



Panorama des techniques microscopiques adaptées à l'imagerie descriptives des cellules de bois



Françoise Laurans



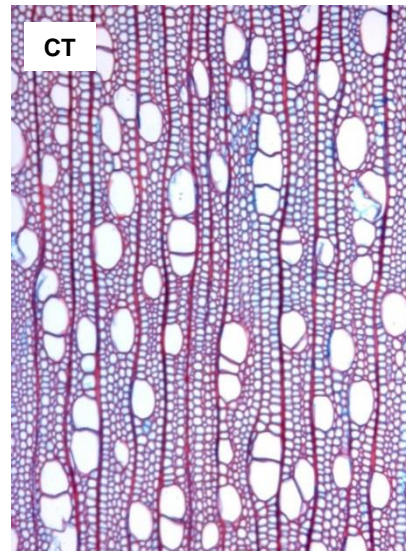
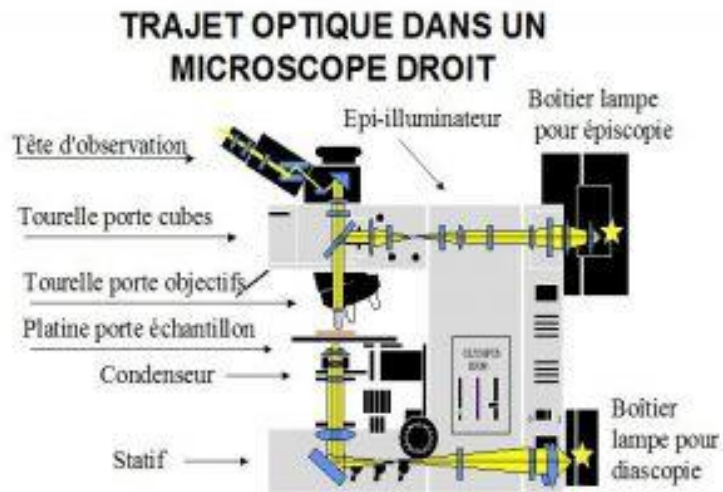
11/ 05/ 2016

Microscopie Photonique

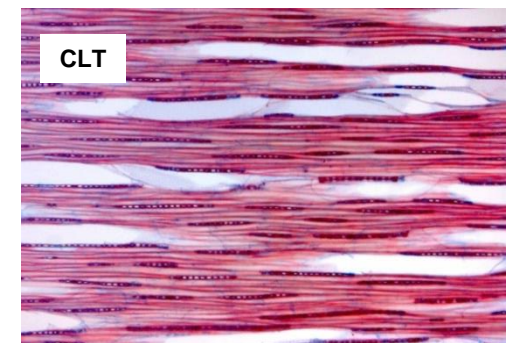
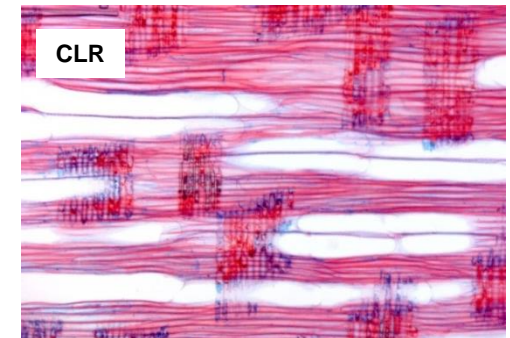
Le microscope photonique est un système optique utilisant des ondes lumineuses (**photons**) pour permettre l'obtention d'une image **grossie** et **résolue** d'un objet invisible à l'oeil nu.

Il existe 2 grandes techniques qui se différencient par le procédé d'éclairage

- ❖ **la microscopie en lumière transmise (diascopie):** La lumière blanche est concentrée sur la préparation disposée sur une lame et la traverse. Nécessite la réalisation de coupes fine à semi fines ($0,8\mu\text{m}$ à $50\mu\text{m}$).



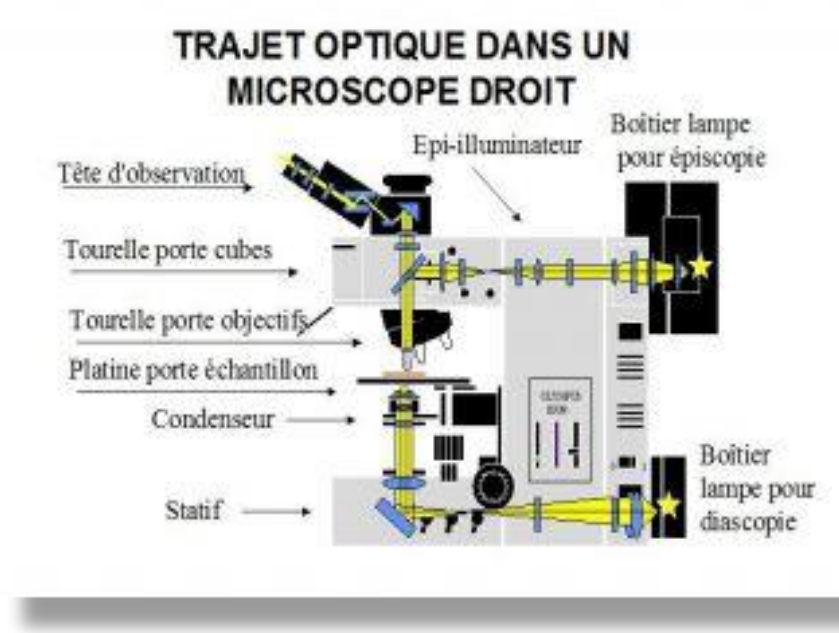
Peuplier obj 5x Bleu astra/safranin
coupes $30\mu\text{M}$



Microscopie Photonique

Il existe 2 grandes techniques de microscopie qui se différencient par le procédé d'éclairage

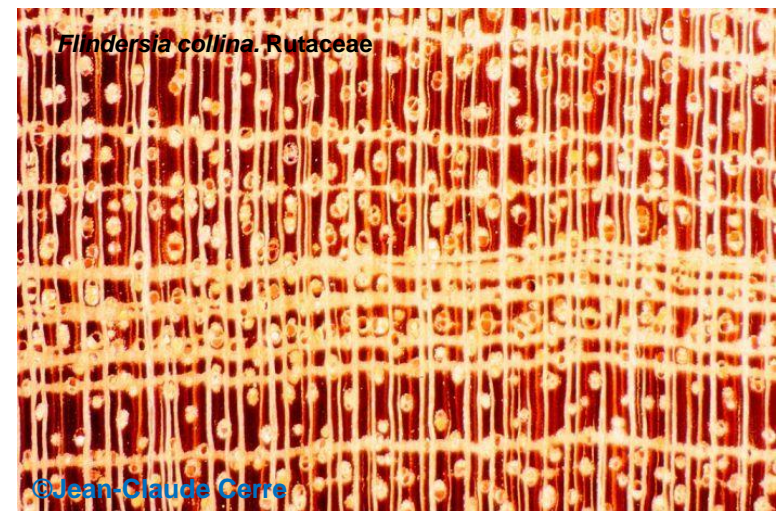
- ❖ la microscopie en lumière transmise (diascopie):
- ❖ **la microscopie en lumière réfléchi (épiscopie)** : Adaptée à l'étude des objets opaques. La lumière est renvoyée à 90° sur la préparation en traversant l'objectif, elle se réfléchit sur l'objet et retraverse l'objectif pour former l'image observable.



Microscopie Photonique

Il existe 2 grandes techniques de microscopie qui se différencient par le procédé d'éclairage

- ❖ la microscopie en lumière transmise (diascopie):
- ❖ la microscopie en lumière réfléchi (épiscopie) :
 - **Intérêt** : Pas de préparation de coupe, Observation sur échantillon massif.
 - **Inconvénient** : état de surface important, polissage.



Caractéristiques d'un microscope photonique

- ❖ **Grossissement** : $G = \text{grossissement objectif} \times \text{grossissement oculaire}$.
- ❖ **Résolution ou Pouvoir séparateur** : Capacité à séparer 2 points voisins
- ❖ **Limite de résolution** : La plus petite distance (d) en dessous de laquelle 2 points voisins ne seront plus distingués.

Formule d'Abbe

$$d = 0,6 \lambda / \text{O.N.} \quad d = 0,6 \lambda / n \sin \alpha$$

λ = longueur d'onde de la lumière utilisée

- ❖ **O. N. = Ouverture numérique de l'objectif** : Largeur maximale du cône de lumière pénétrant dans la lentille

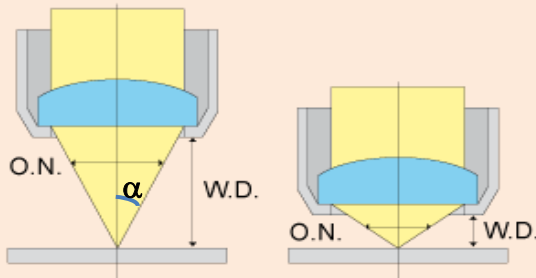
$$\text{O.N.} = n \sin \alpha$$

α = demi-angle du cône de lumière entrant dans l'objectif

n = indice de réfraction du milieu entre l'objet et la lentille

O.N. ne dépasse pas 1,4 (gravée sur les obj.)

Plus la puissance de l'objectif est forte plus l'O.N. augmente mais plus la distance frontale diminue.



Résolution latérale

Caractéristiques d'un microscope photonique

- ❖ **Résolution Axiale - Profondeur de champs** : Distance entre le point le plus haut et le point le plus bas de la préparation qui donne une image nette.

$$D_z = 2 n \lambda / O.N.^2$$

Elle dépend de l'ouverture numérique : la profondeur de champ diminue lorsque l'ouverture numérique augmente.

La Profondeur de champs est faible en microscopie optique à fond clair.

(25µm obj10x, 1µm obj 100x)

- ❖ **Grossissement utile** : celui qui conduit aux meilleures images

il est compris entre 500 x O.N. et 1000 x O.N. de l'objectif

Meilleurs objectifs ont une O.N. de 1,4 il ne sert à rien de les utiliser à des grossissement supérieurs à 1000 x O.N. soit 1400x. Un fort grossissement ne sert à rien si la résolution ne permet pas de séparer les structures fines .

