



Edité le 14/06/2011

MEB et Biologie MEB et Techniques Annexes

Mercredi 29 juin 2011 : MEB et Biologie

10h00 - 11h00 Accueil des participants autour d'un café

11h00 - 11h30 **Hydrogels de chitosane, relations structures - propriétés après implantation sous-cutanée : contribution de l'imagerie par cyro-MEB FEG.**

Sébastien MALAISE, Ingénierie des Matériaux Polymères/Univ. Claude Bernard, Lyon
Béatrice Burdin (2), Pierre Alcouffe (1), Lila Rami (3), Alexandra Montembault (1), Laurence Bordenave (3) et Laurent David (1)

(1) Ingénierie des Matériaux Polymères/Université Claude Bernard Lyon1 ;

(2) Centre Technologique des Microstructures, Université Claude Bernard Lyon1 ;

(3) INSERM, U1026, Bordeaux

Le développement de nouveaux biomatériaux tels que les hydrogels à base de chitosane constitue une voie très prometteuse dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Le chitosane est un biopolymère issu de la carapace de crustacés et de l'endosquelette des céphalopodes. Les hydrogels physiques fabriqués à partir de ce polymère sont biocompatibles, biodégradables, et peuvent avoir une activité cicatrisante, ils miment partiellement la structure de la matrice extracellulaire.

Les hydrogels de chitosane peuvent être synthétisés sous plusieurs formes et avec des structures différentes leur donnant des propriétés particulières. Dans le cadre du projet présenté, les hydrogels sont élaborés de façon à constituer des substituts vasculaires dans une perspective médicale de greffe ou de chirurgie vasculaire reconstructrice.

Des hydrogels de structures différentes ont été dans un premier temps implantés dorsalement chez des rats. Ils ont été prélevés après une ou plusieurs semaines et analysés en histologie et par microscopie électronique à balayage. De par leur nature essentiellement composée d'eau, ces hydrogels représentent un challenge pour les microscopies électroniques, ne serait ce que par le choix de la technique de visualisation mais aussi et surtout par la méthode de préparation.

Des protocoles doivent être développés et mis en œuvre pour un résultat sans équivoque quant à la porosité et la structure des matériaux. Le passage à la cryomicroscopie, qu'elle soit à balayage pour l'observation de la micro structure ou à transmission pour l'ultrastructure, semble être la voie la plus adaptée.

Nous détaillerons dans cette présentation les premiers résultats obtenus sur un CryoMEB-FEG et les comparerons à des résultats obtenus en mode pression contrôlée.

11h30 - 12h00 Apports et intérêt d'un équipement cryo sur un microscope électronique à balayage.

Pierre GOUNON, CCMA Faculté des Sciences, Nice

L'idée d'observer des objets congelés directement dans la chambre d'un microscope à balayage, sans être nouvelle, est toutefois très pertinente. En effet les objets hydratés qu'ils le soient peu ou beaucoup ne peuvent aller dans la chambre d'observation sans un traitement préalable (fixation, déshydratation, et évaporation des éléments de substitution de l'eau) souvent compliqué et dont le résultat peut être assez aléatoire. Malgré une excellente maîtrise de toutes ces techniques ces étapes préalables prennent du temps. Dans quelques cas, la solution technique n'est pas évidente ou pas vraiment réalisable. Deux approches se sont fait jour pour contourner ou surmonter la difficulté : le MEB environnemental et ses déclinaisons et la platine froide (cryo platine).

Le principe est très simple, un échantillon est congelé (une étape à faire avec beaucoup de soin) et transféré sur un support refroidi à -100°C ou plus bas. A cette température on sait que l'eau contenue dans l'échantillon ne peut pas être sublimée quel que soit le vide dans la chambre du microscope.

En fait la mise en œuvre est un peu plus compliquée car il faut aussi éviter le dépôt de givre (contamination) pendant le transfert (et si il y en a pouvoir l'enlever), pouvoir fracturer l'échantillon en cours d'observation, puis sublimer l'eau de l'échantillon pour clarifier les structures et enfin rendre l'objet conducteur en faisant un dépôt métallique (or ou or-palladium). Finalement on aboutit à un appareillage un peu compliqué, un peu cher mais très stable et tout compte fait simple d'emploi et surtout très versatile. Le microscope avec cet attachement de cryotransfert n'est pas fortement modifié (sinon avec un module extérieur fixé sur la chambre et une cryoplatine à ajouter dans la chambre).

Avec un tel système les applications sont nombreuses et relativement simples à mettre en œuvre. La préparation des échantillons est rapide, la résolution du microscope n'est pas fondamentalement altérée. Nous montrerons et suggérerons tout une série d'applications.

