



# La tomographie électronique: du MET au MEB

Agnès BOGNER, Karine MASENELLI, Thierry EPICIER  
Laboratoire MATEIS UMR CNRS 5510, INSA-Lyon



# Introduction

## □ Approches 3D à l'échelle sub-micronique

$\mu\text{m}$



nm



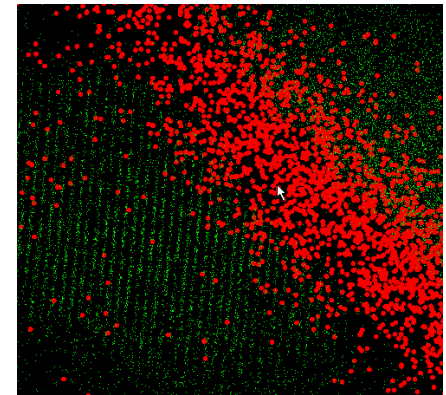
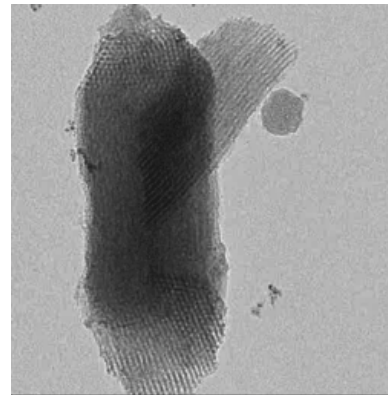
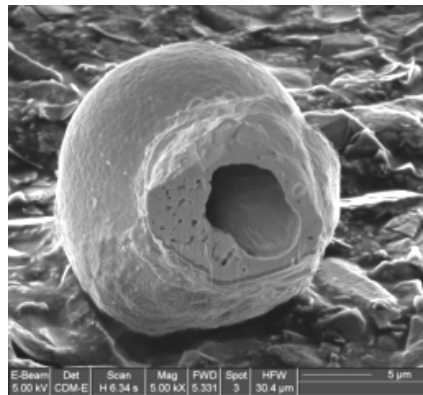
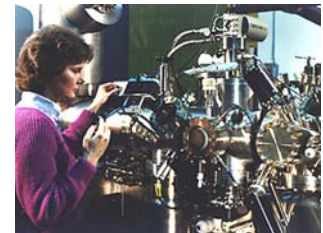
Å

*Tomographie  
aux rayons X*

*FIB/MEB*

*MET*

*Sonde atomique*



J.Y. BUFFIÈRE (*MATEIS*),

FEI Company ©

P.A. MIDGLEY et al.  
(Cambridge, UK)

GPM Rouen

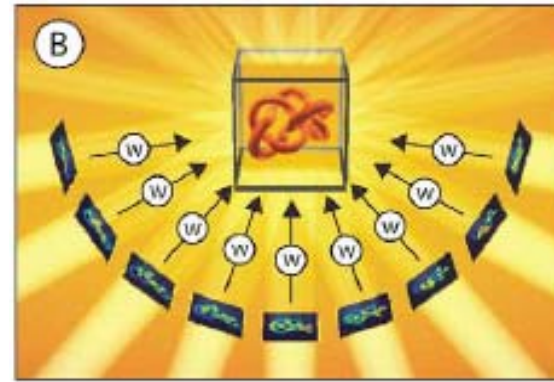
T. CONNOLLEY (*Galway, IRELAND*)

# Introduction

## □ Principe de la tomographie tiltée

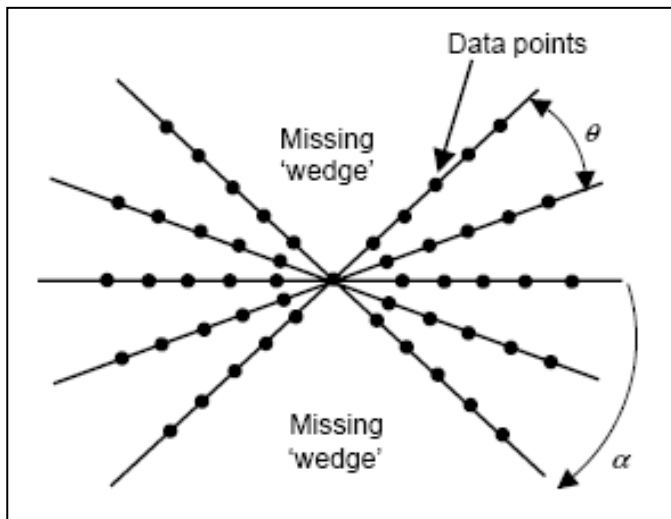


Images = projections de l'objet à différents angles de tilt



Reconstruction 3D via des algorithmes à base de re-projection

*W. Baumeister, Biol. Chem. 2004*



### Difficultés:

- Echantillonnage faible pour les hautes fréquences
- Domaine d'angles manquant « missing wedge »

*Midgley, Ultramicroscopy 2003*

# Plan de la présentation

---

## Introduction

- ❑ Les approches « 3D » en MET
- ❑ Les approches « 3D » en MEB
- ❑ La tomographie tiltée en MEB en mode STEM : analogie avec le STEM-HAADF en MET

## Conclusions

# Plan de la présentation

---

## Introduction

- ❑ **Les approches « 3D » en MET**
- ❑ Les approches « 3D » en MEB
- ❑ La tomographie tiltée en MEB en mode STEM : analogie avec le STEM-HAADF en MET

## Conclusions

# Les approches « 3D » en MET

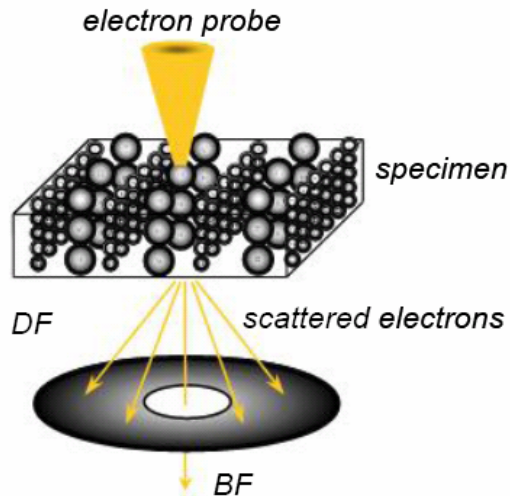
---

## Critère de projection:

le signal varie de façon monotone avec l'épaisseur i.e. lors du tilt

- ❑ MET conventionnel: échantillons non cristallins (pas de contraste de diffraction mais contraste de Fresnel)
- ❑ Modes d'imagerie incohérents et sensibles à la composition: EFTEM, STEM-HAADF
- ❑ Stéréoscopie pour les échantillons instables
- ❑ Problème du « missing wedge »: tomo à 2 axes de tilt, tomo conique ou série focale sans tilt (3D STEM)

# Tomographie en MET en mode STEM-HAADF



STEM-HAADF (High Angle Annular Dark Field)

⇒ Champ sombre annulaire à grands angles

Détecteur annulaire

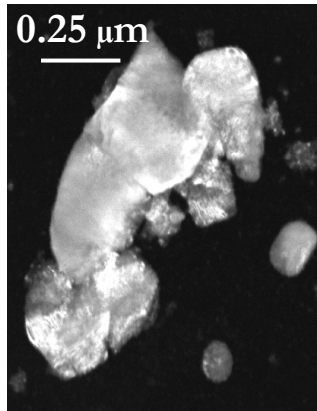


Grands angles:  
diffusion incohérente



Cartographie de l'intensité diffusée

Précipités  
NbC  
(réplique  
carbone)



Intensité  $\propto Z^{\approx 2}$   
(diffusion de Rutherford)

Matériaux à Z élevé: plus clairs

ADF: contraste de diffraction

High Angle ADF: « Z-contraste »

# Tomographie en MET en mode STEM-HAADF



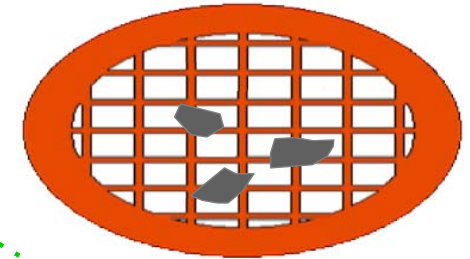
JEOL 2010F 200 kV  
STEM-HAADF

Modification du porte-objet  
simple tilt  $\pm 20^\circ$  compatible  
avec la pièce polaire HR

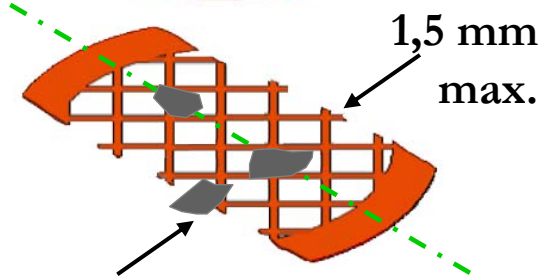


*Gamme de tilt*  
 $\pm 85^\circ$

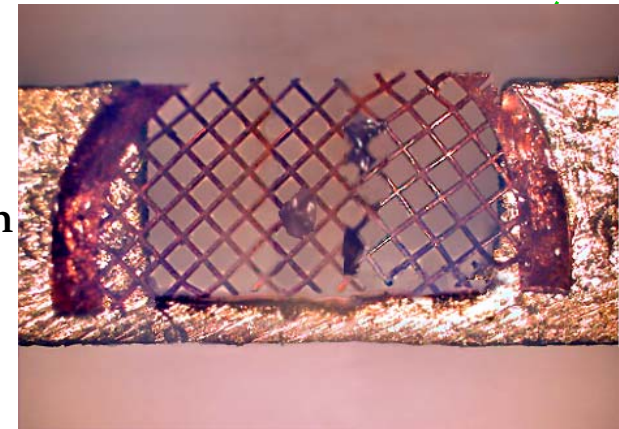
*Echantillon plus étroit  
qu'une grille MET*



Axe  
de tilt



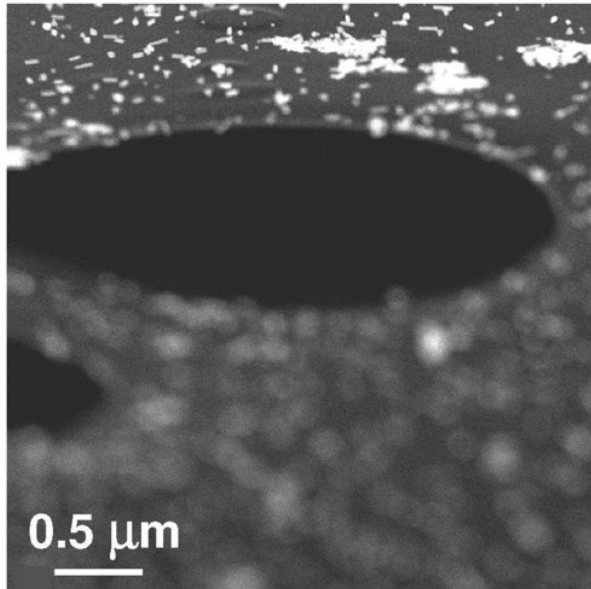
1,5 mm



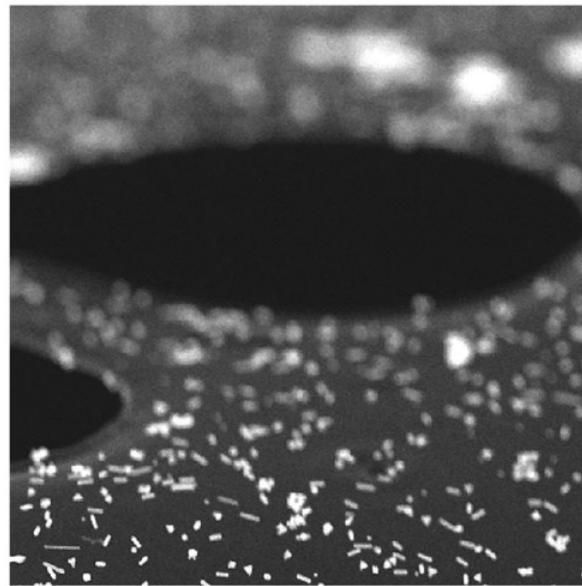
# Tomographie en MET en mode STEM-HAADF

- Focus dynamique, avantage sur un échantillon tilté

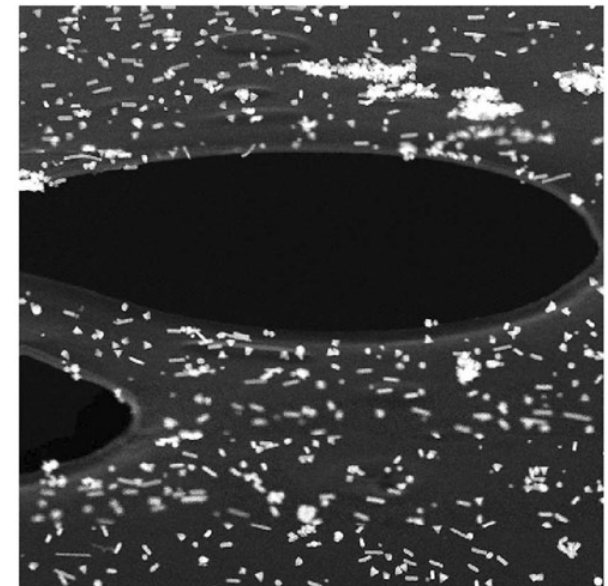
Film de C supportant des nanoparticules de Pd



