

Protocole de
laboratoire pour
analyses
dendrochronologiques



Réalisé par Marc Blondeau
Stagiaire Été 2020

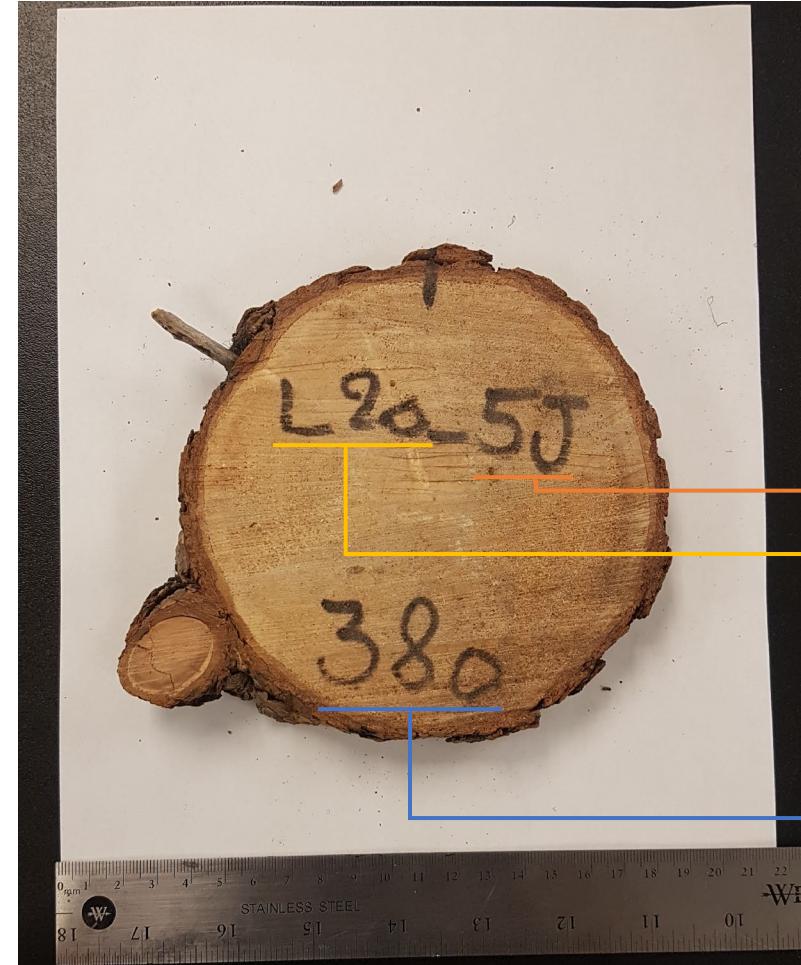
PLAN

1. Coupe de l'arbre
2. Préparation des morceaux
3. Hydratation
4. Coupe anatomique
5. Traitement des coupes
 - I. Coloration
 - II. Déshydratation
 - III. Montage permanent
6. WinCELL

1. COUPE DE L'ARBRE

Les disques des arbres sont identifiés selon:

- Le lac où l'arbre a été récolté;
- Le numéro de l'arbre;
- La hauteur à laquelle la coupe a été réalisée (valide que pour les arbres vivants).



2. PRÉPARATION DES MORCEAUX

- Des morceaux d'environ 1 cm de largeur ont été dessinés puis découpés pour chaque arbre échantillonné
- Les morceaux ont été taillés de la sorte afin de permettre un chevauchement entre les cernes de croissance.
- Identifier chaque morceau à l'aide d'un crayon indélébile (lac + numéro de l'arbre + morceau)
- Si on discerne bien les cernes sur le plan tangentiel du morceau, compter, au binoculaire, le nombre de cernes pour chaque morceau afin de trouver quelles cernes se chevauchent.
- Si on ne discerne pas les cernes, aller jusqu'à l'étape 4 pour tailler les faces.



3. HYDRATATION

Matériel:

- Plaque chauffante
- Agitateur magnétique
- Aimant permanent (x2)
- Bécher 500 mL (x2)
- Erlenmeyer 500 mL
- Eau
- Cuillère
- Échantillons



