

Microscopies et Microanalyses des matériaux mous et biologiques

13 et 14 Mai 2004, dans les locaux de L'OREAL à Aulnay sous Bois (93)

Résumés des Intervenants

La Gonio-spectro-photo-colorimétrie appliquée à l'étude des oeuvres d'art,

Mady ELIAS (Groupe 'couleur', C2RMF, Université d'Evry Val d'Essonne)

L'appareil présenté a été développé au C2RMF pour être adapté à l'étude des œuvres d'art fragiles, uniques et parfois non déplaçables. Les mesures sont donc non-destructives, sans contact, réalisables *in situ* quelle que soit la position de l'œuvre. Elles conduisent à des résultats en temps réel. La gonio-photométrie permet de chiffrer l'état géométrique des surfaces étudiées et de reconnaître par exemple les différentes techniques d'application de l'or. La spectrométrie de réflectance diffuse permet d'identifier les pigments ou les colorants, mais également de comprendre les modifications d'aspect visuel dues à l'application de vernis. La colorimétrie est utilisée comme constat de l'état de conservation des œuvres mais elle peut également être mise en œuvre pour distinguer différentes techniques picturales comme celle des glacis de Primitifs Flamands, comparée aux mélanges pigmentaires ou au pointillisme.

Spectroscopie d'émission X sous vide primaire de films et matériaux polymères,

Maurice ROMAND, M. CHARBONNIER (Université Claude Bernard Lyon I)

La présentation rappellera le principe de la spectrométrie d'émission X induite par excitation électronique de basse énergie (LEEIXS). Cette technique (WDS) dispersive en longueur d'onde utilisant comme source d'excitation un faisceau électronique émis par un tube à décharge opère donc sous vide primaire. Le potentiel de cette technique d'émission des rayons X mous et ultra- mous en tant qu'outil d'analyse des surfaces et des films minces (<100 nm) sera illustré à l'aide de différents exemples (analyse des éléments légers C, N, O, F, Si ... via leur radiation $K\alpha$). Ces exemples concerneront le dépôt de films organiques ou polymères obtenus par auto-assemblage (SAM), électrodéposition, électropolymérisation, polymérisation plasma, évaporation thermique ... sur différents substrats.

Un des objectifs de la présentation vise à montrer comment les analyses effectuées peuvent être utilisées pour optimiser certains procédés de dépôts de films minces et ultraminces.

La microanalyse des polymères,

Alain JADIN (CERTECH, Belgique)

L'observation et la microanalyse des polymères dans un MEB présentent de nombreux aspects spécifiques dus aux propriétés de ces matériaux. On retiendra notamment les problèmes liés au caractère isolant des polymères ou à la détérioration des échantillons sous le faisceau, beaucoup plus critique que pour les matériaux inorganiques. Les signaux émis lors du bombardement électronique sont généralement peu intenses et le contraste des images

fournies est faible. On verra également que la microanalyse d'une matrice polymère seule par MEB apporte peu d'information, contrairement à celle des polymères contenant des charges inorganiques (nature, taille, répartition, ...). L'analyse des matériaux multi-phasiques peut être réalisée sous certaines conditions en faisant appel à des techniques de marquage sélectif. Les techniques de préparation seront abordées et quelques applications variées seront décrites afin de démontrer l'apport essentiellement qualitatif de la microanalyse de systèmes à base de polymères. On verra également que le développement récent des microscopes à pression variable est déterminant pour l'analyse de ces matériaux.

Caractérisation mécanique et topographique de matériaux mous par nano-indentation, nano-rayure et interférométrie 3D en lumière blanche,

David RUCH, Nathalie Bonnel de Longchamp, Maury Bakayoko, Mickaël Thouvenin (Laboratoire de Technologies Industrielles, CRP Henri Tudor, Luxembourg)

L'apparition de techniques de caractérisation novatrices associée à une augmentation de leur potentiel a non seulement permis le développement de nouveaux matériaux mais également la connaissance plus approfondie des microstructures mises en jeu. Ces aspects primordiaux ont notamment été mis en avant pour la caractérisation de matériaux biologiques sur lesquels les dimensions réduites imposent l'emploi d'une instrumentation de test adaptée à leur échelle notamment.

De nombreuses études ([1], [2]) démontrent d'ores et déjà le potentiel d'analyse dimensionnelle et microstructurale de matériaux biologiques par microscopie à force atomique (A.F.M.).