Focus en haut de l'image



Focus en bas de l'image



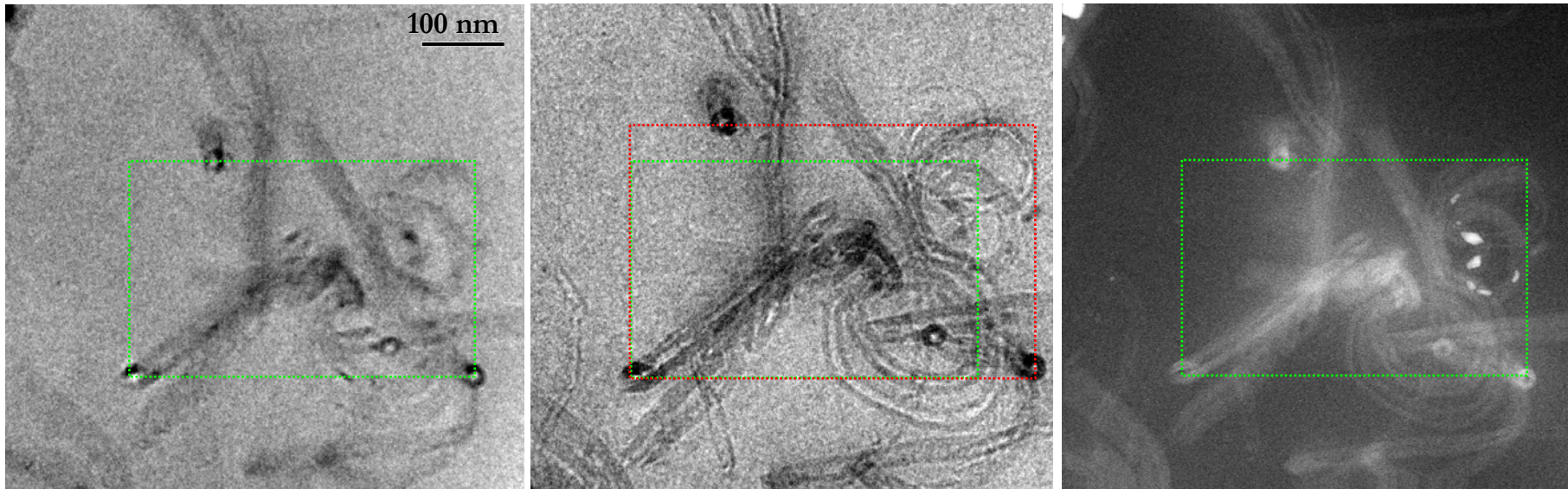
Focus dynamique

Echantillon incliné à  $+73^\circ$  par rapport à l'axe de tilt horizontal

*S. Benlekbir, T. Epicier, M. Bausach, M. Aouine, G. Berhault, Phil. Mag. Letters 2009*

# Tomographie en MET en mode STEM-HAADF

- Dimensions dépendantes ou non du focus



**MET** (in focus)

**MET** (underfocus  $\approx 0.1 \mu\text{m}$ )

**STEM HAADF**



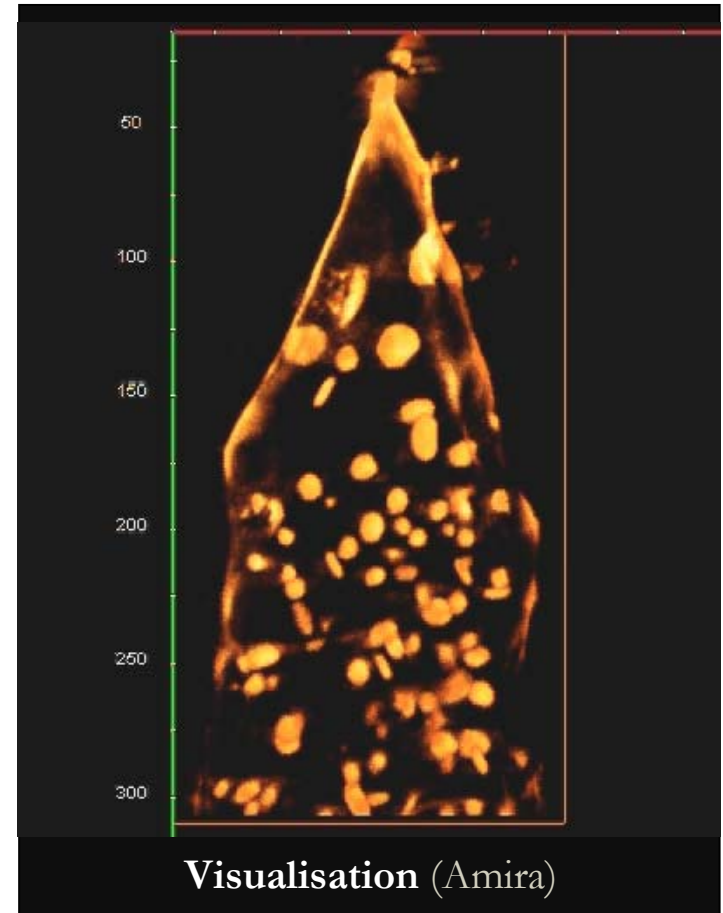
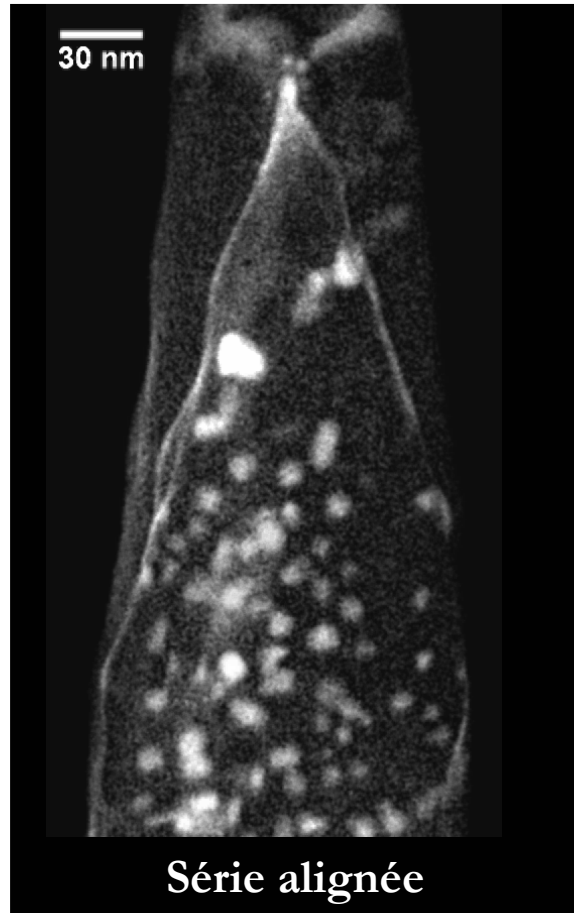
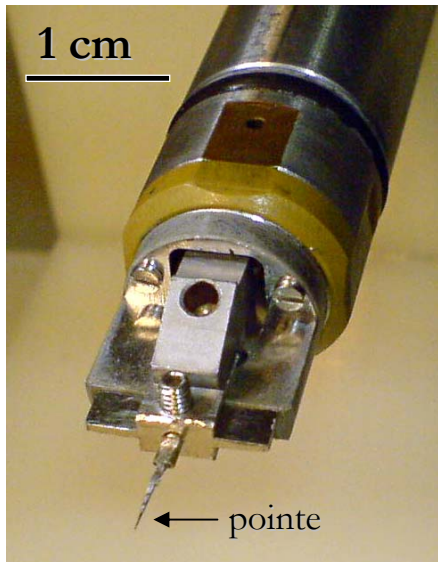
**Grandissement augmenté de 10 %**

*A. Bogner, G. Thollet, J. Ferreira, Y. Liu, T. Epicier., IMC 17 Rio 2010*

# Tomographie en MET en mode STEM-HAADF

## Précipités de $MgZn_2$ dans un alliage d'aluminium

Pointe préparée par  
amincissement  
électrolytique



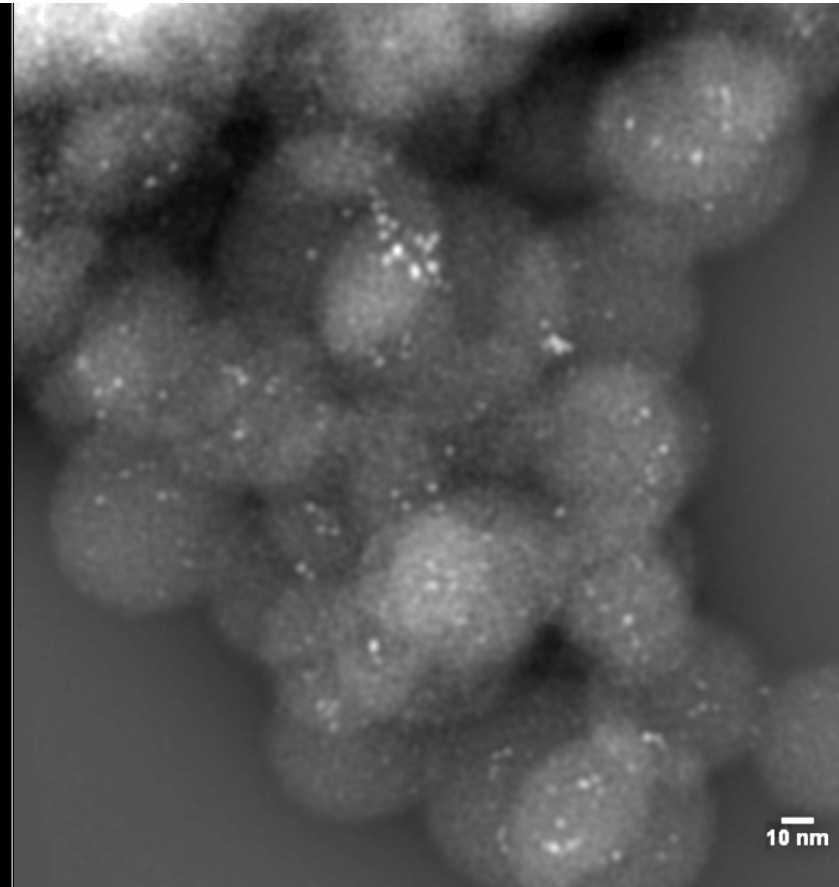
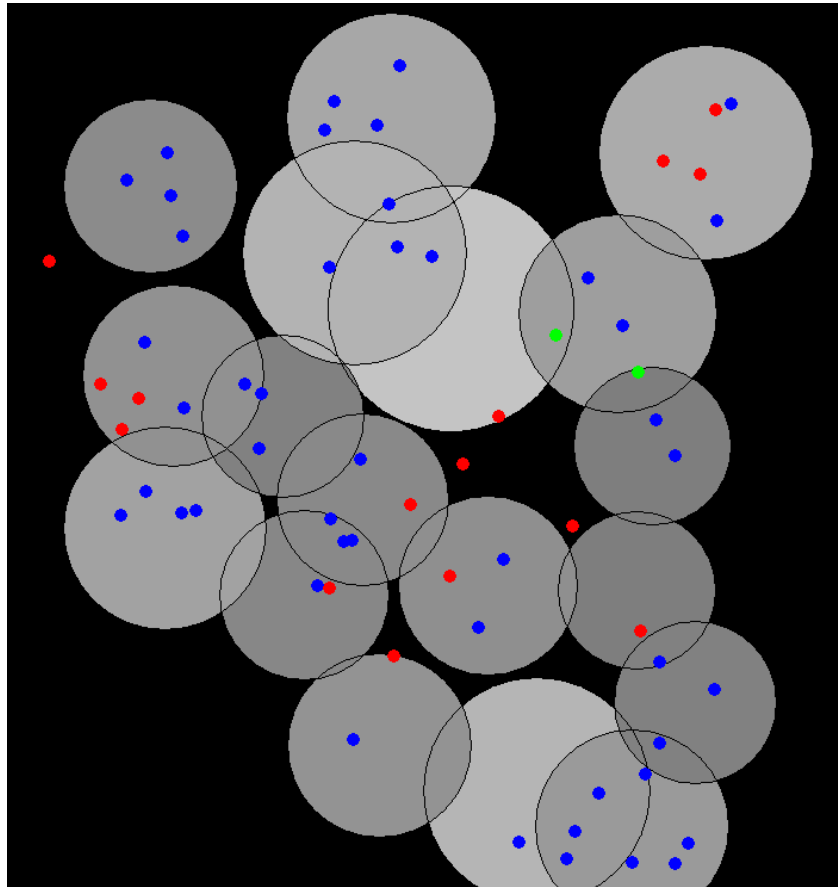
Gamme de tilt :  $-52^\circ$  to  $69^\circ$  ( $121^\circ$ ), pas:  $1^\circ$ , grandissement: 300K

# Stéréoscopie en mode STEM-HAADF

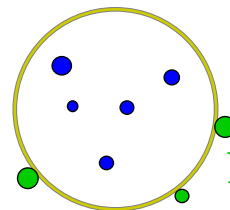
## Nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub> pour applications médicales

Série  
tiltée:

73,5°  
66°  
58,5°  
51°  
43,5°  
36°  
28,5°  
21°  
13,5°



NP Au interne



Bille de SiO<sub>2</sub>

● NP Au libres

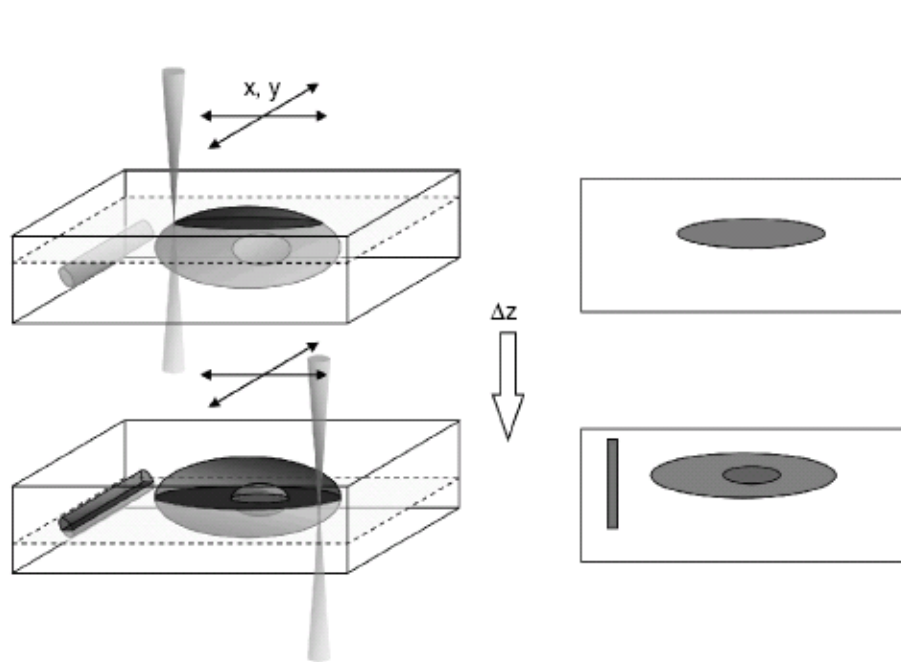
NP Au externe

S. Benlekbir, thèse MATEIS 2009

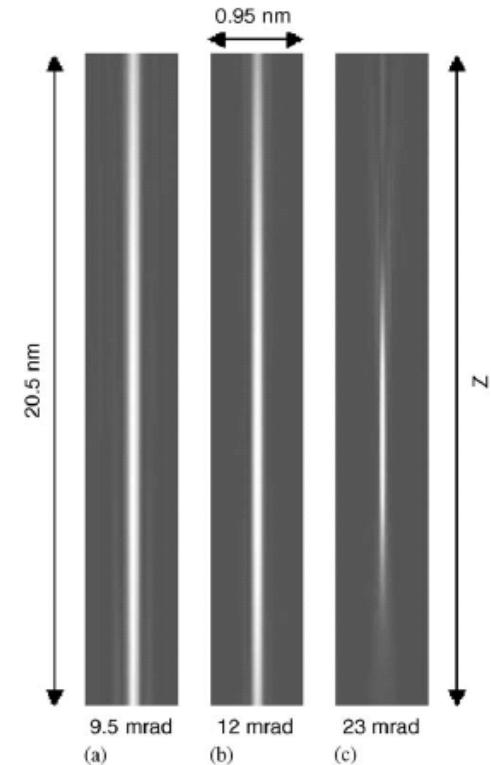
# Tomographie en MET en mode STEM-HAADF

## □ 3D STEM en MET:

- Pas d'inclinaison mécanique nécessaire, pas de « missing wedge »
- Faisceau très convergent: séries focales
- Correction d'aberration sonde: ↓ profondeur de champ pour ↑ résolution en  $z$



*N. De Jonge, R. Sougrat, D. B. Peckys, A. R. Lupini, S. J. Pennycook, 3D aberration-corrected STEM for Biology 2007*



*K. Van Benthem, A. R. Lupini, M. P. Oxley, S. D. Findlay, L. J. Allen, S. J. Pennycook, Ultramicroscopy 2006*

# Plan de la présentation

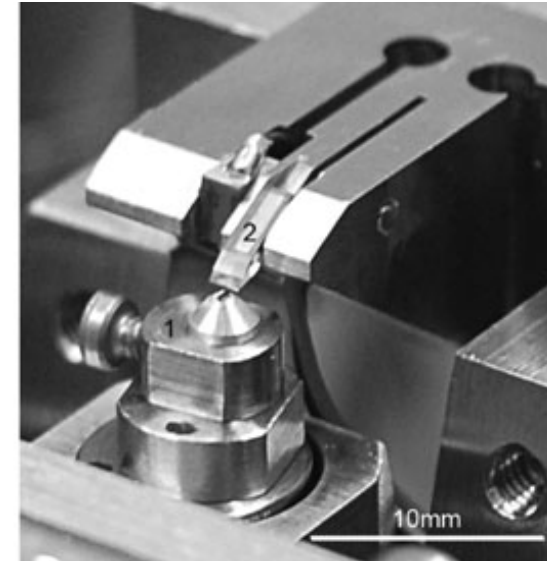
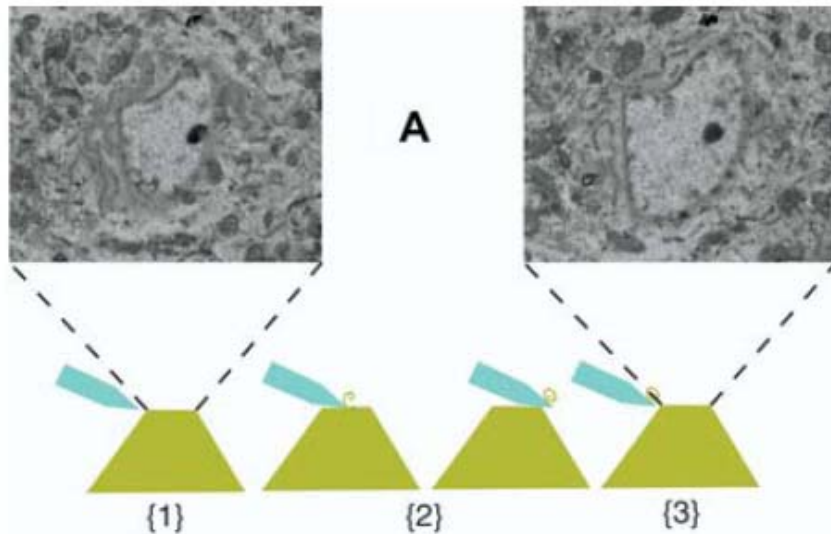
---

## Introduction

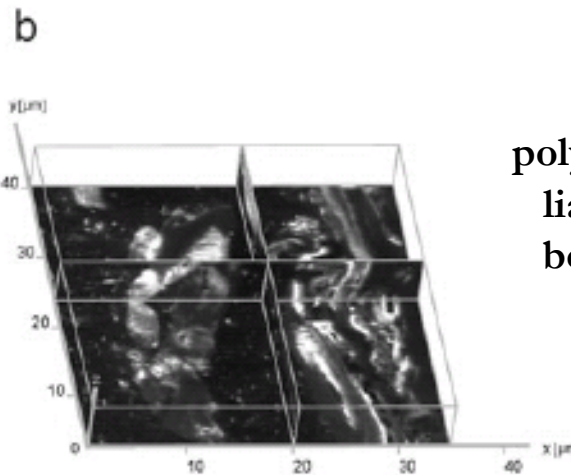
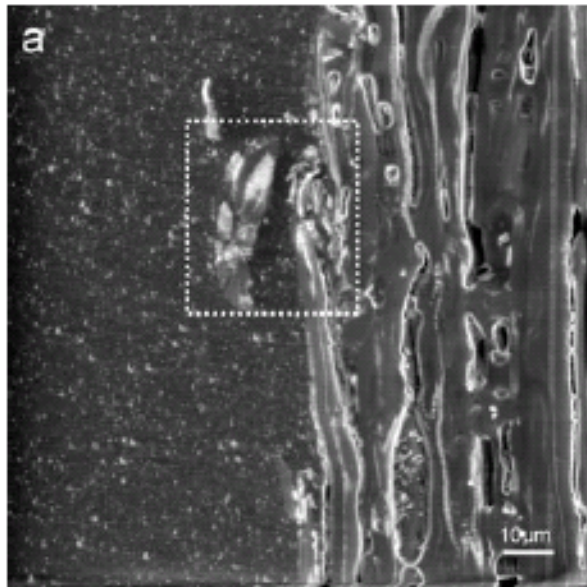
- Les approches « 3D » en MET
- **Les approches « 3D » en MEB**
- La tomographie tiltée en MEB en mode STEM : analogie avec le STEM-HAADF en MET

## Conclusions

# Un ultramicrotome dans un MEB



W. Denk, H. Horstmann, PLoS 2004

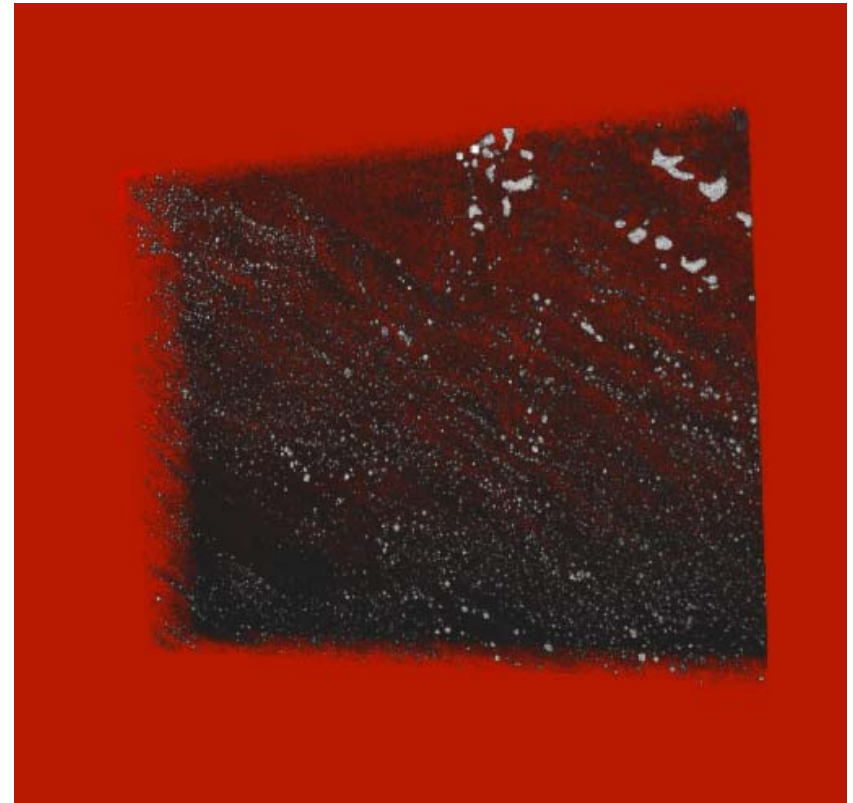
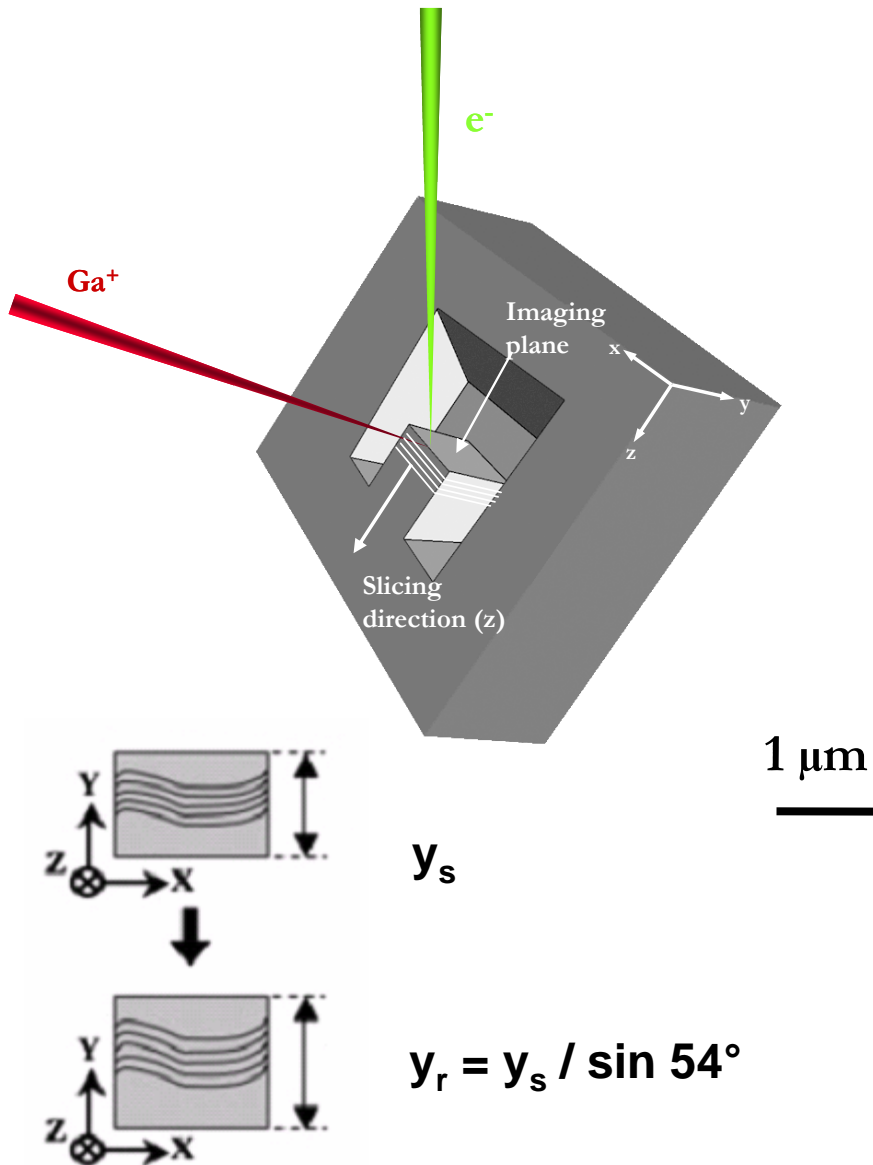