Caractéristiques d'un microscope photonique

Grandissement Obj	Ouverture Numérique	Limite de Séparation (μm)	Profondeur de champs (μm)
2	0,04	7,5	300
10	0,25	1,2	8
20	0,50	0,6	2
40	0,75	0,4	0,9
100	1,4	0,2	0,3

- ❖ Les conditions optimales pour la meilleure image : Compromis entre Résolution, Grossissement, Profondeur de champs, Distance de travail des objectifs.

Adaptations du microscope photonique

Limitation de la microscopie optique en fond clair : faible contraste des cellules observées.

L'augmentation du contraste des tissus obtenu sans coloration. Méthode de contraste physique.

Adaptations du microscope photonique à fond clair à d'autres modes d'observations

❖ **Fond noir** : La lumière transmise n'atteint pas directement l'objectif. Seule la lumière déviée par

l'échantillon atteint l'objectif.

Le fond de l'image apparaît sombre, les objets de l'échantillon paraissent clairs.

Permet de bien visualiser les contours.

Adaptations du microscope photonique

Limitation de la microscopie optique en fond clair : faible contraste des cellules observées.

L'augmentation du contraste des tissus obtenu sans coloration. Méthode de contraste physique.

Adaptations du microscope photonique à fond clair à d'autres modes d'observations

❖ **Fond noir**

❖ **Contraste de phase** : exploite les changements de phase d'une onde lumineuse traversant un échantillon.

L'œil humain est uniquement sensible aux différences d'amplitude (luminosité) et de longueur d'onde (couleur). Les objets non colorés ne produisent pas de différences d'amplitudes ou de longueur d'onde sur la lumière qui les traversent mais induisent des changements de phase.

Principe de la microscopie en contraste de phase est basé sur l'obtention d'une image d'amplitude à partir d'un objet de phase. 2 anneaux de phase, l'un placé dans le condenseur l'autre dans l'objectif

Avantage : donne des info sur la structure interne des cellules .

Inconvénient : effet de halo

Adaptations du microscope photonique

Limitation de la microscopie optique en fond clair : faible contraste des cellules observées.

L'augmentation du contraste des tissus obtenu sans coloration. Méthode de contraste physique.

Adaptations du microscope photonique à fond clair à d'autres modes d'observations

- ❖ **Fond noir**
- ❖ **Contraste de phase**
- ❖ **Contraste Interferentiel Differentiel (DIC) : Nomarski**

La microscopie d'interférence transforme des déphasages d'ondes traversant des objets incomplètement transparents en différences d'amplitude.

Principe basé sur l'interférence de deux rayons lumineux polarisés dans des plans perpendiculaires. Il permet d'augmenter le contraste des objets de phase et ainsi de les rendre visibles.

Avantage : observation de la structure interne des objets transparents avec un excellent contraste .

Relief saisissant. Pas de halo, bords bien définis.

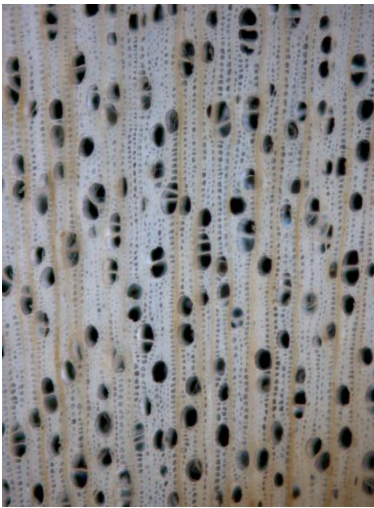
Adaptations du microscope photonique

Limitation de la microscopie optique en fond clair : faible contraste des cellules observées.

L'augmentation du contraste des tissus obtenu sans coloration. Méthode de contraste physique.

Adaptations du microscope photonique à fond clair à d'autres modes d'observations

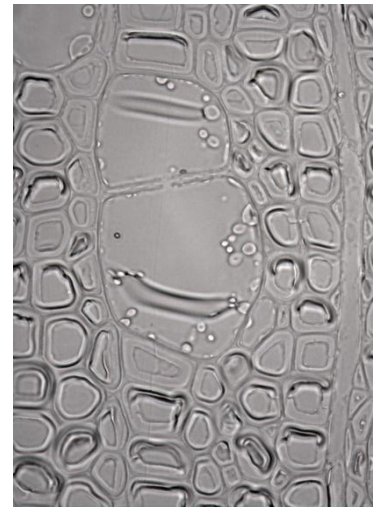
- ❖ **Fond noir**
- ❖ **Contraste de phase**
- ❖ **Contraste Interferentiel Différentiel (DIC) : Nomarski**



Fond noir



Fond clair



Contraste de phase



DIC

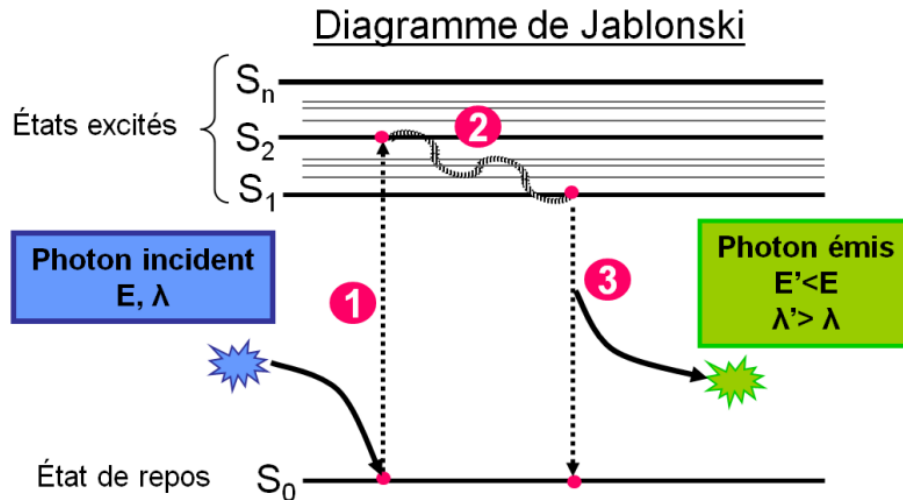
Microscopie à fluorescence

Technique de microscopie photonique qui met à profit la capacité de certaines molécules (fluorophores) à émettre de la fluorescence après excitation. Elle utilise la fluorescence naturelle de certaines substances (auto-fluorescence ou fluorescence primaire) ou une fluorescence induite par interaction chimique avec un marqueur(fluorescence secondaire).

Résolution : 200 nm

Intérêt : rapport signal sur bruit très favorable et fort contraste. Localisation

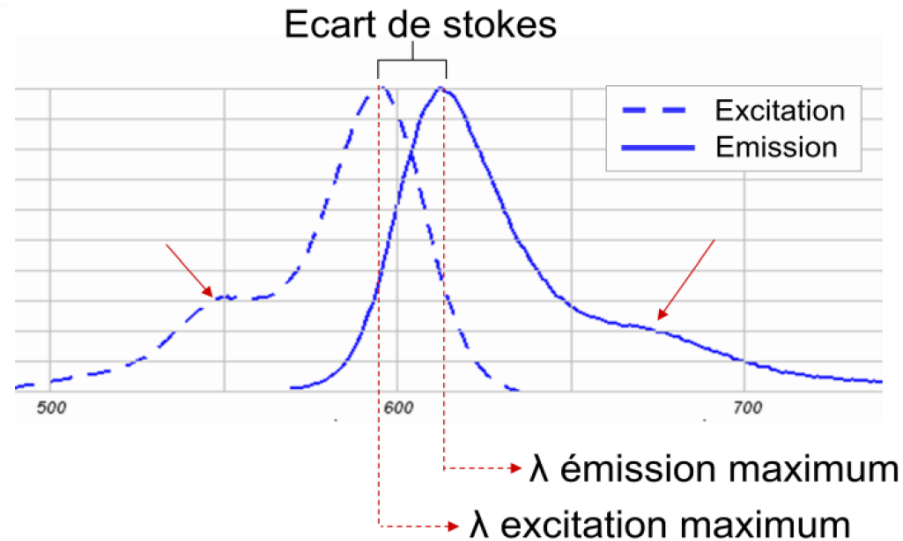
❖ Principe de la fluorescence :



- 1 passage d'un électron d'un état basal à un état excité grâce à l'énergie fournie par un photon incident
- 2 perte d'énergie par radiation, conversion interne, ...
- 3 retour à l'état basal par libération d'un photon d'énergie inférieure.