12h00 - 12h30 Stratégies alimentaires de diverses espèces inféodées aux bois coulés.

Magali ZBINDEN, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Véritables oasis dans le domaine marin profond, les bois coulés abritent une faune abondante, très diversifiée et atypique qui serait à l'origine de la formation d'un réseau trophique durable.

Une des questions importantes est de déterminer l'importance du bois lui-même en tant que source alimentaire et de comprendre la façon dont il est dégradé, puis mobilisé dans le réseau trophique, et par quels organismes.

La recherche, chez ces organismes, d'association avec des symbiotes cellulolytiques est une des clés pour comprendre leurs stratégies alimentaires.

12h30 – 13h00 Characterization of iron oxide concretions associated with bacterial symbionts of a deep-sea hydrothermal vent shrimp. An investigation by various techniques in electron microscopy

Laure Corbari^{1a}, Magali Zbinden², Marie-Anne Cambon-Bonavita³, Frédéric Boulvain^{1b}, Françoise Gaill² and Philippe Compère^{1a}

[1] Université de Liège,

^aDept. Sciences et Gestion de l'Environnement et Cellule d'Appui Technologique en Microscopie (CATμ),

^bDept. Géologie, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium

[2] UMR CNRS 7138, Systématique, Adaptation et Evolution, Université Pierre et Marie Curie, 7 Quai St Bernard, Bâtiment A, 75252 Paris Cedex 05, France

[3] UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrême, Ifremer, centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

The shrimps, Rimicaris exoculata live in dense swarms (> 2,500 ind./m²) on black smoker chimneys of Mid-Atlantic Ridge (MAR) hydrothermal vent sites. They depend on chemoautotrophic bacteria harboured in their gill chamber and fuelled by vent fluid reducing compounds (HS⁻, Fe²⁺, CH₄). Iron oxide nucleates on the bacteria and progressively develops in a heavy mineral crust.

The concretions were imaged down to nanometre scale by use of several techniques of electron microscopy available in the Centre for Applied Technology in Microscopy (Catµ) of the University of Liege (SE-, BSE-, ESED-, GSED-imaging in a FEI XL30 ESEM-FEG, BF/HAADF-imaging and SAD in a Tecnai G2 Twin STEM, EDAX in SEM and TEM).

L. Corbari was post-doctoral fellow research-assistant of the FNRS (Belgium). The work was partly funded with the help of the European MOMARNET program and of the Belgian Fund for Joint Basic Research (F.R.F.C-Belgium, convention n° 2.4594.07.F)

13h00 - 14h00 Déjeuner

14h00 - 14h45 Femtosecond electron microscopy of graphitic materials.

Fabrizio CARBONE, EPFL Lausanne (conférence plénière)

14h45 - 16h30 Session Posters et Pause

16h30 - 17h00 Le cycle cellulaire d'*Aspergillus fumigatus* visualisé par cryo-MEB.

Stéphanie GUADAGNINI, Institut Pasteur Imagopole, Paris

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux qui se dissémine par production de spores. Les pathologies associées peuvent être localisées (Aspergillome) ou invasives (aspergillose pulmonaire) pour des patients immunodéprimés. L'étude de ce champignon dans les conditions in vitro permet d'en comprendre sa croissance ainsi que ses caractéristiques physiologiques.

*Nous avons étudié les différentes étapes du cycle cellulaire d'*A. fumigatus* en utilisant un système de cryotransfert GATAN 2500 couplé à un MEB FEG JEOL 6700F permettant d'observer l'échantillon sans étape de préparation chimique donc au plus près des conditions natives et hydratées.*

Ainsi, nous avons pu observer la morphologie des spores, présentant des motifs géométriques à leur surface (rodlets) et démontrer la présence de biofilm dans certaines conditions de culture.

17h00 - 17h30 Minéralisations induites in vitro par les molécules organiques de la nacre : variations observées au MEB suivant les types cellulaires.

Marthe ROUSSEAU, Faculté de médecine, Nancy

La couche nacrée de l'huître perlière est considérée comme un biomatériau ostéoinducteur prometteur. La nacre contient des molécules signales capables de stimuler la formation osseuse.

Nous avons montré que la phase organique de la nacre était capable d'accélérer la minéralisation in vitro des cellules MC3T3 (pré-ostéoblastes de souris).

Nous avons pu caractériser la structure de l'hydroxyapatite formée in vitro par ces cellules à l'aide de la microscopie électronique à balayage. Des travaux récents ont été réalisés sur des ostéoblastes humains en culture primaire ainsi que sur des cellules ATDC5 (lignée chondrocytaire). Les cristaux d'hydroxyapatite formés par les tapis cellulaires au sein de la matrice extracellulaire présentent différentes formes en fonction des types cellulaires. Ces observations nous apportent des informations structurelles sur l'implication de la matrice extracellulaire dans la minéralisation induite par les cellules.