Matériau composite  
polymère ABS /bois de pin:  
liaison matrice/charges,  
bois détérioré en surface

A. Zankel, B. Kraus, P. Poelt, M. Schaffer,  
E. Ingolic, J. of Microscopy 2009

Conférence C. Genoud  
3DView™ Gatan

# Nano-tomographie en FIB/MEB



Poster B. Van de Moortèle, ENS-Lyon

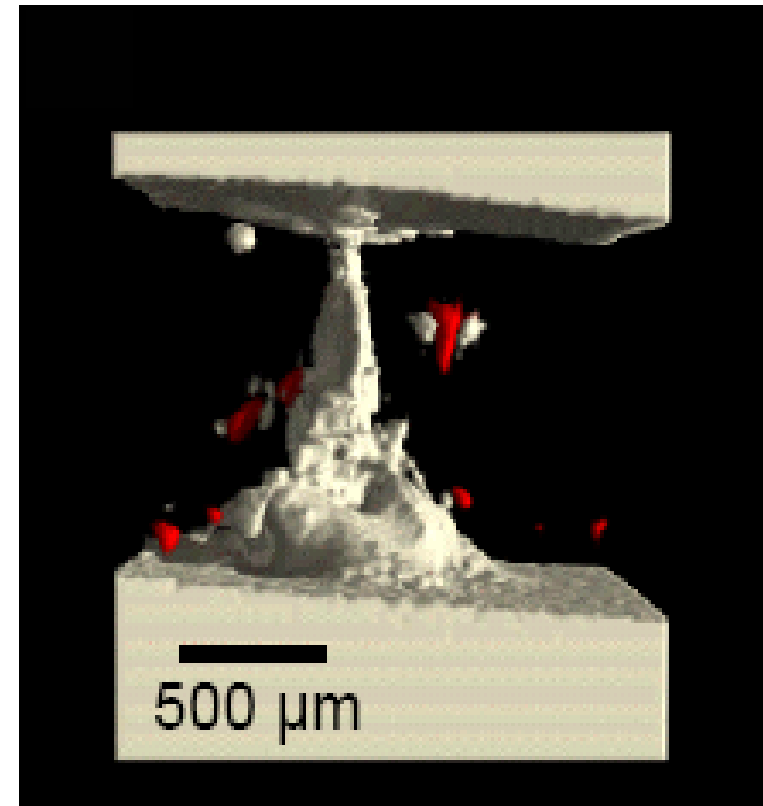
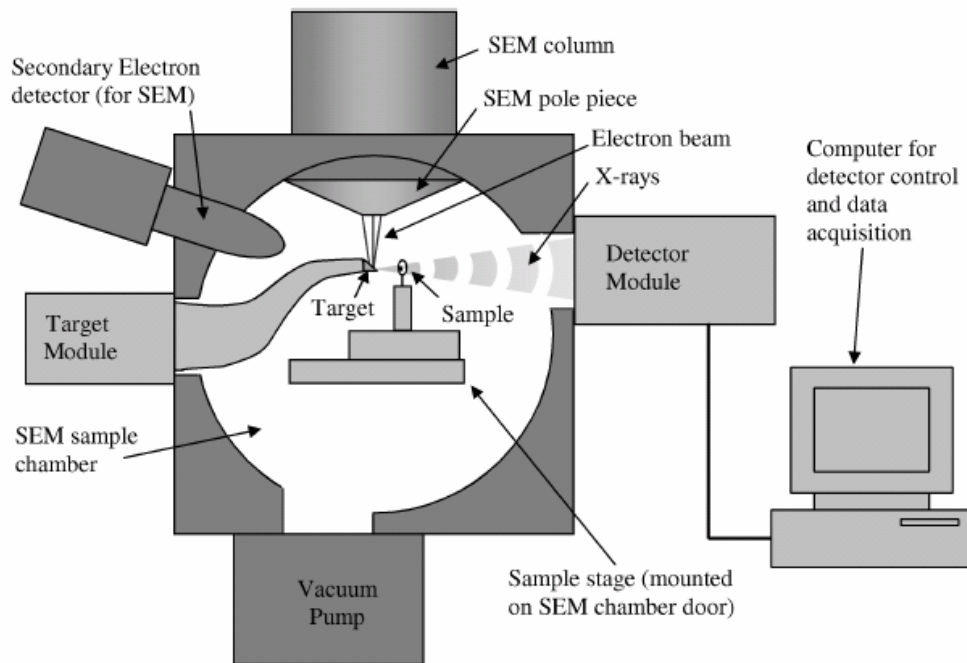
Nanoparticules FeNi dans une olivine noire (météorite martienne), alignement et visualisation Fiji

Présentation T. Epicier et al. vendredi 1<sup>er</sup> juillet à 12h40 (ANR Ruban Solaire)

Conférence B. Humbel, Lausanne

# Tomographie aux rayons X en MEB

## □ X-ray ultra Microscope (XuM)



Visualisation 3D de perforations dans un caoutchouc

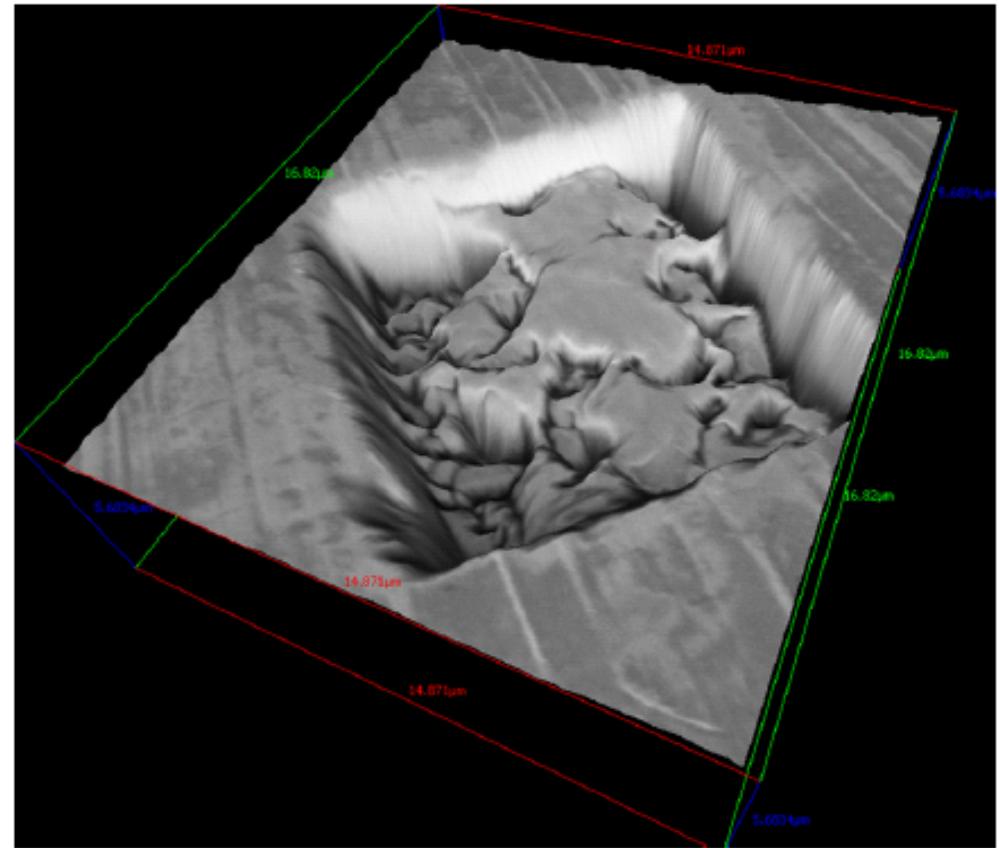
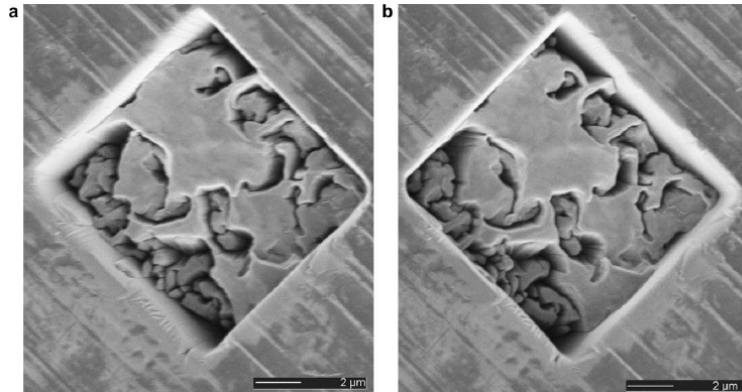
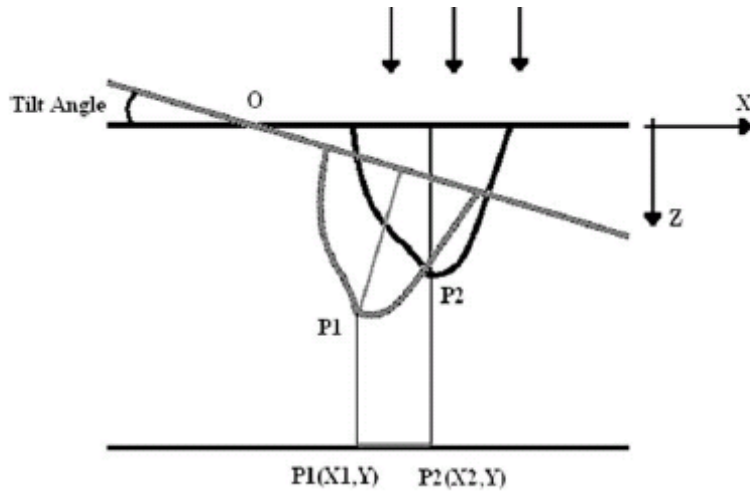
*S. C. Mayo, P. R. Miller, S. W. Wilkins, T. J. Davis, D. Gao, T. E. Gureyev, D. Paganin, D. J. Parry, A. Pogany, W. Stevenson, J. of Microscopy 2002*

*P.R. Miller, S.C. Mayo, T. Gureyev, S.W. Wilkins, J. Sheffield-Parker, M&M 2006*

# Stéréoscopie en MEB

Calcul de points 3D à partir de 2 images 2D:

$$Z = \frac{x_2 - x_1 + x_1 \times (1 - \cos \alpha)}{\sin \alpha}$$

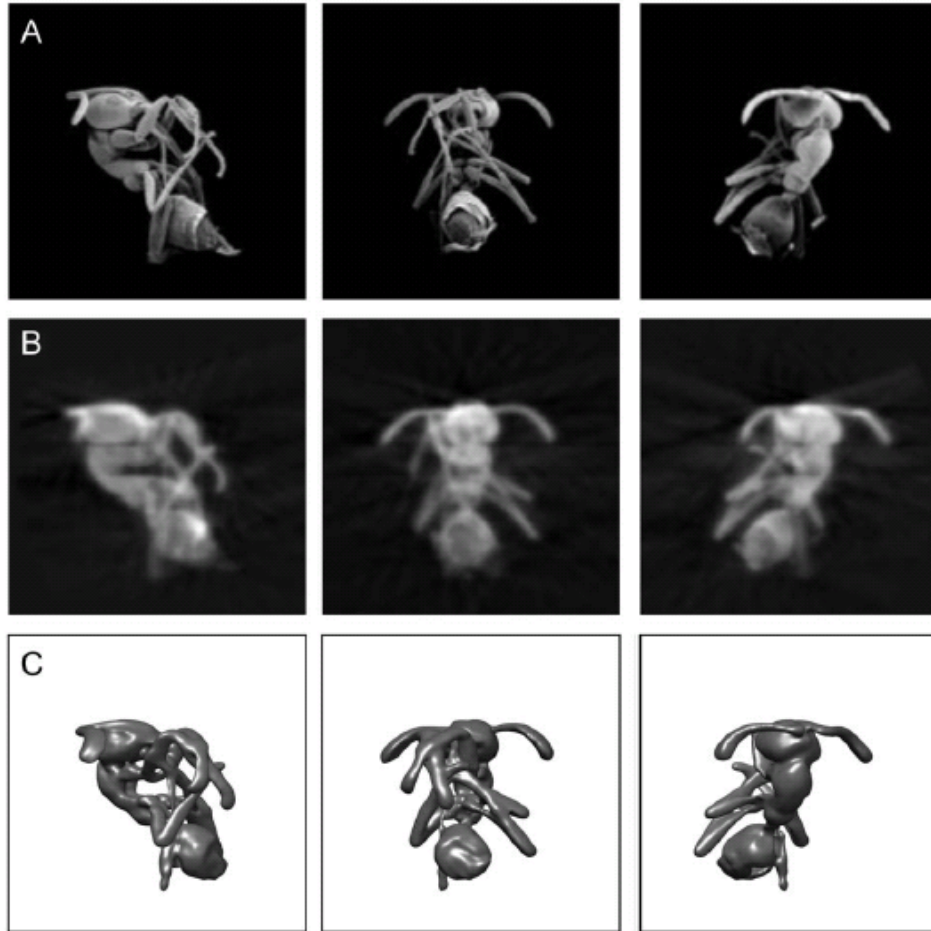


Rendement d'usinage FIB dans le cas du Cu, vues à  $-10^\circ$  et  $+10^\circ$

Visualisation 3D de la zone usinée

# Tomographie de surface en MEB

## □ Reconstruction de surface en mode SE



MEB LEO S-440 LaB<sub>6</sub>  
Fourmi d'Argentine

Procédure testée sur des images  
présentant des artéfacts, et  
volontairement bruitées