Microscopie à fluorescence

- ❖ **Pour chaque fluorophore** : on peut établir un spectre d'excitation et un spectre d'émission



- ❖ **L'écart de Stokes** = écart entre les valeurs maximales d'excitation et d'émission. Plus l'écart est grand plus simple est la discrimination de la fluorescence en microscopie. En pratique pour séparer efficacement, par le filtre dichroïque, la forte lumière incidente de la faible fluorescence ce déplacement doit être $>$ à 20 nm

Microscopie à fluorescence

Eléments principaux du microscope à fluorescence

❖ Epifluorescence

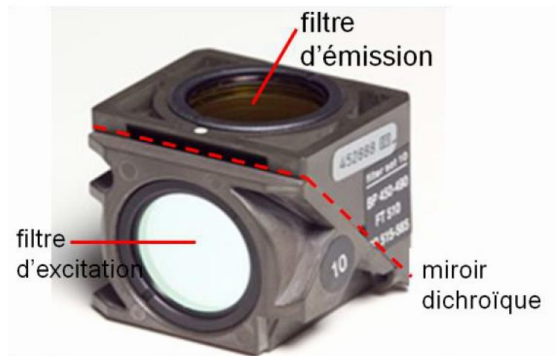
❖ Source de lumière :

Lampe à vapeur de mercure

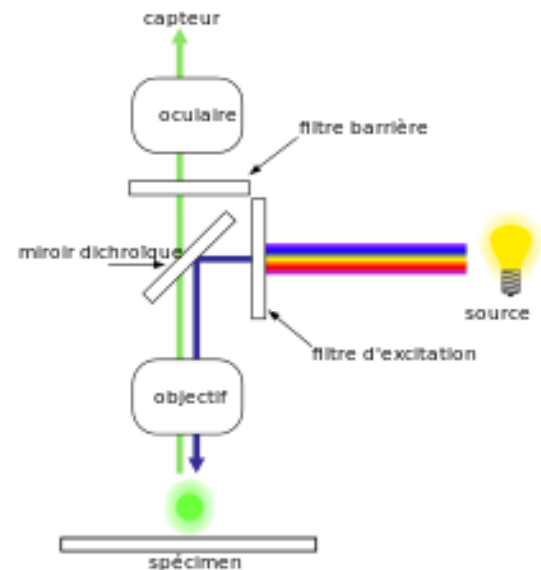
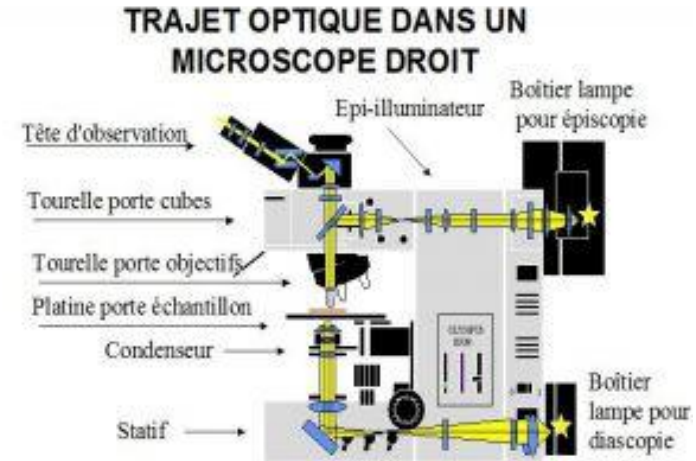
Ampoule Xénon

Système LED

❖ **Filtres de fluorescence** : organisés dans un bloc filtre



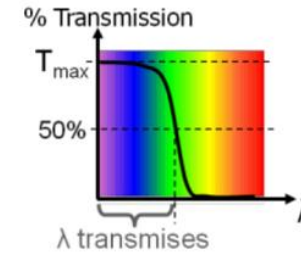
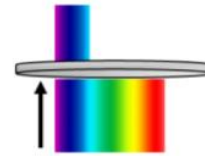
Un bloc filtre par fluorophore



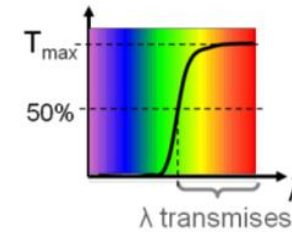
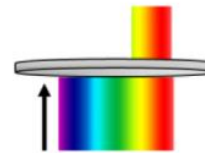
Microscopie à fluorescence

❖ 3 configurations pour les filtres d'excitations et d'émission :

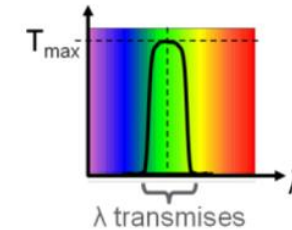
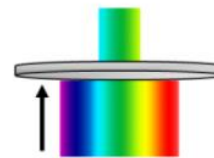
Short pass (passe bas): laisse passer les $\lambda <$ à une valeur et bloque les autres
Un filtre SP500: laisse passer les $\lambda < 500$



Long pass (passe haut): laisse passer les $\lambda >$ à une valeur et bloque les autres
Un filtre LP500: laisse passer les $\lambda > 500$



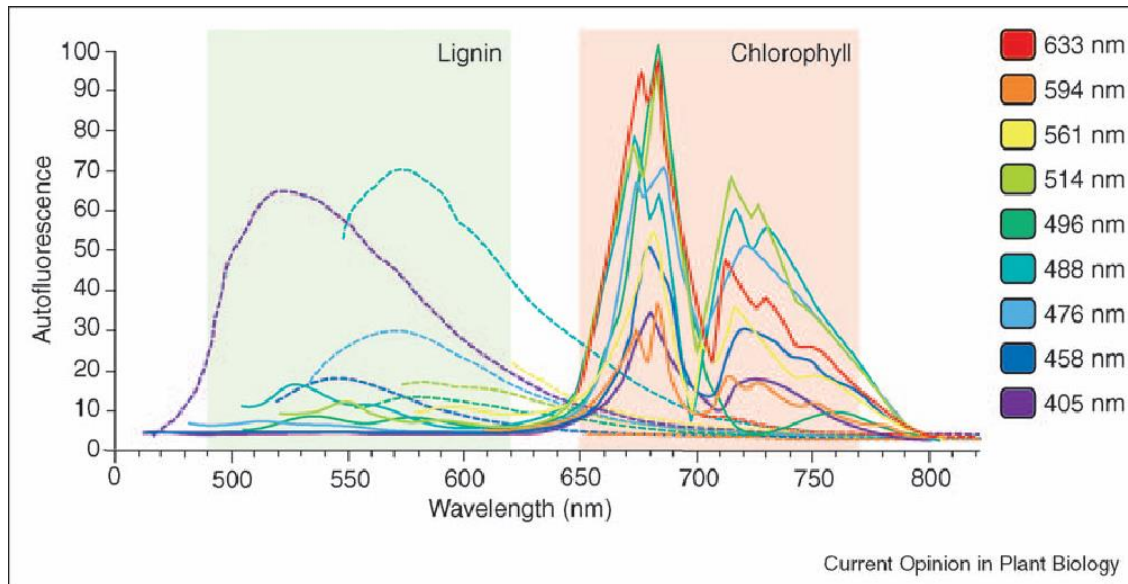
Band pass (passe bande): laisse passer les λ comprise entre 2 valeurs et bloque les autres
Un filtre AF500/30: laisse passer les λ comprises dans une bande de 30 nm centrée sur 500nm soit de 485 à 515nm.
500+/- (30/2)



❖ **Choix du filtre primordial**, une mauvaise configuration peut impliquer une mauvaise interprétation de l'image.

Microscopie à fluorescence -Fluorophores

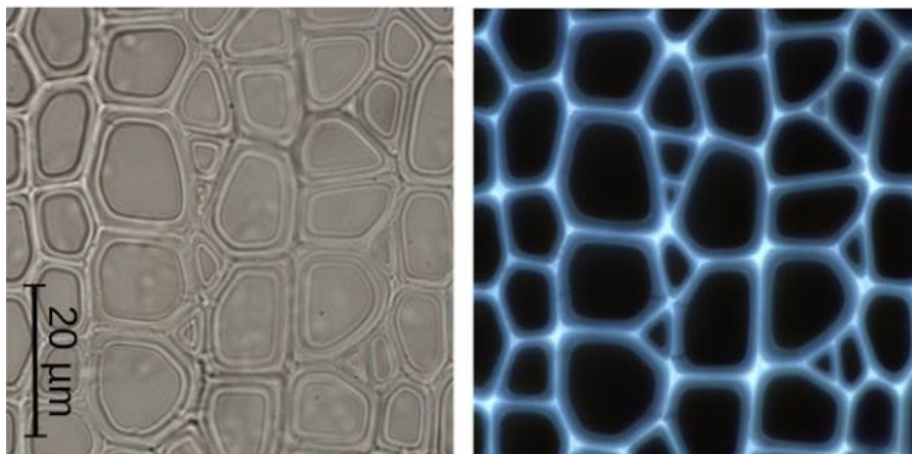
- ❖ **Fluorescence primaire= Autofluorescence** : chez les végétaux nombreuses molécules fluorescentes : Lignines, chlorophylle, composés phénoliques, extractibles du bois



Spectres d'émission des principales sources d'autofluorescence des tissus végétaux après excitation à 9 longueurs d'onde différentes. La lignine émet fortement entre 490 et 620 nm et la chlorophylle entre 650 et 770 nm.

Microscopie à fluorescence -Fluorophores

- ❖ **Fluorescence primaire= Autofluorescence** : chez les végétaux nombreuses molécules fluorescentes : Lignines, chlorophylle, composés phénoliques, extractibles du bois



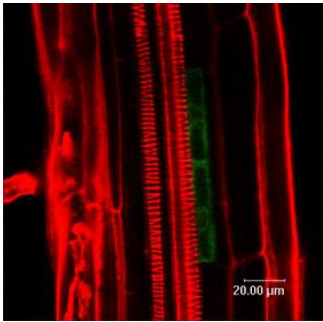
Filtre excitation : 360-370 nm
Miroir dichroïque : 400nm
Filtre d'émission = 420nm

Roussel J.R, Clair B., 2015 Tree Physiol 12-17

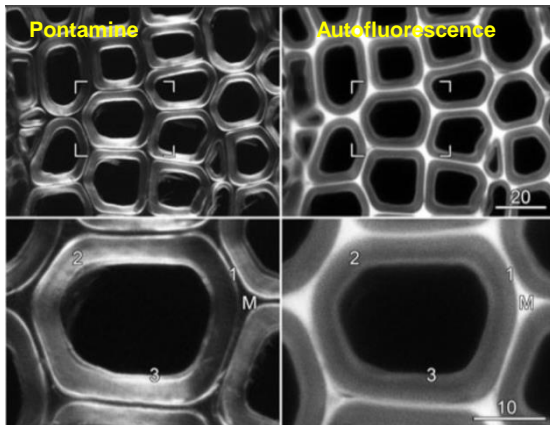
Microscopie à fluorescence -Fluorophores

- ❖ Fluorescence primaire= Autofluorescence
- ❖ Fluorescence secondaire

Marqueurs/Colorations fluorescentes :



- **DAPI** : Détection et quantification de l'ADN
Excitation UV (350nm) Emission Bleu (450-490 nm)
- **Iodure de propidium** : marqueur des parois cellulaires-localisation GFP
Excitation Emission = 617
- **Calcofluor** : colore la cellulose et la chitine



- **Rouge Congo** : cellulose
- **Pontamine Fast scarlet 4BS** : marqueur de la cellulose.

