



Protocole d'observation de la surface de l'épiderme des baies par cryo-microscopie électronique à balayage

Contexte

La texture de la peau des baies et sa couverture de cire ont une influence considérable sur la sensibilité d'un cépage à la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. Dans le projet INTERREG WiVitis, cette couche de cire des baies de cépages résistants aux champignons (PIWI) et de cépages traditionnels est étudiée à l'aide de différentes méthodes. Outre l'utilisation de méthodes basées sur des capteurs, un cryo-microscope électronique à balayage (angl. cryo-scanning electron microscope, cryo-SEM) est également utilisé. Celui-ci permet de visualiser la surface de la pellicule des baies avec un grossissement allant jusqu'à 40.000 fois, afin de rendre visibles à l'œil humain les minuscules structures de la couche de cire et d'examiner les différences de structure.



Préparation de l'échantillon

Tout d'abord, un morceau plat de 3-5 mm de peau de baie est découpé dans la baie présélectionnée à l'aide d'un scalpel et fixé sur un plateau d'échantillonnage.

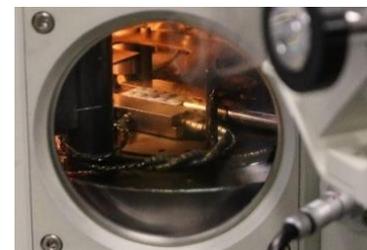
Dans le SEM, il règne un vide très poussé à température ambiante. L'eau contenue dans la préparation de peau de baies s'évaporerait donc immédiatement et les cires s'effondreraient. C'est pourquoi les préparations doivent être préalablement congelées par choc dans de l'azote liquide à -210°C . Dans ces conditions optimales de congélation, aucun cristal de glace ne se forme, ce qui permet de conserver intactes les cellules et les cires des échantillons et de les caractériser fidèlement.



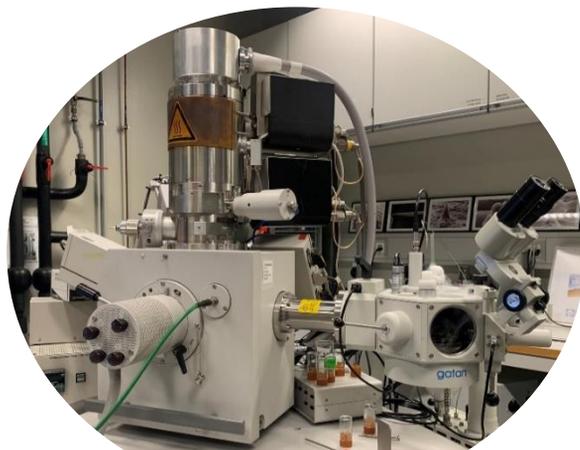
Préparation de l'échantillon de peau de baie sous la loupe

Fonctionnement du cryo-SEM

La plaque d'échantillons avec les dix morceaux de peau de baies congelés peut maintenant être placée dans l'unité cryogénique. Comme celle de notre partenaire de projet NI Lab Basel dispose d'une fenêtre de visualisation, il est possible d'observer comment les échantillons congelés sont recouverts d'environ 30 nm d'or (d'autres enrobages conducteurs de métaux ou de graphite sont également possibles). Cet enrobage empêche les échantillons de se charger sous le faisceau d'électrons, les stabilise et améliore les signaux d'électrons secondaires utilisés pour l'imagerie.



Échantillons congelés dans l'unité cryogénique



Cryo-SEM du Nano Imaging Lab Basel

Les échantillons préparés sont ensuite transférés par le sas dans le SEM. À environ -150°C , le faisceau d'électrons est guidé ligne par ligne sur l'échantillon et interagit avec chaque point avec la surface de l'échantillon. Les signaux qui en résultent sont mesurés par des détecteurs qui permettent de représenter la nature de la surface de l'échantillon. Selon le nombre d'électrons mesurés en un point, celui-ci apparaît plus ou moins clair sur l'écran du PC. Il en résulte des images impressionnantes et à haute résolution de la surface de la peau des baies de divers cépages.