

Microscopies et microanalyses des matériaux mous et biologiques

La réunion de printemps 2004 a eu lieu au centre de conférences de L'Oréal, à Aulnay-sous Bois, les 13 et 14 mai. L'organisateur de la réunion est Philippe Hallégot (phallegot@rd.loreal.com).

Jeudi 13 mai.

8h45 - 9h15 Accueil des participants.

9h15 - 9h30 Message de bienvenue par la **DIRECTION DE LA RECHERCHE L'OREAL**.

9h30 - 10h00 La gonio-spectro-photo-colorimétrie appliquée à l'étude des œuvres d'art ; Mady **ELIAS**, Groupe 'couleur', C2RMF, Université d'Evry Val d'Essonne.

10h00 - 10h30 Spectroscopies optiques : Imagerie fonctionnelle cellulaire et tissulaire ; Michel **MANFAIT**, Unité Médian, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, Reims.

10h30 - 11h00 Utilisation de la microscopie électronique à balayage en biologie marine ; Gérard **SINQUIN**, Groupe de Microscopie Electronique, UFR Sciences, Brest.

11h00 - 11h30 *pause*

11h30 - 12h00 Spectroscopie d'émission X sous vide primaire de films et matériaux polymères ; Maurice **ROMAND**, Laboratoire de Sciences et Ingénierie des Surfaces (LSIS), Université Claude Bernard Lyon I.

12h00 - 12h30 La microanalyse des polymères ; Alain **JADIN**, CERTECH, Seneffe, Belgique.

12h30 - 13h00 Caractérisation mécanique et topographique de matériaux mous par nano-indentation, nano-rayure et interférométrie 3D en lumière blanche ; David **RUCH**, Laboratoire de Technologies Industrielles, CRP Henri Tudor, Luxembourg.

13h00 - 14h30 *repas*

14h30 - 15h00 ADN et complexes ADN-protéines en AFM ; Éric **LE CAM**, Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 8532, Villejuif.

15h00 - 15h30 Applications des microfaisceaux d'ions dans le domaine des sciences de la vie ; Philippe **MORETTO**, Interface Physique Biologie, Cenbg, BP120, Gradignan.

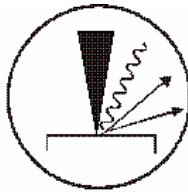
15h30 - 16h00 Matériaux mous et biologiques analysés par SIMS ; Jean-Nicolas **AUDINOT**, Laboratoire d'Analyse des Matériaux, CRP-Gabriel Lippmann, Luxembourg.

16h00 - 16h30 *pause*

16h30 - 17h00 Cartographie isotopique des fibres capillaires ; Philippe **HALLEGOT**, L'Oréal Recherche, Aulnay sous Bois.

17h00 - 17h30 Micro-analyse et imagerie synchrotron de matériaux mous et biologiques ; Jean **DOUCET**, LURE, Orsay.

17h30 - 18h00 Application de l'IRM à la caractérisation de la peau humaine in vivo ; Bernard **QUERLEUX**, L'Oréal Recherche, Aulnay-sous-Bois.

**Vendredi 14 mai**

9h00 - 9h30 Les techniques de préparation d'échantillons biologiques par cryogénie ; Daniel **STUDER**, Anatomisches Institut, Universität Bern, Suisse.

9h30 - 10h00 Cryo-microscopie électronique des matériaux biologiques ; Cedric **BOUCHET-MARQUIS**, Laboratoire d'analyse ultrastructurale (LAU), Faculté des Sciences de Lausanne.

10h00 - 10h30 Nouveaux développements en tomographie électronique ; Sergio **MARCO**, Laboratoire Physico-chimie, Institut Curie, Paris.

10h30-11h00 *pause*

11h00 - 11h30 La cryo ultramicrotomie: application à l'étude morphologique des matériaux ; Jean-Michel **GLOAGUEN**, LPSE Structure et propriété de l'état solide, Université des Sciences et Technologies de Lille.

11h30 - 12h00 Observation d'objets cellulotiques en Microscopie Electronique à Balayage en mode environnemental ; Olga **BIGANSKA**, Ecole des Mines de Paris, CEMEF, Sophia Antipolis.

12h00-12h30 Physico-chimie et physico-mécanique des surfaces macromoléculaires par mesures de force AFM ; Jean-Paul **CHAPEL**, Laboratoire des Matériaux Polymères et des Biomatériaux, UMR5627, Université Claude Bernard Lyon I.

12h30-13h00 **Table ronde**

13h00-14h30 *repas*

14h30 – 16h00 Sur pré-inscription du fait du nombre limité de places :

- présentation des laboratoires d'analyse et de microscopie.

- présentation d'un demi-grand (*mini usine*).

- atelier de cryo-ultramicrotomie avec Monsieur Gilleron

Frederic.Gilleron@leica-microsystems.com

Matériaux mous et biologiques analysés par SIMS

J.-N. Audinot et H.-N. Migeon

Laboratoire d'Analyse des Matériaux, Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann, 162A
Avenue de la Faïencerie, L-1511 Luxembourg, Luxembourg
audinot@crpgl.lu

Résumé

La spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) utilise un faisceau d'ion primaire énergétique afin de pulvériser la surface des échantillons produisant ainsi des ions secondaires qui sont analysés par un spectromètre de masse à double focalisation. Cette technique d'analyse, qui possède une très grande sensibilité, était limitée jusqu'à présent à une résolution spatiale utile de 300 à 500 nm. Ces dernières années, un nouvel instrument, le NanoSIMS50, a été développé afin de focaliser le faisceau d'ion primaire en dessous de 100 nm dans des conditions optimales de sensibilité et de résolution en masse. Ceci permet de cartographier la répartition isotopique et élémentaire avec une résolution latérale de l'ordre de 50 nm. Cette nouvelle génération de microsonde ouvre de nouveaux domaines d'applications pour la technique SIMS et plus particulièrement en biologie et science de la vie où cette résolution latérale permet d'atteindre l'échelle cellulaire en imagerie ionique. Depuis l'acquisition du NanoSIMS par le Laboratoire d'Analyse des Matériaux (LAM), début 2003, nous avons débuté différents projets de recherche en biologie végétale, environnement, immunologie, polymères... Les premiers résultats préfigurent du fort potentiel de l'imagerie ionique.

1. Introduction

L'analyse ionique par émission secondaire (SIMS, Secondary Ion Mass Spectrometry) est basée sur la pulvérisation de quelques couches atomiques de la surface d'un échantillon induite par un bombardement d'ions primaires. Un impact énergétique d'ion primaire, déclenche une cascade de collisions atomiques permettant l'éjection d'atomes et de clusters. Pendant ce procédé d'éjection, certains d'entre eux sont spontanément ionisés. Ces ions secondaires, qui caractérisent la zone analysée, sont séparés selon leur masse dans un spectromètre de masse puis détectés.

Les performances générales de l'analyse ionique peuvent être résumées par sa grande sensibilité (détection de traces) et sa haute résolution en masse (mesures isotopiques et analyse de tous les éléments de la classification périodique). L'utilisation d'un régime dynamique induit une érosion de la surface par balayage par les ions primaires ce qui permet de déterminer le profil en profondeur. Lorsqu'une sonde de petite taille (résolution latérale) est utilisée, ceci permet une localisation spatiale des ions détectés en fonction de la zone pulvérisée. Aujourd'hui, le SIMS est largement répandu pour l'analyse des éléments traces dans les matériaux solides et plus particulièrement dans les semi-conducteurs et les couches minces [1-3]. Jusqu'à présent le SIMS dynamique le plus performant permettait d'obtenir des images avec une résolution latérale de 300 nm. Mais depuis 2002, CAMECA commercialise le NanoSIMS50 qui permet de travailler avec des tailles de sonde de 50 nm alliant ainsi la sensibilité et la résolution en masse à la résolution latérale [4-6].

2. Le NanoSIMS50

Les ions primaires utilisés dans le NanoSIMS50 (figure 1) sont des ions césium (Cs^+) et oxygène (O^+).

La source césium est une source à ionisation thermique [7]. Par chauffage du chromate de césium (Cs_2CrO_4) le césium s'évapore et se dépose sur une plaque de tungstène portée à 1100°C où il est ionisé générant ainsi des ions Cs^+ .

Les ions oxygènes sont générés par un duoplasmatron et, grâce à un filtre de Wien, seuls les ions $^{16}\text{O}^+$ sont admis à poursuivre leur chemin dans la colonne primaire de la machine.

La colonne primaire a été calculée afin d'atteindre une réduction de l'ordre de 1000 de l'image de la source permettant ainsi de travailler avec des tailles de sonde plus petites. Le faisceau incident arrive à la normale de la zone d'analyse ce qui diminue les effets d'ombre qui peuvent apparaître avec une incidence oblique (SIMS type 3f, 4f, 6f,..) sur un échantillon non plat. Le trajet des ions primaires est alors coaxial avec le faisceau secondaire dans la partie objective. La lentille à immersion est alors utilisée pour focaliser les ions primaires et pour collecter les ions secondaires. Ce système permet de diminuer la distance entre l'échantillon et l'ensemble optique à $400\ \mu\text{m}$ (contre $2\ \text{mm}$ dans les autres systèmes) (figure 2) [8]. Les aberrations optiques en sont considérablement réduites ce qui facilite l'obtention de sondes intenses de petite taille. Cette faible distance permet aussi l'utilisation de champ électrique très élevé qui, associée avec un système de réduction de dispersion, permet d'améliorer le rendement de collecte des ions secondaires.

Le faisceau secondaire est ensuite acheminé jusqu'au spectromètre de masse avec un minimum de dispersion en énergie. Le spectromètre est un secteur magnétique, de configuration de Mattauch-Herzog, dans le quel le spectre de masse des ions secondaires est distribué dans le plan focal de l'aimant (rayon de $550\ \text{mm}$). Cette configuration permet l'utilisation de 5 détecteurs électromultiplicateur à dynode dont 4 sont mobiles dans ce plan. Le cinquième est fixe impose la valeur du champ magnétique pour la valeur m/z la plus élevée. Il s'agit du mode de détection multicollection déjà utilisé pour le SIMS 1270¹ permettant d'enregistrer en simultanément 5 masses. Les images réalisées avec ce type d'appareil peuvent être enregistrées de 16×16 pixels à 2048×2048 pixels avec une résolution latérale de $100\ \text{nm}$ dans les conditions classiques mais qui peut atteindre $50\ \text{nm}$ lorsque ceci s'avère nécessaire (figure 3).

L'optique secondaire de cette machine permet, tout comme le SIMS 1270, une haute résolution en masse avec une faible perte en transmission. (figure 4).

Du point de vue sensibilité, Slodzian [9] a montré qu'il suffisait de 200 atomes de carbone pour obtenir un signal significatif de C^- avec une sonde de $100\ \text{nm}$ de diamètre et de 10 couches atomiques d'épaisseur. C'est à dire que dans les tissus biologiques, où ce volume correspond à 10^6 atomes, la concentration minimale détectable est de $200/1.10^6$ soit $0,02\%$ (200 ppm)

Toutes ces caractéristiques, sensibilité, transmission, résolution latérale font du NanoSIMS50 une technique adaptée en biologie pour comparer, dans exactement les mêmes compartiments sous-cellulaires, la distribution des éléments enregistrés. La possibilité d'utiliser des molécules marquées avec un ou plusieurs isotopes stables (par exemple ^{15}N , ^{13}C , ^2H , ^{18}O , ^{33}S , ^{74}Se) permet d'étudier le cheminement métabolique intra et trans cellulaire, des translocations cytoplasmiques et nucleo-cytoplasmiques, l'expression et la distribution d'ARN et d'ADN, le trafic vésiculaire et non-vésiculaire, la pénétration de virus ou la localisation des drogues,...

Le NanoSIMS 50 ouvre ainsi un monde de possibilité de marquage qui est impossible avec l'autoradiographie, et ceci avec une sensibilité et une résolution spatiale de loin supérieurs à la microscopie optique confocale employée avec les marqueurs fluorescents.

¹ Appareil dédié aux mesures isotopiques possédant un rayon d'aimant de $585\ \text{mm}$

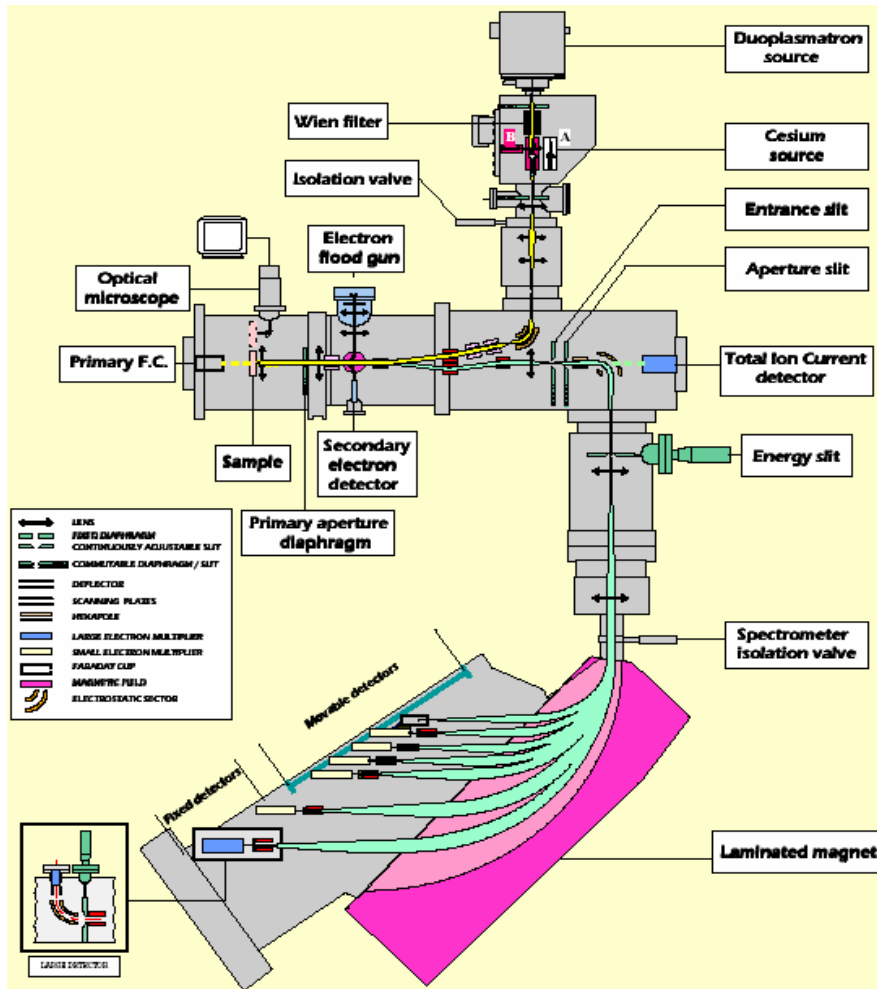


Figure 1 : Synopsis du NanoSIMS 50

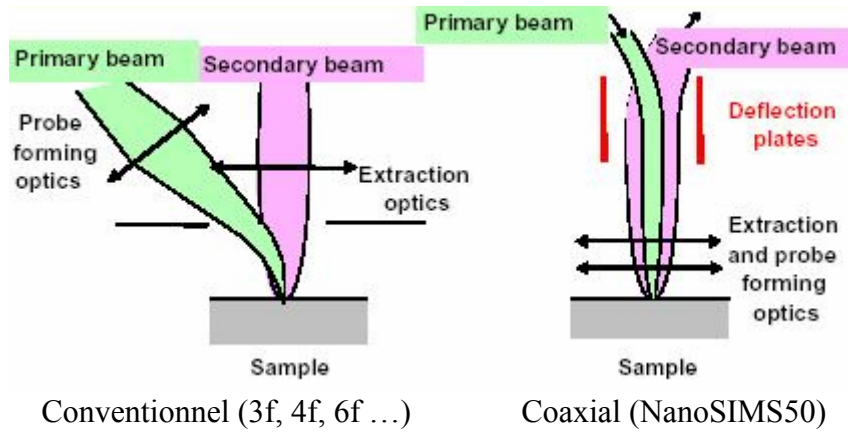


Figure 2 : Représentation du système optique conventionnel et coaxial

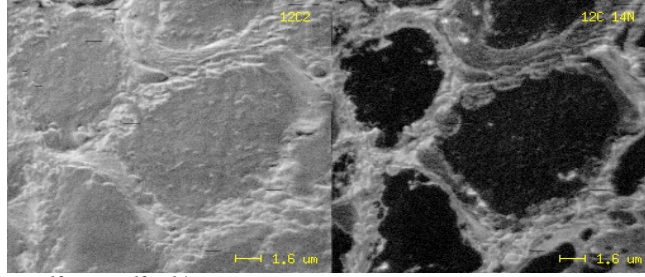


Figure 3 : Répartition de $^{12}\text{C}_2$ et $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ dans une feuille de pomme de terre. ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$, 15ms/pixel)

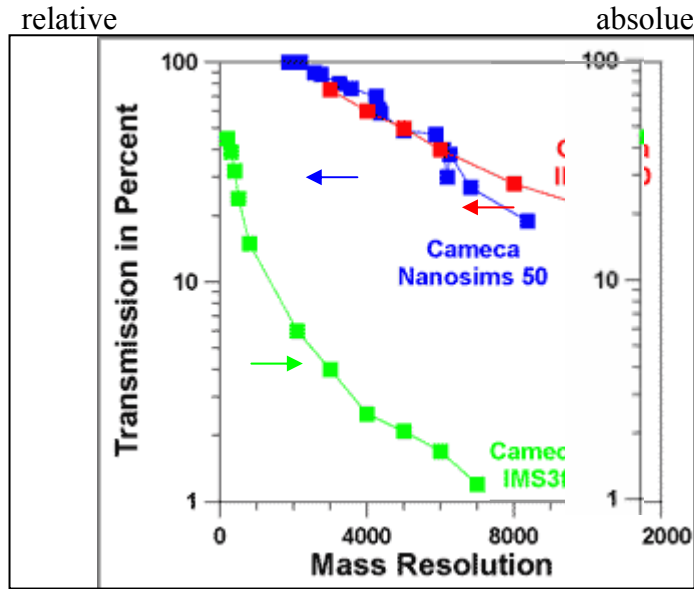


Figure 4 : Comparaison des transmissions en fonction de la résolution en masse des microsondes IMS3f, IMS1270 et NanoSIMS50

3. Exemples de matériaux mous ou biologiques étudiés par NanoSIMS50

3.1. Utilisation de traceur isotopique stable comme marqueur chimique

L'utilisation de l'isotope stable ^{15}N de l'azote (abondance naturelle 0,368%) comme traceur isotopique présente l'avantage qu'il s'agit d'un élément naturel à la nutrition des tissus végétaux. L'azote 14 et l'azote 15 n'émettent pas en SIMS comme $^{14}\text{N}^-$ ou $^{15}\text{N}^-$ en raison de la faible affinité de cet atome. Cependant, s'ils sont associés à un carbone, ils sont intensément émis sous forme de clusters $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ou de $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ et grâce à la résolution en masse élevée obtenue par NanoSIMS, toutes les interférences en masse entre les différents ions polyatomiques sont supprimées. Les masses 27.00011 ($^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$) et 27.00642 ($^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$) sont facilement et totalement séparés avec une résolution en masse de $M/\Delta M$ de 4 300 (figure 5).

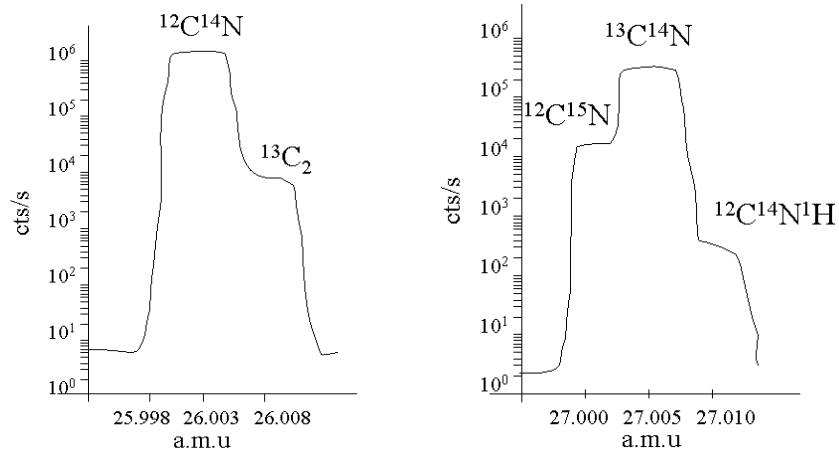


Figure 5 : Pouvoir séparateur en masse du NanoSIMS50 pour les masses 26 a.m.u et 27 a.m.u

C'est donc cet élément qui a été utilisé comme traceur dans des cellules fongiques. Après avoir cultivé ces champignons dans un milieu enrichi en ^{15}N avec des temps d'incubations variables l'imagerie SIMS a été utilisée afin de localiser les lieux d'échange entre les tissus végétaux et la source nourricière et de calculer ainsi les cinétiques d'échanges entre ces deux milieux (figure 6). Les intensités des ions sont sur une échelle logarithmique du noir (absence) au blanc (forte concentration). Par la suite un traitement numérique des images permet d'établir une image du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ à partir des images $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ mettant ainsi en évidence les lieux de fixation préférentiels de l'azote dans les différentes cellules (Cf. figure 7).

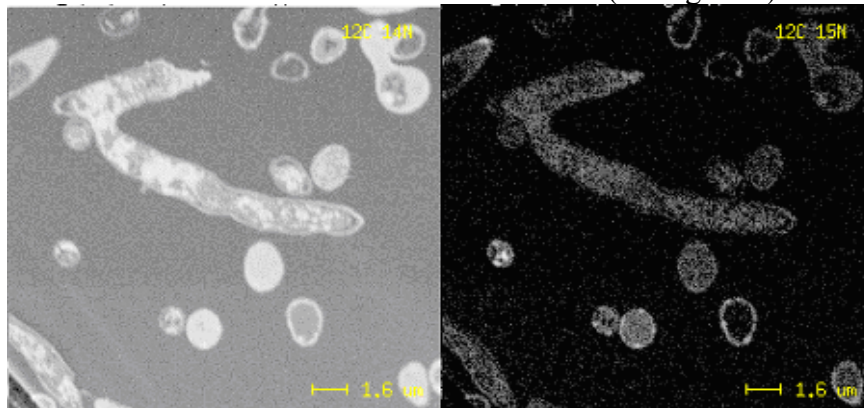


Figure 6 : Localisation de ^{14}N et de ^{15}N de cellules fongiques cultivées 15 minutes dans un milieu enrichi en azote ^{15}N . ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$, 20ms/pixel)

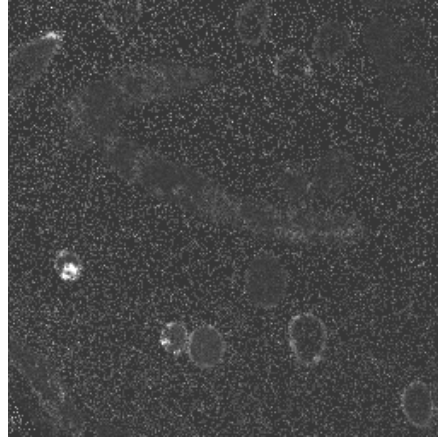


Figure 7 : Image après traitement informatique du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans des cellules fongiques cultivées 15 minutes dans un milieu enrichi en azote ^{15}N .

3.2 Mesures isotopiques dans des tissus biologiques

L'absorption de l'azote par les plantes résulte de nombreuses réactions chimiques dont de nombreux facteurs rentrent en considération. L'un d'entre eux peut être la nature isotopique de l'azote. En effet, l'azote qui possède deux isotopes naturels, ^{14}N et ^{15}N peut faire l'objet d'une discrimination selon sa masse (^{14}N , 14,00307 et 15,00011 pour ^{15}N) pouvant donner des rapports isotopiques différents dans la plante. En collaboration avec l'INRA de Nancy, nous avons débuté un étude sur la ségrégation de l'azote dans des racines de champignon entre l'extérieur (manteau) et le centre (cylindre central). Les premiers résultats ont confirmé une variation de 6% dans l'absorption de l'azote selon sa masse (Tableau 1, figures 8 et 9).

Zone d'analyse	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$
Echantillon 1, Cylindre central	$3,39 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-5}$
Echantillon 2, Cylindre Central	$3,41 \cdot 10^{-3} \pm 3,7 \cdot 10^{-5}$
Echantillon 1, Manteaux	$3,66 \cdot 10^{-3} \pm 2,7 \cdot 10^{-5}$
Echantillon 2, Manteaux	$3,64 \cdot 10^{-3} \pm 6,4 \cdot 10^{-5}$

Tableau 1 : Rapports des intensités $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans le cylindre central et le manteaux de racine de champignon.

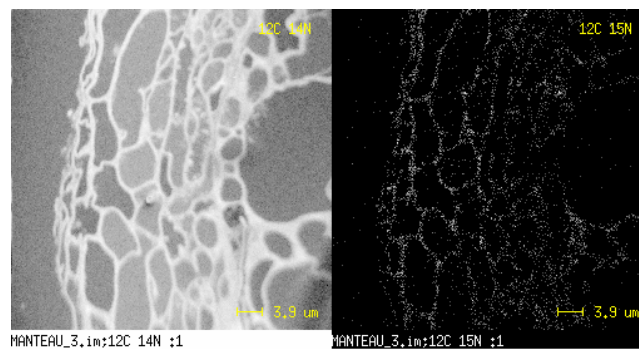


Figure 8 : Répartition de $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ et $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$ dans la périphérie (manteau) des racines d'un champignon. (50x50 μm^2 , 60ms/pixel)

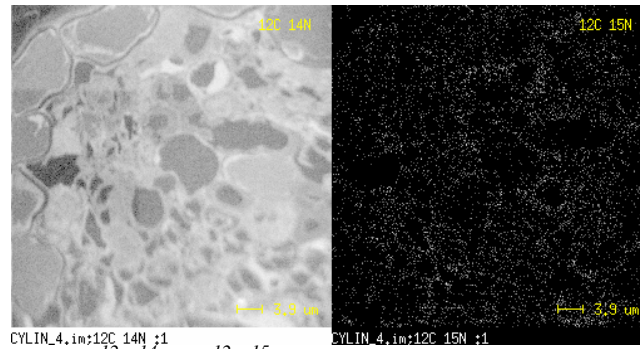


Figure 9 : Répartition de $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ et $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$ dans le cœur central (cylindre) des racines d'un champignon. ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$, 60ms/pixel)

3.3. Etude d'un mélange de polymère, imagerie 3D

A la suite de l'acquisition d'un plan image, la surface de la matière analysée est érodée de quelques couches atomiques permettant de révéler les couches inférieures. Si l'acquisition est faite en série sur une même zone d'analyse, on obtient alors une acquisition en 3 dimensions. Ce mode d'analyse peut s'avérer très intéressant pour étudier des variations de composition dans les trois directions de l'espace.

Afin de combiner les différentes propriétés mécaniques et chimiques des polymères, des mélanges de polymères peuvent être synthétisés comme par exemple entre le polystyrène (PS) et le polyméthacrylate méthylique (PMMA). Le laboratoire Physico-Chimie et de Physique des Matériaux (PCPM) de Louvain la Neuve a réalisé des couches minces de ce type de mélange sous forme de copolymère (polymères associés en chaîne) et de blend (polymères mélangés sous forme de bloc). A la suite de recuits en température, une variation en concentration des polymères PS et PMMA a été mesurée par Tof-SIMS. Une étude en microscopie à force atomique (AFM) a alors montré un réarrangement dans l'espace des mélanges de polymère sous forme de nodules de $200 \mu\text{m}$. Le polyméthacrylate méthylique contient, contrairement au polystyrène de l'oxygène. Ceci permet par imagerie SIMS de le différencier et de le localiser dans ce type de couches minces. Par imagerie 3D, il a été possible de montrer le réarrangement des mélanges de polymères en fonction des températures de recuits. Par exemple, dans le mélange blend, le PMMA se trouve à l'extérieur des nodules et le polystyrène à l'intérieur [10] (figure 10).

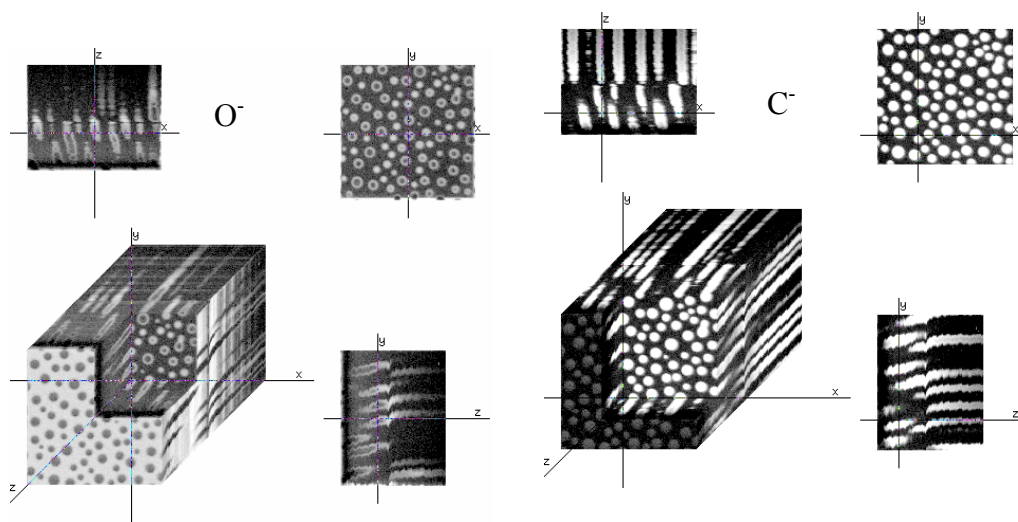


Figure 10 : Répartition 3D de l'oxygène et du carbone dans un mélange polymère blend. Plan X-Y $20 \times 20 \mu\text{m}^2$

4. Conclusion

L'étude par SIMS dynamique des tissus biologiques trouve de nouvelles voies de recherche avec l'imagerie ionique. Le NanoSIMS qui combine sensibilité et résolution latérale ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans le domaine de la médecine et de la biologie.