Orientation microfibrilles de cellulose en STORM

(Liesche J., Ziomkiewicz I, Schulz A. 2013, BMC Plant Biology :13-26)

Collings D.A et al., 2013, Wood science technology Vol47-1

Microscopie à fluorescence -Fluorophores

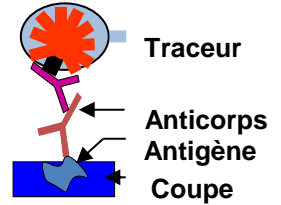
- ❖ Fluorescence primaire= Autofluorescence
- ❖ Fluorescence secondaire

Marqueurs/Colorations fluorescentes

Sondes fluorescentes

-Hybridation in situ : sonde ARN

-Immunomarquage : Anticorps



- Fluorescéine /FITC
- Rhodamine
- Alexa fluor
 - Brillance
 - Photo stabilité
 - Insensibilité au pH

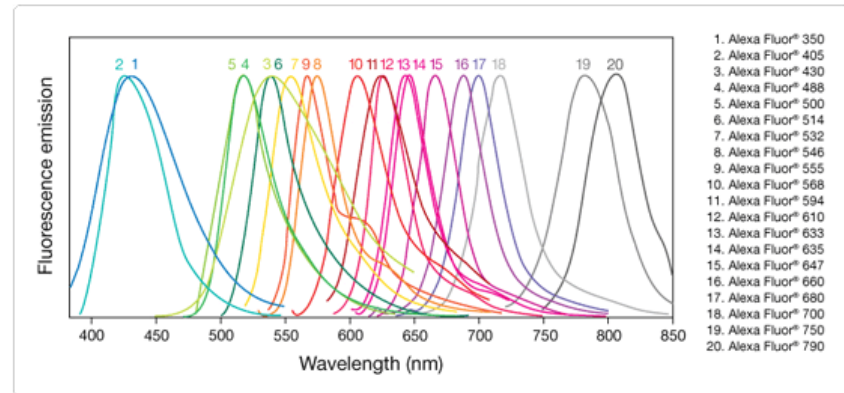


Figure 1. Emission spectra for the Alexa Fluor dye series.

Protéine fluorescente de type GFP

Microscopie à fluorescence Champs large

Exemples Techniques développées

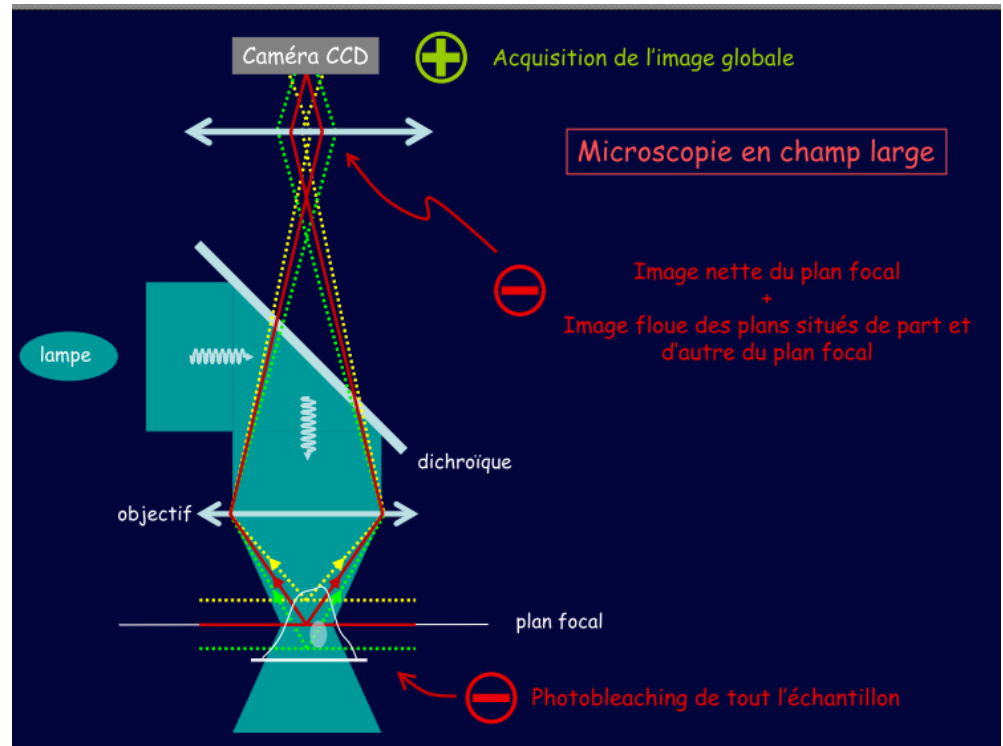
- ❖ **Immunofluorescence** : marquage à l'aide d' anticorps couplé à un fluorochrome
- ❖ **FISH ou hybridation fluorescente *in situ*** : marquage des séquences nucléotidiques grâce à des oligonucléotides couplés à des fluorochromes
- ❖ **FRET ou transfert d'énergie** entre molécules fluorescentes permet de visualiser si deux molécules interagissent
- ❖ **BIFC ou complémententation de fluorescence bimoléculaire** permet de visualiser une interaction en reconstituant l'intégrité d'un fluorochrome à l'aide de deux molécules

Microscopie à fluorescence champ large

Les limites

- ❖ **Résolution Latérale** : limitée par diffraction de la lumière à 200 nm
- ❖ **Pénétration du faisceau lumineux** extrêmement limité
- ❖ **Manque de netteté des images** : visualisation de la fluorescence émise hors plan focal

entraîne un flou.



Microscopie à fluorescence champ large

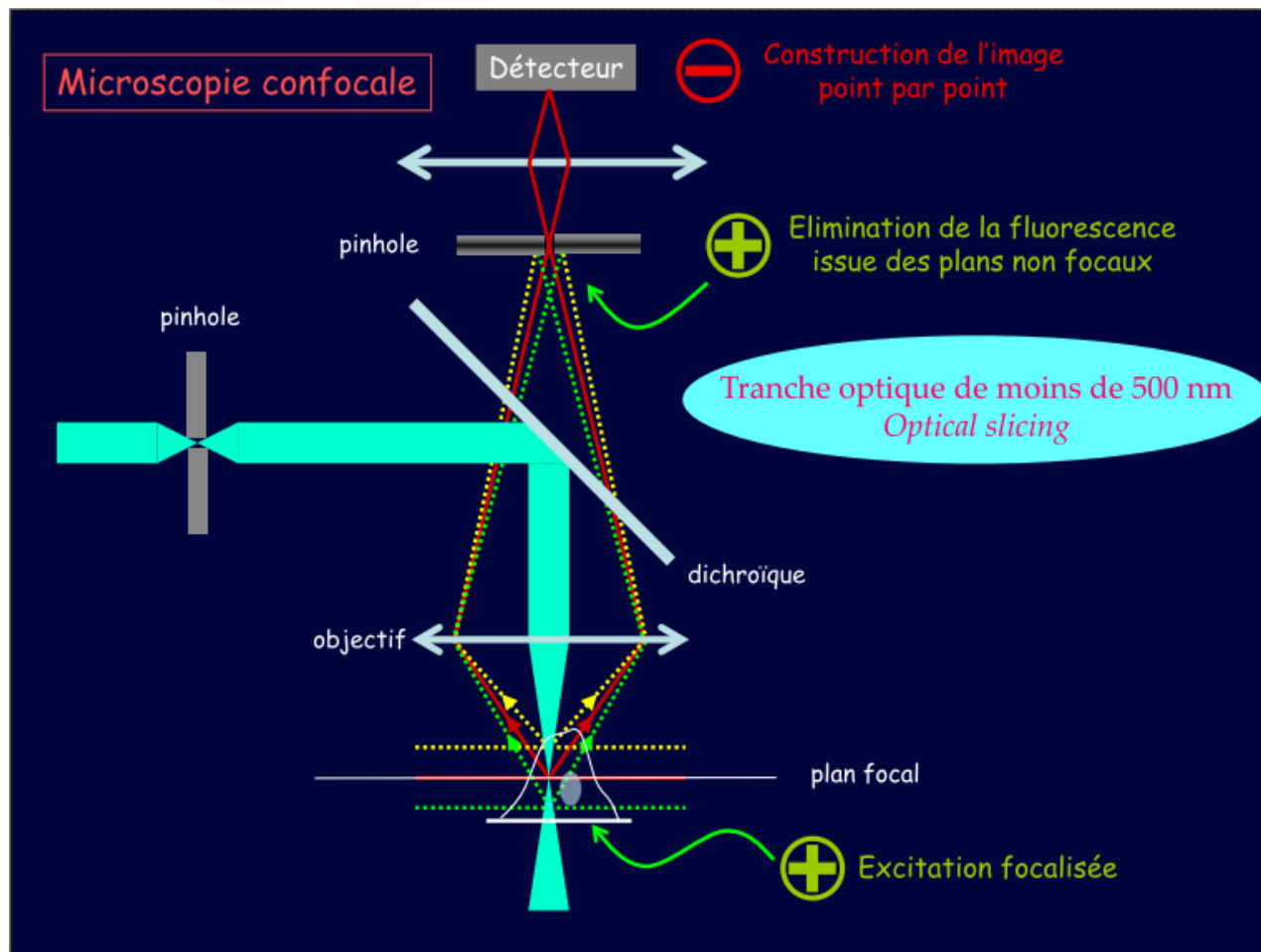
Les limites

Solutions :

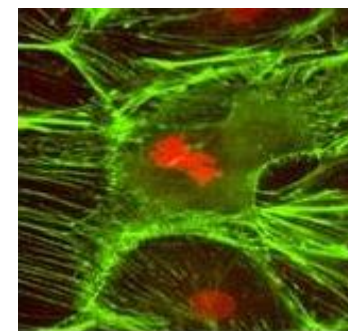
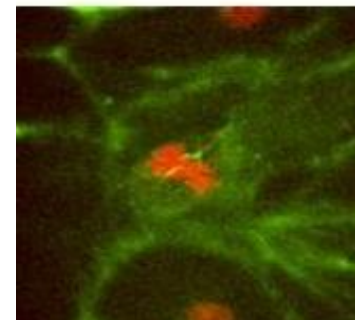
- ❖ **Déconvolution des images possible** : élimine le flou dû à la fluorescence émise hors focus.
- ❖ **Microscopie confocale**
- ❖ **Microscopie à illumination structurée**

