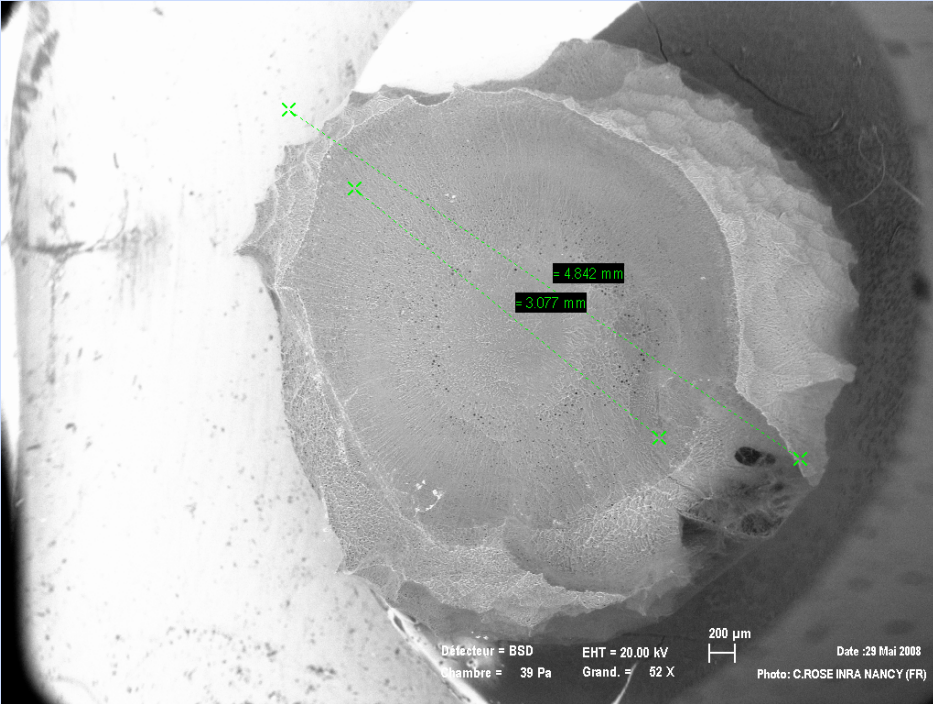


*Conditions initiales*  
*Pression 61 Pa*  
*Température  $-38^\circ\text{C}$*

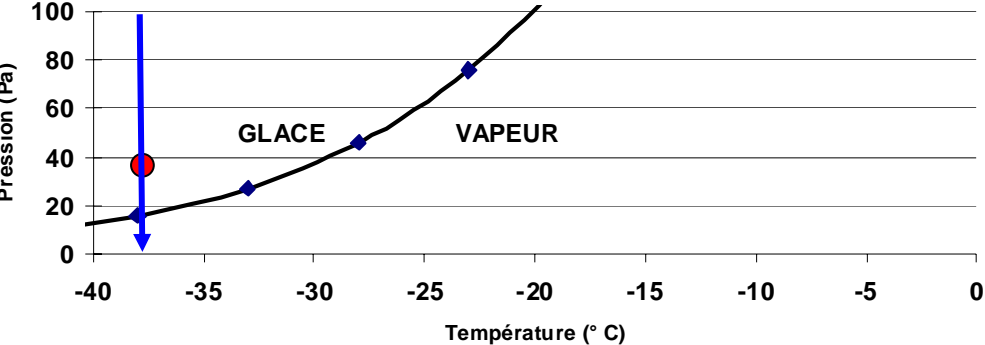
# Observations en vide contrôlé et avec la platine Peltier

