



Centre Technologique  
des Microstructures



## Cartographies X des échantillons biologiques et polymères : précautions sur la préparation d'échantillon et les conditions d'acquisition

*Xavier Jaurand <sup>(1)</sup>, Meriem Ghanem <sup>(1)</sup>, Pierre Alcouffe <sup>(2)</sup>*

*<sup>(1)</sup>Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon 1*

*<sup>(2)</sup> Ingénierie des Matériaux Polymères, UMR 5223, Université Lyon 1*



## Mapping des échantillons biologiques

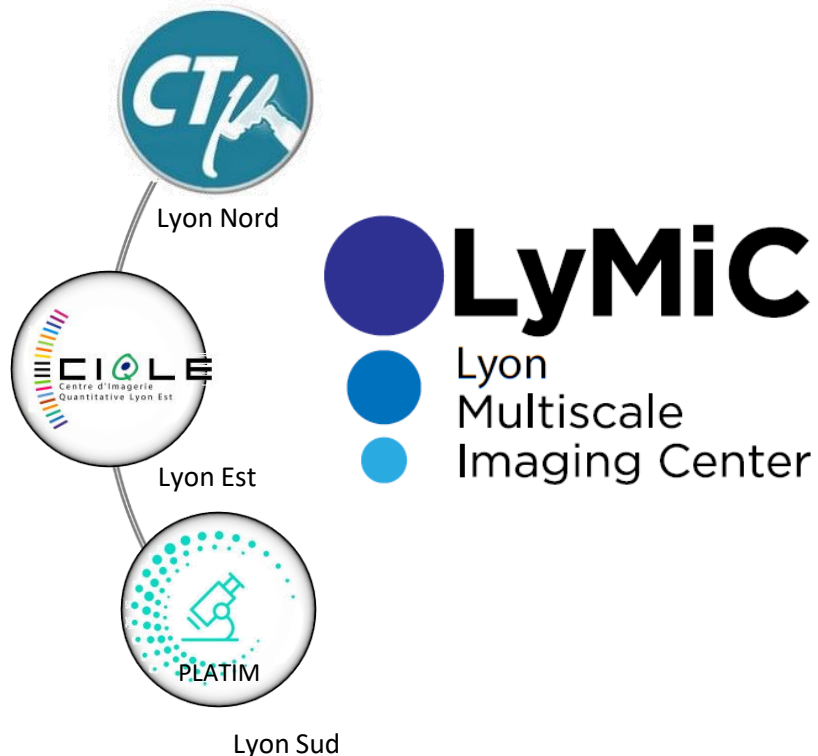
- Difficultés liées à la nature de l'échantillon et à la préparation d'échantillon
- Alternatives aux techniques « classiques »

## Mapping des polymères

- Préparation des échantillons
- Choix des paramètres d'acquisition

## PRESENTATION DU CT $\mu$

Plateforme de microscopie multidisciplinaire de l'Université Lyon1,  
Ouvverte à tous les laboratoires publics ou privés



<http://microscopies.univ-lyon1.fr/>

- Microscopie électronique
- Microscopie photonique
- Microscopie à force atomique





### Échantillons concernés :

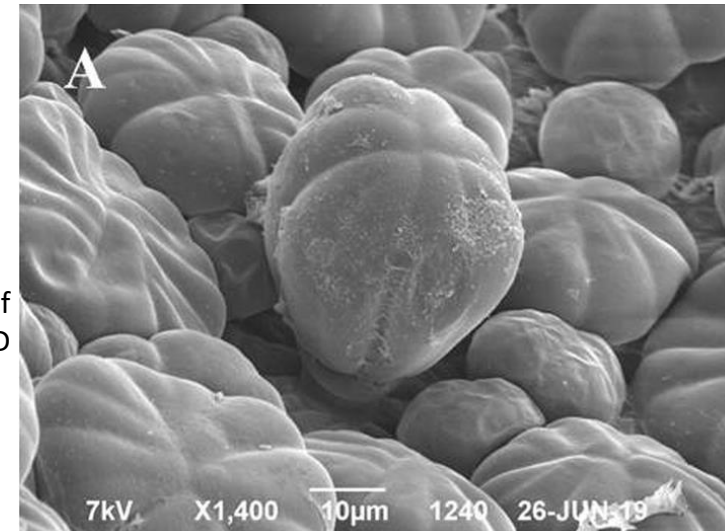
- Cellules en culture (en adhésion, en suspension)
- Tissus (animal, végétal)
- Petits insectes
- Champignons
- Virus
- ...

### Caractéristiques :

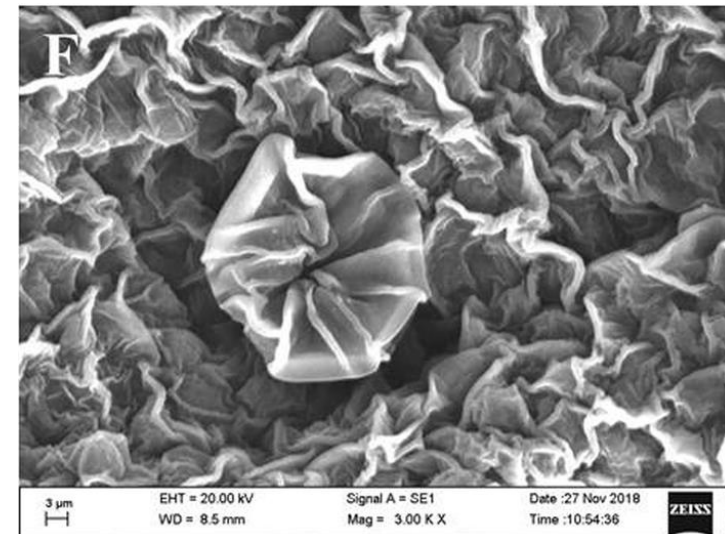
- Fortement hydraté
- Non conducteur
- Vivant

La préparation des échantillons a pour but  
**préserver les structures de l'état vivant**

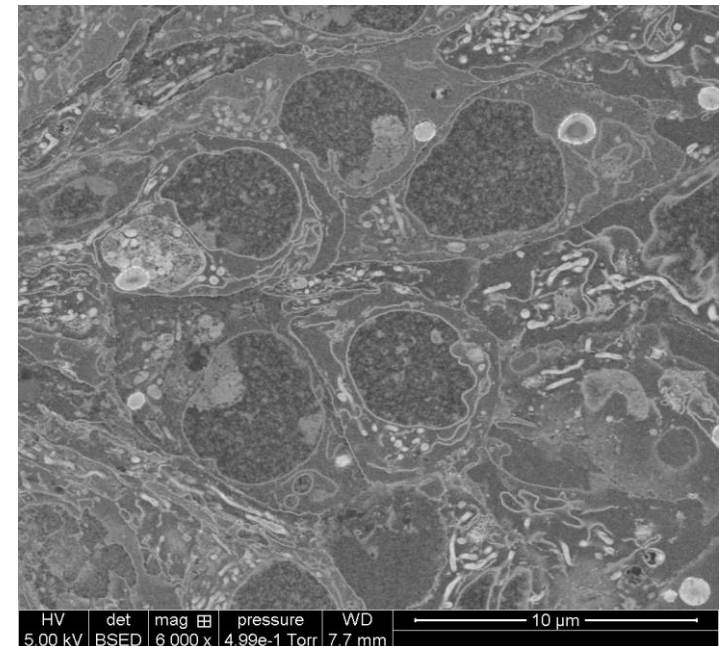
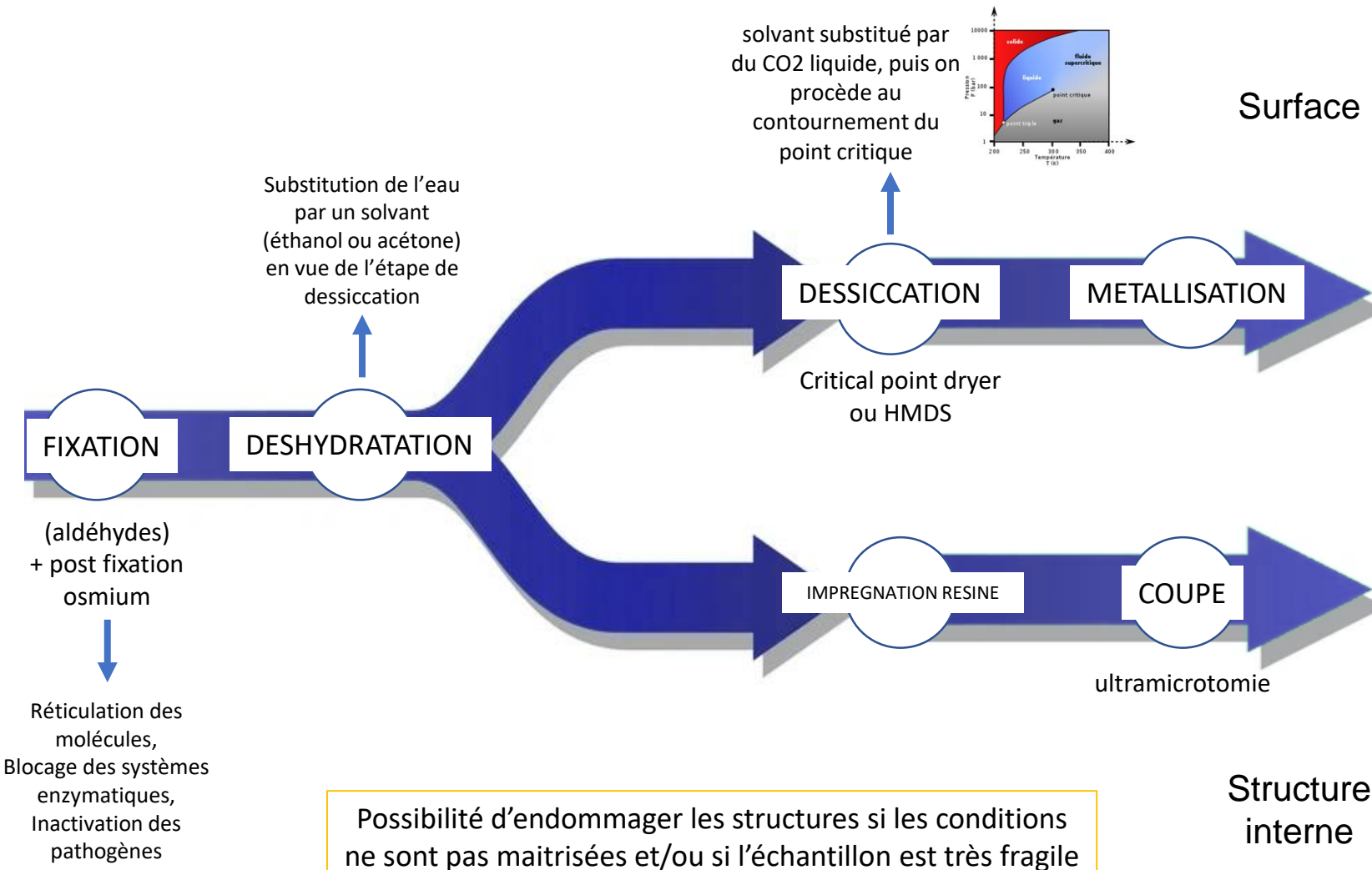
Millingtonia hortensis leaf  
surface after CPD



air drying



# LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES : préparation « classique »



## LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES : préparation « classique »

---

Principales difficultés pour l'EDS en bio :

### Problèmes liés à la nature des échantillons

- Les éléments chimiques présents dans les tissus (autres que C, N et O, comme Ca, K, S, P, Cl, Na... ) sont souvent en très faible concentration et en dessous de la limite de détection
- L'échantillon est « fragile » et tolère mal les fortes énergies et /ou forts courants

### Problèmes liés à la préparation

- Préparation d'échantillon : les différents bains ont tendance à « laver » le contenu cellulaire
  - fixation,
  - deshydratation,
  - dessiccation ou mise en résine

➔ les éléments chimiques peuvent être perdus ou déplacés

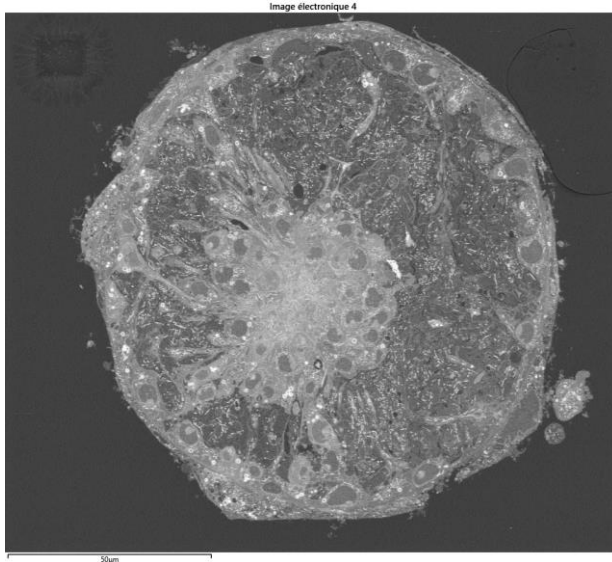
+ les ajouts de contrastants qui peuvent gêner la détection de certains éléments

➔ Overlap des pics S / Pb et P / Os)



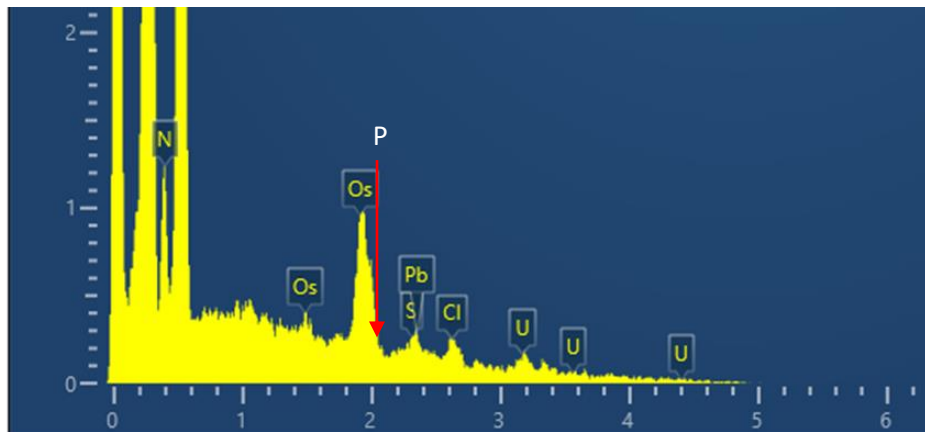
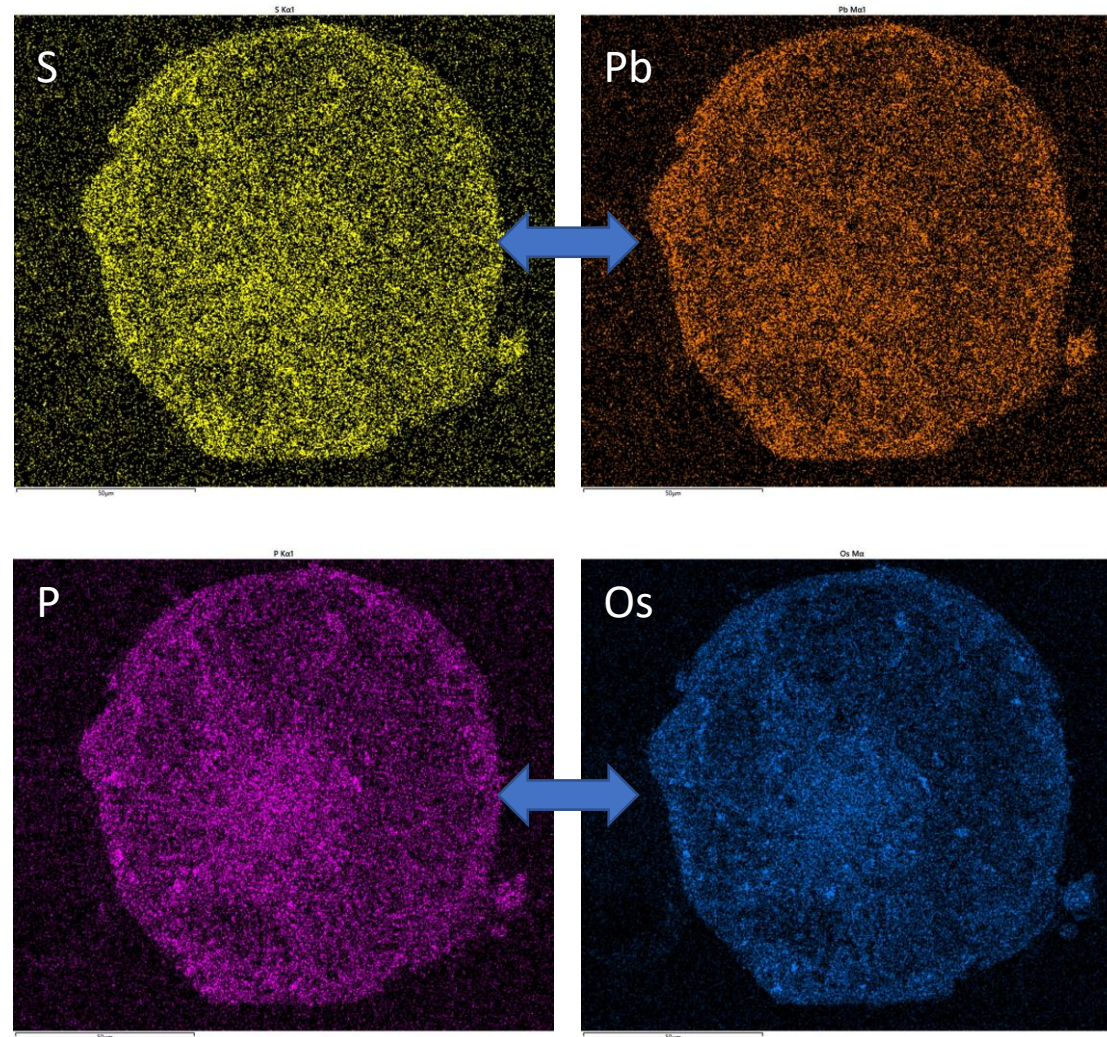
## LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES : préparation « classique »

