

**CRYO-MEB HV-VP(Pression Contrôlée)  
Applications En Recherche Forestière**

Christophe ROSE  
Centre INRA-GRAND-EST-NANCY  
Plateforme Silvatech  
[christophe.rose@inra.fr](mailto:christophe.rose@inra.fr)

Fichier Édition Affichage Historique Marque-pages Outils ?

UMR SILVA - Présentation

https://www6.nancy.inra.fr/silva/Plateformes/SilvaTech/Presentation

Rechercher

Les plus visités Google Actualités Site Intranet du centre... Réseau des Microscop... Christophe Rose - Out... Google Traduction RCCM : Réseau des Ce... CAZAC - Actualité de... FileSender 2.0 listermui - Réseau des... Réservation des équip... Accueil GN-MEBA Bienvenue sur POP&P...

Accueil • Plateformes • SilvaTech • Présentation

# https://www6.nancy.inra.fr/silva/Plateformes/SilvaTech

## Présentation

a plateforme **SILVATECH** est une plateforme nationale dédiée à l'**analyse des écosystèmes forestiers et du bois**.

La gamme de techniques et méthodes développées permet des approches intégrées des **échelles moléculaires à la parcelle**, une capacité de décryptage des **structures, propriétés et fonctions**, de l'**arbre dans son écosystème** jusqu'au **bois matériau**.

SILVATECH est portée par l'UMR SILVA (429) ainsi que l'UMR BEF (428), l'UMR IAM (426) et l'UMR LEMAR (EA 4270).

### Pôle Imagerie-Microscopies : imagerie haute-résolution électronique et confocale, cryo-microscopie-électronique, microanalyses X minérales, histologie et microscopie photonique, plateau de préparation des échantillons (microtomie et cryo-microtomie, lyophilisation, métallisation, broyages)

accru dans les réseaux nationaux et internationaux, les actions de formation régionales et européennes, l'attractivité auprès des chercheurs internationaux.

D'un point de vue fonctionnel, SILVATECH s'organise en 3 pôles techniques interconnectés :

- > **Pôle Isotopie-Biochimie** : couplages de spectrométrie, chromatographie, isotopie, plasma dédié à l'analyse des molécules aux matrices complexes (bois, sève, sol eau), plateau de préparation des échantillons (broyage, extractions, micropesée)
- > **Pôle Imagerie-Microscopies** : imagerie haute-résolution électronique et confocale, cryomicroscopie-électronique, microanalyses X minérales, histologie et microscopie photonique, plateau de préparation des échantillons (microtomie et cryo-microtomie, lyophilisation, métallisation, broyages)
- > **Pôle d'Imagerie-RX** : propriétés physiques et mécaniques, techniques laser, radiographie, tomographie et diffraction aux rayons X, permettant une étude fine et multi-échelle de la structure interne et externe des objets d'étude, ateliers de préparation (bois et métal).

Plateformes

- ▼ SIG et Bases de Données
  - > Présentation
  - > Personnels
- ▼ SilvaTech
  - > Présentation

Accès - Contacts +

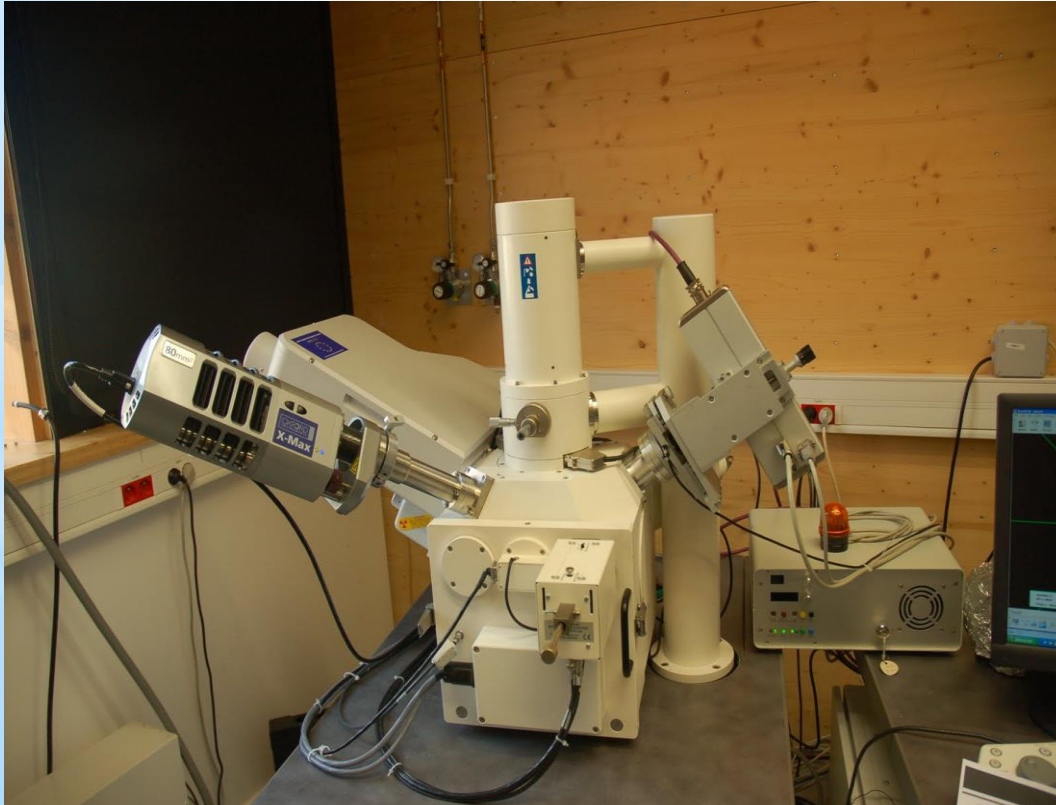
Emplois / Stages +

Archives +

17:15  
14/01/2019

## **MEB 1450 VP LEO (2001)**

### **MICROSCOPIE ELECTRONIQUE à BALAYAGE et MICROANALYSES**



- canon tungstène
- chambre à pression contrôlée

#### **IMAGERIE**

- détecteur électrons rétrodiffusés
- détecteur électrons secondaires mode HV
- détecteur électrons secondaires mode PC

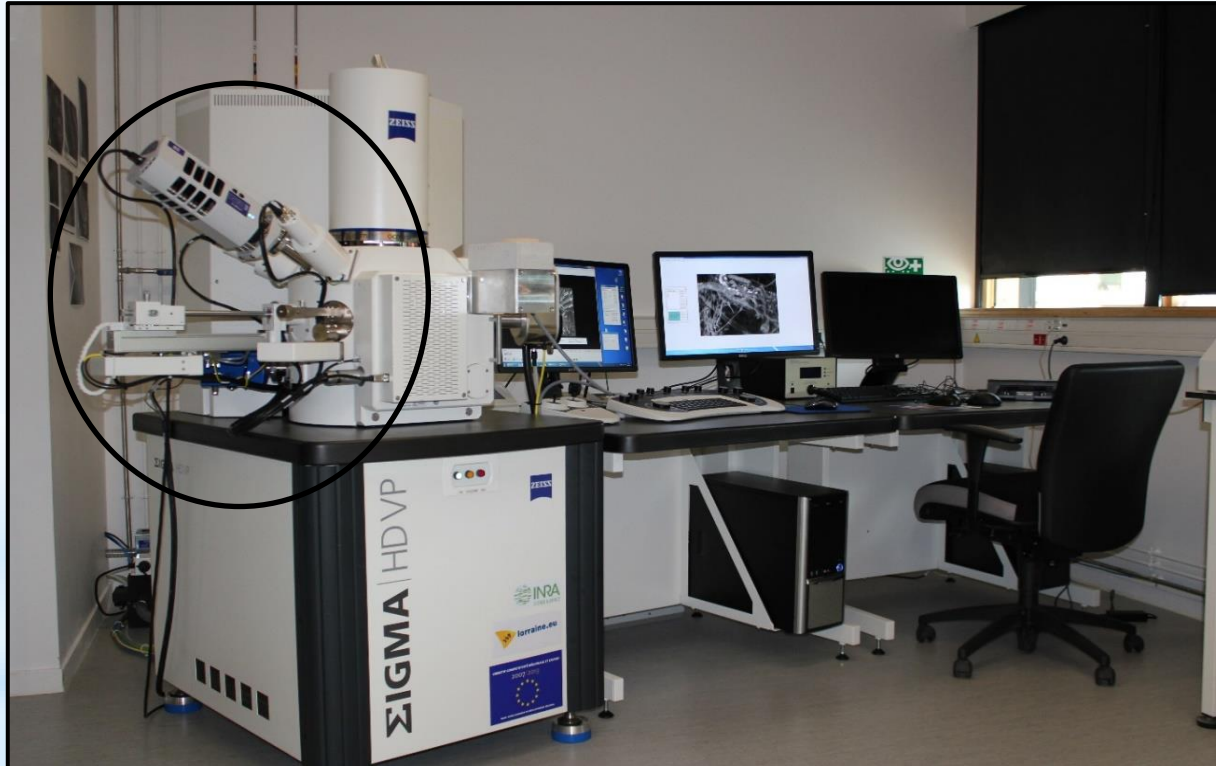
#### **CRYO-TRAITEMENT**

- platine effet Peltier  $-50^{\circ}\text{C}$

#### **SPECTROMETRIE- MICROANALYSES**

- spectromètre à sélection d'énergie (EDS-SDD)
- spectromètre à dispersion de longueur d'onde (WDS)
- Générateur de 'faisceau poly-capillaire' de rayons X (micro-analyse EDX des rayonnements)