3. HYDRATATION

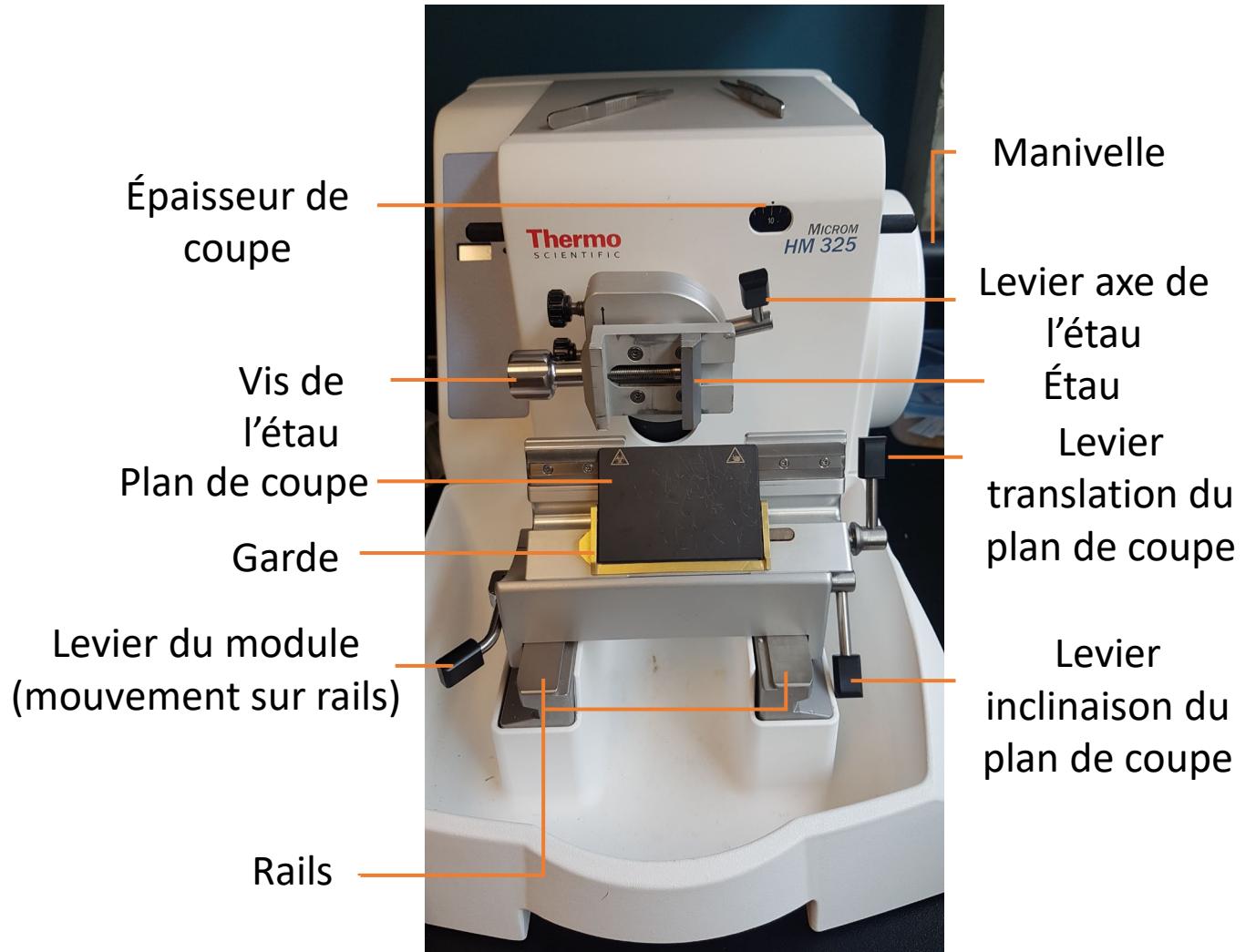
Méthode:

- 1) Déposer un aimant permanent dans chaque bécher
- 2) Porter à ébullition l'eau du bécher sur la plaque chauffante
- 3) Insérer les morceaux dans l'eau chaude et laisser bouillir pendant 20 minutes
- 4) Refroidir durant 5 minutes dans le bécher rempli d'eau tiède placé sur l'agitateur magnétique activé
- 5) Pendant ce temps, changer l'eau chaude du bécher avec celle de l'rlenmeyer afin d'éviter d'enrasser les morceaux
- 6) Répéter les étapes 3) à 5) cinq autres fois (total de 6 cycles)

4. COUPE ANATOMIQUE

Matériel:

- Microtome
- Porte-morceau
- Bécher de 80 mL
- Eau
- Pipette
- Pinceau
- Aiguille courbe à dissection et/ou pince courbe
- Lame
- Lame de laboratoire