Exemple sur testicule de drosophile



Prépara classique + contrastants (U, Pb, Os)

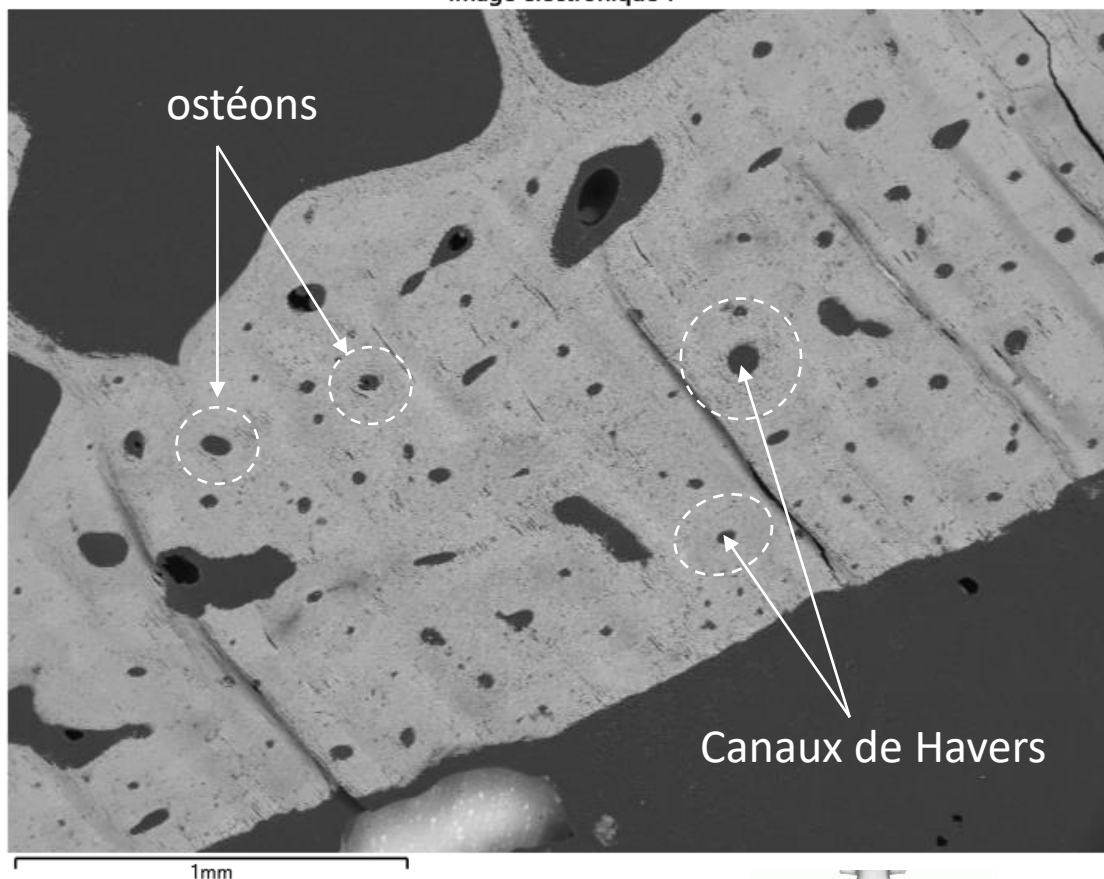
➔ Problème d'overlap S / Pb et P / Os



## LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES : préparation « classique »

### Cas « facile » des tissus minéralisés

Image électronique 1

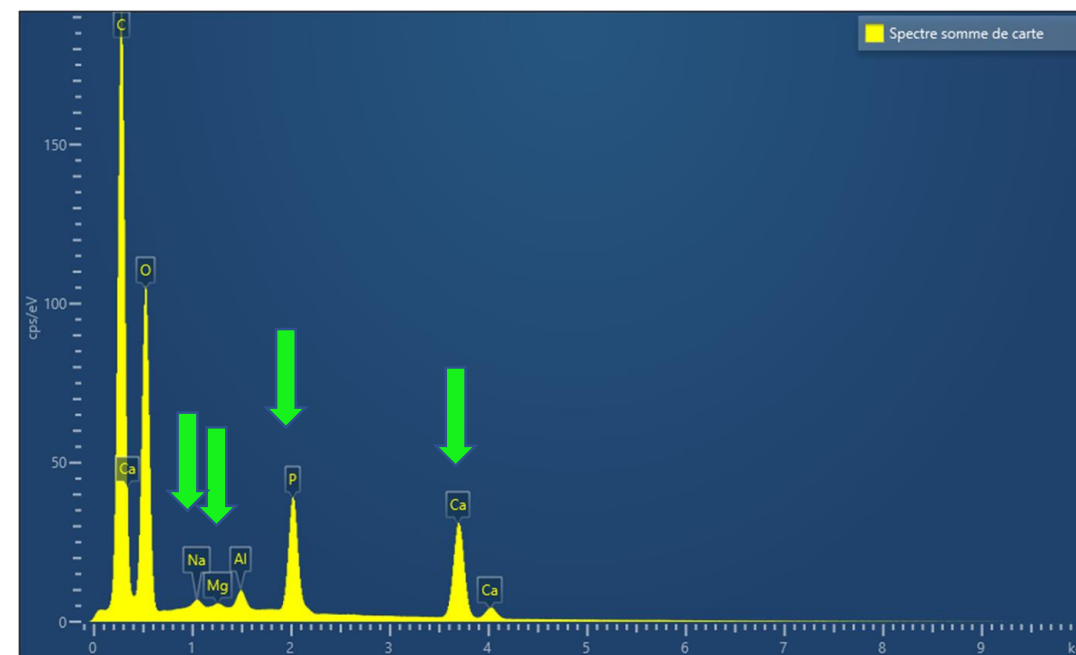


crête iliaque (paroi corticale)



fixed in alcohol, dehydrated in absolute alcohol, then embedded in methyl methacrylate without prior decalcification

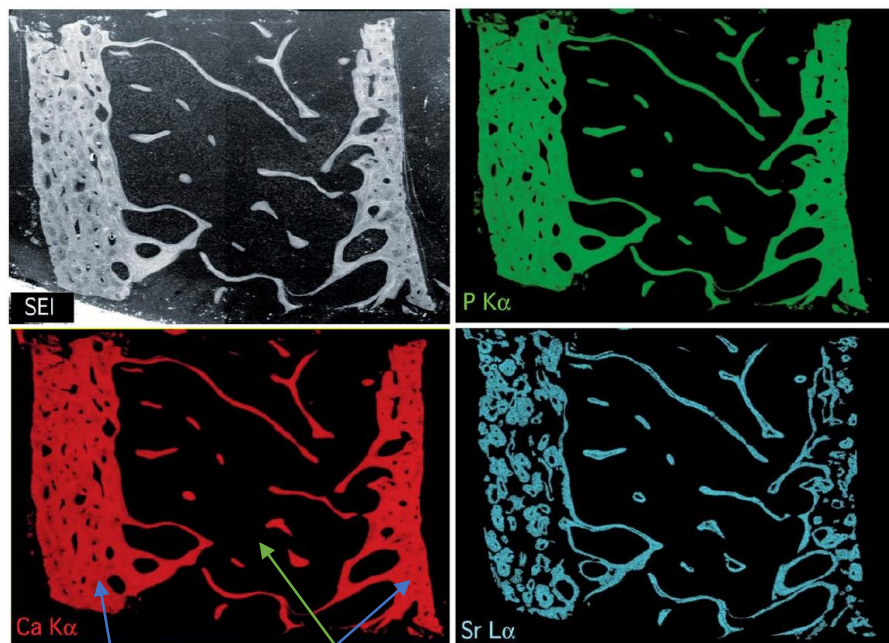
Pas besoin de contrastants





## Etude du mécanisme d'action d'un traitement anti-ostéoporotique

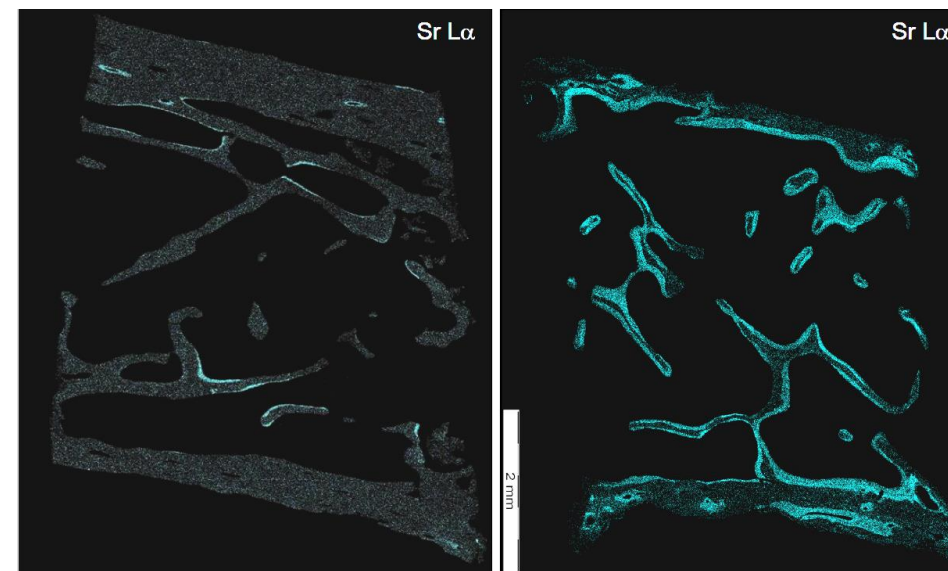
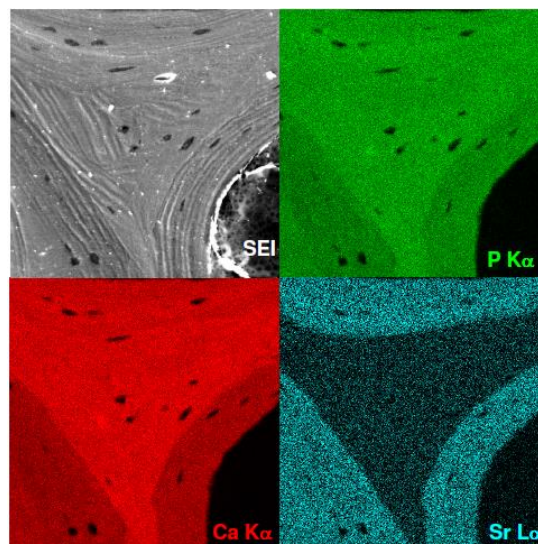
Après traitement de femmes ostéoporotiques par le ranelate de strontium :  
Cartographie du Sr dans des biopsies osseuses → mise en évidence des zones qui ont été actives pendant le traitement  
(ostéons dans l'os compact par exemple)



Os compact  
(paroi corticale)

os spongieux  
(zone trabéculaire)

Hypominéralisation des  
zones néo-formées

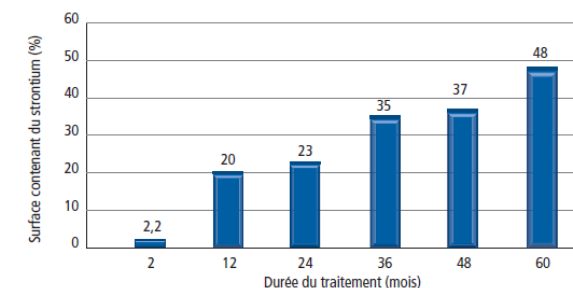


2 mois de traitement

36 mois de traitement

G. Boivin, et al. Osteoporosis International, Volume 21

Evolution des surfaces  
osseuses contenant  
du strontium dans  
l'os total



Alternatives pour modifier le moins possible l'échantillon en limitant les étapes de préparation tout en préservant la structure

- Cryo-SEM
- ESEM (mode environnemental)

### CONGELATION RAPIDE

~~Chemical fixation~~  
Physical Fixation



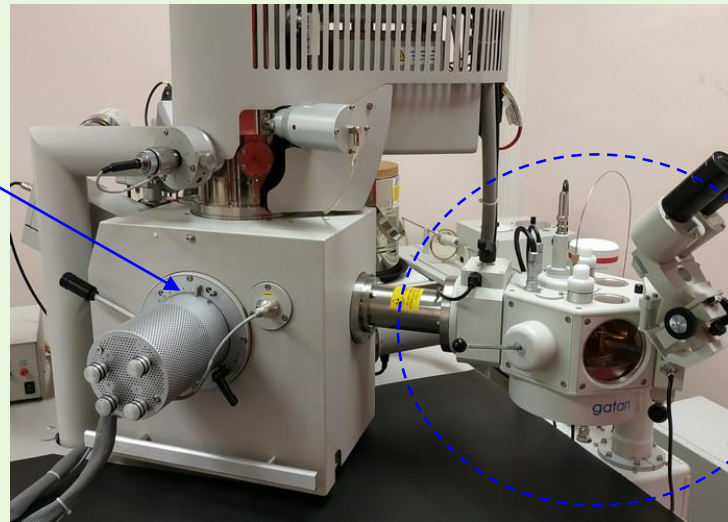
préservation des structures dans leur état natif



### OBSERVATION

#### Cryo SEM

Chambre principale  
avec platine refroidie  
à -140°C



Chambre de cryo-transfert



## CRYO-SEM

1

- Congélation de l'échantillon

2

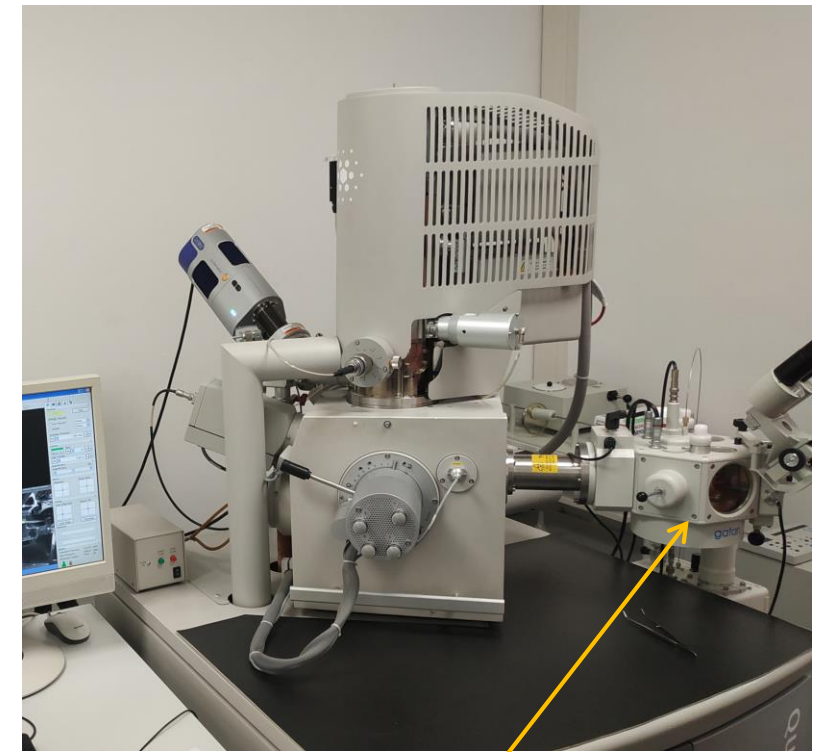
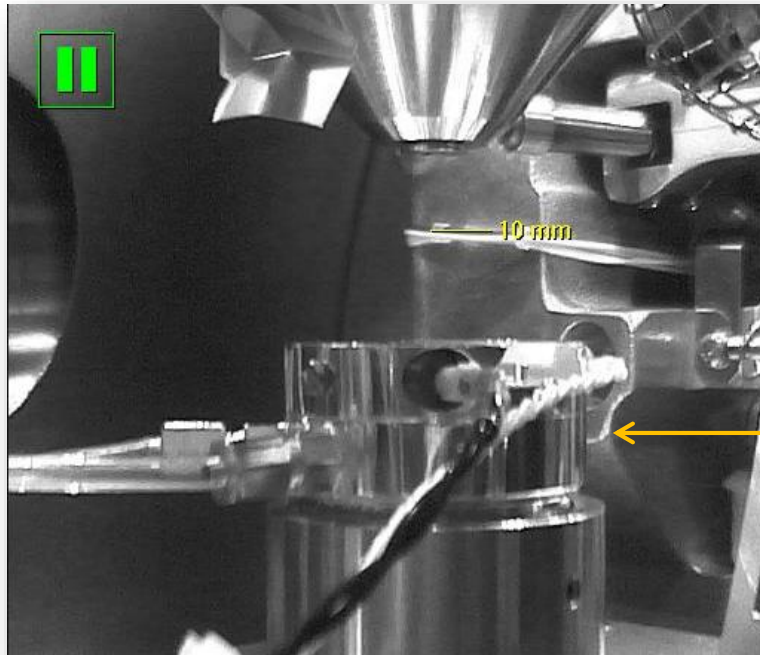
- L'échantillon est maintenu à basse température dans la chambre de préparation.
- Il est fracturé à l'aide d'un couteau