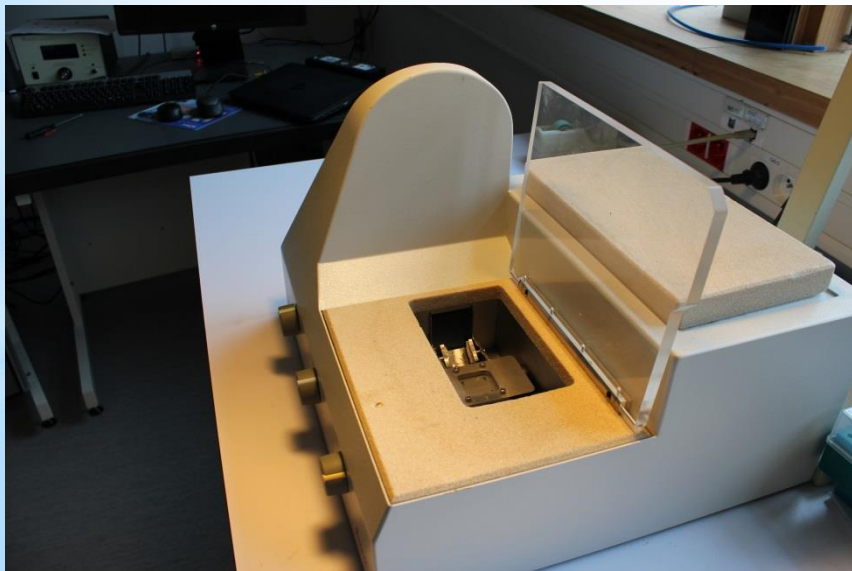
# MEB FEG SIGMA HD –VP ZEISS (2015)



- Imagerie
- Inlens SE
- SE
- BSE
- SE(PC)
- STEM
- Spectrométrie
- EDS–SDD 80 mm<sup>2</sup>



## EQUIPEMENTS CRYOGENIQUES

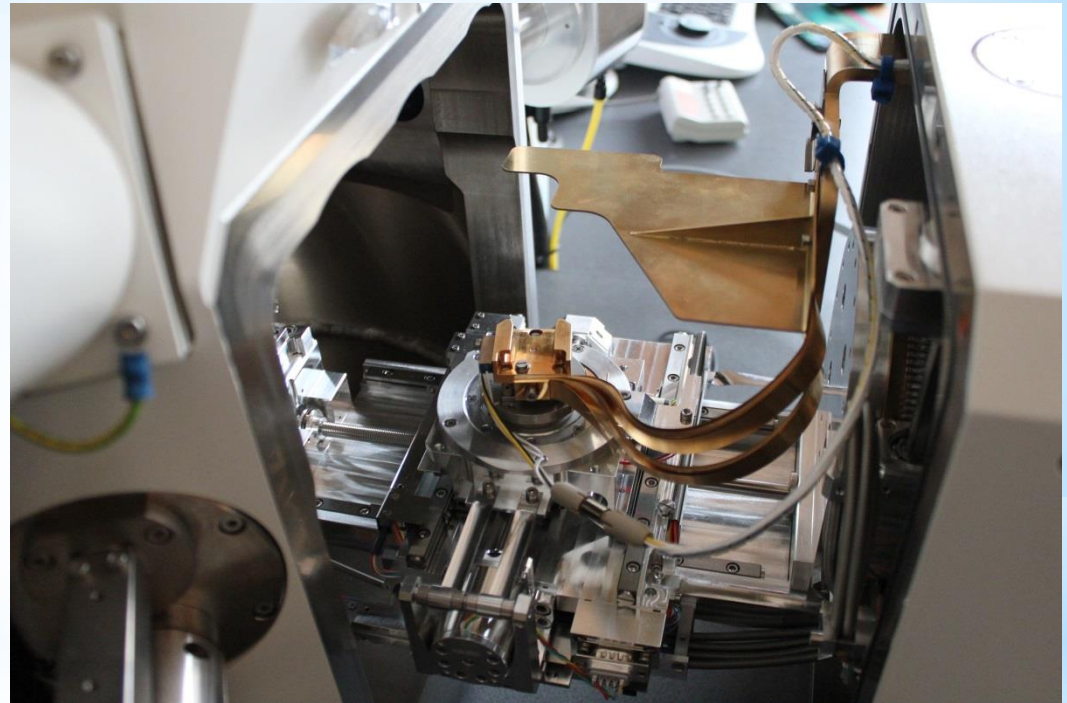


## PREPARATIONS

Pression contrôlée:  
1-133 Pa (0.01-1.33mbar)  
Température:  
+50°C;-50°C



Haut Vide  
10<sup>-5</sup> Pa (10<sup>-7</sup> mbar)  
Température:  
+60°C;-160°C



## EQUIPEMENTS CRYOGENIQUES *in SEM*

# ECHANTILLONS FORESTIERS

> 30% *Enlever l'Eau*

- SECHAGE (air; étuve,...)
- DESHYDRATATION Physico-chimique (bains eau –éthanol/acetone + évaporation)
- DESHYDRATATION + CONTOURNEMENT DU POINT CRITIQUE
- LYOPHILISATION (après congélation/cryofixation)
- ...