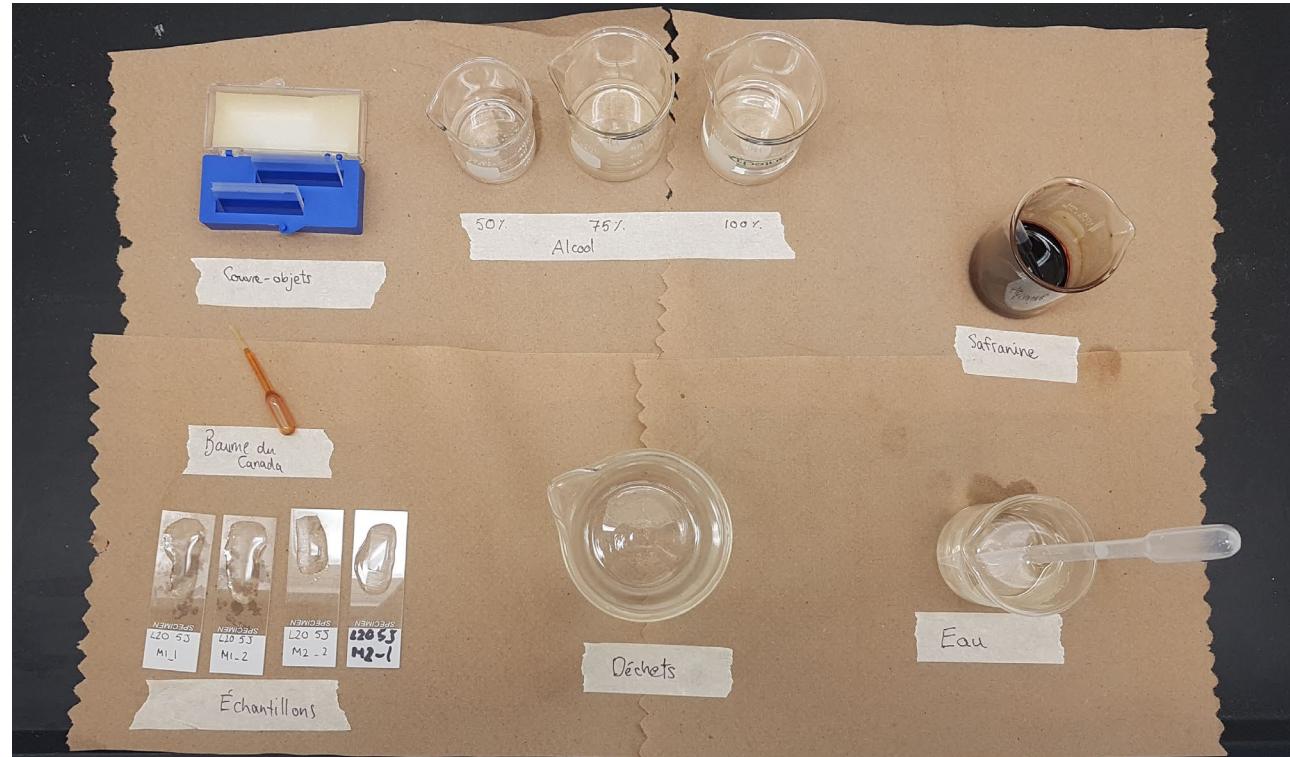
4. COUPE ANATOMIQUE

- 1) Mettre le garde en place
- 2) Dévisser l'étau et insérer le porte-morceau
- 3) Insérer le morceau de bois dans le porte-morceau de manière à ce que les cernes soient perpendiculaires au plan de coupe.
➤ Si les cernes ne sont pas perpendiculaires, tailler chaque faces du morceau afin de remplir cette condition
- 4) Lever le levier du module et pousser vers le morceau de bois en le glissant sur les rails jusqu'à ce que le plan de coupe arrive vis-à-vis le morceau de bois
- 5) Lever le levier de translation du plan de coupe et insérer une lame neuve dans la fente
- 6) Régler l'épaisseur de coupe à 10 µm
- 7) Humecter la face exposée avec la pipette remplie d'eau
- 8) Abaisser le garde
- 9) À l'aide de la manivelle, effectuer une coupe
- 10) Si la coupe est bonne (pas de déchirures et bonne épaisseur), la déplacer sur une lame de microscope identifiée en utilisant l'eau comme véhicule de transport (si la coupe n'est pas bonne, nettoyer le plan de coupe avec le pinceau en faisant des mouvements du bas vers le haut)
- 11) Une fois la coupe bien placée sur la lame, la submerger d'eau afin d'éviter que celle-ci sèche
- 12) Répéter les opérations pour les autres morceaux (faire des doublons pour chaque morceau)

5. TRAITEMENT DES COUPES

Matériel:

- Seringue
- Bécher de 80 mL (x5)
- Bécher «déchets» de 500 mL
- Pipette de 7,7 mL (x2)
- Petites pipettes (x2)
- Couvre-objets (24x40 et 24x55)
- Alcool éthylique
- Eau
- Safranine
- Baume du Canada
- Papier essui-tout
- Gants
- Sarrau



5. TRAITEMENT DES COUPES

I. Coloration

- 1) Rincer la coupe avec la pipette d'eau afin d'enlever les impuretés
- 2) Déposer la lame sur une surface plane et à l'aide d'une petite pipette, submerger l'échantillon de safranine
- 3) Attendre 5 minutes

II. Déshydratation

- 1) Préparer une bécher d'alcool à 50 % (50% eau + 50% alcool), à 75 % (75 % alcool et 25 % eau) et à 100% (voir photo en diapositive 9) en utilisant la seringue.
- 2) Rincer avec une pipette d'eau la safranine excédentaire de la coupe jusqu'à ce que l'eau n'emporte plus de coloration sur son passage
- 3) À l'aide d'une pipette de 7,7 mL, verser la solution de 50 % d'alcool sur l'échantillon jusqu'à ce que celui-ci ne libère plus de colorant
- 4) Répéter l'étape 3) avec les deux autres concentrations d'alcool (75 % et 100 %)

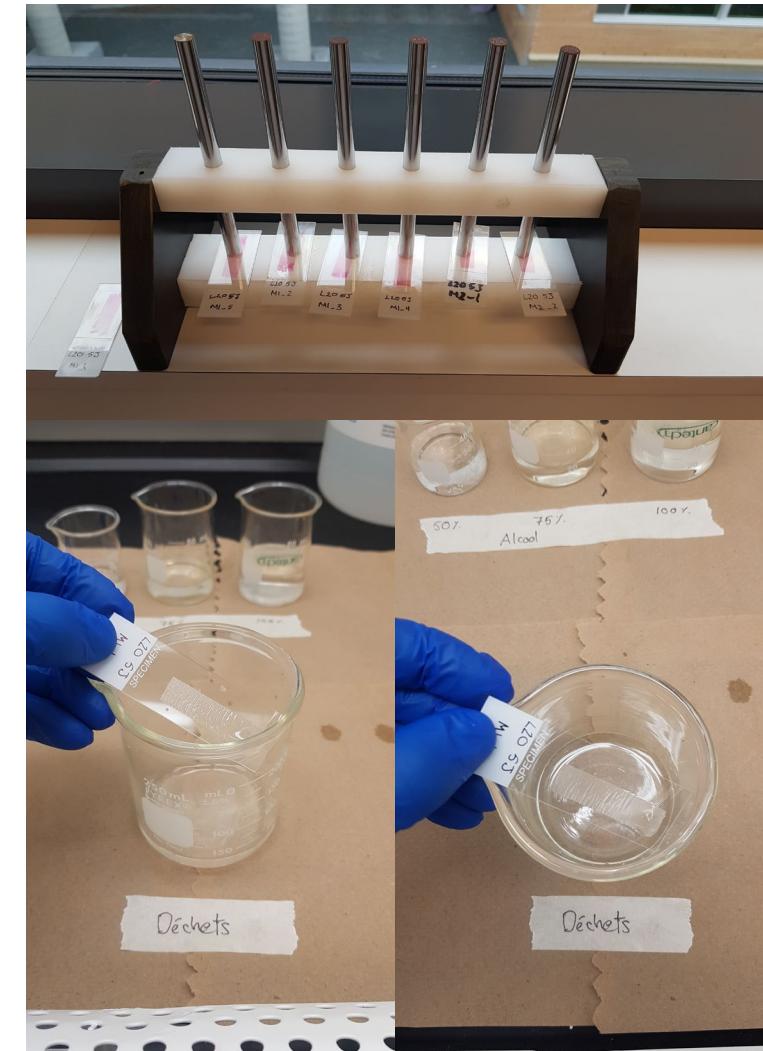
Toluène ??