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

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



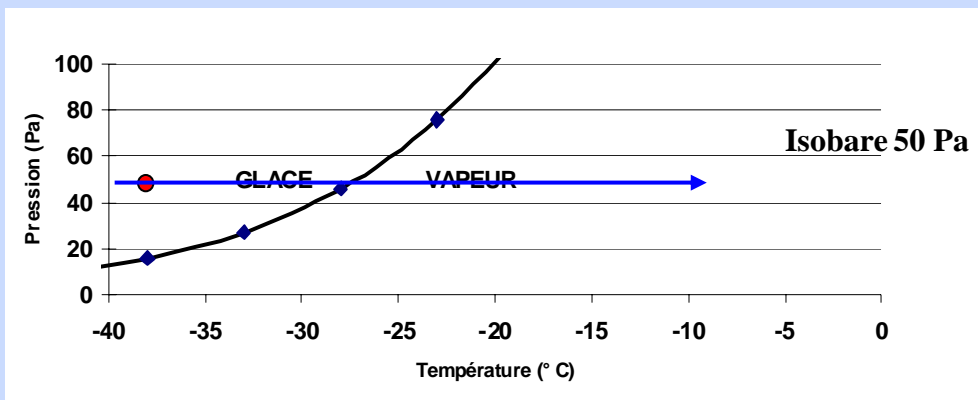
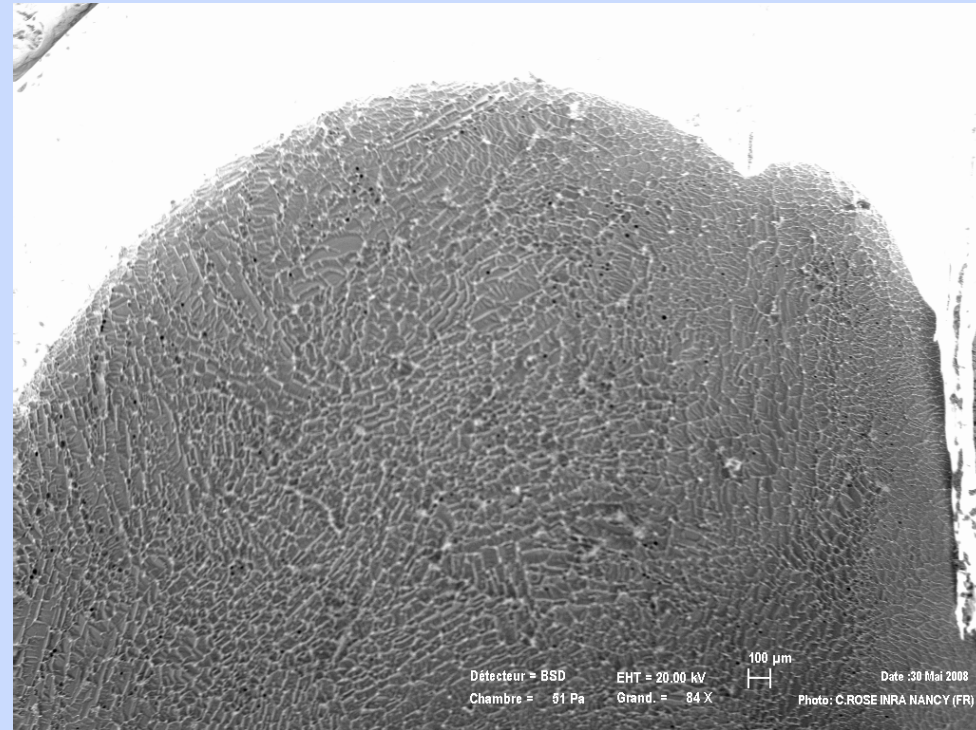
Isotherme -38°C



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

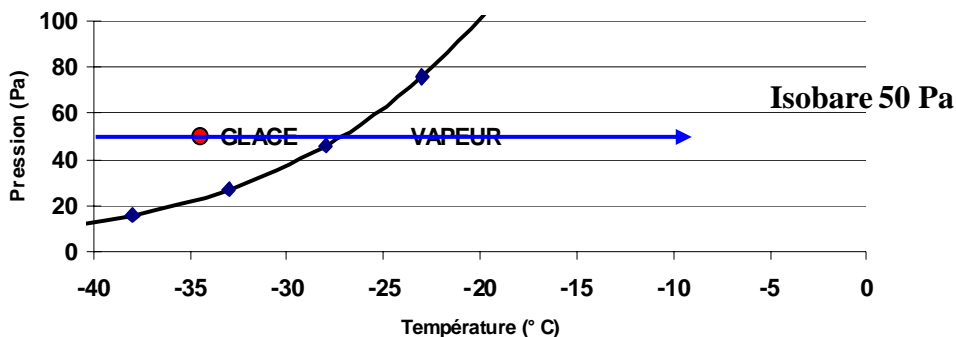
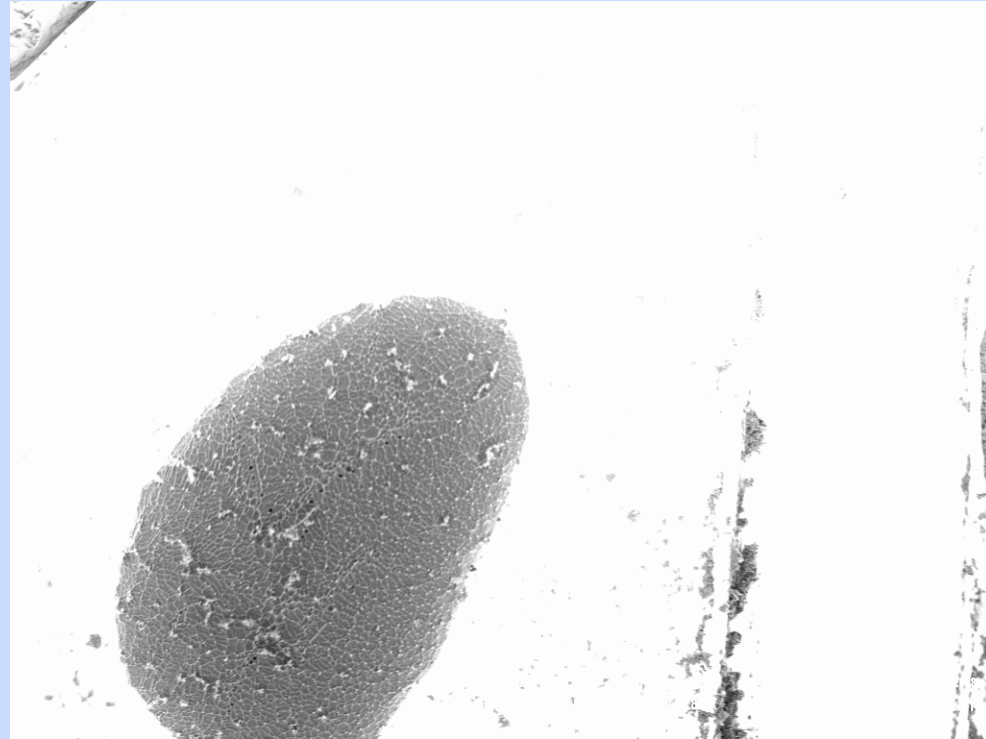


