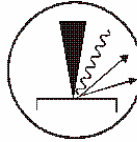


GN  
MEBA



GRUPEMENT NATIONAL DE  
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE  
ET DE MICROANALYSES



*En convention de coopération avec la Société Française de Physique*

# La préparation des matériaux mous

Alain Jadin  
Certech, Seneffe

Philippe Hallégot  
L'Oréal Recherche, Paris

# Plan

- Qu'entend-on par « matériaux mous »?
- Objectif général : coupes et surfaces pour la microscopie (optique, MEB, MET) et l'analyse (EDS et autres spectroscopies : IR, Raman,...)
- (Cryo-) fracture
- Coupe par microtomie :
  - Equipement
  - Paramètres
  - Techniques complémentaires : enrobage, marquage, ...
- Applications dans les polymères (MEB)
- Applications aux matériaux biologiques

# Matériaux mous:



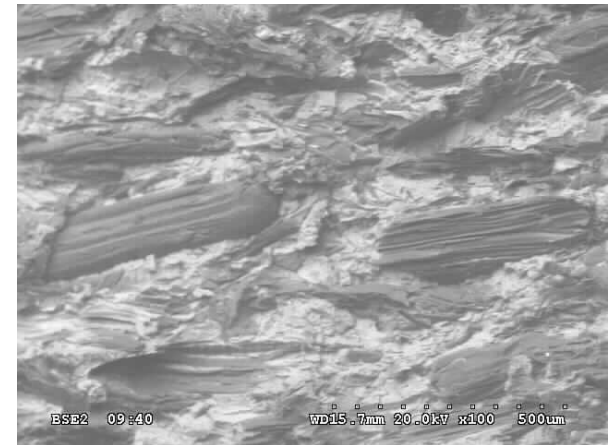
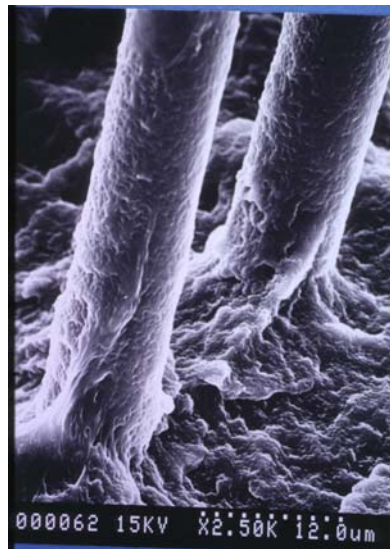
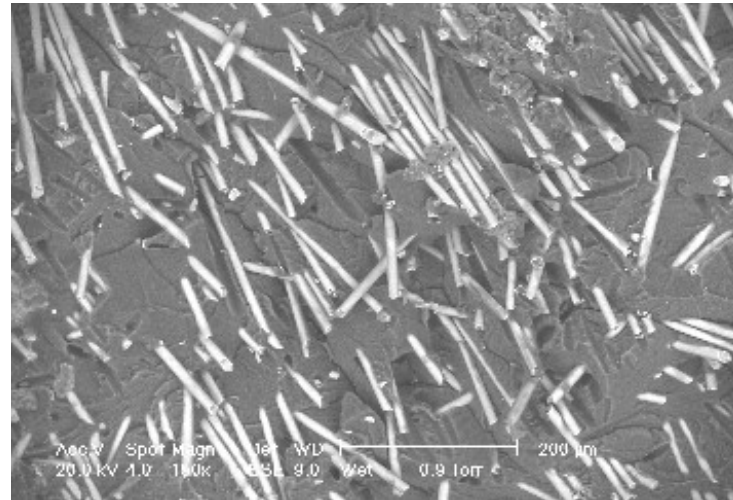
- En général: matériaux organiques
- Polymères: films, plaques, granulés, pièces finies, ....
- Matériaux biologiques

# Objectif:

- Production de coupes et de surfaces pour la microscopie (optique, MEB, MET) et l'analyse (EDS, autres spectroscopies : IR, Raman,...)
- Obtention de surfaces « polies » appropriées à l'analyse EDS
- Deux méthodes: (cryo-)fracture et coupe (différents outils)
- Remarque: certains matériaux peuvent être observés sans préparation!

# Cryo- fracture: adhésion fibres-matrice

Polyamide chargé en fibres de verre



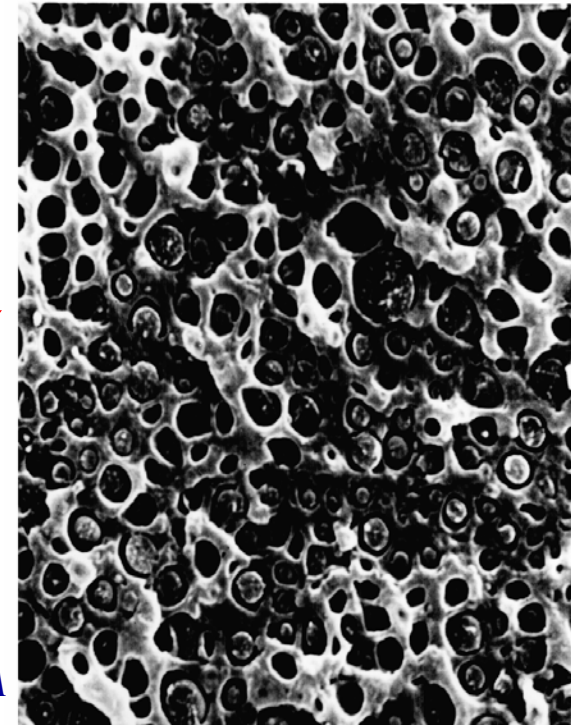
PVC chargé en fibres de bois

# Cryo- fracture: mélange de polymères incompatibles

Faible adhésion entre matrice et phase dispersée mise en évidence par:

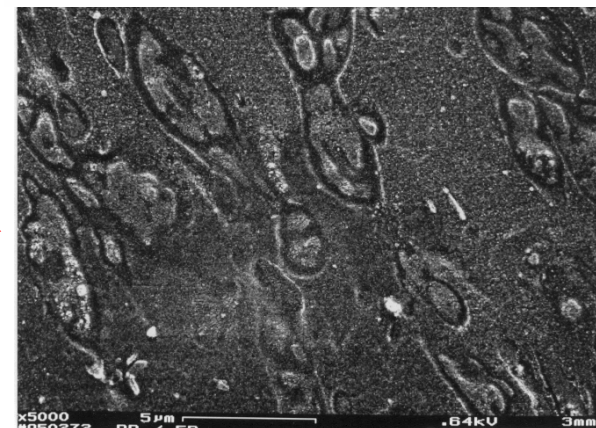
- *Fracture à froid*
- *dissolution matrice*
- *Dissolution phase dispersée*

PC/PMMA

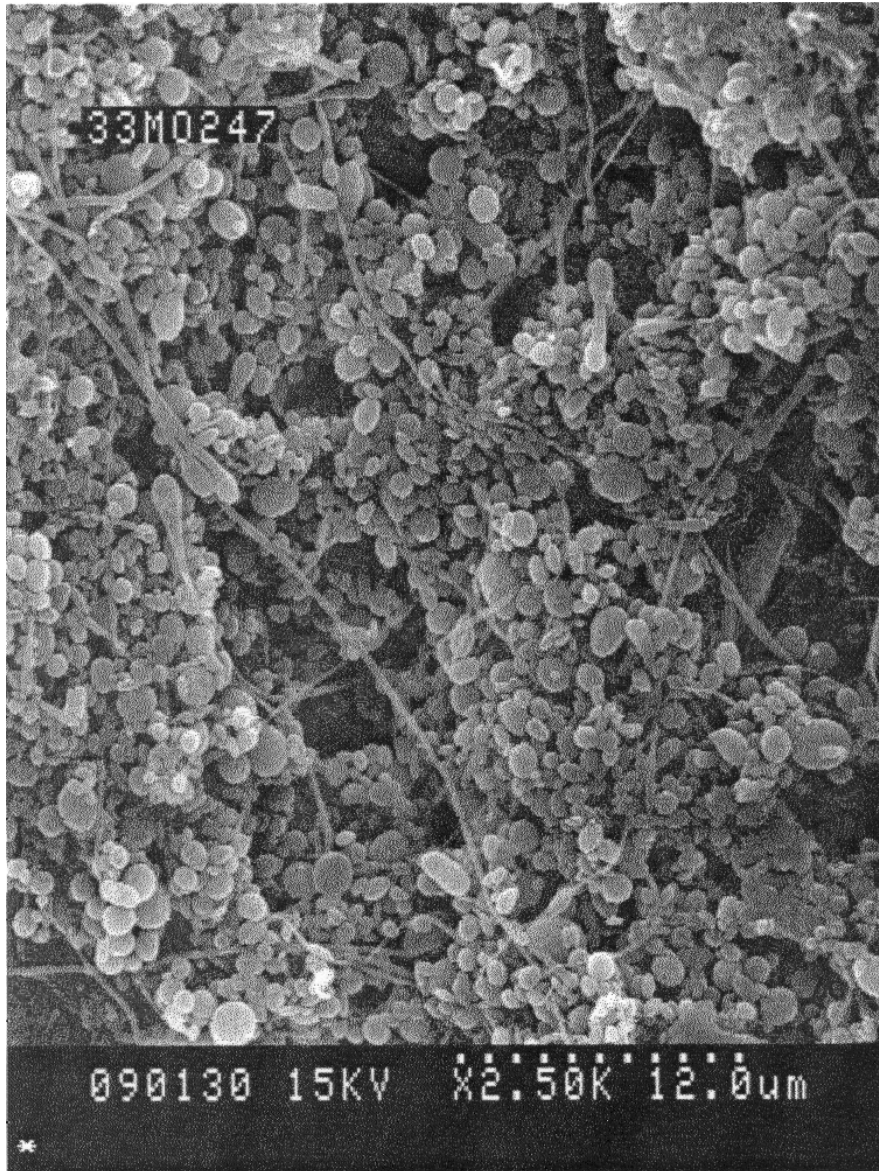


5 μm

PP/EP



# Cryo-fracture : phase dispersée particulaire



- Dissolution de la matrice
- Récupération phase dispersée



- Particules
- Filaments

# Cryo-fracture: cavitation lors de l'étirement

Films bi-orientés pour emballage

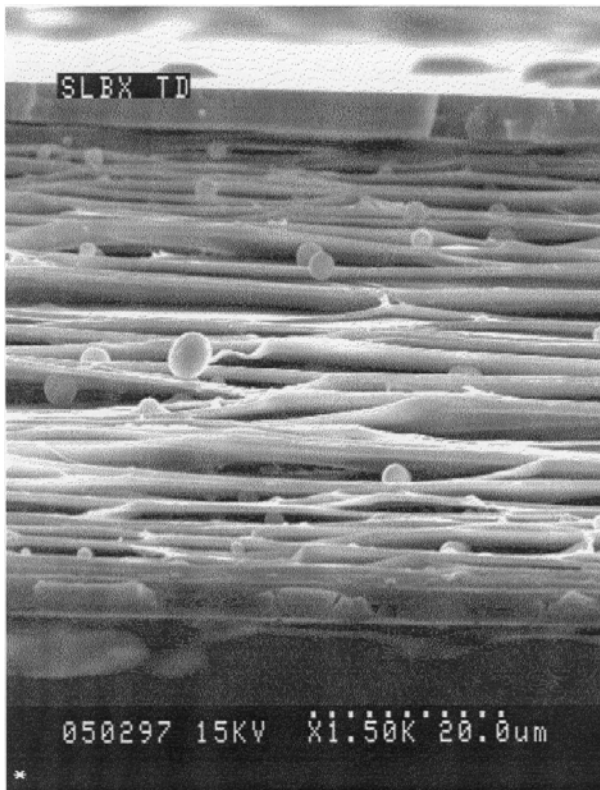
➤ Propriétés mécaniques adéquates:

➤ *déchirabilité*

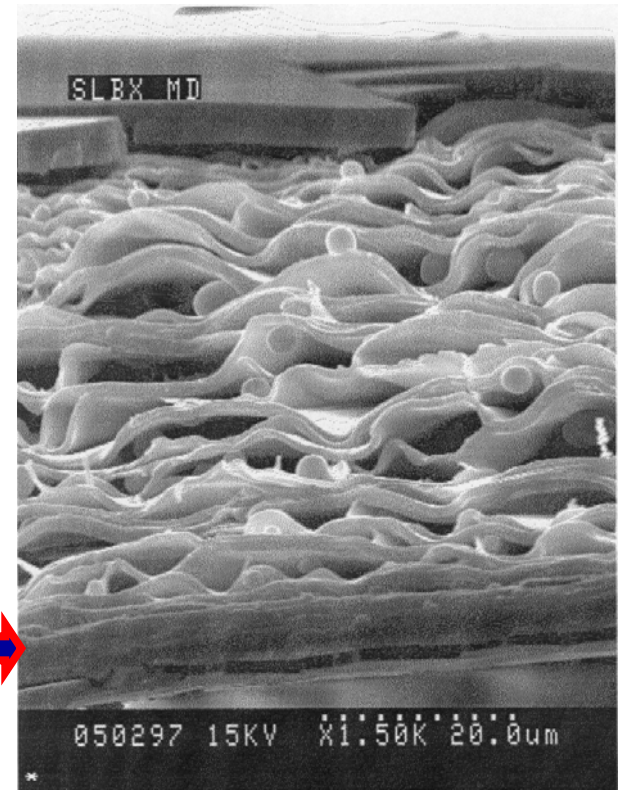
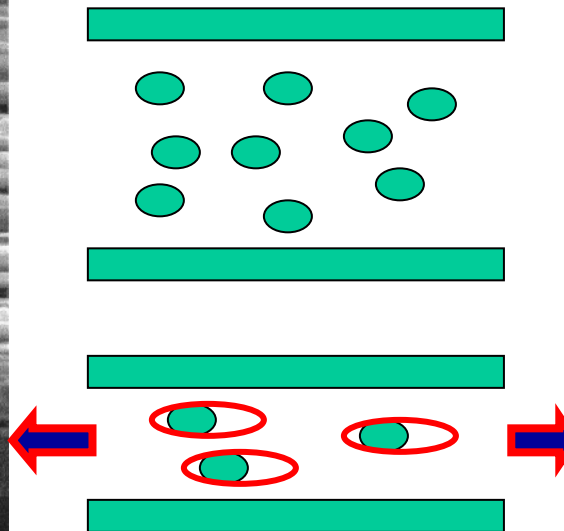
➤ *résistance en traction*

➤ Aspect nacré

➔ Nécessité de cavitation

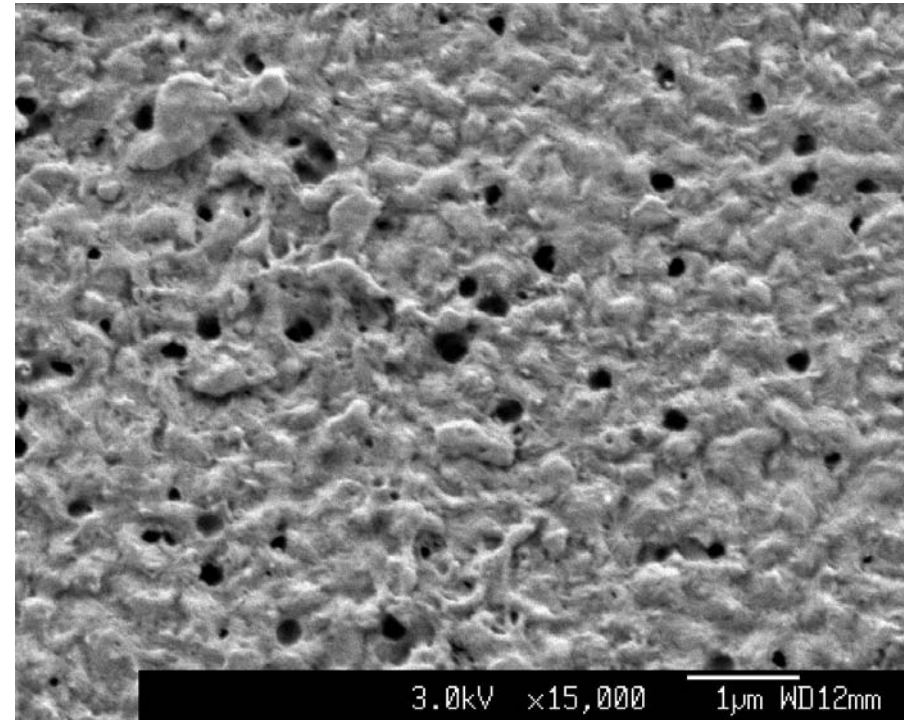
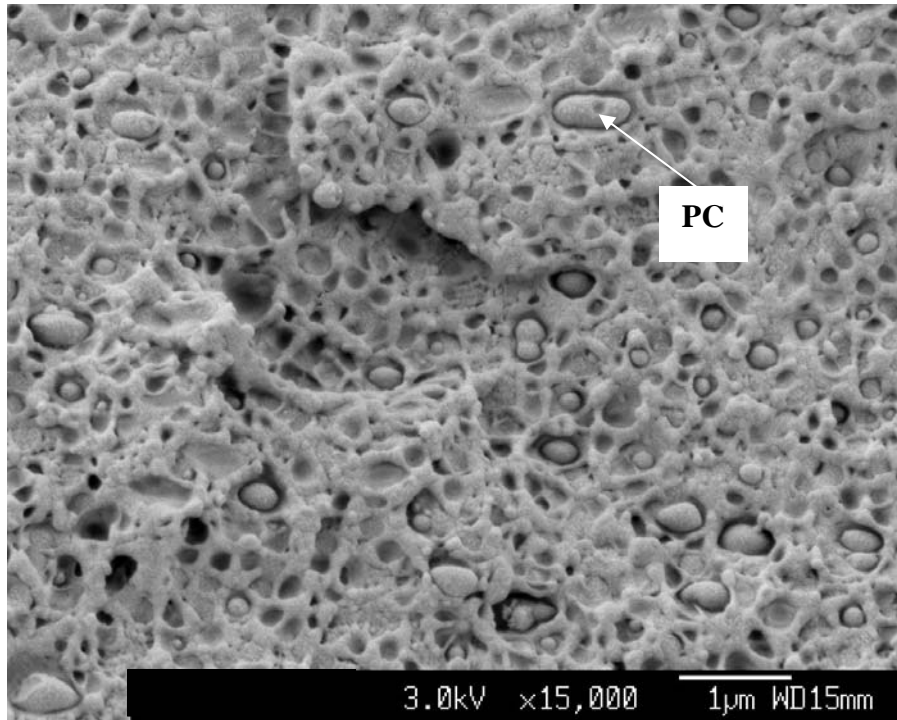


Sens transverse



Sens machine

# Cryo-fracture : adhésion particules-matrice



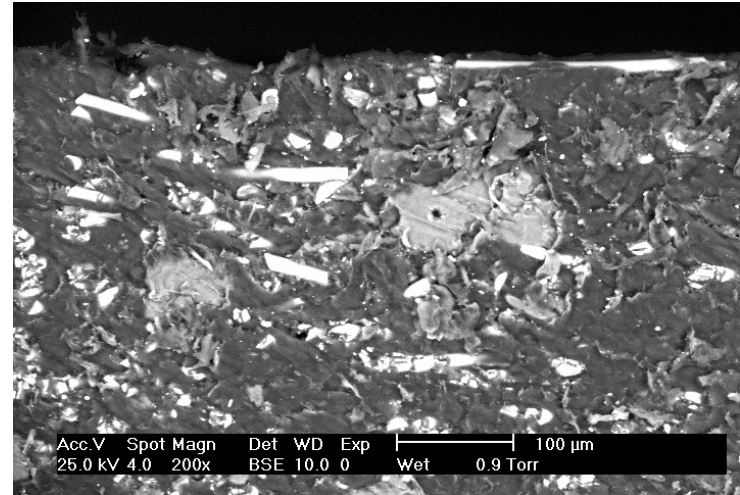
**Fracture dans l'azote liquide**  
**grains PC dans une matrice PBT**

**Attaque par  $\text{CCl}_4$**   
**grains PC dissous**

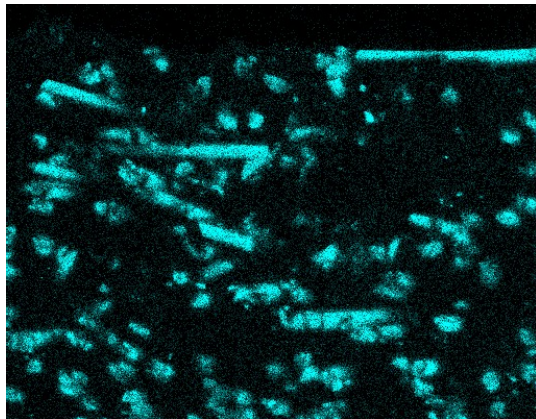
# Fracture à température ambiante



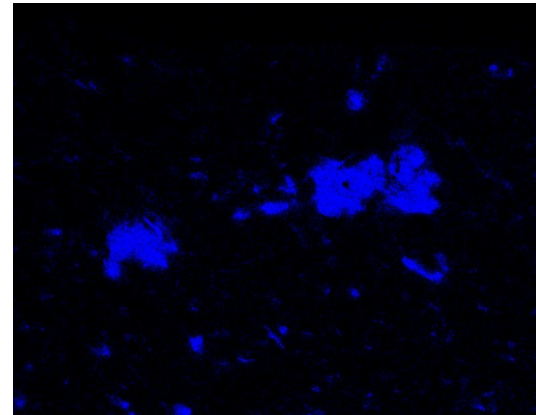
- Matrice: polyamide
- Charges: fibres de verre et PTFE



BSE

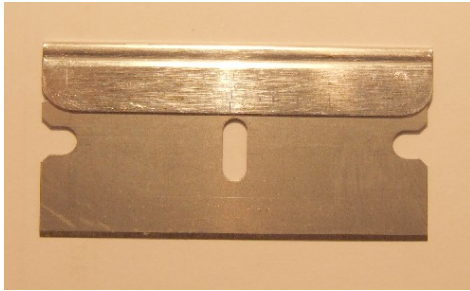


Si



F

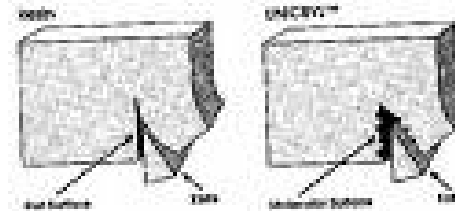
# Outils de coupe



# La microtomie: principe

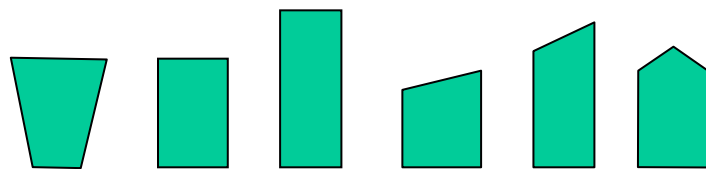
But premier : obtention de coupes (ultra-)fines