5. TRAITEMENT DES COUPES

III. Montage permanent

- 1) Déposer la lame sur une surface plane, compresser la surface avec un essui-tout afin d'extraire tout liquide.
- 2) Retirer le papier et y déposer rapidement quelques gouttes de baume du Canada (dépendamment de la taille de l'échantillon, 2 ou 3 gouttes devraient suffir). En gardant la même vitesse d'exécution, déposer un coin du couvre-objet en premier et presser ensuite l'entièreté contre la lame afin de minimiser l'emprisonnement de bulles d'air
- 3) Exercer une pression au centre en poussant vers l'extérieur afin d'expulser les bulles d'air restantes
- 4) Nettoyer l'excédent de baume du Canada (frotter avec de l'alcool et une lingette Kimwipes au besoin)
- 5) Répéter les étapes de déshydratation et de montage permanent pour les autres échantillons
- 6) Soumettre les lamelles à un poids afin de permettre aux dernières bulles d'air de sortir (voir première photo ci-contre)

N.B.: Tout processus de rinçage se fait en accostant un des coins de la lame sur le mur du bêcher « déchets » afin de faciliter l'écoulement (voir photo ci-contre)

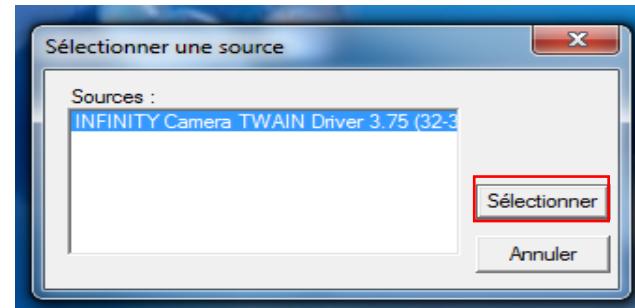
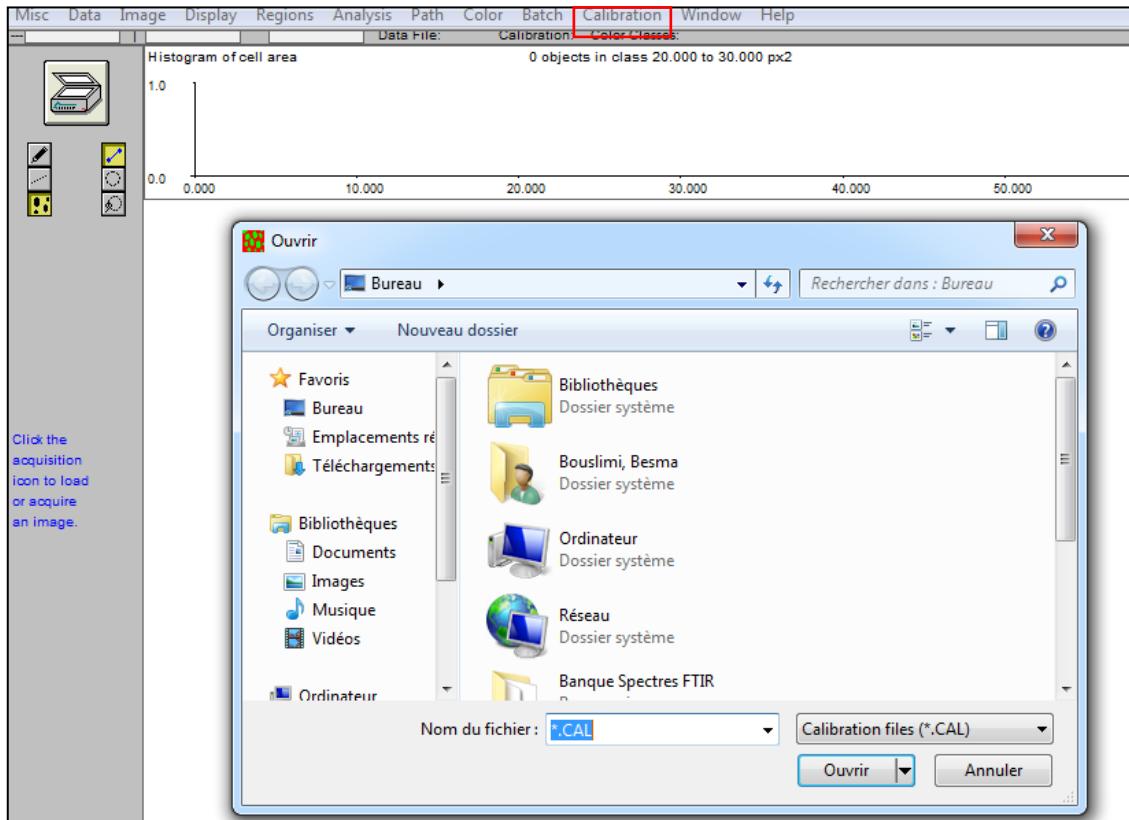