Remerciement :

Les analyses effectuées sur le NanoSIMS ont été réalisées avec l'aide financière du Fond National de la Recherche de Luxembourg (FNR).

Références

- [1] P. Holliger, Analyse de Surface des Matériaux, réunion du GN-MEBA, Paris (2003).
- [2] P. Lehuédé, Analyse de Surface des Matériaux, réunion du GN-MEBA, Paris (2003).
- [3] M. Repoux, Analyse de Surface des Matériaux, réunion du GN-MEBA, Paris (2003).
- [4] F. Hillion, B. Daigne, F. Girard and G. Slodzian, SIMS IX Proc., Yokohama 254 (1993).
- [5] F. Hillion, B. Daigne, F. Girard and G. Slodzian, SIMS X Proc., Munster 979 (1995).
- [6] C. Lechene, Analyse de Surface des Matériaux, réunion du GN-MEBA, Paris (2003).
- [7] G. Slodzian, B. Daigne, F. Girard, F. Boust, F. Hillion, Proc. SIMS VIII, Amsterdam, p49 (1992).
- [8] G. Slodzian, B. Daigne, F. Girard, F. Boust, F. Hillion, Bio Cell, 74, 43 (1992).
- [9] G. Slodzian et al., C.R.Acad.Sc., 311(série II), 57-64 (1990).
- [10] L. Kailas, J.-N. Audinot, H.-N. Migeon, P. Bertrand. Proc. SIMS XIV, San Diego, 14-19 sept (2003).

Cryo-Microscopie électronique des matériaux biologiques

Cédric Bouchet-Marquis

Université de Lausanne, Laboratoire d'Analyse Ultra structurale , 1015 Lausanne (Suisse)

cedric.bouchet-marquis@lau.unil.ch

1. Introduction

Depuis des décennies maintenant, l'organisation du noyau cellulaire ainsi que les fonctions qui en découlent sont un des intérêts principaux du monde scientifique. Cette architecture organisée en domaines étant directement reliée aux mécanismes de régulation de l'expression des gènes qui s'y trouvent. Dans cette ligne de pensée, un grand nombre d'informations ultra structurales ont été apportées par des travaux autant en microscopie optique avec des études en fluorescence qu'en microscopie électronique soit sur matériel fixé chimiquement enrobé en résine, soit sur matériel cryofixé suivi ou non par une cryo-substitution, et en règle générale, enrobé dans des résines partiellement hydrophiles. Afin d'aller plus en avant dans la connaissance et la caractérisation des domaines qui constituent le noyau eucaryote, une étude en microscopie électronique des cryo sections hydratées (CEMOVIS) a été effectuée, permettant d'observer le noyau à l'état natif, sans aucune fixation chimique, ni utilisation de colorant qui peuvent être autant de sources d'artefacts liés au réarrangement des molécules et à leur agrégation. Des constituants cytoplasmiques tels que les microtubules dont la présence est représentative de la préservation des structures intracellulaires ont été étudiés.

2. Cryo microscopie des sections hydratées

2.1.1. cryofixation

La cryo fixation des échantillon biologiques sous haute pression permet d'acquérir un niveau remarquable de préservation des structures qui s'y trouvent. Les échantillons en suspension dans notre cas sont aspirés dans un tube en cuivre d'un diamètre interne de 300 μ m. l'échantillon est ensuite vitrifié dans la machine à haute pression de LEICA Empact. Cette étape permet de garder l'eau présente dans l'échantillon sous forme amorphe. En fait le processus de vitrification consiste a congeler l'échantillon à l'aide d'un jet d'azote liquide sous une pression de 2100 bar avec une vitesse plus élevée que celle de la formation des cristaux de glace. L'eau est ainsi encore présente dans l'échantillon sous forme liquide mais avec une extrême viscosité. Les avantages de cette méthode sont : L'observation de l'échantillon à l'état natif, la présence d'eau vitreuse permet le maintien de la répartition ionique dans chacun des compartiments cellulaires. De plus cette méthode permet l'observation des structures sans l'utilisation de colorants ni fixateur chimiques qui peuvent être a l'origine en partie de l'agrégation du matériel à observer.

2.1.2. cryosections

le matériel vitrifié en haute pression est taillé en pyramide puis coupé en sections de ~50nm d'épaisseur à l'aide d'un couteau en diamant(Diatom,35°) à une température de -160°C dans un cryo microtome(Leica). Les sections ainsi obtenues en ruban(figure1) sont collectées à l'aide d'un cil pour les déposer sur une grille en cuivre de 1000 mesh recouverte au préalable par un film de carbone évaporé. Le spécimen est transféré dans un microscope électronique à transmission à l'aide d'un cryo transfert(Gatan) qui permet d'observer l'échantillon à basse température. Il est a noté que la température d'observation ne doit pas monter au-delà de -130°C sous peine de voir l'eau qui compose le spécimen passer de l'état vitreux à l'état cristallin. La formation de cristaux de glace

s'accompagne de dommages considérables au sein de l'échantillon. L'état vitreux des sections est vérifié par diffraction électronique. L'eau présente dans les spécimens les rend très sensibles au faisceau d'électron, l'imagerie est donc effectuée en mode low-dose qui permet de limiter au maximum la dose d'électron qu'ils reçoivent.

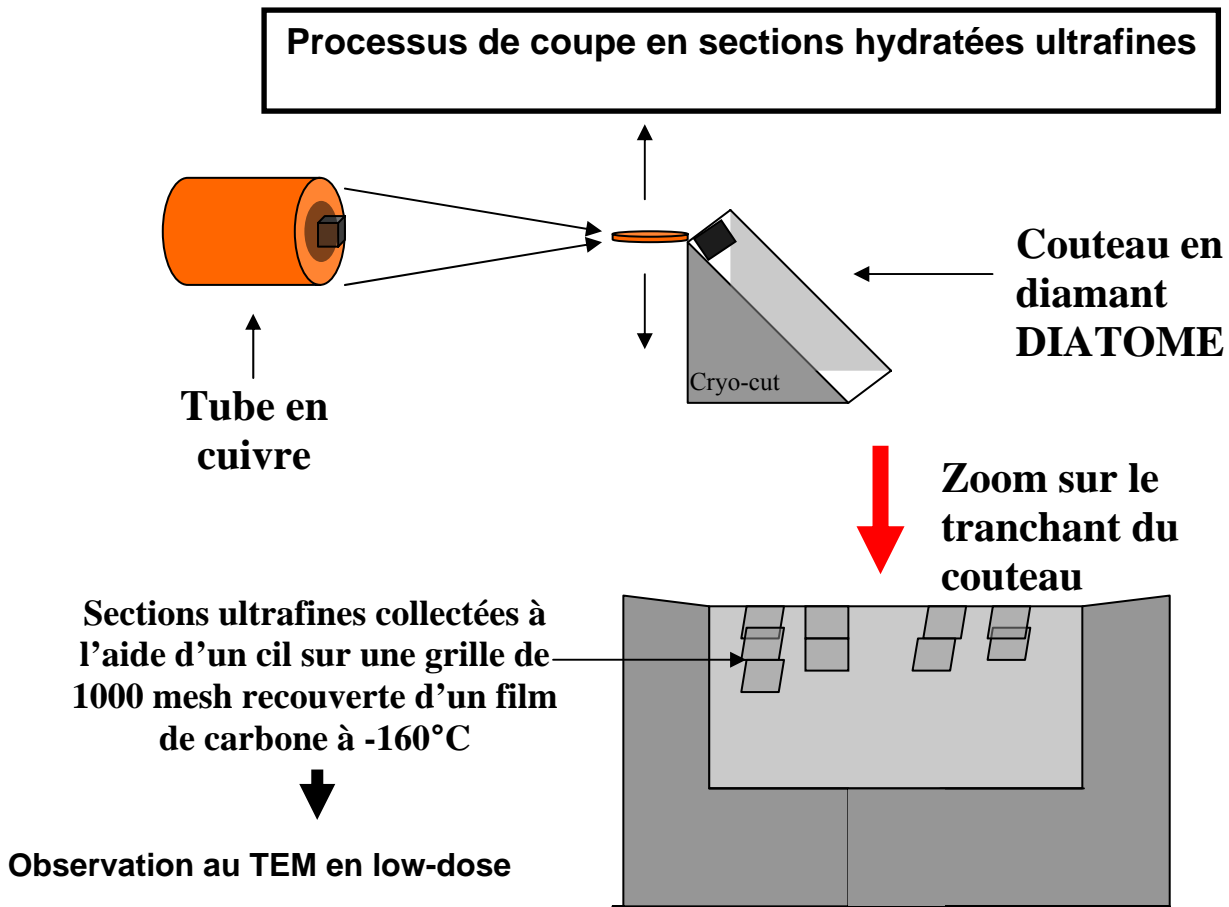


Fig. 1 – Cryo sections de spécimens biologiques précédemment cryofixés par haute pression.

3. Etude sur les cellules eucaryotes d'ovaire de hamster

3.1.1. Les microtubules comme indicateur de qualité de fixation des cellules eucaryotes

Dans le cadre de l'étude de l'architecture du noyau de cellules eucaryotes d'ovaire de hamster, la présence de nombreux microtubules au niveau du cytoplasme des cellules observées permet d'estimer la qualité de la fixation de celles-ci. Le fait que les microtubules, structures qui réagissent à leur environnement par une activité de polymérisation et ou dépolymérisation, soient aussi bien préservées est pour nous un indicateur de la qualité de la fixation par haute pression des cellules dont nous voulons observer le noyau.

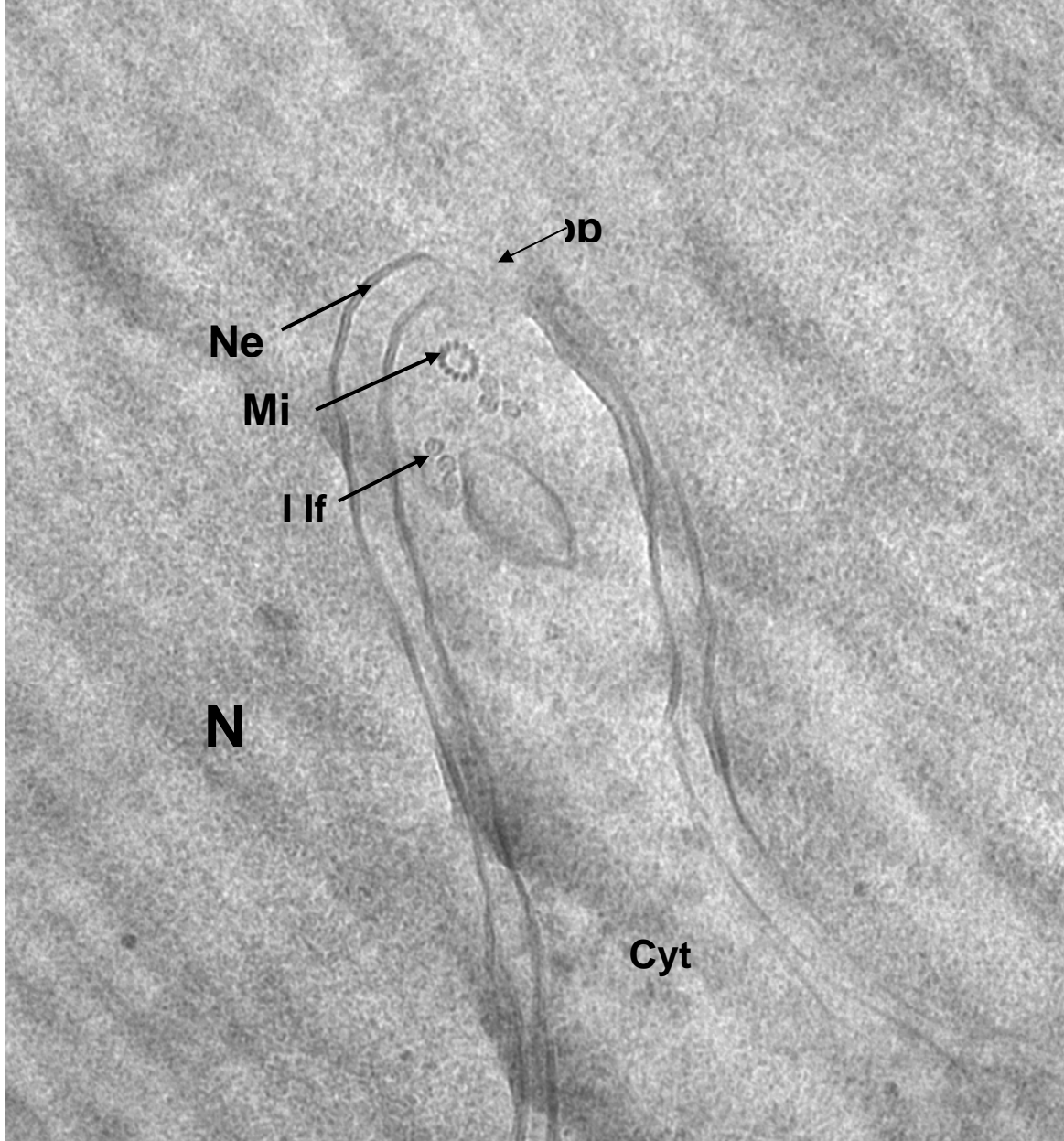


Fig. 2 - Protubérance cytoplasmique(Cyt) dans le noyau (N) d'une cellule CHO observée en cryo section hydratée après fixation à haute pression. On peut observer un microtubule(Mic) à 13 protofilaments proche de la membrane nucléaire externe(Enm) et d'un pore nucléaire(Np) accompagné par des filaments intermédiaires(If) avec une résolution proche des 5nm. Ceci illustre le fait que les microtubules sont souvent localisés dans l'entourage de l'enveloppe nucléaire. Cette image démontre la puissance de la méthode qui même sans l'utilisation de colorants, offre un contraste suffisant pour observer des structures en haute résolution. La barre représente 100nm.

3.1.2. Le noyau eucaryote vu en cryo microscopie des sections hydratées

L'organisation du noyau fixé chimiquement en domaines structuraux est délimitée par la membrane nucléaire. Le noyau est divisé en deux principaux compartiments : le nucléoplasme et le nucléole. Le nucléole est composé d'un composant fibrillaire dense, un centre fibrillaire et un composant granulaire. Le nucléoplasme plus complexe est composé de la chromatine condensée préférentiellement localisée à proximité de la membrane nucléaire mais pas exclusivement. On la retrouve aussi proche du nucléole. A la périphérie de celle-ci, on trouve les granules périchromatiniens, site d'accumulation des ARN pré messagers pressentis comme transporteur de ces derniers jusqu'aux pores nucléaires où ils seront expulsés vers le cytoplasme. Les fibrilles périchromatiniennes quant à elles regroupent l'ensemble des sites de transcription et d'épissage des ARN pré messagers. Le nucléoplasme est aussi composé de l'espace interchromatinien qui contient les granules interchromatiniens. Si on observe attentivement la figure 3, on retrouve avec une certaine exactitude ces mêmes éléments sur les noyaux cryofixés observés en sections hydratées.

Mais alors que la chromatine condensée dans le cas de matériel chimiquement fixé ressemble à de gros amas noirs très peu définis, elle apparaît très finement structurée avec une texture granuleuse dans le cas de matériel hydraté. Cette définition la différencie indubitablement de l'espace interchromatinien qui apparaît comme une mer plus ou moins lisse remplis d'éléments avec peu de contraste. En fait le problème rencontré sur le matériel hydraté n'est le manque de contraste en lui-même mais plutôt le pléthore d'informations superposées sur l'épaisseur de la section.

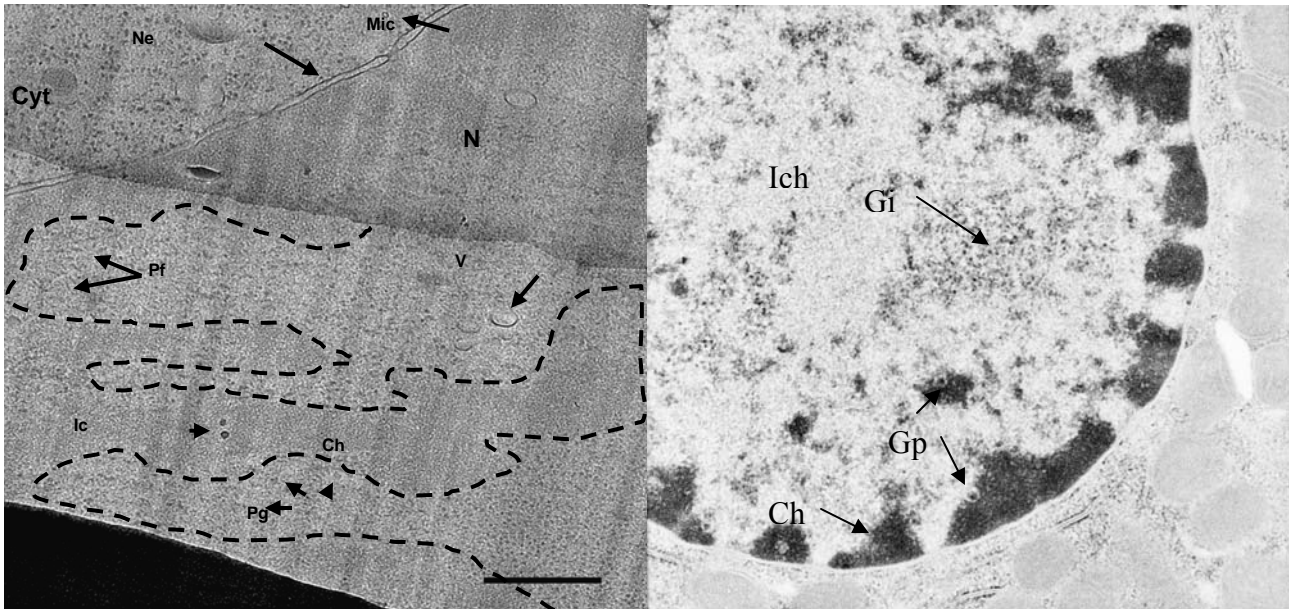


Fig. 3 – Micrographes de cellules CHO en cryo microscopie des sections hydratées à gauche et en préparation classique en résine à droite. Même si la plupart des domaines connus sont retrouvés en cryo microscopie, on s'aperçoit par exemple que la chromatine condensée a une structure granuleuse très homogène contrairement à ce qui peut être observé sur sections en résine. Certains domaines ne sont pas encore identifiés en cryo section tels que les granules interchromatiniens. La barre représente 500nm

4. conclusion

L'observation d'éléments cytoplasmiques tels que les microtubules a permis de s'assurer d'atteindre sur du matériel cryofixé et observé en sections hydratées, une résolution suffisante pour caractériser les différents domaines du noyau de cellules eucaryotes comme les cellules CHO. La résolution obtenue sur les microtubules et autres filaments intermédiaires nous permet raisonnablement d'espérer aller plus loin encore dans l'étude de l'architecture du noyau en haute résolution. Même si pour le moment tous les domaines du noyau n'ont pas été caractérisés, nous gardons grand espoir de les identifier en utilisant des méthodes de marquage pré-fixation.

Remerciements: A Stan Fakan pour les images de noyaux enrobés en résine et à Jacques Dubochet pour son soutien permanent dans mon travail de thèse.

Micro-analyse et imagerie synchrotron de matériaux mous et biologiques

Jean DOUCET, Barbara FAYARD

Laboratoire de Physique des Solides, Bât.510, Université Paris-Sud F-91405 Orsay
doucet@lps.u-psud.fr

Résumé: *L'association de divers équipements de focalisation des faisceaux de rayons X (capillaire de verre, lentille de Bragg-Fresnel, lentille réfractive, guide d'onde, miroirs courbes Kirkpatrick-Baez) avec les faisceaux très faiblement divergents et très brillants issus des sources synchrotron de troisième génération permet maintenant de produire des faisceaux micrométriques ou submicrométriques. Deux grandes familles de techniques en bénéficient: les techniques de micro-analyse et les microscopies à balayage. Les potentialités de ces nouvelles techniques (microscopie X, micro-tomographie X, micro-fluorescence X, spectroscopie micro-XANES, micro-tomographie, microélectronique IR, microscopie UV) sont présentées.*

1. Introduction

Le développement récent et spectaculaire des techniques de microanalyse utilisant le rayonnement synchrotron de troisième génération ouvre de nombreuses perspectives en imagerie. Il existe maintenant une douzaine de techniques permettant d'imager de façon sélective un paramètre chimique ou structural. Certaines d'entre elles sont des techniques de balayage qui tirent profit de la possibilité de focalisation micrométrique ou submicrométrique des faisceaux, d'autres sont des techniques de champ plein. Leurs domaines d'application sont très variés: microélectronique, géologie, chimie, environnement. Elles sont particulièrement bien adaptées à l'étude des systèmes biologiques et des matériaux dits mous grâce notamment à leur résolution spatiale, à la possibilité de s'affranchir de toute préparation des échantillons et de les observer dans des conditions proches de leur environnement naturel.

2. Les nouveaux outils d'imagerie microstructurale sélective utilisant les sources de rayonnement synchrotron

2.1. Les techniques à balayage

L'association de divers équipements de focalisation des faisceaux de rayons X (capillaire de verre, lentille de Bragg-Fresnel, lentille réfractive, guide d'onde, *miroirs courbes Kirkpatrick-Baez*) avec les faisceaux très faiblement divergents et très brillants issus des sources synchrotron de troisième génération permet maintenant de produire des faisceaux submicrométriques. Il suffit alors de placer les échantillons sur des platines munies de dispositifs de translation très précis pour créer les conditions d'imagerie à balayage. Les techniques à balayage les plus utilisées aujourd'hui sont les suivantes:

la micro-diffraction

C'est la combinaison de la diffraction classique avec un micro-faisceau de quelques μm^2 de section. L'information structurale concerne la géométrie des conformations moléculaires et des arrangements supramoléculaires. Plus les systèmes sont organisés, plus l'information que l'on peut en extraire est riche. Les systèmes fibrillaires (protéines fibreuses, cellulose, polymères) et lamellaires (lipides) se prêtent bien à ce type d'analyse. La micro-diffraction permet d'obtenir des informations à partir de quelques nanogrammes seulement d'échantillons. Elle est particulièrement bien adaptée pour les études *in situ* d'échantillons rares, sous contrainte ou hétérogènes.

la micro-fluorescence X

Cette technique fournit la cartographie des éléments chimiques constitutifs de l'échantillon avec une résolution spatiale pouvant atteindre 0,2 μm . Elle est d'une très grande sensibilité puisque des éléments dont la concentration n'excède pas le ppb sont détectables. Elle est particulièrement efficace pour détecter la présence d'atomes exogènes en très faible teneur. La détection de plusieurs éléments peut s'effectuer au cours de l'acquisition de la même image.

le micro-XANES

Il s'agit d'une technique de spectroscopie d'absorption au seuil d'absorption X d'un élément donné. Elle se pratique auprès des sources de rayonnement synchrotron depuis de nombreuses années. L'analyse des oscillations du coefficient d'absorption fournit l'état de valence de l'élément étudié et permet donc de révéler ou suivre un état ou une réaction chimique. Le micro-faisceau permet de réaliser ce type d'étude sur des matériaux hétérogènes à l'échelle du micron. Le mode en cartographie se pratique également et permet de d'accéder à la répartition spatiale des formes chimiques de l'élément étudié.

la spectromicroscopie infrarouge

La combinaison de la spectroscopie FTIR avec une platine de déplacement permet d'établir la cartographie des fonctions chimiques. Cette technique se pratique en laboratoire avec une source classique de type global, mais son faible flux n'autorise pas raisonnablement le mode en balayage avec une résolution inférieure à 10 μm . L'utilisation de la source synchrotron (mille fois plus brillante que la source global) permet de s'affranchir de cette limitation et d'atteindre une résolution spatiale de 3 μm .

la spectromicroscopie ultraviolet

Cette technique est encore peu répandue. Elle consiste à coupler un microscope classique à une source synchrotron, ce qui permet d'accroître ses possibilités. La technique peut se décliner en plusieurs sous-techniques, particulièrement intéressante est la possibilité de décomposer le signal de fluorescence en ses diverses composantes temporelles en mode cartographie avec une résolution pouvant atteindre le nm.

2.2. Les techniques de champ plein

La seconde famille de techniques d'imagerie est constituée par la famille des techniques de champ plein. Ces techniques, qui dérivent de la radiographie d'absorption X, ne nécessitent pas de faisceaux sub-micrométriques, les images de radiographie X sont collectées sur des détecteurs bidimensionnels. En travaillant de part et d'autre du seuil d'absorption d'un élément donné, il est possible de sélectionner la contribution de l'élément. Par ailleurs, l'exploitation de la cohérence naturelle des faisceaux issus des sources de troisième génération permet de travailler en mode contraste de phase, mode qui augmente considérablement le contraste des images aux interfaces. Les techniques principales sont: la microscopie X-mous, la micro-tomographie et l'imagerie en contraste de phase.

la microscopie X-mous

Il s'agit réellement d'une technique de microscopie au sens propre du terme qui travaille dans le domaine des X-mous. Le principe optique de base est le même que pour un microscope optique ou électronique à transmission, les lentilles convergentes sont constituées par des systèmes multicouches de densité alternée. La résolution est de l'ordre de quelques dizaines de nm. L'intérêt de cette technique pour les échantillons biologiques réside dans le fait qu'en travaillant dans la gamme énergétique de 250 à 500 eV – dite fenêtre de l'eau - l'absorption de l'eau est très faible par rapport à celle des matériaux biologiques, ce qui permet de travailler directement sur des échantillons dans un milieu aqueux. Cette technique permet par ailleurs de s'affranchir de toute préparation spécifique des échantillons, le contraste étant naturel.

la micro-tomographie X

Le principe est celui de la tomographie classique avec reconstruction d'un objet en volume à partir d'une série de radiographies prises sous des angles différents. La source de rayonnement synchrotron permet d'améliorer la qualité des images grâce à l'utilisation d'un faisceau monochromatique et parallèle. La résolution, qui dépend seulement de la résolution du détecteur, est de l'ordre de 0,5 μm . Le contraste

avec les rayons X est celui de la densité, cette technique est bien adaptée à l'étude des milieux hétérogènes comme les mousses et les milieux composites.

le contraste de phase

Le rayonnement synchrotron possède une cohérence naturelle qui peut donner lieu à des phénomènes de contraste de phase, c'est-à-dire un renforcement de la diffusion des rayons X par l'interface entre deux milieux de densité différente, voire à des franges d'interférences si le détecteur est suffisamment éloigné de l'objet. Cette possibilité de travailler en mode contraste de phase est couplée à la microscopie X et à la tomographie, elle permet de révéler des détails invisibles en mode classique de contraste par absorption.

3. Comparaison aux autres techniques de microscopie

Les techniques d'imagerie à balayage comme les techniques de champ plein ne nécessitent pas de préparation spécifique des échantillons et le contraste est naturel, sans nécessité de marqueurs spécifiques. Elles peuvent se pratiquer sur des échantillons biologiques dans des conditions qui sont proches du milieu physiologique naturel, et s'accommodent aisément de conditions d'environnement variées, autorisant par exemple le suivi en temps réel de modifications induites par des facteurs physico-chimiques, ce qui est important pour les matériaux mous. Le second avantage des techniques d'imagerie utilisant le rayonnement synchrotron est leur grande sélectivité, aussi bien au plan chimique qu'au plan structure moléculaire/supramoléculaire ou bien encore au plan des hétérogénéités macroscopiques.

La résolution spatiale de ces techniques synchrotron est moins bonne que celle de la microscopie électronique ou de l'AFM, en revanche elles permettent d'étudier les échantillons en volume et ne nécessitent pas de coupes fines.

En termes de destructivité, les techniques utilisant le rayonnement X synchrotron se situent entre la microscopie électronique et les techniques optique. La pertinence des observations requiert quelques précautions : les expériences doivent s'effectuer assez rapidement, en minimisant le temps d'irradiation sous faisceau afin d'éviter des phénomènes de dégradation. De manière générale, les échantillons les plus fragiles sont les échantillons très hydratés, tels que les échantillons biologiques, le recours aux techniques cryogéniques peut alors s'avérer nécessaire. Pour la majorité des autres échantillons, l'endommagement sous faisceau X reste un problème mineur qu'il convient d'estimer pour chaque cas. La complémentarité avec les autres techniques de microscopie est donc évidente. Les sources synchrotron, qui s'étendent sur une large palette énergétique de l'infrarouge aux X-durs, permettent soit d'améliorer des techniques existant déjà avec des sources de laboratoire, soit de donner naissance à de nouvelles techniques. Selon la problématique précise, il y aura intérêt à utiliser telle(s) ou telle(s) technique(s), en gardant néanmoins à l'esprit que l'accès aux centres de rayonnement synchrotron est encore malheureusement limité par le faible nombre d'installations et d'équipement de microscopie. La demande est très supérieure à l'offre, certains synchrotrons s'efforcent de mettre en place un accès plus rapide et plus simple que celui pratiqué jusqu'à maintenant.