Application MEB: surface



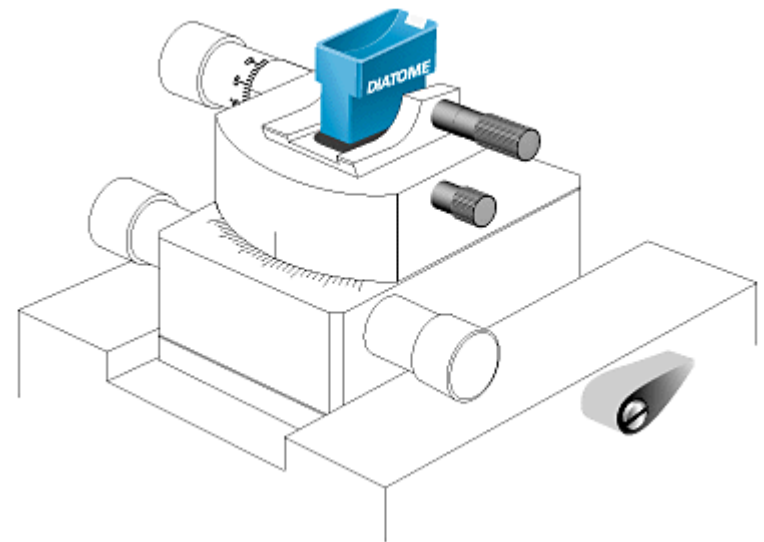
Couteau à lame de diamant, couteau de verre

*Trimming* : formation d'une pyramide (forme de la section) de coupe à l'aide d'une lame de rasoir, d'un couteau de verre, d'un couteau de diamant.

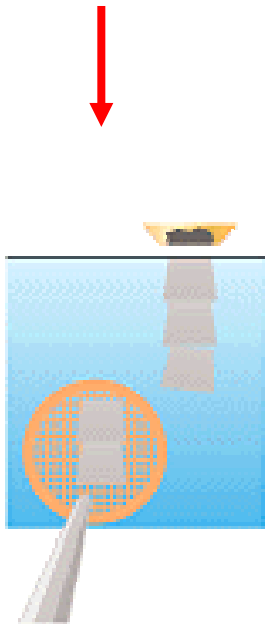
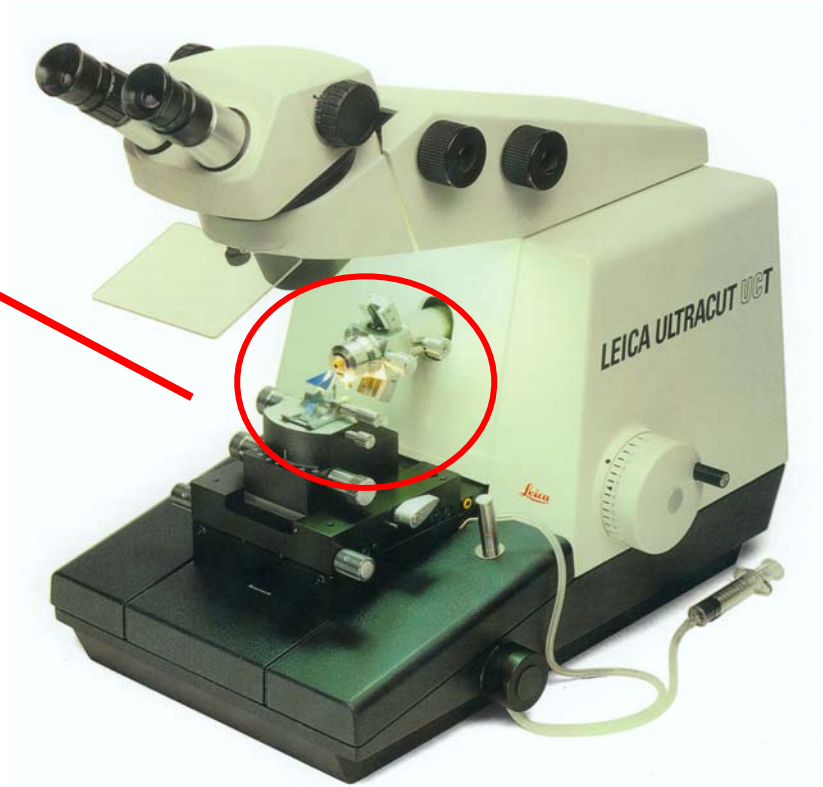
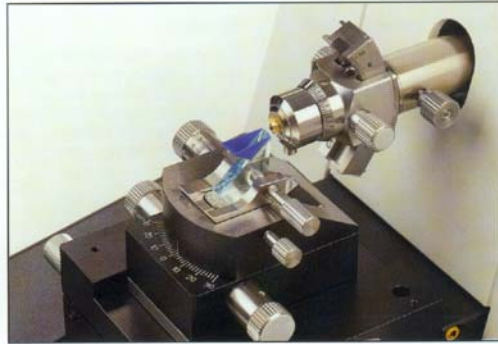
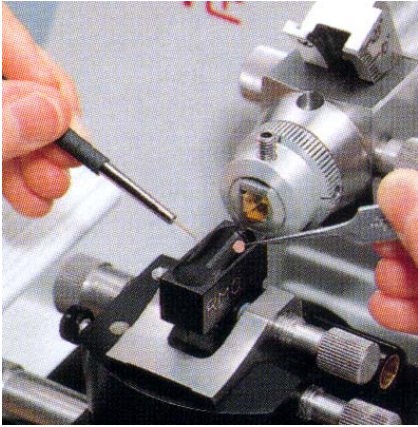


“Classiques”

“Spéciales”



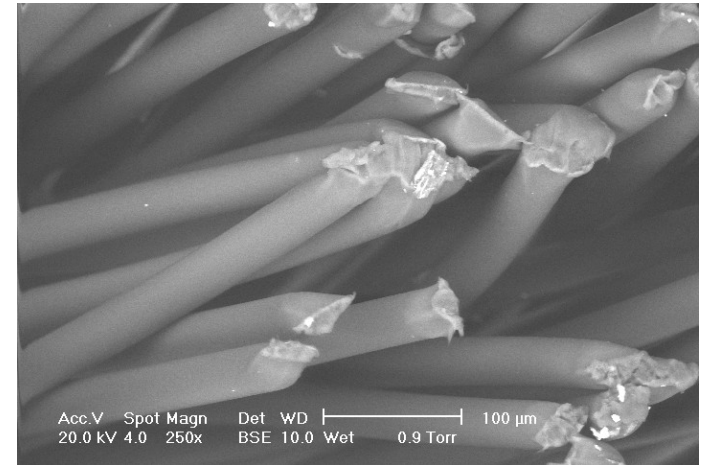
# La microtomie: équipement



# La microtomie: paramètres

Le choix est guidé par les propriétés physico-chimiques des matériaux:

- température de transition vitreuse ( $T_g$ )
- composition,
- échantillon pur ou mélange,
- présence de charges (+ nature):



Type de couteau, épaisseur, température, ...

# La microtomie: paramètres

Choix de la température: lié à Tg

## *Polymères, temp. ambiante*

Polycarbonate.  
Polyméthylmétacrylate.  
RuO<sub>4</sub>-Stained PP /  
HDPE  
OsO<sub>4</sub>-stained HIPS,  
ABS, PC/ABS.  
Nylons.  
Epoxy.  
...

## *Polymères, cryo ultra-microtomie*

Polypropylènes.  
Polyéthylènes (LDPE, LLDPE,  
HDPE).  
Elastomères.  
PTFE.  
Nylons.  
ABS, HIPS (unstained)  
Latex, peintures  
...

# Techniques complémentaires

- enrobage: différents types de résines
- marquage, coloration
- attaque chimique
- polissage

# Marquage et coloration

- Objectif :
  - augmenter le contraste entre les différentes composantes de l'échantillon
  - “durcir” un échantillon (faciliter la coupe)
- Types de coloration :
  - Osmium ( $\text{OsO}_4$ )
  - Ruthénium ( $\text{RuO}_4$  en solution ,  $\text{RuCl}_3$  en cristaux )
  - Tungstène (acide phosphotungstique)

- Coloration à l'osmium :

- mise en évidence des groupements insaturés

- Polystyrènes
- Elastomères thermoplastiques styréniques (SIS, SBS)
- ABS, HIPS, (mélange avec nylons, PC,...)
- Mélanges époxy / élastomère
- Latex,
- ...

- Coloration au ruthénium:

- contraste amorphe / cristallin

- présence d'aromatiques

- Polyéthylènes (LDPE, HDPE, LLDPE)

- Polypropylènes

- Polyurethanes ( bulk, mousse)

- PVC

- PS

- Latex

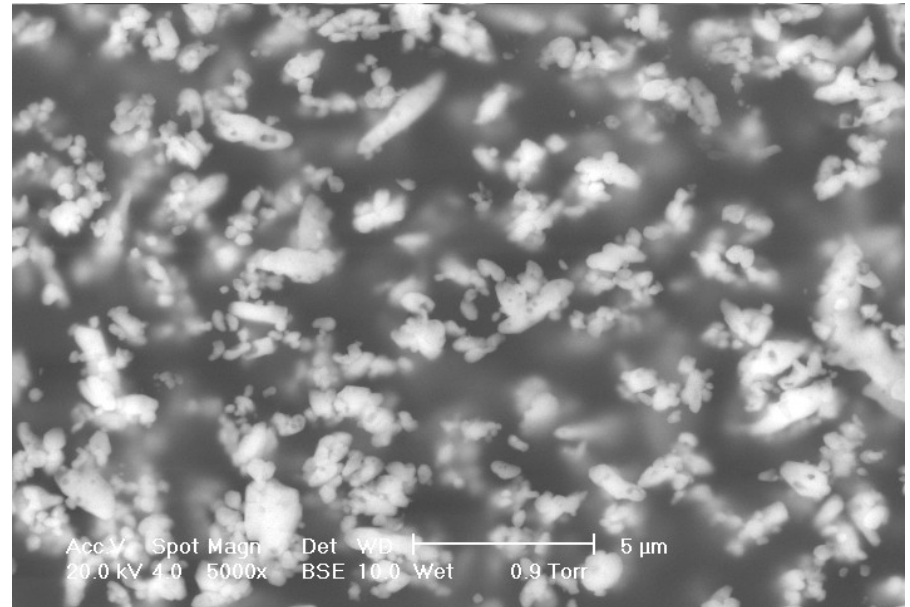
- ...