3

- L'échantillon peut être métallisé à froid

4

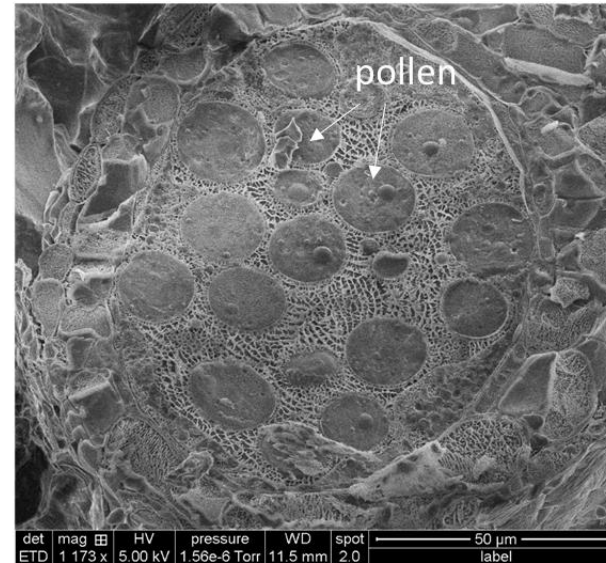
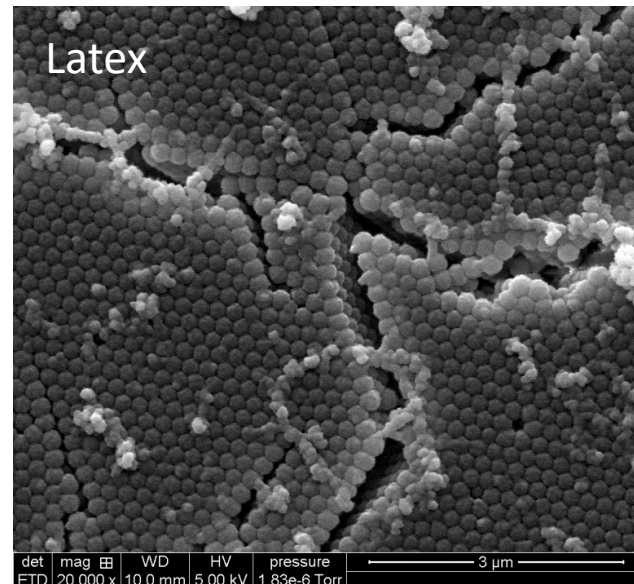
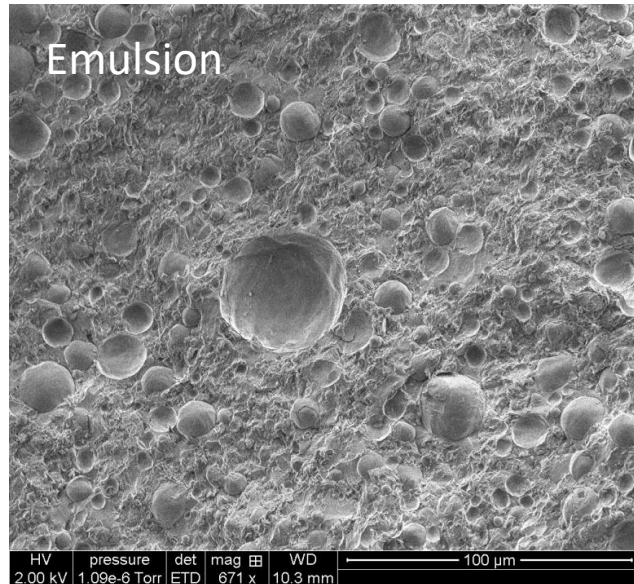
- L'échantillon est transféré sur une platine refroidie dans la chambre du MEB pour les observations.



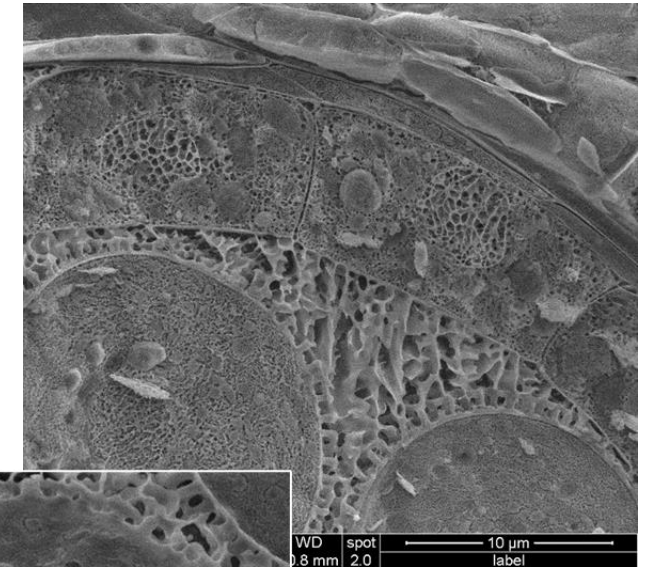
Chambre de cryo-transfert

Platine refroidie (jusqu'à -160°C)

## CRYO-SEM (imagerie)

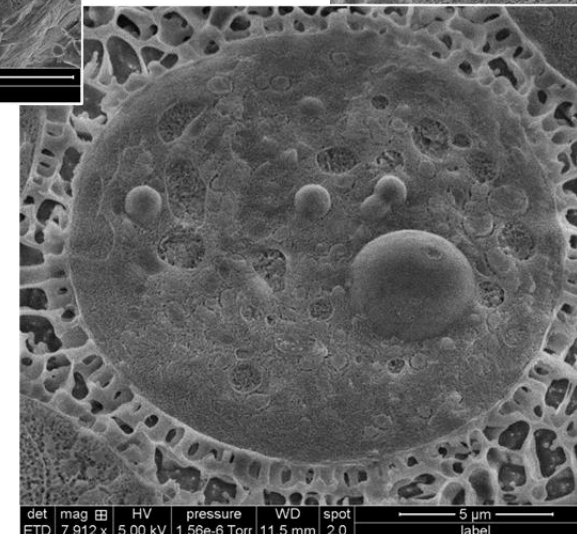
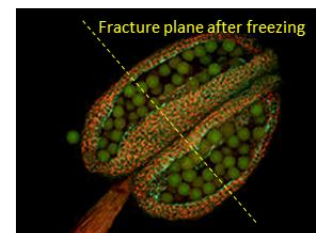


T = -140°C

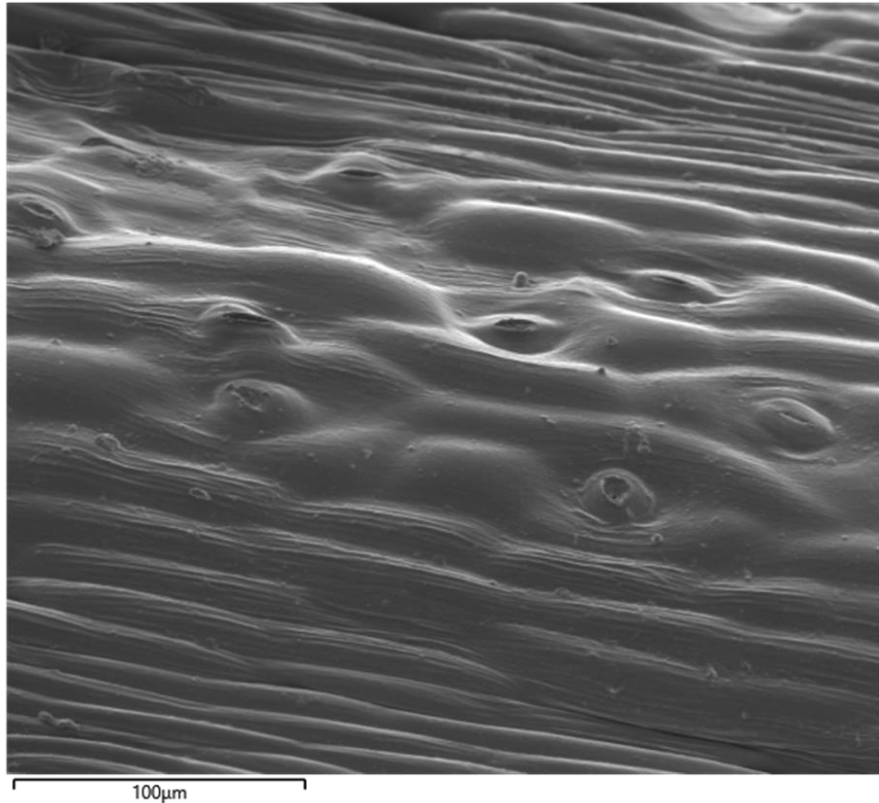


Anther of *Arabidopsis thaliana*

Image courtesy of Jekaterina Truskina, RDP, ENS Lyon.



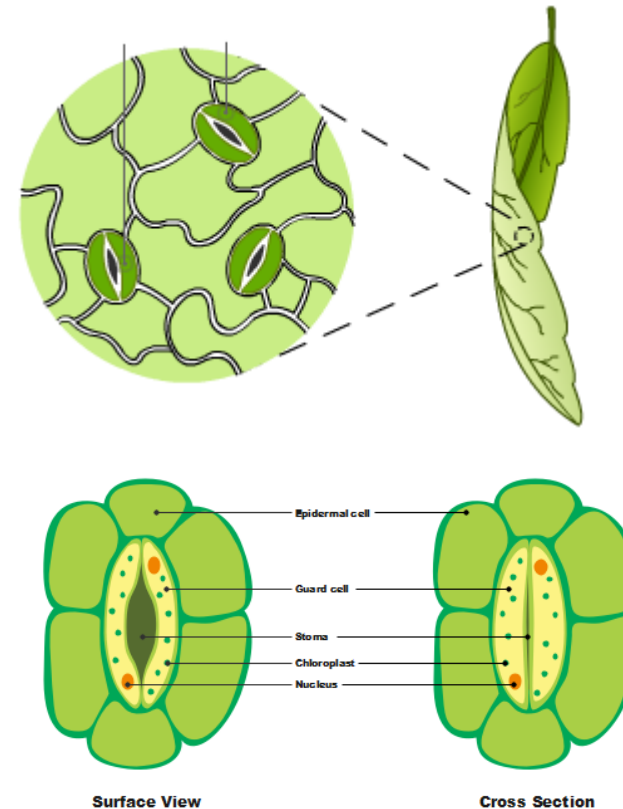




Cryo SEM  
5 kV, T=-140°C

### Analyse EDS de stomates

- orifice présent dans l'épiderme des organes aériens des plantes (feuilles, tiges...).
- permet les échanges gazeux entre la plante et l'air ambiant (H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>)





CRYO 5 kV

Image électronique 2

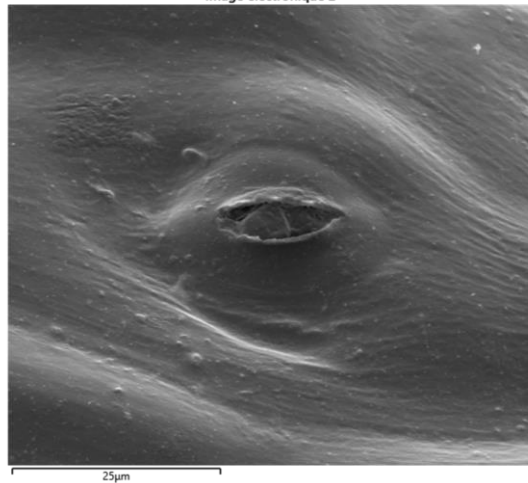
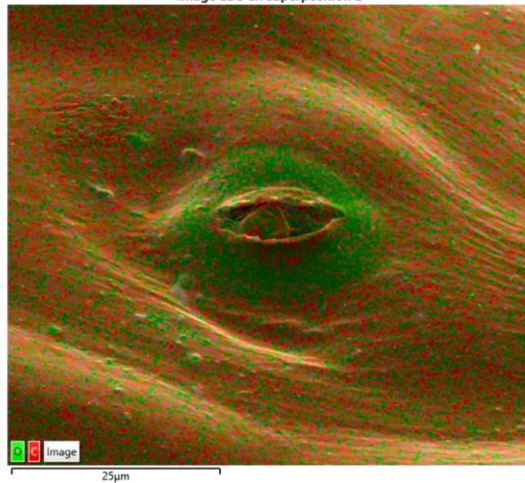
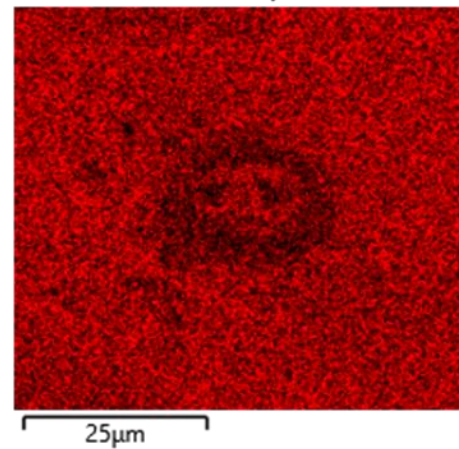


Image EDS en superposition 2



C K $\alpha$ 1,2



O K $\alpha$ 1

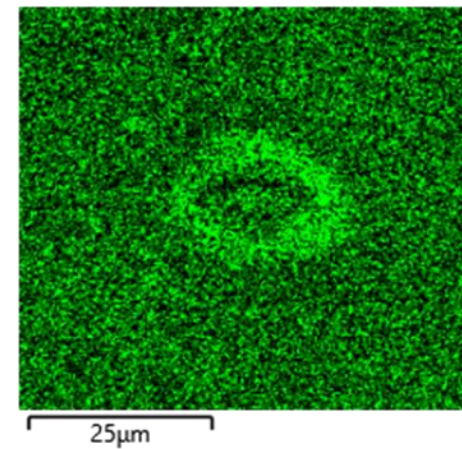


Image électronique 5

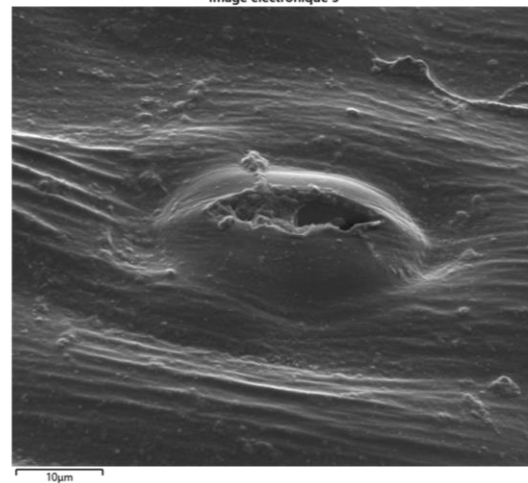
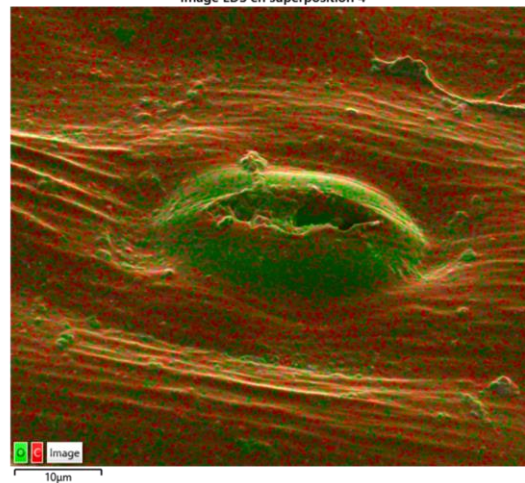
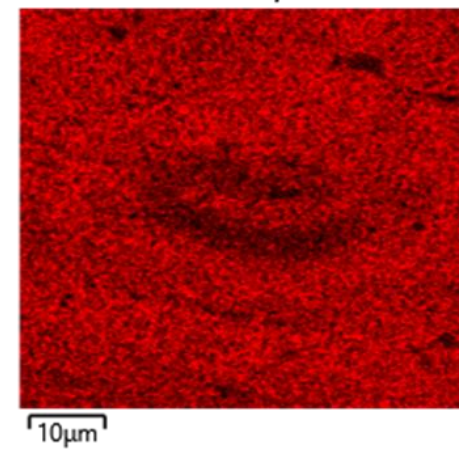