4. Bibliographie

Il est évidemment impossible de dresser une liste de références d'articles sur le sujet tant ils sont nombreux. Même la bibliographie sur le sujet comporte de très nombreux ouvrages. Le lecteur intéressé par la microscopie à rayons X pourra consulter le recueil des proceedings de la conférence "7th International Conference on X-ray Microscopy", Ed J. Susini, D. Joyeux & F. Polack, J. Phys. France vol. 104, EDP Sciences (2002). Des informations et des exemples sur les techniques d'imagerie synchrotron peuvent être obtenues à partir des sites web des principaux centres de rayonnement synchrotron. Le site de l'ESRF à Grenoble, www.esrf.fr, présente de nombreux exemples et fournit la liste des sites web des autres centres dans le monde entier. Pour la microscopie infrarouge, il est recommandé de consulter la rubrique expériences – superACO - Microscopie (SA5) sur le site: www.lure.u-psud.fr

La gonio-spectro-photo-colorimétrie appliquée à l'étude des œuvres d'art

Mady ELIAS

Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France
C2RMF – UMR 171 CNRS
elias@physique.univ-evry.fr

1. Introduction

Les œuvres du patrimoine sont précieuses, fragiles, uniques et parfois non déplaçables. Leur étude, dans un but de conservation, de restauration ou d'histoire de l'art, nécessite donc des méthodes d'analyse non invasives, non destructives et sans contact entre l'appareil et l'œuvre. Les dispositifs doivent être portables, adaptables à toute position de la surface étudiée, de façon à réaliser des mesures in situ. Enfin, les résultats doivent pouvoir être obtenus en temps réel, pour conduire à une intervention ou une décision immédiate.

C'est en respectant ces critères qu'a été développé au C2RMF un dispositif d'analyse de surfaces permettant de chiffrer leur état géométrique, d'identifier leurs composants chromogènes (pigments et colorants) et d'établir un constat quantitatif de la palette des couleurs d'une œuvre d'art. Couplées à une modélisation des flux lumineux diffusés par les couches picturales, les mesures permettent également de reconnaître certaines techniques picturales sans avoir recours à des prélèvements ainsi que de prédire les modifications d'aspect visuel liées à la présence ou au vieillissement de vernis.

Le domaine d'application d'une telle goniospectrocolorimétrie a depuis quelques temps dépassé celui des œuvres d'art. Il s'étend actuellement à divers supports colorés tels que les métaux et leurs patines, les tissus, les papiers, les verres et les céramiques.

2. L'appareil

Pour rendre le dispositif léger, de petite dimension et portable, une *configuration de rétrodiffusion* a été choisie. Un faisceau collimaté de lumière blanche, conduit par un faisceau de fibres optiques éclaire un disque de 6 mm de diamètre de la surface étudiée. La lumière diffusée par cette surface est collectée par un second faisceau de fibres optiques de même direction que la lumière incidente, mélangé aléatoirement avec le faisceau incident.

Les deux faisceaux traversent la même optique achromatique, solidaire du porte-fibres. La distance entre les fibres et la surface étudiée est ainsi conservée par focalisation. Ceci est obtenu par un réglage fin en translation de la position des fibres jusqu'à l'obtention d'un signal maximum. Cette technique permet d'*éviter tout contact* entre l'appareil et la surface et d'assurer la reproductibilité des mesures.

La lumière recueillie est ensuite classiquement dispersée par un réseau en réflexion, transformée en information électrique par une barrette CCD, numérisée par un CAN et enregistrée informatiquement.

Un goniomètre a été ajouté au dispositif pour modifier l'angle de rétrodiffusion. L'ensemble est lié à une rotule de rotation et à un pied photographique permettant d'adapter l'appareil à toute position des surfaces étudiées.

Les angles sont mesurés à 0,5° près, les luminances et les facteurs de réflectance sont obtenus avec une précision de 1%. Les coordonnées trichromatiques sont calculées à 0,1 unité près. Le pouvoir de résolution en longueur d'onde vaut 3 nm.

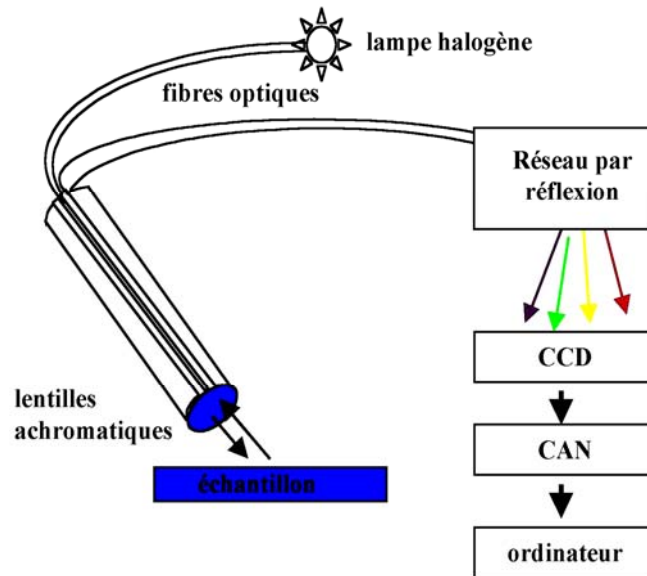


Fig. 1 – Schéma de principe du goniospectrophotocolorimètre

3. La fonction goniophotométrie

3.1. Principe

L'étude de la luminance L recueillie en fonction de l'angle de rétrodiffusion θ , pour une longueur d'onde fixe, permet d'accéder au chiffrage de l'état géométrique de la surface étudiée, c'est à dire à ses écarts par rapport à un plan moyen [1].

En effet, dans le cadre de l'optique géométrique, toute surface rugueuse aléatoire peut être décomposée en une série de micro-facettes. Dans une configuration de rétrodiffusion, seules les micro-facettes possédant une normale confondue avec l'axe optique du dispositif donneront lieu à un signal réfléchi (Fig.2a). La luminance recueillie sera alors directement proportionnelle à la densité de probabilité de ces normales. Une surface parfaitement plane ne donnera de signal réfléchi que pour $\theta = 0^\circ$. Plus la surface sera rugueuse, plus le nombre de micro-facettes inclinées sera importante et plus la courbe de luminance en fonction de θ sera étalée angulairement (Fig. 2b).

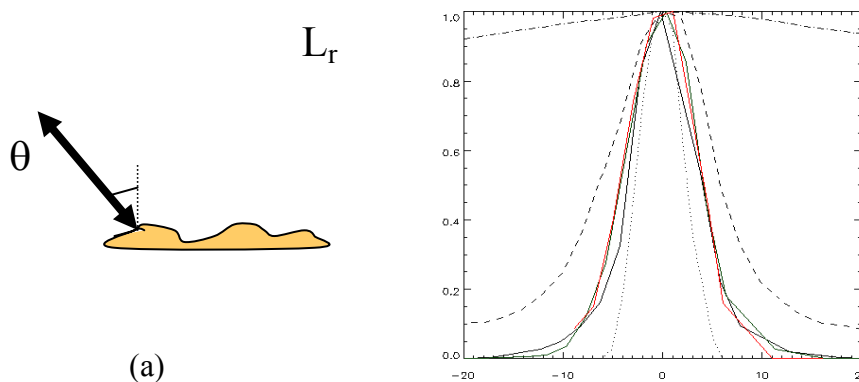


Fig. 2 – (a) Surface rugueuse décomposée en micro-facettes et éclairée en rétrodiffusion
(b) Répartition de la luminance relative en fonction de l'angle de rétrodiffusion selon la rugosité de la surface étudiée.

Il est alors possible de calculer l'angle efficace $\theta_{r.m.s.}$ correspondant à la répartition des micro-facettes et d'en déduire le rapport h/l donnant la rugosité r.m.s. h divisée par la longueur de corrélation l . Ce rapport est caractéristique des écarts de la surface étudiée par rapport au plan moyen. Plus il est important, plus la surface est rugueuse.

3.2. Applications

Cette technique d'analyse permet de distinguer les différentes techniques artistiques d'application des fonds d'or [2]. Selon le support utilisé, la feuille d'or est polie (or sur bol), la feuille d'or ne peut pas être polie (or à la mixtion) ou bien on est en présence de peinture à l'or (or coquille). La surface de l'or est alors de plus en plus rugueuse. La goniophotométrie fournit des rapports h/l respectivement de l'ordre de 0,1, 0,2 et 0,4 qui permettent de deviner la technique utilisée sans avoir à effectuer de prélèvement.

4. La fonction spectrophotométrie

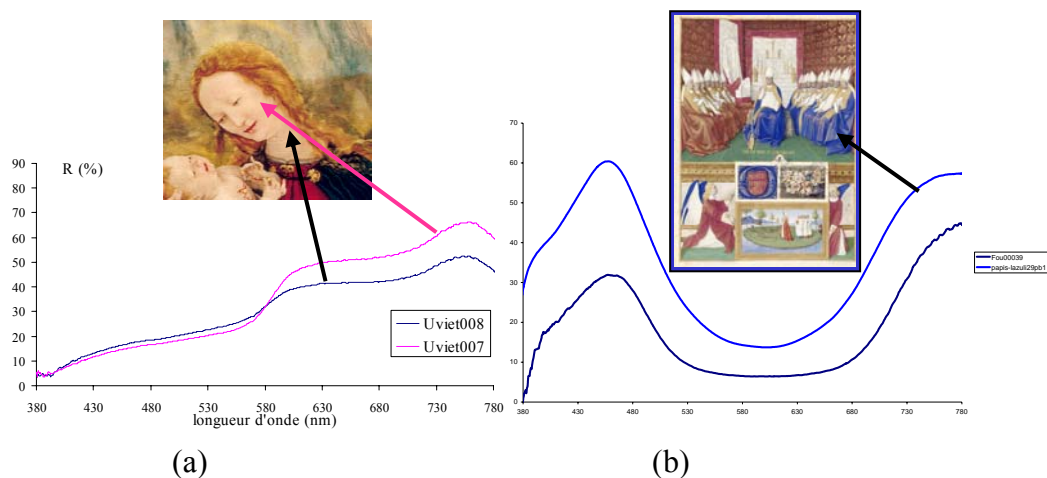
4.1. Principe

Le spectre de réflectance diffuse décrit les variations du facteur de réflectance (luminance diffusée par l'échantillon divisée par celle que diffuserait un diffuseur parfait) en fonction de la longueur d'onde. Il est enregistré pour un angle de rétrodiffusion fixe et égal à 22° , pour lequel la diffusion de volume l'emporte sur la diffusion de surface. Dans ces conditions, il représente l'étiquette optique des centres diffuseurs, chromophores de la surface étudiée.

4.2. Applications

La comparaison de ces spectres permet ainsi de distinguer les chromophores et de détecter, par exemple, la présence de repeints de natures différentes (Fig 3.a).

Une base de données spectrales de pigments et colorants individuels a été établie de façon à ce que seule la diffusion volumique de la lumière soit enregistrée, sans effet de surface [3]. La comparaison informatique d'un spectre inconnu avec ces spectres de référence permet d'identifier en temps réel la nature du pigment ou du colorant (Fig. 3.b).



*Fig.3 – (a) Détection de repeints dans le visage de la Vierge de l'Annonciation du retable d'Issenheim de Grünewald : les extrema des spectres n'ont pas la même longueur d'onde
(b) Reconnaissance de lapis-lazzuli sur le livre d'heures d'Etienne Chevalier de Jean Fouquet : spectre inconnu (en haut) et spectre du lapis-lazzuli de la base de donnée (en bas).*

Dans le cas des colorants, c'est actuellement la seule méthode de reconnaissance non destructive. La rugosité de la surface étudiée se traduit par une translation verticale ascendante du spectre par rapport au spectre de référence. La mesure de cette translation conduit au chiffrage de l'état de la surface par le rapport h/l [4].

5. La fonction colorimétrie

5.1. Principe

Les coordonnées trichromatiques sont calculées à partir du spectre de réflectance mesuré, du spectre de l'illuminant D65 et de la réponse spectrale de l'œil standard, défini par la CIE-1931. Chaque point de mesure est ainsi caractérisé par trois coordonnées décrites dans l'espace $L^*a^*b^*$. L'axe L^* définit la clarté, l'axe a^* s'étend du vert au rouge, l'axe b^* s'étend du bleu au jaune. Ce chiffrage de la couleur est propre à la configuration choisie, ici celle de la rétrodiffusion.

5.2. Applications

Le chiffrage de la couleur permet d'établir tout d'abord le constat d'état d'une œuvre d'art ainsi que son suivi au cours du temps. Il permet également de décrire quantitativement la palette d'un peintre à des fins de comparaisons temporelles ou artistiques. Plusieurs représentations graphiques ont été développées : une représentation globale à 3D (Fig 4a), une représentation à 2D utilisant l'analyse en composantes principales (Fig 4.b).

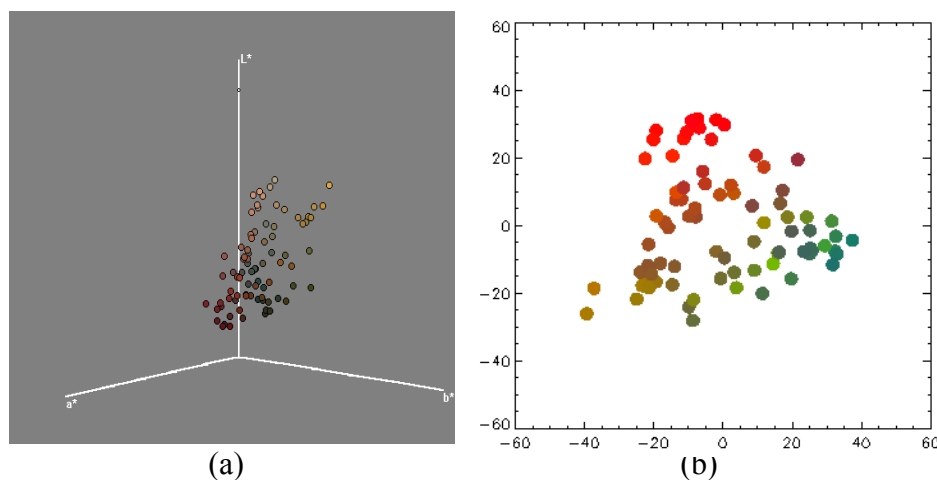


Fig.4 – (a) Représentation 3D des couleurs du retable d'Issenheim de Grünewald
(b) Représentation en analyse en composantes principales des couleurs du même retable

Les coordonnées trichromatiques permettent également de distinguer entre différentes techniques artistiques [5]. Pour obtenir des surfaces de différentes nuances à partir du même pigment, dans un drapé par exemple, il est possible de faire varier soit le nombre de couches picturales (glacis), soit la quantité de pigment blanc ajouté (mélange pigmentaire), soit d'utiliser la technique de la fusion optique (pointillisme). Les variations de la clarté L^* en fonction de la saturation (ou chroma) $C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$ permettent d'identifier ces trois techniques, sans aucun prélèvement, comme le montre la Fig. 5.

6. Conclusion

L'originalité de l'appareil présenté porte sur sa configuration particulière de rétrodiffusion ainsi que sur sa prise de mesures sans contact. Il permet de chiffrer l'état géométrique d'une surface, d'identifier les chromophores qui la constituent, de distinguer plusieurs techniques artistiques différentes et d'établir un constat d'état des couleurs d'une œuvre, en temps réel et sans prélèvement.

Associées à une modélisation des flux lumineux recueillis fondée sur la résolution de l'équation de transfert radiatif [6, 7], les mesures précédemment décrites permettent également d'interpréter et de prévoir les modifications d'aspect visuel d'une surface colorée lorsqu'elle est recouverte d'un vernis [8, 9, 10]. Cette étude a deux objectifs : produire l'image d'une œuvre virtuellement vernie ou dévernée, fournir des vernis adaptés aux besoins de l'artiste ou du restaurateur.

Toujours liées à la modélisation, les mesures précédentes permettent enfin de déterminer les propriétés optiques intrinsèques des centres diffusants (coefficients d'absorption k et de diffusion s des pigments) nécessaires pour prédire de nouveaux effets visuels [11].

Une version commerciale de cet appareil offrant des possibilités étendues sera disponible prochainement [12]. En effet, les analyses colorimétriques et spectrophotométriques pourront être réalisées simultanément sur plusieurs points alignés sur la surface de l'objet étudié, tout en améliorant la compacité et la portabilité de l'instrument.

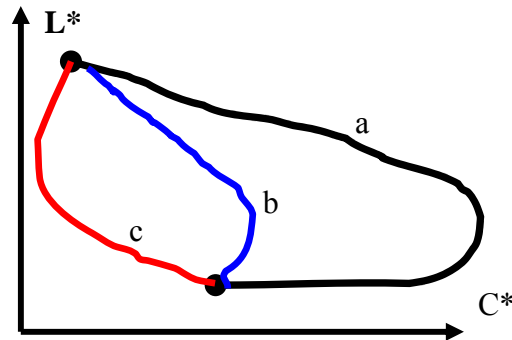


Fig.5 – Variation de la clarté L^* en fonction de la saturation $C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$ pour différentes techniques artistiques (a) : glacis, (b) : mélange pigmentaire, (c) : pointillisme.

Références

- [1] M. Elias, M. Menu, Experimental characterisation of a random metallic rough surface by spectrophotometric measurements in the visible range, *Opt. Commun.* 180, 191-198, (2000)
- [2] M.Elias, M.Menu Characterization of surface states on patrimonial works of art, *Surf. Eng.* vol 17 n°3 225-229, (2001)
- [3] G.Dupuis, M.Elias, L.Simonot, Pigment identification by fiber-optics diffuse reflectance spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 56 n°10, 1329-1336, (2002)
- [4] L.Simonot, M.Elias, Color change due to surface state modification, *Col. Res. Appl.* 28 n°1, 45-49, (2003)
- [5] L. SIMONOT, *Etude expérimentale et modélisation de la diffusion de la lumière dans une couche de peinture colorée et translucide. Application à l'effet visuel des glacis et des vernis*, Thèse de doctorat, Paris VI, (2002) <http://tel.ccsd.cnrs.fr/documents/archives0100/22/38/>
- [6] M.Elias, G.Elias, New and fast calculation for incoherent multiple scattering, *J. Opt. Soc. Am. A* 19 n°4, 894-901, (2002)
- [7] M. Elias, G. Elias, Radiative transfer in inhomogeneous stratified media using the Auxiliary Function Method, *J. Opt. Soc. Am. A* 21, 580-589, (2004)
- [8] M. Elias, L. Simonot, M. Menu, Bidirectional reflectance of a diffuse background covered by a partly absorbing layer, *Opt. Commun.* 191, 1-7, (2001)
- [9] M. Elias, L. Simonot, Bi-directional reflectance of a varnished painting Part 1: Influence of the refractive indices without using the approximations of Saunderson correction – Exact computation, *Opt. Commun.* 231 14-25, (2004)
- [10] M. Elias, L. Simonot, M. Thoury, JM Frigerio, Bi-directional reflectance of a varnished painting Part 2: Influence of the refractive indices, surface state and absorption – Experiments and simulations, *Opt. Commun.* 231, 25-33, (2004)
- [11] L. Simonot, M. Elias, Special visual effect of art-glazes explained by radiative transfer equation, *Appl. Opt.* 43, 2580-2587, (2004)
- [12] ELDIM, 1185, rue d'Epron 14200 Hérouville-saint-Clair, France, Tel : 0231947600, Email : eldim@eldim.fr

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

J-M GLOAGUEN

Laboratoire de Structure et Propriétés de l'Etat Solide: UPRESA 8008
Bât C6, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex
Jean-michel.gloaguen@univ-lille1.fr

Résumé: « To get good ultrathin sections is no doubt difficult; however, the beginning technician should take comfort and hope in the thought that thousands of high quality electron micrographs have proven that it can be done » (M.H. Hayat in 'Principles and Techniques of Electron Microscopy - biological Applications, Vol 1, New-York, 1970)

1. Introduction

Des coupes ultrafines, d'épaisseur 20nm, ont été obtenues pour la première fois en 1952 sur l'ultramicrotome développé par Sjöstrand. Depuis, cette technique est de plus en plus utilisée pour l'obtention d'échantillons fins qui seraient difficiles à préparer par d'autres méthodes plus conventionnelles en science des matériaux, tel que l'amincissement ionique. Ce fût d'abord les biologistes qui ont été les gros utilisateurs de la technique. La figure 1 présente un ultramicrotome moderne, équipé d'un système de coupe basse température, fabriqué par Reichert

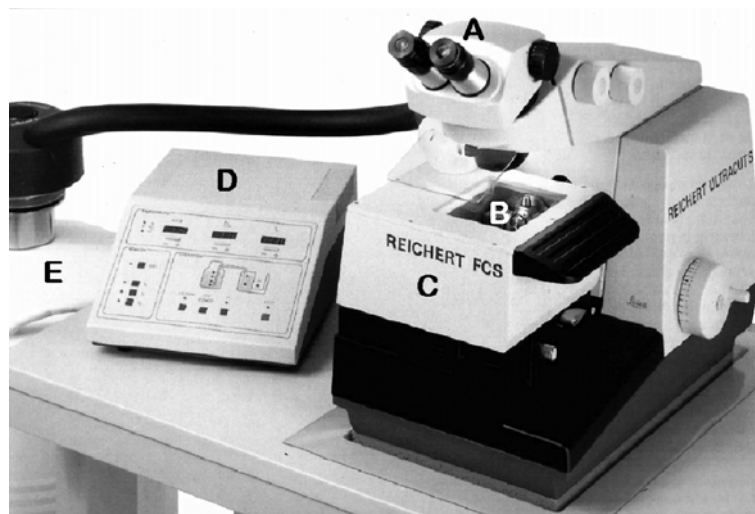


Figure 1: un cryo-ultramicrotome moderne
A: Binoculaire de contrôle, B: Echantillon, C: Système cryogénique,
D: Pupitre de contrôle, E: Réservoir d'azote

2. Principe

Les ultramicrotomes sont des instruments de mécanique d'extrême précision qui permettent de détacher d'un objet des tranches minces d'épaisseur régulière se succédant sous forme d'un ruban de coupes. L'épaisseur de ces coupes varient de l'ordre du micron jusqu'à une dizaine de nanomètres.

Cet appareil se compose principalement de trois parties:

le corps de l'ultramicrotome, très rigide pour s'affranchir de tout phénomène de vibration,
le couteau,

l'objet.

Dans le cycle de coupe, l'objet et le rasoir se déplacent l'un par rapport à l'autre suivant deux étapes distinctes. Dans un premier temps, l'objet se rapproche du couteau, ce qui règle l'épaisseur de la coupe, dans un deuxième temps par un mouvement perpendiculaire au précédent, c'est la coupe proprement dite (figure 2).

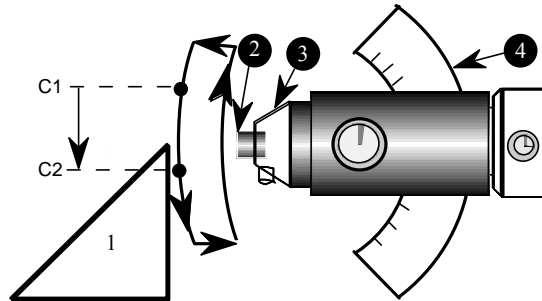


Figure 2: Principe du cycle de coupe

1. Couteau
2. Echantillon
3. Porte-échantillon
4. Segment arqué

C'est par le mécanisme d'avance que l'on règle l'épaisseur de la coupe. Au cours du cycle, l'avance de l'objet ralentit au point de commutation C1, ce déplacement lent se maintenant jusqu'au second point de commutation C2, le retour au point C1 se faisant à une vitesse accélérée. Pendant la course ascendante, l'objet subit automatiquement un mouvement de rétraction et ne risque donc pas de toucher le tranchant du couteau pendant le retour en arrière.

Ce processus se répète de manière systématique et une coupe est obtenue à chaque passage du bloc-échantillon sur le couteau. Les coupes s'organisent sous la forme d'un ruban qui vient flotter sur un liquide contenu dans un bac fixé sur le couteau (figure 3).

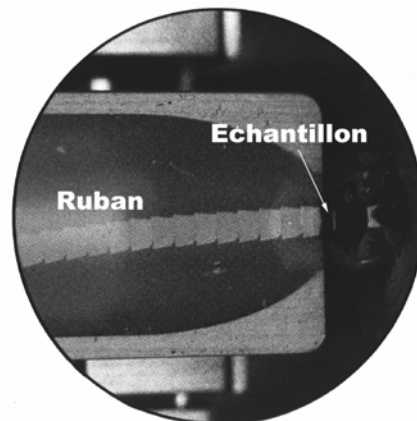


Figure 3: Organisation des coupes

Lors d'une découpe à température ambiante, le liquide de flottaison est de l'eau distillée (il est important que cette eau soit parfaitement propre pour que les coupes ne soient pas contaminées par des impuretés). A basse température, les lames sont recueillies dans une solution à 40/60 de DMSO (dyméthylsulfoxyde) et d'eau distillée. Le couteau ne peut toutefois être porté à une température inférieure à -50°C ; le DMSO devenant visqueux à partir de cette température. Signalons que la littérature suggère parfois d'employer une solution de glycol, utilisable jusqu'à -35°C (S.Y HOBBS, 1980). Il est à remarquer que le dispositif cryogénique assure de manière indépendante le refroidissement de l'échantillon, du couteau et de la chambre dans laquelle est logé le couteau. En pratique le couteau est porté à une température supérieure à celle de l'échantillon; les

coupes peuvent ainsi se dilater sur le liquide de flottaison et les phénomènes de superposition sont ainsi limités.

Ces coupes sont ensuite recueillies directement sur des grilles de microscopie électronique. Ces grilles sont séchées et peuvent être observées.

3. Préparation de l'échantillon

Un échantillon de dimension acceptable, pour pouvoir être fixé dans le porte-échantillon, est découpé dans le matériau à étudier. Cet échantillon est ensuite taillé de façon à obtenir à son sommet un parallélépipède ou une pyramide de 0,2 à 0,5 mm de côté (figure 4).

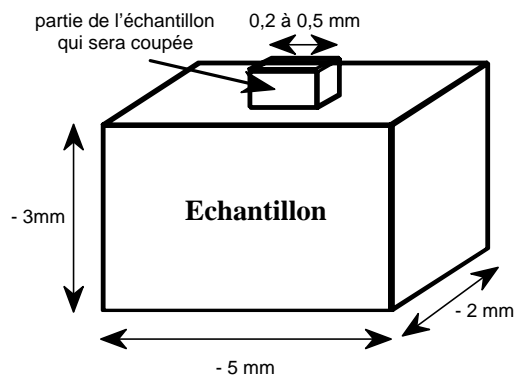


Figure 4: Echantillon préparé pour l'obtention des coupes

Seule cette partie de l'échantillon sera découpée. Afin qu'il ne fléchisse pas au contact du couteau, nous veillons à ce que le bloc de matière à découper ne soit pas trop haut. Les phénomènes de vibrations sont alors minimisés et les chances d'obtenir des lames d'épaisseur régulière augmentées. D'autre part, pour que le ruban de coupes ne se torde pas sur le liquide de flottaison (problème de déchirure), mais défile au contraire perpendiculairement au tranchant du couteau, il faut veiller à tailler un bloc aux faces les plus parallèles possible.

La préparation de la pyramide peut s'effectuer suivant différentes méthodes : soit à l'aide d'une lame de rasoir sous binoculaire, cette méthode est très aléatoire. Elle dépend de « la forme du jour », la qualité de la pyramide n'est pas parfaite (peu de chance d'avoir des coupes en série), probabilité d'endommager l'échantillon non négligeable soit directement sur le microtome à l'aide d'un couteau de verre (figure 5).

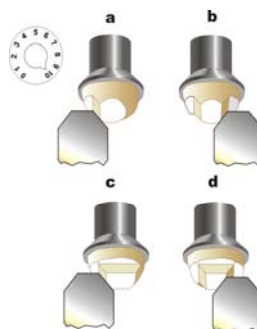


Figure 5: Préparation de l'échantillon à l'aide du microtome en vue de la découpe; à chaque étape le porte-échantillon est tourné d'un angle de 90°

Il est à noter qu'il existe sur le marché, des équipements permettant le façonnage de la face de l'échantillon. Ces appareils sont composés d'un dispositif de fraisage à grande vitesse, d'un stéréo-microscope avec illuminateur pré-aligné. La surface de coupe et la pyramide peuvent ainsi être façonnées rapidement et précisément à la taille désirée, et prennent forme sous contrôle visuel grâce au stéréo-microscope. La surface de coupe lisse et perpendiculaire produite grâce à cette

méthode, réduit l'alignement du couteau sur le bloc, permettant une production de coupes ultrafines dès le début et dans les meilleures conditions. Il n'est plus nécessaire de lisser la surface rugueuse produite habituellement dans un façonnage à la lame de rasoir, puis de changer et d'aligner le nouveau couteau pour produire des coupes.

4. Réglages et choix des paramètres de coupe

Trois paramètres de coupes, spécifiques au matériau étudié, sont à définir, il s'agit de:

1. la vitesse de coupe
2. l'épaisseur des coupes
3. l'angle de coupe: somme de l'angle du couteau β et de l'angle de dégagement α (figure 6).

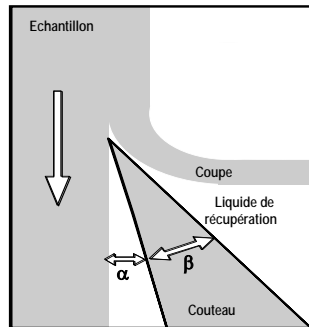


Figure 6: Schématisation de la préparation d'une lame mince.
Mise en évidence des paramètres clés de coupe.

L'influence de ces paramètres, sont connus depuis de longues dates, de manière purement qualitative, par les microtomistes (HAYAT 1970, DEMPSTER 1943, WACHTEL 1966, REID'S 1975, ZIEROLD 1984). Certains auteurs, plus récemment (JESIOR, 1985, 1986), se sont attachés à quantifier leur importance sur la qualité de l'observation. La microtomie est une technique de préparation mécanique, ainsi le critère de qualité retenu est un facteur de compression, définie comme:

$$c\% = \frac{a-b}{a} \times 100$$

ou a et b sont respectivement le grand et le petit axe d'un objet, initialement sphérique, observé après découpe. Les résultats sont présentés sur les figures 7-9.

Il apparaît clairement que la vitesse de coupe n'a que peu d'influence sur la déformation des structures observées. En règle générale, il est préférable d'opérer à faible vitesse (M.H. HAYAT, 1970). Chaque passage de l'échantillon sur le couteau s'accompagne en effet de vibrations entraînant des distorsions de celui-ci. Couper à faible vitesse (inférieure à 3 ou 4 mm/s) permet au système de se relaxer entre deux coupes consécutives. Une vitesse trop élevée conduit au contraire à une superposition des vibrations qui se traduit par des variations d'épaisseur de la lame.