- durcissement avant coupe

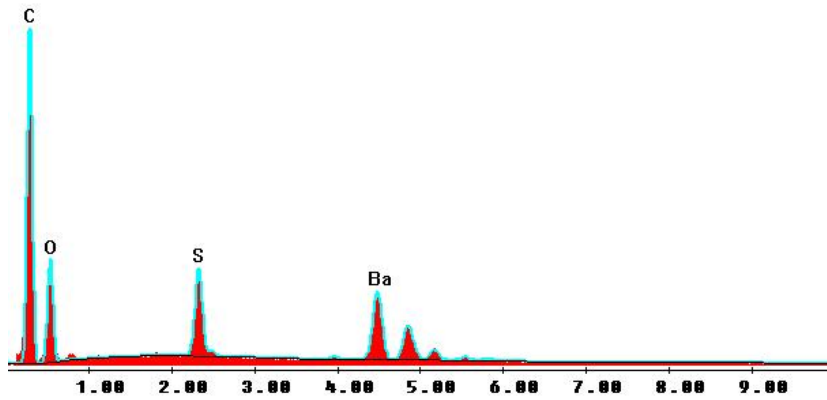
- **Coloration au tungstène**
  - Nylon (polyamide)
  - Polyuréthane
- **Colorations croisées:** mélanges complexes (au moins ternaires)
- **Études cinétiques**

# Préparation par microtomie: polymères chargés

BSE: dispersion des charges



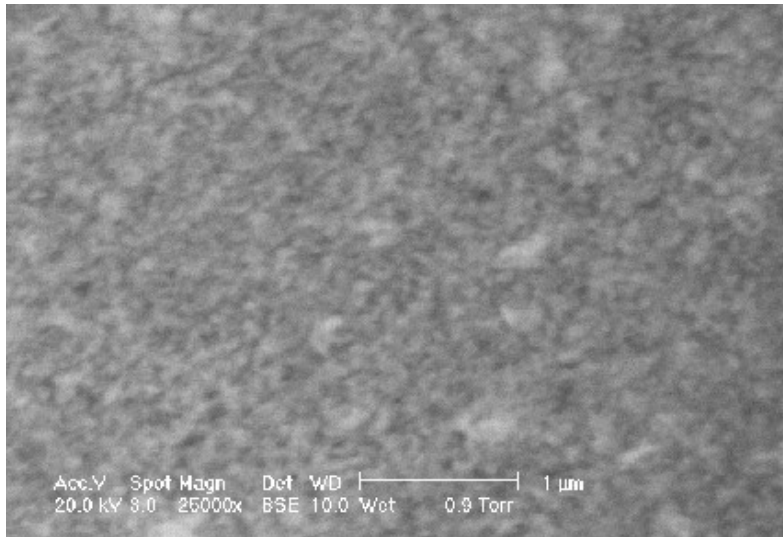
(BaSO<sub>4</sub> dans une résine thermodurcissable)



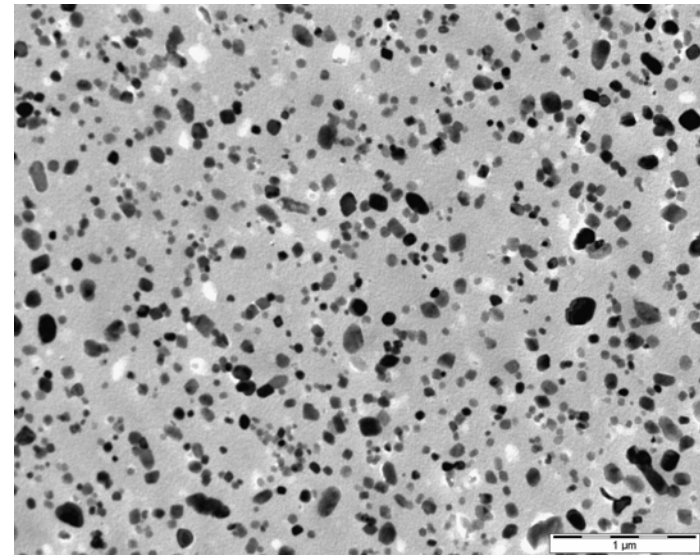
Analyse EDS

# Préparation par microtomie: polymères chargés

Dispersion de très fines particules de  $\text{BaSO}_4$  (~ 50 nm: trop fines)



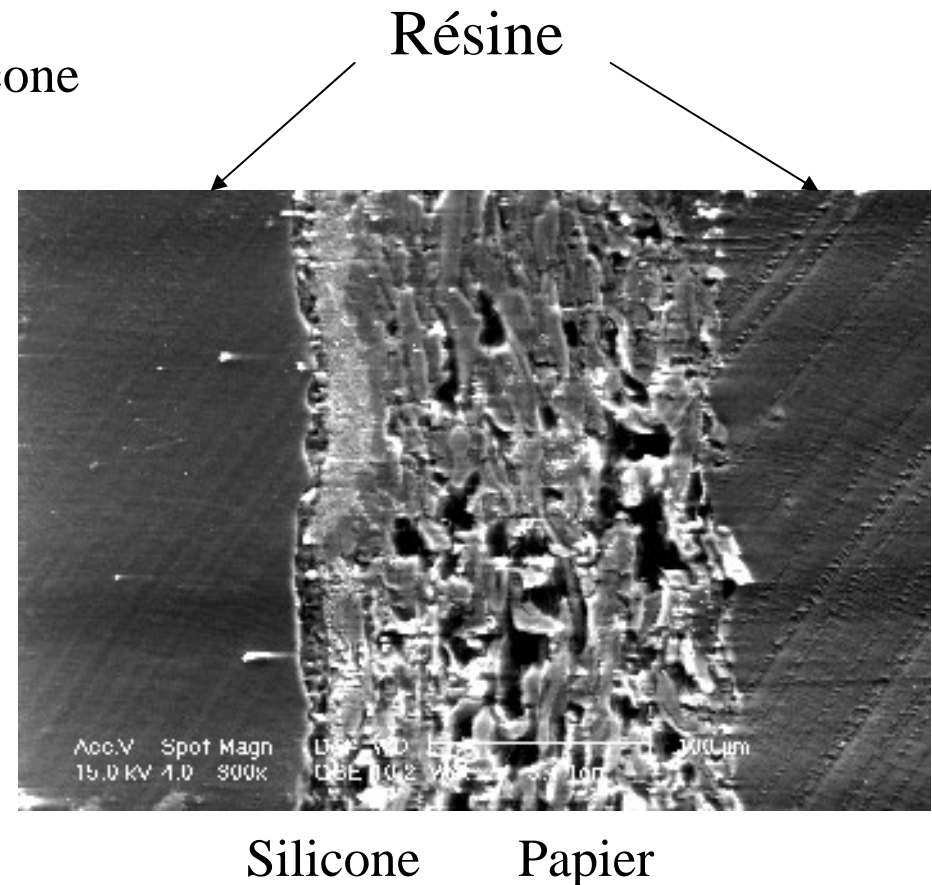
MEB

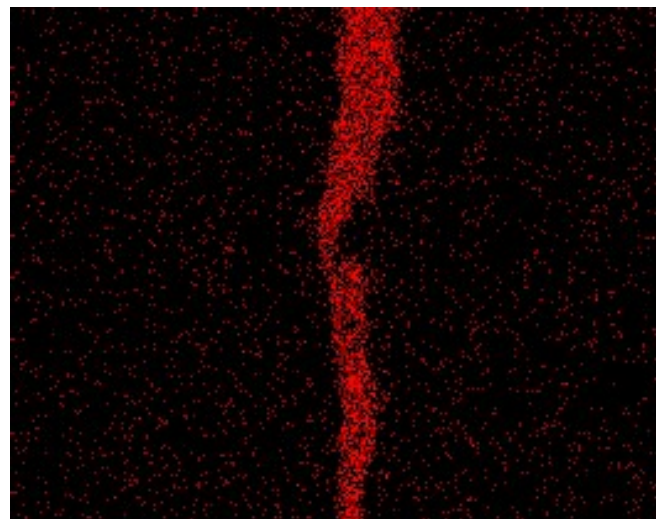
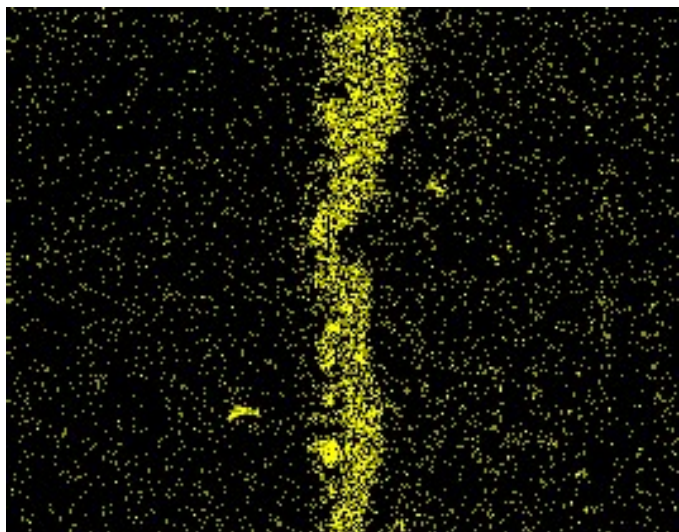
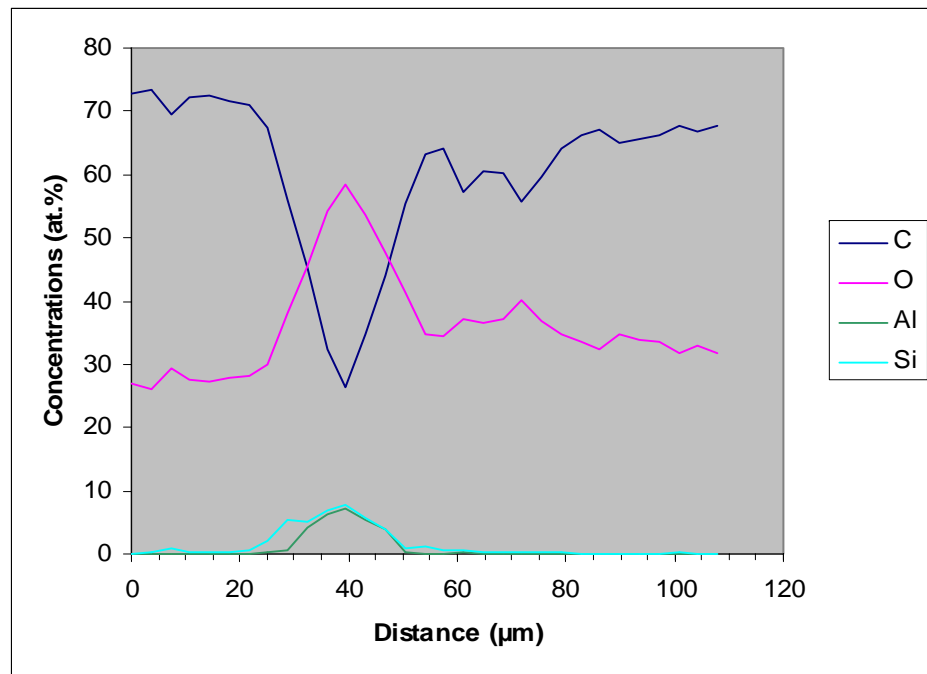
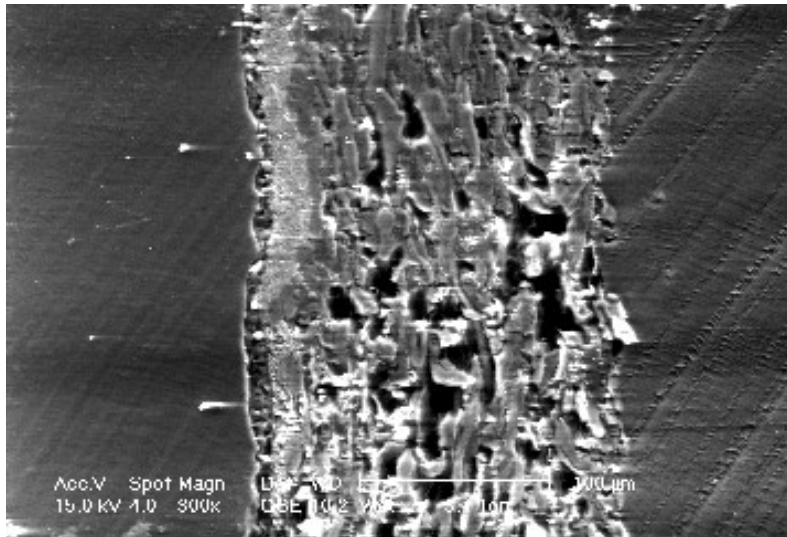