A: images extraites de la série,  
artéfacts liés à des effets de charge

B: re-projections du volume  
reconstruit

C: visualisation, résolution: D/8

# Tomographie de surface en MEB

## □ Reconstruction de surface en mode SE

MEB Hitachi S-5200 in lens, filaments intermédiaires (cellules pancréas)

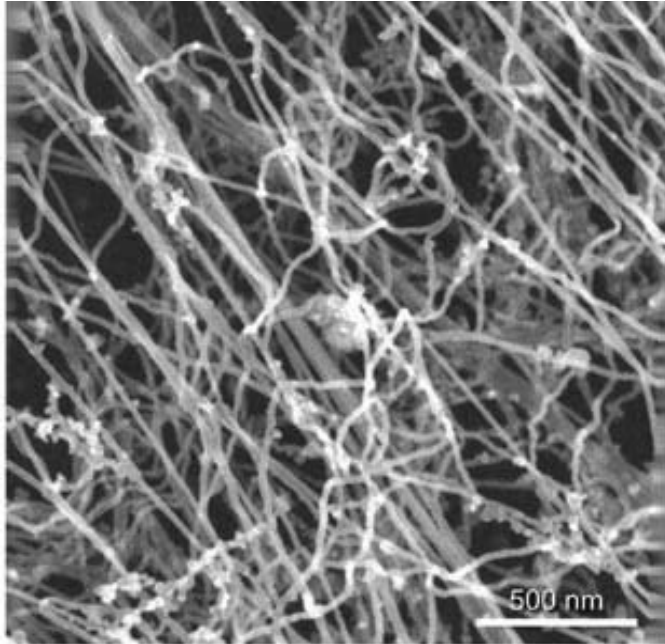
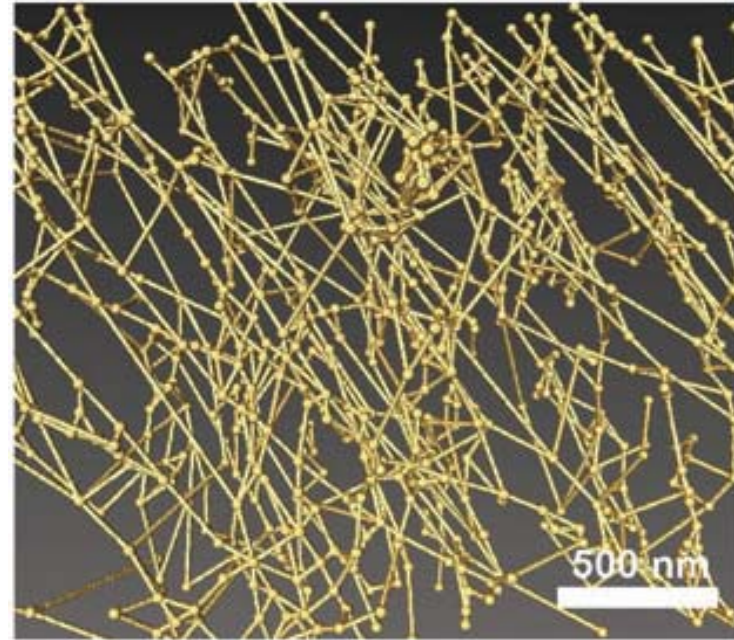


Image SE à tilt 0° après  
préparation intensive



Volume reconstruit par WBP (Imod)  
après traitements intensifs



11 tomogrammes analysés pour caractériser le réseau de ces filaments:  
densité, longueur moyenne d'un segment, taux moyen de nœuds, etc.

*S. Lück, M. Sailer, V. Schmidt, P. Walther, J. of Microscopy 2010*

# Plan de la présentation

---

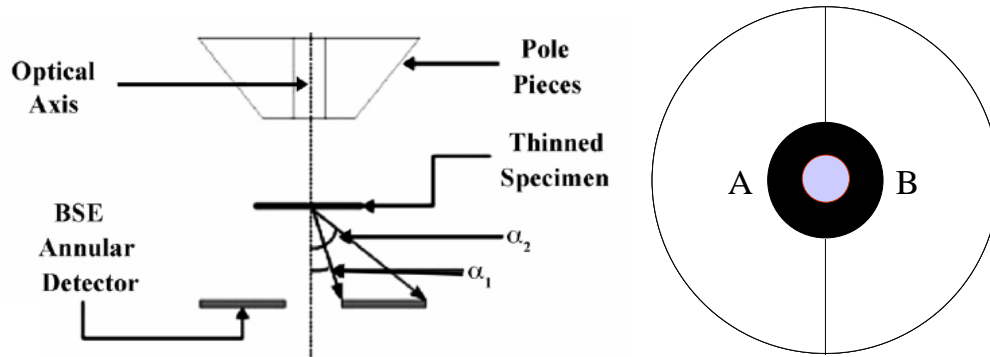
## Introduction

- Les approches « 3D » en MET
- Les approches « 3D » en MEB
- **La tomographie tiltée en MEB en mode STEM : analogie avec le STEM-HAADF en MET**

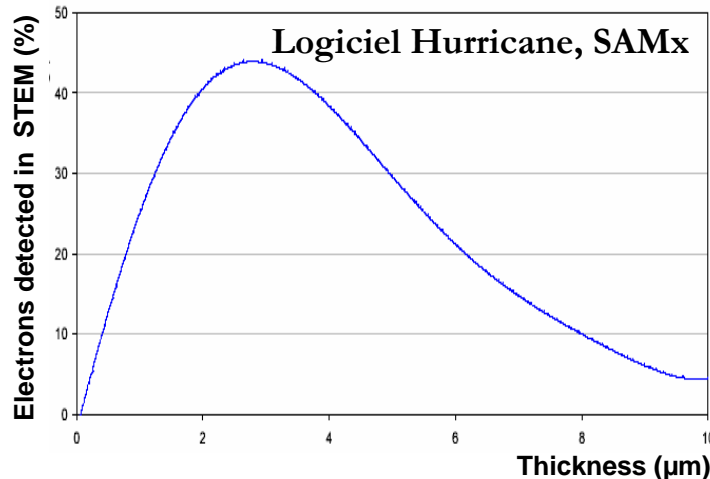
## Conclusions

# Le mode STEM basse tension

## Basse tension + détecteur champ sombre annulaire



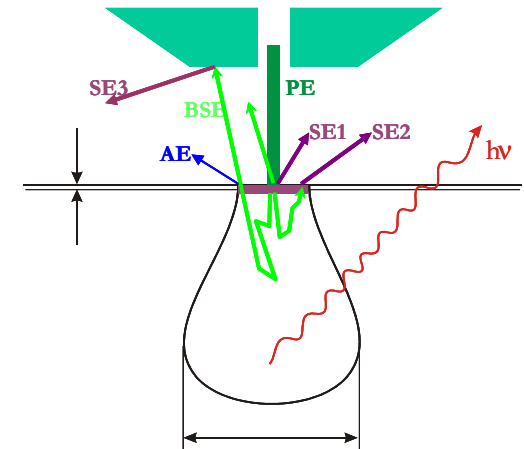
- Basse-tension  $\Rightarrow$  efficacité d'interaction e-/matière
- Grands angles de collection  $\Rightarrow$  efficacité de collection des e-  $\Rightarrow$  **contraste et épaisseurs traversées**  $\uparrow$



Modélisation de l'épaisseur traversée dans l'eau

## Echantillon mince:

$\downarrow$  volume d'interaction  $\Rightarrow \uparrow$  résolution

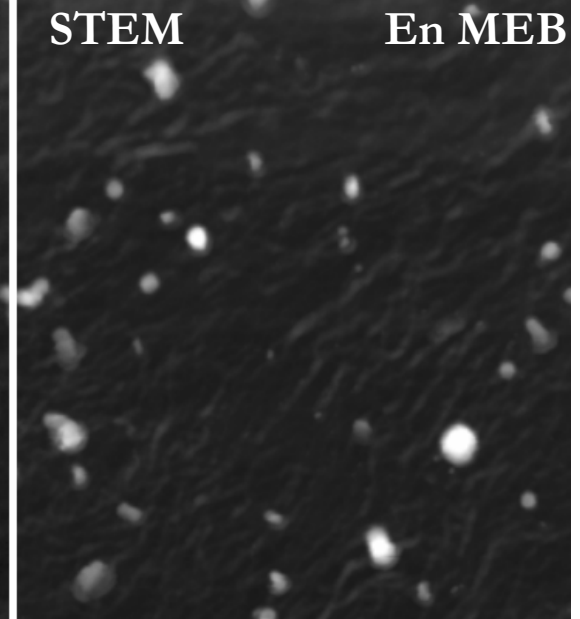
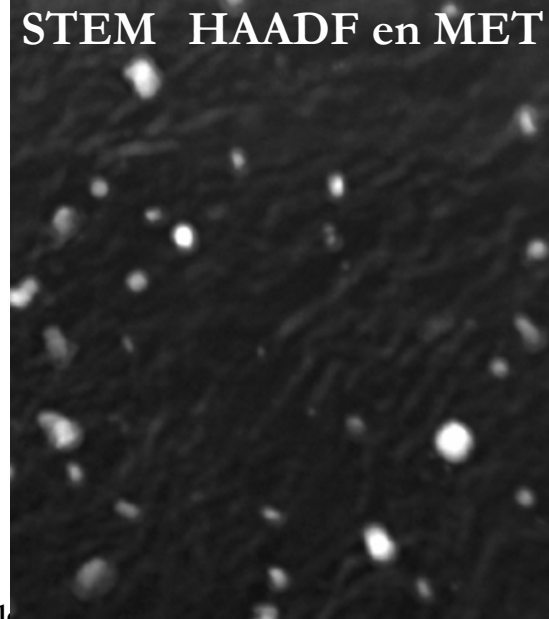
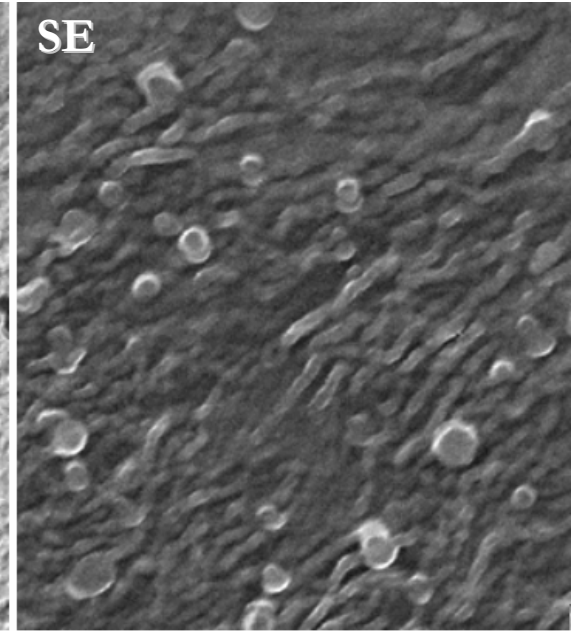
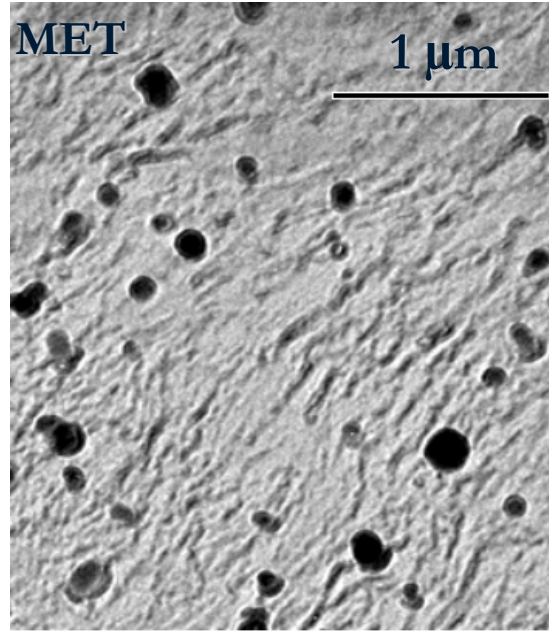
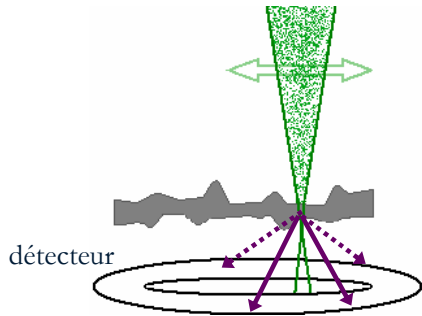


$\Rightarrow \uparrow$  résolution en STEM (effet top-bottom)

- Information de volume
- Meilleure résolution
- Contraste de masse épaisseur
- Contraste exacerbés
- Grandes épaisseurs traversées