17h30 - 18h00 Comparaison microstructurale de prothèses dentaires : supports, interfaces et revêtements.

Marie-Eline COUTURIER, Société Française de la Céramique, Courtaboeuf

Les céramiques sont utilisées dans le secteur dentaire pour leurs propriétés d'inertie chimique, de résistance mécanique et d'esthétisme. Les prothèses actuellement sur le marché sont métalliques, céramo-métalliques ou plus récemment céramo-céramiques.

Nous nous intéressons plus particulièrement aux prothèses céramo-métalliques nécessitant une adaptation technologique spécifique de la céramique sur le métal, couramment utilisées, ainsi qu'aux prothèses céramo-céramiques, récemment développées et nouvellement mises sur le marché.

Les analyses microstructurales ont pour but d'observer, d'illustrer et d'analyser la composition chimique des différentes composantes des prothèses (supports, revêtements), d'étudier la qualité de l'interface support/revêtement et de rechercher l'éventuelle présence de plomb et cadmium pour caractériser l'innocuité de la prothèse en bouche.

18h00 – 18h30 Apports du MEB aux biomatériaux appliqués à la chirurgie ORL et vasculaire

Dominique VAUTIER, Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg

Le MEB permet d'imager l'adhésion de chondrocytes et le comblement par un polyester biodégradable des porosités d'une prothèse trachéale constitué de billes de titane fritté.

Par ESEM, il est possible de suivre, sous étirement, la stabilité mécanique de nanoassemblages de multicouches de polyélectrolytes en surface de prothèses vasculaires en polyéthylène téréphtalate

18h30 - 14h00 Départ pour la réception à l'Hôtel de Ville de Strasbourg

Jeudi 30 juin 2011 : MEB et Techniques Annexes

- 08h30 - 09h15** **Conférence plénière : Microanalyse ionique. Débuts et suites**
- Georges SLODZIAN, Centre de spectrométrie nucléaire et de spectrométrie de masse, Université Paris-Sud Orsay*
- 60 années d'analyse chimique locale et de microscopie électronique à la suite de Raimond Castaing*
- 09h15 - 10h00** **Conférence plénière : De quelques idées de départ au succès de l'analyse chimique locale en microscopie électronique**
- Bernard JOUFFREY, Ecole Centrale Paris**
- 60 années d'analyse chimique locale et de microscopie électronique à la suite de Raimond Castaing*
- 10h00 - 10h30* *Pause*
- 10h30 - 11h00** **Mesures de contraintes locales par diffraction des électrons rétrodiffusés.**
- Dominique LOISNARD, EDF Renardières**
(symposium commun : A la frontière MEB - TEM)
- La technique de l'EBSD s'est grandement développée ces dernières années, l'une de ses extensions consiste à mesurer les contraintes locales au sein d'un matériau. Cette méthode, basée sur la corrélation de diagramme de Kikuchi, sera présentée ainsi que les avantages qu'elle apporte par rapport à la technique classique.*
- Les paramètres logiciels et expérimentaux pouvant limiter la précision de la mesure ont été testés sur du Silicium. Cette méthode a ensuite été appliquée sur un échantillon de Silicium contraint par une couche épitaxiée de Silicium-Germanium et les mesures ont été comparées à des calculs par éléments finis. Enfin, des mesures ont été effectuées sur une soudure d'alliages de Nickel.*
- 11h00 – 11h30** **La tomographie électronique : du MET au MEB.**
- Agnès BOGNER, Laboratoire MATEIS - INSA Lyon**
(symposium commun : A la frontière MEB - TEM)
- La tomographie aux rayons X a été la première technique basée sur la reconstruction d'un volume à partir d'une série d'images acquises sous différents angles de vue lors de l'inclinaison d'un objet [1]. La résolution spatiale obtenue est micronique avec des tomographes de laboratoire, voire submicronique si un rayonnement synchrotron est utilisé. Néanmoins, les matériaux actuels présentant des structures nanométriques, ces approches demandent à être complétées par des méthodes plus résolues.*
- Le développement de la tomographie électronique en MET [2] a permis d'obtenir des informations 3D à l'échelle du nanomètre mais au détriment des volumes reconstruits (quelques dizaines de nm³ contre plusieurs dizaines de cm³ pour la tomographie X). L'acquisition des images successives s'effectue dans les différents modes d'imagerie utilisées*

en MET : champ clair, imagerie filtrée en énergie (EFTEM), champ sombre annulaire (STEM ADF ou HAADF).