MET sur coupe ultra-mince (<100 nm)

## Enrobage + microtomie: papier siliconé pelable

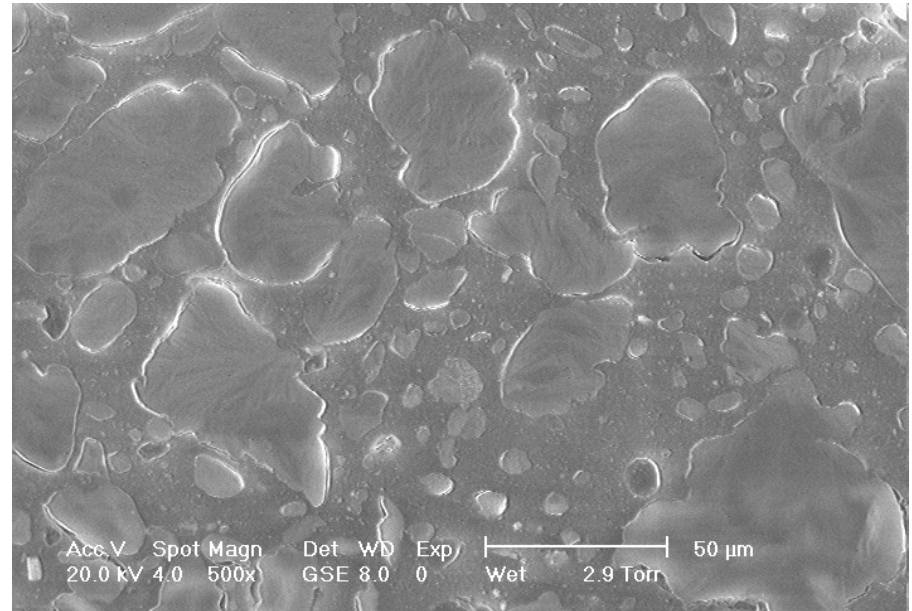
- Objectif: déterminer la diffusion du silicone
- Analyse sur tranche
- Échantillon enrobé dans une résine
- Préparation sur couteau diamant
- MEB à chambre environnementale
- Analyse EDS en ligne et cartographie





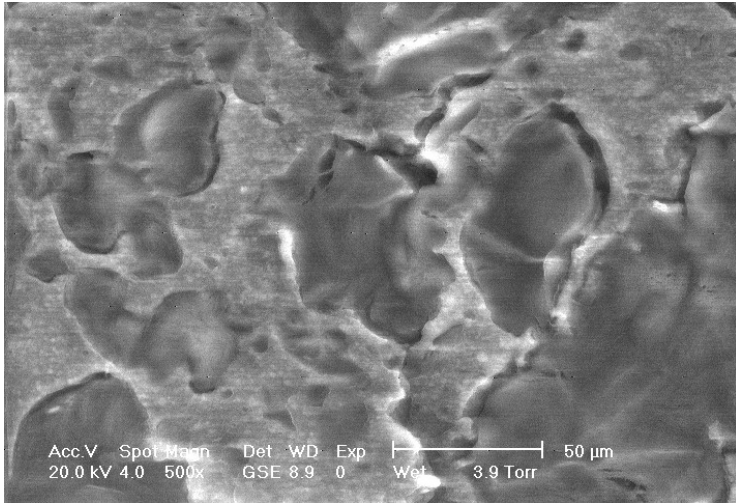
## Microtomie + marquage: polymères multi-phasiques

- Mélange: polyéthylène oxyde (PEO)/ polystyrène (PS)
- Surface rectifiée par couteau diamant

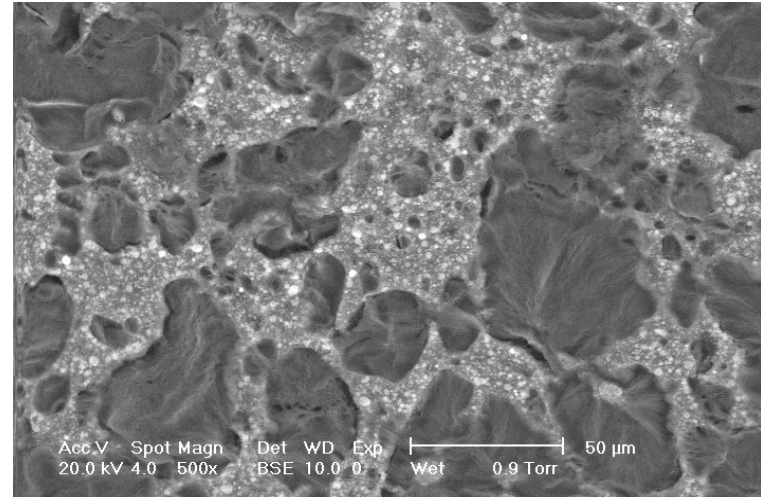


- Image SE: faible contraste
- Accentuation du contraste: marquage sélectif par Os

# Microtomie + marquage: polymères multi-phasiques

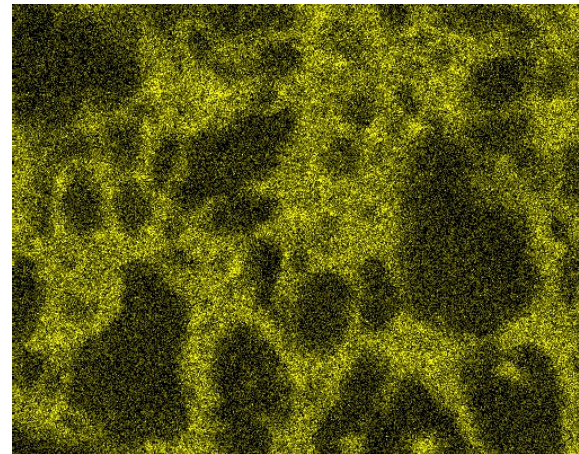


SE



BSE

- L'osmium se fixe sur le PS
- Accentuation du contraste SE
- Apparition d'un contraste BSE
- Localisation indirecte du PS



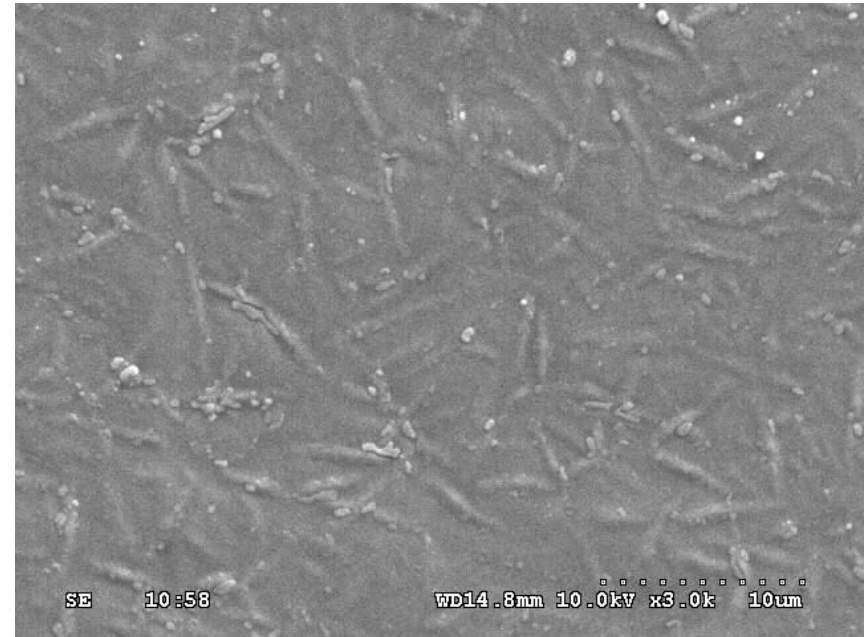
Os

## Microtomie + décapage chimique

PP isotactique : surface rectifiée mécaniquement et attaquée par  $\text{KMnO}_4$  en milieu acide (dégradation préférentielle de la phase amorphe)



Haute tacticité: sphérolites bien définis



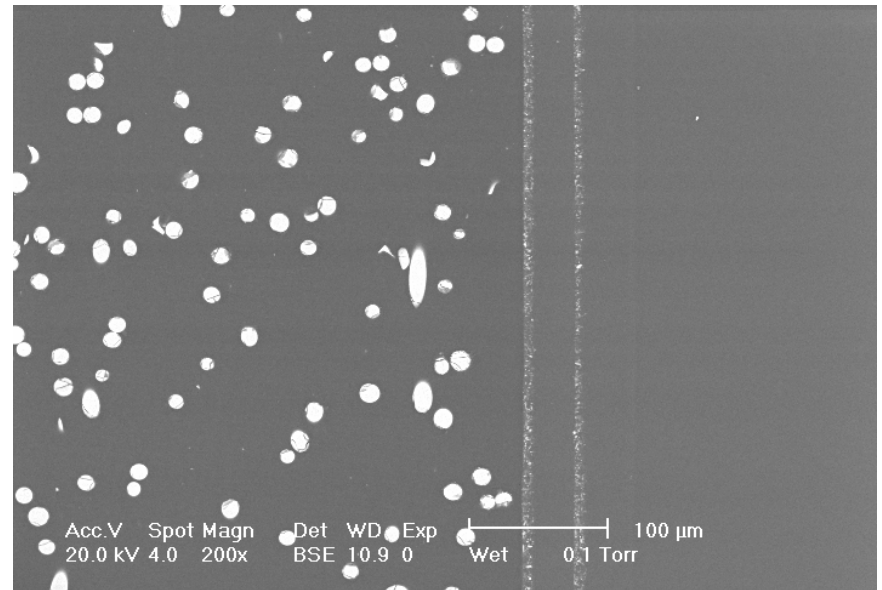
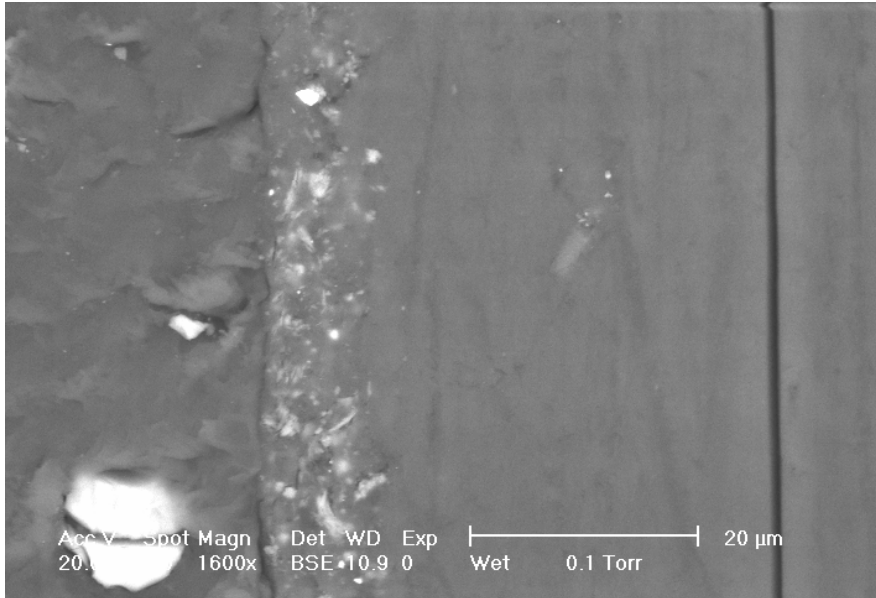
Faible tacticité: structures lamellaires uniquement (pas de sphérolites)