*Conditions initiales*  
*Pression 50 Pa*  
*Température platine -38°C*

# 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

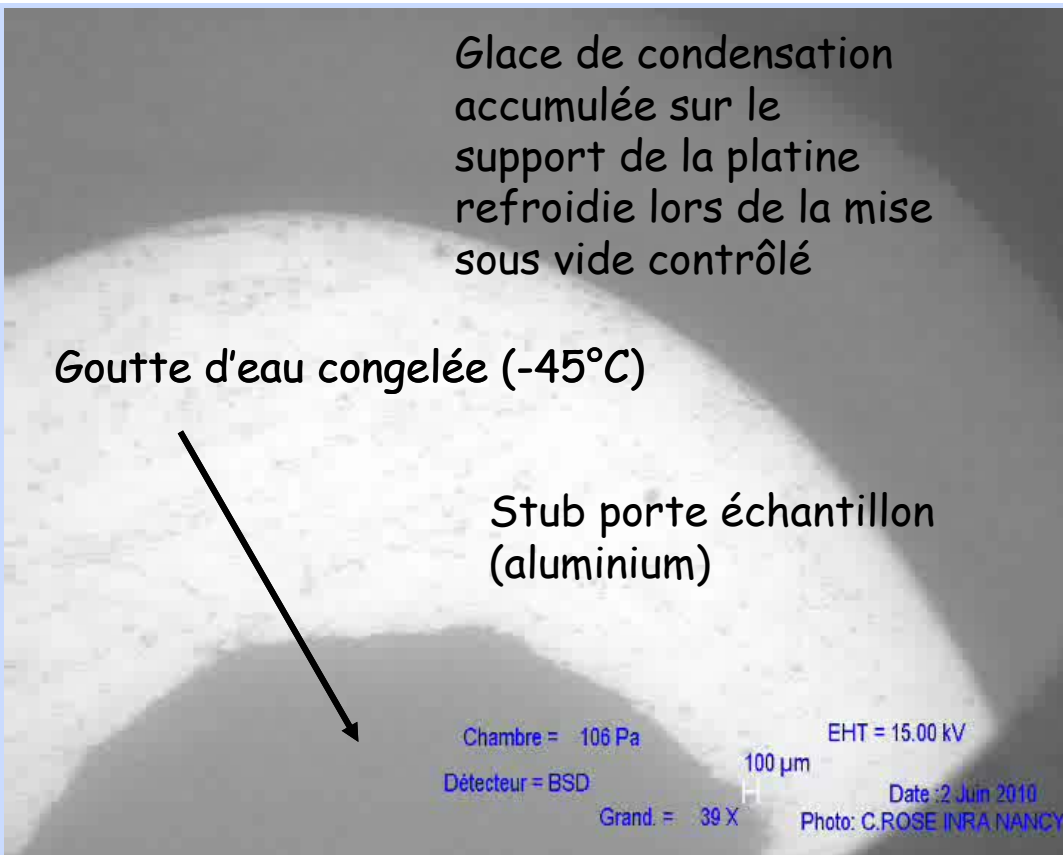
Delta température:  $3^{\circ}\text{C}$   
Balayage faisceau permanent (20Kv; 800pA)  
Temps d'exposition : 6 min



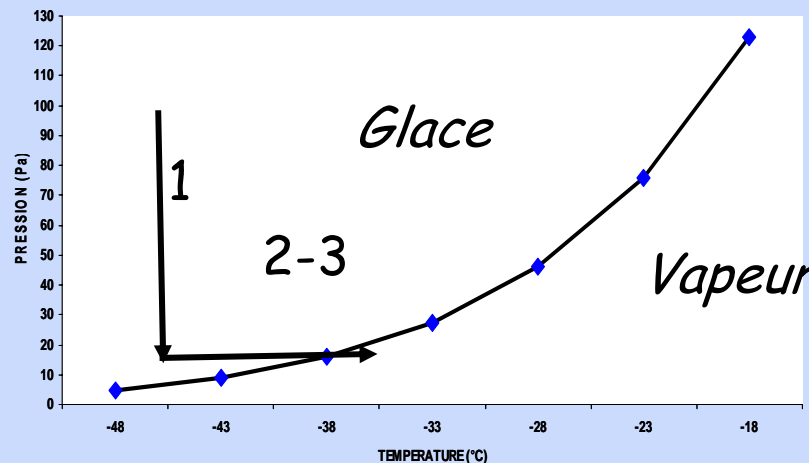
Conditions finales  
Pression 50 Pa  
Température platine  $-35^{\circ}\text{C}$