6. WinCELL

1. Ouvrir WinCELL et appuyer sur «Sélectionner»

2. Calibrer le microscope

- Dans l'onglet «Calibration», choisir le fichier de calibration

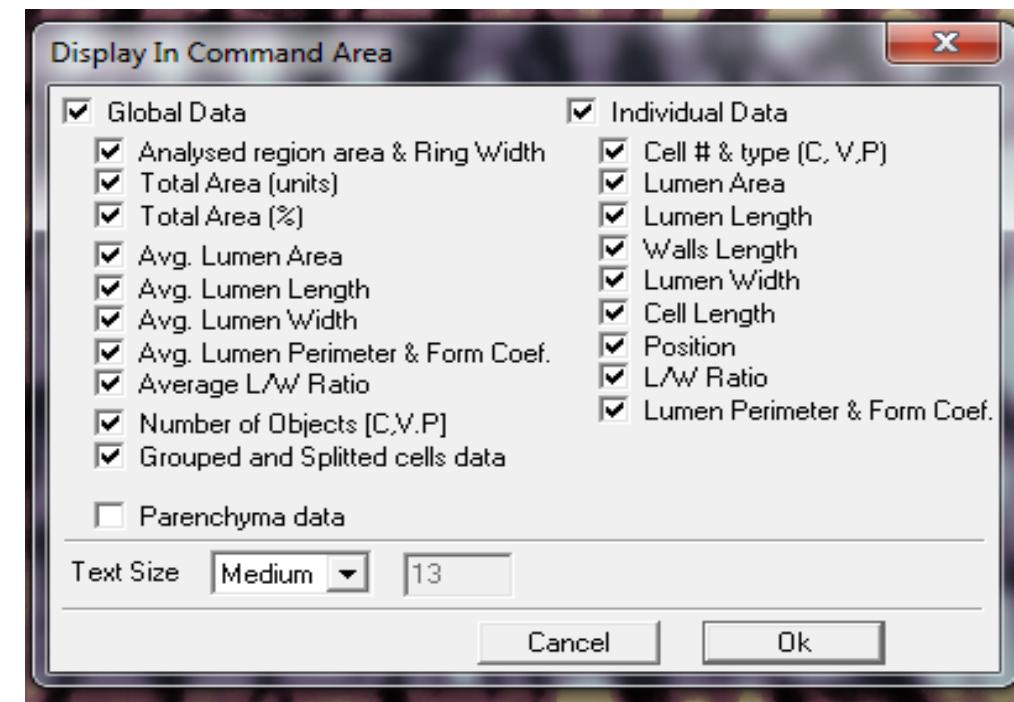
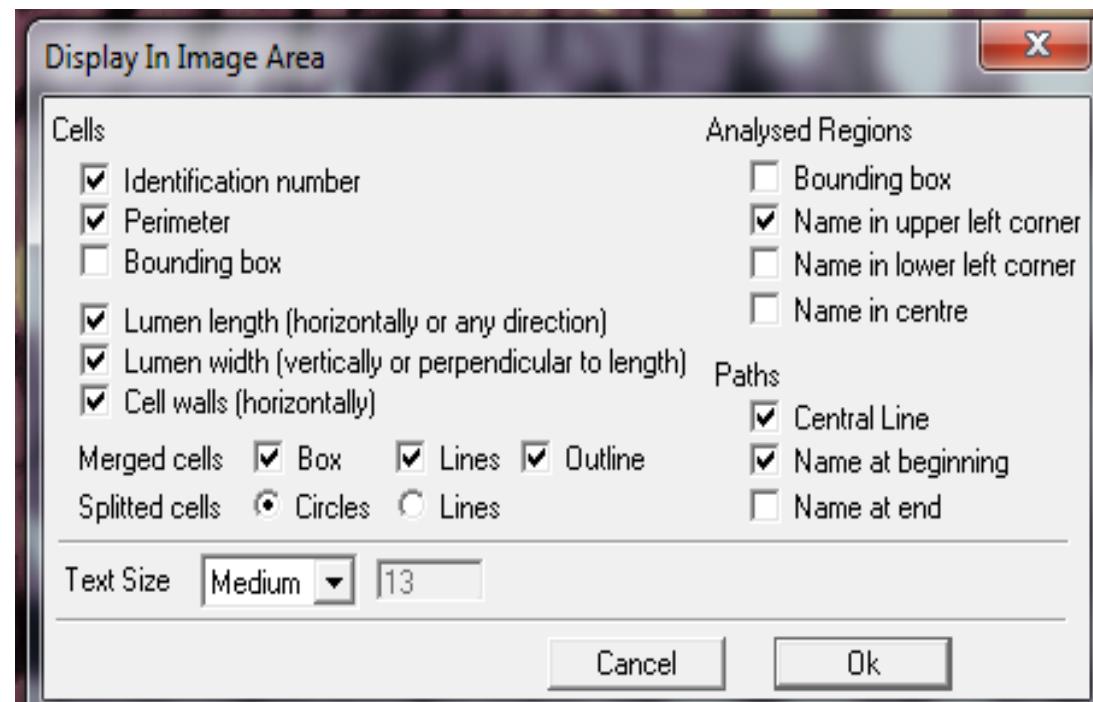


6. WinCELL

- Si aucune calibration n'est enregistrée dans l'ordinateur, suivre les directives du manuel d'instruction de WinCELL à la page 94

3. Identification des paramètres à mesurer

- Dans l'onglet «Display», choisir «Command area» et «Image area»



6. WinCELL

4. Prise de l'image

- Déposer la lame sur la platine en la sécurisant entre les valets du microscope optique
- À l'aide de la tourelle, choisir l'objectif ayant un grossissement de 50 et identifier les cernes initiales de la coupe
- Tourner la tourelle et choisir un grossissement de 100
- Cliquer sur l'onglet « **Image** », « **Origin** » puis « **Scanner or digital camera** »
- Cliquer sur  pour basculer vers l'appareil photo du microscope