# Coupe + enrobage + polissage mécanique: analyse d'une couche de peinture

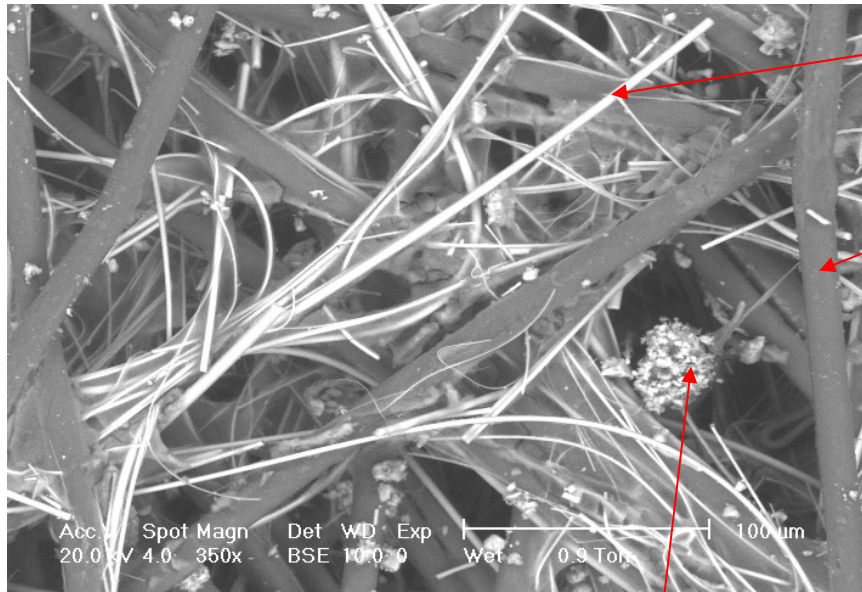
Support: pièce automobile en polyamide (+fibres de verre)

Peinture  
(4 couches)

PA – fibres de verre ↙ ↘



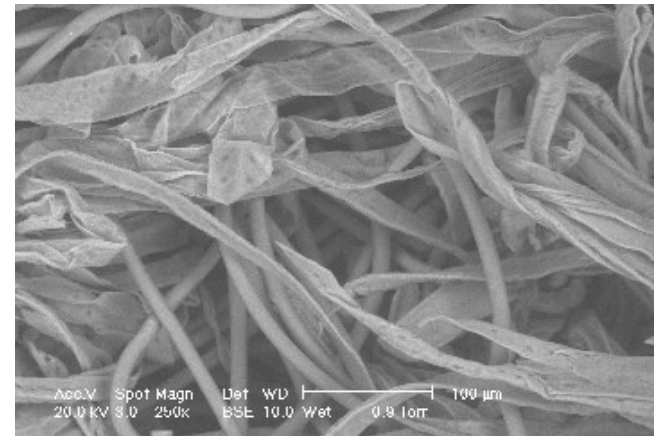
# Observation sans préparation ou préparation simplifiée: fibres (filtres)



Fibres de verre

Fibres polyester

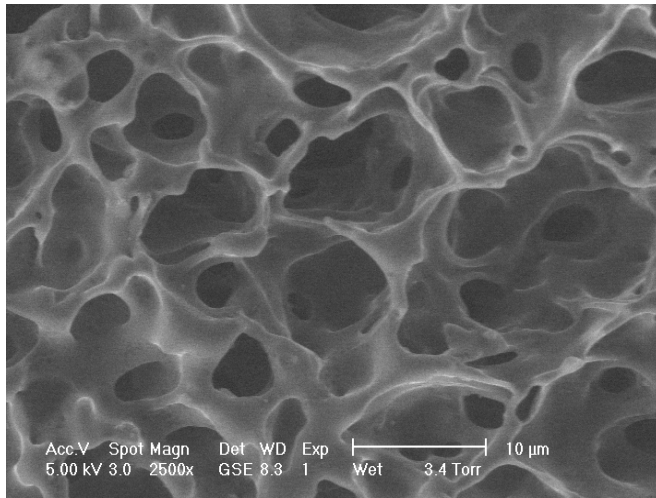
Particule



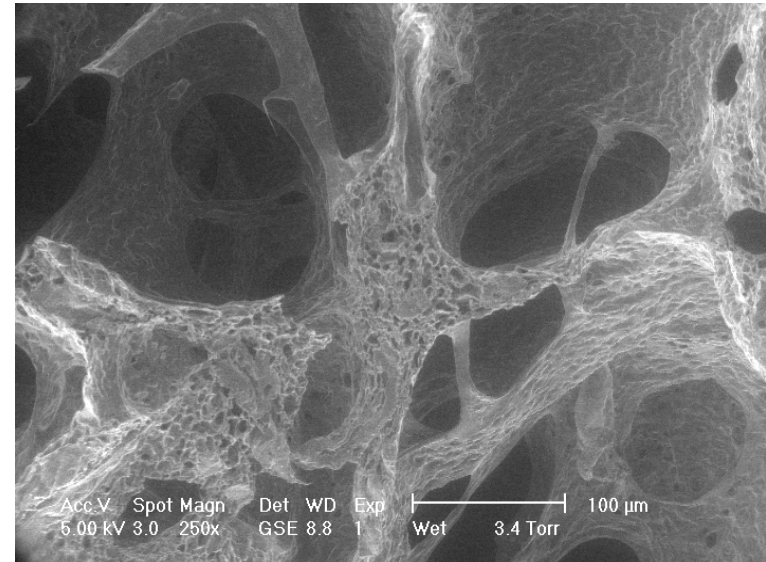
cellulose

# Observation sans préparation ou préparation simplifiée: éponges

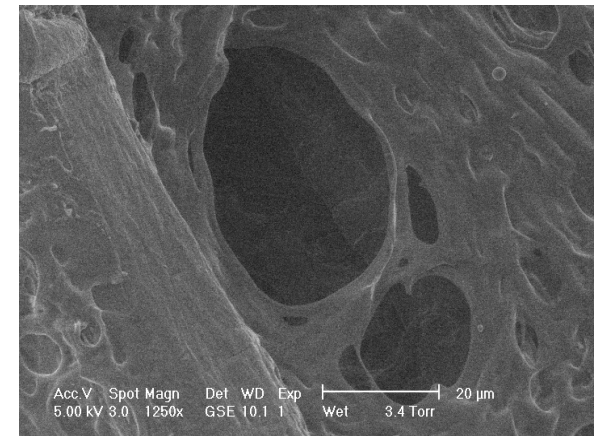
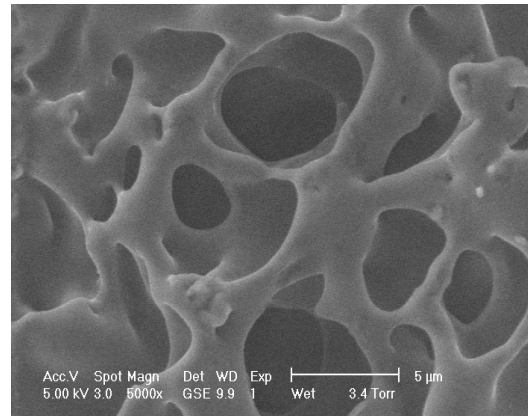
- Échantillons: éponges cellulose
- Mise en évidence de la (micro-)porosité
- Technique utilisée: MEB à chambre environnementale (20% Rh)



micro-porosité



« dentelle »



# Conclusions

- *Méthodes de préparation spécifiques adaptées aux caractéristiques des matériaux.*
- *Principalement la fracture et la microtomie issue des techniques en transmission*
- *Techniques complémentaires éventuelles*
- *Certaines méthodes « matériaux durs » peuvent être utilisées*
- *....*

# Particularités des échantillons biologiques

Teneur en eau élevée

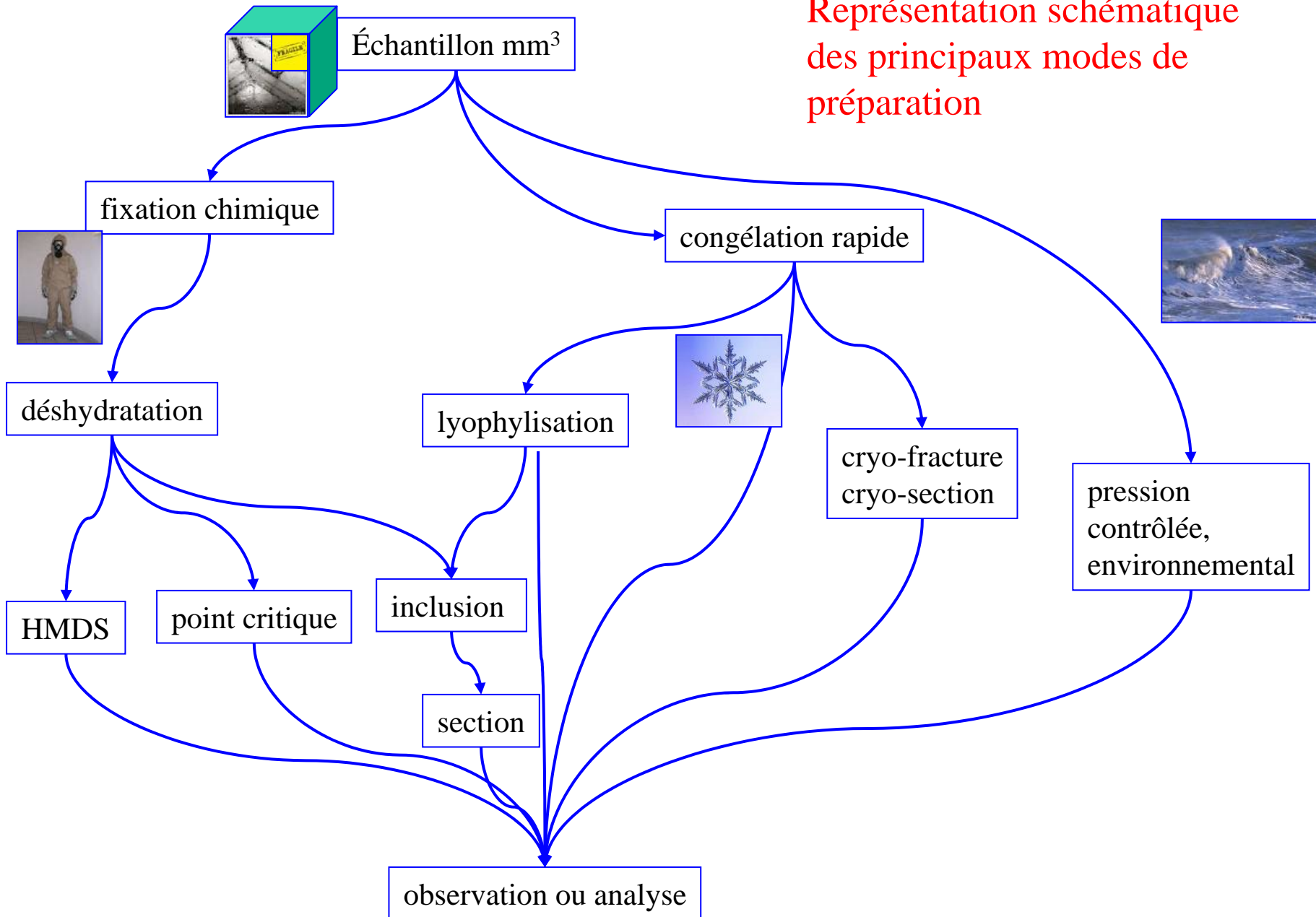


Avant toute observation au MEB, il est donc nécessaire:

- soit de déshydrater l'échantillon
- soit de travailler dans des conditions d'observation compatibles avec la présence d'eau dans l'échantillon.