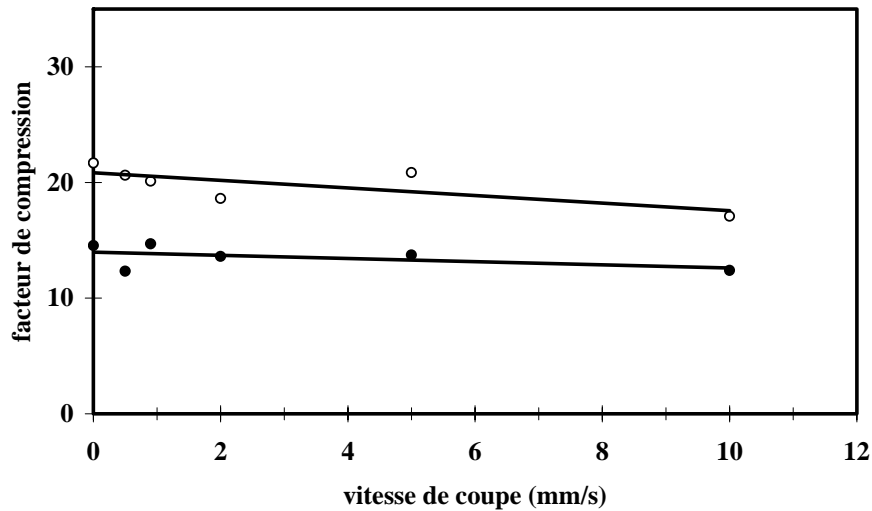


Figure 7: Influence de la vitesse de coupe: • matériau non durci, ◦ matériau durci (JESIOR 1986), $\beta = 35,7^\circ$, $\alpha = 4,8^\circ$, épaisseur de coupe 90 nm.

L'épaisseur des lames est un facteur majeur pour les phénomènes de compression. L'influence est d'autant plus importante que l'épaisseur est faible. Toutefois, pour des épaisseurs supérieures à 50 nm le phénomène semble se stabiliser. L'évolution du facteur de compression est plus marqué pour l'échantillon non durci.

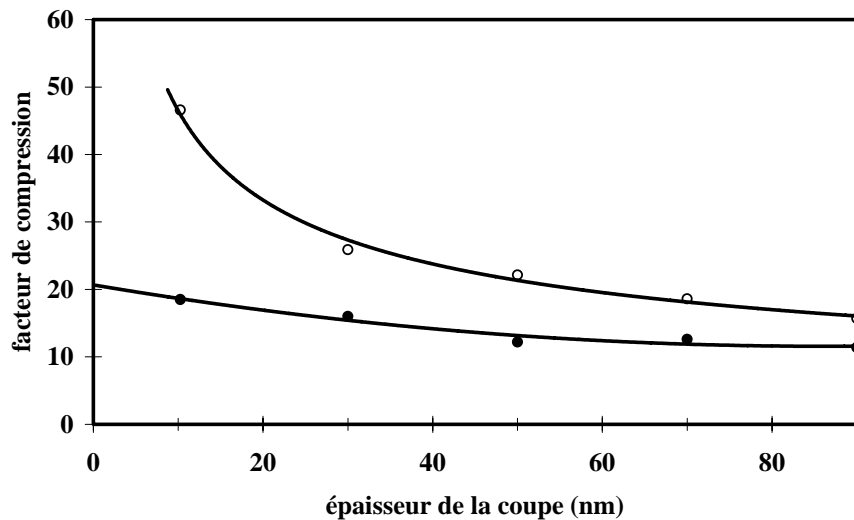


Figure 8 Influence de l'épaisseur de coupe: • matériau non durci, ◦ matériau durci (JESIOR 1986), $\beta = 26,6^\circ$, $\alpha = 4,8^\circ$, vitesse de coupe 0,9 mm/s

L'observation la plus intéressante est la relation qui existe entre compression et angle de coupe. Il est ainsi possible d'obtenir des coupes ultrafines d'échantillons mous, sans introduire de forte de compression, en utilisant un angle de coupe le plus faible possible.

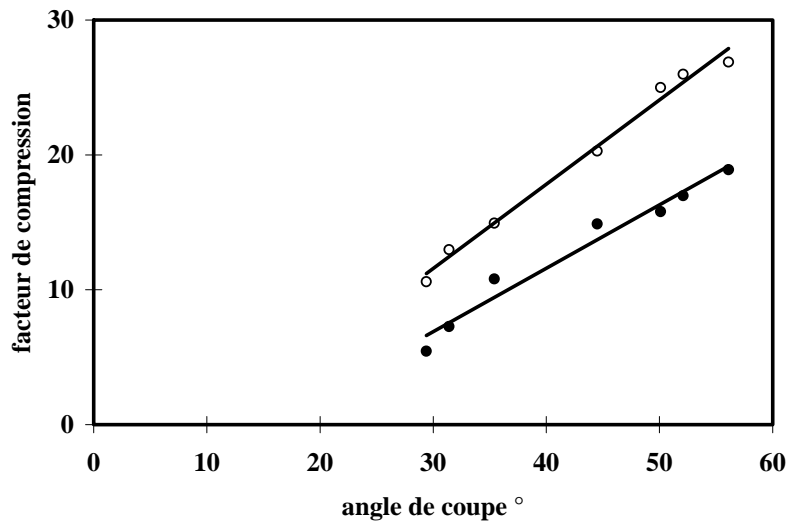


Figure 9: Influence de l'angle de coupe: • matériau non durci, ◦ matériau durci (JESIOR 1986), vitesse de coupe 0,9 mm/s, épaisseur de coupe 90 nm.

Les mélanges de polymères présentent une difficulté supplémentaire de préparation: ce sont des matériaux polyphasés dont chaque constituant peut présenter des duretés différentes (exemple classique des polymères chocs où la phase dispersée est à l'état caoutchoutique, à température ambiante, alors que la matrice est vitreuse). La figure 10 montre une image obtenue par microscopie à force atomique d'un échantillon de polystyrène choc, après surfaçage à l'ultramicrotome. Ce cliché met clairement en évidence une déformation de la phase caoutchoutique à l'intérieur des nodules, malgré l'utilisation d'un angle de coupe faible (la partie caoutchoutique se trouve « étirée » à environ 0,5 μm par rapport à la surface moyenne de l'échantillon). Il est possible s'affranchir de ce phénomène, en durcissant l'échantillon, pendant ou avant la découpe: utilisation de la basse température, colorations sélectives.

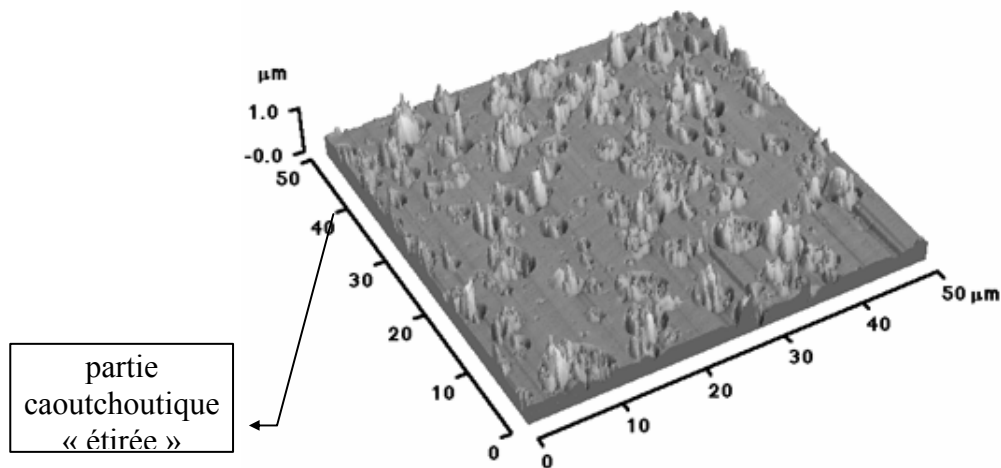


Figure 13-a: Image de microscopie à force atomique d'un échantillon de polystyrène choc après surfaçage à l'ultramicrotome: angle de coupe 35°, épaisseur de coupe 50 nm, vitesse de coupe 1 mm/s

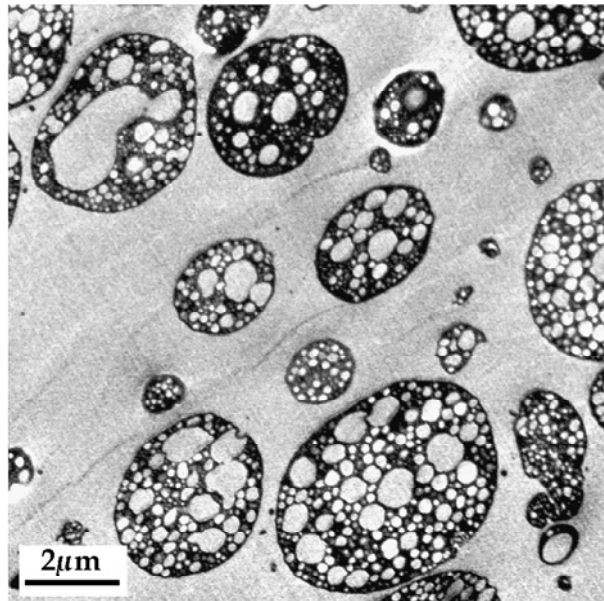


Figure 13-b.: Image en Microscopie Electronique en Transmission d'une lame extraite du même échantillon avec des conditions de coupes identiques.

5. Conclusion

La découpe par couteau diamant grâce à l'ultramicrotome, est de plus en plus utilisée en microscopie électronique en transmission pour la production de lames minces qui seraient difficiles à préparer avec les autres méthodes plus conventionnelles. Simultanément, il y a de nombreuses circonstances où le sectionnement au diamant peut produire des échantillons sans les artefacts nuisibles qui peuvent résulter de l'emploi des méthodes classiques, surtout les artefacts qui influencent la microscopie analytique.

La plupart des matériaux peuvent être sectionnés avec un ultramicrotome aussi bien à température ambiante qu'à basse température. L'article de T. F. Malis et D. Steele intitulé "*Ultramicrotomy for Material Science*" contient une liste impressionnante de matériaux qui ont été coupés, ainsi qu'une excellente liste d'articles et de livres de référence. Cet article présente une première tentative pour développer une méthodologie de l'utilisation de l'ultramicrotome en science des matériaux; il signale les inconvénients de la technique, fournit une liste complète couvrant plus de trois décennies d'applications ingénieuses et peu divulguées, et illustre la diversité de ces applications à l'aide de nombreux exemples. On fait des suggestions pour de nouvelles améliorations afin d'utiliser l'ultramicrotome de façon plus routinière pour les matériaux de pointe modernes et pour les applications en M.E.T exigeant des microanalyses précises.

Contrairement aux sciences de la vie où il existe une abondante littérature traitant de la technique de microtomie, le domaine de la science des matériaux est plus avare d'informations. Toutefois, l'apparition d'ultramicrotomes plus performants, et en particulier, un équipement pour coupe à basse température et de nouveaux types de couteaux diamants, permettent la production de coupes fines, voir ultra-fines, de nombreux matériaux, aussi facilement qu'avec des échantillons biologiques. La gamme de matériaux présentée va du latex à tous les types de matériaux polymères, de l'aluminium à la céramique voir même le saphir.

Cartographie Isotopique des Fibres Capillaires

Philippe Hallégot

L'Oréal Recherche, Aulnay-sous-Bois, France

phallegot@rd.loreal.com

Résumé : Des cartographies haute résolution d'isotopes constitutifs de la fibre ou de traceurs ont été obtenues par Spectrométrie des Ions Secondaires (Secondary Ion Mass Spectrometry = SIMS). Elles ont permis une meilleure connaissance de la structure de la medulla et des pigments de mélanine. Ces cartographies et les rapports isotopiques précis que l'on peut en déduire ont également contribué à la compréhension de l'action d'agents réducteurs utilisés en cosmétique.

1. Introduction :

La composition chimique des cheveux est presque exclusivement déduite de l'analyse de composés extraits de la fibre capillaire. L'inconvénient majeur de cette méthode est le manque de spécificité des extractions. Afin de s'en affranchir, nous avons appliqué la technique SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) [1] à l'analyse chimique *in situ* de cheveux naturels ou traités.

2. Matériel et Méthodes :

2.1. Préparation des échantillons

Les cheveux utilisés dans cette étude proviennent de volontaires d'origine caucasienne. Ces cheveux ont été inclus dans une résine ou congelés puis sectionnés à des épaisseurs variant de 250 nm à 1 micromètre. Les sections ont ensuite été déposées sur un support conducteur. Il est également possible de coucher directement les cheveux sur le support conducteur afin d'en analyser la surface.

2.2. Réduction de la fibre

Certains échantillons de cheveux ont été réduits, avant analyse, par action d'ATG (ammonium thioglycolate) 1M pendant deux minutes ou quarante minutes. La kératine réduite a ensuite été marquée par réaction avec de l'acide iodo-acétique-¹⁴C. La réduction des fibres est une étape majeure de la permanente et du défrisage des cheveux.

2.3. Instrumentation

Deux types de microsondes ont été utilisées : microsonde à source de gallium liquide (Institut Enrico Fermi, Université de Chicago)[2] et microsonde NanoSIMS à source césium (Cameca) [3]. Ces sources délivrent des courants de plusieurs pA, sous quelques kV d'accélération, sur une surface de 50 nm de diamètre environ. Sous l'impact des ions Ga⁺ ou Cs⁺, les atomes constitutifs de l'échantillon sont éjectés et peuvent être identifiés par spectrométrie de masse afin d'établir des cartographies isotopiques des surfaces analysées.

3. Quelques données sur le cheveu :

3.1. Pousse du cheveu et caractéristiques physiques

Un cheveu pousse en moyenne de 0.3 à 0.5 mm par jour. La longueur de cheveu produite en moyenne par un individu est de 16 km par an. Une chevelure de 20 cm développe environ 6 m². Le cheveu a des propriétés physiques remarquables : un cheveu peut supporter environ 100 grammes, ce qui correspond à une charge totale de 10 à 15 tonnes par chevelure. D'autre part, un cheveu peut être étiré jusqu'à 50% de sa longueur en moyenne avant de casser.

3.2. Structure du cheveu observée en MEB et MET:

Un cheveu est constitué d'un cortex et d'une cuticule périphérique (Fig.1, Fig.2 et Fig.3). Une médulla centrale est parfois présente (Fig.4). Les pigments de mélanine donnent sa couleur au cheveu (Fig.3, Fig.5 et Fig.6). Ils sont de dimensions micrométriques et ont la forme de grains de riz. Le diamètre moyen du cheveu est de 80 micromètres.

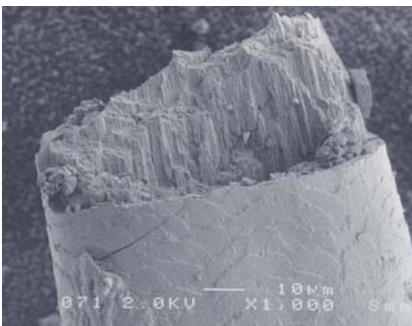


Fig.1

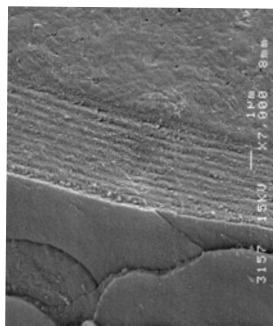


Fig.2

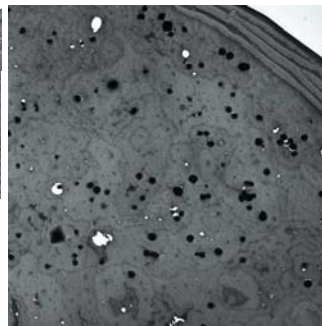


Fig.3

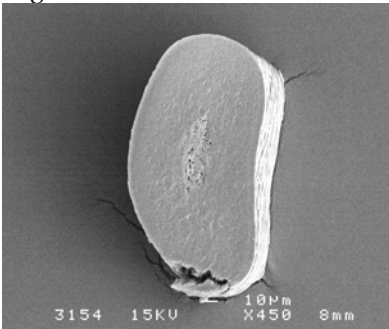


Fig.4

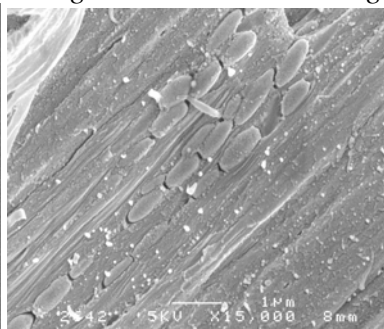


Fig.5

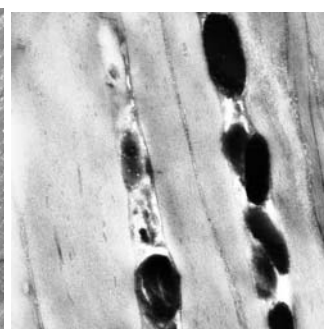


Fig.6

4. Détection d'un actif en surface du cheveu.

La technique SIMS a été utilisée afin de mettre en évidence l'affinité des céramides pour la surface des cheveux préalablement défrisés. Pour cela, un céramide marqué au ¹⁴C a été employé et suivi, au cours des traitements cosmétiques, par l'acquisition du signal ²⁸CN⁻ (¹⁴C¹⁴N⁻) (Fig. 7a et Fig. 7b). Il a été récemment démontré que le céramide restaurait l'intégrité de la fibre défrisée [4].

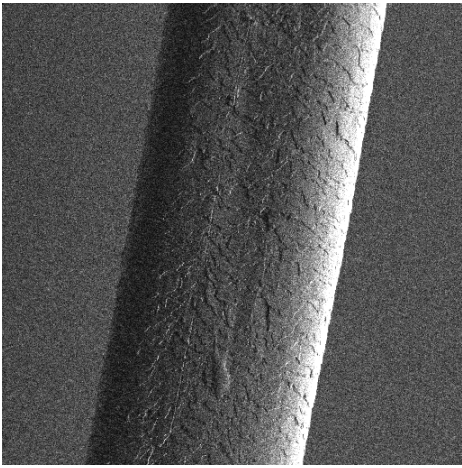
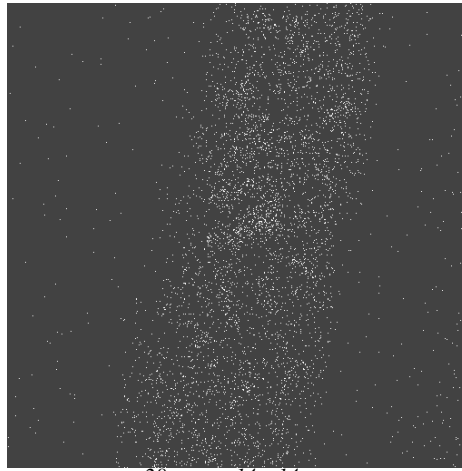


Fig 7 : 7a, topographie du cheveu
(ions secondaires totaux)



7b, signal ^{28}CN ($^{14}\text{C}^{14}\text{N}$), céramide
marqué.

5. Suivi du processus de réduction du cheveu.

L'imagerie des rapports $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{14}\text{C}^{14}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ permet de suivre le processus de réduction par l'ATG en fonction du temps. Au bout de 2', un anneau périphérique est visible, indiquant une réduction partielle de la fibre (Fig. 8 et Fig. 9). En revanche, au bout de 40 minutes, la réduction implique la totalité du cortex (Fig. 10). De telles études complètent avantageusement les techniques plus conventionnelles de suivi des processus de réduction [5].

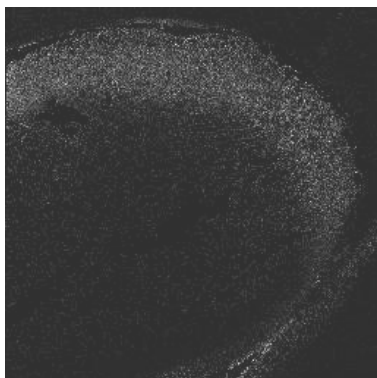


Fig. 8: $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$

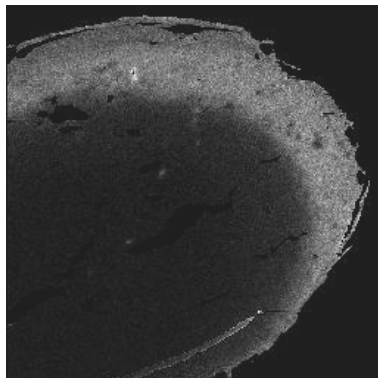


Fig. 9: $^{14}\text{C}^{14}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$

ATG 1M, 2' : réduction partielle

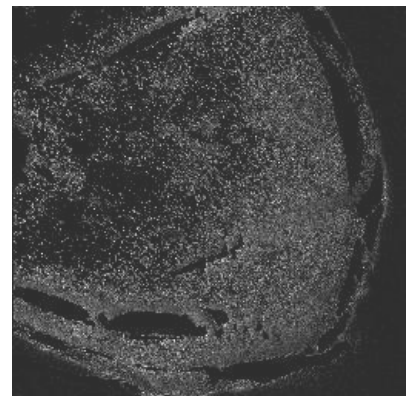


Fig. 10: $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$

ATG 1M 40' : réduction totale

6. Cartographie chimique du pigment de mélanine et de la medulla.

Très peu de données existent quant à la structure fine de la medulla, souvent mal préservée et peu accessible. La technique SIMS nous offre le moyen d'étudier *in situ* ce compartiment. Pour la première fois, les distributions relatives des protéines sulfurées et non sulfurées ont pu être imagées. Cette architecture protéinique contribue très certainement à donner au cheveu ses propriétés caractéristiques. Nous avons également très récemment démontré la possibilité d'étudier *in situ* les pigments de mélanine. En particulier, une polarité des pigments a été mise en évidence. Ceux-ci présentent en effet un pôle riche en oxygène [6].

7. Conclusion

Les images de distributions isotopiques sont aisément obtenues et corrélées à l'histologie du cheveu. La grande sensibilité de la technique est démontrée par l'acquisition d'images haute

résolution de la distribution de ^{34}S (Fig. 11 : ^{32}S et Fig. 12 : ^{34}S) dont la concentration moyenne dans le cheveu n'est que de 0.08%. L'obtention de rapports isotopiques est immédiate : le rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ moyen calculé sur nos échantillons est de 4.53% (SD = 0.28% ; n =10), et n'est pas significativement différent du rapport d'abondance terrestre de 4.52%. L'incorporation ou le renouvellement de molécules dans la tige pileaire est donc accessible par l'utilisation de molécules marquées par des isotopes stables ou radioactifs.



Fig. 11 : ^{32}S

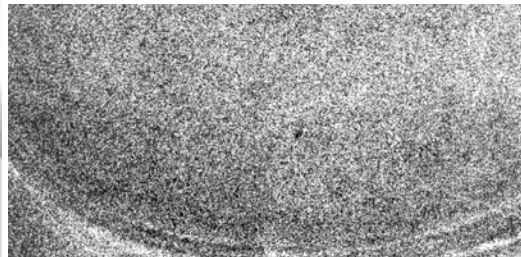


Fig. 12 : ^{34}S

8. Références

- [1] R. Castaing et G. Slodzian (1962) Microanalyse par émission ionique secondaire (Microanalysis by secondary ion emission) *J Microsc* 1, 395-410.
- [2] R. Levi-Setti, J.M. Chabala et Y.L. Wang (1988) Aspects of high resolution imaging with a scanning ion microprobe, *Ultramicroscopy*, vol.24, 97-114.
- [3] G. Slodzian, B. Daigne, F. Girard, F. Boust et F. Hillion (1992) Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection, *Biol. Cell* 74, 43-50.
- [4] B. A. Bernard, A. Franbourg, A.M. François, B. Gautier et P. Hallégot (2002) Ceramide binding to African-American hair fibre correlates with resistance to hair breakage, *International Journal of Cosmetic Science*, 24, 1-12.
- [5] Wickett, R.R. and Barman, B. G. (1985) Factors affecting the kinetics of disulfide bond reduction in hair, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 36, 75-86.
- [6] P. Hallégot, R. Peteranderl et C. Lechene (2004) In-situ imaging mass spectrometry analysis of melanin granules in the human hair shaft, *J Invest Dermatol* 122, 381-386.

La microanalyse des polymères

Alain JADIN

CERTECH, B-7180 Seneffe (Belgique)

alain.jadin@certech.be

Résumé :

L'observation et la microanalyse des polymères dans un MEB présentent de nombreux aspects spécifiques dus aux propriétés de ces matériaux. On retiendra notamment les problèmes liés au caractère isolant des polymères ou à la détérioration des échantillons sous le faisceau, beaucoup plus critique que pour les matériaux inorganiques. Les signaux émis lors du bombardement électronique sont généralement peu intenses et le contraste des images fournies est faible. On verra également que la microanalyse d'une matrice polymère seule par MEB apporte peu d'information, contrairement à celle des polymères contenant des charges inorganiques (nature, taille, répartition, ...). L'analyse des matériaux multiphasiques peut être réalisée sous certaines conditions en faisant appel à des techniques de marquage sélectif. Les techniques de préparation seront abordées et quelques applications variées seront décrites afin de démontrer l'apport essentiellement qualitatif de la microanalyse de systèmes à base de polymères. On verra également que le développement récent des microscopes à pression variable est déterminant pour l'analyse de ces matériaux.

1. Introduction

Les polymères, dans leur forme intrinsèque, se différencient des matériaux inorganiques par leur composition centrée sur les éléments légers (C, O, N, ...) et une morphologie a priori peu accessible à l'observation par MEB. Celle-ci est en outre compliquée par la nature isolante de ces matériaux. Ce dernier inconvénient peut toutefois être contourné au moyen d'un revêtement conducteur, de l'observation à basse tension, ou grâce aux nouveaux types de MEB (pression variable, environnemental). La microanalyse par spectroscopie EDS de ces matériaux présente peu d'intérêt à l'état intrinsèque, mais on verra qu'elle se révèle très utile dans la détermination du type et de la répartition des charges inorganiques, largement utilisées dans les polymères (renforts mécaniques, pigments, additifs divers).

2. Particularités de la microanalyse des polymères

2.1. Interaction électrons-polymères

Etant donné la composition de ces matériaux, la profondeur de la « poire d'interaction » dans les polymères peut atteindre plusieurs microns lors du bombardement par un faisceau d'électrons dont l'énergie se situe entre 15 et 30 kV [1]. A titre de comparaison, la profondeur de pénétration des électrons est de l'ordre de 8 μm dans le carbone à 30 kV, contre seulement 2 μm dans le fer. Ceci peut être critique lors de la comparaison entre les images électroniques et la microanalyse, en particulier dans les polymères chargés. Dans tous les cas, la résolution spatiale de la microanalyse X est donc nettement inférieure dans les matériaux organiques par rapport aux matériaux inorganiques.

2.2. Conductivité électrique et thermique

La conductivité thermique des polymères est très inférieure à celle des métaux (typiquement 3 ordres de grandeur). Lors d'une irradiation trop intense, ces matériaux subissent donc des dégradations qui modifient leur morphologie ou leur composition. Ceci peut simplement altérer le contraste, ou rendre l'analyse impossible. On peut remédier, dans une certaine mesure, à cet inconvénient en diminuant l'intensité du faisceau ou la tension d'accélération. Dans ce dernier cas, l'analyse EDS peut être hypothéquée si des éléments métalliques sont présents dans la matrice.

L'inconvénient majeur lors de l'observation des polymères était encore récemment leur très faible conductivité électrique intrinsèque (typiquement 20 ordres de grandeur plus faible que pour les métaux). Il peut être contourné de différentes façons. Tout d'abord, un revêtement conducteur peut être déposé sur la surface avant l'analyse. Suivant l'analyse réalisée, ce revêtement est constitué de carbone ou d'un métal (Au, Pd, Cr,...). Différentes méthodes de dépôt existent, présentant une incidence plus ou moins importante sur la morphologie du revêtement [1]. Lors de la microanalyse, les éléments présents dans ce revêtement peuvent également créer des interférences sur les spectres. Une deuxième méthode suivie est l'observation à basse tension, provoquant de sérieuses limitations au niveau de l'analyse. Enfin, l'utilisation de MEB à pression variable ou à chambre environnementale apporte une compensation de l'effet de charge, rendant possible l'observation et l'analyse de matériaux isolants sans restrictions majeures. Toutefois, lors de la microanalyse sous vide partiel, l'effet de diffusion du faisceau électronique par le gaz ambiant peut détériorer fortement la résolution latérale [2].

2.3. Morphologie

La surface d'un polymère de composition homogène présente généralement une morphologie offrant peu d'intérêt pour l'observation par MEB (aspect lisse, peu de contraste). Les structures cristallines qui apparaissent dans les polymères sont souvent observées par microscopie électronique à transmission moyennant l'utilisation de techniques de coloration. Des méthodes d'observation par MEB des morphologies de polymères dans des mélanges ont été développées. Celles-ci sont basées sur le décapage (« etching ») d'une phase pour en révéler une autre. Dans le cas des mélanges, on utilise un solvant spécifique d'une des phases. Pour les polymères semi-cristallins, des méthodes de décapage des phases amorphes ont été développées [1, 4]. Par contre, la présence de porosités, de micro-fissures, de charges ou d'impuretés est facilement mise en évidence en combinant l'observation électronique et la microanalyse X. Le MEB devient alors un instrument de choix pour l'observation de fractures ou de surfaces polies ou rectifiées de polymères chargés.

2.4. Composition

Les polymères sont composés en majorité de carbone et oxygène, et dans certains cas contiennent également de plus faibles quantités de chlore, azote, fluor, soufre... Il s'agit donc essentiellement d'éléments légers et le contraste des images électroniques fournies est généralement peu élevé. De plus, la quantification de ces éléments par EDS n'est pas optimale. Dans les polymères contenant des charges inorganiques, par contre, les images électroniques (notamment en électrons rétrodiffusés) et la spectroscopie X permettent une détermination rapide de la nature et de la distribution de ces charges.