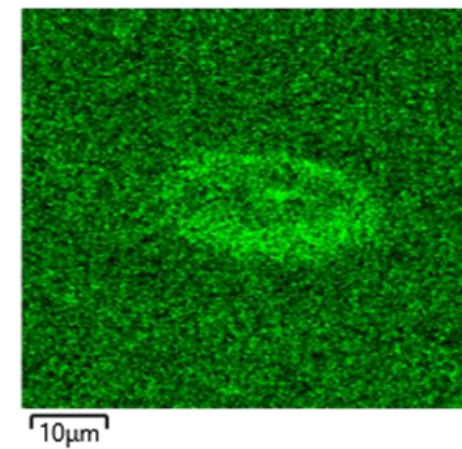
Image EDS en superposition 4



C K $\alpha$ 1,2



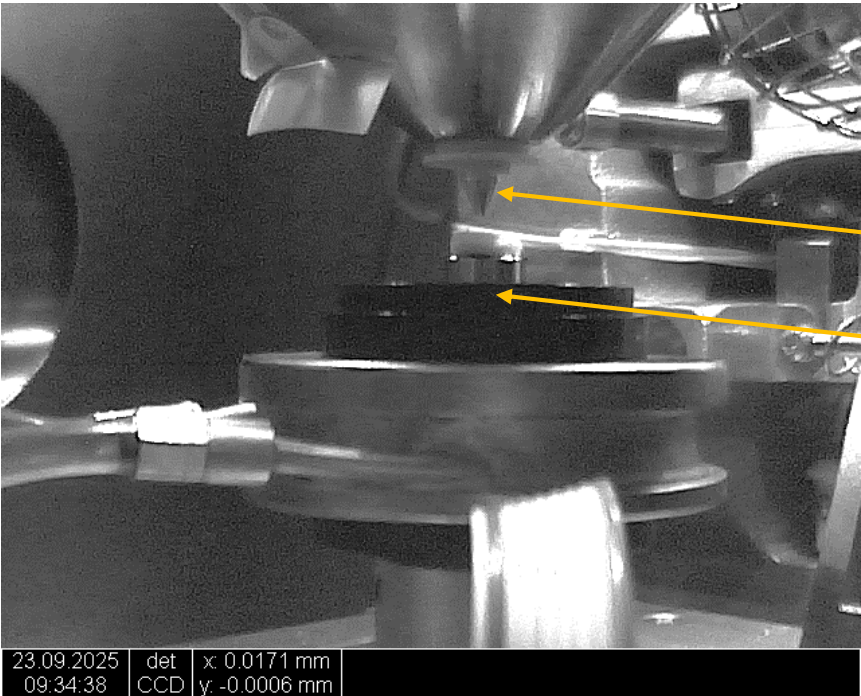
O K $\alpha$ 1





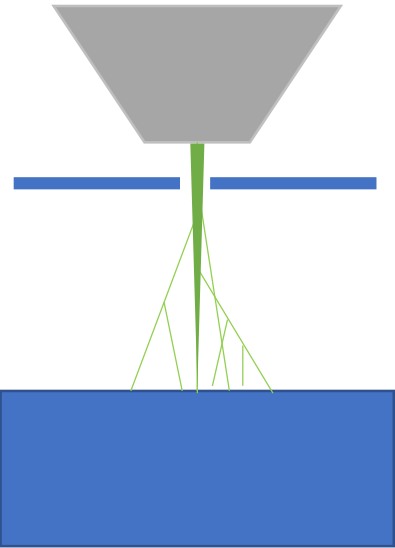
# ESEM (mode environnemental)

Pression H2O, quelques mbar

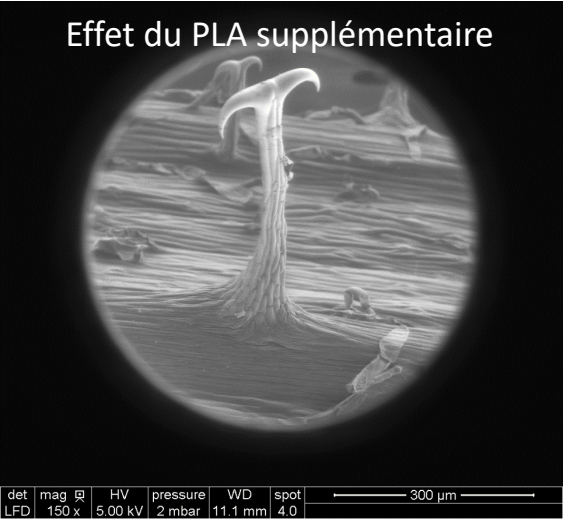
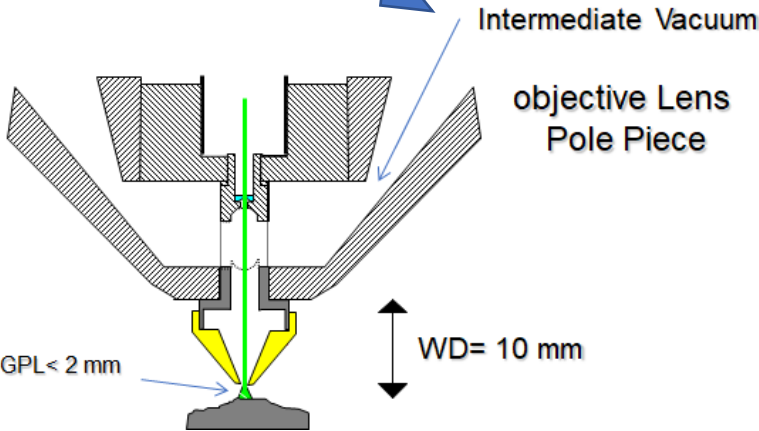


Cône + PLA  
Platine Peltier

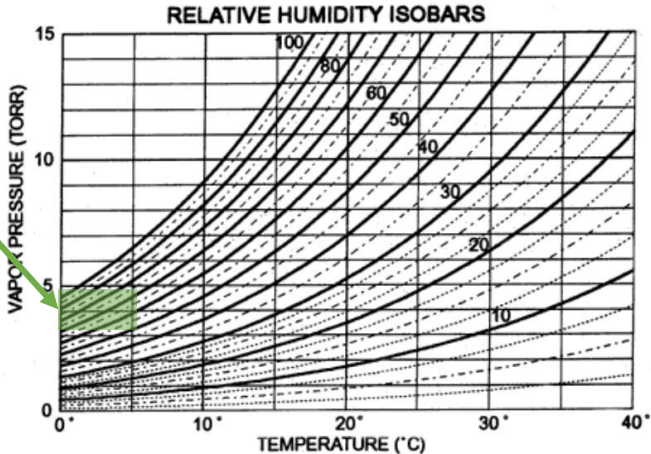
Phénomène de «skirt» lié au gaz



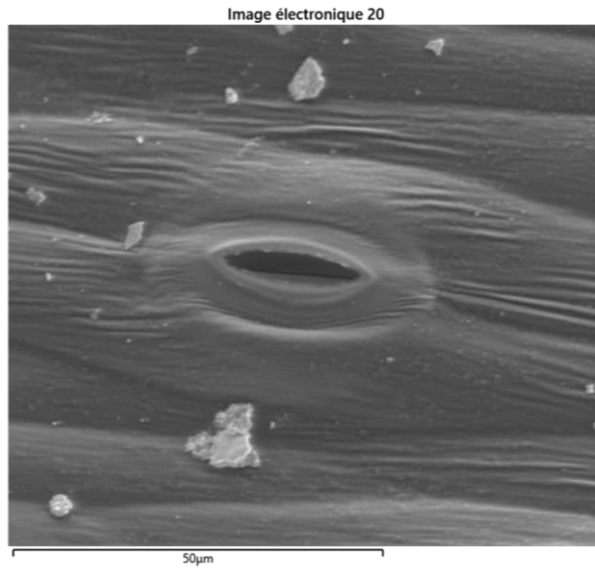
Pour l'EDS : perte du caractère « local » de l'analyse, beaucoup de signal provient des zones environnantes



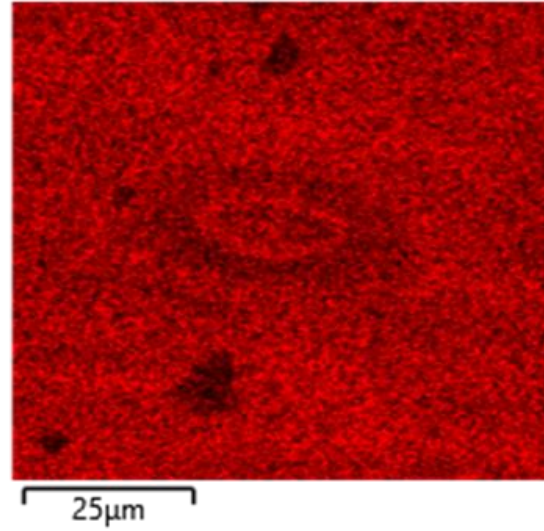
Taux d'humidité relative élevé



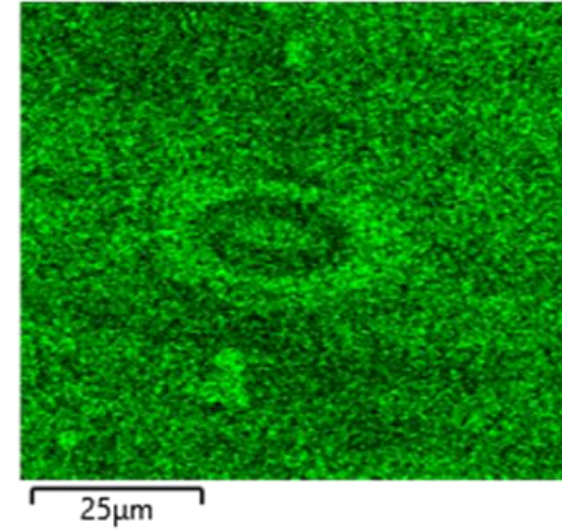
5 kV, 2 mbar (H<sub>2</sub>O) , T=2,5°C



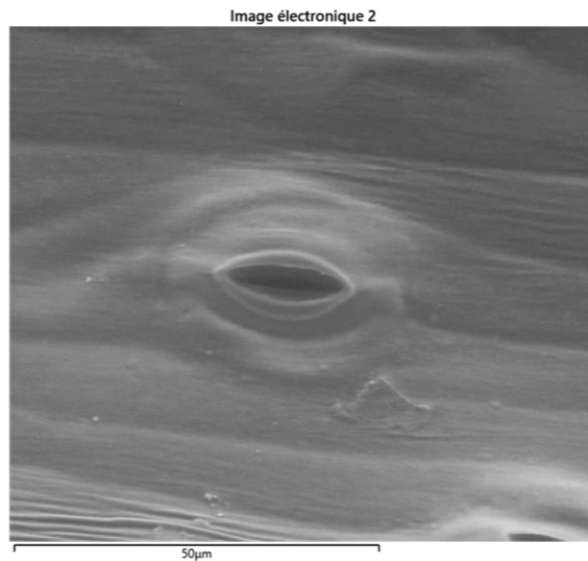
C K $\alpha$ 1,2



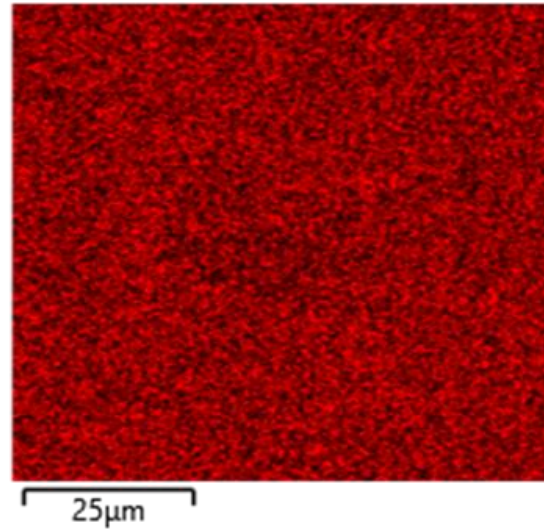
O K $\alpha$ 1



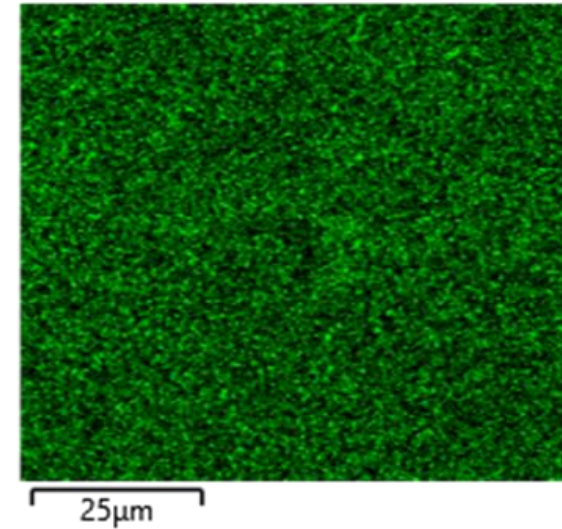
5 kV, 4,5 mbar (H<sub>2</sub>O) , T=3,5°C



C K $\alpha$ 1,2



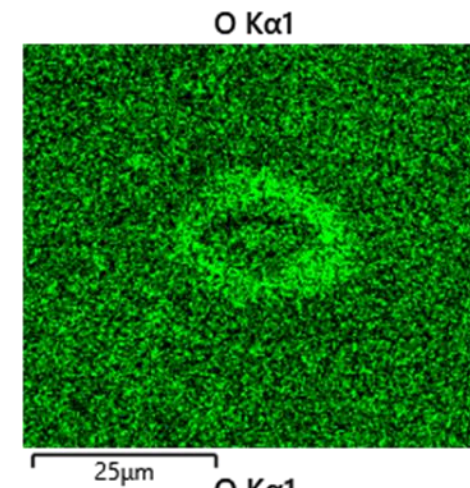
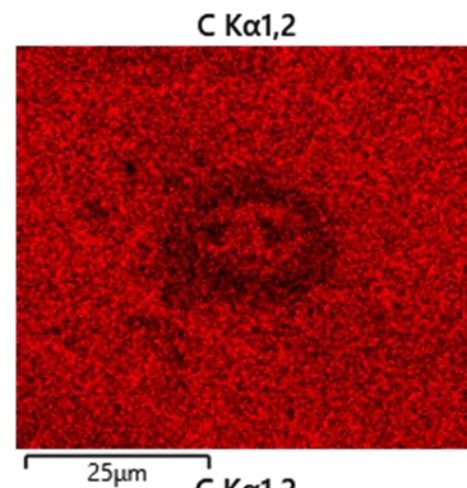
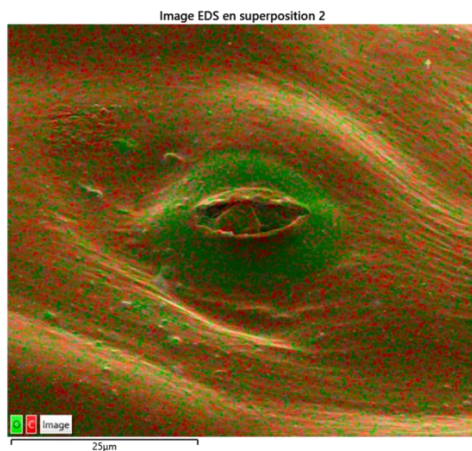
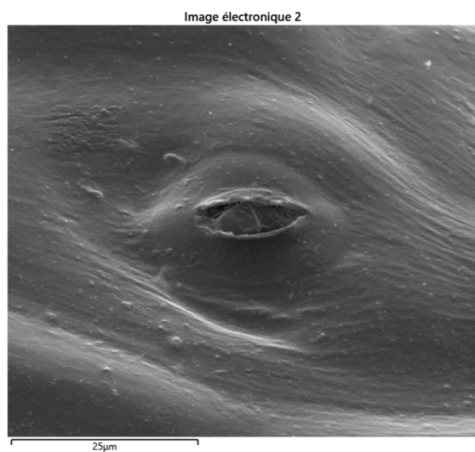
O K $\alpha$ 1



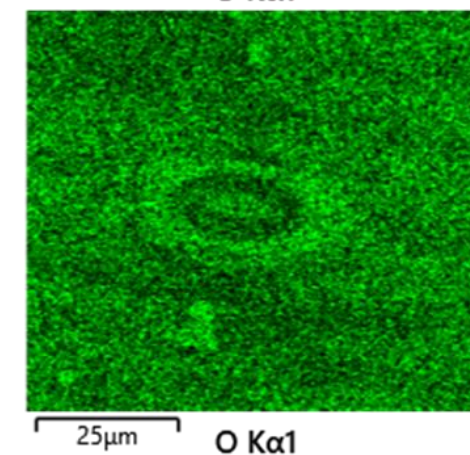
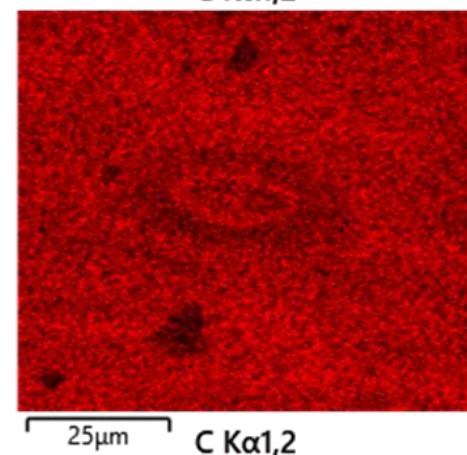
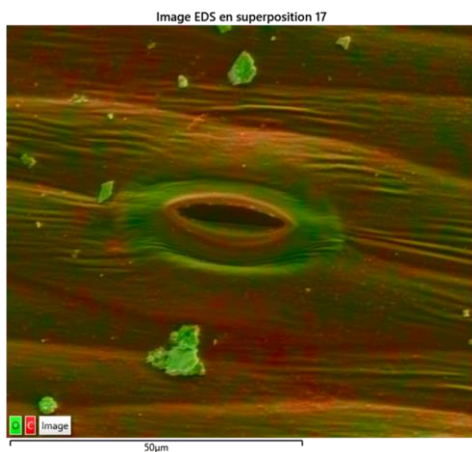
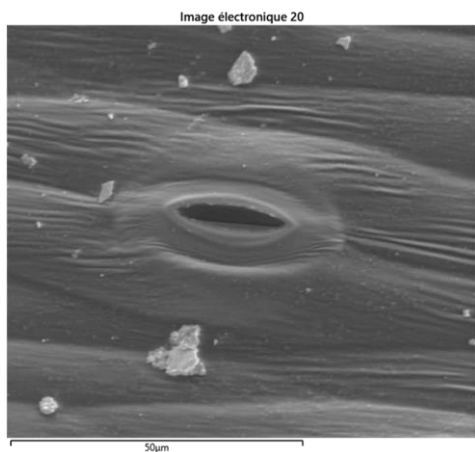
Trop de diffusion du faisceau dans le gaz → trop de signal parasite