Nous allons montrer que la combinaison des techniques de nano-indentation, de nano-rayure et d'interférométrie permet, par des méthodologies d'analyse adaptées, de quantifier les propriétés tribologiques, mécaniques et structurales de ces polymères. Une étude comparative de leurs propriétés est ainsi rendue possible.

Ces méthodes ont comme principal avantage de permettre une étude plus représentative du matériau que l'AFM puisqu'elle autorise une diversité des paramètres mesurés plus vaste et ce à une échelle plus caractéristique. En outre, c'est une méthode d'acquisition de données beaucoup plus rapide que l'AFM.

Pour ce faire, notre présentation s'articulera autour de deux thèmes : la caractérisation de matériaux mous synthétiques sur lesquelles notre expérience est bien établie et des matériaux biologiques.

D'une part, des polymères synthétiques tels que le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le polycarbonate (PC), le polyimide (PI) ou bien encore des revêtements de sol sont étudiés. Ces revêtements de sol sont constitués de polychlorure de vinyle (PVC) avec, dans certains cas, une couche supplémentaire d'élastomère d'épaisseur micrométrique. Différentes méthodologies d'analyse seront présentées pour montrer la complémentarité des techniques utilisées.

D'autre part, des polymères biologiques de type cheveux provenant de diverses ethnies (africaine, européenne, asiatique) sont testés. Ceux-ci sont prélevés sur plusieurs parties du cuir chevelu (tonsure, côtés) et subissent différents traitements cosmétologiques (décoloration, laquage, teinture, shampooinage).

L'origine ethnique et la zone de sélection sur le cuir chevelu fournissent des cheveux d'aspect et de géométrie variables. En outre, l'application de traitements cosmétologiques modifie à divers degrés leur structure interne et externe. Par ailleurs, ceci est confirmé par une étude antérieure ([4]).

L'observation de ces cheveux par microscopie optique révèle de fortes hétérogénéités de surface entre les échantillons tests. Il est vraisemblable que les propriétés mécaniques, tribologiques et géométriques s'en trouvent significativement modifiées.

L'analyse par nano-rayure montre d'ores et déjà une altération quantifiable des propriétés de frottement du cheveu à différents niveaux. Celles-ci ont pu être reliées par interférométrie à l'aspect de surface du cheveu lorsqu'il s'agit de traitements cosmétologiques. Par ailleurs, des hétérogénéités de résistance à l'usure par analyse combinée de nano-rayure et d'interférométrie sont observées entre des cheveux de personnes distinctes.

En somme, cette étude a permis de mettre en œuvre une méthode d'analyse combinée des techniques de nano-rayure et d'interférométrie en lumière blanche. Celle-ci fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs sur le panel de cheveux testé.

Par la suite, notre étude se poursuivra au travers de tests sur d'autres parties du cheveu (variabilité des propriétés le long de la tige) et du cuir chevelu dans son ensemble (vertex, régions pariétale, frontale, occipitale) ainsi que par des tests de résistance à l'usure après traitements. En outre, des mesures de module d'Young et de dureté seront opérées dès mise au point du protocole de test.

Références

- [1] J.A.A. CROSSLEY, C.T. GIBSON, L.D. MAPLEDORAM, M.G. HUSON, S. MYHRA, D.K. PHAM, C.J. SOFIELD, P.S. TURNER, G.S. WATSON : Atomic force microscopy analysis of wool fibre surfaces in air and under water. *Micron*. 31 , 659-667 (2000).
- [2] J. BLACH, W. LOUGHLIN, G. WATSON, S. MYHRA : Surface characterization of human hair by atomic force microscopy in the imaging and F-d modes. *International Journal of Cosmetic Science*, 2001, 23, 165-174.
- [3] OLIVER W.C., PHARR G.M. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*, 1992, Vol. 7, N° 6, pp. 1564-1583.
- [4] W. EISFELD, T. VIENENKOTTER, Y. KARA, P. BUSCH : Evaluation of tactile skin properties by piezoelectric sensors. *SÖFW Journal*. 125(9), 2-12 (1999).