3. Techniques de préparation

Les observations MEB peuvent généralement être réalisées sur des échantillons bruts (pièces moulées, injectées, films,...). Dans certains cas, comme pour l'analyse de polymères chargés ou multi-phasiques, des surfaces rectifiées ou fracturées (éventuellement à froid) sont préférables. Dans tous les cas, une surface lisse est requise pour une analyse EDS précise. Une telle surface peut

être obtenue par polissage, ou rectification au moyen d'un couteau (verre, diamant, carbure de tungstène). Un décapage chimique ou un marquage sélectifs permettent de révéler les différentes phases présentes dans les matériaux complexes [1,3,4].

4. Applications typiques

Les exemples repris ci-après sont issus d'une liste non-exhaustive mais représentative des observations et analyses régulièrement réalisées sur les polymères. Ils ont tous été obtenus dans un MEB à pression variable ou à chambre environnementale.

4.1. Analyse de charges

La figure 1 ci-dessous montre un exemple typique où l'exploitation combinée de l'imagerie électronique et de la microanalyse permet de déterminer la nature et la répartition de différents types de charges. Elle a été réalisée sur une surface de fracture, sans revêtement conducteur, dans un microscope à chambre environnementale. L'échantillon est un mélange (alliage) utilisé pour ses propriétés de résistance à l'abrasion. La matrice est constituée de polyamide (PA) chargé en fibres de verres (renforts mécaniques), auquel un lubrifiant interne (PTFE) a été ajouté. La répartition de ce lubrifiant est une donnée critique pour l'utilisation de ce matériau dans des pièces mécaniques qui subissent un frottement. On distingue clairement sur l'image, collectée au moyen des électrons rétrodiffusés, les fibres de verres (très claires), ainsi que le PTFE (niveau de gris intermédiaire), dans la matrice de PA, apparaissant plus sombre. L'analyse EDS confirme cette observation, comme le montre la cartographie élémentaire réalisée sur le silicium et le fluor (figure 2).

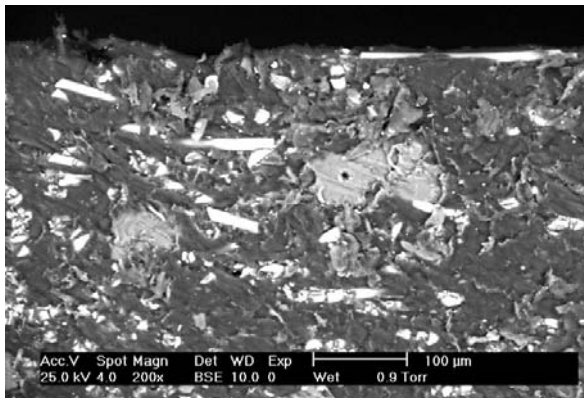


Figure 1 : surface de fracture d'un polymère chargé en fibres de verre et PTFE.

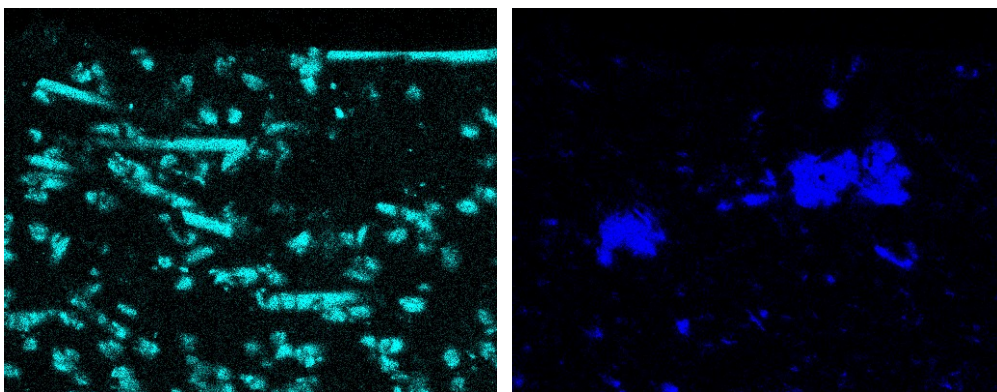


Figure 2 : cartographie élémentaire de Si (gauche) et F (droite)

Dans le deuxième exemple présenté ci-dessous, les particules (BaSO_4) présentes dans la matrice polymère sont caractérisées par une taille beaucoup plus faible. Celle-ci devient comparable à l'étendue du volume d'interaction, avec une influence sur la résolution spatiale de l'analyse EDS. Un premier indice est fourni par la comparaison des deux images présentées ci-dessous. Elles ont

été réalisées au moyen des électrons rétrodiffusés, en utilisant respectivement une tension d'accélération de 20 (photo a) et 12 kV (photo b).

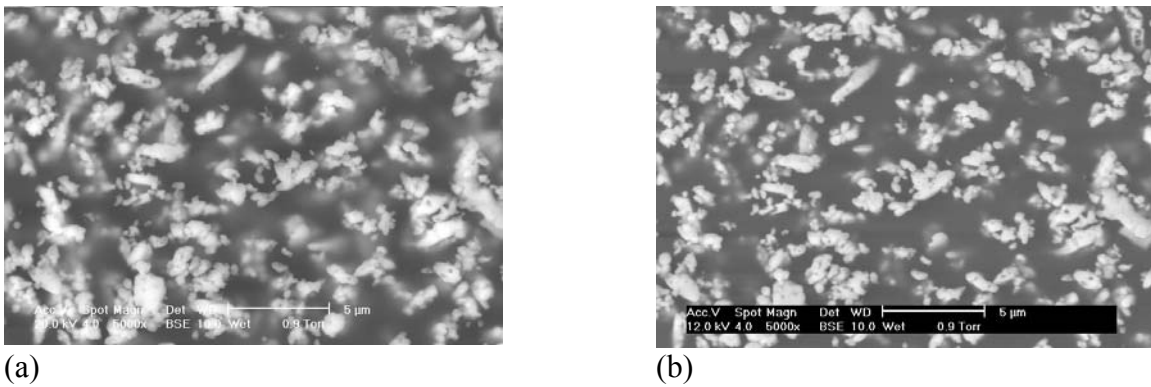


Figure 3 : influence de la tension d'accélération

Ces images permettent d'estimer la répartition des particules dans la matrice, et une analyse EDS globale confirme la présence des éléments attendus (figure 4). Une analyse locale précise est toutefois impossible dans ces conditions, essentiellement pour deux raisons : (i) le volume d'interaction est plus grand que les particules individuelles; (ii) le faisceau électronique subit une diffusion par le gaz ambiant (« beam skirt ») [2]. Le premier problème peut être partiellement contourné en diminuant la tension d'accélération, avec une incidence sur la qualité de l'analyse, tandis que le second peut être atténué en diminuant la pression dans la chambre (réapparition possible des effets de charge) et/ou la distance parcourue par le faisceau dans la chambre avant d'atteindre la surface de l'échantillon.

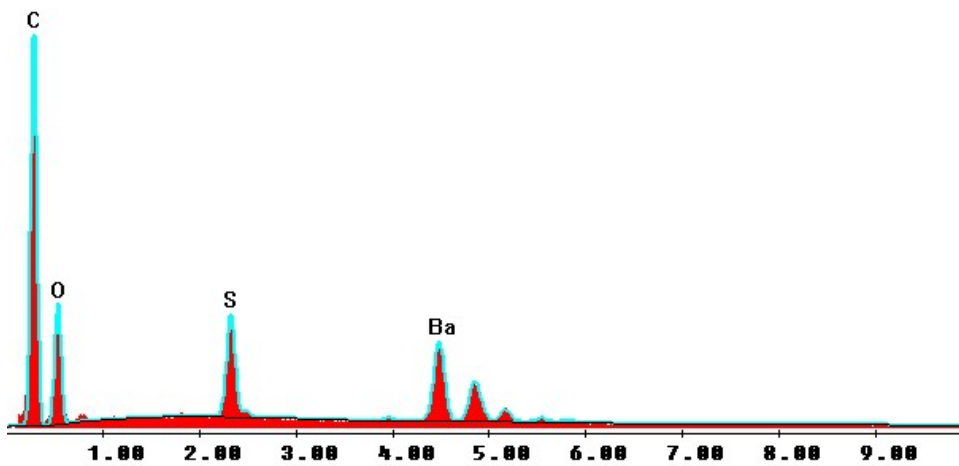


Figure 4 : analyse EDS globale

Lorsque la taille des particules est nettement plus faible (de l'ordre de 50 nm), l'observation par MEB devient difficile et une observation de coupes ultra-minces par microscopie électronique à transmission est préférable (figure 5).

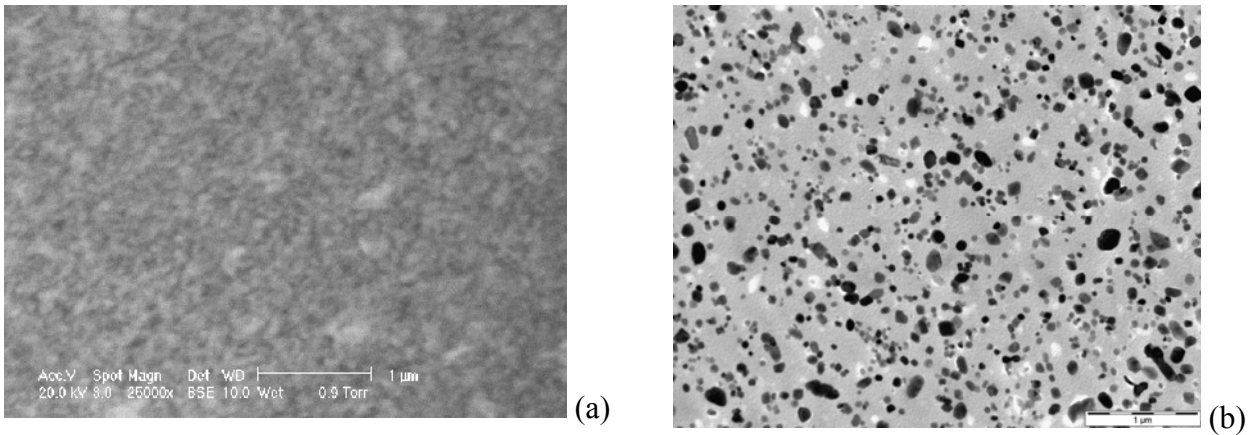


Figure 5 : images MEB (a) et MET (b) d'un polymère chargé en $BaSO_4$

4.2. Polymères multi-phasiques

Comme indiqué plus haut, le contraste est généralement peu élevé sur les images électroniques fournies par les polymères. Il en va de même pour les mélanges de polymères, où les différentes phases se distinguent difficilement. Un marquage sélectif par des métaux lourds peut alors accroître le contraste entre phases et permettre de les différencier. Dans l'exemple ci-dessous, l'échantillon est constitué d'un mélange polyéthylène oxyde-polystyrène, dont la surface a été préparée à basse température au moyen d'un ultra-microtome équipé d'un couteau en diamant. L'image collectée en électrons secondaires est peu contrastée (photo a). Afin de différencier les phases, l'échantillon a été exposé à des vapeurs d'osmium pendant plusieurs heures. L'osmium se fixant préférentiellement sur le polystyrène (insaturations du noyau aromatique), le contraste augmente sensiblement entre les deux phases (photo b). Celles-ci se distinguent clairement sur la photo c, réalisée au moyen des électrons rétrodiffusés, permettant de localiser l'osmium (zones claires), et donc le polystyrène. L'analyse EDS confirme ce résultat, comme l'indique la cartographie de l'osmium (photo d).

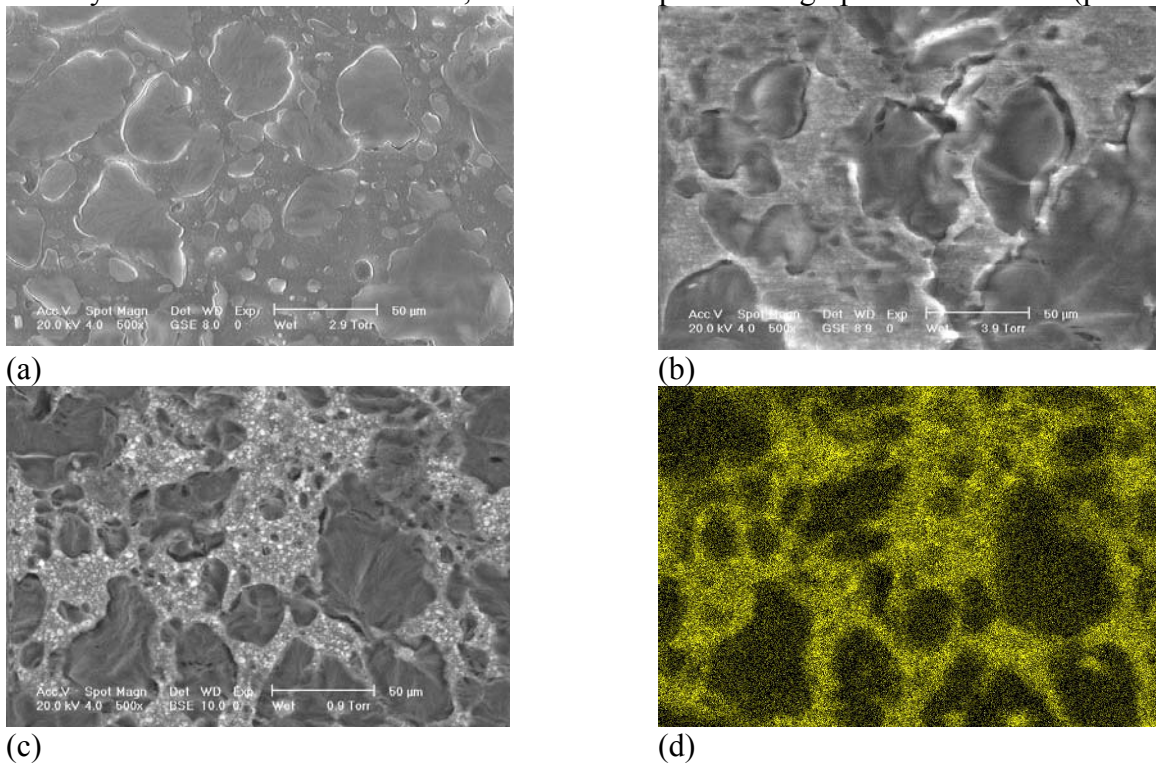


Figure 6 : marquage d'un mélange de polymères

4.3. Fibres

Les images présentées ci-dessous montrent quelques types de fibres organiques (naturelles ou polymères) et inorganiques (fibres de verre). Elles mettent en évidence les morphologies particulières de ces fibres, et la relative facilité avec laquelle elles peuvent être distinguées par l'imagerie comme par l'analyse EDS (voir aussi le paragraphe 4.1.).

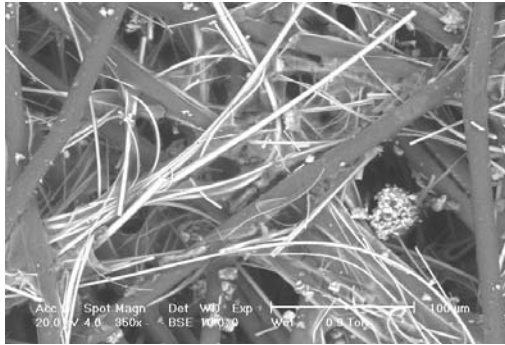


Figure 7 : fibres de polyester et de verre dans un filtre

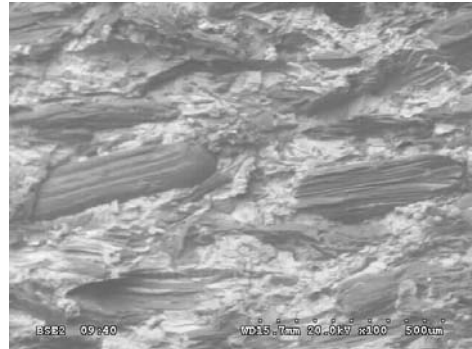


Figure 8 : fibres de cellulose dans un polymère

5. Conclusions

Les quelques exemples représentatifs décrits ici montrent que l'observation MEB et l'analyse EDS peuvent apporter de nombreuses informations complémentaires sur la morphologie et la composition des polymères. Par rapport aux matériaux inorganiques, certaines spécificités apparaissent et peuvent nécessiter une adaptation des conditions opératoires. On voit également que les microscopes fonctionnant sous vide partiel apportent une simplification dans la préparation et l'analyse des polymères.

Remerciements : *L'auteur souhaite remercier ses collègues Yann Bourgeois, Jean-Christophe Lambrechts et Karl Crener pour leur aide lors des analyses décrites ici et dans la rédaction de cet article.*

Références

- [1] J.I. Goldstein et al., *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Plenum Press, NY 1992.
- [2] C. Mathieu, *Microscopy and Analysis*, July 1999, 5-7
- [3] C.J.G. Plummer, *Caractérisation des Polymères par Microscopie Electronique, Techniques de l'Ingénieur, traité Plastiques et Composites*, AM 3 282.
- [4] L.C. Sawyer and D.T. Grubb, *Polymer Microscopy*, Chapman and Hall, London 1987.

Etude des complexes ADN-Protéines par AFM en milieu liquide.

Eric Le Cam., David Pastré², Fabrice Landousy¹, Josette Jéusset¹, Alain Zozime² et Olivier Piétrement¹

¹ Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire, UMR 8126 CNRS, Institut Gustave-Roussy - 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex.

² Laboratoire Milieux Nanométriques, Université d'Évry - Rue du Père Jarlan, 91025 Évry Cedex.
elecama@igr.fr

La recherche en imagerie moléculaire que nous développons est essentiellement consacrée aux machineries protéiques associées à l'ADN impliquées dans les grandes voies de régulation du matériel génétique, la transcription, la réplication, la recombinaison et la réparation. Ces mécanismes fondamentaux qui contrôlent la maintenance du génome et son expression mettent en jeu des assemblages protéiques successifs et des activités enzymatiques spécifiques et finement régulées.

La reconnaissance de l'ADN par des protéines est dépendante des particularités structurales des séquences ou de ses lésions, en particulier des propriétés géométriques (courbure) et des propriétés dynamiques (flexibilité). La formation d'un tel complexe génère des changements de conformation de l'ADN et de la protéine et permet l'assemblage séquentiel des autres protéines impliquées. Ainsi les propriétés structurales locales de l'ADN modulent la formation des complexes nucléoprotéiques et le cheminement de moteurs moléculaires, comme les hélicases ou les polymérases.

La compréhension de ces mécanismes moléculaires nécessite des approches d'imagerie combinant la résolution spatiale pour les études structurales et la résolution temporelle pour accéder à la dynamique des complexes.

Nous avons développé des méthodologies permettant de caractériser, en microscopie électronique (TEM) et en microscopie à force atomique (AFM) à l'air, les variations locales de conformation de l'ADN et leurs implications dans la formation de complexes nucléoprotéiques (reconnaissance et stabilité des complexes). Ces méthodologies font appel à des techniques spécifiques d'étalement de l'ADN ou des complexes et à un traitement statistique des données réalisées sur de grandes populations de molécules. Les études réalisées en TEM et AFM à l'air sont tout à fait comparables puisqu'elles font appel à des techniques d'étalement et de séchage similaires. Cependant le TEM permet d'obtenir une meilleure résolution (de l'ordre du nm) et permet surtout un plus grand nombre d'observations.

Pour étudier les assemblages nucléoprotéiques et le comportement de moteurs moléculaires sur certaines séquences, il faut pouvoir suivre le cheminement des protéines sur un fragment d'ADN, à l'échelle de la molécule unique et avec une résolution spatiale et temporelle compatible avec les événements observés. L'AFM en milieu liquide est en théorie parfaitement adapté à ce type d'étude, à condition d'obtenir la résolution nanométrique dans les conditions de réaction utilisées avec des vitesses de balayage suffisamment rapides pour suivre les événements qui sont dans des échelles de temps de l'ordre de la seconde.

Pour minimiser les interactions pointe-surface, tout en balayant suffisamment rapidement, nous étudions différents modes d'excitation de la pointe, électrostatique ou magnétique, comparativement au mode acoustique, ce qui permet de réaliser un balayage plus adapté à la fragilité du matériel biologique.

Travailler sur l'ADN en milieu liquide nécessite de le fixer sur un support tout en minimisant l'influence de ce support. De nombreux problèmes restent posés car l'étude des complexes ADN-protéine par AFM requiert plusieurs conditions.

1) il est indispensable d'utiliser un substrat atomiquement plan et biocompatible. Le mica, malgré sa complexité, reste la surface standard. L'adsorption des molécules d'ADN repose sur

l'attraction électrostatique avec la surface de mica, prétraitée ou pas, par l'intermédiaire de cations divalents (Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} ...) présents dans la solution.

2) les molécules d'ADN doivent rester accessibles aux protéines et par conséquent ne doivent pas être fixées trop fortement à la surface. Il faut donc trouver le compromis entre l'observation par AFM, qui nécessite une fixation forte des molécules, et le processus biologique qui ne doit pas être perturbé par la surface.

3) il est indispensable de garantir l'activité biologique spécifique de la protéine, ce qui implique notamment de travailler avec des concentrations de sel monovalent importantes (au delà de 100 mM). Ces conditions ne sont pas compatibles avec l'observation par AFM en liquide, car les ions monovalents écrantent l'interaction électrostatique entre la surface et l'ADN

Nous avons établi un nouveau protocole qui permet une fixation réversible de l'ADN sur une surface de mica prétraitée avec du $NiCl_2$. a) Les molécules d'ADN sont déposées sur la surface du mica prétraitée et observées par AFM pour contrôler la concentration des molécules et l'état de la surface. b) Les molécules sont ensuite libérées de la surface par augmentation de la force ionique ($NaCl$ ou KCl) dans la solution. c) En ajoutant du $MgCl_2$ et en baissant la force ionique, l'ADN est recollé sur la surface pour obtenir une image nette. Ces étapes peuvent être répétées plusieurs fois. Nous obtenons ainsi une fixation réversible qui permet soit d'observer par AFM les molécules immobilisées sur la surface, soit d'avoir des molécules libres capables d'interagir spécifiquement avec des protéines sans influence de la surface. Ce processus de contrôle de la fixation des molécules d'ADN permet ainsi de garder celles-ci proches de la surface, même pour de fortes concentrations de sels monovalents, grâce aux ions Ni^{2+} adsorbés sur la surface de mica.

Références :

Piétrement, O., Pastré, D., Fusil, S., Landousy, F., Jeusset, J., David, M.O., Zozime, A. & Le Cam, E. Reversible binding of DNA on $NiCl_2$ treated mica by varying the ionic strength. *Langmuir*. 19, 2536-2539(2003)

Pastre D, Piétrement O, Fusil S, Landousy F, Jeusset J, David MO, Hamon L, Le Cam E, Zozime A. Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: a theoretical and experimental study. *Biophys J* 2003 ; 85 : 2507-2518.

Beloin C, Jeusset J, Revet B, Mirambeau G, Le Hegarat F, Le Cam E. Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 5333-5342.

Nouveaux développements en tomographie électronique

Sergio Marco

Institut Curie UMR-168 ; 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris

sergio.marco@curie.fr

Résumé: *La tomographie est une méthode de reconstruction 3D basée dans la combinaison de projections, enregistrés à des différents angles, de l'objet à reconstruire. Le développement des méthodes d'automatisation pour l'acquisition des images ainsi que l'augmentation de la puissance de calcul et de stockage des ordinateurs a permis à la tomographie électronique d'aborder l'étude 3D de structures sub-cellulaires. Combinée à la filtration en perte d'énergie la tomographie électronique est à l'origine de la cartographie chimique 3D ou "energy filter transmission electron tomography" (EFTET). Ce nouveau méthode permet d'analyser la distribution spatial de plusieurs composantes chimiques de structures mésoscopiques (de 100nm – 1µm).*

1. Introduction

Les techniques de détermination de structures tridimensionnelles de composantes sub-cellulaires constituent l'un des plus grands atouts de la biologie moderne car elles permettent de mieux comprendre leurs relations structure-fonction. Ainsi, l'analyse par diffraction de rayons X et par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont apporté des informations structurales considérables sur des protéines individuelles et des petits complexes protéiques. Cependant, les machines cellulaires, constituées de multiples composants, restent inaccessibles à ces techniques d'analyses structurales.

Au cours de la dernière moitié du XXe siècle, les développements de la microélectronique et de l'informatique ont permis à la microscopie électronique à transmission (MET) d'être une stratégie puissante pour l'étude de ces structures sub-cellulaires. Ainsi des objets mésoscopiques (de taille supérieure à 100 nm) peuvent être maintenant reconstruits en 3D. L'une des premières utilisations de la microscopie électronique pour obtenir des volumes d'objets biologiques a été l'application d'algorithmes de tomographie à des projections de protéines solubles. On peut définir la tomographie comme une technique permettant de calculer des reconstructions 3D d'objets depuis leurs projections enregistrées à différents angles. Le processus de reconstruction implique la détermination pour chaque projection de l'orientation dans l'espace de l'objet étant à son origine. Tenant compte que cette position est définie par les angles d'Euler (φ : rotation horizontale, θ : rotation verticale et ψ : deuxième rotation horizontale suite à l'application de φ et θ ; figure 1), la tomographie consiste à déterminer ces angles pour chaque projection, puis à additionner les projections une fois placées dans l'espace^[1,2]. Ils existent des logiciels publics, comme IMOD, qui permettent de calculer des reconstructions et des modèles tomographiques en utilisant des séries d'images de projection d'un objet enregistrées à des angles φ et ψ constantes et θ variable^[3].

La tomographie électronique peut être combinée avec des méthodes de cartographie chimique, comme la filtration en perte d'énergie (EFTET) et l'énergie dispersive de rayons-X (EDX) pour obtenir de cartes 3D de distribution d'éléments dans des structures mésoscopiques. Ceci représente l'évolution de la MET-3D à la cartographie chimique 3D d'objets biologiques.

2. Limitations de la tomographie électronique.

2.1. Problèmes généraux

L'impossibilité de tourner l'échantillon au microscope électronique à des angles θ supérieurs à 70° empêche d'obtenir des projections dans toutes les orientations. Ceci génère un manque d'information ce qui se connait comme « missing wedge ». Le « missing wedge » peut être partiellement compensé en utilisant des porte-échantillons qui permettent de tourner l'objet dans le plan du support de la grille (ψ). Dans ce cas pour chaque valeur de ψ une série tomographique (θ variable) peut être enregistrée. Les volumes ainsi obtenus peuvent être ensuite combinés dans un volume moyen.

La combinaison de plusieurs volumes nécessite préalablement la mise en place de méthodes qui protègent l'échantillon des effets de la radiation électronique car, irradiée plusieurs fois (121 fois si on prend des images à des valeurs de θ variables toutes les 1° entre -60° et $+60^\circ$), elle s'amincit rapidement pouvant perdre 20% de leur volume après l'acquisition de la première série tomographique. Dans ce contexte, la congélation des résines plastiques, où les échantillons sont inclus, et l'acquisition des séries tomographiques à température de l'azote liquide limite ce problème. L'application de cette approche nous a permis de réaliser l'acquisition des séries d'images de projection d'un même objet à plus de six angles (ψ) différents.

Reste encore le problème de réaliser un recalage correct des volumes calculés à différents valeurs de ψ . A cette fin, des logiciels écrits sous JAVA pour ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ont été développés^[4]. Ces logiciels utilisent les algorithmes d'alignement d'images sans utilisation de référence déjà utilisées en tomographie moléculaire pour le calcul d'images moyennes 2D sans images de référence^[5,6].

Malgré ces limitations, la tomographie cellulaire a permis d'obtenir des informations 3D de structures cellulaires comme les kinetocores^[7], l'appareil de Golgi^[8,9], les mitochondries^[10,11] et les corpuscules basaux^[12] avec des microscopes à grand voltage (1MV) ou d'organelles de sécrétion de chitine^[12] et des bactériophages^[13] avec des microscopes à émission de champ. Mais la réalisation de la tomographie cellulaire est aussi possibles sur des microscopes standard (voltage < 200 kV et des cathodes de LaB₆) tel que sera démontré dans le chapitre correspondant aux exemples d'application (cf §3).

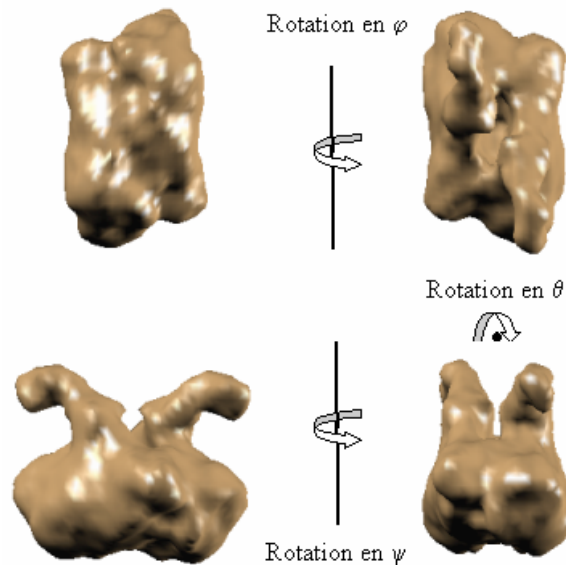


Fig. 1 - Application des angles d'Euler à un volume obtenu par tomographie.

La combinaison de trois rotations (angles ϕ , θ et ψ) dans deux axes perpendiculaires dans l'espace est suffisante pour placer un objet dans toutes les orientations possibles.