# Analogie entre les modes STEM en MEB et en MET

*STEM*

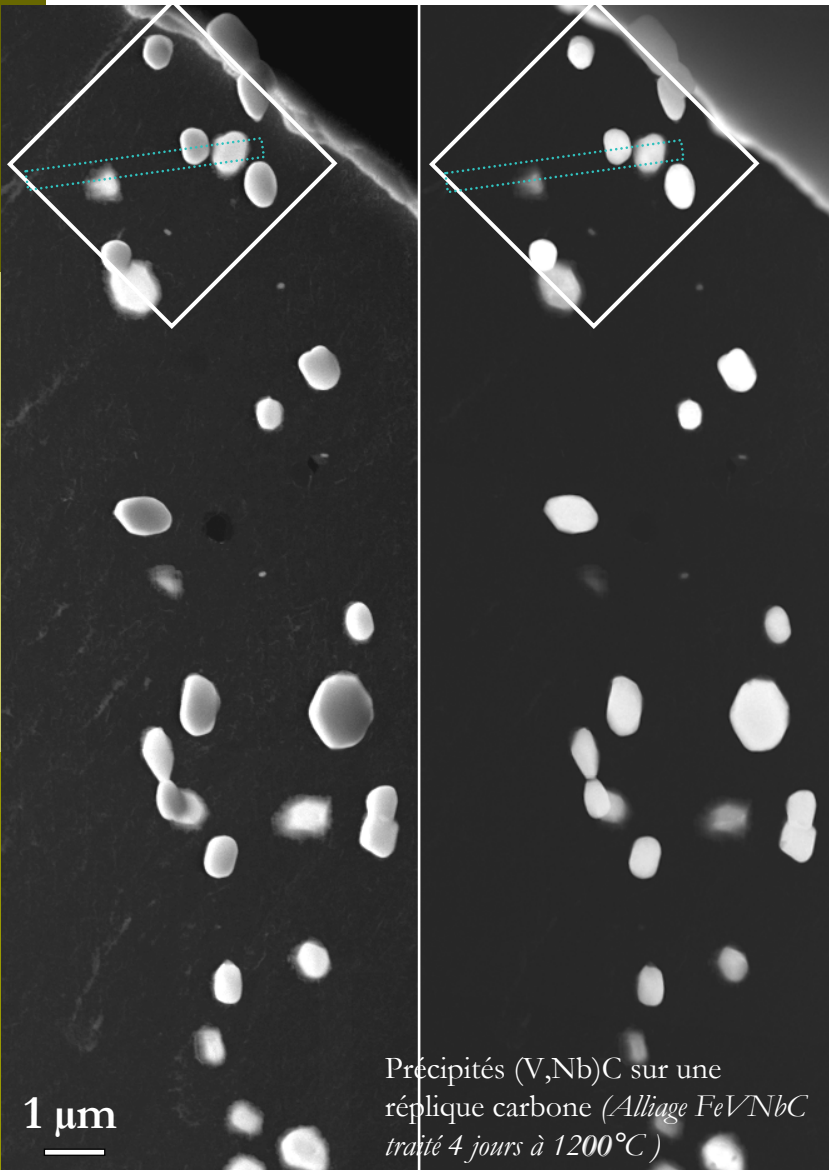


**Carbures de métaux  
sur un film carbone**

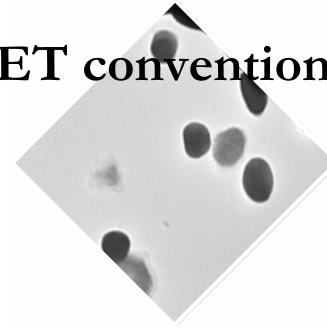
D. Acevedo, M. Perez,  
A. Bogner,  
C. Verdu, T. Epicier, *J.  
of Microscopy*, 232, Pt 1  
(2008), 112

# Analogie entre les modes STEM en MEB et en MET

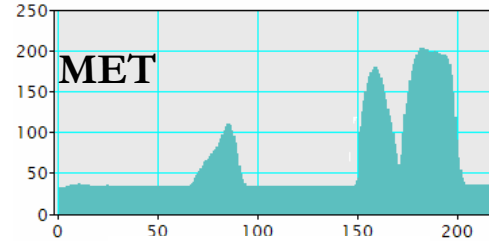
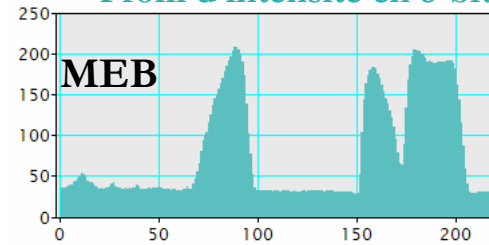
STEM en MEB    STEM HAADF en MET



MET conventionnel



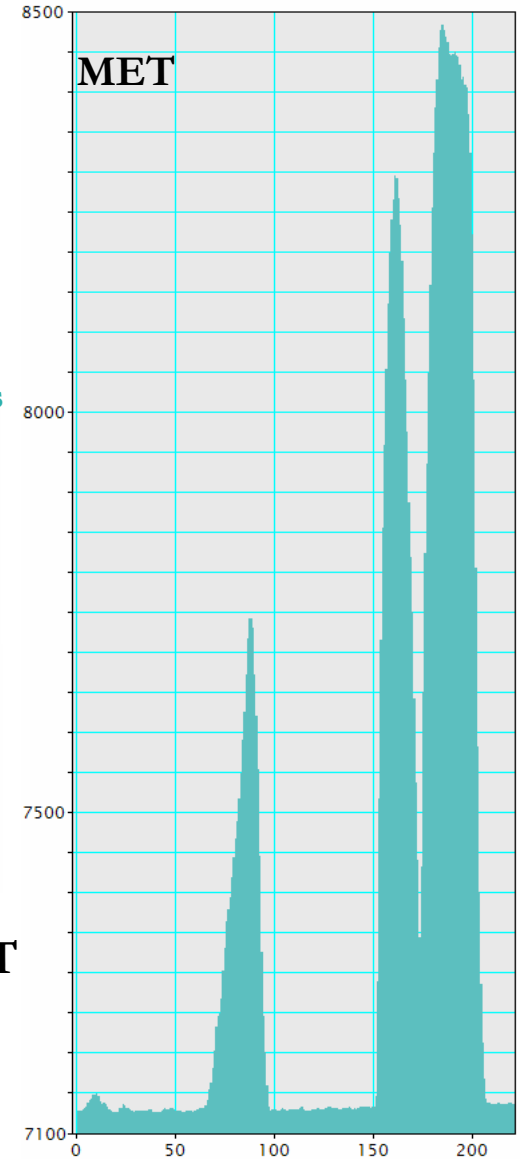
Profil d'intensité en 8-bits



STEM HAADF en MET



Profil d'intensité en 16-bits



# Tomographie en ESEM en transmission

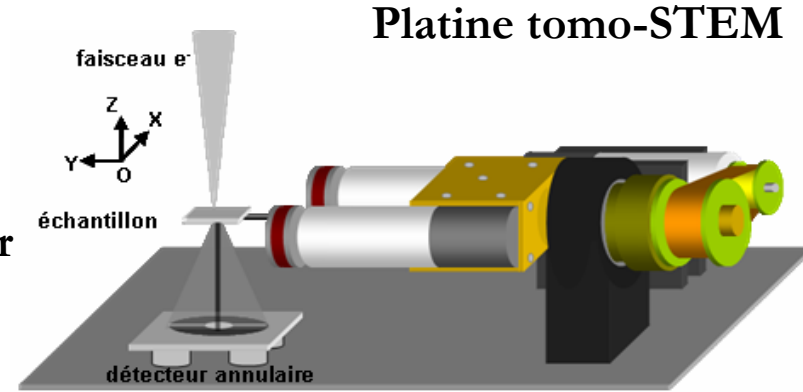
## □ Principe et développements



ESEM  
XL30 FEG 30 kV



- ✓ *ESEM*: échantillons non conducteurs, grande chambre
- ✓ *STEM*: contrastes importants, bonne résolution, grande épaisseur traversée, information de volume



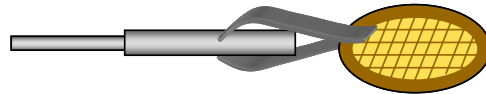
Moteurs pas à pas

## 2 géométries d'échantillons

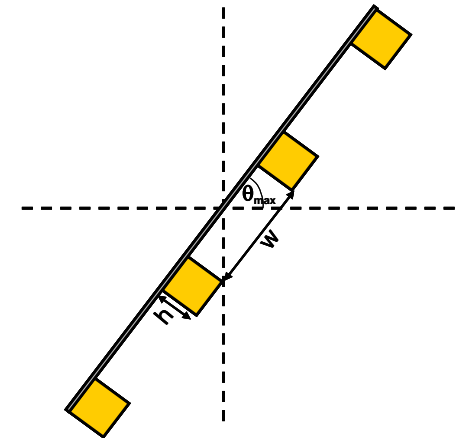
✓ pointe



✓ grille MET



Tilt limité



Tilt limité (autour 70°)

*P. Jornsano, thèse MATEIS 2008*

*P. Jornsano et al., Ultramicroscopy 2011*

# Tomographie en ESEM en transmission

Nanofils de SiC, de 130-150 nm de diamètre

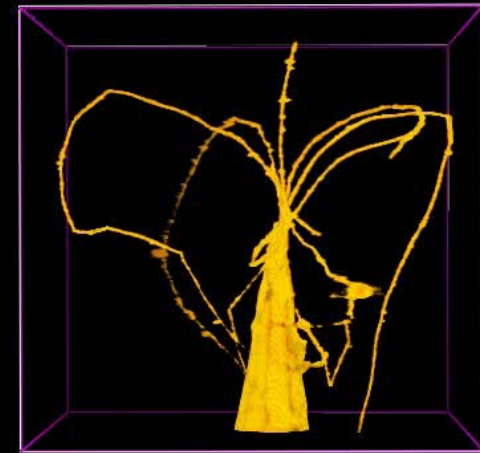


Projections:  $-90^{\circ}$  à  $+180^{\circ}$  par pas de  $2^{\circ}$  (résolution  $\sim 20$  nm)

Volume reconstruit :  $\sim 50 \times 40 \times 40 \mu\text{m}^3$



Série alignée (ImageJ)



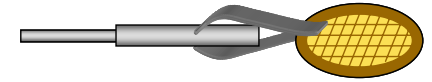
Visualisation (Chimera) après reconstruction WBP ImageJ

*P. Jornsano, thèse MATEIS 2008*

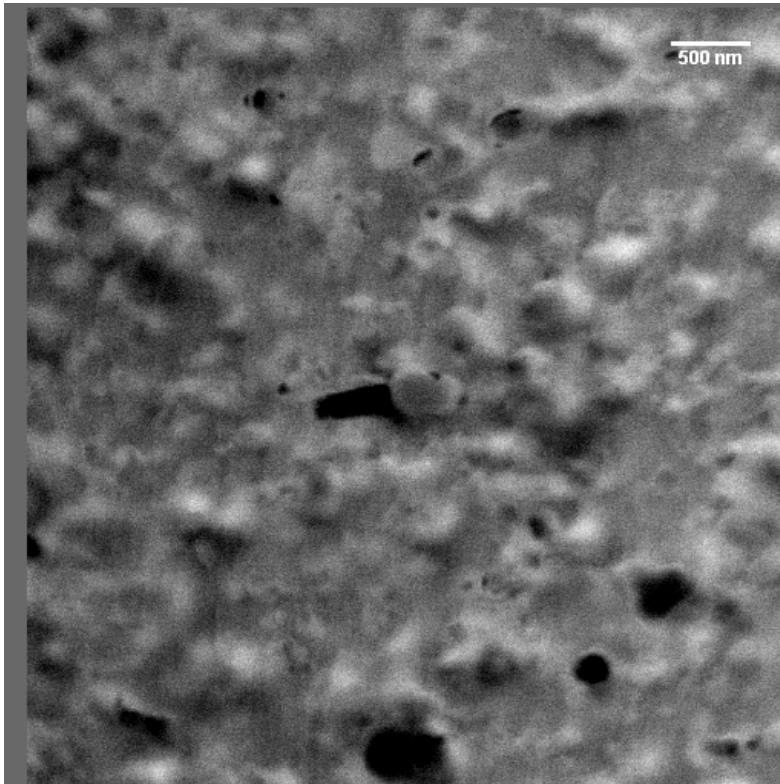
*P. Jornsano et al., Ultramicroscopy 2011*

# Tomographie en ESEM en transmission

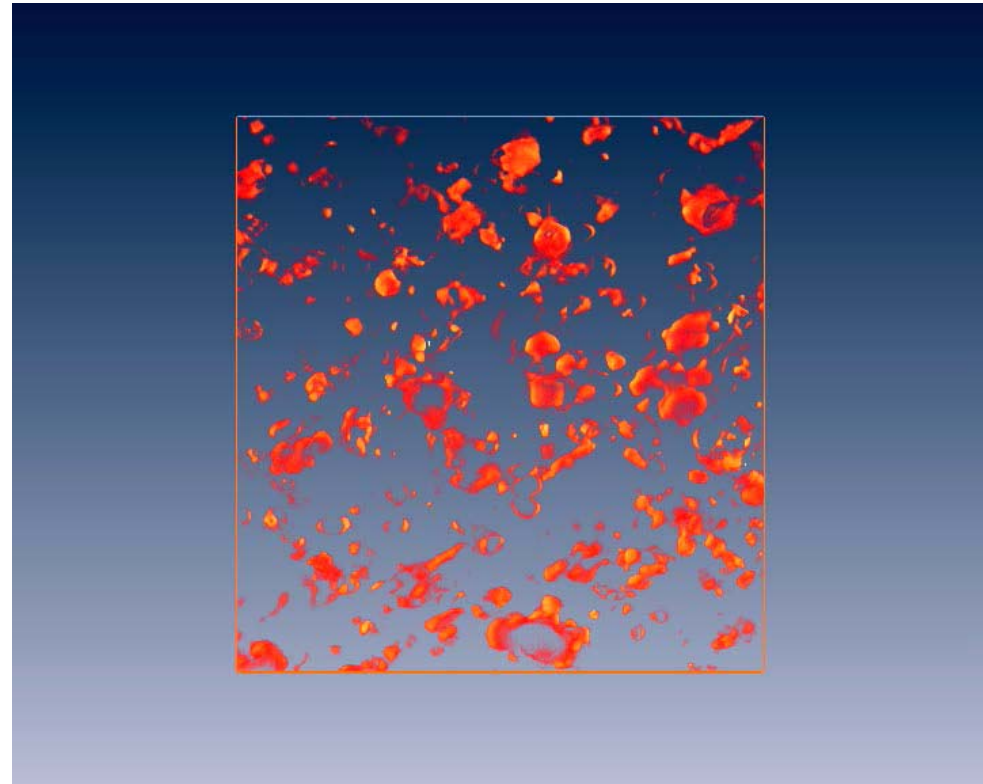
Matrice PVC contenant des charges minérales ( $\text{CaCO}_3$  et  $\text{TiO}_2$ )  
et des modifiants choc, coupe 500 nm