Applications des micro faisceaux d'ions dans le domaine des sciences de la vie,

Philippe MORETTO (Interface Physique-Biologie, CENBG - Gradignan)

En termes d'analyse, les microfaisceaux d'ions légers (H^+ , He^+) dans le domaine du MeV permettent d'obtenir un certain nombre d'informations indispensables dans l'étude de phénomènes touchant la matière vivante, que ce soit en médecine, en biologie ou dans le domaine de l'environnement. Le fait de pouvoir cartographier des distributions élémentaires à l'échelle d'une coupe de tissu ou d'une cellule permet d'accéder à la localisation de substances exogènes comme des toxiques ou des molécules à effet thérapeutique. Le dosage local des éléments traces essentiels à la vie dont l'homéostasie est étroitement contrôlée par le métabolisme est également du plus haut intérêt. Enfin, les minéraux, en général très compartimentés dans les tissus vivants, peuvent être étudiés du point de vue des échanges ioniques cellulaires.

La plupart de ces éléments sont facilement accessibles aux techniques d'analyse par microfaisceau, à condition de respecter une préparation d'échantillon qui permette de placer des tissus sous vide. De telles méthodes, très proches de celles utilisées pour la microscopie électronique, sont essentiellement basées sur des cryotechniques (cryofixation, cryomicrotomie, lyophilisation à basse température ...). Les méthodes d'analyse utilisées, PIXE, RBS, STIM, souvent sous forme d'analyse bidimensionnelle, peuvent être parfois mises en

œuvre simultanément, ce qui permet par exemple, de faire un dosage dans un tissu tout en mesurant sa masse organique et de faire de l'imagerie par densitométrie.

Au cours de cette revue, seront décrites quelques applications récemment développées dans les domaines de la dermatologie, de la physiologie des anticancéreux et de la pathologie. Cet exposé sera complété par quelques applications en tomographie ainsi que par l'utilisation d'une ligne d'irradiation ion par ion à l'échelle cellulaire, dispositif destiné à des études de radiobiologie sur les effets des faibles doses.

Matériaux mous et biologiques analysés par SIMS,

Jean-Nicolas AUDINOT et H.-N. MIGEON (LAM, Luxembourg)

La spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) utilise un faisceau d'ions primaires énergétique afin de pulvériser la surface des échantillons produisant ainsi des ions secondaires qui sont analysés par un spectromètre de masse à double focalisation. Cette technique d'analyse, qui possède une très grande sensibilité, était limitée jusqu'à présent à une résolution spatiale utile de 300 à 500 nm. Ces dernières années, un nouvel instrument, le NanoSIMS50, a été développé afin de focaliser le faisceau d'ions primaire en dessous de 100 nm dans des conditions optimales de sensibilité et de résolution en masse. Ceci permet de cartographier la répartition isotopique et élémentaire avec une résolution latérale de l'ordre de 50 nm.

Ce papier sera focalisé sur une description technique du NanoSIMS50 et, au travers de quelques résultats obtenus au Laboratoire d'Analyse des Matériaux (LAM), nous démontrerons le potentiel de cet instrument pour l'étude des tissus biologiques et des matériaux mous.

Cartographie isotopique des fibres capillaires,

Philippe HALLEGOT (L'Oréal Recherche, Aulnay sous Bois)

Les déterminations des métabolismes ou des réactions chimiques qui ont lieu dans le cheveu sont presque exclusivement déduites d'analyses globales de composés extraits.

L'inconvénient majeur de ces analyses est qu'elles ne fournissent aucune indication spatiale pourtant indispensable à la compréhension des phénomènes.

Afin de combler cette lacune, nous avons appliqué la technique SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) à l'analyse de cheveux. Des cartographies haute résolution d'isotopes constitutifs de la fibre ou de traceurs ont alors été obtenues. Elles ont permis une meilleure connaissance de la structure de la médulla et des pigments de mélanine. Ces cartographies et les rapports isotopiques précis que l'on peut en déduire ont également contribué à la compréhension de l'action d'agents réducteurs.

Micro-analyse et imagerie synchrotron de matériaux mous et biologiques,

Jean DOUCET (Laboratoire de Physique des Solides, Bât.510, Université Paris-Sud F-91405 Orsay)

L'association de divers équipements de focalisation des faisceaux de rayons X (capillaire de verre, lentille de Bragg-Fresnel, lentille réfractive, guide d'onde) avec les faisceaux très faiblement divergents et très brillants issus des sources synchrotron de troisième génération permet maintenant de produire des faisceaux micrométriques ou submicrométriques. Deux

grandes familles de techniques en bénéficient: les techniques de micro-analyse et les microscopies à balayage.

Les potentialités de ces nouvelles techniques (micro-diffraction, micro-fluorescence X, la spectroscopie micro-XANES, micro-spectroscopie IR, micro-tomographie) seront illustrées à travers quelques exemples choisis dans le domaine des matériaux mous et biologiques en mettant en avant leur sélectivité chimique ou structurale.