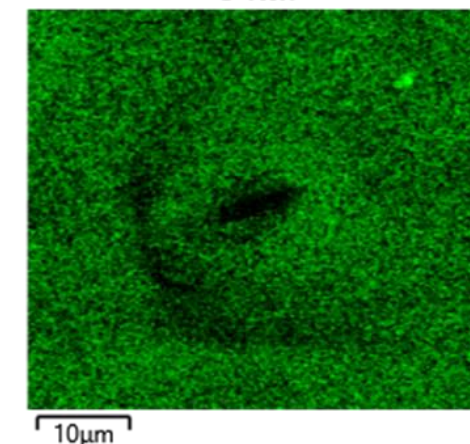
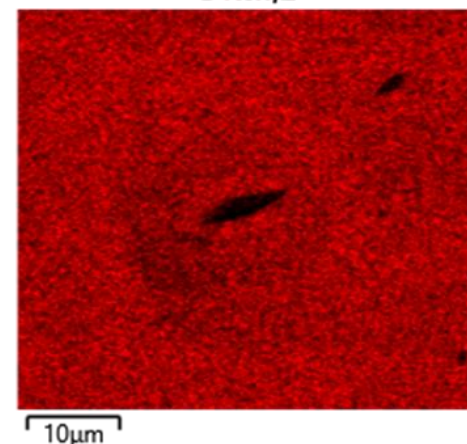
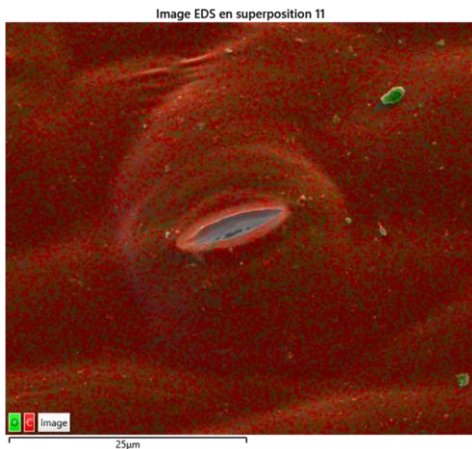
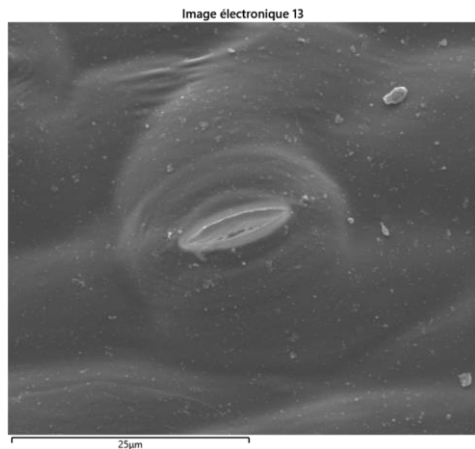
cryoSEM



ESEM



Préparation  
classique  
(High vac)



# LES POLYMERES

## Qu'est-ce qu'un polymère ?

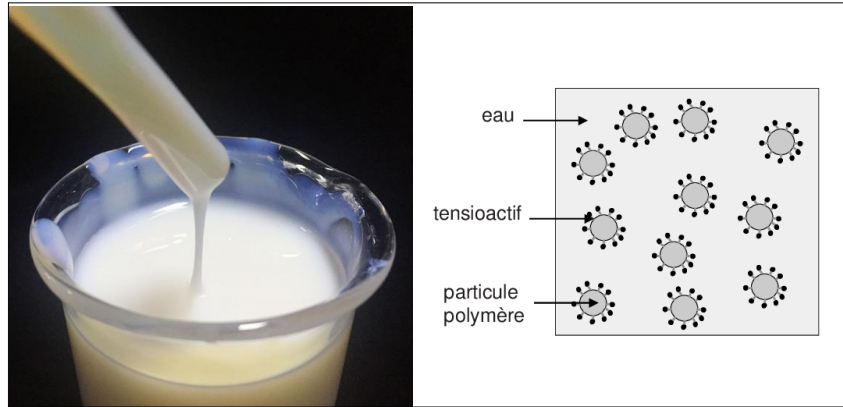
- **Assemblage de macromolécules** formées de briques élémentaires appelées **monomères**
- **Plusieurs formes :**

### Massif

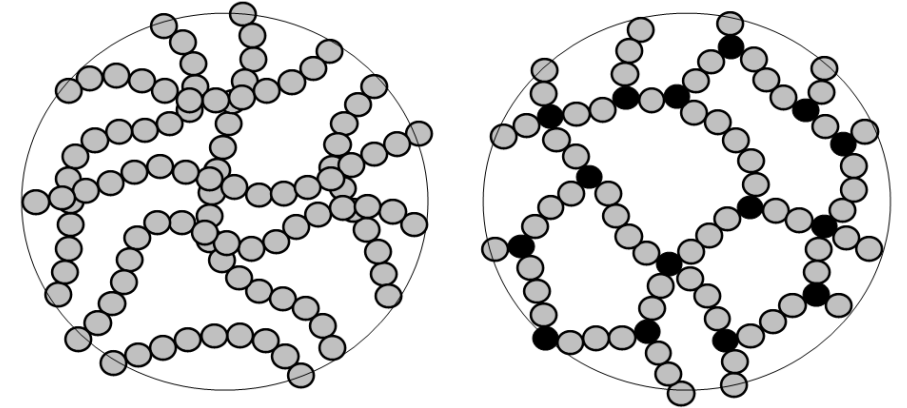


ou

### émulsions ou latex (sous forme de particules dispersées)



Latex : suspension de particules de polymère dans l'eau, stabilisées par un tensioactif.



<https://fr.wikipedia.org/wiki/reticulation>



# LES POLYMERES

## Qu'est-ce qu'un polymère ?

Il existe des **polymères naturels** :

- ADN : polymère avec 4 monomères formés des bases A, T, G, C
- protéines (polymères d'acides aminés),
- cellulose,
- polyisoprene (caoutchouc naturel)

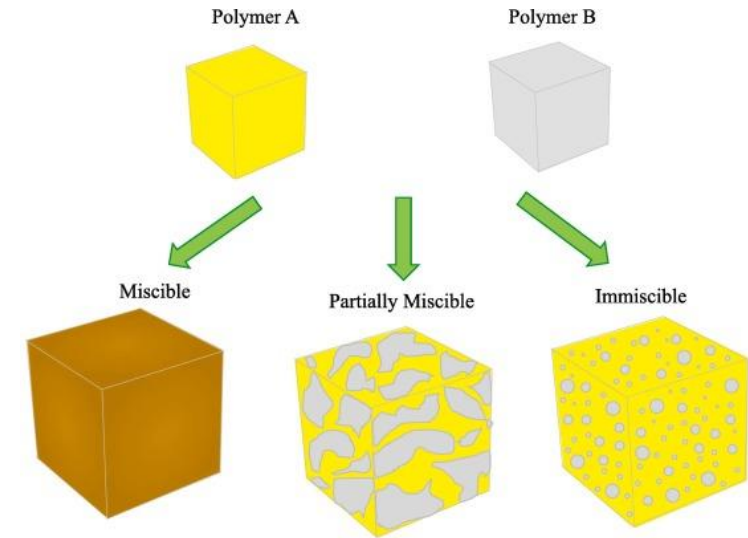
Mais en général, ce sont des produits **synthétiques** :

- polymère pur
- Mélange de 2 ou plusieurs polymères (**blend**)
- **Composite** : matrice polymère + fillers inorganiques = charges minérales (TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>...), fibres, NdC, NTC...



Très grande variété de matériaux différents

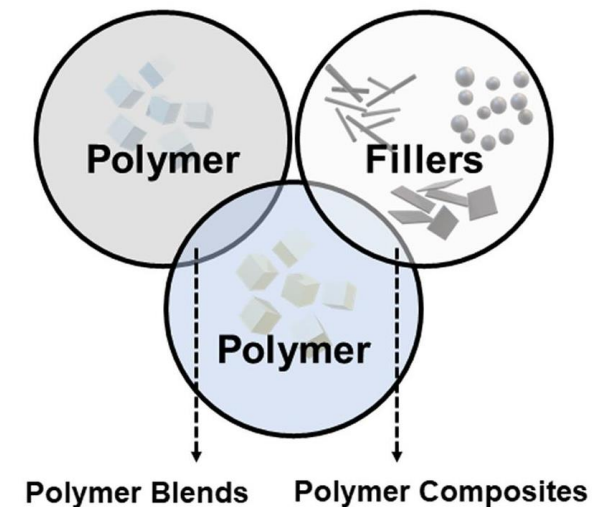
## BLEND



Mélanges homogènes, ou avec plusieurs phases

<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100713>

## COMPOSITES



<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110249>

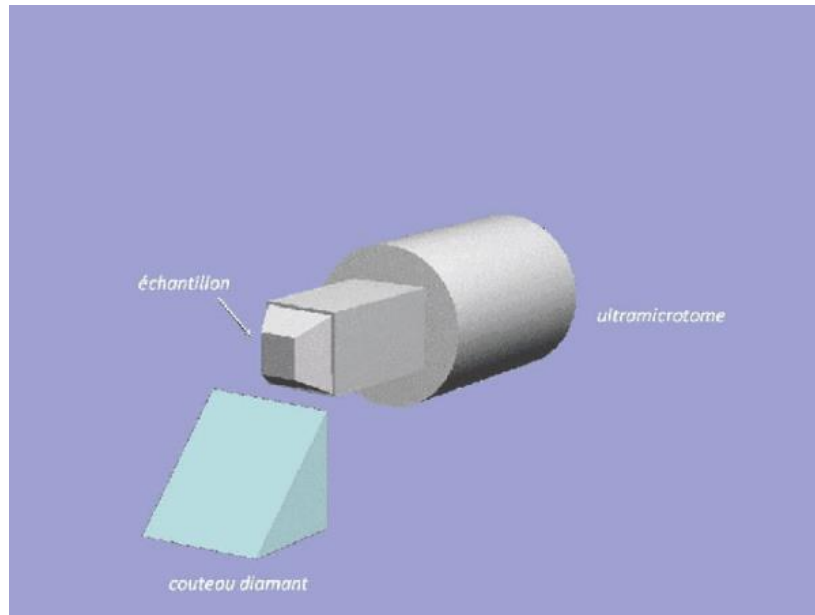


## LES POLYMERES : préparation

Obtenir une surface plane

~~Polissage mécanique~~

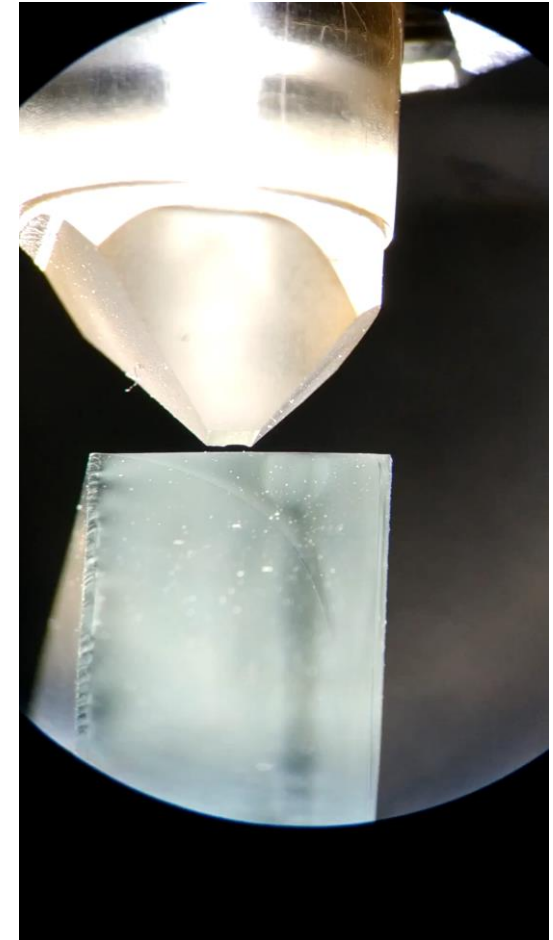
ultramicrotomie



Surfaçage de l'échantillon

Si échantillon mou à  $T_{\text{amb}}$

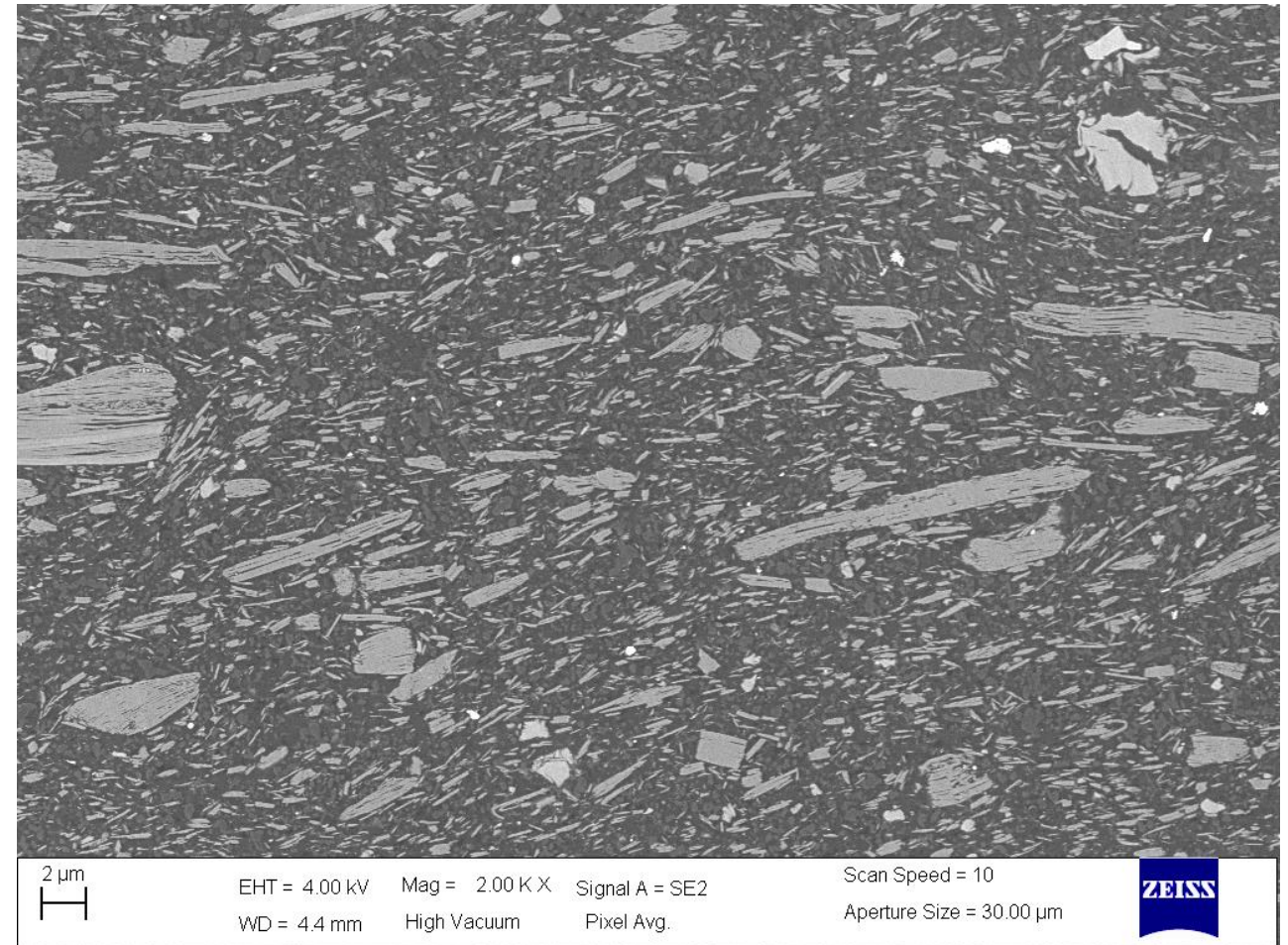
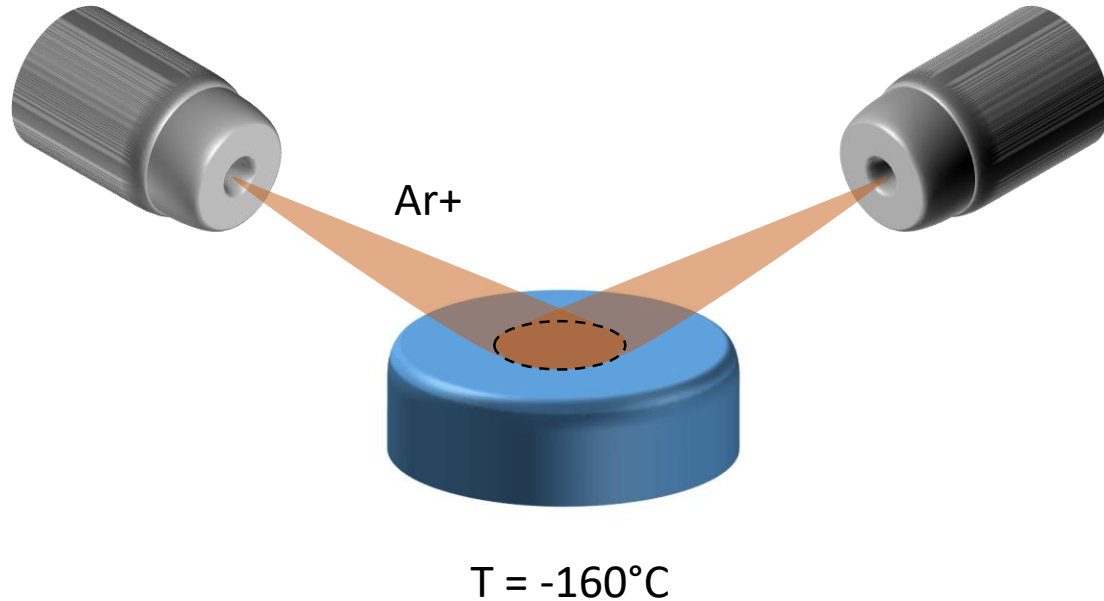
Cryo-ultramicrotomie