< 30% *Garder l'Eau*

METALLISATION

MEB-MODE HV

Eau Liquide

MEB-MODE ESEM(PC)  
+Platine Peltier

Eau Congelée  
/Cryofixation

MEB-MODE PC  
+Platine Peltier

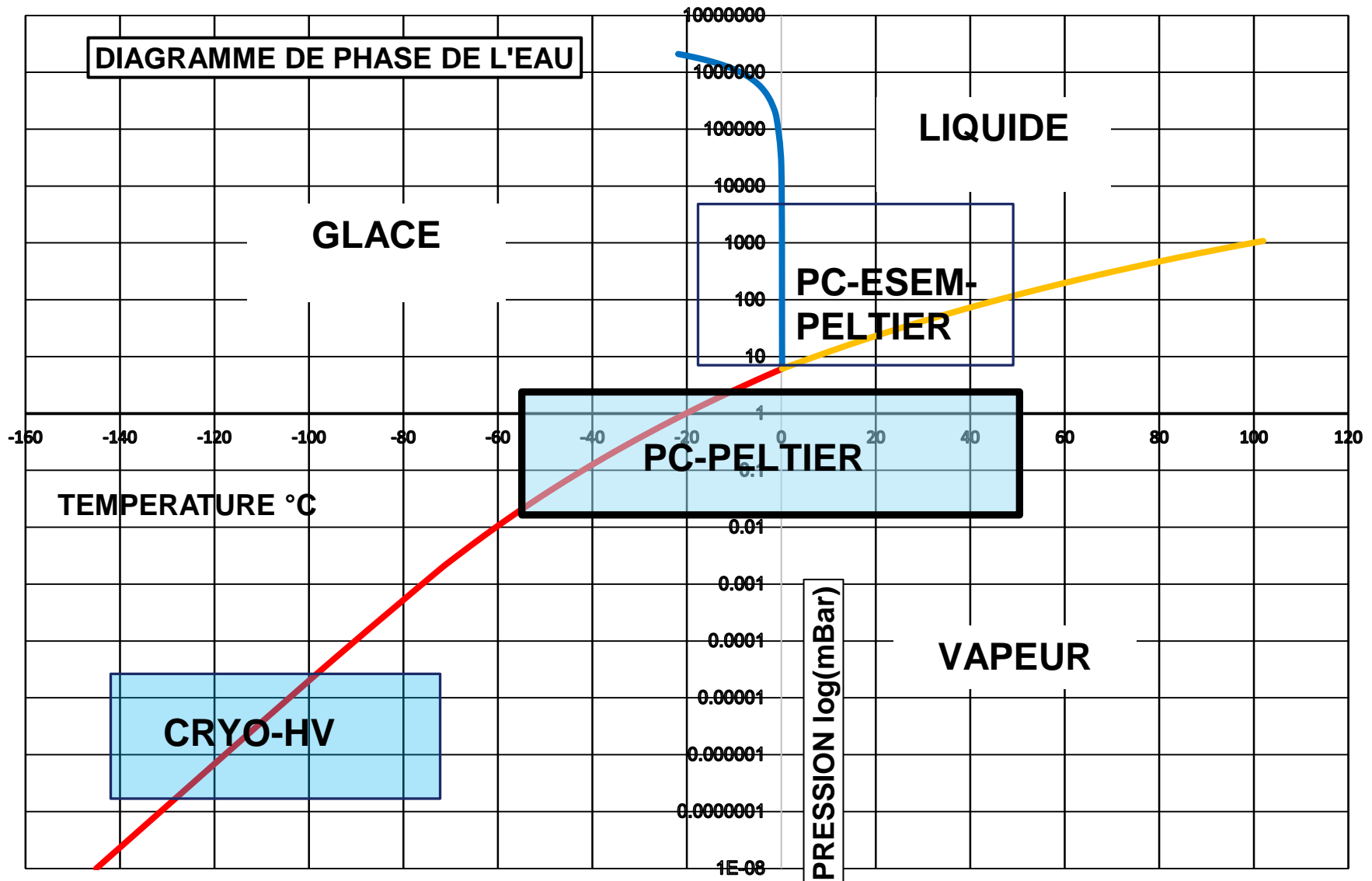
MEB-MODE PC  
+Platine CRYO

MEB-MODE PC

METALLISATION mode cryo

MEB-MODE HV  
+Platine CRYO

# Domaines d'utilisation des différents modes



# 1 Exemple: Cryo-MEB EDS

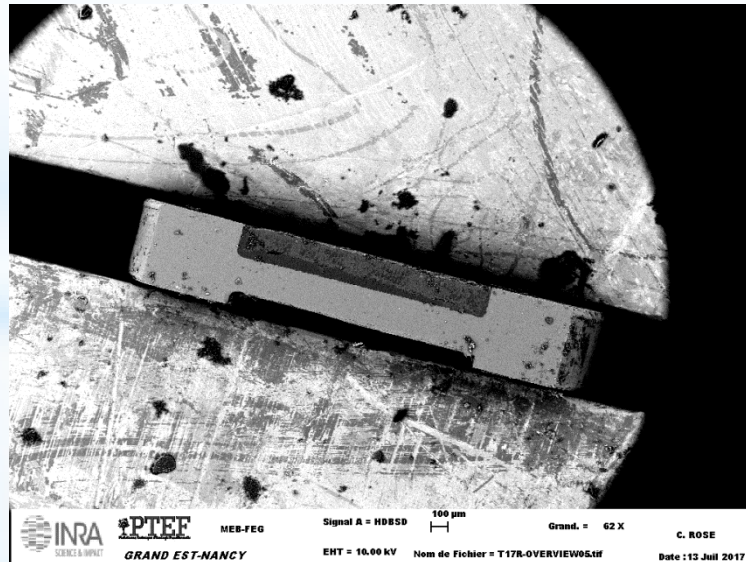
Collaboration WSL (Ch)-Université de RIGA



Congélation HPF

Cryo-Ultramicrotomie

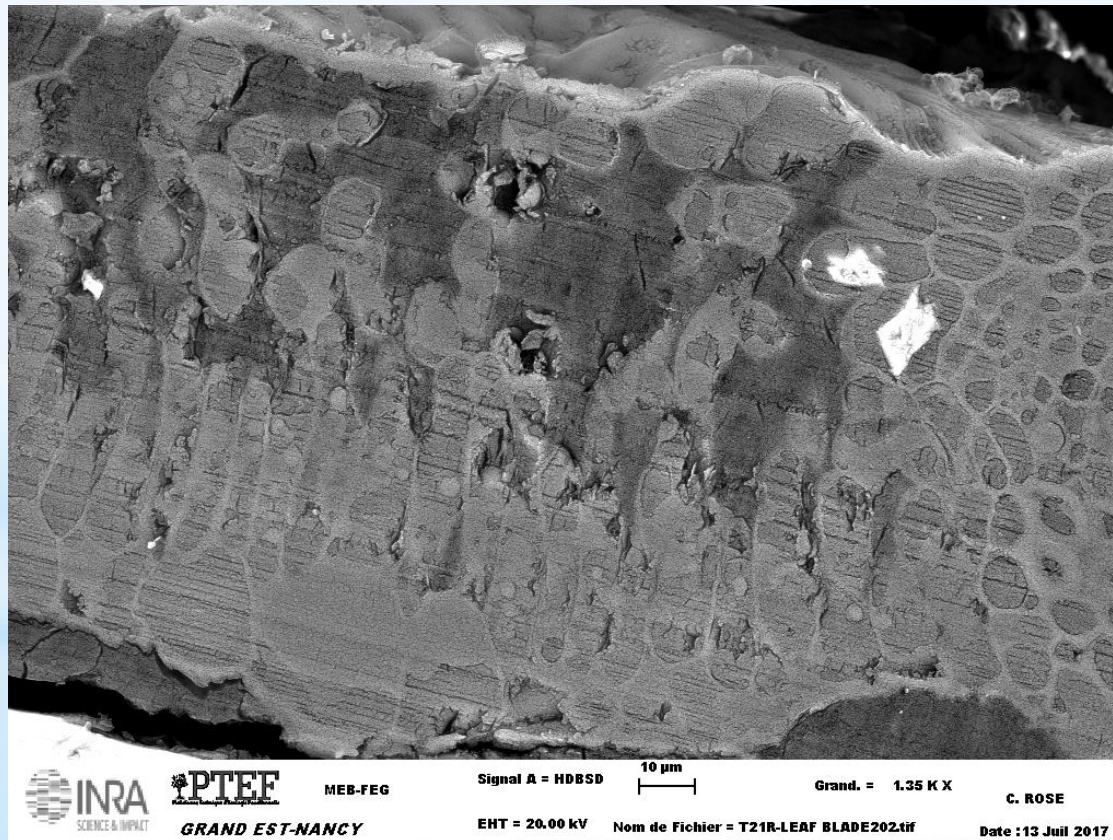
INRA-SILVATECH

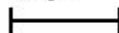
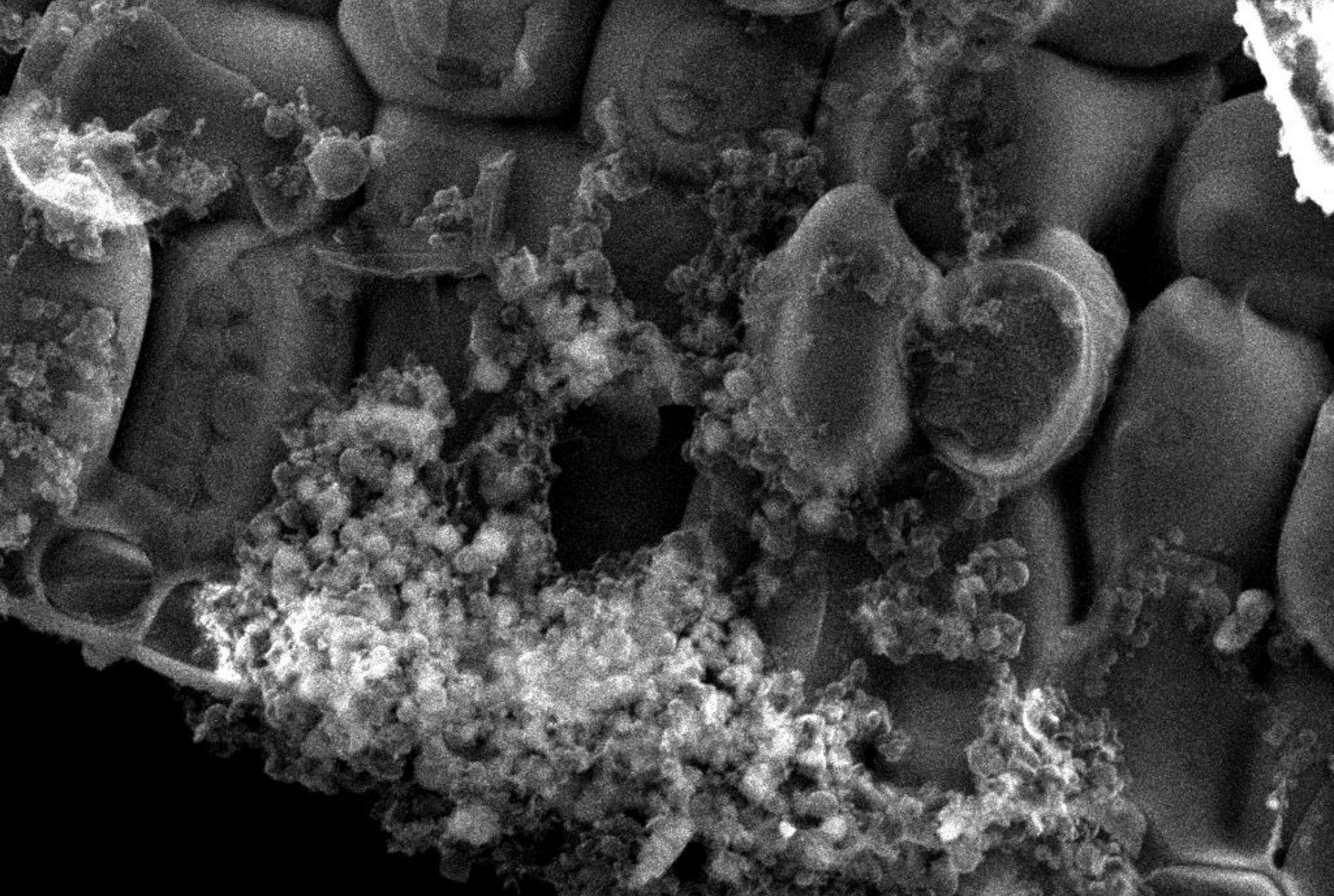