Gamme de tilt:  $+67^\circ/-67^\circ$ , pas de  $1^\circ$



Série d'images STEM alignées (ImageJ)

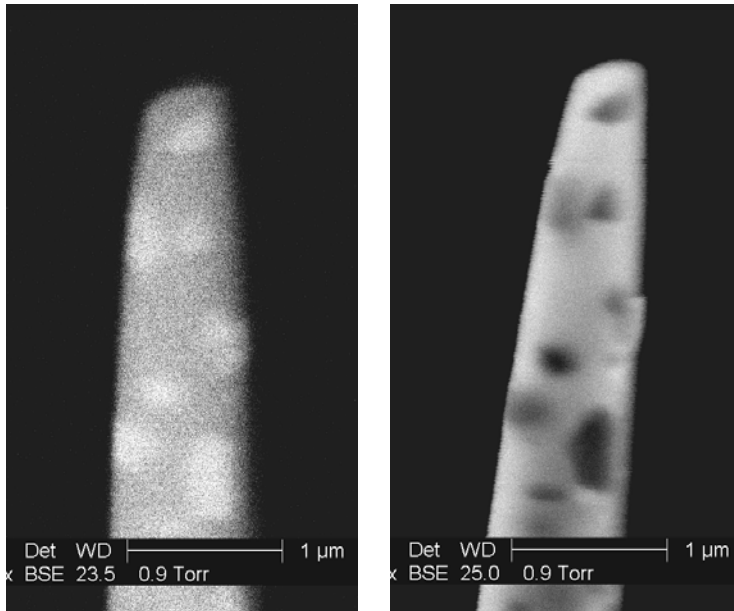


Visualisation (Amira)

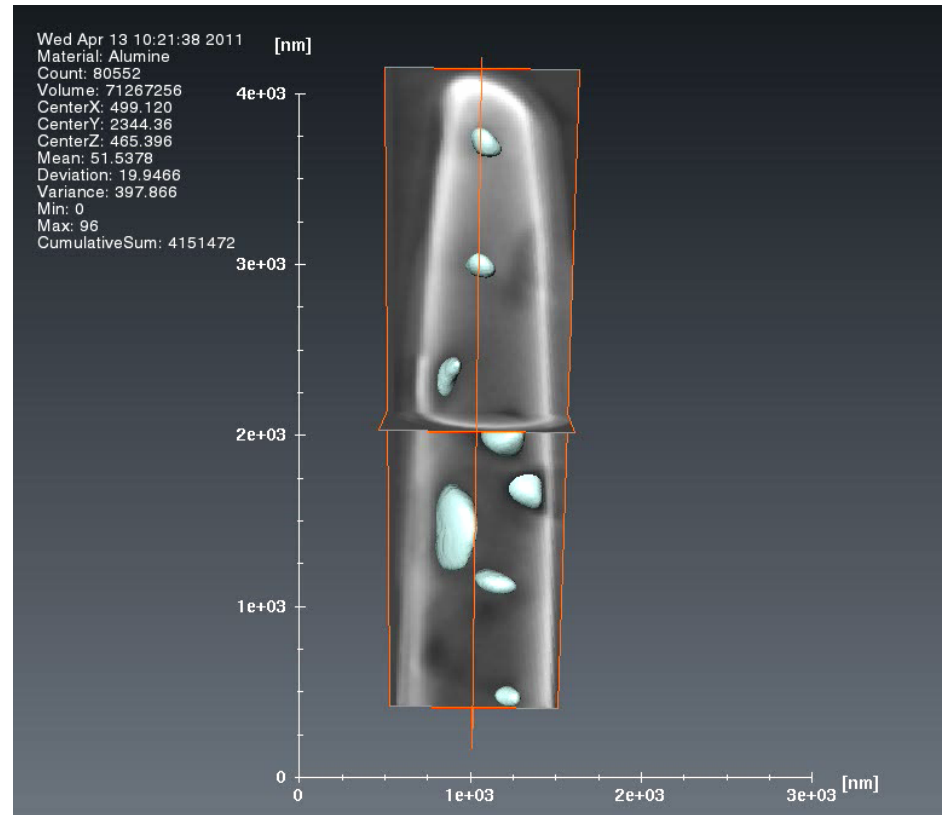
# Tomographie en ESEM en transmission

Pointe en alumine/zircone préparée par FIB (*T. Douillard, MATEIS*)

Gamme de tilt:  $-90^\circ/+90^\circ$ , pas de  $1^\circ$



Images BSE (gauche) et image STEM (droite), définition standard

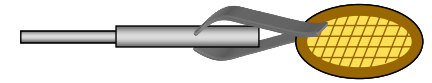


Visualisation (Avizo après reconstruction SIRT 10 it. avec Digital Micrograph), résolution  $\sim 40$  nm

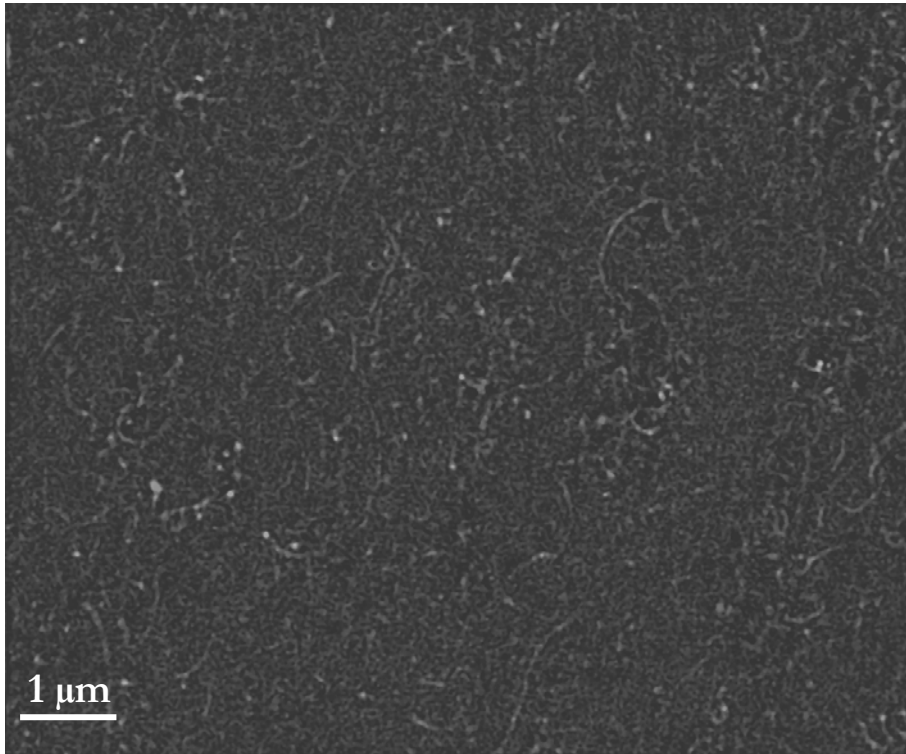
Echantillon:

*J. Chevalier et L. Gremillard, MATEIS*

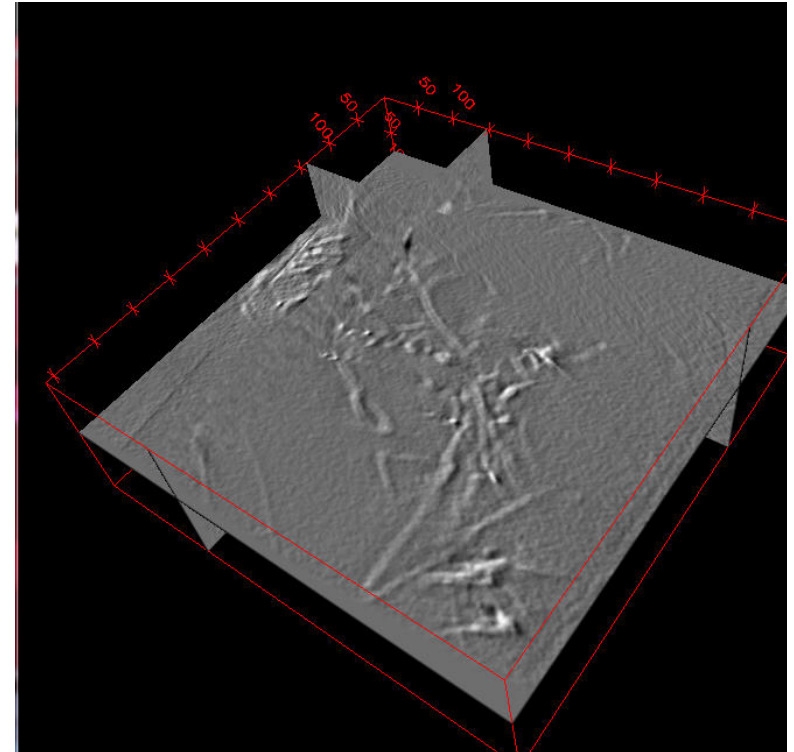
# Tomographie en ESEM en transmission



Nanocomposites P(S-ABu)/MWCNT préparé par lyophilisation + pressage à chaud



Série d'images réalisées à  $\pm 62^\circ$  en mode STEM, alignées avec ImageJ

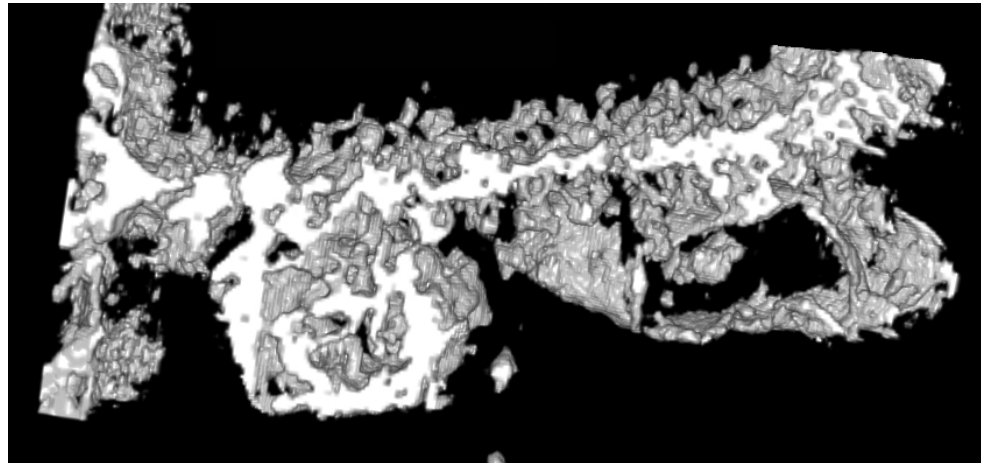
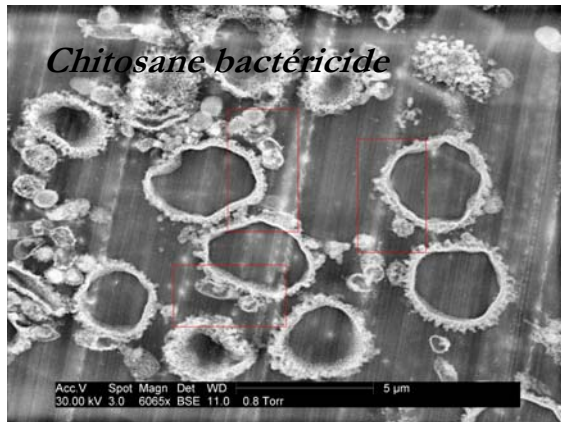
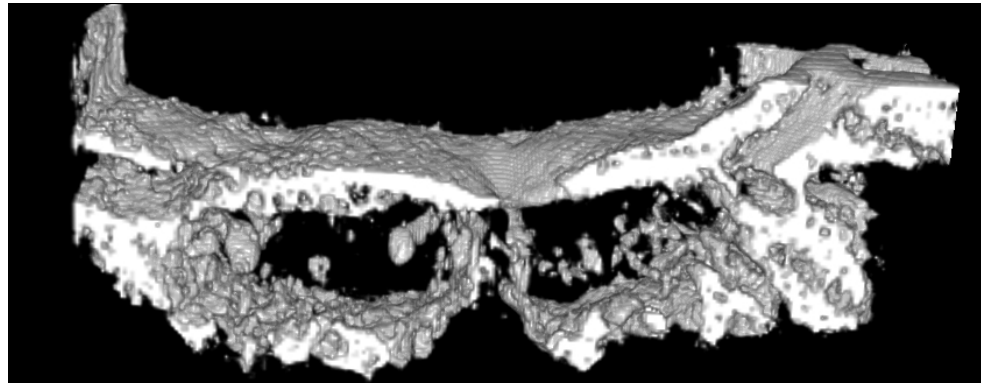
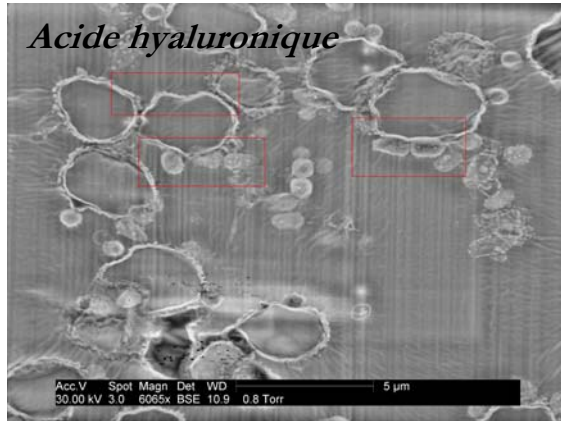