Microscopie confocale à balayage laser

Principe



Champ large



Confocal

Microscopie confocale à balayage laser

Fonctionnement

- ❖ **Sources Lasers** : lumière d'excitation intense et focalisée
- ❖ **Balayage du champs en x et y** : 2 miroirs galvanométrique orthogonaux
- ❖ **Détecteurs PMT** : tubes photomultiplicateurs. Nécessaire car très faible signal émis

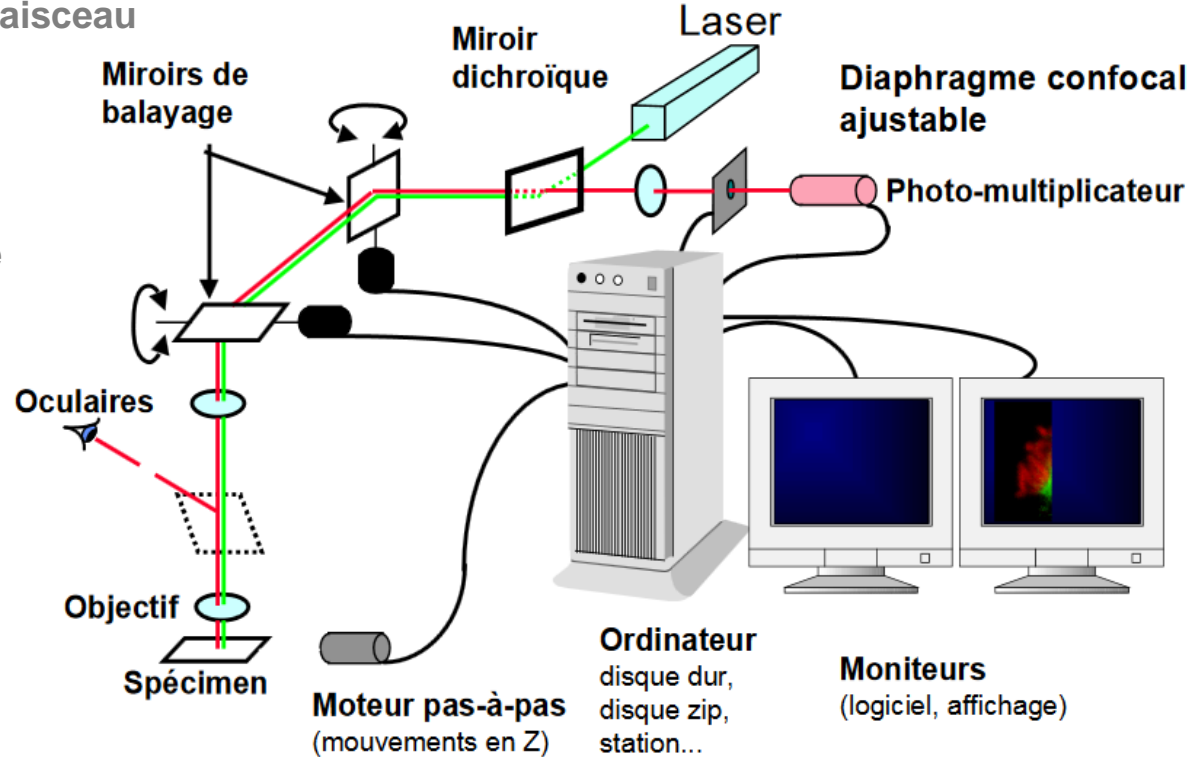
pour chaque position du faisceau

Numérisation du signal
électrique.

Constitution d'une matrice
de pixels

Image 256 niveaux de gris

Fausses couleurs



Microscopie confocale à balayage laser

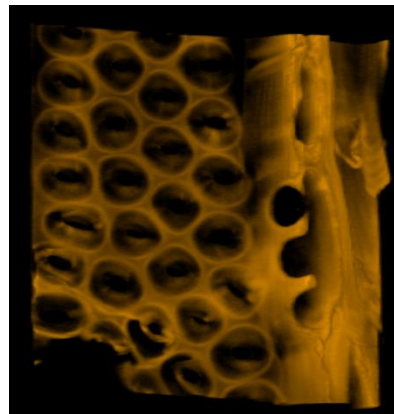
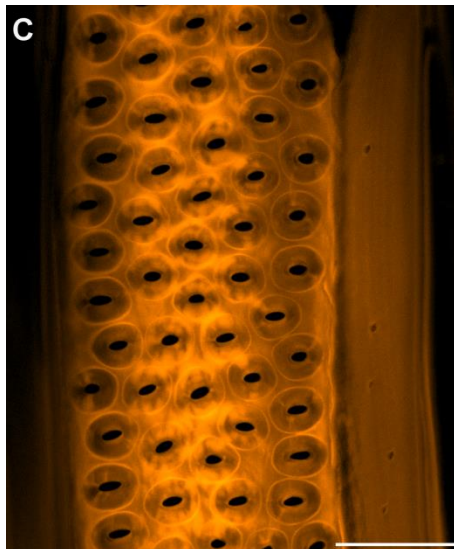
Avantages

- ❖ **Résolution** : amélioration de 30% de la résolution latérale et axiale par rapport à un champ large. Pour ON 1,4 et λ 488nm
Latéral $d = 0,46 \lambda / O.N.$ 160 nm
Axial $D_z = 1,4 n \lambda / O.N.^2$ 400 à 600nm
- ❖ **Reconstruction 3D** : obtention de coupe optique très fine 500nm
- ❖ **Baisse du photo-blanchiment de l'échantillon**: imagerie point par point
- ❖ **Images multicanaux** : possibilité d'imager plusieurs fluorophores simultanément sur une même préparation. Colocalisation de plusieurs molécules d'intérêt.
- ❖ **Possibilité de balayage Spectral**: pour caractériser un fluorophore , pour éliminer l'autofluorescence, pour séparer deux sondes dont les spectres se chevauchent (Crosstalk),

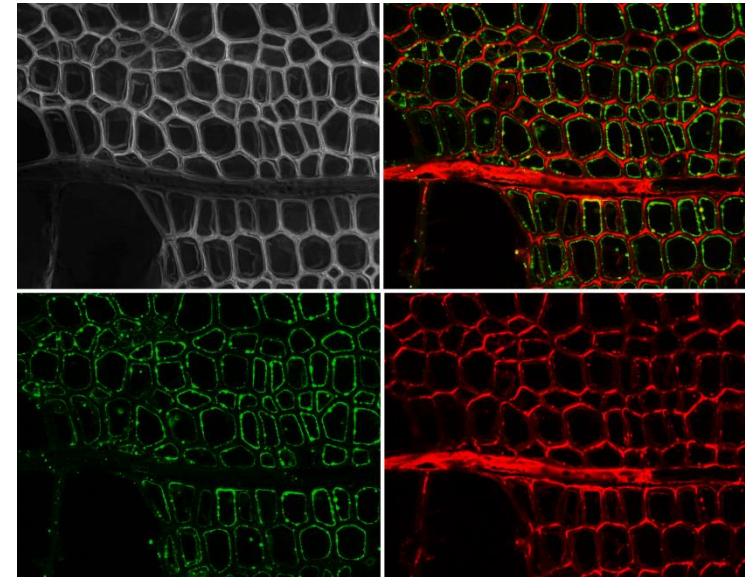
Microscopie confocale à balayage laser

Inconvénients

- ❖ Lenteur de la prise d'image : Balayage laser
- ❖ Rapport signal/bruit faible
- ❖ Pénétration relativement réduite dans l'épaisseur de la préparation <math><80\mu\text{m}</math>
- ❖ Photo-toxicité cellulaire



Ponctuations Vaisseaux Peuplier
Iodure de propidium



Bois de tension de peuplier
Double marquage A488-A633

Microscopie à fluorescence - Evolutions

- ❖ **Microscopie Biphoton/multiphoton** : Fait appel à la lumière infrarouge et des lasers pulsés. Permet de lever un certains nombres des verrous du confocal. Imagerie à plusieurs 100^{aine} de μm de profondeur dans des tissus vivants.
- ❖ **Microscopies haute résolution** : Nanoscopes.
 - ❖ **PALM/STORM** (*photo-activated localization microscopy*) Microscopie à fluorescence champ large permettant de dépasser la limite de diffraction (super résolue) pour atteindre des résolutions typiques de l'ordre de 20nm. Récompensé par le prix Nobel de chimie 2014
Fluorophores spéciaux. Quantum dots.
 - ❖ **STED Super résolution.** (stimulated-emission-depletion). Microscopie confocale à balayage laser dont l'illumination est mise en forme pour dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction. Résolution 50 à 100nm.

Préparation des échantillons pour la microscopie Photonique

La microscopie photonique en lumière transmise, en épifluorescence champs large ou microscopie confocale nécessite au préalable la réalisation de coupes histologiques fines à semi fines

❖ **Coupe sur matériel non inclus : Différents types de microtomes**



Microtome rotatif



Microtome à glissière



Microtome à congélation



Vibratome

Epaisseur de coupe pour du bois : 10 à 50 μm optimum autour de 30 μm . angle de coupe faible.

Taille des échantillons : 1,5 x 1,5 cm

Préparation des échantillons pour la microscopie Photonique

La microscopie photonique en lumière transmise, en épifluorescence champs large ou microscopie confocale nécessite au préalable la réalisation de coupes histologiques fines à semi fines

❖ Coupe sur matériel non inclus :

❖ Différents types de microtomes :

❖ Prétraitements des échantillons :

- Bois verts / bois tendres: coupes directes, congélation -20°C
- Bois secs / bois durs : saturation en eau, trempage sous vide, bouillir dans eau/glycerol, vapeur d'eau, cocotte minute....