RIGA Lettonie



- La préparation spécifique des surfaces et leur maintien permanent en mode cryogénique permet la préservation intégrale des contenus cellulaires et donc une micro-analyse X minérale très efficace dans les cellules.
- Le surfaçage idéal par cryo-ultramicrotomie renforce la qualité des mesures chimiques: surfaces quasi planes et non rugueuses.
- La gestion de la sublimation de la glace d'artefact reste primordiale



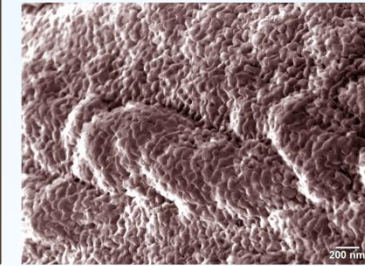
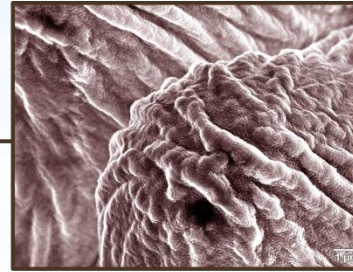
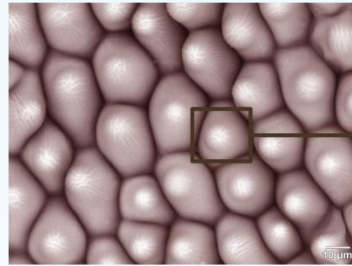
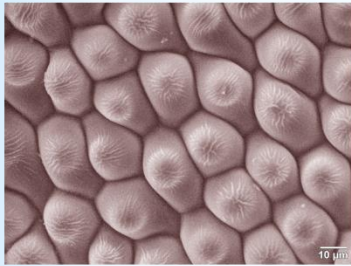


## 2<sup>eme</sup> Exemple :

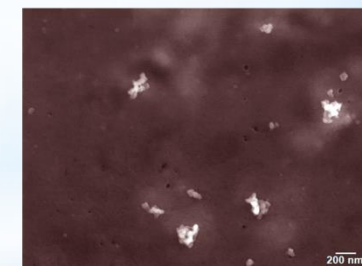
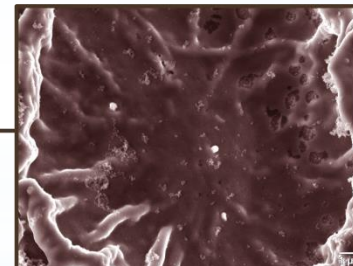
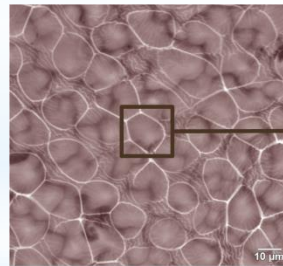
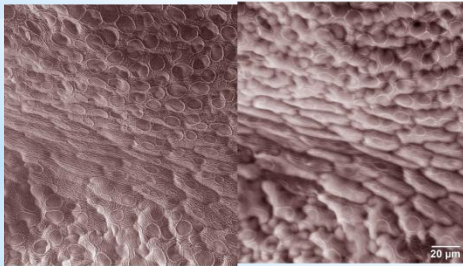


*ROSA damascena*

Face Sup:  
Adaxiale

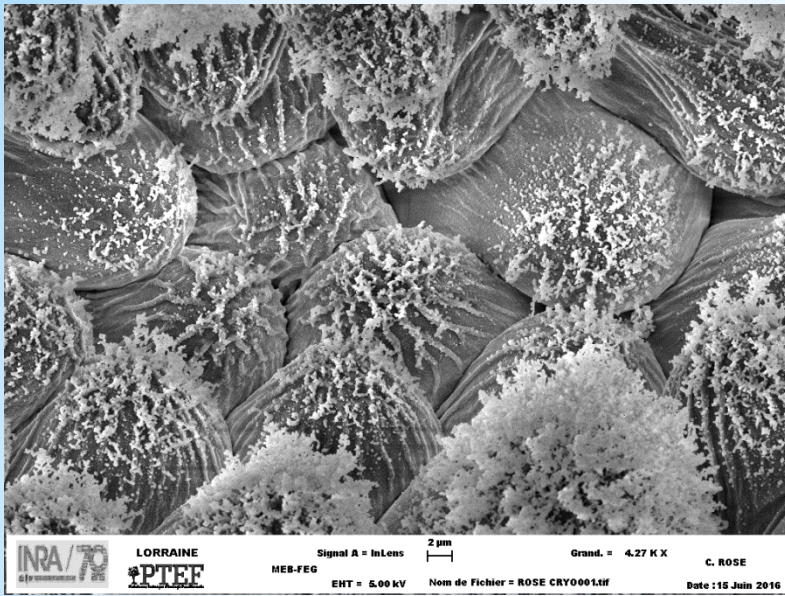


Face Inf:  
Abaxiale

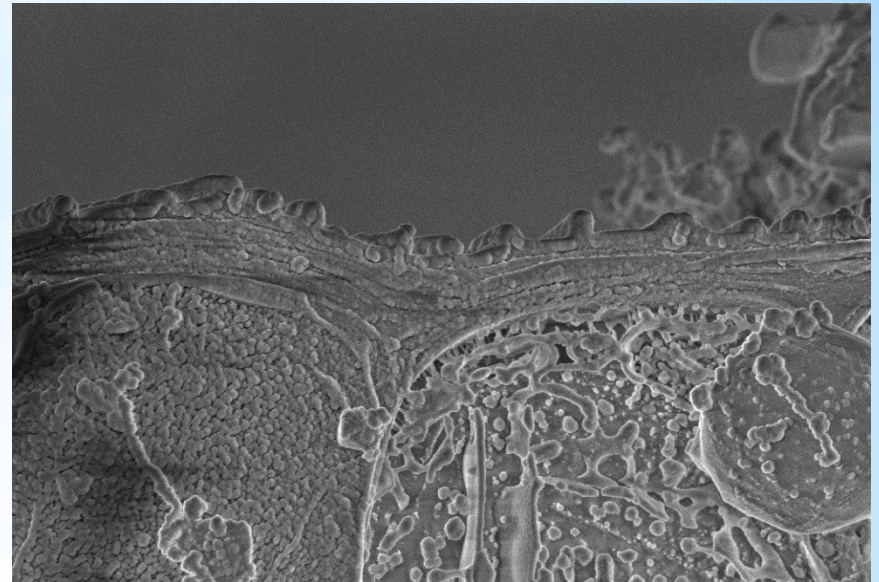


Pression contrôlée  
+ Platine Effet Peltier

Vide Secondaire  
+ Platine Cryo



INRA/70 LORRAINE PTEF  
 MEB-FEG Signal A = InLens 2 µm Grand. = 4.27 K X C. ROSE  
 EHT = 5.00 kV Nom de Fichier = ROSE CRY0001.tif Date : 15 Juin 2016



INRA/70 LORRAINE PTEF  
 MEB-FEG Signal A = InLens 2 µm Grand. = 9.94 K X C. ROSE  
 EHT = 3.00 kV Nom de Fichier = ROSE CRY0036.tif Date : 16 Juin 2016



INRA/70 LORRAINE PTEF  
 MEB-FEG Signal A = SE2 10 µm Grand. = 2.51 K X C. ROSE  
 EHT = 5.00 kV Nom de Fichier = ROSE CRY0007.tif Date : 15 Juin 2016



INRA/70 LORRAINE PTEF  
 MEB-FEG Signal A = InLens 2 µm Grand. = 4.75 K X C. ROSE  
 EHT = 3.00 kV Nom de Fichier = ROSE CRY0040.tif Date : 16 Juin 2016

# POSTER ECM 2016 LYON



## Using cryomethods around SEM technologies to characterize waxes on the surface of the petals of *Rosa damascena*

Eric Fernandez<sup>1</sup>, Christophe Rose<sup>2</sup>, Léa Rollin, Sylvie Marull-Tufeu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yves Rocher Research and Innovation- ROCHER GROUP, 7 chemin de Bretagne 92130 Issy-Les-Moulineaux, France

<sup>2</sup>Centre de Recherches INRA-LORRAINE UMR EEF-PTEF 54280 Champenoux

Cryo-fractures et observations avec une grande résolution dans les deux modes de vide sur des échantillons massifs et à des échelles complémentaires.