Application de l'IRM à la caractérisation de la peau humaine in vivo,

Bernard QUERLEUX (L'Oréal Recherche, Aulnay sous Bois)

Parmi les méthodes d'imagerie non invasives permettant de caractériser la peau in vivo, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) tient encore une faible place essentiellement car des modifications techniques importantes doivent être apportées à des équipements conventionnels pour obtenir une résolution spatiale suffisante pour l'imagerie de la peau. Cette difficulté aura disparu dans les prochaines années avec les développements prévus sur les nouvelles machines.

Nous présenterons tout d'abord très rapidement la solution retenue par notre groupe pour obtenir des images de la peau humaine in vivo à une résolution de 50 μm . Puis nous présenterons des exemples d'images de la peau saine ou pathologique obtenues sur différents sites corporels.

Mais l'IRM est une modalité d'imagerie complexe, longue, et onéreuse, et si seulement des informations morphologiques étaient accessibles, elle serait de relativement peu d'intérêt. Cependant, l'IRM apporte une information complémentaire fondamentale permettant d'accéder à une information tissulaire ou physiologique grâce à une mesure ou cartographie de nombreux paramètres intrinsèques au tissu étudié (temps de relaxation densité de protons, diffusion, spectroscopie localisée, ...), descriptifs d'interactions au niveau moléculaire.

Nous illustrerons ce propos par une présentation de quelques études axées sur la contribution de l'IRM à une description *in vivo* des modifications cutanées induites par le vieillissement chronologique.

Les techniques de préparation d'échantillons biologiques par cryogénie,

Daniel STUDER (Anatomisches Institut, Universitat Bern, Bühlstrasse 26, 3000 Bern 9)

La cryofixation par rapport à la fixation chimique permet de mieux préserver les échantillons biologiques. Quand un échantillon est parfaitement congelé, on peut supprimer quasiment tous les effets osmotiques qui existent avec la fixation chimique. Une cryofixation optimale est réalisée quand l'eau se vitrifie, ce qui signifie que les molécules d'eau n'ont pas eu le temps de former des cristaux.

L'exposé décrira la théorie de la congélation et les différentes techniques utilisées en biologie (les mêmes techniques sont applicables pour tous les échantillons hydratés). La congélation à haute pression, la plus performante, sera décrite en détail avec l'EMPACT de Leica comme référence.

Cryo-microscopie électronique des matériaux biologiques,

Cédric BOUCHET-MARQUIS (Laboratoire d'analyse ultrastructurale (LAU), Faculté des Sciences de Lausanne)

La Cryo-microscopie électronique est une des techniques de pointe à l'heure actuelle pour l'observation d'échantillons biologiques et la meilleure en ce qui concerne leurs préservation. Elle permet d'éliminer les effets osmotiques dus à la fixation chimique et à la déshydratation qui sont en grande partie responsables d'agrégation et de perte de matériel biologique que l'on peut observer sur les échantillons en préparation classique. Elle est idéale pour observer, décrire et comprendre à terme la "vraie" organisation du noyau cellulaire qui sera observée dans l'état le plus proche du vivant.

L'exposé décrira (i) les grandes lignes de l'obtention de sections hydratées sur du matériel préalablement vitrifié par haute pression et l'observation au microscope électronique à transmission. Il sera montré (ii) comment estimer la bonne fixation de l'échantillon, physiquement et biologiquement parlant. Puis la puissance de la méthode sera montrée par (iii) l'observation de l'organisation générale d'un noyau de cellule CHO (cellule d'ovaire de hamster) ou HTC (cellule tumorale d'hépatocyte) respectivement cryo-fixés en suspension et en monocouche comparés au noyau en préparation classique (enrobage en résine et coloration).

Nouveaux développements en tomographie électronique,

Sergio MARCO (Institut Curie, Paris)

La tomographie est une méthode de reconstruction 3D basée sur la combinaison de projections, enregistrées à différents angles, de l'objet à reconstruire [1]. En fonction du système utilisé pour générer les projections, on peut parler de tomographie axiale computerisée (CAT-scan) ou de tomographie électronique. Le développement des méthodes d'automatisation pour l'acquisition des images ainsi que l'augmentation de la puissance de calcul et de stockage des ordinateurs a permis à la tomographie électronique d'aborder l'étude 3D de structures sub-cellulaires complexes telle que le golgi [2] ou la mitochondrie [3]. Combinée à la filtration en perte d'énergie la tomographie électronique est à l'origine de la cartographie chimique 3D [4,5] ou "energy filter transmission electron tomography" (EFTET). Cette nouvelle méthode permet d'analyser la distribution spatiale de plusieurs composantes chimiques de structures mésoscopiques (de 100nm – 1µm). Initialement appliquée aux sciences des matériaux l'EFTET commence aussi à être utilisée en biologie.