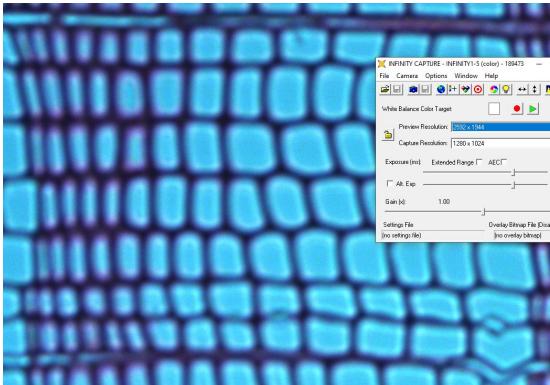
5. Identification

- Inscrire le nom de l'échantillon dans la section « **Sample ID** » et le nom de l'opérateur dans la section suivante

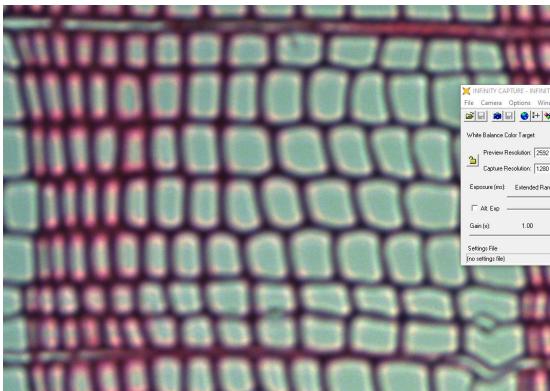
6. WinCELL

6. Réglage de l'image

- L'objectif de cette étape est de créer une image nette tout en permettant de différencier la matière (bois) du fond blanc.
- Voici l'image obtenue à un grossissement de 100x en orientant la caméra du microscope afin d'orienter les rayons horizontalement



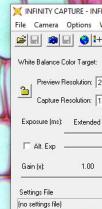
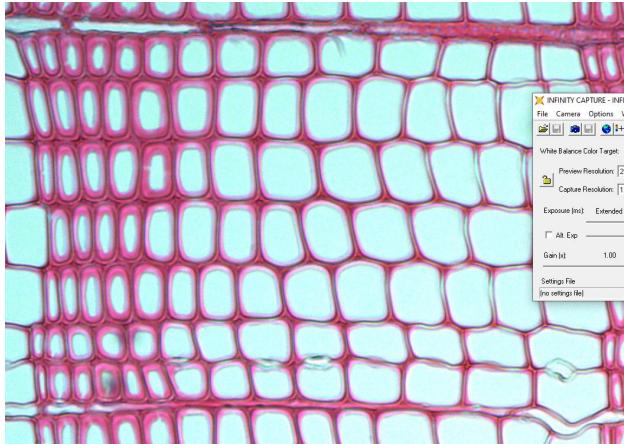
- Cliquer sur pour faire un balancement global des couleurs afin de discerner automatiquement le blanc des autres couleurs.



1. Coupe de l'arbre 2. Préparation des morceaux 3. Hydratation 4. Coupe anatomique 5. Traitement 6. WinCELL

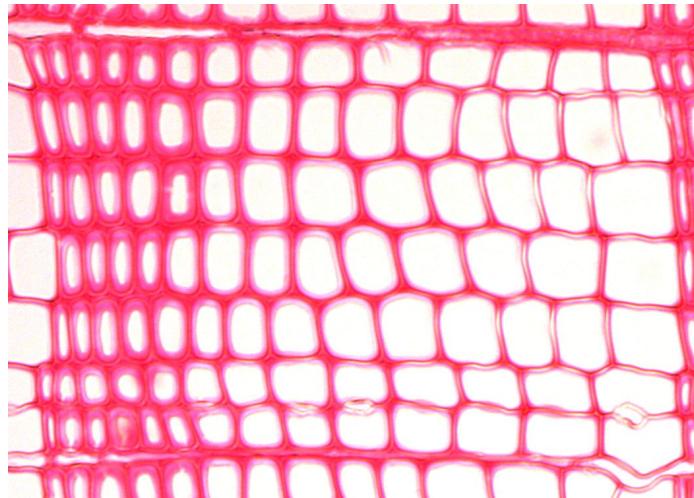
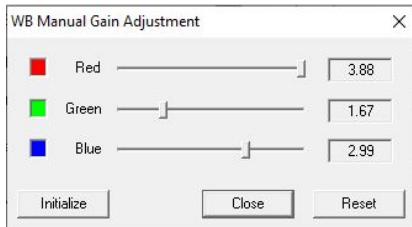
6. WinCELL

- Faire le focus avec la macrovis et la microvis du microscope afin d'obtenir un résultat semblable à celui-ci