-Le mode pression contrôlée évite l'interaction des artefacts de glace et de métallisation.

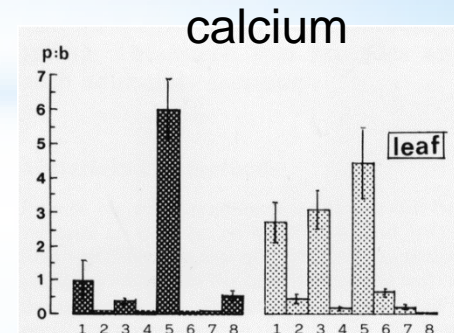
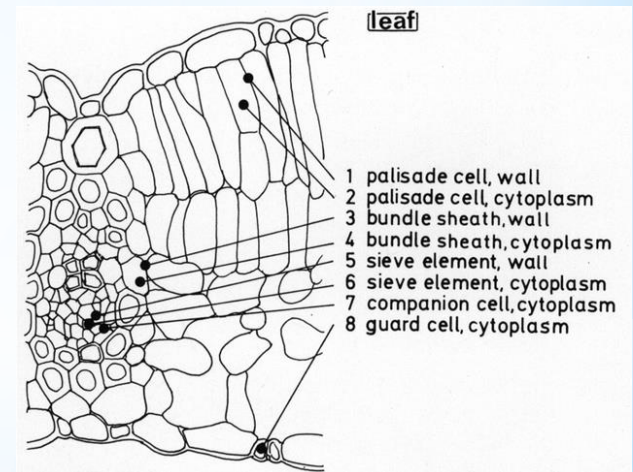
-Le mode en vide conventionnel permet les observations en haute résolution des surfaces de nos objets. Les perspectives de ce travail nous permettent d'envisager la visualisation et peut être la compréhension des mécanismes de fonctionnement des surfaces cuticulaires des pétales de rose (cires et émissions d'huiles essentielles )

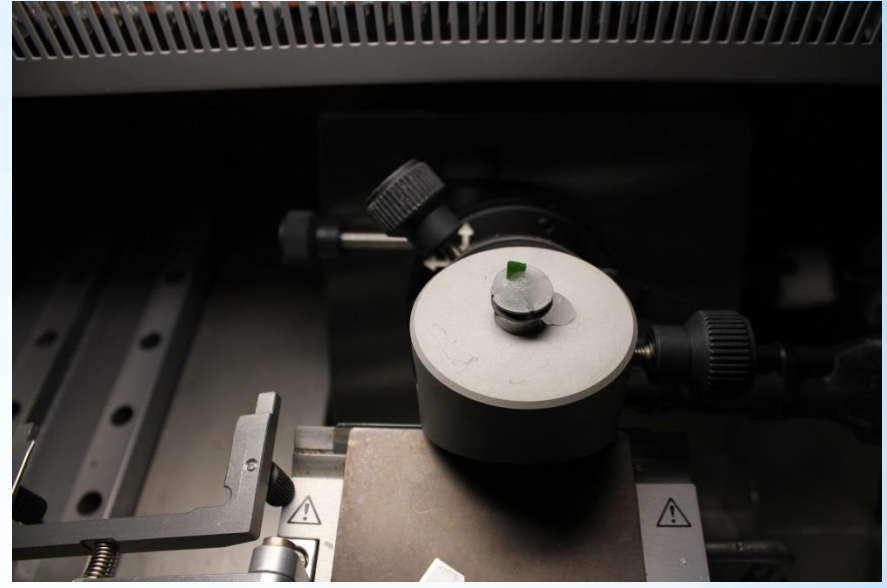
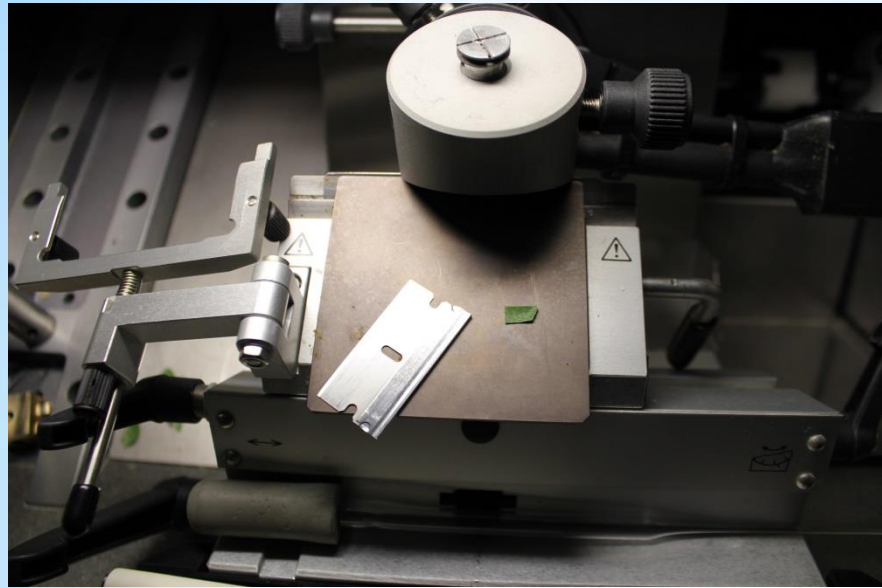
.

### 3<sup>eme</sup> Exemple: Développements en Cryo-MEB HV et PC

#### Projet de suivi des processus phénologiques de la sénescence foliaire

Eschrich et al. (1988). Mineral partitioning in the phloem during autumn senescence of beech leaves. *Trees* 2, 73-83