Préparation des échantillons pour la microscopie Photonique

La microscopie photonique en lumière transmise, en épifluorescence champs large ou microscopie confocale nécessite au préalable la réalisation de coupes histologiques fines à semi fines

❖ Coupe sur matériel non inclus :

❖ Différents types de microtomes :

❖ Prétraitements des échantillons :

❖ Colorations adaptées aux coupes histologiques de bois :

- Histologiques : exemples
 - Safranine
 - Carmino vert de Mirande : carmin aluné et vert d'iode
 - Bleu astra (bleu Alcian)/Safranine

Préparation des échantillons pour la microscopie Photonique

La microscopie photonique en lumière transmise, en épifluorescence champs large ou microscopie confocale nécessite au préalable la réalisation de coupes histologiques fines à semi fines

❖ Coupe sur matériel non inclus :

❖ Différents types de microtomes :

❖ Prétraitements des échantillons :

❖ Colorations adaptées aux coupes histologiques de bois :

- Histologiques
- Histochimiques : exemples
 - Calcofluor : Cellulose/ fluorescence
 - Phloroglucinol/HCl - Wiesner : lignines de type S et G
 - Mâule : lignines de type S en rouge , type G en brun
 - PAS – Periodic acid Schiff : coloration des polysaccharides
 - IKI : amidon

Préparation des échantillons pour la microscopie Photonique

La microscopie photonique en lumière transmise, en épifluorescence champs large ou microscopie confocale nécessite au préalable la réalisation de coupes histologiques fines à semi fines

- ❖ **Coupe sur matériel non inclus**
- ❖ **Coupes sur matériel inclus**
 - **Différents milieux d'inclusion :**
 - **Différents types de Fixation : Chimique/Physique**

Préparation des échantillons pour la microscopie Photonique

La microscopie photonique en lumière transmise, en épifluorescence champs large ou microscopie confocale nécessite au préalable la réalisation de coupes histologiques fines à semi fines

- ❖ **Coupe sur matériel non inclus**
- ❖ **Coupes sur matériel inclus** : Différents milieux d'inclusion nécessitent tous des étapes d'imprégnations longues dans des bains de concentrations croissantes.

Taille de l'échantillon inclus réduite : Quelques mm de coté Epaisseur de coupe faible : 0,8 à 3 µm

- Paraffine
- PEG : Polyéthylène Glycol
- Steedman's wax :
- DGD : diethylene glycol distearate
- Résines
 - Epoxy :
 - Méthacrylate

Microtome rotatif

Ultramicrotome
Couteau de verre ou diamant

Préparation des échantillons pour la microscopie Photonique

Milieu inclusion	Paraffine	PEG	Steedman's wax	DGD	Résines	
					Epoxy	Méthacrylate
Déshydratation de l'échantillon	oui	non	oui	oui	oui	oui Incomplète pour LR White
Solubilité	TBA Xylène Toluène	eau	Ethanol	n-butyl alcool	Éthanol Acétone Epoxy 1-2 propane	Eau Ethanol
T° imprégnation	58-60°C	50°-60°C	37°C	65°C	4°C	4°C
T° Polymérisation	–	–	–	–	60°C	<ul style="list-style-type: none"> • 54°C • 4°C sous UV • 37°C pour MM • -60°C à -20°C pour lowicryl
Extractible	oui	oui	oui	oui	oui (soude alcoolique)	Oui pour certaines
Coupes	Microtome rotatif	Microtome rotatif	Microtome rotatif	Ultra microtome	Ultra microtome	Ultra microtome

Préparation des échantillons pour microscopie optique

❖ **La Fixation** indispensable pour tout échantillon biologique.

- **Fixation chimique** : consiste à stabiliser les structures biologiques fortement hydratées par créations de nouvelles liaisons chimiques qui rendent les protéines insolubles

Principe : Pontage des molécules organiques avec un agent chimique ce qui transforme le gel protéique en une trame réticulée.

Fixateurs :

- Glutaraldéhyde (dialdéhyde)
- Formaldéhyde (monoaldéhyde)

Caractéristiques physico-chimique à prendre en compte au moment de la fixation : la concentration ionique, la concentration molaire, le pH

Avantages : ne nécessite pas d'équipement spécifique

Limitations et artefacts : modification de la conformation spatiale des protéines , pertes d'éléments (ions diffusibles, petites molécules solubles), apport de molécules chimiques, liaisons entre molécules indépendantes

Préparation des échantillons pour microscopie optique

❖ **La Fixation** indispensable pour tout échantillon biologique.

- **Fixation Physique /Cryofixation** : permet de stabiliser les structures biologiques par simple vitrification de la phase aqueuse

Principe : Abaisser fortement et rapidement la t° de l'échantillon pour transformer l'eau qu'il contient en glace vitreuse amorphe. -180°C avec un abaissement de 10^3°C par seconde.

Techniques : échantillons massif dur. **Congélation directe sous haute pression**

Congélation ultrarapide par jet d'éthanol refroidie à l'azote dans une enceinte où règne une pression élevée (2100 bars) qui permet de réduire la taille des cristaux de glace ($<10\text{nm}$).

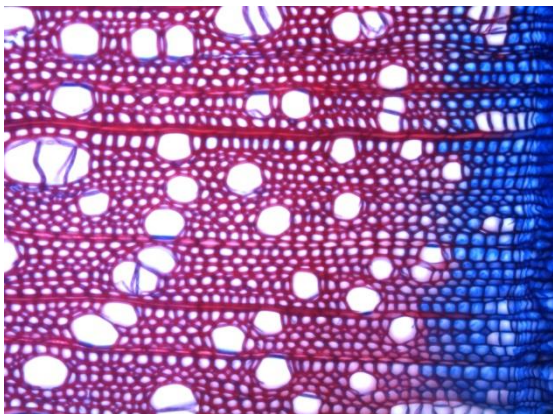
Suivi d'une étape de Cryo-substitution et de cryo-imprégnation pendant plusieurs jours avant inclusion à froid de l'échantillon

Avantages : permet une stabilisation parfaite de la structure dans sa configuration hydratée

Limitations : nécessite un appareillage complexe. Échantillon très petit $0,5 \text{ mm}^3$

Préparation des échantillons pour la microscopie Photonique

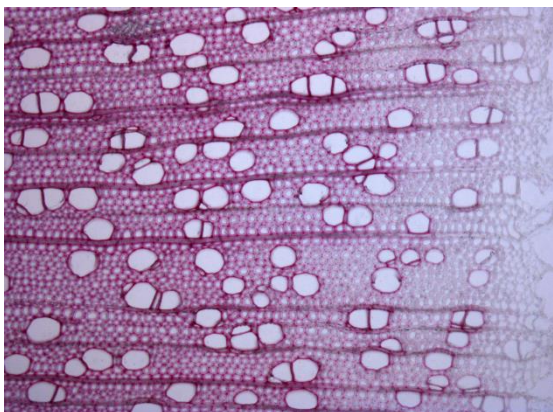
Non inclus



BleuAstra/Sfranine

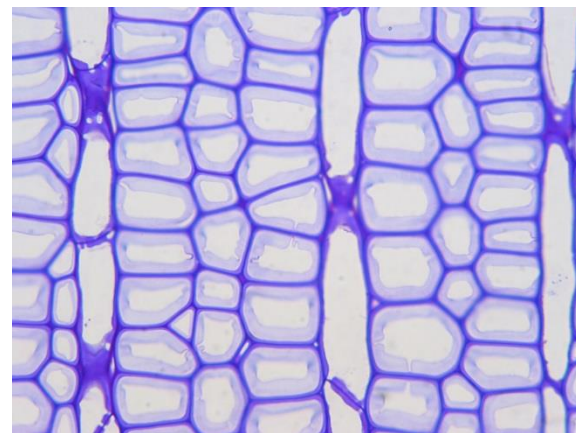
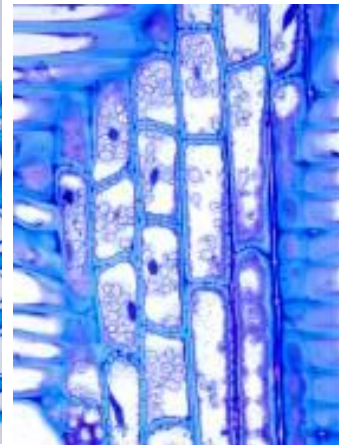
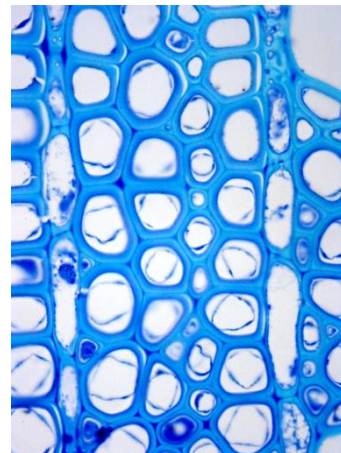


Maule



Wiesner

Inclus en résine



Microscopie électronique

- ❖ Utilisation d'un faisceau d'électrons accélérés sous vide comme source de rayonnement

d'onde plus faible - Augmentation de la résolution $d = 0,6 \lambda / n \sin \alpha$

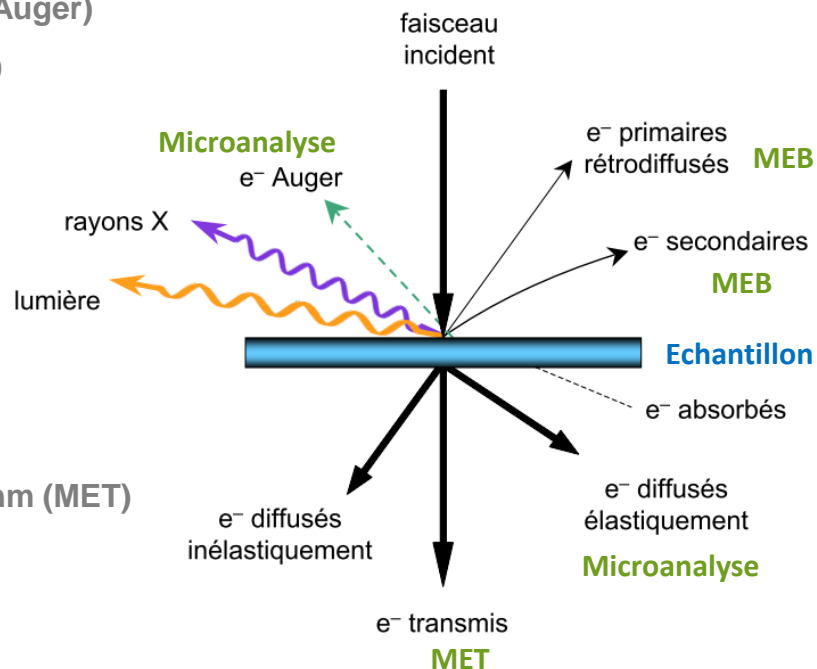
- ❖ **Interaction de la matière avec les électrons** : les électrons de haute énergie interagissent avec la matière. Ils subissent des diffusions inélastiques et élastiques qui conduisent à l'émission d' :

- Électrons de faible énergie (e^- secondaire, Auger)
- Électrons de forte énergie (e^- rétrodiffusés)
- Photons X
- Emissions radiatives

La ME explore toute la gamme des énergies émises.