2.3. Problèmes spécifiques à la cartographie chimique 3D

En enregistrant les images en perte d'énergie d'un même objet, à des angles θ variables, il est possible d'obtenir des informations en trois dimensions de la distribution d'éléments chimiques dans des cellules à condition d'être assez concentrés localement pour donner un signal caractéristique supérieur au niveau du bruit de fond. La principale difficulté de cette technique (nommée EFTET ou cartographie chimique 3D) est alors l'identification du signal caractéristique d'un élément par rapport au bruit de fond. L'approche la plus utilisée pour isoler ce signal caractéristique consiste à modéliser la courbe de bruit de fond pour interpoler ses valeurs dans la région du signal et ainsi pouvoir les soustraire. À cette difficulté, il s'ajoute que l'inclinaison de l'échantillon modifie, par une valeur $1/\cos(\theta)$, l'épaisseur d'échantillon à traverser par le faisceau d'électrons, et en conséquence l'interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon. Ceci impose le développement de nouveaux algorithmes pour réaliser une soustraction correcte du bruit de fond avant de calculer une carte chimique 3D.

A l'heure actuelle ils sont disponibles des programmes écrits sous JAVA pour le logiciel public d'analyse d'images ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) qui permettent d'aligner des séries tomographiques acquises à différentes valeurs de perte d'énergie et de soustraire le bruit de fond pour obtenir le signal caractéristique d'un élément^[14].

3. Exemples d'application

3.1. La morphogenèse des mélanosomes

Les mélanosomes sont des organelles intracellulaires responsables de la synthèse et du stockage de la mélanine chez les mammifères. Ces structures sont seulement exprimées dans des mélanocytes et dans des cellules de l'épithélium de la rétine^[15]. Malgré l'importante implication des mélanosomes dans des cancers de peaux et des maladies impliquant des lysosomes et des diminutions de la pigmentation, leur morphogenèse est loin d'être comprise. Ainsi, les mécanismes moléculaires impliqués dans leur maturation et le mécanisme par lequel les mélanocytes utilisent leur système membranaire pour engendrer ces organelles spécialisées restent inconnus.

Sur la base de leur morphologie, quatre étapes de maturation des mélanosomes ont été définies^[16]. Les premélanosomes où la mélanine est absente contiennent des compartiments membranaires de vésicules internes (phase I). Ces organelles évoluent en structures ellipsoïdales avec des "striations" internes (phase II). Dans le mélanosome mûr, la mélanine est synthétisée et déposée progressivement sur les striations (phase III) jusqu'à ce que l'espace interne soit rempli (phase IV). Ces striations sont de nature protéique et elles apparaissent suite à une protéolyse de la protéine intégrale de membrane Pmel 17^[17]. Cependant leur organisation structurale est loin d'être comprise. Ils peuvent être structurés comme des lames empilées le long de

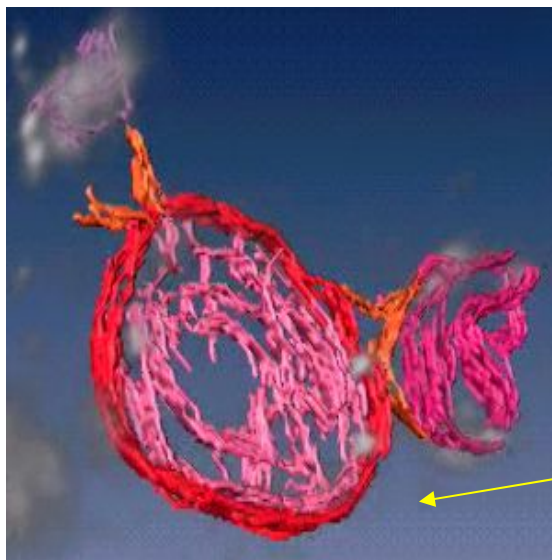


Fig. 2 Reconstruction tomographique d'un mélanosome de type II. Le modèle en faux couleurs montre les feuillettes de mélanine (en rosse), certains d'entre elles (flèche) parallèles aux membranes (rouge et marron).

l'axe majeur du mélanosome ou comme des filaments parallèles. Seule la reconstruction tridimensionnelle du mélanosome pourrait répondre à la question concernant l'organisation interne de ces striations. La combinaison de 6 volumes d'un mélanosome de type II en une reconstruction tomographique (figure 2) a montré que les striations ne sont pas des filaments mais des feuillettes parallèles qui s'interconnectent entre eux^[18].

3.2. La reconstructions des centrioles

Le centrosome est une structure sub-cellulaire associée solidement au noyau, qui se duplique une fois pendant le cycle cellulaire et qui sert de centre organisateur de microtubules. Il est constitué de plusieurs domaines majeurs dont les plus éminents sont le domaine centriolaire et le domaine peri-centriolaire^[19]. Le domaine centriolaire définit le centre du centrosome et contient une paire de centrioles. Malgré que, la structure externe des centrioles soit bien connue, il n'existe pas d'information détaillée de sa structure interne et son analyse nécessite de la mise en oeuvre de nouvelles stratégies. Une approche possible pour calculer un volume du centriole est celui qui a été déjà utilisé pour calculer la reconstruction 3D du bactériophage T4 en entier^[20]. Il consiste en trois étapes. Dans une première étape, des reconstructions 3D de centrioles sont obtenus par tomographie cellulaire sur des coupes épaisses de centrioles inclus dans des résines plastiques. Ces reconstructions pourront être facilement calculées en utilisant des centrioles présents dans les corpuscules basaux des paramécies. Ces animaux possèdent plusieurs milliers d'entre eux dans leur bouche et leur cortex. Une première reconstruction 3D d'un de ces corpuscules basaux a été déjà réalisée par la combinaison de six tomogrammes différents (figure 3). Le résultat démontre qu'il est possible de réaliser des reconstructions 3D de ces organelles et de les combiner pour obtenir un volume ayant un rapport signal sur bruit qui permet d'observer des microtubules^[4]. Dans la deuxième étape les volumes calculés sont classifiés en utilisant des réseaux de neurones 3D^[21]. Ceci

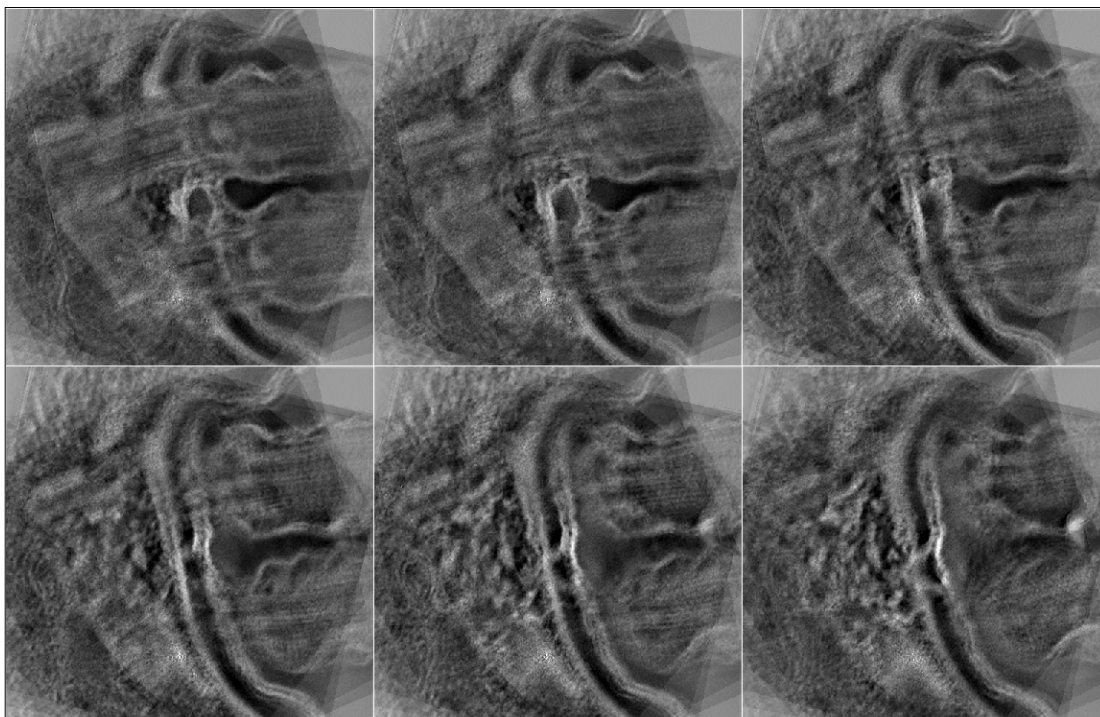


Fig. 3 - Reconstruction tomographique d'un corpuscule basal. Chaque image correspond à une section longitudinale (60, 70, 80, 90, 100 et 110 des 200 totales) du volume moyenne calculé après raffinement de l'alignement 3D. Barre d'échelle 200nm.

permet d'obtenir des classes homogènes de volumes qui pourront être ensuite utilisées pour calculer des volumes moyens pour chacune des classes. Chaque classe doit représenter une orientation différente du centriole et sa combinaison dans un seul volume devrait réduire la perte d'information

provenant de l'impossibilité d'acquérir des séries d'inclinaison à grands angles ($\theta > 70^\circ$). La troisième étape consiste à utiliser le volume calculé par la combinaison des moyennes de classes comme référence pour calculer les relations géométriques existantes entre les images obtenues dans la glace vitreuse, en ainsi calculer un volume du centriole sans besoin de l'inclure dans des résines plastiques qui altèrent sa structure interne.

3.3. Les inclusions métalliques chez des bactéries

Découvertes à la fin des années 70, les sources hydrothermales profondes présentent des conditions de vie extrêmes. En effet outre la forte pression qui règne à ces profondeurs (260 atm), les fortes variations de température (entre 2°C et 250°C) et l'absence de lumière, de fortes teneurs en soufre et en composés métalliques sont présentes. Le vestimentifère *Riftia pachyptila*, un ver tubicole géant, survit et prolifère dans un tel environnement grâce aux adaptations physiologiques qu'il a su développer. Une première résistance aux éléments métalliques passe par la présence d'un tube protecteur. De nombreuses études ont été menées sur ce tube, notamment sur les micro-organismes présents dans son épaisseur^[22,23]. Ils renferment des inclusions sous forme de granules riches en composés métalliques comme des poly-phosphates de fer. Le calcul de cartes tridimensionnelles du signal Fer (710eV en perte d'énergie) sur des coupes semi-fines (200nm) des bactéries de *R. pachyptila* (figure 4) ont démontré la présence simultanée de plusieurs granules métalliques dans une même bactérie^[14]. Pour calculer ces reconstructions il a été nécessaire de réaliser une congélation lente dans l'azote liquide des coupes semi-fines et de les observer à la température de l'azote liquide. Cette approche a permis d'acquérir des images de projection à des valeurs de perte d'énergie et d'angle d'inclinaison θ différentes tout en préservant le signal.

Remerciements : Les travaux présentés ont été financés par l'INSU (programme GEOMEX), le CNRS/INSU/IFREMER (HOT 96) et le projet interdisciplinaire Curie (PIC) « Physique du Vivant: de la molécule isolée à la cellule ».

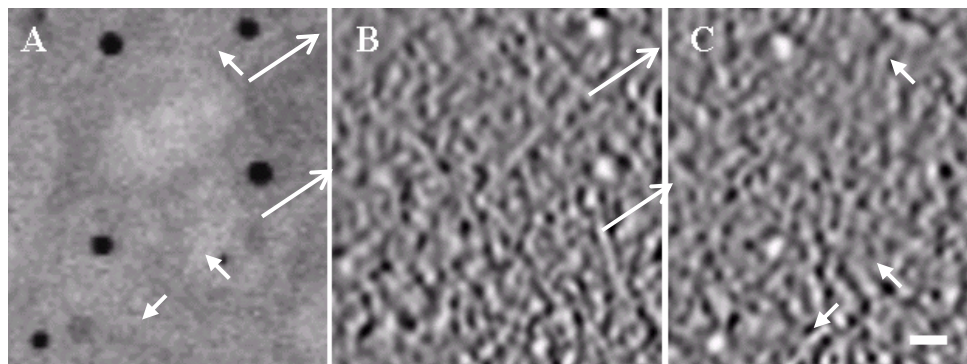


Fig. 4 –Exemple de cartographie chimique 3D
 (a) Image de projection d'une bactérie montrant des inclusions granulaires électrodenses
 (b et c) Plans 113 (b) et 150 (c) de la carte chimique 3D de Fe (de 200 planes) correspondent aux granules montrés en (a). Les granules signalés avec un flèche creuse se trouvent à une hauteur inférieure que ceux signalés avec une flèche plane. La barre correspond à 100 nm

Références

- [1] K. DIERKSEN, D. TYPKE, R. HEGERL, A.J. KOSTER, W. BAUMEISTER, *Ultramicroscopy*, 40, 71-87, (1992).
- [2] W. BAUMEISTER, R. GRIMM, J. WALZ, *Trends. Cell. Biol.* 9, 81-85, (1999).
- [3] J.R. KREMER, D.N. MASTRONARDE, J.R. MCINTOSH, *J Struct Biol* 116, 71-76, (1996).
- [4] C. MESSAOUDI, T. BOUDIER, N. GARREAU DE LOUBRESSE, P. DUPUIS-WILLIAMS, J.L. RIGAUD, S. MARCO, *Volume alignment by reference-free methods in cellular tomography*. XIII European microscopy congress. Antwerp. Belgium. (2004).
- [5] P. PENCZEK, M. RADERMACHER, J. FRANK, *Ultramicroscopy*. 40, 33-53, (1992).
- [6] S. MARCO, M. CHAGOYEN, L.G. FRAGA, J.M. CARAZO, J.L. CARRASCOSA, *Ultramicroscopy*. 66, 5-10, (1996).
- [7] B.F. MCEWEN, J.T. ARENA, J. FRANK, C.L. RIEDER, *J. Cell. Biol.* 120, 301-312, (1993).
- [8] M.S. LADINSKY, J.R. KREMER, P.S. FURCINITTI, J.R. MCINTOSH, K.E. HOWELL, *J. Cell. Biol.* 127, 29-38, (1994).
- [9] M.S. LADINSKY, C.C. WU, S. MCINTOSH, J.R. MCINTOSH, K.E. HOWELL, *Mol. Biol. Cell.* 13, 2810-2825, (2002).
- [10] C.A. MANNELLA, M. MARKO, P. PENCZEK, D. BARNARD, J. FRANK, *Micr. Res. Techn.* 27, 278-283, (1994).
- [11] E.T. O'TOOLE, T.H. GIDDINGS, J.R. MCINTOSH, S.K. DUTCHER SK, *Mol Biol Cell.* 14, 2999-3012, (2003).
- [12] B. SHILLITO, A.J. KOSTER, J. WALZ, W. BAUMEISTER, *Biol. Cell.* 88, 5-13, (1996).
- [13] J. BÖHM, O. LAMBERT, A.S. FRANGAKIS, L. LETELLIER, W. BAUMEISTER, J.L. RIGAUD, *Curr. Biol.* 11, 1168-11675, (2001).
- [14] S. MARCO, T. BOUDIER, C. MESSAOUDI, C. MORY, C. COLLIEX, J.P. LECHAIRE, G. FRÉBOURG, F. GAILL, *Development of EFTEM tomography methods and software*. XIII European microscopy congress. Antwerp. Belgium. (2004).
- [15] M.S. MARKS, M.C. SEABRA, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 738-748, (2001).
- [16] M. SEIJI, T.M. FITZPATRICK, R.T. SIMPSON, M.S.C. BIRBECK, *Nature.* 197, 1082-1084, (1963).
- [17] G. RAPOSO, D. TENZA, D.M. MURPHY, J.F. BERSON, M.S. MARKS, *J. Cell Biol.* 152, 809-823, 2001.
- [18] T. BOUDIER, I. HURBAIN, C. MESSAOUDI, G. RAPOSO, S. MARCO, *Describing the internal morphology of melanosomes by electron tomography*. XIII European microscopy congress. Antwerp. Belgium. (2004).
- [19] J.M. GARY, O. YONGCHUN, J.B. RATTNER, *Microsc. Res. Tech.* 49, 409-419, 2000.
- [20] C. MESSAOUDI, T. BOUDIER, J.P. LECHAIRE, J.L. RIGAUD, F. GAILL, S. MARCO, *Biol. Cell.* 95, 393-398, (2003).
- [21] A. PASCUAL-MONTANO, K.A. TAYLOR, H. WINKLER, R.D. PASCUAL-MARQUI, J.M. CARAZO, *J. Struct. Biol.* 138, 114-122, (2002).
- [22] J.P. LECHAIRE, B. SHILLITO, G. FRÉBOURG, F. GAILL, *Biol. Cell.* 94, 2-6. (2002).
- [23] P. LOPEZ-GARCIA, F. GAILL, D. MOREIRA, *Env. Microbiol.* 4, 204-215, (2002).

Applications des microfaisceaux d'ions dans le domaine des sciences de la vie

Philippe Moretto, Claire Michelet-Habchi

Interface Physique-Biologie, CENBG, Le Haut Vigneau, BP120, 33175 Gradignan cedex.

moretto@cenbg.in2p3.fr

***Résumé:** La microsonde nucléaire est apparue il y a une quinzaine d'années dans le panorama des techniques d'analyse et d'imagerie par faisceau d'ions. Tirant partie des multiples interactions ion-matière accessibles aussi bien aux échelles nucléaire qu'atomique, cet instrument se caractérise par une grande polyvalence et une excellente sensibilité analytique. Un faisceau d'ions focalisé, atteignant une résolution spatiale d'une cinquantaine de nanomètres pour les dispositifs les plus performants, permet aussi bien de produire des cartographies chimiques élémentaires 2 et 3D par balayage que de mettre en œuvre des méthodes d'irradiation localisées.*

1. Introduction

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

La plupart de ces éléments sont facilement accessibles aux techniques d'analyse par microfaisceau, à condition de respecter une préparation d'échantillon qui permette de placer des tissus sous vide. De telles méthodes, très proches de celles utilisées pour la microscopie électronique, sont essentiellement basées sur des cryotechniques (cryofixation, cryo-microtomie, lyophilisation à basse température ...). Les méthodes d'analyse utilisées, PIXE, RBS, STIM, souvent sous forme d'analyse bidimensionnelle, peuvent être parfois mises en œuvre simultanément, ce qui permet par exemple, de faire un dosage dans un tissu tout en mesurant sa masse organique et de faire de l'imagerie par densitométrie. On regroupe souvent l'ensemble des techniques utilisées sous le terme de microsonde nucléaire.

2. La ligne microfaisceau

Le principe de fonctionnement d'une microsonde nucléaire s'apparente à celui d'un microscope électronique à balayage mise à part la sonde utilisée qui est un faisceau d'ions au lieu d'un faisceau d'électrons. La focalisation du faisceau est basée sur le principe d'un système centré en optique ionique (Fig. 1). A l'entrée de la ligne, un premier collimateur d'une dizaine de micromètres de diamètre constitue l'objet pour une optique convergente basée sur l'association de lentilles

quadrupolaires magnétiques. Il faut limiter les effets des aberrations, liées à la configuration multipolaire utilisée, en plaçant un collimateur d'ouverture quelques mètres en aval de l'objet, juste avant les lentilles. Ceci permet d'éliminer les trajectoires les plus éloignées de l'axe optique. En mode faible flux (typiquement 10^3 ions par seconde), l'ouverture des deux collimateurs est ajustée à quelques micromètres. Un tel degré de précision permet d'atteindre, sur les dispositifs les plus avancés, une tache de faisceau dans le plan image de l'ordre d'une cinquantaine de nanomètres qui représente actuellement la limite en résolution spatiale de ce type d'instrument. Une ouverture plus large, typiquement du millimètre, autorise un faisceau plus intense (entre 10^9 et 10^{10} ions par seconde) dont la dimension peut varier entre 200 nm et quelques μm suivant le dispositif expérimental. Un système de plaques électrostatiques permet de balayer très précisément le faisceau afin d'analyser l'échantillon point par point. D'un point de vue purement technique, la difficulté de réalisation d'un tel dispositif réside dans l'étude des optiques de focalisation des particules massives à de telles énergies. Leur mise en œuvre nécessite ensuite une précision drastique pour l'usinage des lentilles qui les composent comme pour leur alignement. Enfin, les niveaux de vibration autorisés sur les supports de ligne, inférieurs en amplitude aux résolutions spatiales, contraignent à l'utilisation de techniques antivibratoires complexes. Ceci explique qu'à l'heure actuelle, plus de vingt ans après les premières tentatives, il n'existe seulement qu'une cinquantaine de microsondes dans le monde.

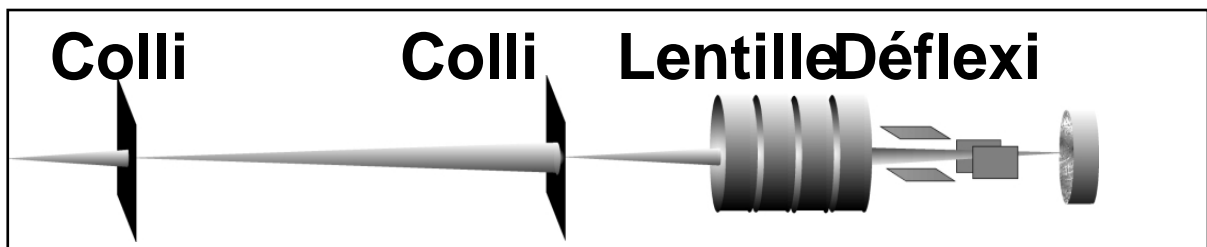


Fig. 1 - Schéma de principe d'une microsonde nucléaire : le faisceau d'ions est collimaté puis focalisé jusqu'à former une tache d'un diamètre de l'ordre du micron dans le plan focal.

3. Les techniques d'analyse et de caractérisation

De nombreuses techniques de caractérisation peuvent être mises en œuvre, souvent simultanément, à l'aide d'une microsonde nucléaire. Citons pour l'essentiel :

3.1. PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*)

La détection des raies X caractéristiques émises par les cortèges électroniques des atomes excités par les ions incidents, permet de déterminer la teneur de tous les éléments présents plus lourds que le sodium, parfois même que le carbone lorsque des détecteurs particuliers sont employés. En effet les photons X émis par les éléments plus légers sont trop peu énergétiques pour être détectés. C'est donc une analyse chimique élémentaire (accès au Z) avec une sensibilité donnant accès à des éléments trace jusqu'à des concentrations de la ppm.

3.2. PIGE (*Particle Induced Gamma-ray Emission*)

La méthode consiste à mesurer le spectre gamma émis par les noyaux des atomes excités (excitation coulombienne en général) afin de doser certains éléments légers (typiquement Z inférieur à 19). L'identification est isotopique (accès à A et Z).

3.3. NRA (*Nuclear Reaction Analysis*)

La technique permet, en choisissant la nature des ions incidents et leur énergie, d'induire des réactions nucléaires particulières, parfois résonnantes. Avec des ions de quelques MeV, seuls les éléments légers peuvent être dosés, en raison de la barrière coulombienne trop élevée des noyaux lourds qui interdit toute interaction nucléaire. On détecte alors soit les particules légères produites par la réaction, soit le rayonnement gamma émis. La probabilité de réaction présente parfois une résonance étroite en fonction de l'énergie du faisceau incident. En faisant varier celle-ci, on peut alors déterminer un profil de la concentration de l'élément dosé en fonction de la profondeur dans l'échantillon. Cette méthode est également isotopique (accès à A et Z).

3.4. RBS (*Rutherford backscattering Spectrometry*)

La méthode consiste à mesurer l'énergie des ions après rétrodiffusion sur les noyaux cible. Cette énergie étant caractéristique de la masse du noyau diffuseur, on a ainsi accès au nombre de masse A. Les ions subissant un ralentissement électronique dans la matière traversée, la méthode est sensible à la topographie et l'organisation en profondeur du matériau étudié (ordonnancement et épaisseur de couches minces par exemple, localisation d'impuretés ou contaminations en surface...). En milieux organiques, elle permet en outre d'accéder à la teneur en éléments majeurs de l'échantillon (carbone, azote, oxygène) et donc à sa masse.

3.5. STIM (*Scanning Transmission Ion Microscopy*)

Elle donne accès à l'épaisseur de l'échantillon (ou plus exactement à sa masse surfacique en g/cm^2), grâce à la mesure de la perte d'énergie du faisceau après traversée de la cible. En mode imagerie, elle permet de déterminer la structure d'une coupe mince avec un contraste en densité (structure d'une coupe de tissus biologiques par exemple). Comme RBS, la méthode STIM permet également d'accéder à la masse d'échantillons organiques.

Cette grande diversité de techniques offre donc une richesse d'information particulièrement intéressante pour la caractérisation de matériaux. En particulier pour ce qui concerne l'analyse élémentaire, il est ainsi possible d'explorer quasiment tout le tableau périodique, parfois même en une seule analyse, tout en conservant intact l'échantillon analysé.

4. Applications à l'analyse dans le domaine des sciences de la vie

L'observation de composés chimiques diffusant dans des tissus ou se fixant dans des cellules est un problème majeur en médecine et pharmacologie. Que ce soient des molécules à visée curative où des éléments toxiques tels que certains métaux lourds, leur détection à l'échelle micrométrique reste un domaine réservé à quelques méthodes comme la spectrométrie de masse locale par ablation, les méthodes de marquage radioactif (autoradiographie) ou enfin les méthodes optiques (fluorescence sous UV).

En particulier, dans le domaine de la pharmacologie des anticancéreux, si certaines de ces molécules fluorescent sous excitation photonique, pour d'autres au contraire, il n'existe pas d'autre alternative que la spectroscopie d'émission X pour un dosage *in situ* de quantités infimes. Cette propriété fait tout l'intérêt des microsondes nucléaires. A titre d'exemple, la fixation intracellulaire du cisplatine a pu être étudiée sur des lignées humaines résistantes à cette drogue, largement utilisée dans le traitement de cancers ovariens et des voies aériennes supérieures. La méthode à, par ailleurs, permis des études de pharmacocinétique dans des micro-nodules tumoraux afin d'optimiser les modes locaux d'administration de l'anticancéreux, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles stratégies cliniques telles que certaines méthodes de chimiothérapie intrapéritonéale, actuellement en cours d'essais cliniques.

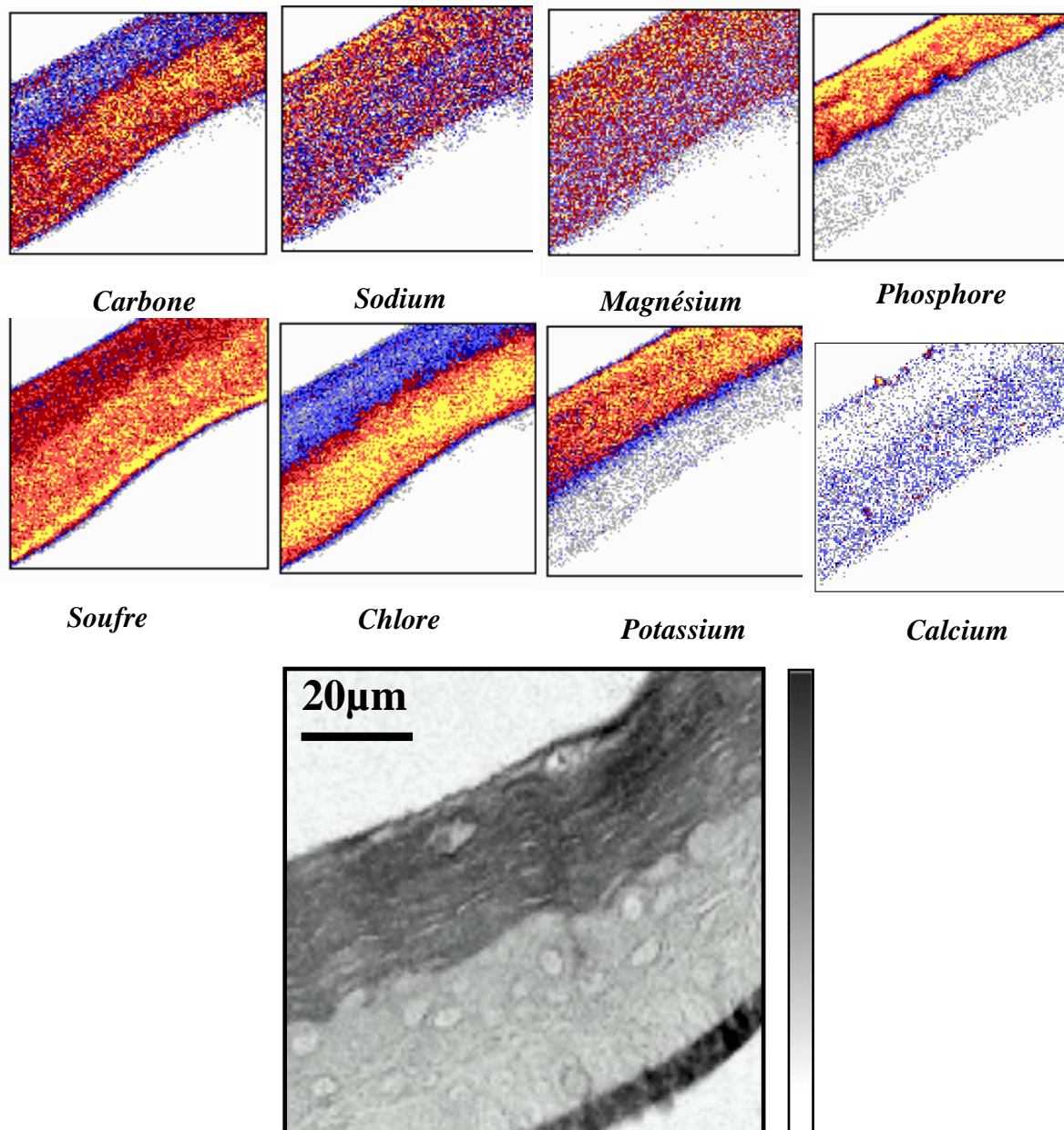


Fig. 2 - Analyse d'une coupe d'épiderme humain reconstruit in vitro : l'image de microscopie ionique (STIM) met en évidence les différentes couches constituant l'épiderme au niveau cellulaire : a) support de culture en polycarbonate, b) couche épineuse, c) couche cornée. Les cartographies en carbone et en minéraux ont été obtenues respectivement par les techniques RBS et PIXE.