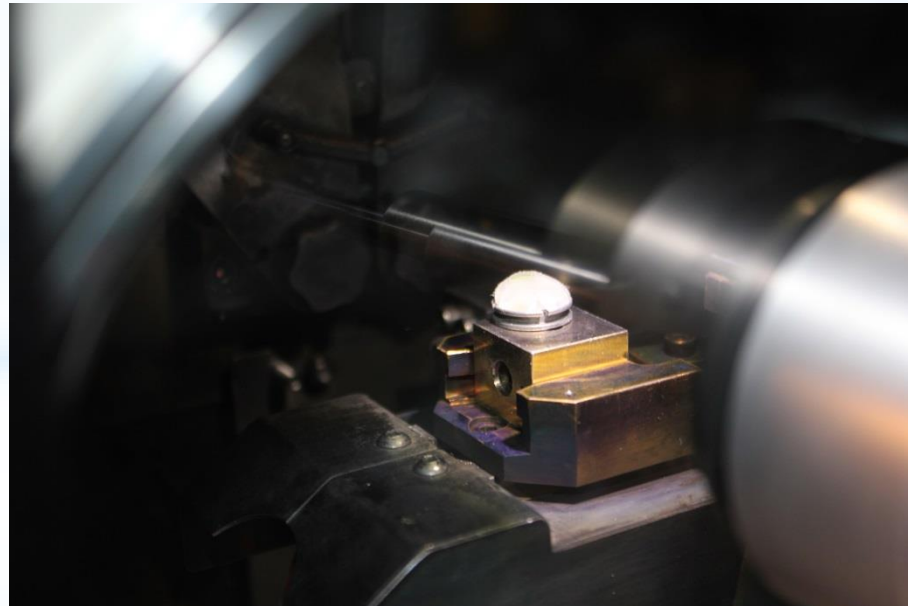




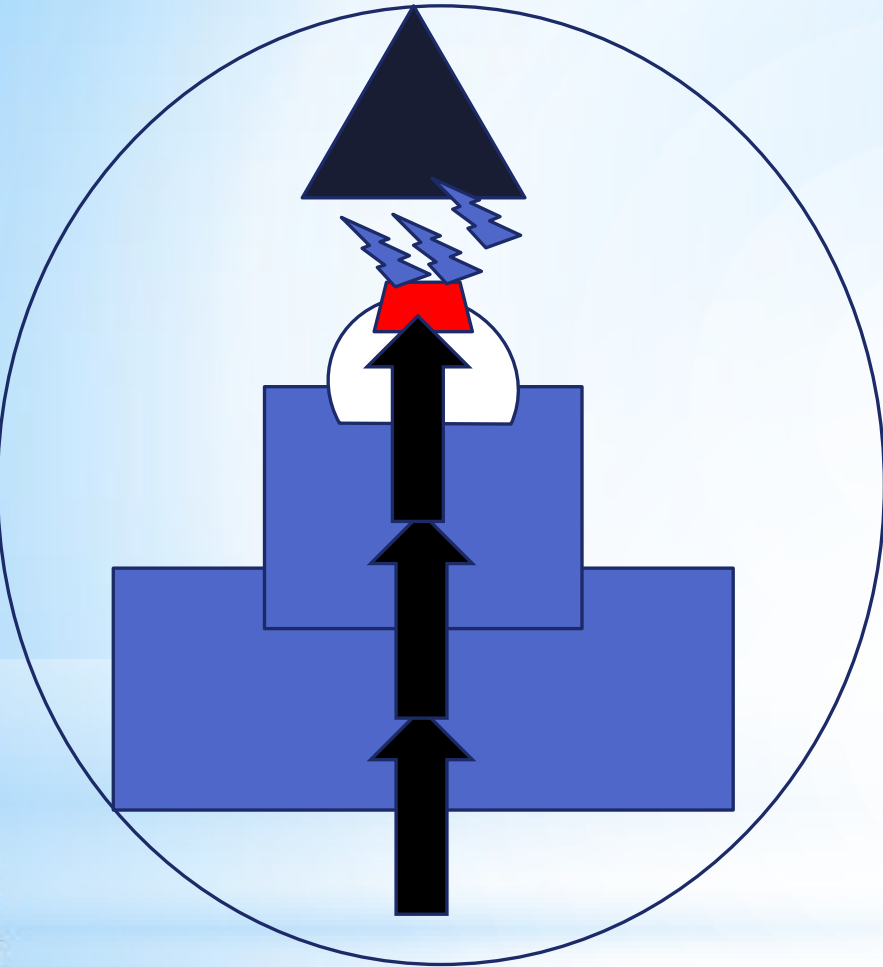
**Préparation des Echantillons  
Végétaux épais**

**Cryo-microtomie**

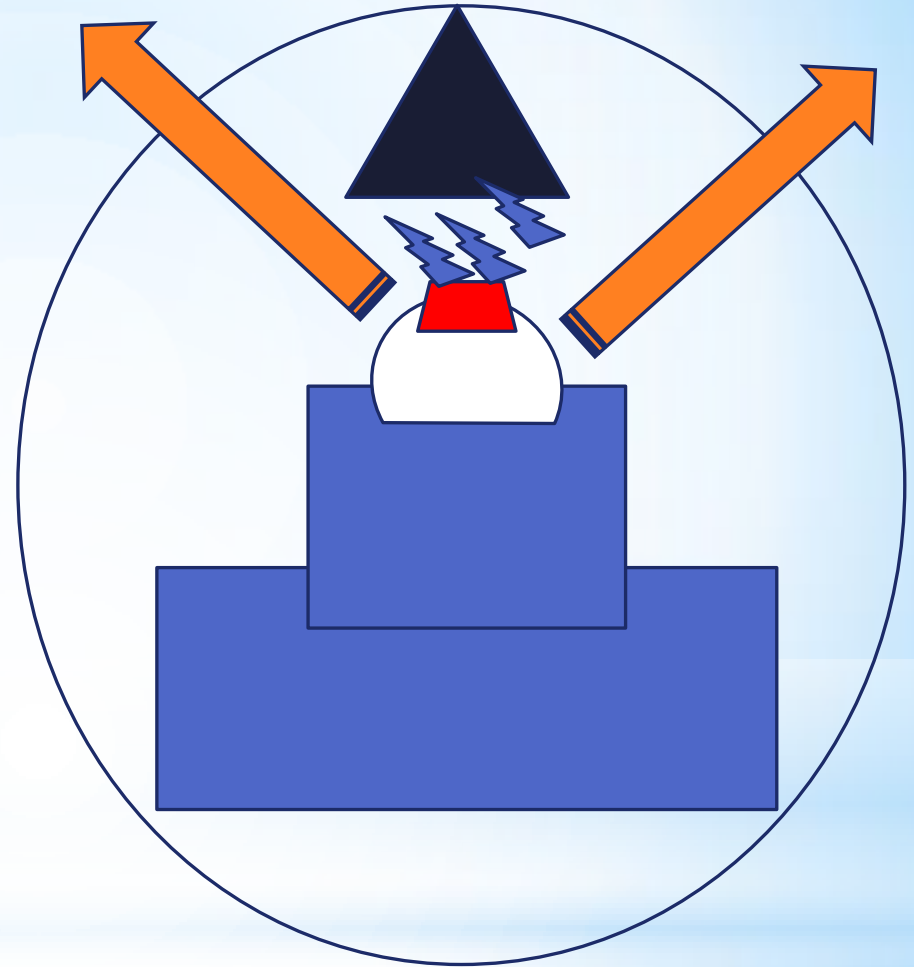
**Cryo-fracture**



**GN-MEBA POITIERS 2019**



Sublimation par  
Réchauffement en contexte  
Isobare (-140°C à -100°C)

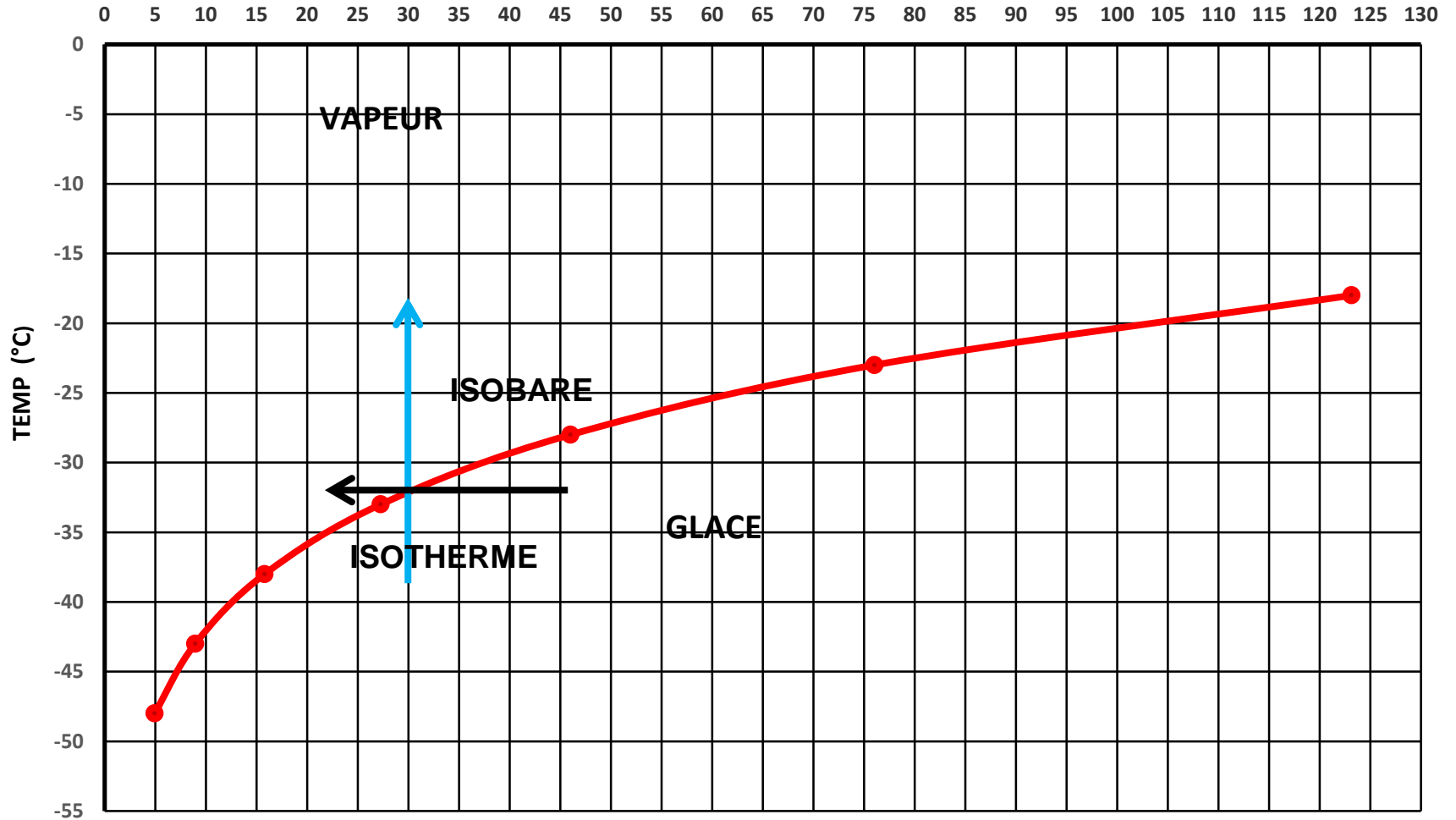


Sublimation par Détente en  
contexte Isotherme (55Pa à  
30Pa)