- ❖ **Signaux utilisés pour l'imagerie** :

- Électrons secondaires et rétrodiffusés (MEB)
- Électrons transmis: échantillons minces < 100nm (MET)



Microscopie électronique à balayage

- ❖ **Principe** : un faisceau électronique très fin balaie point par point et ligne par ligne la surface de l'objet. Diverses interactions entre les électrons incidents et la matière génèrent différents signaux dont certains sont utilisés pour construire l'image et d'autres pour la microanalyse .
- ❖ Détection des **électrons secondaires** fournit une information topographique de l'échantillon sur une profondeur de 10 nm. Image Permet d'obtenir des images de la surface d'un échantillon, caractérisée par un effet relief. Résolution de quelques nm (dépend des détecteurs) et grande profondeur de champs.
- ❖ **Électrons rétrodiffusés** : image qui est fonction de la composition chimique de l'échantillon
- ❖ **Emission de photons X** : analyse quantitative de la composition chimique

Microscopie électronique à balayage

- ❖ **Techniques de préparation des échantillons biologiques** : l'échantillon doit être rendu parfaitement sec (travail sous vide nécessite l'élimination des liquides) et conducteur (pour production d'électrons secondaires).
- ❖ **Fixation**
- ❖ **Dessiccation au point critique** : La tension superficielle fait que si l'on supprime l'eau d'une structure hydratée, la structure est déformée. Dans certaines conditions de température et de pression qui dépendent de la nature du liquide, la tension superficielle est nulle, c'est **le point critique**.
Point critique de l'eau 217.7 atmosphères à 374 ° C = difficile à obtenir en laboratoire
Point critique du CO₂ 72,9 atmosphère à 31.1°C
3 substitutions successives : eau- éthanol, éthanol-acétone, acétone - CO₂ liquide dans une enceinte adéquate
On pratique alors l'élimination du CO₂ à son point critique
- ❖ **Métallisation** : Dépôt d'une couche métallique de surface. Métal évaporé : Or, Platine, Palladium ou alliages de ces métaux (dimensions du grain obtenu, capacité à émettre de électrons secondaires, facilité d'évaporation)

Microscopie électronique à balayage

Observations des échantillons à l'état natif en minimisant les différentes étapes de préparation.

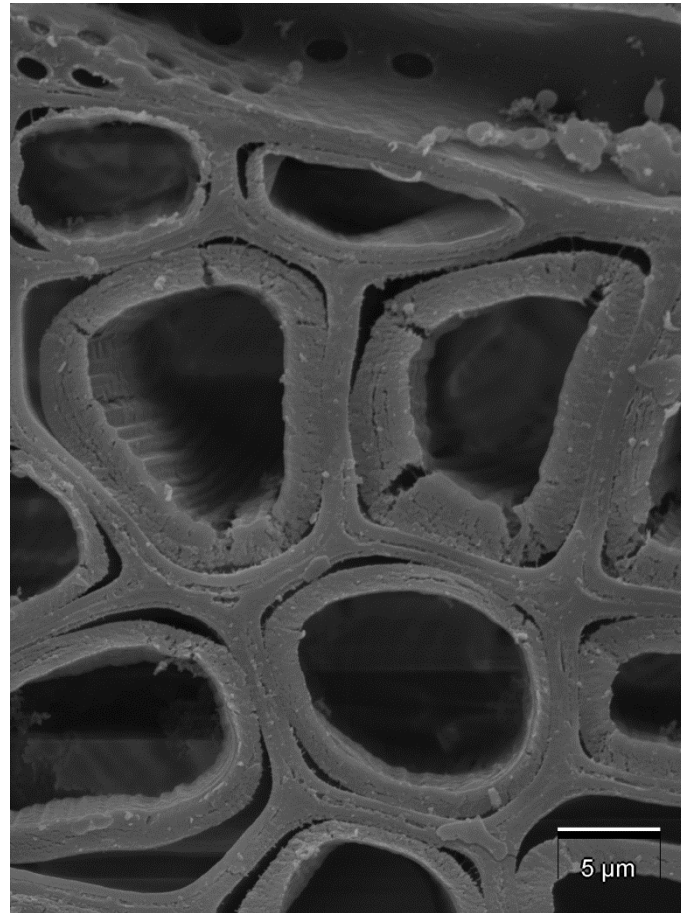
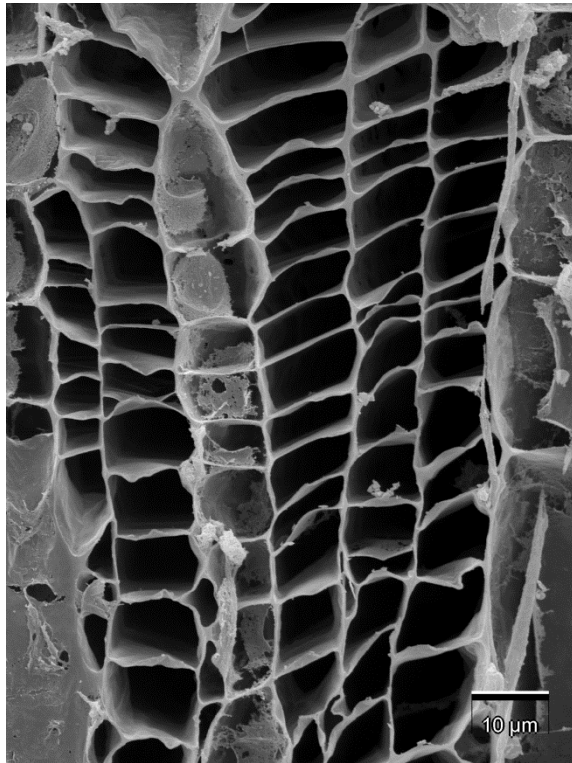
- ❖ **Cryo MEB** : MEB équipé d'un système de préparation des échantillons par congélation/métallisation
- ❖ **MEB à pression contrôlée** : mode environnemental /ESEM : Mode « Haut vide »
fonctionne à des pressions quasi atmosphériques au niveau de la chambre objet.

Possibilités d'observer :

- Des matériaux non conducteurs
- Des objets hydratés
- Des échantillons dans un environnement donné : pression, T°, composition en gaz.

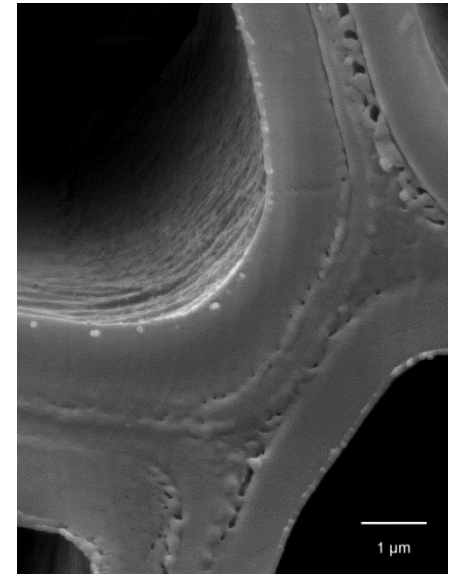
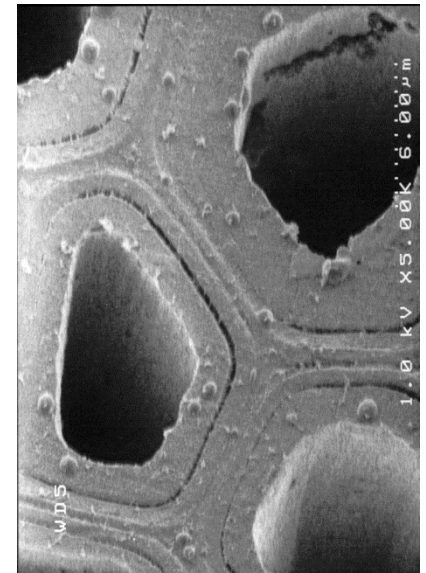
Essai dynamiques

Microscopie électronique à balayage



Dessiccation par contournement du point critique
Métallisation or-Palladium

CryoMEB



Microscopie électronique à transmission

MET utilise un faisceau d'électrons à haute tension, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon.

❖ **Principe** : Echantillon mince (<200nm) traversé par les électrons énergétiques. Les électrons transmis de façon élastique sont utilisés en TEM

❖ Au niveau de la préparation les électrons incidents provenant de la source sont soit :

- totalement arrêtés
- déviés et ralentis
- déviés.