L'imagerie STEM peut également être réalisée dans un MEB. Bogner et al. ont montré que ce mode était intéressant sur plusieurs points : contraste important, grandes épaisseurs traversées, basse tension, mode environnemental [3]-[4]. Ces atouts spécifiques ont été mis à profit dans la tomographie STEM en MEB, développée par analogie à l'approche de reconstruction tomographique en MET en mode STEM HAADF [5]. Cette nouvelle approche complète la palette des méthodes de caractérisation 3D : la résolution spatiale et la taille des volumes reconstruits sont intermédiaires entre la tomographie X et la tomographie MET.

Une introduction générale sera présentée concernant la tomographie électronique. Puis l'accent sera mis sur le mode STEM en MEB et le développement de la tomographie dans un MEB. Enfin, quelques exemples de caractérisation de microstructures en sciences des matériaux seront présentés de manière comparative par les deux approches de reconstruction tomographique, MET et MEB [6].

[1] B. P. Flannery et al., *Science* 237 (1987) 1439-1444

[2] D. J. de Rosier, *Nature* 217 (1968) 130-134

[3] A. Bogner et al., *Ultramicroscopy* 104 (2005) 290-301

[4] A. Bogner et al., *Micron* 38 (2007) 390-401

[5] P. Jornsano et al., *Ultramicroscopy* (in press)

[6] Nous remercions le Centre Lyonnais de Microscopie pour l'accès aux instruments, MEB et MET.

11h30 - 12h00 Un microtome dans un MEB.

Christel GENOUD, Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Lausanne
(*symposium commun : A la frontière MEB - TEM*)

Comment obtenir des images de coupes sériées dans un microscope à balayage à partir d'échantillons biologiques ou de matériaux?

Le SBF-SEM est un microscope à balayage modifié de manière à contenir un microtome dans sa chambre. Grâce à ce dispositif, il est possible de couper physiquement un bloc de matériel biologique ou autre comme le permet un ultramicrotome classique, mais à l'intérieur du microscope.

La surface du bloc est scannée après chaque passage du couteau afin d'obtenir une image après chaque coupe de la surface du bloc. De cette manière, il est possible d'obtenir des images successives à intervalle régulier (50 nm par exemple) représentant un volume de matériel en trois dimensions.

Il est par exemple possible de cette manière d'étudier la connectivité neuronale dans des régions cérébrales ou d'étudier la morphologie des noyaux de cellules en cultures.

12h00 - 12h15 Couplage des microscopies électroniques en transmission (Cs-HRTEM, HAADF) et à balayage (SEM-STEM) pour étudier les mécanismes d'auto-assemblage des nanocristaux à différentes échelles

Marie Cheynet, SIMAP, Grenoble
(*symposium commun : A la frontière MEB - TEM*)

12h15 - 12h30 Tomographie X

Présentation Gatan
(*symposium commun : A la frontière MEB - TEM*)

12h30 - 13h30 Déjeuner libre

13h30 - 14h00 Cathodoluminescence – Principes physiques et applications pratiques.

Brigitte SIEBER, Unité Matériaux et Transformations - Université de Lille

La cathodoluminescence est l'émission de lumière par un matériau soumis à une excitation électronique. Les propriétés optiques et leurs fluctuations spatiales peuvent ainsi être analysées dans les matériaux isolants et semi-conducteurs. Le microscope électronique à balayage est l'un des outils de choix pour ce type d'expériences.

Dans une première partie j'exposerai les principes physiques à l'origine de la cathodoluminescence dans les matériaux.

La seconde partie sera consacrée à ses applications principales.

14h00 - 14h30 Spectrométrie Raman et de cathodoluminescence couplées sur MEB.

Albert JAMBON et O. BOUDOUMA, UPMC, Institut des Sciences de la Terre, UMR 7193, 4 place Jussieu, 75005

Dans le domaine des Sciences de la Terre, le microscope électronique à balayage (MEB) est devenu un outil indispensable à l'étude des roches. Les détecteurs classiques (électrons secondaires, rétro diffusés, R.X., cathodoluminescence), largement utilisés dans ce domaine, permettent la plupart du temps de répondre aux problèmes posés lors de la caractérisation des phases minérales. Cependant, dans certains cas et surtout quand il s'agit de la structure cristalline des phases, cette réponse reste incomplète et nécessite l'utilisation de techniques éloignées de celle du MEB (spectrométrie Raman, spectrométrie I.R., Diffraction de R.X...).