# Cinétique de réaction, d'une goutte d'eau congelée, à une baisse de la pression dans la chambre, suivie d'un réchauffement de la platine Peltier

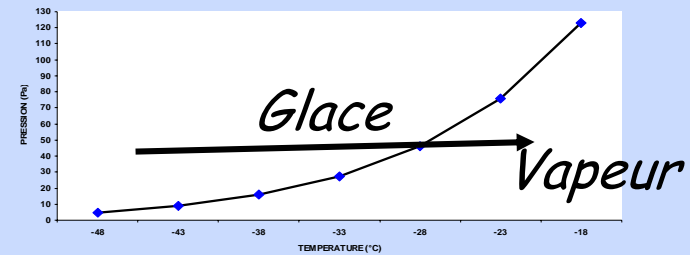
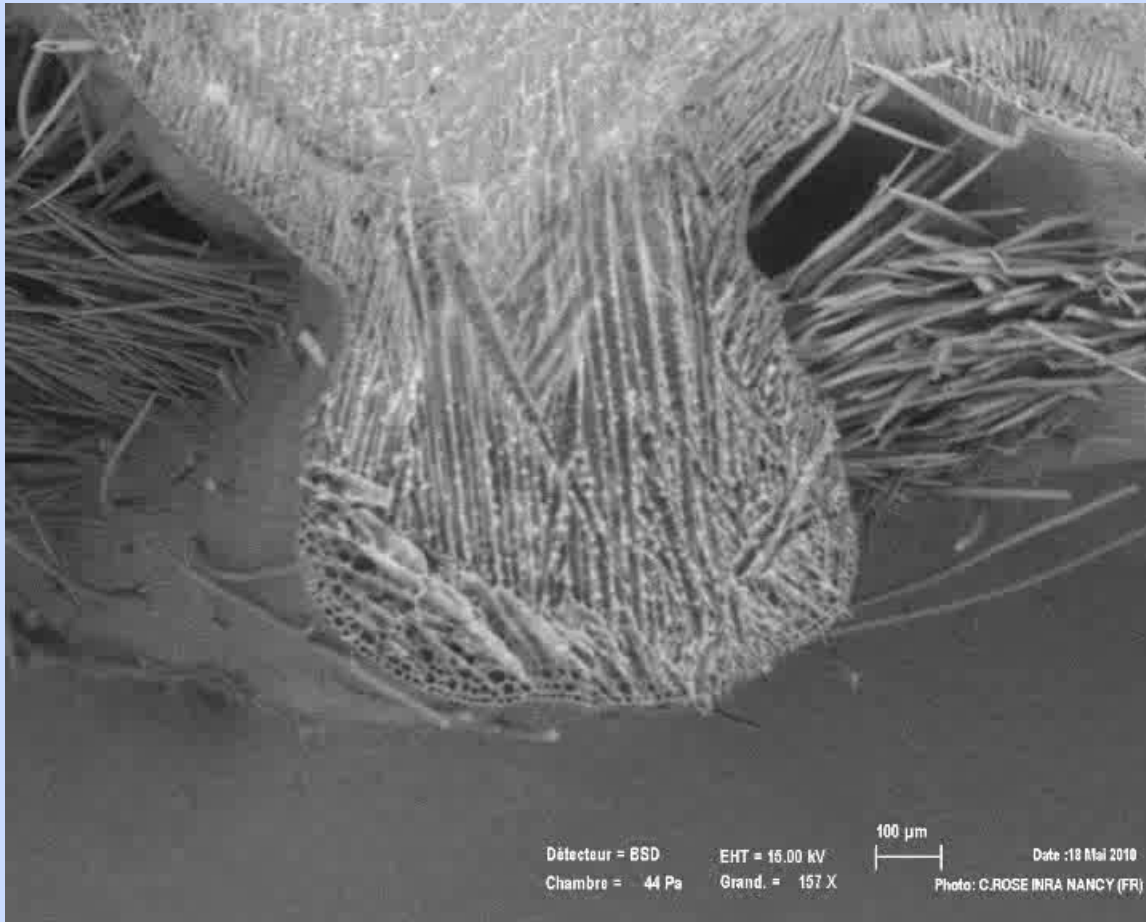
1. Baisse de pression dans la chambre: observation (sous le faisceau) d'une légère sublimation de la goutte d'eau congelée .
2. Début du réchauffement de la platine : condensation rapide de glace sur le stub porte échantillon (effet doigt froid) due à la sublimation rapide de la glace accumulée sur l'élément refroidissant de la platine .
3. Réchauffement progressif du stub (environ 1mn) : sublimation rapide de la glace à la surface du stub et début d'une sublimation importante de la goutte d'eau .