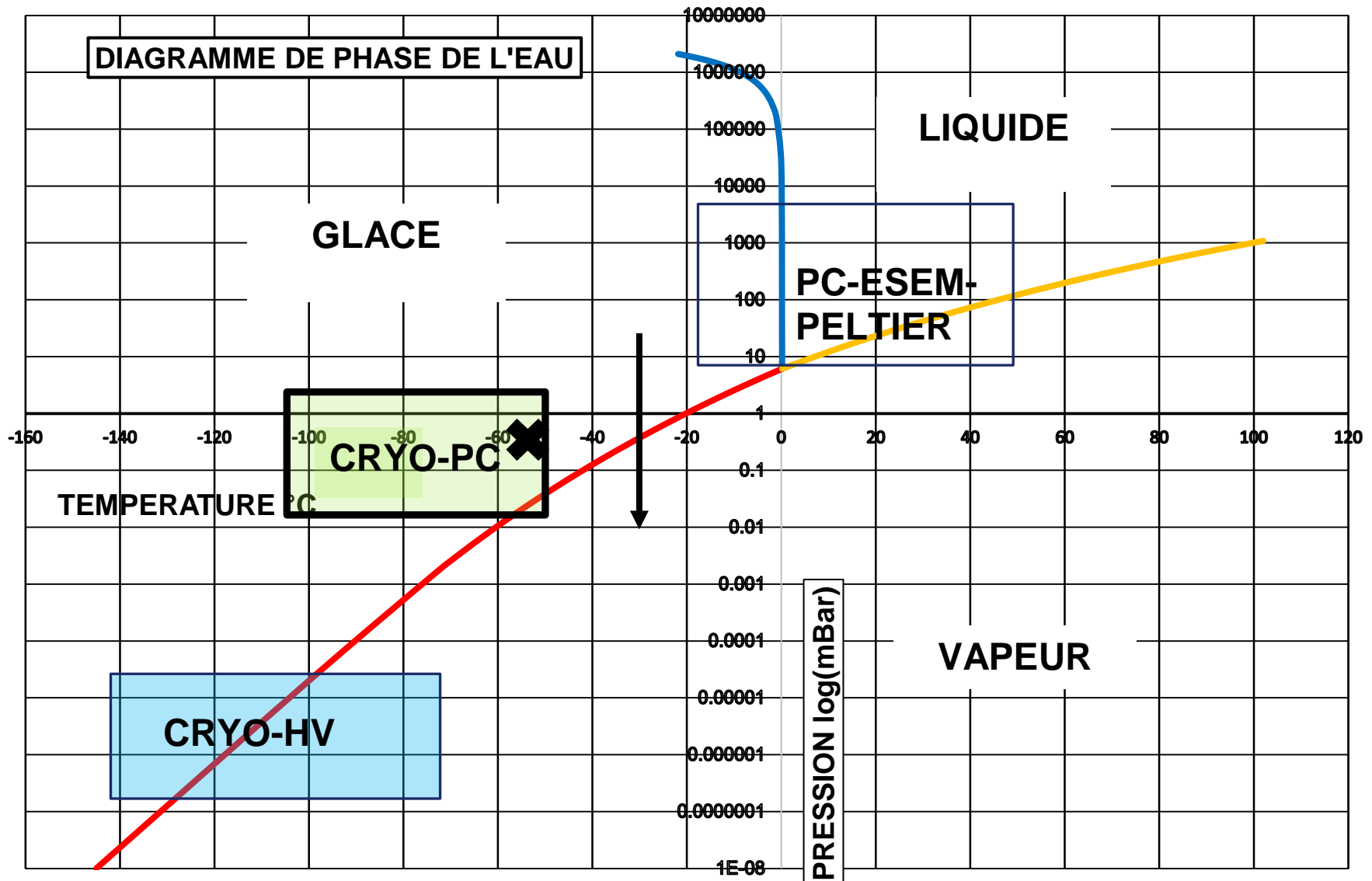
# SUBLIMATION DE LA GLACE 'artefact' en mode Pression contrôlée

Diagramme de phase glace/vapeur

PRESSION (Pa)