# Représentation schématique des principaux modes de préparation



## La fixation chimique



Consiste à établir des pontages entre molécules contiguës et à bloquer les systèmes enzymatiques

- Le glutaraldéhyde ( $\text{COH}(\text{CH}_2)_3\text{COH}$ ). Il agit par pontage des protéines.
- Le tétroxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ). Il complète (c'est une post-fixation) en réagissant avec les doubles liaisons (phospholipides des membranes)



## La déshydratation chimique

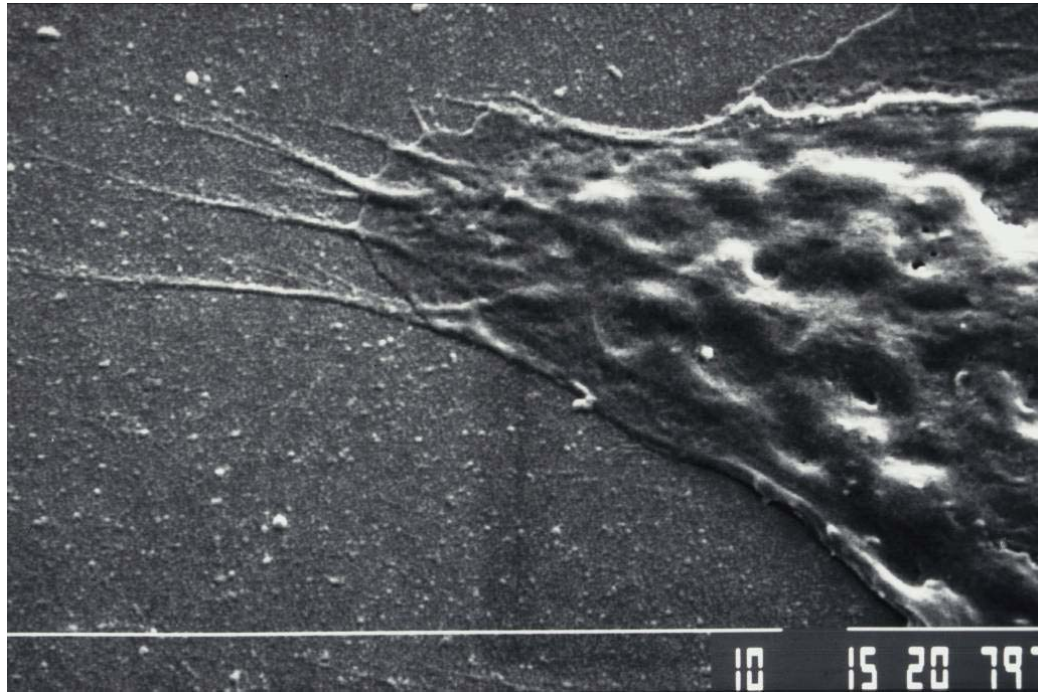


Déshydratation par immersion des échantillons dans des bains successifs  
d'éthanol 50% à 100%

Puis : élimination de l'éthanol par la méthode du  
contournement du point critique du CO<sub>2</sub> (31°C; 7,4 MPa)  
(éthanol-acetone-CO<sub>2</sub> liquide)

Ou par l'utilisation de HMDS (hexamethyldisilazane)



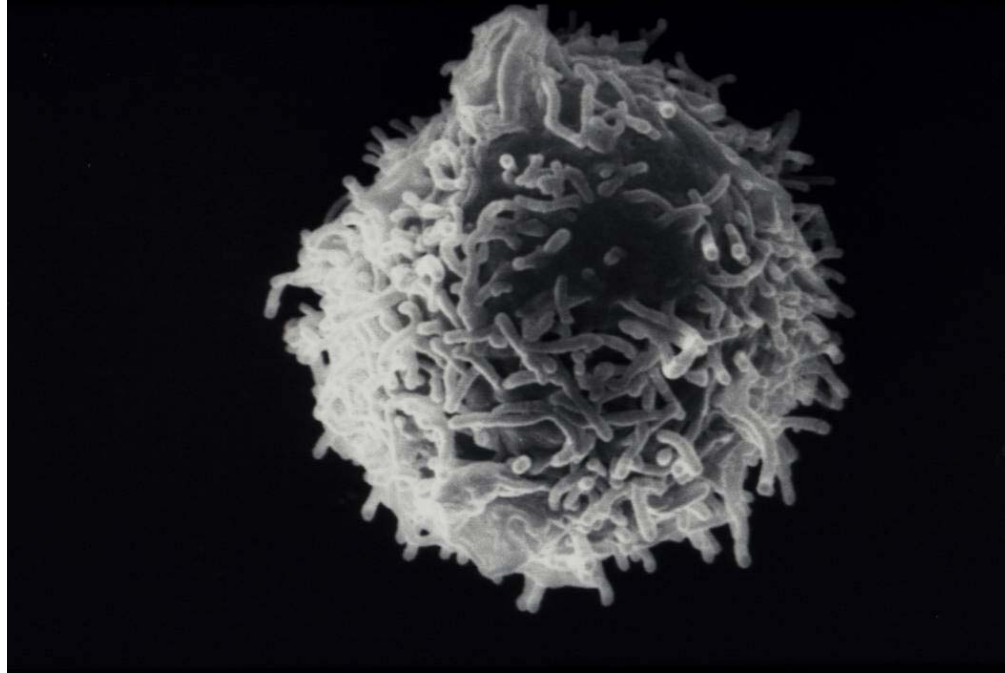


Fibroblaste en culture. Détail des filopodes.

Fixation au glutaraldéhyde, post-fixation à l'osmium, déshydratation à l'alcool, passage au point critique. MEB tungstène, 15kV, métallisation à l'or.

Marqueur : 10 micromètres





Fibroblaste en suspension.

Fixation au glutaraldéhyde, post-fixation à l'osmium, déshydratation à l'alcool, passage au point critique. MEB tungstène, 15kV, métallisation à l'or.

Diamètre de la cellule 7 micromètres.





Collagène après prétraitement à l'enzyme hyaluronidase.  
La périodicité du collagène (64 nanomètres) est bien visible.  
Fixation au glutaraldéhyde, post-fixation à l'osmium, déshydratation à l'alcool,  
utilisation de HMDS. MEB à canon à émission de champ, 12kV, métallisation au platine.  
Marqueur : 1 micromètre



## La voie cryogénique

l'éthane,                      point de fusion  $-183^{\circ}\text{C}$                       point d'ébullition  $-88.8^{\circ}\text{C}$ ,

le propane,                      point de fusion  $-189^{\circ}\text{C}$                       point d'ébullition  $-42.1^{\circ}\text{C}$ ,

les capacités calorifiques sont importantes,  
les conductivités thermiques sont élevées,

l'azote a un point d'ébullition très bas ( $-195.8^{\circ}\text{C}$ ),  
mais très proche de son point de fusion ( $-210^{\circ}\text{C}$ )  
à utiliser à son point de fusion sous un mélange solide/liquide  
(= azote pâteux préparé sous vide)

la congélation par impact sur bloc de cuivre refroidi permet des  
congélations très rapides.

la congélation par haute pression tire profit de l'abaissement du point  
de congélation de l'eau sous haute pression : permet de congeler  
l'échantillon sans aucun artefact sur 200 micromètres de profondeur.



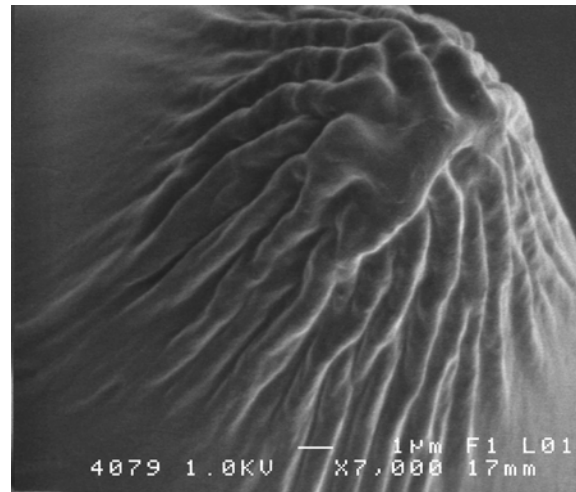
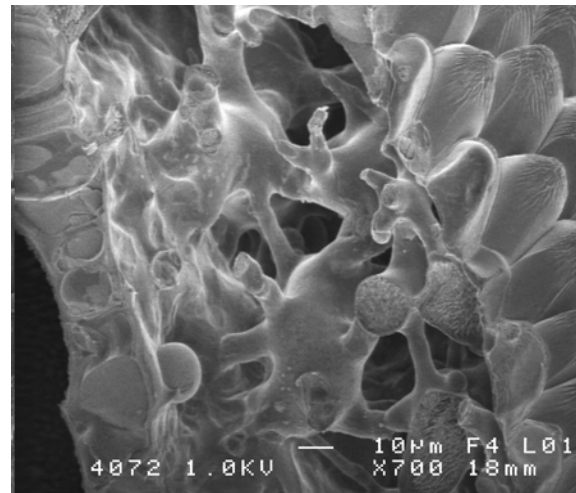
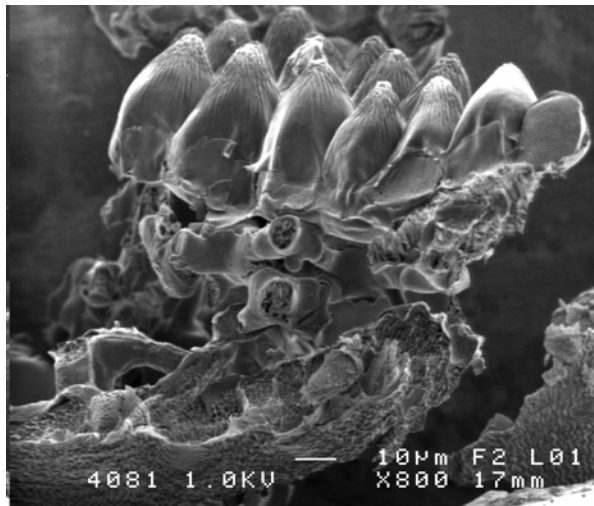
## L'observation des échantillons après congélation

La lyophilisation

exemple : 1 journée à  $-150^{\circ}\text{C}$ , 3 jours à  $-100^{\circ}\text{C}$ ,  
une remontée de  $1^{\circ}/\text{h}$  jusqu'à la température ambiante.

L'observation de l'échantillon à l'état congelé,  
sur une platine refroidie à l'azote liquide,  
éventuellement après décapage, cryo-fracture ou  
cryo-section.