## LES POLYMERES : préparation

Pour composites incompatibles avec ultramicrotomie  
(endommagement du couteau)

→ Polissage ionique cryo



EPDM-PP + noir de carbone + charges minerales

### Problème du contraste

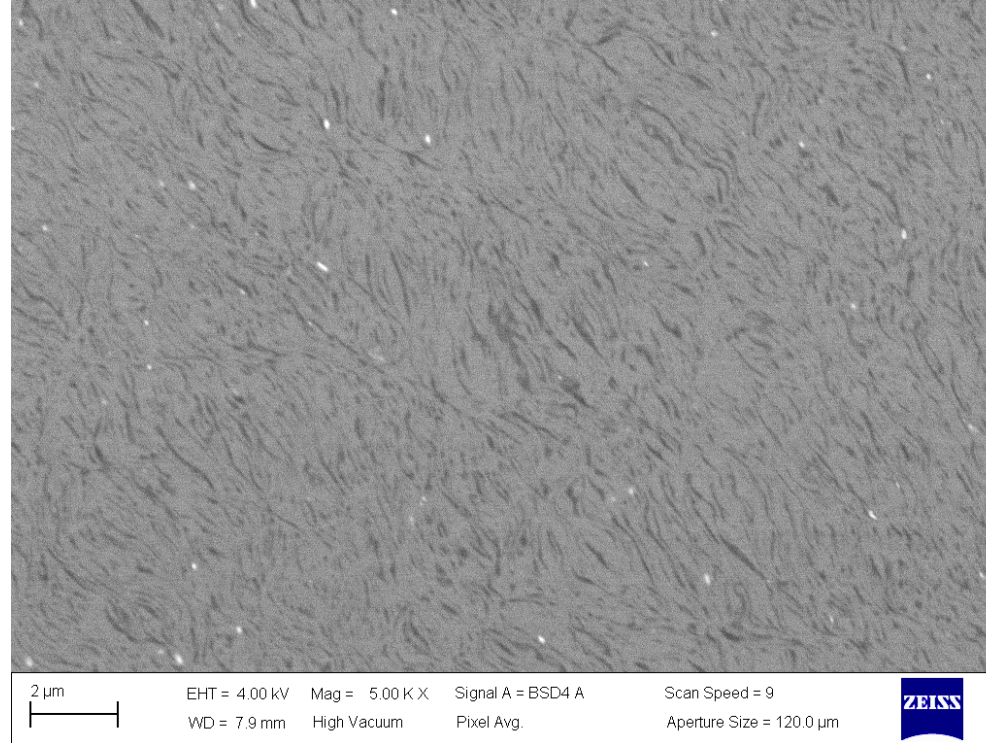
Pour des mélanges de polymères, variations de Z trop faibles



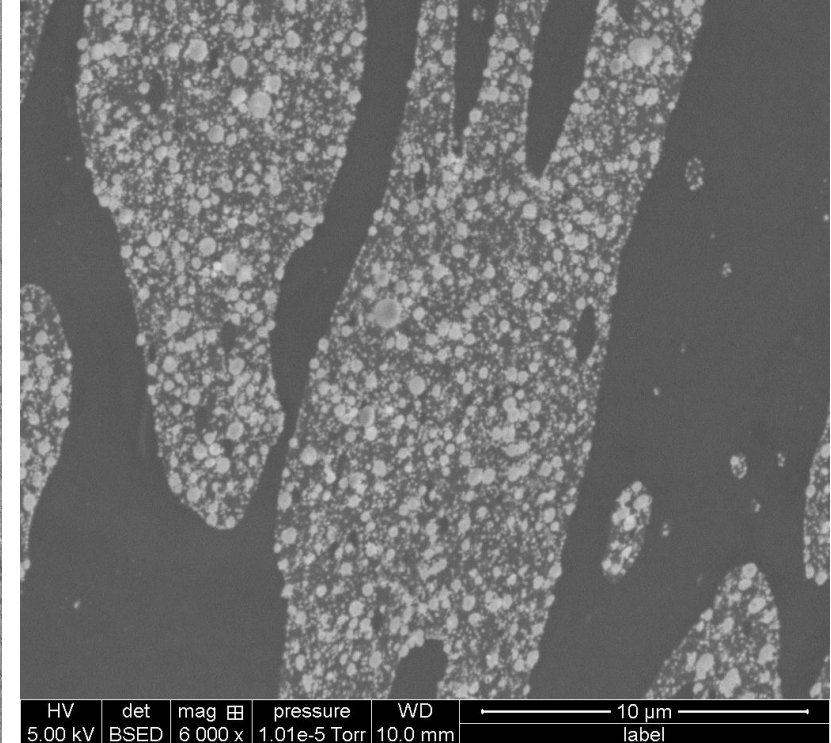
Pas ou peu de contraste !



Utilisation de contrastants pour « marquer » certaines phases



EPDM-PP  
matrice EPDM marquée par OsO<sub>4</sub>

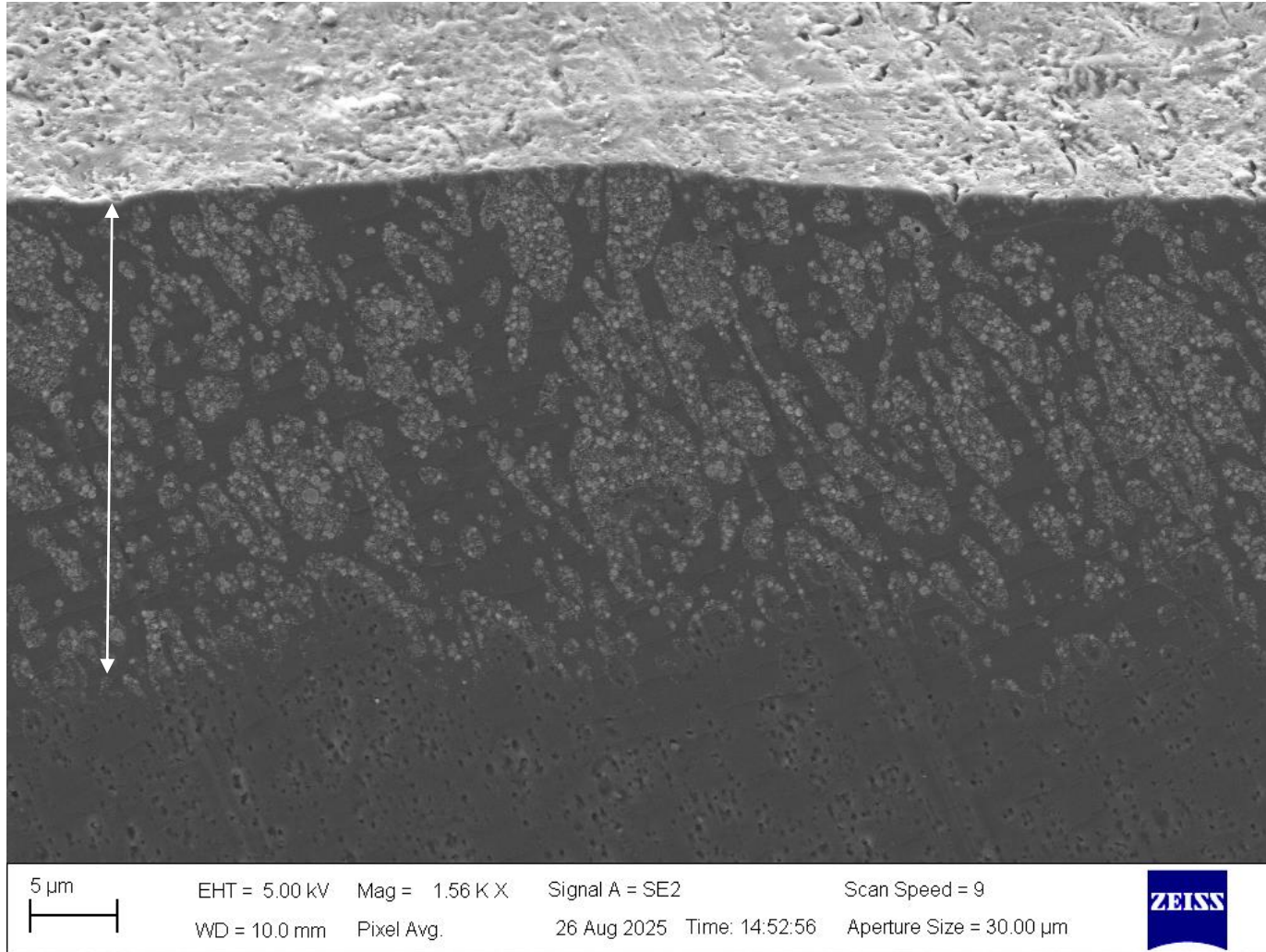


PS-ABS  
Marquage ABS avec OsO<sub>4</sub>

Osmium se fixe sur les doubles liaisons C=C



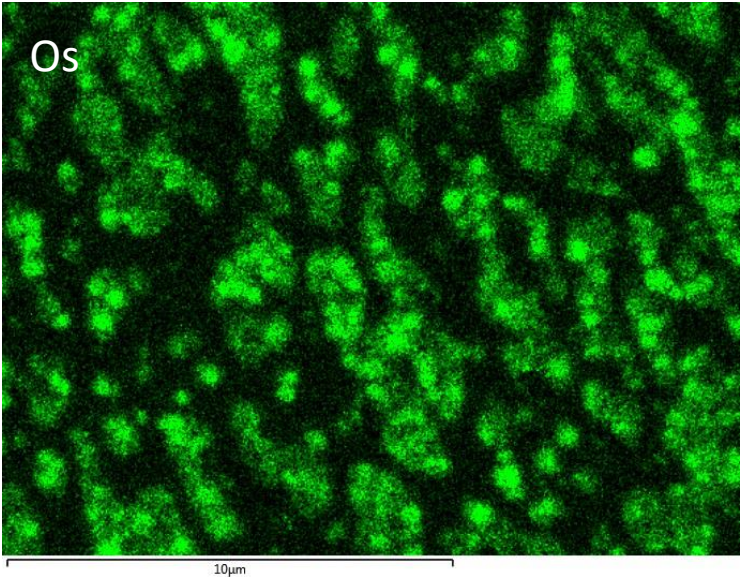
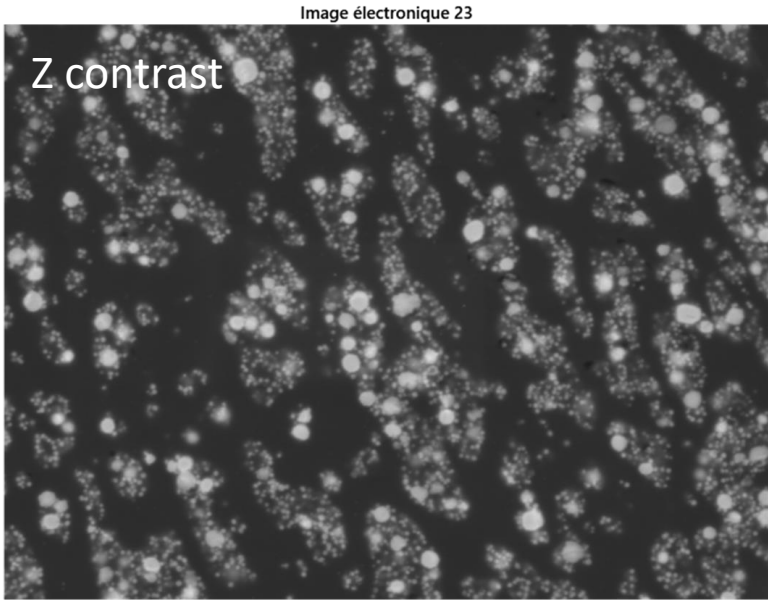
### Problème du contraste



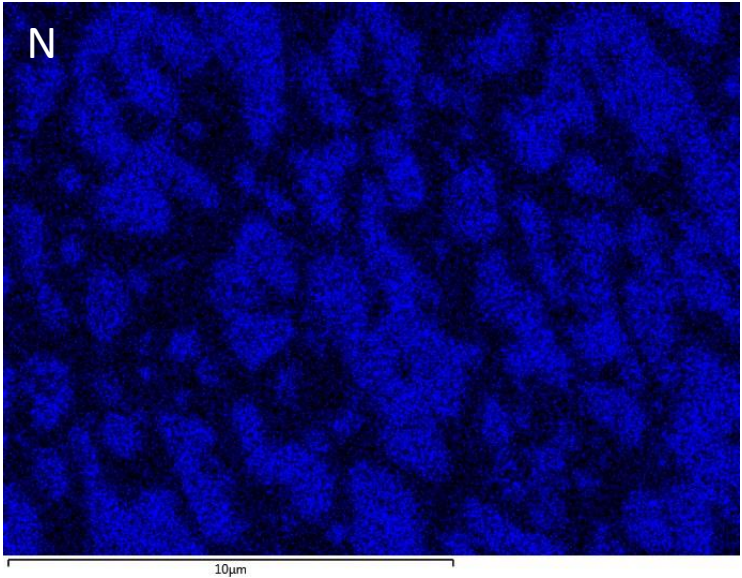
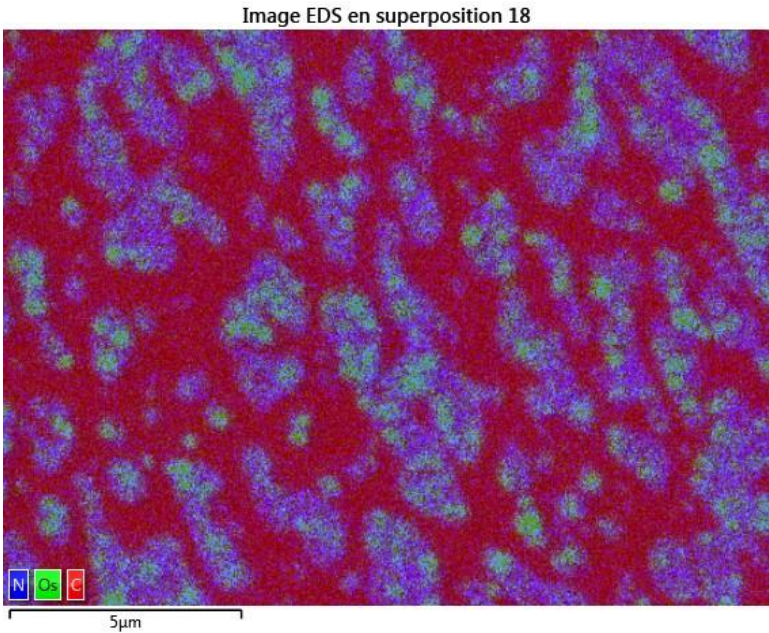
Pénétration du contrastant =  
10-20 µm (très dépendant des cas)

Exemple sur mélange PS-ABS  
(Acrylonitrile butadiène styrene)

Qui est qui parmi ces différents contrastes ?