L'intégration d'un système Raman sur un MEB peut combler cette carence et permet ainsi d'accéder aux informations sur la structure des phases. Nous avons monté un système Raman sur notre MEB en le couplant avec le dispositif de catholuminescence. Ce dispositif comprend un miroir parabolique rétractable qu'on peut insérer entre l'échantillon et la pièce polaire. Le miroir est percé d'un trou de 2 mm de diamètre qui permet aux électrons de traverser et d'exciter l'échantillon. Le signal de luminescence émis est dirigé vers un spectromètre équipé de réseaux dispersifs (300 à 1800 traits/mm) et d'une camera CCD.

Par un jeu de miroirs à 45 degré et un boîtier Raman (optique de Jobin YVON) un faisceau laser (532nm) peut être focalisé sur l'échantillon grâce au miroir parabolique, le signal Raman émis est redirigé, à travers une fibre optique, vers un spectromètre. Le laser, le signal Raman et la cathodoluminescence empruntent le même chemin. On peut basculer du Raman vers la catholuminescence grâce à un système de commutation mettant en jeu des miroirs à 45 degré. L'asservissement de la platine du MEB permet sans dispositif supplémentaire d'effectuer une cartographie Raman hyperspectrale. Une carte d'intensité peut être visualisée en sélectionnant une zone d'intérêt du spectre

14h30 - 15h00 La microscopie et les méthodes de caractérisation chimique des matériaux : utilisation complémentaire de la spectroscopie Auger haute résolution et de l'EDS.

Muriel BOUTTEMY, Institut Lavoisier, Versailles

Le développement de nanotechnologie nécessite l'adaptation de méthodes de caractérisation à l'échelle spatiale de ces objets. Ainsi, le couplage de la microscopie FEG et de la spectroscopie nano-Auger, permettant d'accéder à la composition de surface (profondeur sondée de l'ordre de 3 nm), représente un atout indéniable pour relever un tel challenge.

La spectroscopie EDS, moins localisée mais dont la profondeur d'analyse s'étend jusqu'à 2 µm, apporte quant à elle des renseignements supplémentaires sur les évolutions de

composition en volume. Nous présenterons des exemples concrets afin d'illustrer l'apport et la complémentarité de ces techniques.

15h00 - 15h30 Les potentialités de la nano-EBIC.

Michel TROYON, Laboratoire de Microscopie Electronique et Tunnel, Université de Reims
Grâce à la combinaison MEB/AFM, il est possible d'améliorer considérablement les performances en résolution de l'analyse EBIC classique.

Nous illustrerons les potentialités de cette nouvelle technique que nous appelons nano-EBIC ou encore EBIC en champ proche par divers exemples : jonction p-n, boîtes quantiques InAs/GaAs, hétérostructures III-V, nanocristaux de germanium sur oxyde de silicium, etc...

15h30 - 16h00 Techniques de caractérisation électrique des matériaux diélectriques sous irradiation électronique dans le MEB et applications.

Sébastien RONDOT, Omar JBARA, GRESPI / Matériaux Fonctionnels – Univ. de Reims

L'étude de l'irradiation électronique des matériaux diélectriques couvre un large domaine de la physique appliquée allant du comportement des satellites soumis au rayonnement cosmique dans la recherche spatiale (vent solaire) aux électrets utilisés en radiobiologie.

L'irradiation des matériaux diélectriques par des électrons énergétiques s'accompagne de nombreux phénomènes complexes notamment l'émission électronique secondaire, l'émission photonique, le piégeage de charges, etc. Les électrons piégés dans le solide génèrent un champ électrique qui peut conduire, dans le cas extrême, à la rupture diélectrique ou claquage.

En microscopie électronique, ces phénomènes de charge sont une source d'artefacts (perturbation de l'émission électronique et de l'émission des rayons X etc.) mais ils peuvent constituer un moyen privilégié pour caractériser les diélectriques (mesure de la charge d'espace et du potentiel de surface). Ces phénomènes complexes liés au processus de charge d'un diélectrique irradié sont qualitativement bien compris et détaillés dans une prolifération d'articles mais les mécanismes des nombreux phénomènes physiques élémentaires mis en jeu sont loin d'être élucidés.

Nous présenterons quelques techniques de mesure dynamique de la charge piégée dans les isolants irradiés et du potentiel de surface associé. Ces techniques, mises au point au laboratoire, utilisent des dispositifs installés dans la chambre objet du MEB. Des exemples d'application concernent l'étude de la cinétique de la charge (et éventuellement de la décharge) dans les polymères utilisés pour les gaines de câble haute tension, dans les alumines des composants de puissance et dans les verres utilisés comme " espaceurs " dans les écrans plats.

=====