- Cliquer sur et augmenter la couleur rouge au maximum

Avec ajustements de couleurs



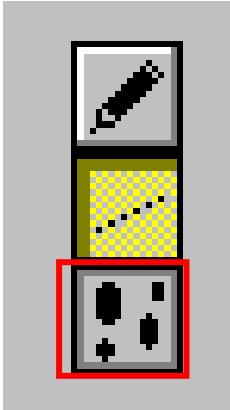
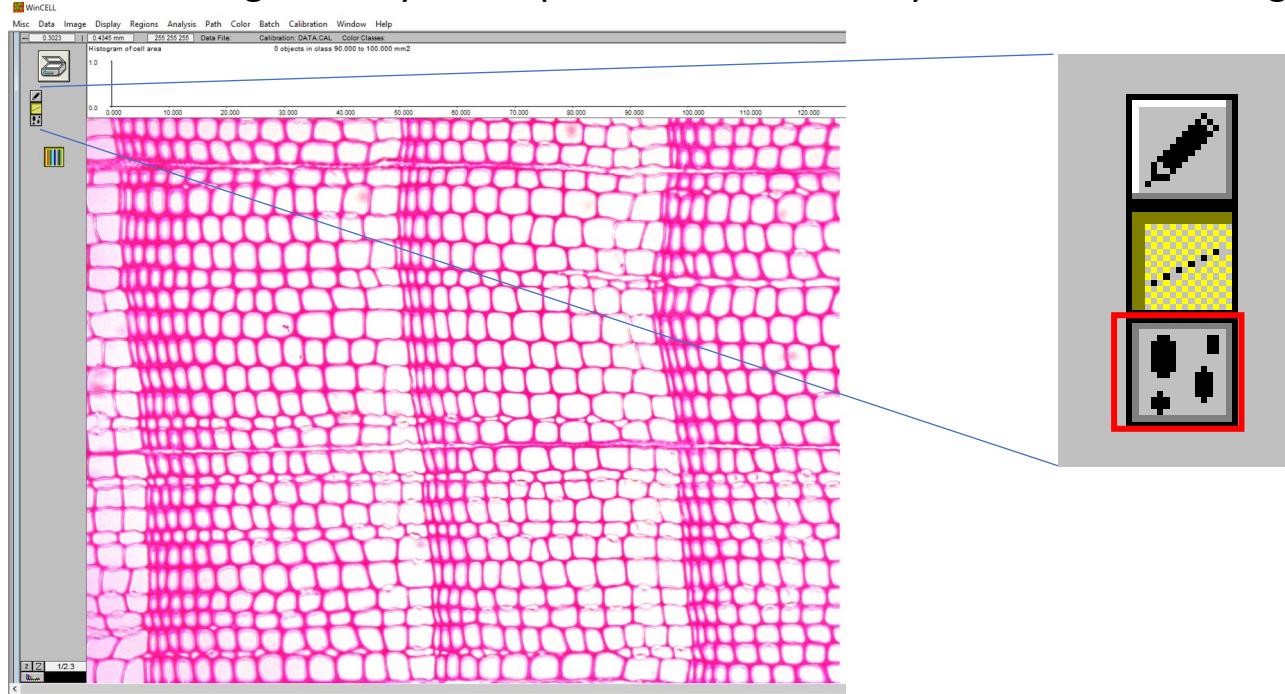
L'image ci-contre est un bon exemple d'une cerne renfermant certains rayons dont les caractéristiques anatomiques peuvent être exploitées

6. WinCELL

- En cas de besoin, modifier les autres options afin d'obtenir une image nette dont le fond et les cellules sont bien contrastées
 - Augmenter ou diminuer la luminosité, le contraste et la gamme dans 
 - Ajuster la teinte et/ou la saturation en cliquant sur 
- Une fois la mise au point réussie, cliquer sur 

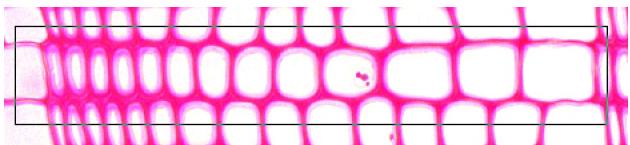
7. Analyse de l'image

- Voici l'image à analyser. Cliquer sur l'icône d'analyse, encadrée en rouge.



6. WinCELL

- Choisir un ou plusieurs rayons adjacents à analyser en créant une zone d'analyse en cliquant sur  qui se trouve sur le tableau de bord.

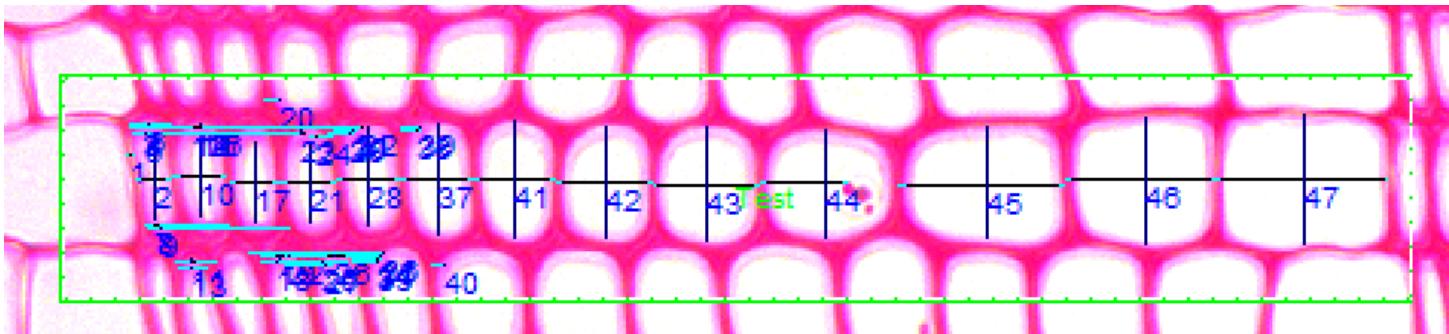


- La fenêtre suivant s'ouvre, inscrire le nom de l'échantillon et l'utilisateur, OK.