Baisse de pression:  
100 Pa vers 15 Pa  
Réchauffement :  
-45°C vers -35°C

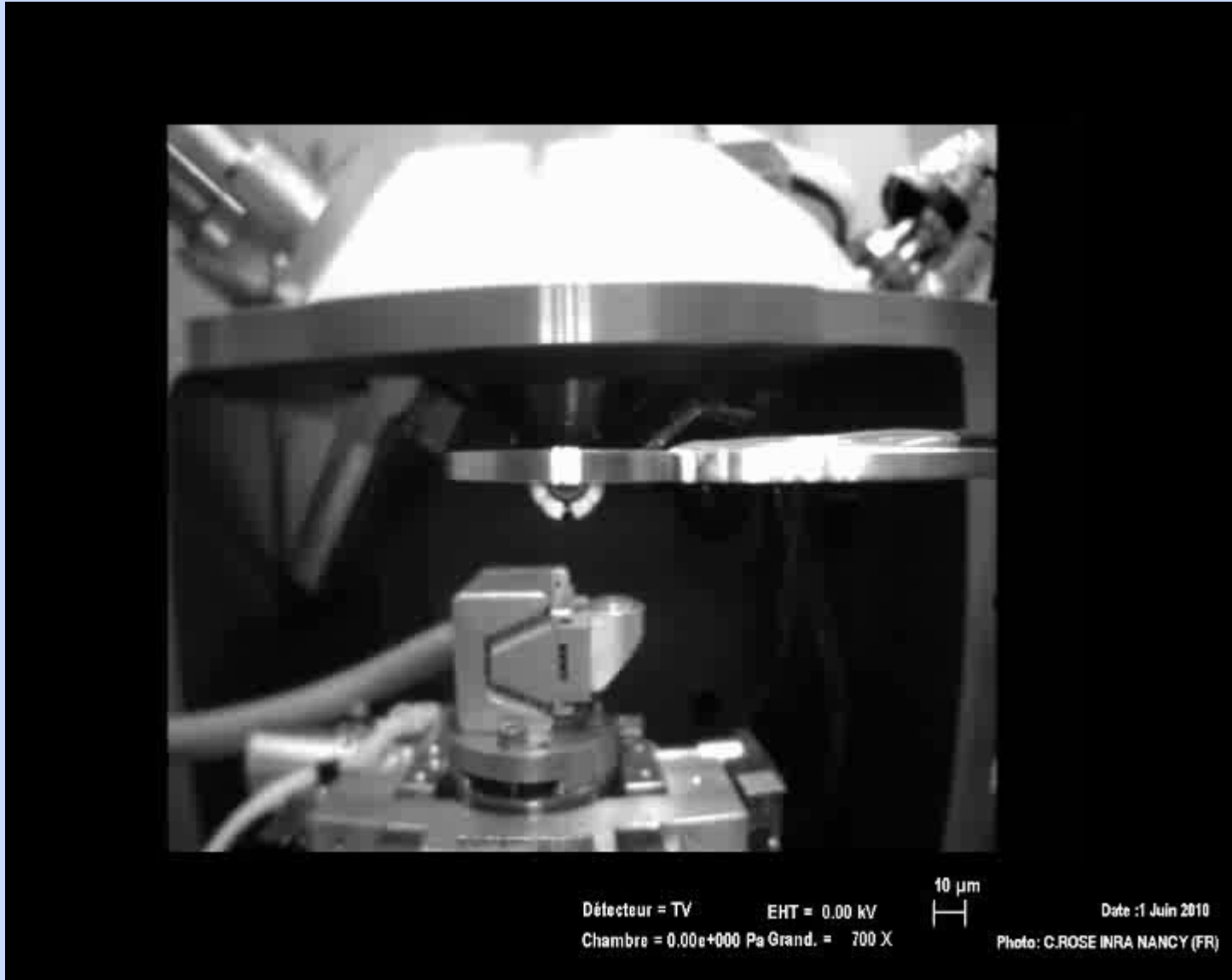


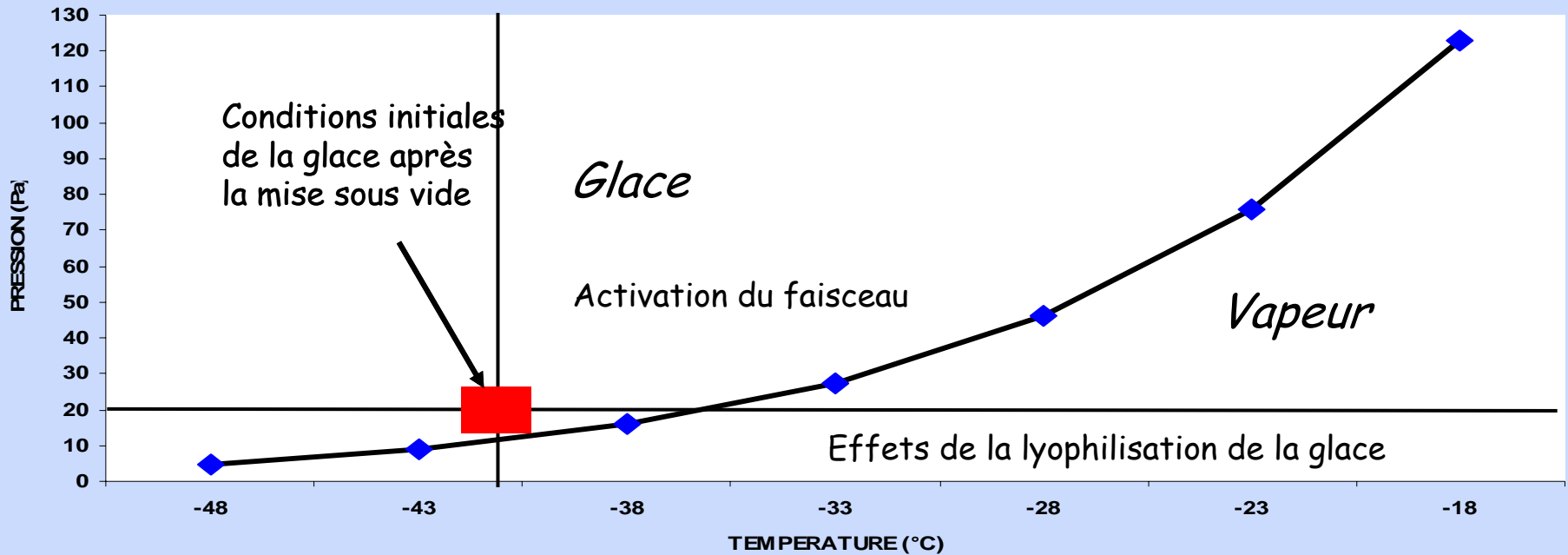
*Sublimation par réchauffement de la platine de la glace à la surface d'un pétiole de feuille de charme fracturée.*



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