La physiologie de la peau est également un domaine de choix pour la microsonde nucléaire dans la mesure où cette technique permet de réaliser un instantané de l'ensemble des espèces ioniques minérales et de leur distribution spatiale dans l'épiderme, un tissu dont l'épaisseur ne dépasse pas une centaine de microns. C'est pourtant dans ce tissu que se trouve le siège de la fonction barrière, une des barrières physiologiques les plus importantes qui régule une bonne partie des échanges avec notre environnement. En particulier, l'état du gradient calcique serait étroitement lié à l'efficacité de la fonction barrière, en plus d'un rôle essentiel dans les mécanismes de différenciation cellulaire ayant lieu dans l'épiderme. La méthode autorise le suivi de substances exogènes lors de leur pénétration transcutanée avec de nombreuses applications dans les domaines pharmaceutique (crèmes, patches), dermocosmétique et environnementaux.

L'augmentation des cas de maladies de peau, d'allergies, d'eczéma, apporte des interrogations

nouvelles sur l'action de notre environnement et des produits d'usage quotidien sur notre peau. Un programme de recherche, joignant les efforts de 11 laboratoires européens, dont cinq dotés de microsondes nucléaires, vient d'être lancé pour étudier les effets d'une exposition prolongée aux particules ultra-fines (jusqu'à 15 nanomètres) de type SiO₂ ou TiO₂ présentes dans de nombreux produits dermo-cosmétiques ou ménagers, et en particulier dans les formulations des nouveaux filtres solaires. Existe-t-il des voies de pénétration transcutanée ? Pour répondre à cette question diverses méthodes d'analyse complémentaires sont mises en œuvre in vitro sur des peaux naturelles ou artificielles. La microscopie ionique et les techniques d'analyse par faisceau d'ions permettent de caractériser la teneur en titane et éléments trace des différentes couches de l'épiderme et de tester une éventuelle pénétration de ces nanoparticules.

5. La microsonde comme outil de modification cellulaire

La compréhension de l'interaction des ions légers dans le domaine d'énergie du MeV dans la matière vivante joue un rôle primordial dans de nombreuses problématiques : étude des phénomènes de carcinogenèse, ion-thérapie anticancéreuse, estimation du risque lié à une exposition à la radioactivité environnementale... L'enjeu est de taille en radiobiologie mais aussi en radioprotection, dans la mesure où l'effet biologique réel de l'exposition à de faibles doses d'irradiation reste encore méconnu : les normes actuelles sont dérivées de modèles d'extrapolation de données obtenues à doses beaucoup plus élevées, comme par exemple le suivi des populations d'Hiroshima et Nagasaki. Le développement de dispositifs d'irradiation très précis, délivrant un nombre d'ions prédéterminé dans des cellules ciblées sous microscope, se révèle indispensable pour lever le voile sur un certains nombre d'interrogations actuelles, en particulier : quelle est la réponse biologique d'une cellule traversée par une seule particule alpha ? Quels mécanismes de réparation ou de mort sont activés lorsque différents sites intracellulaires sont touchés (noyau, cytoplasme) ? Y a-t-il communication intercellulaire et sous quelle forme (effet bystander) ? Jusqu'à présent limitée à des faisceaux collimatés, la technologie de ces dispositifs a évolué pour maintenant se tourner vers l'utilisation de microfaisceaux focalisés. En France, un tel dispositif a été récemment développé au CEN de Bordeaux Gradignan, permettant l'irradiation à dose contrôlée de cellules cultivées in vitro. En plus de la maîtrise des dimensions microscopiques, l'enjeu technologique est ici de contrôler le faisceau ion par ion puis de l'extraire de la ligne de faisceau jusqu'à la pression atmosphérique afin d'irradier des cellules préalablement repérées dans un puits de culture

Références

- [1] Y. LLABADOR and P. MORETTO, Applications of Nuclear Microprobe in the Life Science, , World Scientific Editor, 1998, pp 1-288.
- [2] P. MORETTO and M. BONNIN-MOSBAH, Proceedings of the 7th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications, Bordeaux, 10-15 september 2000, Nucl. Instr. & Meth. B181,1-775,(2001).

Observation d'objets cellulose en Microscopie Electronique à Balayage en mode environnemental

O. Biganska, F. Ducos, M. Repoux, P. Navard

Ecole des Mines de Paris, CEMEF, UMR CNRS / Ecole des Mines 7635, BP 207, 06904 Sophia Antipolis, France

olga.biganska@ensmp.fr

Résumé: La microscopie électronique à balayage en mode environnemental est une technique qui permet l'observation des échantillons isolants, ce qui est le cas de la plupart des polymères et surtout, des polymères naturels. En association avec une platine Peltier elle permet en plus de travailler avec les échantillons humides. La structure complexe des échantillons de cellulose obtenus après la régénération des solutions dans des bains aqueux a ainsi pu être mise en évidence. Leur texture microporeuse due à la séparation de phase se produisant lors de la régénération, a pu être préservée de toute évolution qu'elle aurait subie dans les conditions classiques et être analysée précisément.

1. Introduction

La cellulose, un des polymères naturels les plus répandus sur Terre, est fabriquée par la plupart des plantes et certaines bactéries. C'est une matière quasi inépuisable, biodégradable et biocompatible. Son potentiel attire de nombreuses industries telles que la papeterie et le textile, mais aussi l'emballage, l'hygiène et la médecine.

La cellulose n'est pas fusible en dessous de sa température de dégradation. Elle est susceptible d'être mise en forme sous forme de fils, films ou d'objets tridimensionnels moyennant des procédés plus ou moins complexes et polluants. Un procédé consistant à dissoudre la cellulose native dans une solution aqueuse de la N-méthylmorpholine-N-oxyde (NMMO), puis à réaliser la mise en œuvre d'une solution cellulose-NMMO-eau et à recouvrir la cellulose grâce au passage de la solution dans un bain régénérant, est industrialisé.

L'étude de la morphologie des objets cellulose juste après la régénération (à l'état humide) ainsi que celle concernant les objets finis (à l'état sec) s'avère capitale car, d'une part, elle permet d'expliquer la formation et l'évolution des structures dans ces objets et, d'autre part, de comprendre la relation entre la morphologie et les propriétés de ceux-ci. Notre travail concernait l'étude des objets tridimensionnels préparés au laboratoire et des fibres industrielles de cellulose régénérée.

2. Aperçu sur la formation de structure dans les objets cellulose

La formation de la structure dans les produits cellulose obtenus par le procédé NMMO est initiée lors du passage de la solution extrudée dans l'air où elle subit une déformation due à l'étirage (filage des fibres) et au gonflement (fabrication des films). La structure évolue lors de la précipitation de la cellulose lorsque la solution, sous la forme de fibres, de films ou d'objets 3D, passe par un bain régénérant. Elle continue à évoluer lors des traitements suivants, notamment le lavage et le séchage des produits [1].

Nous allons nous focaliser sur l'étape qui conduit à la précipitation de la cellulose. Elle a lieu lorsque la solution contenant du polymère (cellulose), du solvant (NMMO) et du non-solvant (eau)

entre en contact avec une substance qui est solvant pour la NMMO et non-solvant pour la cellulose. Des liquides polaires tels que l'eau ou les alcools jouent généralement ce rôle. La structure asymétrique qui en résulte est intimement liée au rapport des vitesses avec lesquelles le solvant quitte la solution et le non-solvant y pénètre. Les phénomènes qui ont lieu à ce stade suivent les principes de séparation de phase classiques : le type de texture en formation dépend de la position qu'occupe la composition de la solution sur le diagramme de phases.

Dans notre cas, la structure globale des échantillons de cellulose régénérés est asymétrique et présente un cœur contenant de larges pores entouré d'une peau fine. La texture microporeuse du cœur est induite par la séparation de phase spinodale [2].

3. Aspects expérimentaux

Le microscope électronique à balayage en mode environnemental contourne les limitations que présente un MEB conventionnel (dépôt d'une couche conductrice sur les échantillons isolants, impossibilité pour l'échantillon de contenir des espèces volatiles etc.) et permet d'examiner les échantillons non conducteurs, ce qui est le cas de la cellulose, ainsi que les échantillons hydratés. Nos observations ont été effectuées à l'aide d'un appareil Philips XL SEM environnemental LaB6. La platine Peltier PW6750 dont il peut être équipé sert à maintenir l'eau dans les échantillons à l'intérieur de la chambre du microscope. Elle utilise un module thermoélectrique pour changer la température, et en conjonction avec la pression de la chambre, crée de la condensation sur l'échantillon. Ce système permet d'atteindre un taux d'humidité fixe par un choix adéquat de la température et de la pression, ou de le varier en agissant sur ces paramètres.

4. Application

4.1. Objets 3D

L'aspect des échantillons de solutions de cellulose régénérés observés en microscopie électronique à balayage en mode environnemental est présenté sur la figure 1. La structure asymétrique coeur-peau est bien visible sur ces photographies. Les phénomènes suivants gouvernent sa formation. Lorsque la solution de cellulose entre en contact avec le non-solvant, une peau dense est formée car la concentration de la cellulose à la surface de l'échantillon subit une augmentation brusque. Dans le cas où la solution de cellulose initiale est liquide, et dépendant de facteurs comme la concentration de la solution en cellulose et/ou la concentration du bain en NMMO, des macropores (ou doigts) se forment sous la peau. La formation des doigts résulte de la déformation de l'interface en mouvement créée entre deux fluides (la solution fondue de cellulose et le non-solvant) de viscosités très différentes. Un tel scénario est essentiellement causé par le fait que le non-solvant pénètre plus vite dans la solution que le solvant n'en sort.

Un résultat tout à fait intéressant est le fait que la texture des échantillons est composée de microsphères d'environ 1-2 μ m, de taille très homogène. L'explication la plus probable est que ceci est la conséquence d'un mécanisme de décomposition spinodale suivie d'une casse en sphères induite par la minimisation de l'énergie interfaciale.

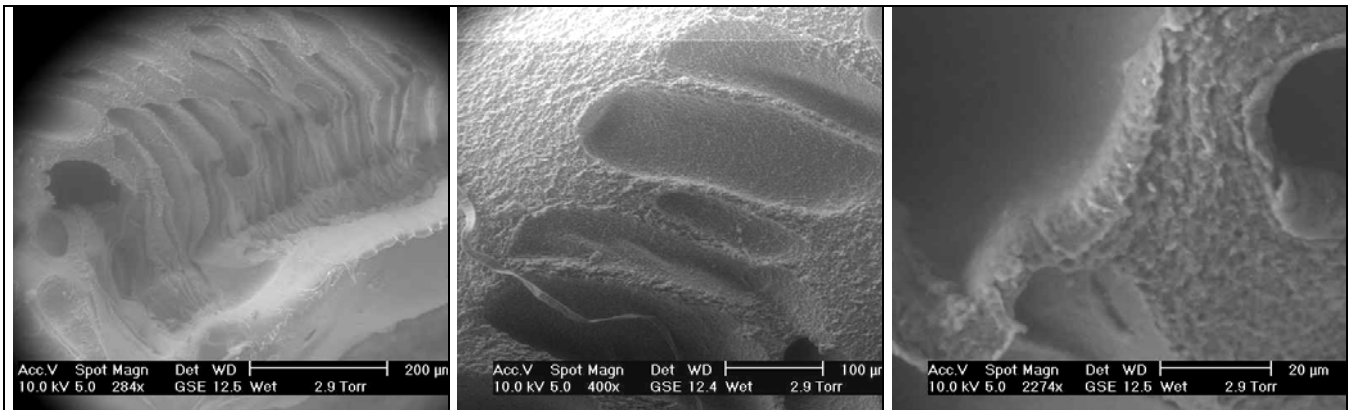


Fig. 1 - Photographies en microscopie électronique à balayage en mode environnemental de la coupe d'un échantillon de la solution fondue à 6% de cellulose, régénéré dans un bain d'eau à température ambiante : a et b vue générale et c texture des parois entre les pores.

L'avantage de la microscopie électronique à balayage en mode environnemental réside dans la possibilité d'analyser rapidement les différences de la structure engendrées par le changement des paramètres expérimentaux d'une part, et, d'autre part, de suivre l'évolution de la structure lors du séchage ou, au contraire, tenter de la préserver de tout changement en utilisant la platine Peltier. L'exemple ci-dessous illustre bien ces propos.

La figure 2 montre l'évolution de la structure coeur-peau des échantillons régénérés dans des bains à des températures différentes. On constate qu'elle subit un changement significatif lorsque la température du bain augmente. L'épaisseur de la peau diminue, le nombre de pores augmente et ils deviennent plus fins.

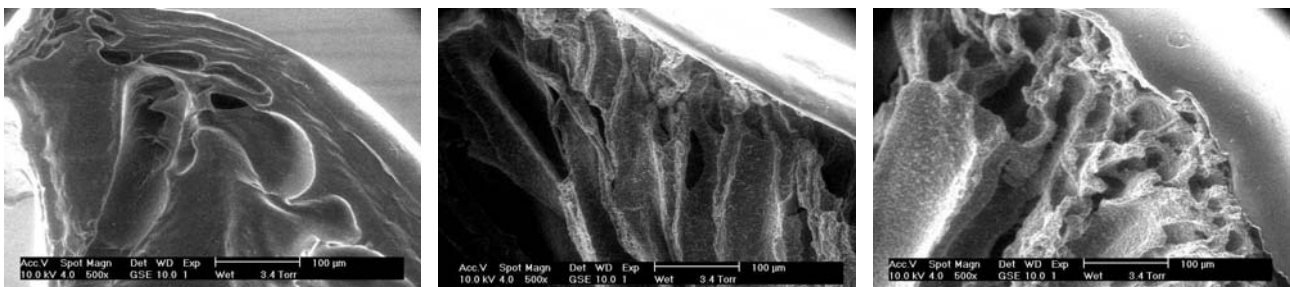


Fig.2 - Photographies en microscopie électronique à balayage en mode environnemental des coupes des échantillons des solutions fondues à 8% de cellulose, régénérés dans des bains d'eau à température variable : a - 20°C, b - 50°C et c - 80°C.

4.2. Fibres

Les fibres filées à partir de la cellulose par le procédé NMMO sont sujettes à la fibrillation, phénomène qui consiste en un détachement de fibrilles se produisant lors des sollicitations mécaniques à l'état humide. Ce phénomène est illustré par les photographies présentées sur la figure 3. Il est évident que la structure des fibres doit influencer ce phénomène. La faible taille de ces fibres (10μm au plus) rend extrêmement difficile l'étude de leur structure par des méthodes conventionnelles. Néanmoins, les expériences menées en microscopie électronique en transmission ont permis de montrer que la structure coeur-peau observée dans les objets tridimensionnels est également présente dans le cas des fibres. L'épaisseur de la peau qui s'est avérée être amorphe a été estimée à 35- 60 nm.

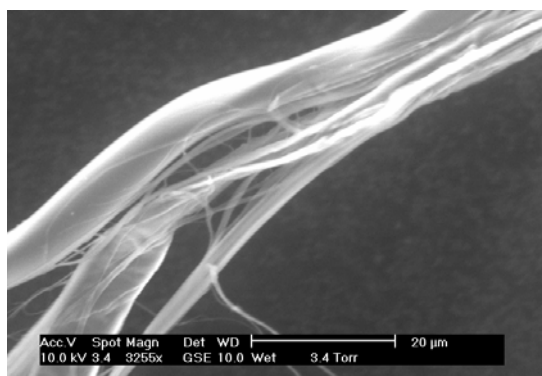


Fig.3 - Photographie en microscopie électronique à balayage en mode environnemental illustrant la fibrillation d'une fibre de cellulose régénérée.

Plusieurs fibres produites dans des conditions très différentes de manière à modifier leurs caractéristiques (notamment l'épaisseur de la peau) ont été soumises aux essais permettant d'induire la fibrillation. Ensuite, elles ont été observées en microscopie électronique à balayage dans le but de comprendre l'origine de ce phénomène et d'étudier l'influence de la structure sur la fibrillation. Pour quantifier cette influence, les histogrammes représentant les pourcentages des fibrilles en fonction de leur diamètre ont été construits suite à une analyse attentive des photographies. Il s'est avéré que la taille moyenne des fibrilles se trouve toujours dans l'intervalle de 100 à 500 nm et que les conditions de filage influencent peu la fibrillation.

5. Conclusions

La technique de microscopie électronique à balayage en mode environnemental est incontournable lorsqu'il s'agit d'analyser les échantillons isolants, ce qui est souvent le cas des polymères naturels. En association avec la platine Peltier, cette technique permet, de plus, d'analyser les échantillons humides. Les expériences menées avec les objets de cellulose régénérés ont permis de révéler la structure qu'ils ont immédiatement à la sortie du bain de régénération et de suivre l'évolution de cette dernière lors de traitements postérieurs.

Références

- [1] Fink H-P, Wiegel P, Purz HJ, Ganster J *Progress in Polymer Science* 26 (2001) 1473
 Shen TC, Cabasso I *Macromolecular solutions, solvent-property relationship in polymers*, R.B. Seymour and G.A. Stahl, Eds., Pergamon Press, New-York (1982)

Applications de l'Imagerie par Résonance Magnétique à la Caractérisation de la peau humaine *in vivo*

Bernard QUERLEUX

L'OREAL Recherche ; 1, Avenue Eugène Schueller ; 93601 Aulnay-sous-Bois

bquerleux@rd.loreal.com

1. Introduction

De nombreuses méthodes biophysiques permettent de caractériser la peau par des paramètres qui la représentent globalement. Cependant, sa structure hétérogène nécessite aussi des mesures localisées à l'échelle microscopique. Parmi les méthodes d'imagerie médicale, les 3 méthodes les plus utilisées actuellement pour l'étude de la peau saine ou pathologique sont l'imagerie ultrasonore à haute fréquence, la microscopie confocale et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). On sait que la première représente les interfaces entre différentes structures génératrices d'échos ultrasonores et sa simplicité de mise en œuvre explique en grande partie son succès croissant dans l'exploration de la peau *in vivo* [1-3]. De même, nous commençons à bien apercevoir les possibilités en terme de résolution spatiale microscopique qu'offre la microscopie confocale pour la visualisation des couches cutanées les plus superficielles [4-6]. Quant à l'IRM, bien que beaucoup plus lourde et coûteuse, elle présente de nombreux avantages : elle fournit de multiples contrastes de significations différentes, renseigne sur les caractéristiques de l'eau cutanée et, associée à la spectroscopie localisée, informe sur sa composition chimique.

2. Les contraintes de l'imagerie de la peau *in vivo* par IRM.

Du fait de la minceur de la peau par rapport aux autres organes, de l'ordre du millimètre, la spécificité des appareils dédiés à l'imagerie de la peau réside dans la nécessité d'améliorer très significativement la résolution spatiale qui représente la limite pour distinguer deux structures distinctes. Pour l'imagerie de la peau *in vivo*, il faut au moins une résolution de 0,1 mm dans le sens de la profondeur pour obtenir une image de bonne qualité. En IRM, la conception et la réalisation d'antennes radiofréquences de surface pour optimiser la sensibilité en réception et de systèmes de gradient offrant très localement une résolution spatiale submillimétrique ont été réalisés [7-9]. Pour notre part, afin de pouvoir étudier la peau sur la plupart des zones du corps humain, nous avons modifié un appareil « corps entier » conventionnel pour obtenir, localement au niveau cutané, une amélioration notable de la résolution spatiale. La conception d'une bobine de surface, capable de créer un gradient de champ magnétique intense dans la direction perpendiculaire à la surface de la peau est une solution optimale permettant de diminuer la taille du pixel dans cette direction jusqu'à 18 microns. Muni d'une antenne de détection de 3 cm de diamètre pour optimiser le rapport signal sur bruit de l'image, cet ensemble forme un module complet que l'on peut déplacer sur la table d'examen afin d'accéder à la plupart des régions du corps [10]. Lors d'une acquisition, la zone à imager repose sur la surface du module afin d'éviter tout artefact de mouvement.

3. Applications de l'IRM à haute résolution spatiale à l'étude de la peau humaine.

3.1. Imagerie morphologique.

Avec une résolution spatiale submillimétrique et correspondant à un champ de vue inférieur à 2 cm, on obtient des images de la peau par IRM permettant de visualiser les différentes couches cutanées (Fig.1). Sur ces images, l'épiderme en hypersignal se différencie nettement du derme en hyposignal. Enfin, l'hypoderme apparaît, traditionnellement très intense. On distingue également clairement les follicules pileux, les indentations de l'hypoderme dans le derme, ainsi que les travées conjonctives de l'hypoderme.

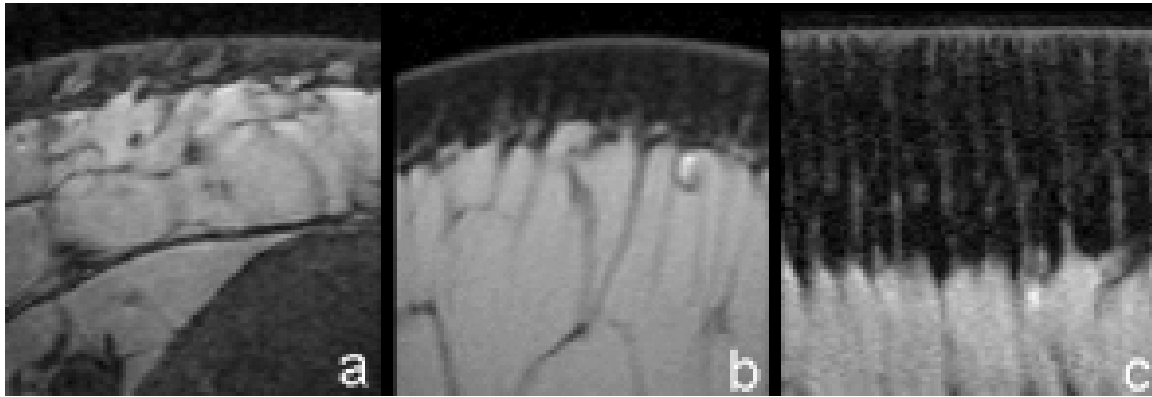
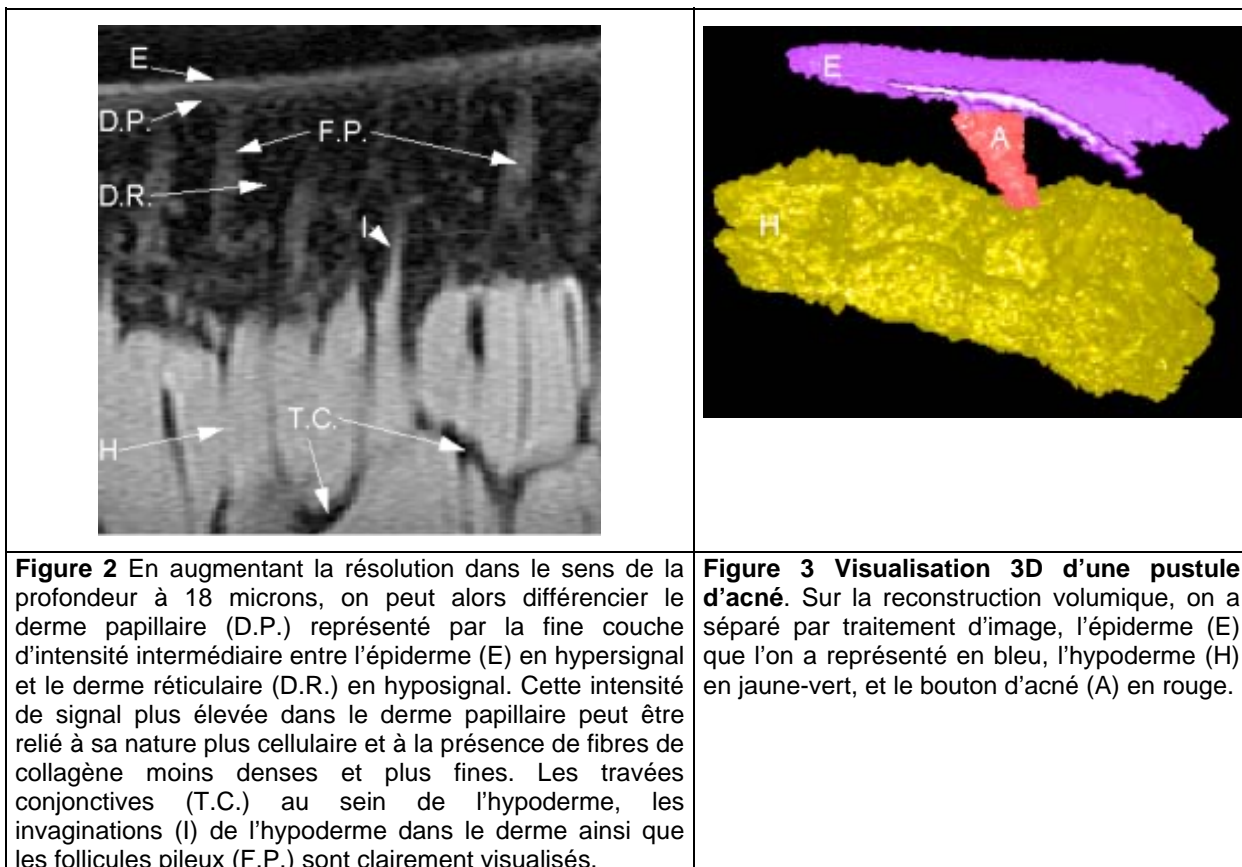


Figure 1. IRM haute résolution de la peau saine *in vivo*. a: mollet; b: cuisse; c: dos. On différencie l'épiderme en hypersignal, le derme en hyposignal et l'hypoderme en hypersignal séparé en lobules graisseux par des travées conjonctives en hyposignal. On peut également mesurer les variations de l'épaisseur de la peau en fonction du site anatomique.

En améliorant la résolution en profondeur d'un facteur 4, correspondant à une résolution de 18 microns en profondeur, le signal moyen dans le derme papillaire est supérieur à celui dans le derme réticulaire offrant un contraste permettant alors de les distinguer (Fig.2).

L'imagerie morphologique trouve des applications pour étudier la peau saine, par exemple dans la comparaison des images obtenues sur différentes zones du corps, ou pour comparer l'anatomie de la peau *in vivo* sur des zones photoprotégées ou photoexposées. Egalement, elle trouve des applications dans la caractérisation de lésions cutanées de petites dimensions comme l'acné (Fig. 3) ou dans le suivi de pathologies au cours d'un traitement.



3.2. Caractérisation tissulaire *in vivo* des différentes couches cutanées.

L'IRM se distingue des autres méthodes d'imagerie du fait que le signal reçu dépend de paramètres intrinsèques aux tissus qui peuvent être calculés en faisant varier les paramètres de la séquence d'acquisition de l'image. On peut ainsi mesurer les temps de relaxation T_1 et T_2 et la densité de protons correspondant à la teneur en eau « mobile » et en lipides dans les différentes couches cutanées. Ces paramètres renseignent sur l'état physico-chimique des tissus. Certains ont ainsi étudié la possibilité de différencier le caractère malin ou bénin de tumeurs cutanées par la mesure des temps de relaxation [11]. En ce qui nous concerne, dans une étude portant sur un groupe de 10 femmes d'âge inférieur à 40 ans et un groupe de 10 femmes d'âge supérieur à 70 ans [12], nous avons pu démontrer, d'une part que, quel que soit l'âge, la teneur en eau mobile est deux fois plus importante dans l'épiderme que dans le derme permettant une estimation de la fraction d'eau se trouvant sous une forme « liée » dans le derme. D'autre part, nous avons pu montrer que la teneur en eau mobile dans la partie superficielle du derme était significativement augmentée chez les personnes âgées par rapport au groupe d'âge inférieur à 40 ans, traduisant soit une augmentation de la teneur en eau totale au cours du vieillissement, et donc de sa fraction d'eau mobile, soit une modification des fractions d'eau « mobile » et « liée » (Tableau n°1).

	Densité de protons mobiles (U.A)		Significativité
	Age < 40 ans	Age > 70 ans	
Epiderme	0,90 ± 0,08	0,96 ± 0,11	NS
Derme superficiel	0,48 ± 0,10	0,58 ± 0,11	p<0,05
Derme profond	0,40 ± 0,11	0,47 ± 0,08	NS
Derme total	0,41 ± 0,10	0,49 ± 0,10	NS

Tableau n°1. Valeurs moyennes (\pm déviation standard) de la densité relative de protons mobiles des différentes couches cutanées obtenues chez 10 personnes âgées de plus de 70 ans et 10 personnes jeunes de moins de 40 ans. Quel que soit l'âge, la teneur en eau mobile est environ 2 fois plus importante dans l'épiderme que dans le derme. D'autre part, chez les personnes âgées, la teneur en eau mobile dans la partie superficielle du derme est significativement augmentée.

Une telle mesure quantitative de la teneur en eau mobile a été également utilisée pour calculer le profil d'hydratation dans la couche cornée épaisse du talon en réponse à l'application court terme d'un produit cosmétique hydratant. Grâce à l'imagerie (Fig. 4.a et Fig. 4.b) qui permet, par définition, de localiser le signal physique mesuré, nous avons pu mettre en évidence deux régions distinctes dans la couche cornée : la plus superficielle où l'hydratation peut être modifiée par un mécanisme extérieur (augmentation dans le cas du bain et du produit hydratant, diminution dans une expérience de lavages répétés), et une partie plus profonde où l'hydratation n'est pas modifiée (Fig.4.c) [13].