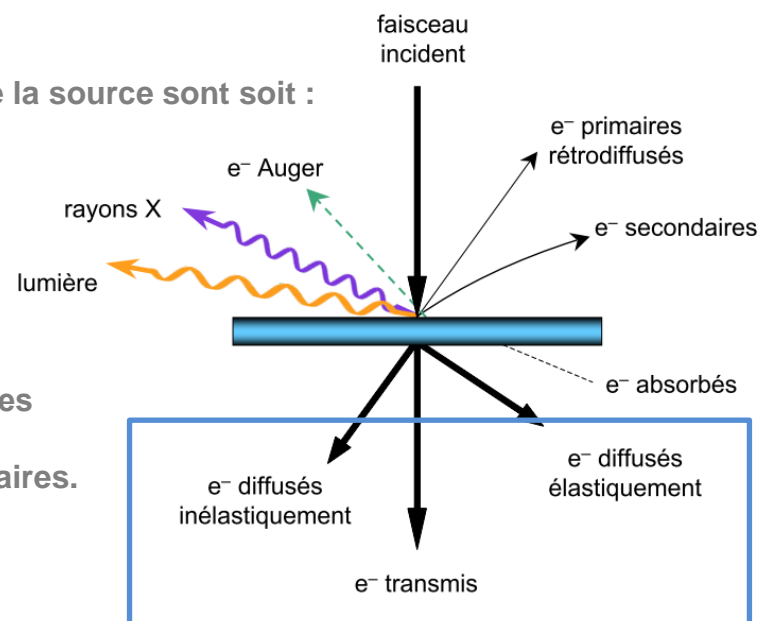
Les électrons arrêtés se traduisent à l'observation par des zones sombres les électrons transmis correspondent à des zones claires.

Signal ⇒ Image contrastée

❖ **Résolution** MET classique travaillant à 80 KV **0,2 nm**

HRTEM 0,05 nm record

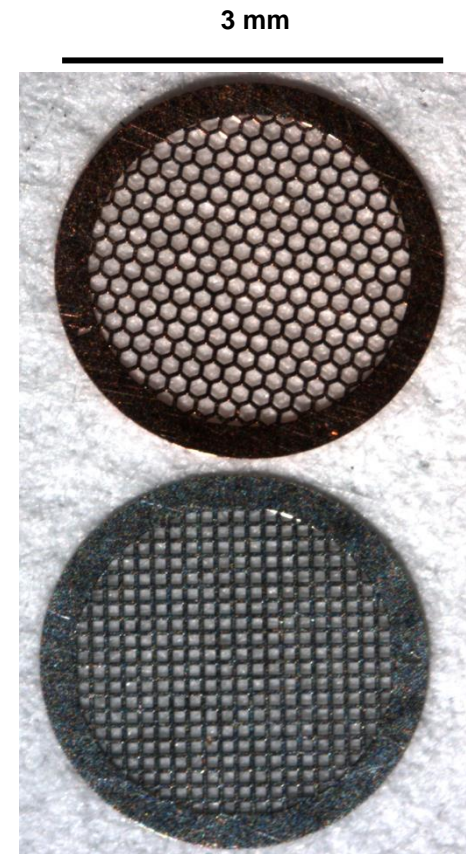
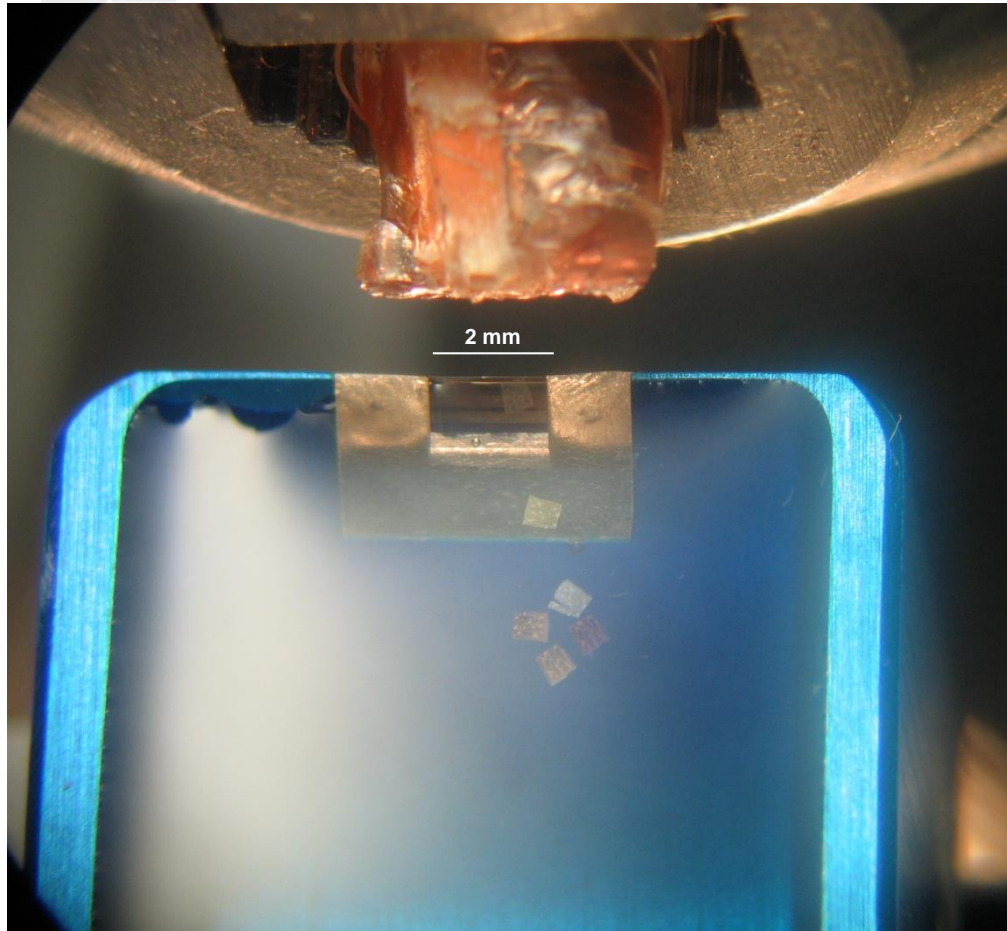
❖ **Ne permet pas l'observation de tissus vivants et impose des techniques de préparations spécialisées**



Microscopie électronique à transmission

- ❖ **Techniques de Préparation des échantillons**
- ❖ **Prélèvements** d'échantillons de petites tailles placés directement dans le mélange fixateur
- ❖ **Fixation** plusieurs heures dans un mélange Glutaraldéhyde/formaldéhyde à adapter en fonction des applications. Pour le bois passage sous vide partiel nécessaire. Ou Cryofixation.
- ❖ **Post fixation osmique (oxydant fort)** pour les observations ultrastructurales.
- ❖ **Déshydratation** et substitution : différents solvants en fonction de la résine
- ❖ **Imprégnation dans la résine.** Passage sous vide peuvent aidés en fonction de la viscosité de la résine
- ❖ **Inclusion** : à chaud, a froid, sous UV
- ❖ **Dégrossissage** du bloc : à la main ou à l'aide d'une fraiseuse, idéalement forme pyramide tronquée, réduction de la surface de coupe et choix de la zone à observer $\leq 1\text{mm}^2$
- ❖ **Ultramicrotomie** : coupes ultrafines 70-150 nm d'épaisseur au couteau diamant.
- ❖ **Récupération des coupes** sur des grilles, cuivre, platine ou or (3mm de diam)
- ❖ **Contraste des coupes** : Acétate d'Uranyle, OTE , UranylLess (lanthanides), Citrate de Plomb, KMnO_4 , Thiocarbohydrazide-Proteinate d'Argent (polysaccharide).

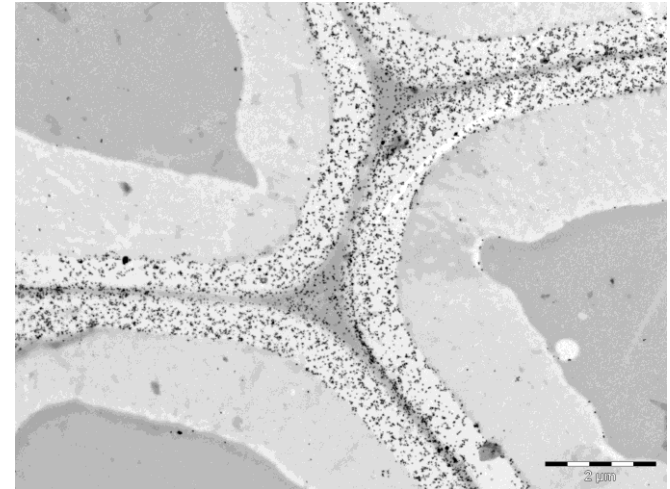
Microscopie électronique à transmission



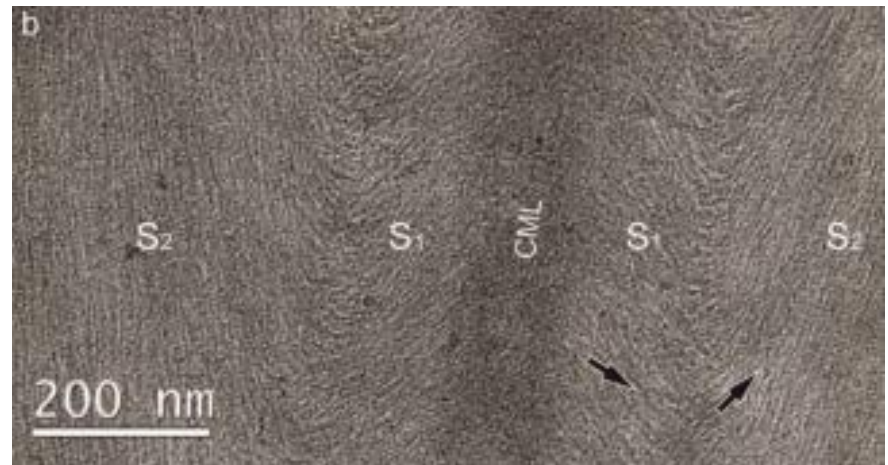
Microscopie électronique à transmission



MET 80 KV Fibre de bois de tension de peuplier



Immunomarquage Fibre BT peuplier
Hémicellulose-Arabinoxylanes



cryoTEM, Epicea, CLR, KMnO4 - Orientation des microfibrilles

Merci de votre attention.