Identification

Sample	Test
Year	2011
Image #	1
Present in image	<input type="checkbox"/> Beginning of year <input type="checkbox"/> Ending
Operator	Marc

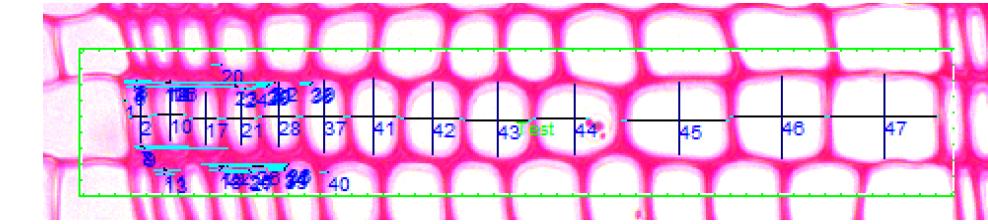
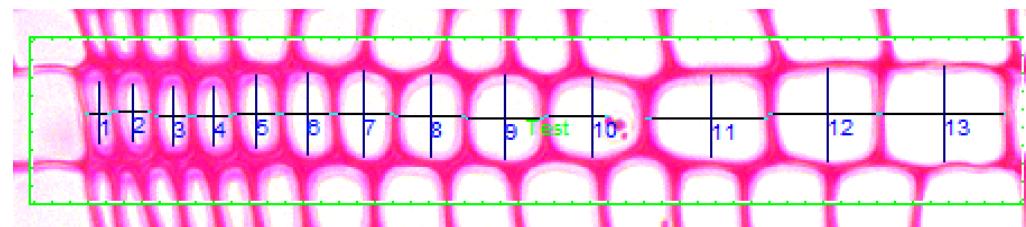
- L'analyse se fait et une fenêtre s'ouvre pour créer un fichier .TXT renfermant les informations analysées. Cliquer « **Create one** » et enregister le fichier dans vos dossiers.



6. WinCELL

8. Ajustements post-analyse

- Puisque l'image n'est pas parfaite, le logiciel détecte mal certaines structures. Il faut donc ajuster manuellement l'analyse.
 - Le logiciel détecte des fausses cellules aux pourtours des vraies cellules. En effet, on voit bien qu'il y a en réalité 13 cellules complètes dans la boîte, et non 47.
 - Dans l'onglet « **Analysis** », choisir « **Filters** » et entrer les valeurs nécessaires afin d'ignorer les fausses détections (les objets qui ne sont pas de vraies cellules).
 - Dans ce cas-ci, il suffisait seulement changer la valeur de « **Area** » afin d'exclure les valeurs non pertinentes.



Debris Filtering

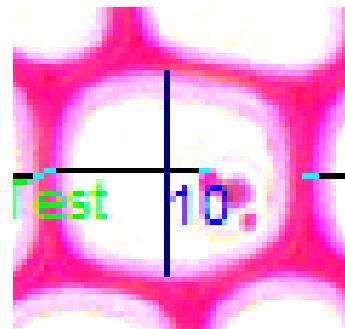
Remove from the analysis objects which meet these criteria

<input checked="" type="checkbox"/> Area < [0.0001] mm ²	<input type="checkbox"/> Area > [0.0003] mm ²
<input type="checkbox"/> Length < [0.1000] mm	<input type="checkbox"/> Length > [10.0000] mm
<input type="checkbox"/> Width < [0.0100] mm	<input type="checkbox"/> Width > [1.0000] mm
<input type="checkbox"/> Form coefficient < [0.0000]	<input type="checkbox"/> Form coefficient > [0.9000]
<input type="checkbox"/> Length/Width ratio < [10.0000]	<input type="checkbox"/> Length/Width ratio > [8.0000]

Image smoothing Intensity Medium

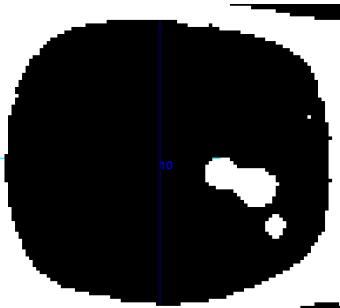
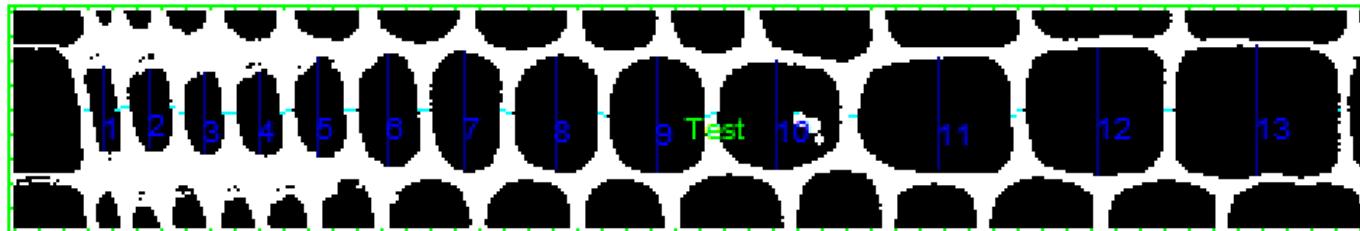
Cancel Ok

- Certains paramètres anatomiques ne sont pas bien tracés (e.g.: le diamètre de la cellule #10 n'est pas complet car un objet coupe la trajectoire).



6. WinCELL

- Cliquer sur  dans le tableau de bord, soit le sélecteur d'image par pixelisation. Voici le résultat. En blanc apparaissent les zones non conservées par l'analyse et en noir, celles étant prises en compte. On voit bien que dans la cellule #10 se trouve une zone qui n'est pas conservée.



- Cliquer sur l'icône suivante pour permettre des modifications de l'image pixelisée. 
- Cliquer sur les icônes suivantes pour combler les trous dans l'image.



Couleur de remplissage



Taille du traçage

- Une fois le remplissage complété, cliquer sur  pour recommencer l'analyse et appuyer sur  afin de mieux voir les distinctions entre les différentes zones d'analyse.