Tomogramme en vue « orthoslice » de la série présentée à gauche (Fiji)

# Tomographie en ESEM en transmission

Contact micro-capsules polymères/bactéries E. Coli

Coupes de 650 nm, série tiltée de  $-62,5^\circ$  à  $+62,5^\circ$  par pas de  $2^\circ$  (Saxton), images XHD, grand. 6k

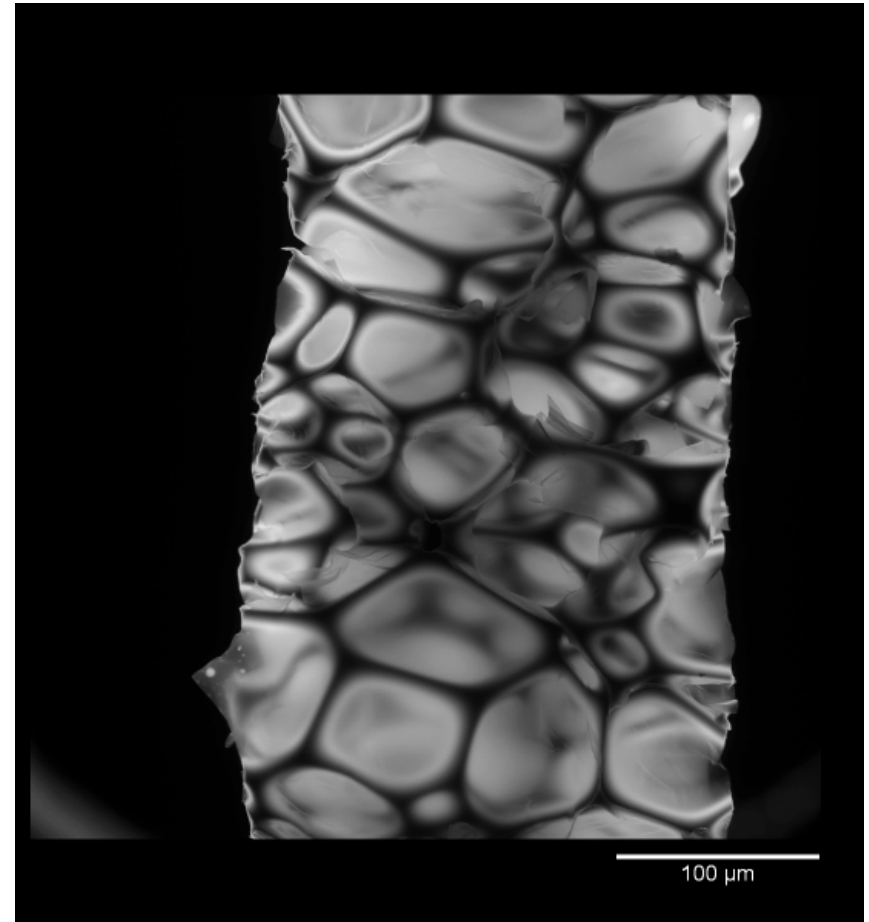


Alignement + reconstruction SIRT 50 it. (Digital Micrograph), visualisation Fiji, résolution  $\sim 15$  nm

# Tomographie de surface en MEB

Visualisation d'échantillons massifs:  
mousse de polyuréthane de  
section  $400 \times 400 \mu\text{m}^2$  (transmission  
partielle)

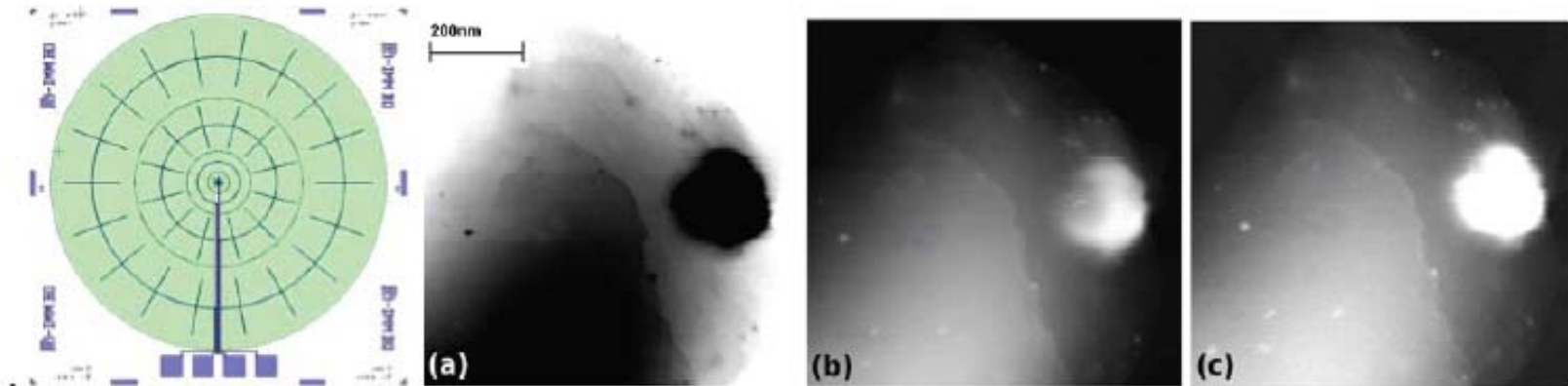
- Cellules fermées : Échantillon avec des zones très fines (parois) et des zones épaisses (barreaux)
- Information manquantes dans les zones épaisses: non adapté à la reconstruction tomographique
- Informations sur la structure 3D des cellules: restent accessibles avec l'observation de l'échantillon sur  $360^\circ$



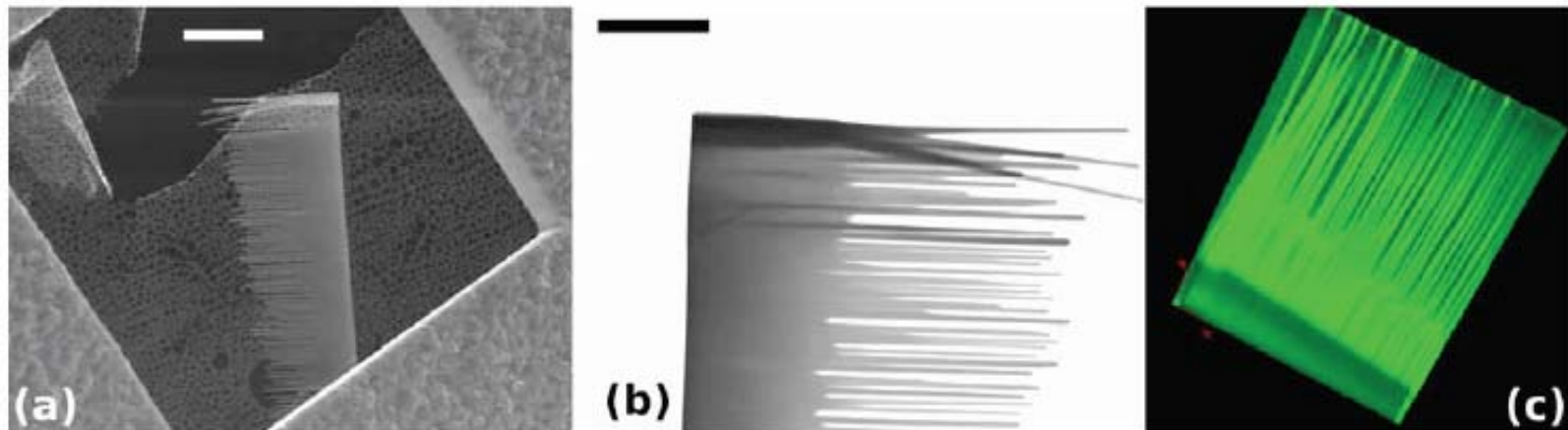
Série d'images réalisées en mode  
STEM, alignées avec ImageJ

# Tomographie en MEB en transmission

- MEB LEO 1525, série en utilisant l'axe de rotation de la platine



Détecteur STEM à quadrants, et images champ clair ou champ sombre de nanoparticules AuPd



a/ Image SE d'un nano-peigne de ZnO; b/ Ex. d'image STEM; c/ Visualisation TomoJ

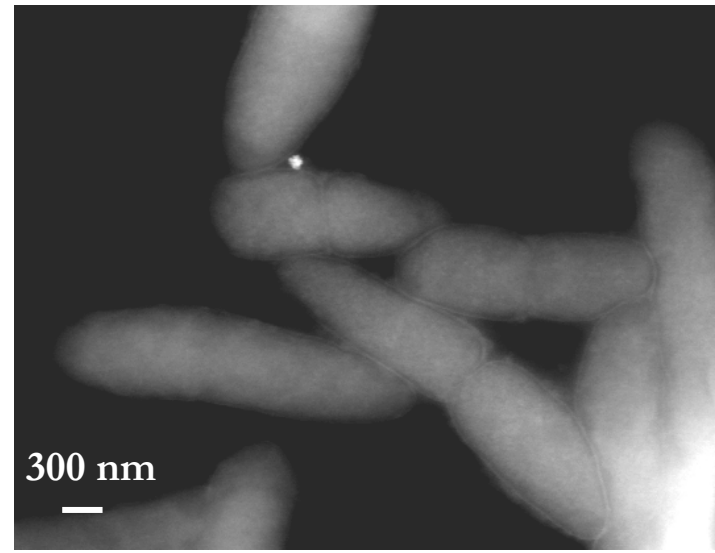
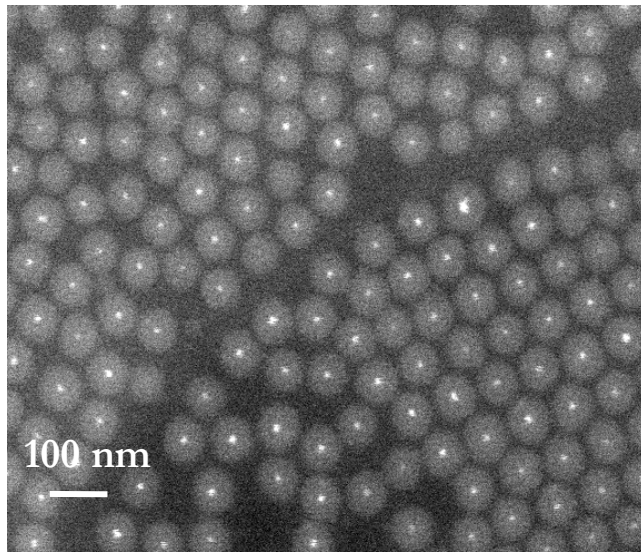
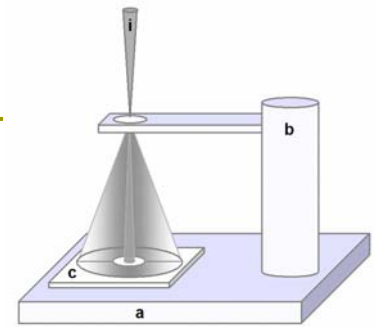
# Conclusions

---

- ❑ **Approches 3D en microscopie e-: échelle intermédiaire entre tomo X et sonde atomique**
- ❑ **Approches 3D en MEB nombreuses: FIB, ultramicrotome, stéréo, SE, STEM... ⇒ complètent encore la palette en terme d'échelle et de taille de volume reconstruit**
- ❑ **Tomographie tiltée en MEB en mode STEM: analogue à la tomo MET en STEM-HAADF mais: tension, contraste, épaisseur, résolution, mode environnemental...**
- ❑ **Les approches peuvent être couplées**
- ❑ **Chaque échantillon aura des caractéristiques qui le rendront adapté ou non à une des approches**
- ❑ **Un exemple, nanocomposite polymère/nanotubes:**
  - **Résolution adaptée en FIB/MEB et en STEM en MET et en MEB**
  - **Dégradation critique en STEM en MET (contraction)**
  - **Contraste non adapté en FIB/MEB, adapté en STEM en MEB**

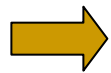
# Perspectives

- ESEM en mode hydraté: images de nanoparticules dans l'eau, et de bactéries hydratées en wet-STEM



Nanoparticules core-shell or-silice dans l'eau

Bactéries *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*



Platine tomo/wet-STEM

- Platine tomo-STEM nouvelle génération: moteurs piézo-inertiels

*A. Bogner et al., Ultramicroscopy 2005 et Micron 2007*

*A. Bogner, thèse MATEIS 2006*

# Remerciements

---

S. Benlekbir, T. Douillard, J. Ferreira, C. Gauthier, P. Jornsano, Y. Liu, A. Malchère, B. Mamdy, G. Thollet, B. Van de Moortèle

et au  pour l'accès aux 3 microscopes

MET  2010F 200 kV

ESEM  XL30 FEG 30 kV

Cross-beam  NVision40