Dans ce contexte, des nouvelles approches méthodologiques pour améliorer les performances de la tomographie électronique sont en train d'être réalisées. Ainsi, au niveau de l'amélioration de la qualité des images enregistrées, l'utilisation de techniques de cryo-microscopie réduit les effets de la radiation électronique. D'un autre côté, des algorithmes de recalage des volumes permettent d'augmenter la résolution du volume final. Finalement, dans le cas de la EFTET, le développement de méthodes de soustraction du bruit de fond dans l'espace 3D permet d'obtenir des cartes d'éléments à des valeurs de perte d'énergie supérieures à 400eV, telles que l'oxygène et le fer.

Les principes de la tomographie électronique, ainsi que les nouvelles approches pour l'observation des échantillons, pour le recalage des volumes et pour la EFTET seront développés à l'aide de plusieurs exemples biologiques. Notamment, par : (i) l'étude de la morphogenèse des mélanosomes. Ces organelles, sont impliqués dans des processus biologiques essentiels telles que la synthèse et le stockage de la mélanine ainsi que dans plusieurs maladies de dépigmentation de la peau; (ii) l'analyse de la structure des centrioles des corpuscules basaux, qui, ayant leur rôle dans la motilité cellulaire sont similaires aux

centrioles des centrosomes responsables de la division cellulaire; et (iii) l'étude, par EFTET, des inclusions métalliques granulaires chez des bactéries qui représente un mécanisme d'adaptation aux milieux extrêmes.

Références

- [1] Frank, J. 1992. Electron tomography. Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope. Plenum Press. New York
- [2] Ladinsky, M.S., Wu, C.C., McIntosh, S., McIntosh, J.R., Howell, K.E. 2002. Structure of the Golgi and Distribution of Reporter Molecules at 20 degrees C Reveals the Complexity of the Exit Compartments. *Mol. Biol. Cell.* **13**:2810-2825.
- [3] Nicastro D, Frangakis AS, Typke D, Baumeister W. (2000). Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria. *J. Struct. Biol.* **129**:48-56.
- [4] Möbus G, Doole R.C, Inkson B.J (2003). Spectroscopic electron tomography. *Ultramicroscopy* **96**:433-451.
- [5] Midgley P.A, Weyland M. (2003). 3D electron microscopy in the physical sciences: the development of Z-contrast and EFTEM tomography. *Ultramicroscopy* **96**:413-431.
-

La cryo-ultramicrotomie : application à l'étude morphologique des matériaux,

Jean-Michel GLOAGUEN (LPSE Structure et propriété de l'état solide, Université des Sciences et Technologies de Lille)

Les bases de la technique, les artefacts, comment y remédier : une série d'exemples en TEM, SEM et AFM.

Observation d'objets cellulotiques en Microscopie Electronique à Balayage en mode environnemental,

Olga BIGANSKA, Franck Ducos, Monique Repoux, Patrick Navard (Ecole des Mines de Paris, CEMEF, UMR CNRS / Ecole des Mines 7635, BP 207, 06904 Sophia Antipolis)

Des objets cellulotiques tels que fibres, films et objets tridimensionnels ont été observés à l'aide d'un microscope à balayage en mode environnemental associé, au besoin, à la platine Peltier permettant de maintenir un taux d'humidité désiré dans la chambre du microscope.

Cette technique a permis de mettre en évidence une structure complexe des objets de cellulose régénérés. Elle est composée, dans le cas des objets tridimensionnels, d'une peau fine qui entoure un cœur contenant, dans certains cas, des macropores. La texture du cœur présente une micro porosité qui est due à la séparation de phase dont le mécanisme a été attribué à la décomposition spinodale. L'observation de fibres dont le diamètre ne dépasse pas 10µm s'est avérée beaucoup plus délicate. Néanmoins, il a été possible de conclure que leur structure cœur-peau est similaire. Ce résultat important en soi, permet, en outre, d'expliquer le phénomène de fibrillation observé sur les fibres humides soumises à un traitement mécanique.