HT = 5 kV



Marqué par Os

ABS :  
Polybutadiène (rubber phase)  
dans la phase SAN (styrène  
acrylonitrile)

Contient N



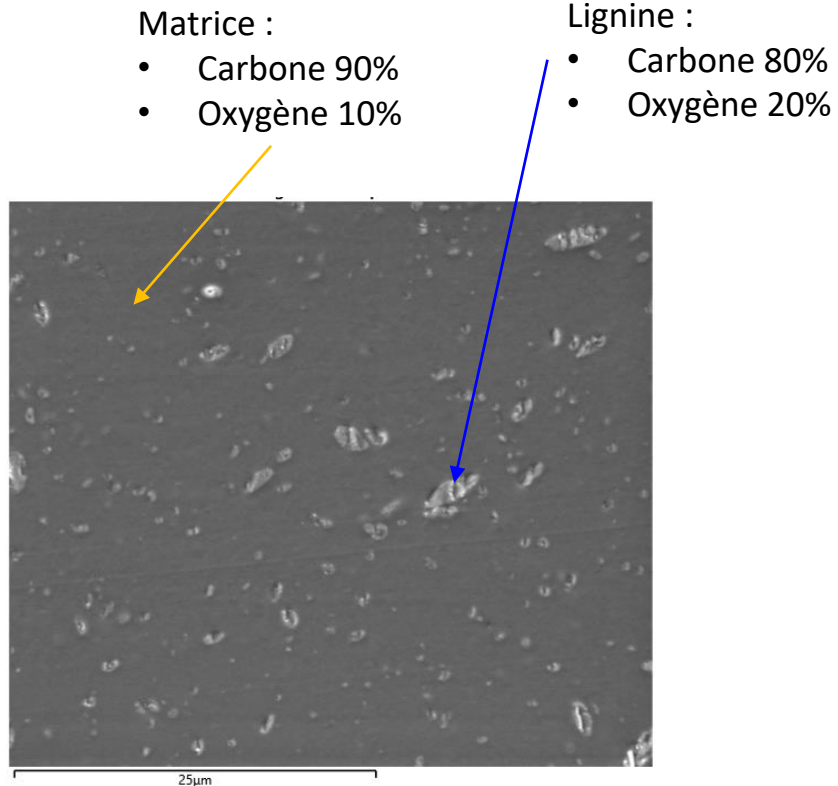
# LES POLYMERES

## 2<sup>e</sup> CAS : mélange PE – Lignine (polymère présent dans les parois cellulaires des plantes)

Pas de contrastant,  
On se base sur la  
différence de  
concentration en  
oxygène

Mapping O K $\alpha$

Particules de lignine  
entre 300 nm et 5  $\mu$ m

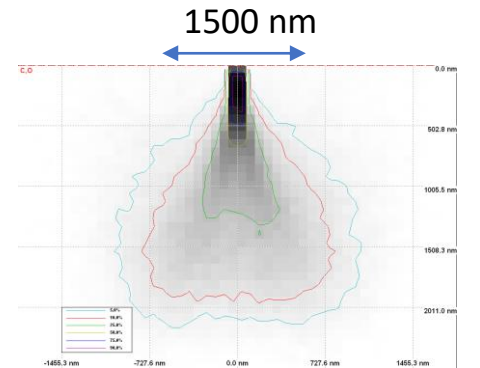
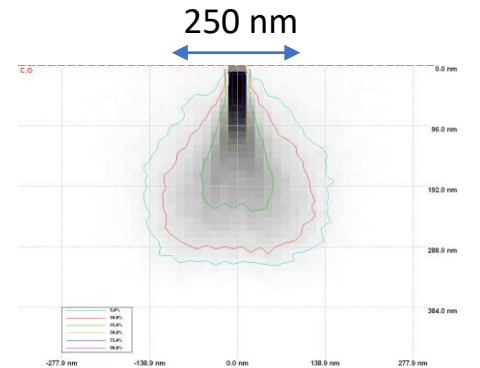
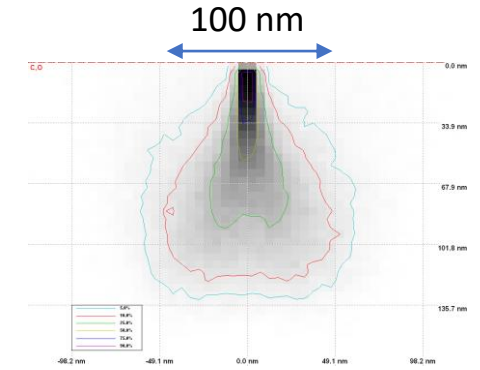
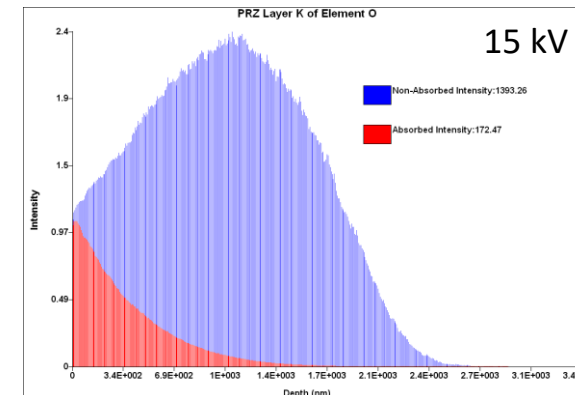
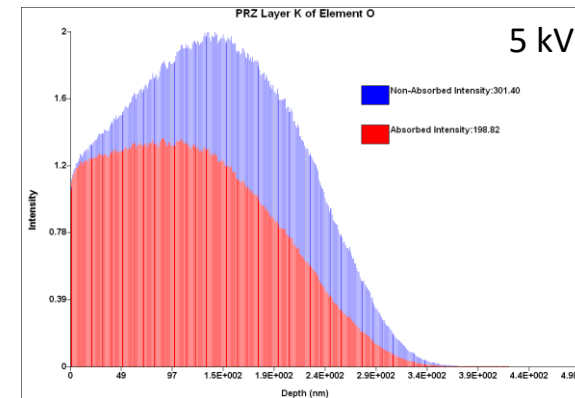
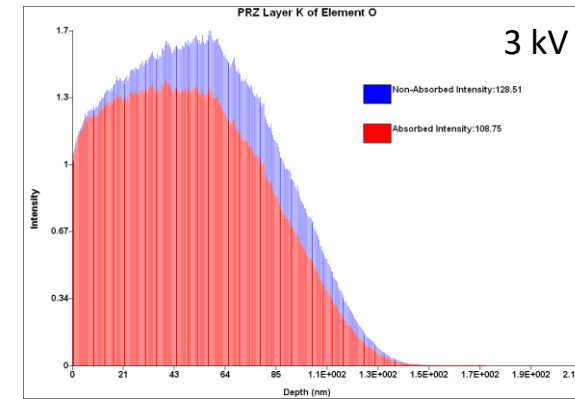


Sample courtesy : Duncan SCHWALLER, IMP

Quelle HT pour :

- Optimiser le contraste entre la lignine et la matrice
- Avoir une bonne résolution spatiale
- Limiter l'endommagement de la surface par le faisceau

Intensité émise et distribution du  
rayonnement en profondeur  
Fonctions  $\phi(\rho z)$





# LES POLYMERES

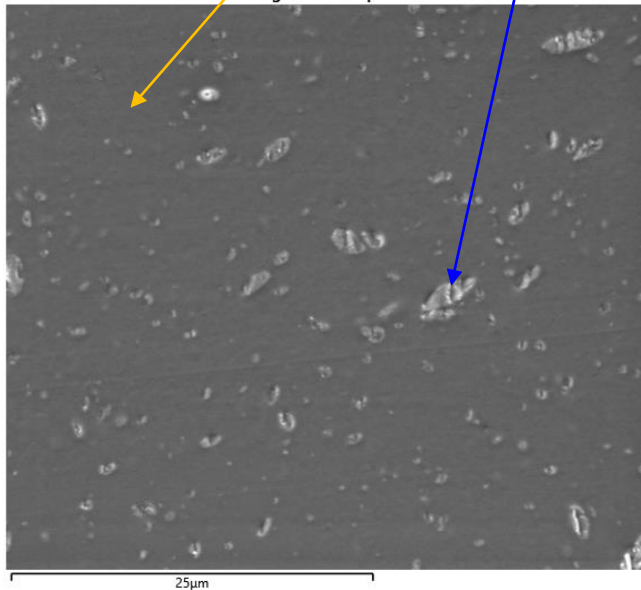
## 2<sup>e</sup> CAS : mélange PE – Lignine (polymère présent dans les parois cellulaires des plantes)

Matrice :

- Carbone 90%
- Oxygène 10%

Lignine :

- Carbone 80%
- Oxygène 20%



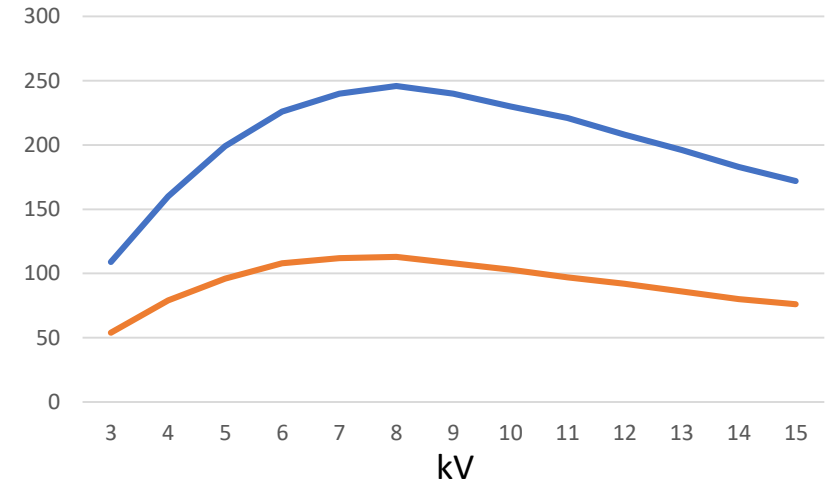
Particules de lignine  
entre 300 nm et 5 μm

Sample courtesy : Duncan SCHWALLER, IMP

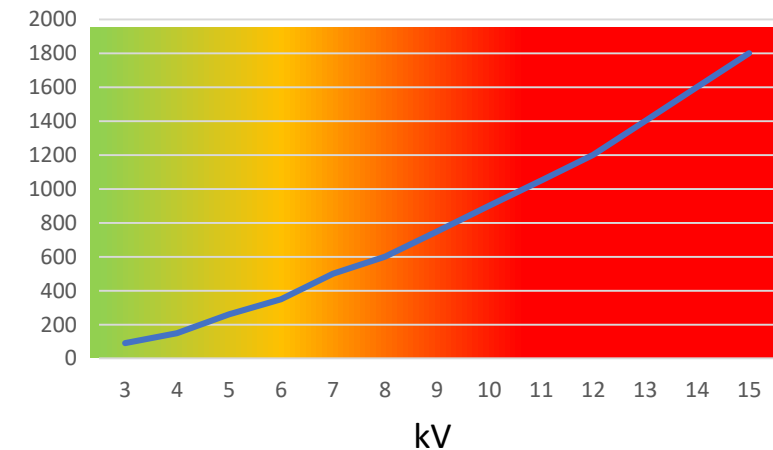
Quelle HT pour :

- Optimiser le contraste entre la lignine et la matrice
- Avoir une bonne résolution spatiale
- Limiter l'endommagement de la surface par le faisceau

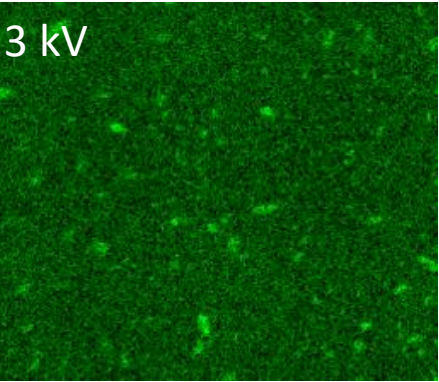
Intensité O Ka  
particules vs matrice



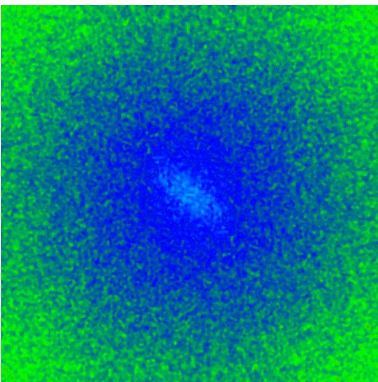
Diamètre émission X



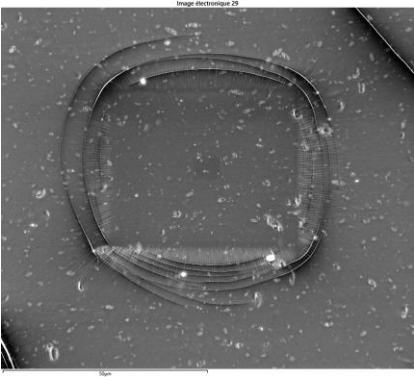
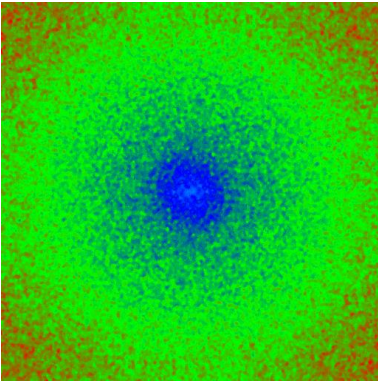
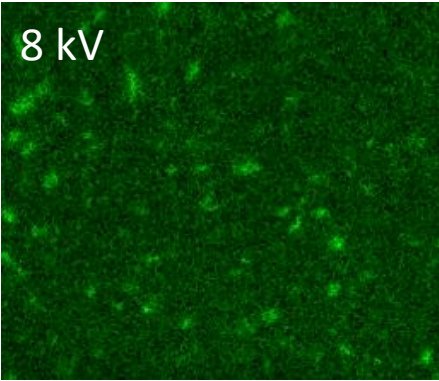
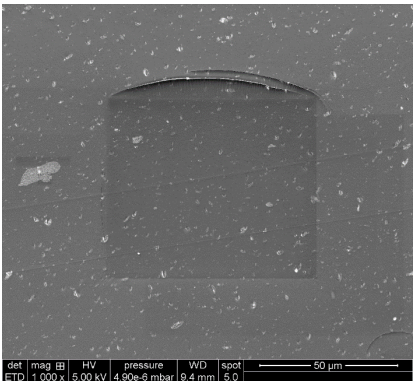
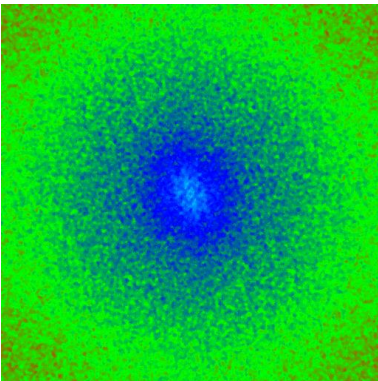
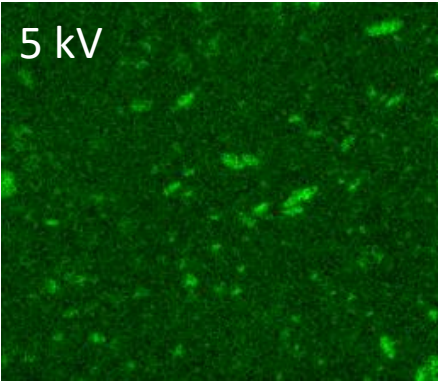
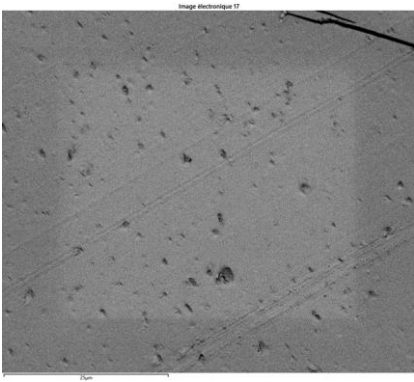
Mapping O Ka



Résolution (FFT)

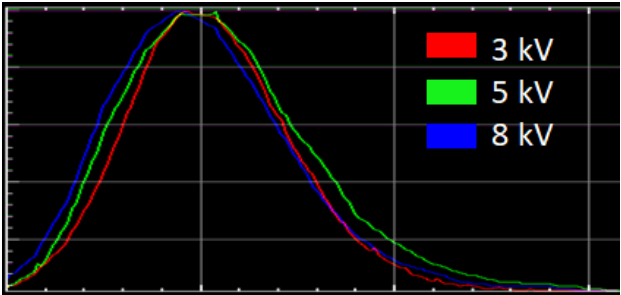


Beam damage



25  $\mu$ m

	résolution	contraste	Beam damage	possibilité Mapping Si
3 kV				
5 kV				
8 kV				



Histogrammes de niveaux de gris des cartes





Centre Technologique  
des Microstructures



**Merci de votre attention!**

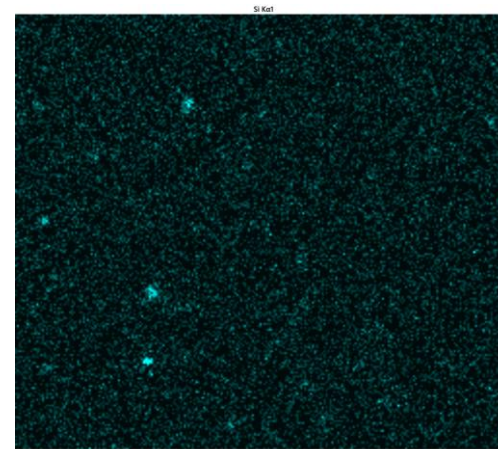
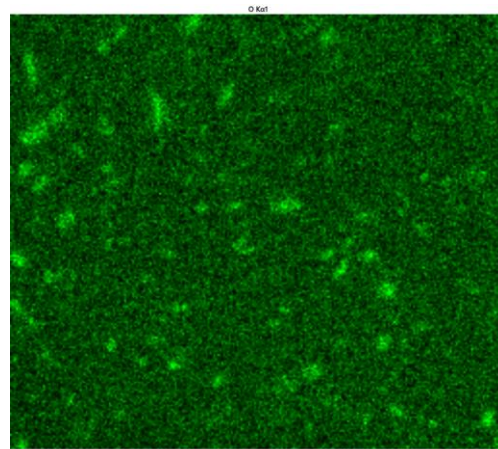
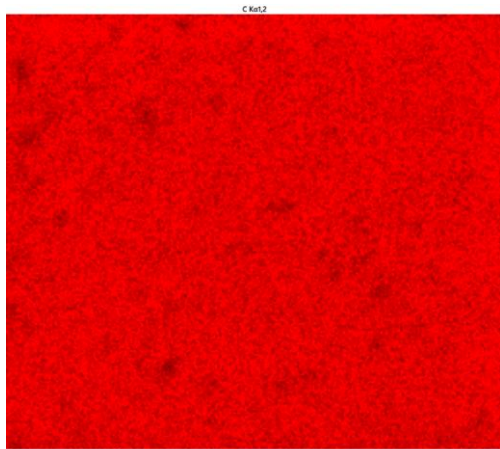