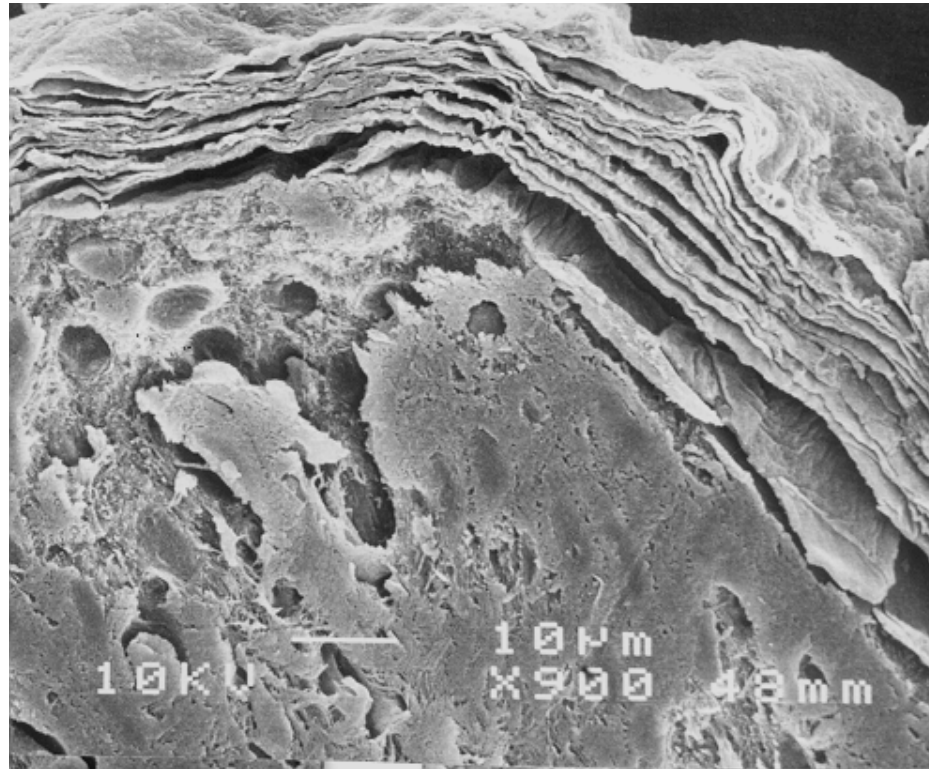


Lyophilisation

Observation à - 130°C

Pétale de rose, MEB à canon à émission de champ, métallisation au platine

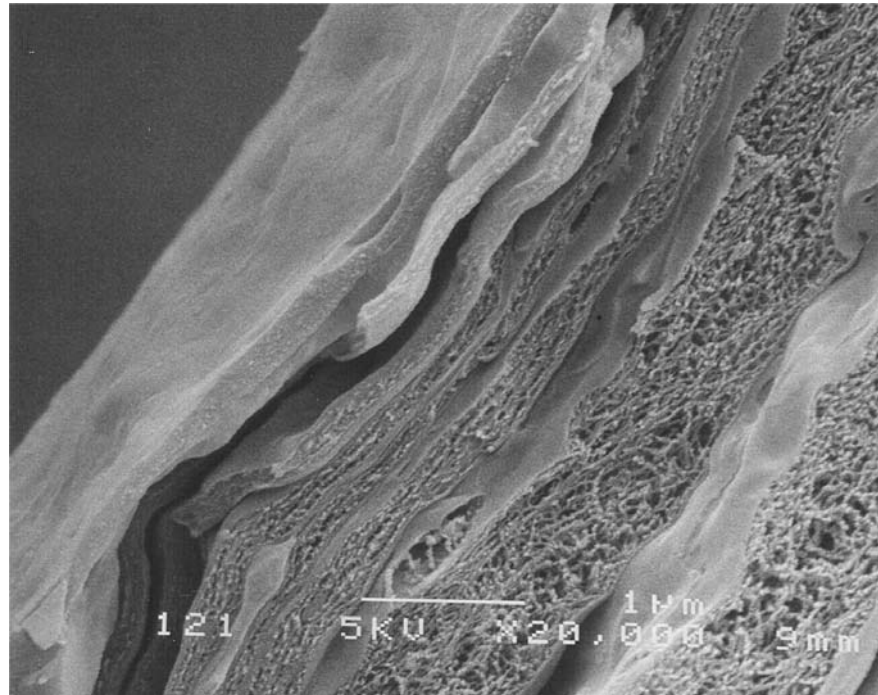




Échantillon de peau cryo-fracturé puis déshydraté et traité au HMDS

MEB à canon à effet de champ, 10kV, métallisation à l'or, marqueur 10 micromètres





Cryo-fracture transversale de l'épiderme supérieur kératinisé de peau humaine, deux types de cornéocytes sont visibles.

Echantillon observé hydraté et à basse température, après décapage.

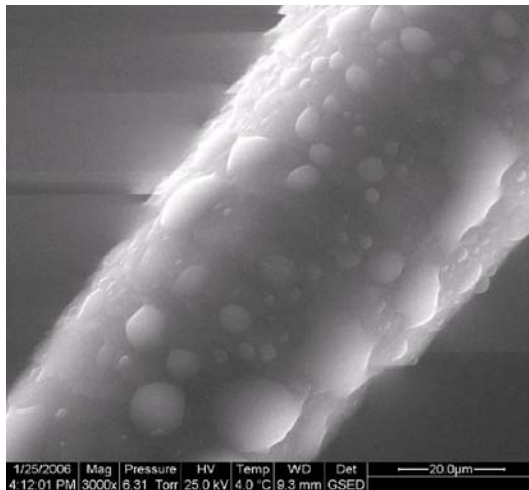
MEB à canon à émission de champ, 5kV, métallisation platine.



# La microscopie à pression contrôlée et La microscopie à chambre environnementale

Rappels:

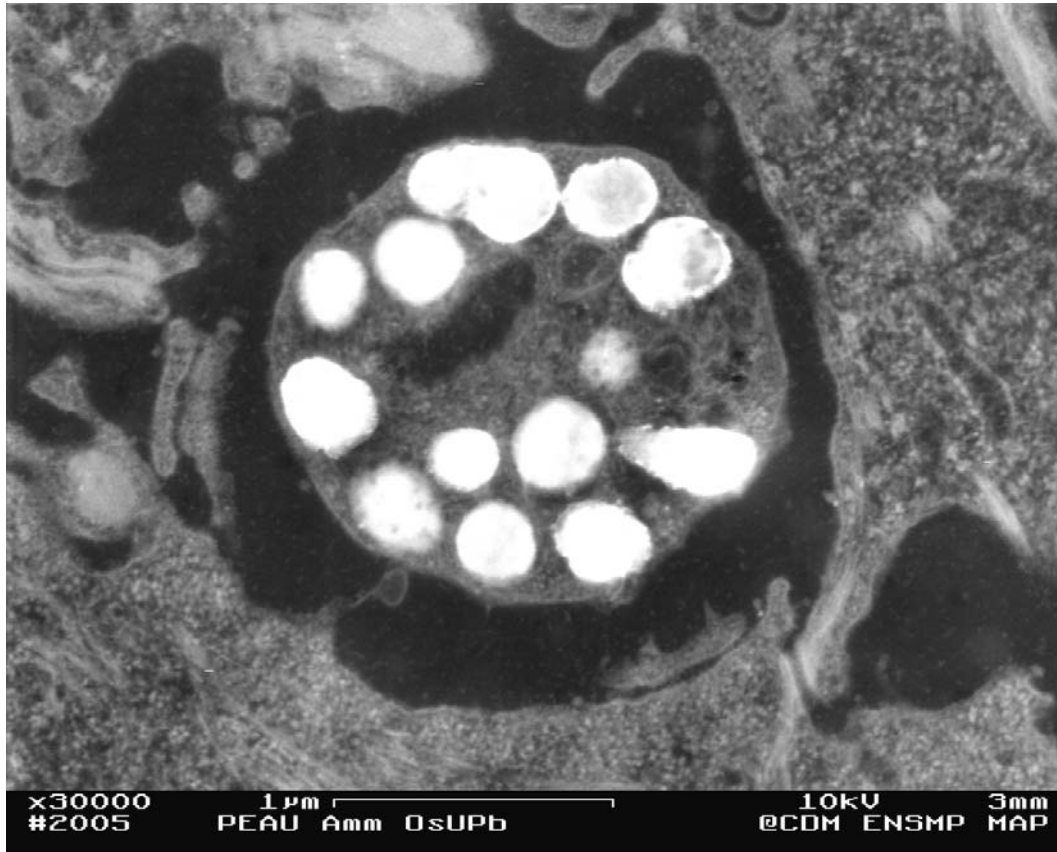
Goutte d'eau à l'équilibre à T° ambiante : 2000 à 2500 Pa  
à 0°C : 610 Pa  
à -10°C : 260 Pa



Condensation d'eau à la surface d'un cheveu dans  
la chambre d'un microscope environnemental.

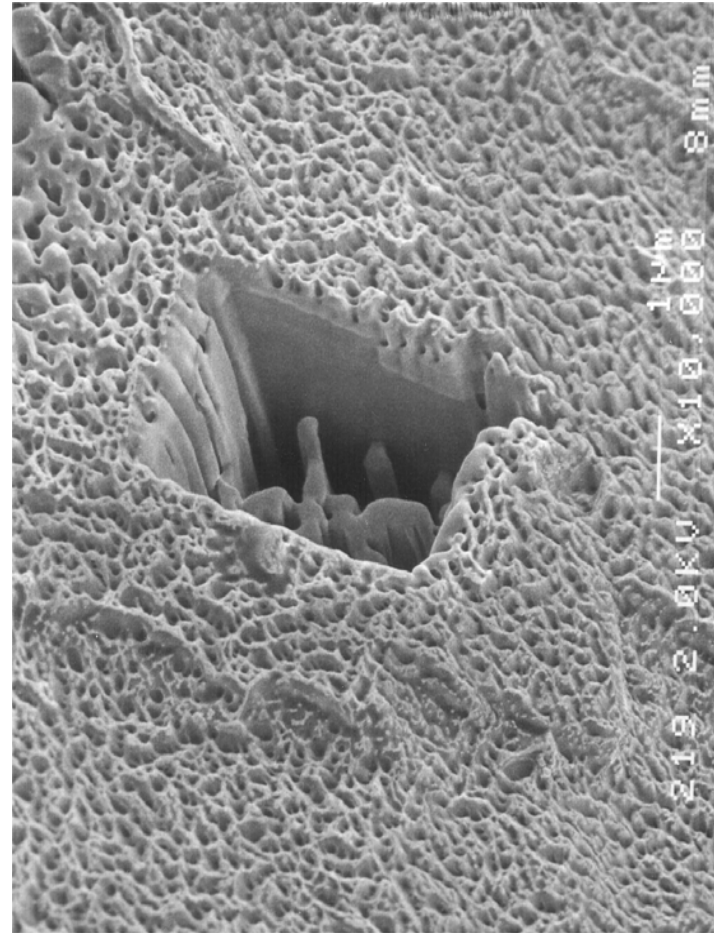


## Détecteur STEM



Epiderme : grains de mélanine dans une dendrite d'un mélanocyte.  
Observation en STEM dans un MEB à canon à émission de champ.

## Découpes par faisceau d'ions



*'Microdissection' d'un cheveu au moyen d'une sonde gallium.*

Dimensions du trou central ( $2.5\mu\text{m}^3$ ).

Observation par MEB à canon à émission de champ, 2 kV,  
métallisation à l'or/palladium.

Conclusion:  
1 échantillon = 1 préparation