# Domaines d'utilisation des différents modes

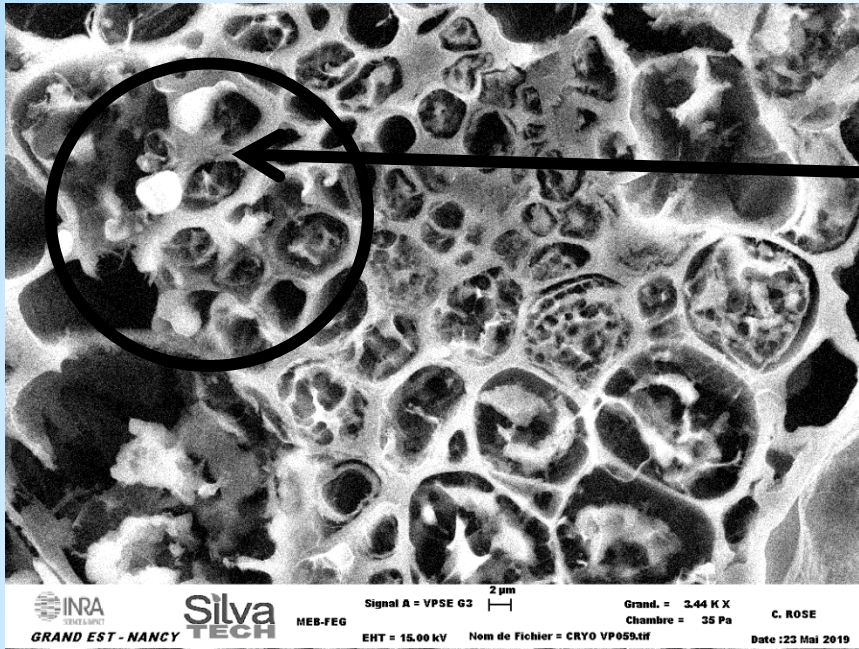




# SUBLIMATION DE LA GLACE 'artefact' en mode Pression contrôlée

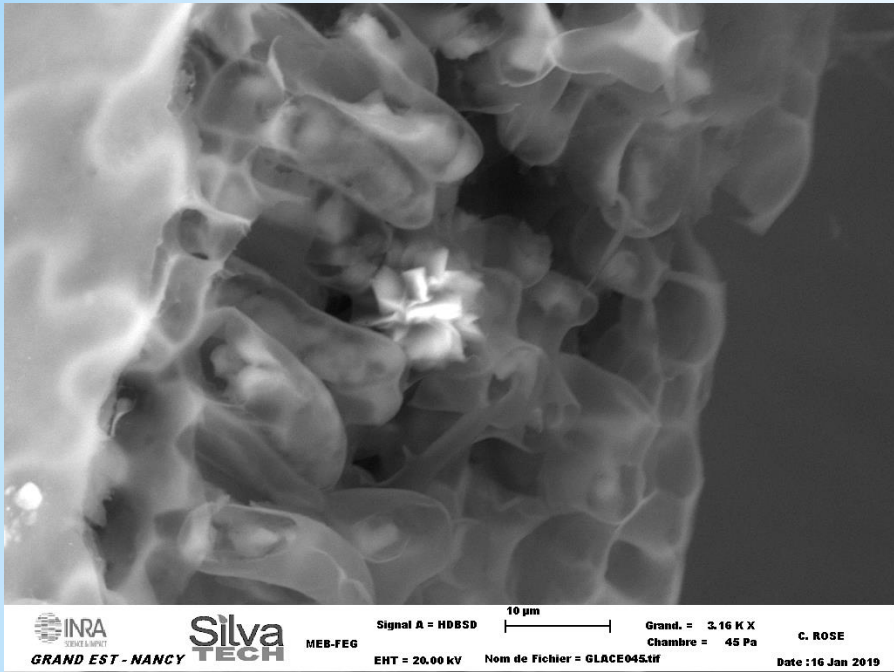


# SUBLIMATION DE LA GLACE 'artefact' en mode Pression contrôlée

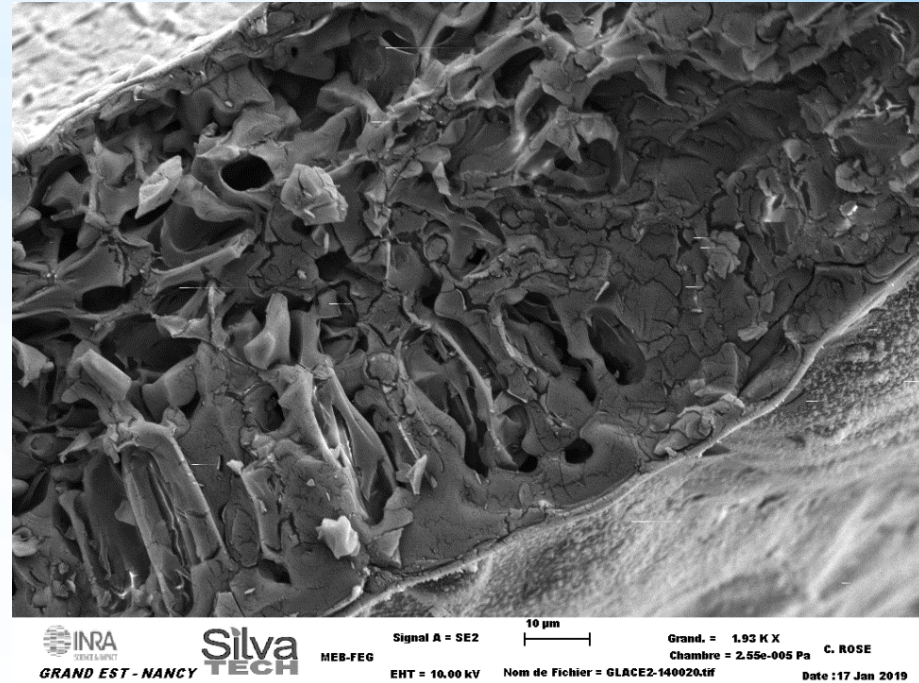


2MN ENVIRON



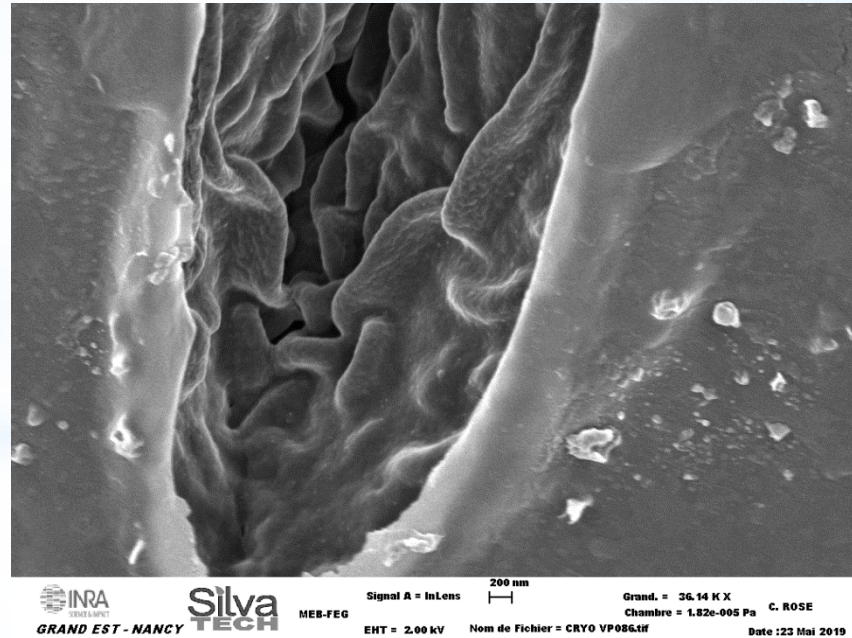
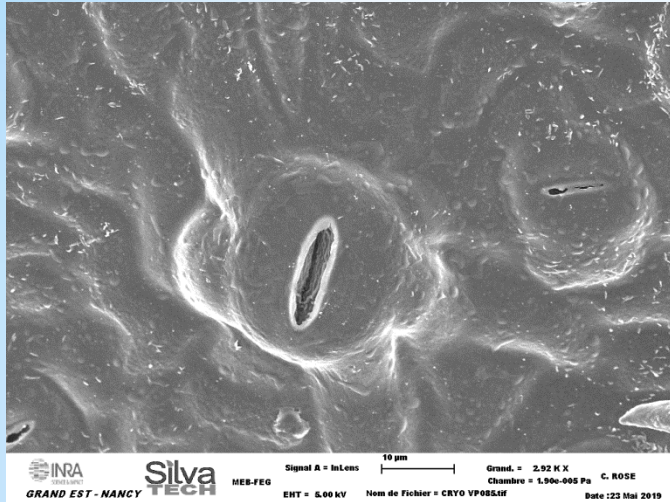


Observations en mode « cryo-pression contrôlée »



Observations en mode « cryo-haut vide »

# Observations en mode cryo-HV après 'préparation' en mode cryo-pression contrôlée



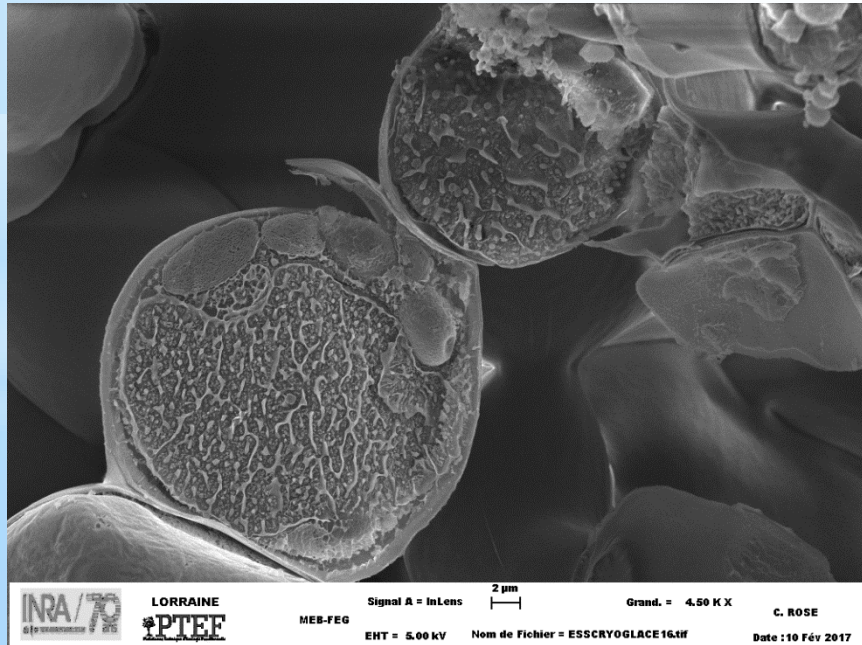
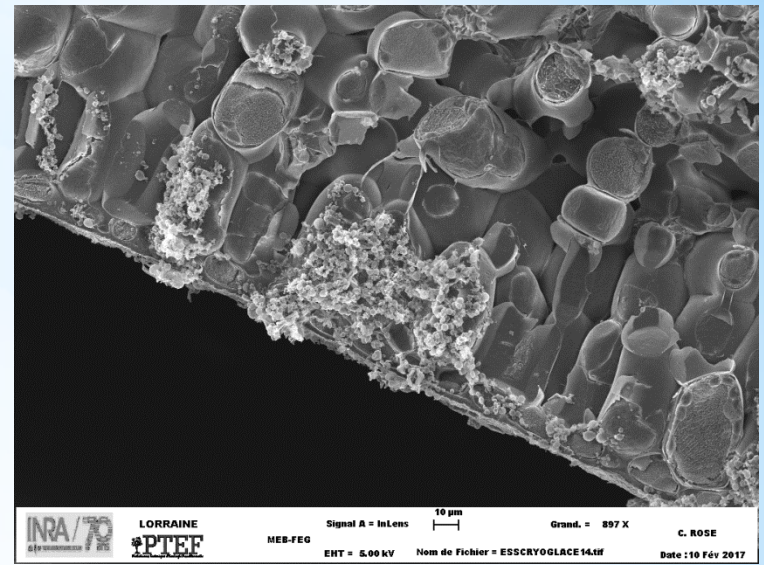
## **Conclusions:**

**-L'utilisation des systèmes et technologies en Cryo-Meb sont adaptables aux échantillons 'forestiers' traités sur la plateforme .**

**-Le maintien de l'eau congelée dans les structures permet des observations à haute résolution et améliore la qualité des mesures notamment pour la micro-analyse X.**

**-L'acquisition et la pratique récente de cette discipline hautement résolutive a confirmé que la qualité des résultats est fortement liée à des expérimentations répétées et à des développements méthodologiques assez rigoureux.**

**-Les développements actuels et futurs en particulier à partir des équipements travaillant en pression contrôlée laissent présager une amélioration significative des techniques de préparation des échantillons: meilleure gestion de la sublimation de la glace superficielle ainsi qu'une complémentarité des informations issues de l'emploi de ces différents modes .**



**MERCI DE VOTRE ATTENTION**