*Des développements innovants pour l'observation et la microanalyse  
d'échantillons biologiques en pression contrôlée:  
1. 'le montage à l'eau':*



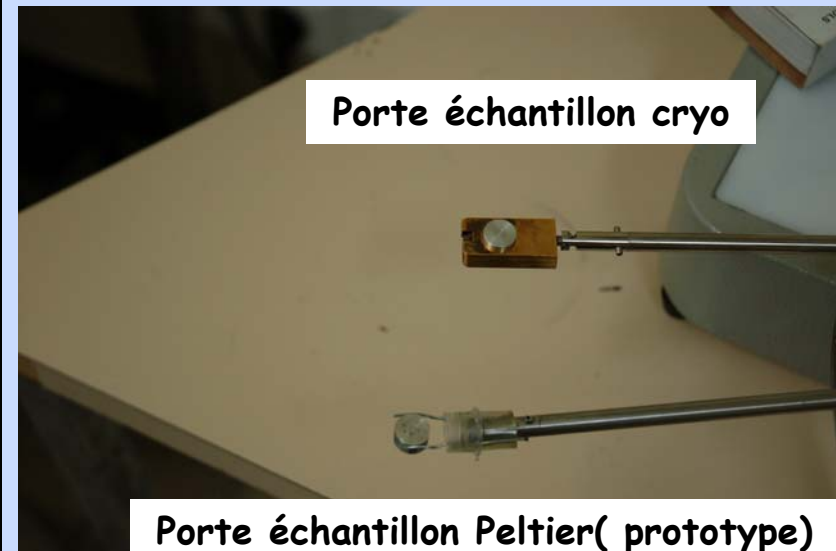


La mise en place d'échantillons (congelés) dans de l'eau refroidie (proche du point de congélation) et rapidement surgelée ('montage dans la glace') permet:

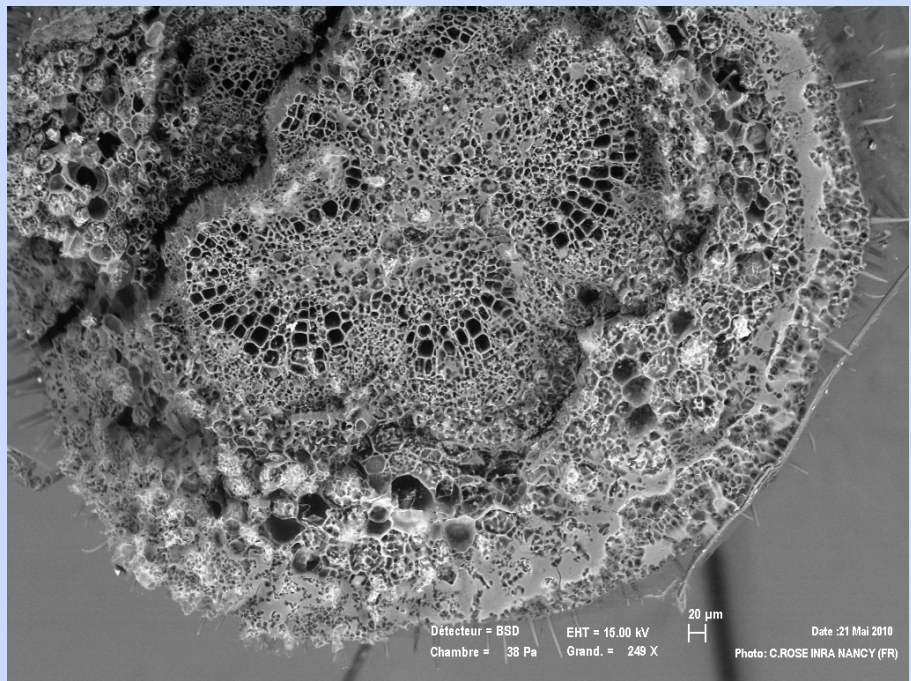
- Très bon support , rigidification et congélation importante de l'échantillon .
- Conservation d'une température très basse de l'échantillon grâce à la lyophilisation de la 'réserve d'eau embarquée': la sublimation (contrôlée) de la 'goutte' de glace à une pression donnée entraine le maintien de la température de cette glace (de l'échantillon) proche de la courbe d'équilibre, même en présence du faisceau et pendant un temps d'observation prolongé.
- Possibilité d'abaisser la pression dans la chambre : meilleure efficacité du détecteur de rétrodiffusés et de la microanalyse EDS (réduction du skirt mais attention aux excès de charges).

*Des développements innovants pour l'observation et la microanalyse d'échantillons en pression contrôlée:  
2. l'utilisation du sas de cryo-transfert:*

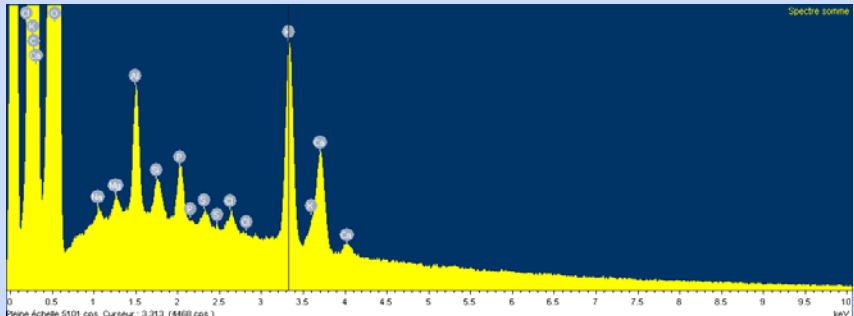
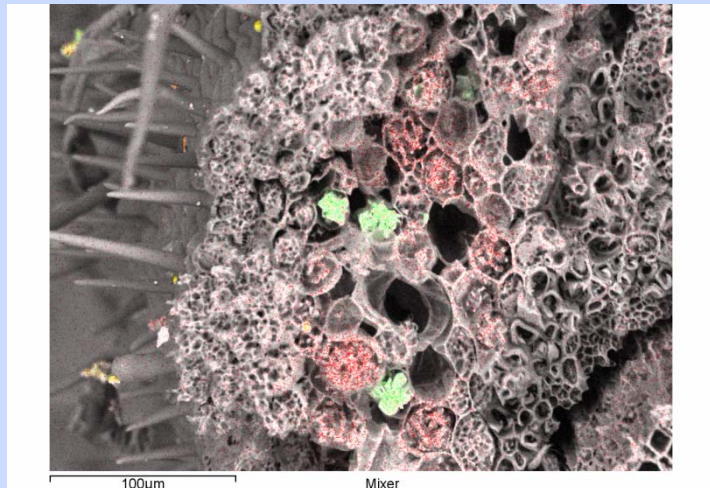
La mise en place de l'échantillon par l'intermédiaire du sas cryo, sur la platine Peltier refroidie sous pression contrôlée, préserve l'intégrité de l'échantillon et crée des conditions favorables à l'observation prolongée et à la microanalyse EDS (effet skirt et de charges limitants, mais pas d'interaction avec les pics de métallisation).



# Observation et analyse d'un Pétiole de feuille de charme (mode Pression contrôlée ;Sas-cryo)



Échantillon congelé (N2 liquide ) et fracturé puis introduit par le sas -cryo dans la chambre sous pression contrôlée et sur la platine à effet Peltier préalablement refroidie (-45°C) .