[xavier.jaurand@univ-lyon1.fr](mailto:xavier.jaurand@univ-lyon1.fr)

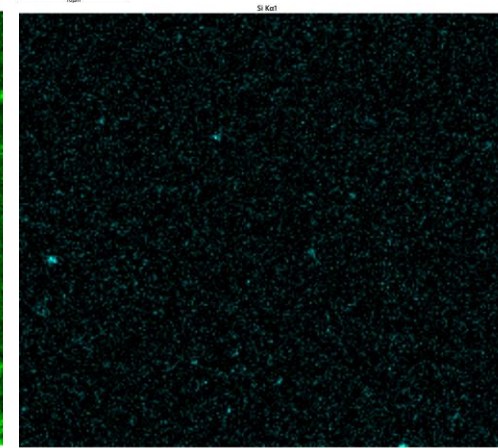
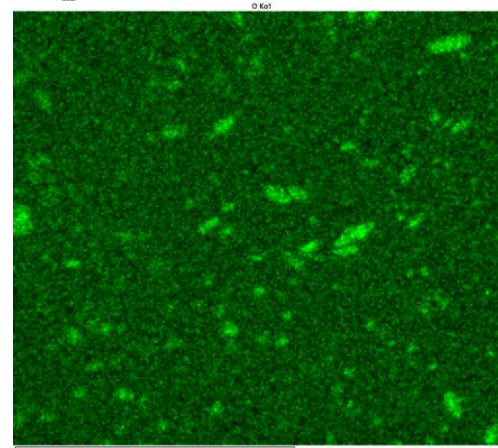
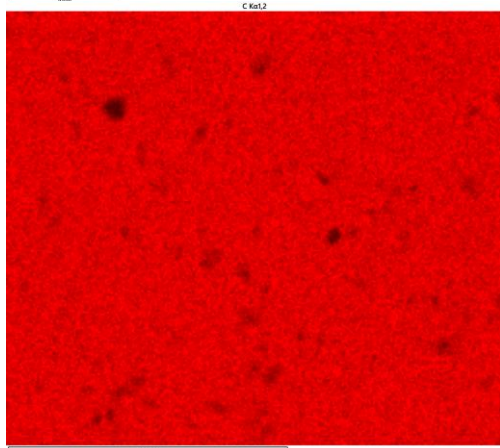




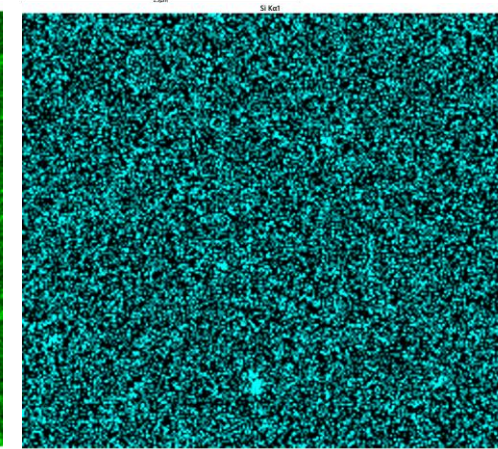
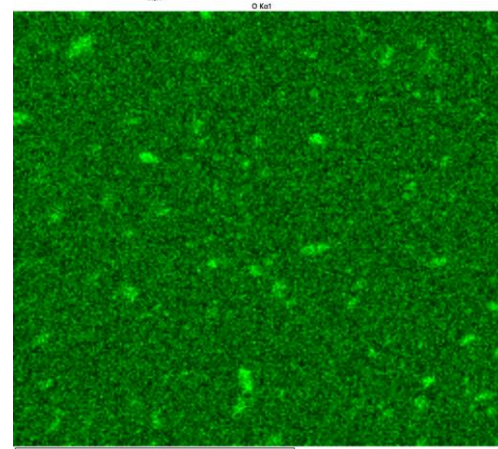
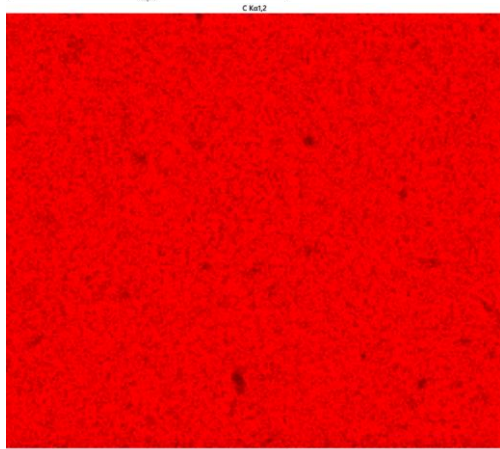
8 kV



5 kV



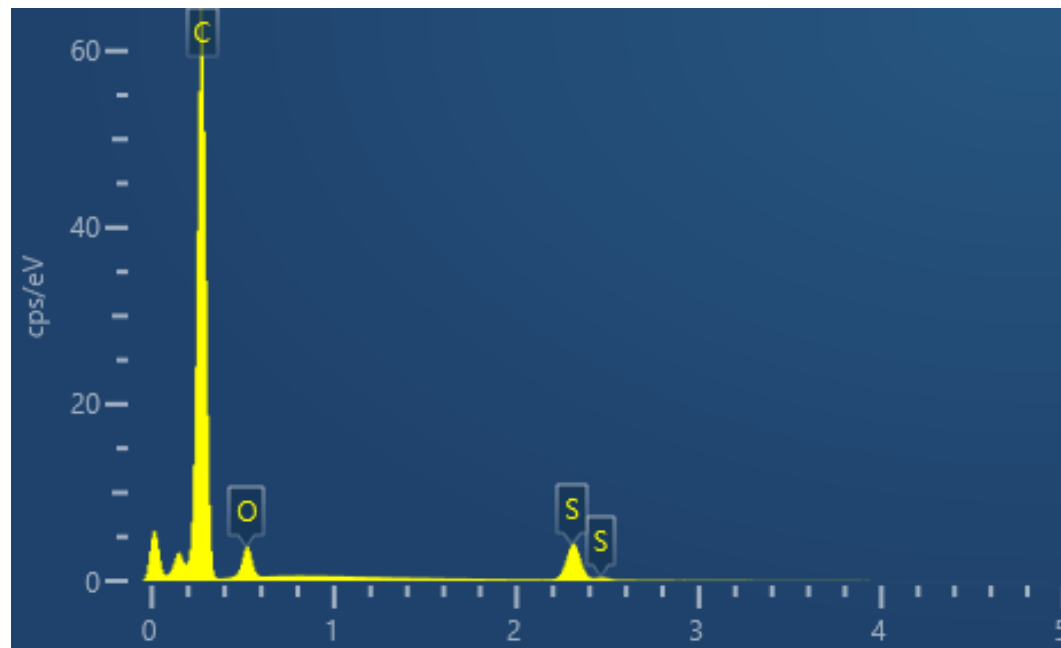
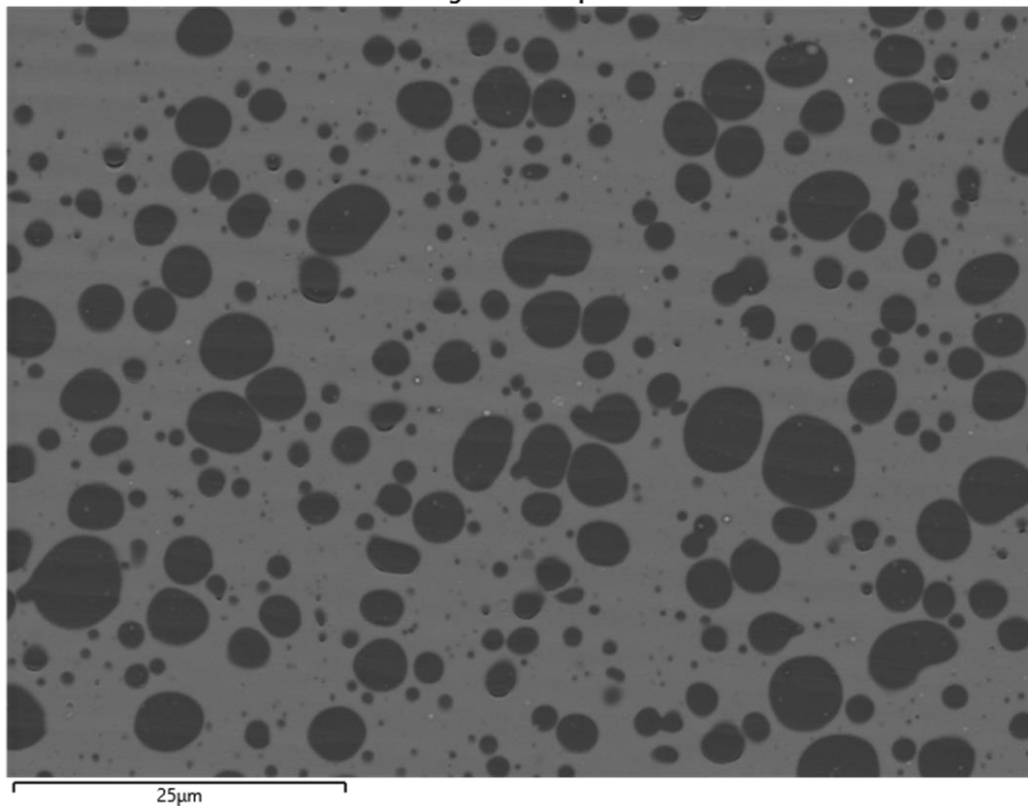
3 kV





5 kV

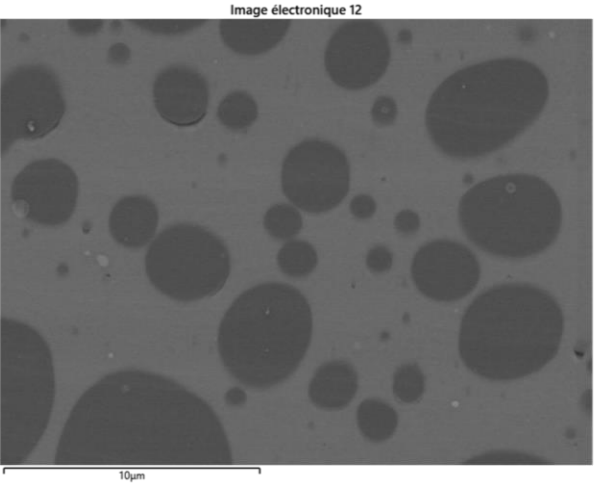
Image électronique 7



Contraste naturel  
Matrice soufrée  
(polymère résistant à la chaleur)

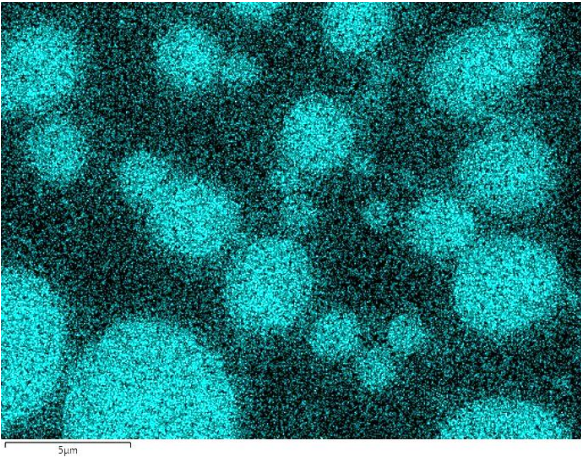


Choix de la HT



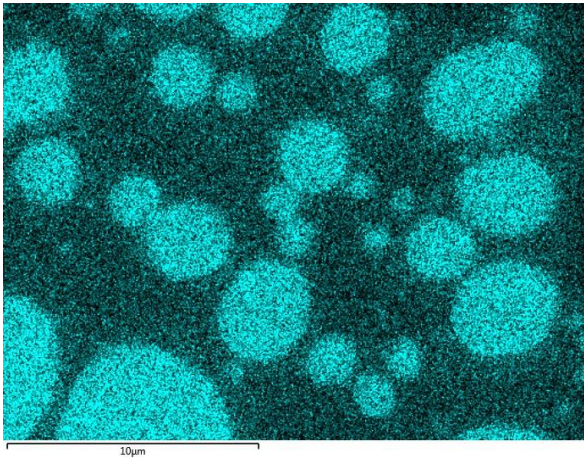
10 kV

O Kα1



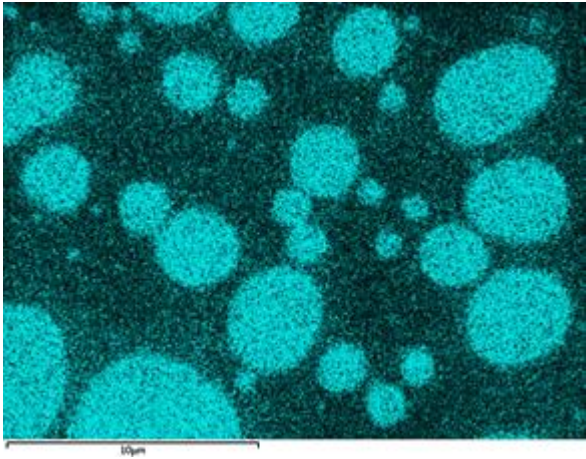
5 kV

O Kα1

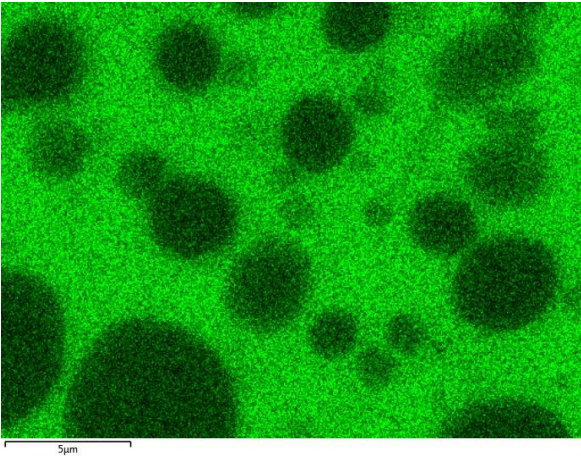


3 kV

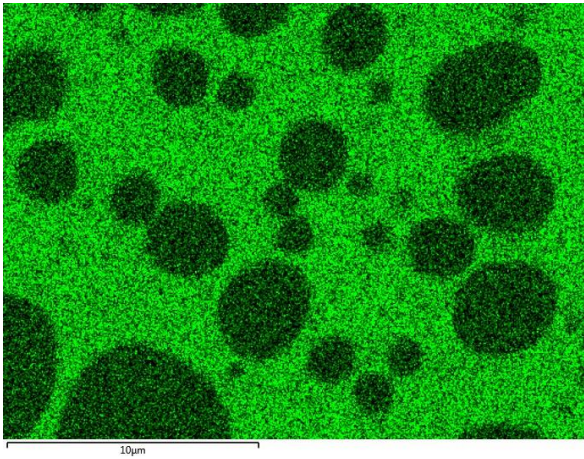
O Kα1



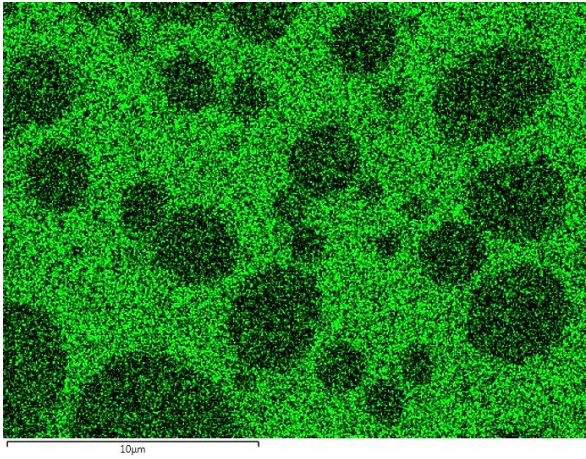
S Kα1



S Kα1



S LI





A 3kV , taux d'excitation de la raie S ka  
est trop faible , on passe sur la raie L  
Mais attention au temps de mise en forme...