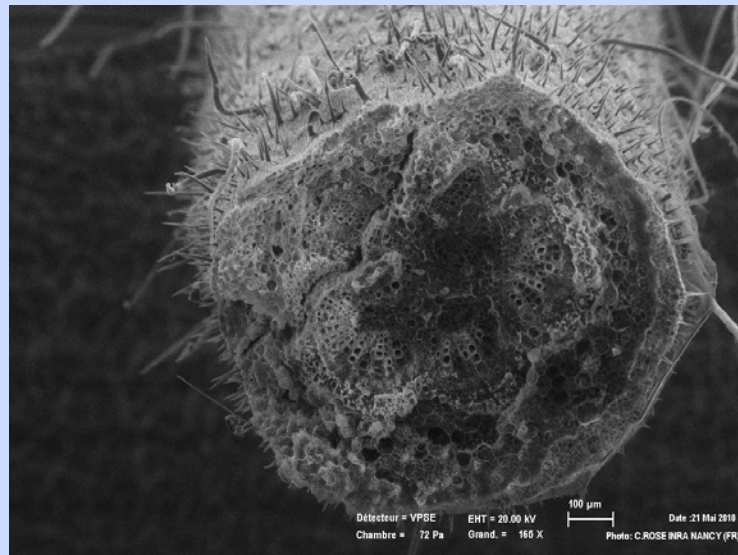
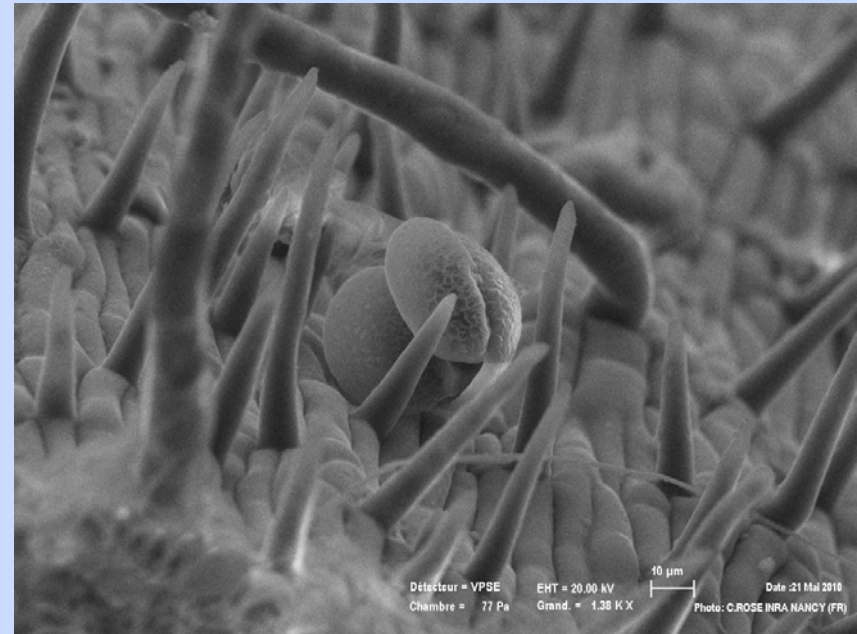
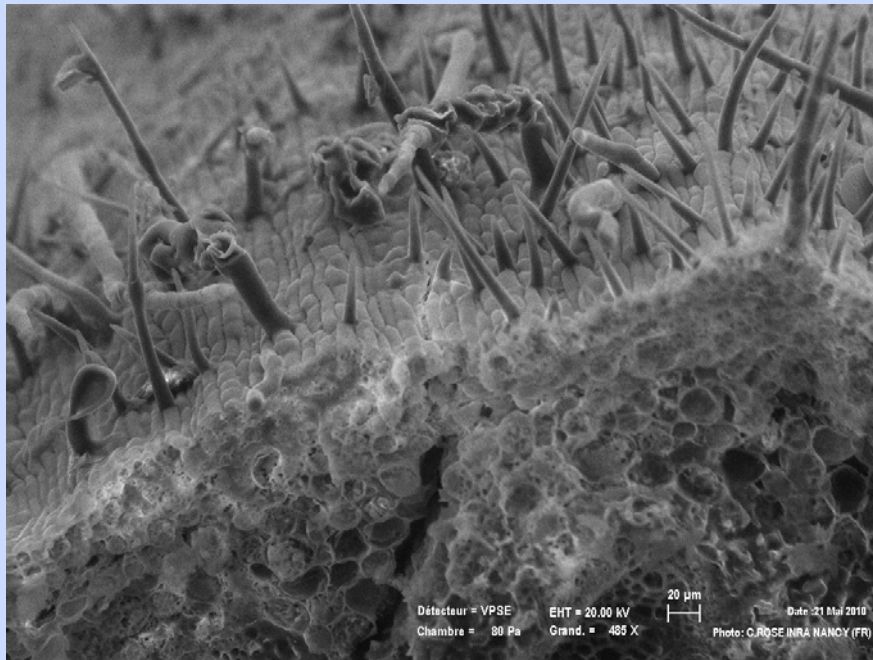
Spectre somme EDS

# 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 au skirt et aux charges )
  - Coût expérimental limité

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

- La mise en place, dans de l'eau à température proche du point de congélation, d'échantillons biologiques préalablement congelés permet d'augmenter la rigidité, le contrôle de la déshydratation et de la température de ces objets malgré l'effet physique du faisceau d'électrons, elle accroît la possibilité d'observations longues et à assez haute résolution en mode pression contrôlée avec une température régulée efficacement par une platine à effet Peltier .
- 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.



*Merci de votre  
attention*