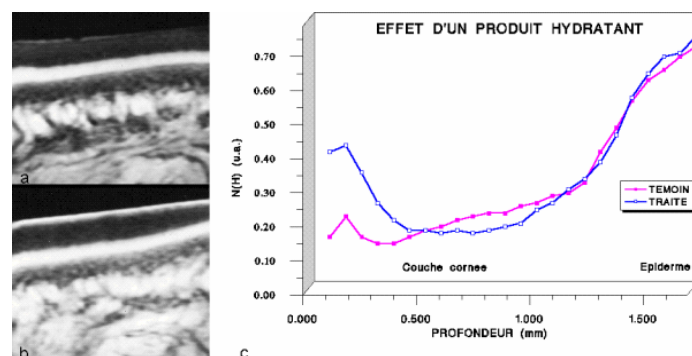


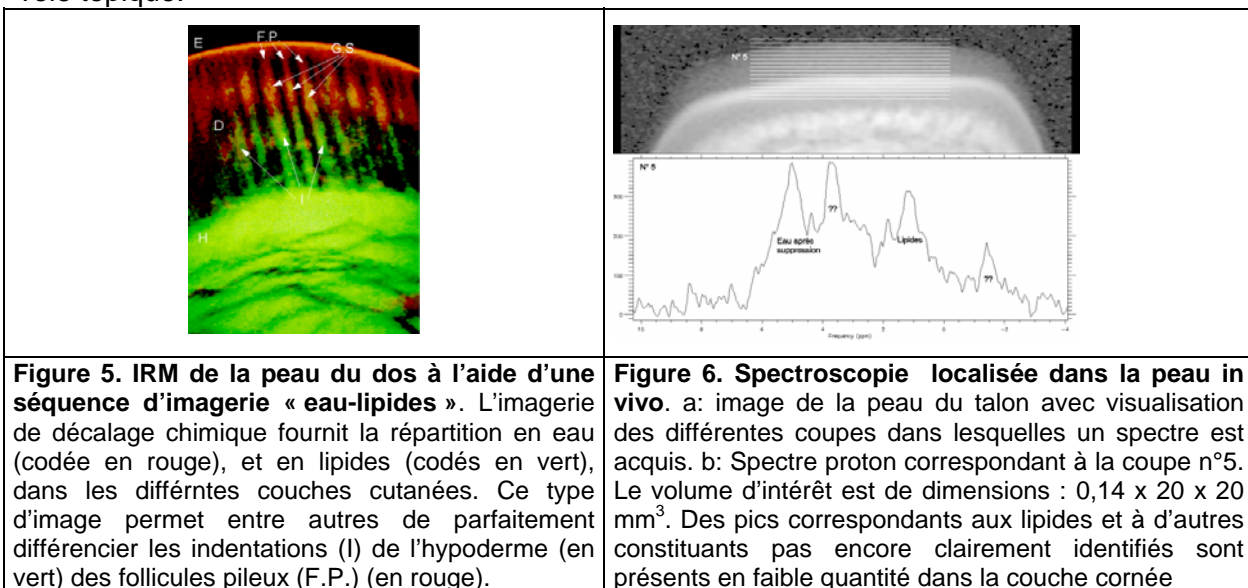
Figure 4 Evaluation par IRM quantitative d'un produit cosmétique hydratant. a: image témoin; b: image après application court terme d'un produit cosmétique hydratant; c: Calcul du profil d'hydratation de la couche cornée *in vivo* du talon. Grâce à l'imagerie, on peut distinguer deux régions dans la couche cornée: la plus superficielle où l'hydratation peut être modifiée par un mécanisme extérieur comme dans le cas d'un produit hydratant, et une partie profonde où l'hydratation n'est pas modifiée.

5.1. 3.3. Imagerie spectroscopique et spectroscopie localisée.

Si l'IRM permet d'obtenir une information morphologique sur les différentes structures cutanées, un premier approfondissement pour une meilleure caractérisation tissulaire passe par la mesure des temps de relaxation qui permettent de décrire principalement les différents « états » de l'eau dans la peau. Un pas supplémentaire dans l'analyse biochimique *in situ* est obtenu en réalisant une spectroscopie parfaitement localisée au sein des tissus.

Plusieurs méthodes permettent actuellement d'utiliser simultanément les principes de localisation et de spectroscopie pour réaliser des images séparées des différentes molécules. La figure 5 représente une superposition de deux images de la peau du dos dont l'une, codée en rouge représente la répartition des molécules d'eau tandis que l'autre, codée en vert, représente la répartition des molécules lipidiques. Cette image, obtenue sur le dos, présente un contraste optimal pour séparer au sein du derme les annexes cutanées riches en eau (les follicules pileux), de celles riches en lipides (les indentations de l'hypoderme ou les glandes sébacées). La partie supérieure du follicule pileux, en continuité avec l'épiderme, est, comme lui constitué essentiellement d'eau, donc codée en rouge. Par contre, la partie inférieure, contenant en particulier la glande sébacée, est majoritairement composée de lipides, donc codée en vert. Ce type d'acquisition correspond à une spectroscopie simplifiée « à deux pics », eau et lipides, mais qui peut être obtenue dans une région d'intérêt aussi petite qu'un pixel de l'image à haute résolution spatiale correspondant, dans notre cas, à un volume de l'ordre de $0,08 \text{ mm}^3$.

Pour obtenir un spectre complet, on est obligé, pour des problèmes de sensibilité, de définir une région d'intérêt représentant un volume plus important correspondant à plusieurs pixels de l'image. La plupart des études ont porté sur la spectroscopie du phosphore [14-16] et très peu le proton [17-20]. Néanmoins, dans une application *in vivo*, la plus forte sensibilité de ce noyau est un élément important. Ainsi, il est maintenant possible d'acquérir un spectre proton dans chaque coupe parallèle à la surface de la peau, de seulement $0,14 \text{ mm}$ d'épaisseur sur une section de 20 mm de diamètre. La figure 6.a présente une image du talon avec une couche cornée de l'ordre de 1 mm d'épaisseur et un épiderme épaissi de l'ordre de $0,5 \text{ mm}$. Sur cette image sont superposées les différents éléments de volume d'épaisseur $0,14 \text{ mm}$ dans lesquels les spectres sont acquis. La figure 6.b présente le spectre après suppression du signal de l'eau dans la couche n° 5 correspondant à la partie supérieure de la couche cornée. On peut détecter une faible quantité de lipides de la couche cornée ainsi que d'autres métabolites en très faibles concentrations non encore assignés d'une manière reproductible. Un des enjeux essentiels de cette méthode réside dans son éventuel apport dans les études de pénétration de produits par voie topique.



4. Conclusion

Si l'examen visuel et la biopsie de la peau restent les principaux outils pour étudier la peau saine ou pour établir un diagnostic dermatologique, l'imagerie par résonance magnétique à haute résolution spatiale est dès à présent une méthode non invasive très riche et très prometteuse pour caractériser la peau humaine saine ou pathologique [21]. L'IRM semble ainsi pouvoir jouer un rôle utile pour établir la meilleure voie chirurgicale dans le cas des tumeurs situées dans des zones difficiles comme le visage ou sous l'ongle [22]. D'autre part, comme outil de recherche pour augmenter notre connaissance de la peau humaine *in vivo*, l'IRM s'avère être une méthode de référence pour étudier l'interaction entre l'eau et les macromolécules au sein du derme. L'approfondissement de cette recherche devrait contribuer, par exemple, à une meilleure compréhension des mécanismes du vieillissement de la peau.

La voie d'avenir sera certainement de progresser dans le couplage entre l'imagerie fournissant la localisation spatiale des structures cutanées, et la spectroscopie apportant des

informations sur la nature de ces structures. Dans la quête d'une imagerie spectroscopique localisée dans de petits éléments de volume dans la peau *in vivo*, l'IRM à haute résolution spatiale a déjà donné des résultats préliminaires très encourageants.

Enfin, comme toutes les méthodes d'exploration atraumatique, l'IRM à haute résolution spatiale permet de suivre l'évolution de la peau sous traitement. Parmi ces traitements, ceux que constituent la cosmétologie pourront tirer avantage de cette technique dans la mise au point et la validation de nouveaux produits.

Tous les résultats présentés résultent d'une collaboration entre les Laboratoires de Recherche avancée de L'Oréal et le Centre Inter Etablissement de Résonance Magnétique, URA CNRS 2212, Hôpital de Bicêtre.

Bibliographie

- [1] Payne P.A., Grove G.L., Alexander H., Quilliam R.M., Miller D.L., Cross-sectional ultrasonic scanning of skin using plastic film transducers, *Newsletters Bioeng Skin*, 3:241-246, 1982.
- [2] Querleux B., Lévêque J.L., de Rigal J., In vivo cross-sectional ultrasonic imaging of human skin, *Dermatologica*, 177:332-337, 1988.
- [3] Fornage B., McGavran M.H., Duvic M., Waldron C.A., Imaging of the skin with 20 Mhz US, *Radiology*, 189:69-76, 1993.
- [4] Corcuff P., Bertrand C., Lévêque J.L., Morphometry of human epidermis in vivo by real-time confocal microscopy, *Arch Dermatol Res*, 285:475-481, 1993.
- [5] Rajadhyaksha M., Grossman M., Esterowitz D., Webb R.H., Anderson R.R., In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin : melanin provides strong contrast, *J Invest Dermatol*, 104:946-952, 1995.
- [6] Masters B.R., Gonnord G., Corcuff P., Three-dimensional microscopic biopsy of in vivo human skin: a new technique based on a flexible confocal microscope, *J Microsc*, 185:329-338, 1996.
- [7] Hyde J.S., Jesmanowicz A., Kneeland J.B., Surface coil for MR imaging of skin, *Magn Reson Med*, 5:456-461, 1987.
- [8] Nagel TL, Alderman DW, Schoenborn RR, Hendrickson M, Shelby J, Saffle J, Schweizer MP: The slotted crossover surface coil: a detector for in vivo NMR of skin. *Magn Reson Med* 1990;16:252-268.
- [9] Kwon Song H., Wehrl F.W., Ma J., In vivo MR microscopy of the human skin, *Magn Reson Med*, 37:185-191, 1997.
- [10] Bittoun J., Saint-Jalmes J., Querleux B., Darrasse L., Jolivet O., Idy-Peretti I., Wartski M., Richard S., Lévêque J.L., In vivo high-resolution imaging of the skin in a whole-body MR system at 1.5T, *Radiology*, 176:457-460, 1990a.
- [11] Takahashi M., Kohda H., Diagnostic utility of magnetic resonance imaging in malignant melanoma, *J Am Acad Dermatol*, 27:51-54, 1992.
- [12] Richard S., Querleux B., Bittoun J., Jolivet O., Idy-Peretti I., de Lacharrière O., Lévêque J.L., Characterization of the skin in vivo by high resolution magnetic resonance imaging: water-behavior and aged-related effects, *J Invest Dermatol*, 100:705-709, 1993.
- [13] Querleux B., Richard S., Bittoun J., Jolivet O., Idy-Peretti I., Bazin R., Lévêque J.L., In vivo hydration profile in skin layers by high resolution magnetic resonance imaging, *Skin Pharmacol*, 7:210-216, 1994.
- [14] Chen Y., Richards T.L., Izenberg S., Golden R.N., Williams D.L., Nelson J.A., Steen R.G.: In vivo phosphorus NMR spectroscopy of skin using a crossover surface coil. *Magn Reson Med*, 23:46-54, 1992.
- [15] Zemtsov A., Dixon L., Cameron G., Human in vivo phosphorus 31 magnetic resonance spectroscopy of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 30:959-965, 1994.
- [16] Collier S.W., Sardon S., Ruiz-Cabello J., Johnson W.A., Cohen J.S., Schwartz S.L., Measurement of pharmacodynamic effects of dexamethasone on epidermis by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy in vitro. *J Pharm Sci* 83:1339-1344, 1994.
- [17] Kim Y.H., Oreberg E.R., Faull K.F., Wade-Jardetzky N.G., Jardetzky O., 1H NMR spectroscopy: an approach to evaluation of diseased skin in vivo, *J Invest Dermatol*, 92:210-216, 1989.
- [18] Bittoun J., Jolivet O., Querleux B., Richard S., Suminski M., Idy-Peretti I., Lévêque J.L., High spatial resolution MR spectroscopic imaging and localized spectroscopy of the skin, *SMRM, book of abstracts* page 33, 1993.
- [19] Wright A.C., Bohning D.E., Pecheny A., Spicer K.M., Dermatogerontological correlations in vivo by 1H CSI on a 1.5T clinical magnet, *SMRM, book of abstracts* page 1916, 1995.
- [20] Querleux B., Jolivet O., Bittoun J., In vivo MR spectroscopy in human skin, in P. Elsner, A. Barel, E. Berardesca, B. Gabard, J. Serup (Eds): Current Problems in dermatology: Advances in skin bioengineering, Vol 26, 1997, (sous presse).
- [21] Zemtsov A., Dixon L., Magnetic resonance in dermatology, *Arch Dermatol*, 129:215-218, 1993.
- [22] Goettmann S., Drape J.L., Idy-Peretti I., Bittoun J., Thelen P., Arrive L., Belaich S., Magnetic resonance imaging: a new tool in the diagnosis of tumours of the nail apparatus, *Br J Dermatol*, 130:701-710, 1994.

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

Maurice ROMAND, Marlène CHARBONNIER

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1, Laboratoire de Sciences et Ingénierie des Surfaces, 69622 Villeurbanne Cédex (France)

Maurice.Romand@univ-lyon1.fr, Marlène.Charbonnier@univ-lyon1.fr

Résumé: Le présent document rappelle le principe de la spectrométrie d'émission X induite par excitation électronique de basse énergie (LEEIXS). Cette technique dispersive en longueur d'onde (WDS) utilise comme source d'excitation un faisceau électronique émis par un tube à décharge opérant donc sous vide primaire. Le potentiel de cette technique d'émission des rayons X mous et ultra-mous en tant qu'outil d'analyse des surfaces et des films minces (< 100 nm) est illustré à l'aide de différents exemples (analyse des éléments légers C, N, O, F, Si ... via leur radiation K_{α}). Ces exemples concernent la caractérisation de films organiques ou polymères obtenus par auto-assemblage (SAM), électrodéposition, électropolymérisation, polymérisation plasma, évaporation thermique ... sur différents substrats. Ils démontrent en particulier comment les analyses LEEIXS réalisées peuvent être utilisées pour optimiser certains procédés de dépôts de films minces et ultra-minces.

1. Introduction

La caractérisation chimique des surfaces, interfaces / interphases et films minces est aujourd'hui indispensable pour assurer le développement et la mise sur le marché de nombreux matériaux / multimatériaux dont a besoin la technologie moderne. Pour ce faire, il existe une demande de plus en plus pressante visant à disposer de techniques adaptées permettant en particulier :

- de contrôler et d'optimiser les procédés de traitements de surface et de dépôts de films minces,
- de corrélérer la nature chimique (composition et structure) de ce type de matériaux avec leurs propriétés physiques, mécaniques et chimiques,
- d'appréhender et de prévoir leur mode de dégradation dans des environnements divers c'est-à-dire sous contraintes physico-chimiques et/ou mécaniques.

Dans ce contexte général, l'objet du présent document vise à mettre en exergue le potentiel de la spectrométrie d'émission X induite par excitation électronique de basse énergie (LEEIXS) en tant qu'outil d'analyse et de caractérisation des surfaces et des films minces et ultra-minces via la dispersion et la détection des radiations X de grande longueur d'onde caractéristiques en particulier des éléments légers (B, C, N, O, F...).

2. Dispositif expérimental

L'instrument utilisé est basé sur une technique d'émission X dispersive en longueur d'onde (technique WDS). Il emploie, et c'est là sa principale originalité, une source d'excitation constituée d'un tube à décharge ("tube à gaz" ou "tube à cathode froide") opérant sous vide primaire et délivrant un faisceau électronique de basse énergie (1 - 5 keV). Cette source, implantée à demeure au sein du spectromètre, communique avec l'atmosphère de ce dernier par l'intermédiaire d'une anode percée d'un trou central. L'atmosphère résiduelle du spectromètre (1 - 10 Pa) constitue donc le gaz ionisable. Pour une tension de fonctionnement fixée, la stabilisation du courant débité par la

source à cathode froide est obtenue en régulant la pression au moyen d'une microfuite commandée électroniquement. Dans les conditions habituelles de fonctionnement, ce courant est sélectionné entre 0,1 et 0,2 mA. Le faisceau d'électrons émis par la source fonctionne en régime de décharge luminescente anormale ; il résulte principalement du bombardement de la cathode (Al) par les ions positifs créés dans l'espace interélectrode. Après franchissement de l'orifice anodique, une partie de ce faisceau vient bombarder la surface de l'échantillon soumis à l'analyse. En première approximation, l'aire bombardée (0,5 à 1 cm²) est fonction du choix du diamètre de l'orifice anodique. Les rayonnements X émis par l'échantillon (rayonnement de freinage et rayonnements caractéristiques) sont ensuite dispersés en fonction de leur longueur d'onde en utilisant des cristaux, des pseudo-cristaux et des miroirs multicouches de grande distance interréticulaire et sont enfin détectés à l'aide d'un compteur proportionnel à flux gazeux dont la fenêtre d'entrée est adaptée (nature et épaisseur) à une bonne transmission des rayonnements X mous et ultra-mous.

D'une manière générale, ce type de source permet [1-7] :

- l'obtention de forts rendements de production des rayons X de faible énergie ;
- l'étude d'échantillons aussi bien conducteurs que semi-conducteurs ou isolants sans qu'il soit nécessaire dans ce dernier cas de les revêtir d'un film conducteur ;
- l'analyse quantitative des échantillons en minimisant les effets de matrice tels que ceux couramment rencontrés en microanalyse X (EPMA) et en spectrométrie de fluorescence X (XRFS) ;
- la caractérisation des surfaces solides et des films minces et ultra-minces, cette dernière possibilité étant associée à la faible profondeur au sein de laquelle pénètrent les électrons incidents de faible énergie et par conséquent à la faible épaisseur au sein de laquelle prennent naissance les rayonnements X caractéristiques (typiquement quelques dizaines de nm).

3. Résultats

Le premier exemple décrit met en évidence la sensibilité de la technique LEEIXS vis-à-vis des éléments légers. Il concerne la caractérisation de films ultra-minces résultant de l'auto-assemblage de molécules de n-alcanethiols chimisorbées à la surface d'un substrat d'or. Ces molécules linéaires de formule SH-(CH₂)_n-CH₃ possèdent une chaîne hydrocarbonée (R) saturée de longueur variable selon la valeur de n et un groupement terminal polaire thiol (SH) lequel est connu pour son aptitude à former des thiolates R-S-Au(I) par coordination avec les atomes d'or. Dans ce travail, les films métalliques d'or de 60 nm d'épaisseur sont réalisés par pulvérisation cathodique d'une cible d'or sur des substrats d'aluminium et l'adsorption des molécules organiques sur les échantillons ainsi obtenus est effectuée par immersion dans une solution 10⁻³ M du thiol considéré dans l'heptane. Les substrats revêtus des films monomoléculaires sont alors rincés dans le solvant correspondant et séchés sous flux d'azote sec. La figure 1 représente le spectre C K_α d'un film greffé correspondant à n + 1 = 16 atomes de carbone. Le présent résultat est obtenu en utilisant un faisceau électronique incident de 3 keV et une intensité de courant de 0,1 mA et en dispersant les radiations X correspondantes à l'aide d'un cristal analyseur d'octadecyl hydrogen maleate (OHM ; 2d = 6,35 nm). La figure 2 montre l'augmentation de l'intensité du signal C K_α (transition C 2p → C 1s) en fonction du nombre (n + 1) d'atomes de carbone de la molécule chimisorbée c'est-à-dire en fonction de la longueur de la chaîne carbonée. Notons que le changement de pente observé figure 2 s'explique par une augmentation de la densité de greffage dans le cas des thiols à longue chaîne, les molécules correspondantes étant mieux ordonnées grâce à la formation d'un plus grand nombre de liaisons de Van der Waals interchaînes. Le présent résultat démontre clairement que la spectrométrie LEEIXS est tout à fait capable d'analyser un élément léger comme le carbone jusqu'à des seuils de l'ordre de la monocouche atomique. Soulignons néanmoins dans le présent cas qu'une part probablement non négligeable de l'intensité du signal C K_α émis résulte de l'excitation des atomes de C par les électrons incidents rétrodiffusés par le substrat sous-jacent de numéro atomique élevé [5].

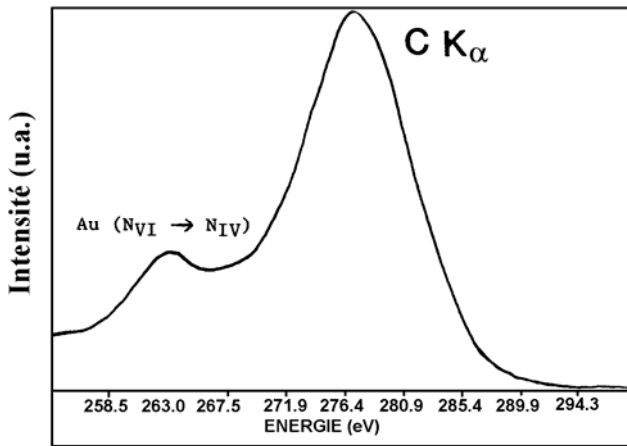


Fig. 1 - Spectre C K α d'un n-alcane thiol (C 16) greffé à la surface d'un substrat d'or.

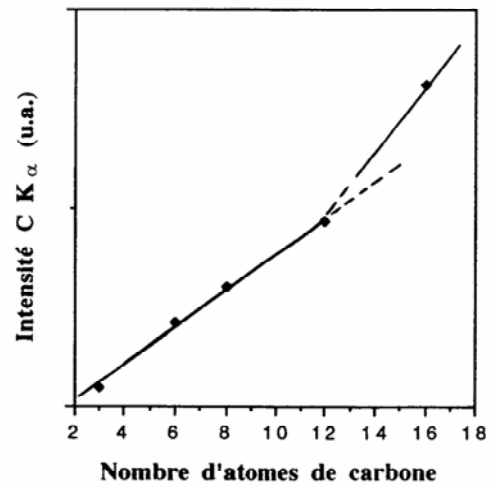


Fig. 2 - Chimisorption de n-alcane thiols sur des substrats d'or : variation de l'intensité de la bande C K α (mesures LEEIXS) en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée.

L'exemple suivant traite de la caractérisation de films organiques dits de carbone amorphe hydrogéné (notation a-C:H) déposés sur des substrats d'acier inoxydable par un procédé de "polymérisation" plasma. Cette technique de dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PACVD) permet de réaliser à basse température des films solides à partir d'un précurseur gazeux (ici le méthane) sous pression réduite via une activation chimique générée par une décharge électrique. Dans le présent cas, les dépôts sont effectués dans un réacteur type diode à électrodes parallèles, le substrat à revêtir étant l'électrode reliée au générateur radio-fréquence (13,56 MHz).

La figure 3 a montre, en fonction du temps de dépôt, l'augmentation de l'intensité du signal C K α émis par les films formés les autres paramètres expérimentaux (pression de travail : 20 mTorr et débit du gaz réactant: 30 sccm; densité de puissance délivrée par le générateur : 0,22 W.cm⁻²) étant maintenus constants. De la même façon, on peut suivre la variation de l'intensité d'un signal

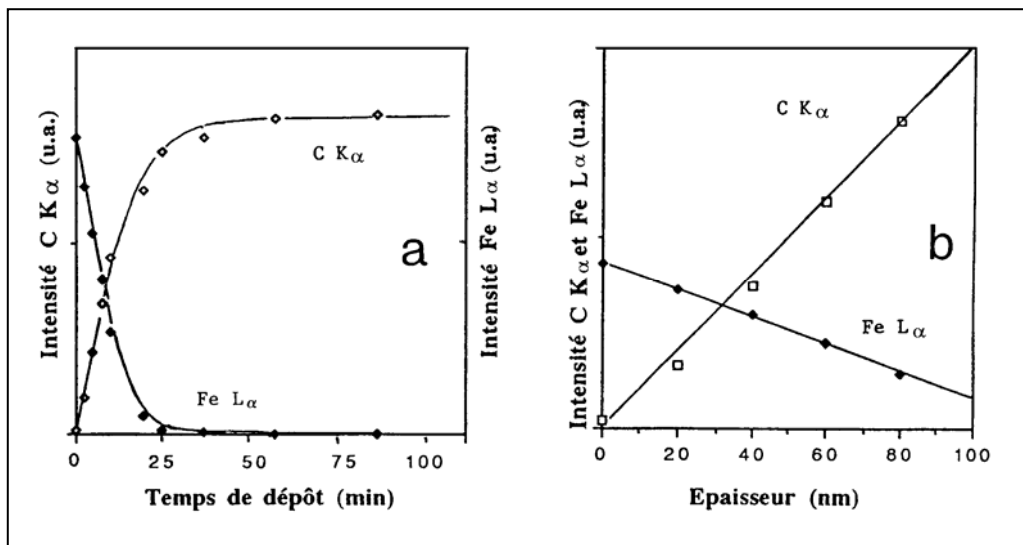


Fig. 3 - Films minces de carbone amorphe hydrogéné déposés sur des substrats d'acier inoxydable. Variation de l'intensité des signaux C K α et Fe L α en fonction (a) de la durée du dépôt, (b) de l'épaisseur du film déposé (échelle jusqu'à environ 100 nm).

caractéristique du substrat. La figure 3 a représente également la diminution de l'intensité du signal Fe L α (transition Fe 3d_{5/2} → Fe 2p_{3/2}) relatif au substrat d'acier inoxydable lorsque le temps de dépôt

croît, c'est-à-dire lorsque l'épaisseur du film de carbone hydrogéné augmente. Comme on peut le constater sur la figure 3 b, l'intensité du signal C K_{α} augmente linéairement avec l'épaisseur du dépôt jusqu'à environ 100 nm ce qui correspond (figure 3 a) à une durée de traitement d'environ 25 min. L'étendue de cette gamme de linéarité dépend en particulier de l'énergie du faisceau électronique incident (3,5 keV dans le présent travail). Ces divers résultats sont obtenus en utilisant pour disperser les radiations C K_{α} et Fe L_{α} les cristaux analyseurs d'OHM et de phthalate acide de thallium (TIAP ; $2d = 2,571$ nm). Il est à noter que, lorsque l'épaisseur du dépôt devient supérieure à l'épaisseur fournissant l'information analytique, l'intensité du signal C K_{α} reste quasiment constante d'où l'existence (figure 3 a) de l'asymptote horizontale.

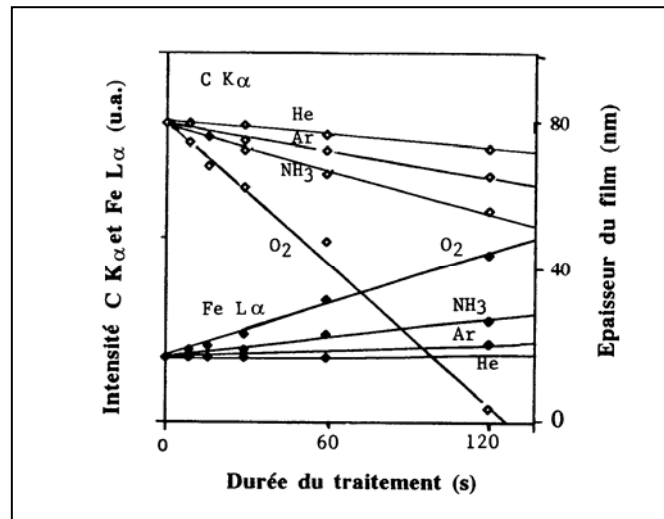


Fig. 4 - Influence de la durée d'un traitement plasma (O_2 , NH_3 , Ar ou He) sur l'érosion de films de carbone hydrogéné de 80 nm d'épaisseur (films déposés sur un substrat d'acier).

Les films de carbone amorphe hydrogéné précédemment décrits sont inertes chimiquement. Les travaux effectués au sein du laboratoire [8] montrent que de tels films peuvent être utilisés en vue de jouer un rôle de pontage entre un substrat métallique et un agent de recouvrement organique type adhésif, peinture, vernis... mais que ce rôle n'est possible que si une fonctionnalisation chimique de la surface du dit film est réalisée préalablement. Cette opération est également effectuée par traitement plasma mais ce faisant le dépôt de carbone amorphe hydrogéné subit une érosion (ionique et/ou chimique) qu'il convient de contrôler. Un tel contrôle peut être effectué par spectrométrie LEEIXS en suivant en fonction du temps de traitement (plasma O_2 , NH_3 , Ar ou He) la diminution d'intensité des radiations C K_{α} caractéristiques de films élaborés dans les mêmes conditions et initialement de même épaisseur (~ 80 nm) et l'augmentation concomitante de l'intensité de la radiation Fe L_{α} caractéristique du substrat. La figure 4 met clairement en évidence le rôle plus "décapant" du plasma O_2 .

L'exemple suivant est relatif à des dépôts réalisés en phase liquide. Il concerne la caractérisation de films organosilanés utilisés en tant qu'agent de couplage entre un substrat inorganique (ici un acier inoxydable 304 L) et un polymère (adhésif). Rappelons que les organosilanes ont pour formule générale $(RO)_3Si-R'-Y$ où Y est un groupement organofonctionnel sélectionné pour sa réactivité vis-à-vis d'un polymère et RO- un groupement alcoxy qui s'hydrolyse en solution aqueuse pour former un hydroxysilane qui réagit avec un groupement hydroxyle de surface du substrat inorganique. L'élimination d'une molécule d'eau ainsi formée à l'interface silane/substrat conduit alors à la création à la surface du substrat d'une liaison covalente forte métal-oxane Me-O-Si. Dans les expériences réalisées, les substrats utilisés sont dégraissés par ultra-sons dans l'acétone à $60^\circ C$ puis traités chimiquement en milieu sulfochromique et rincés abondamment à l'eau distillée. Le silane considéré dans cette étude est le γ -aminopropyltriéthoxysilane (γ -APS). Pour effectuer la réaction de silanation proprement dite, les substrats sont immergés durant une minute dans un mélange eau/éthanol/silane à pH voisin de 10,6 puis séchés sous un flux d'azote avant de subir un traitement thermique à $100^\circ C$ pendant une heure. Les échantillons traités sont enfin

abondamment rincés afin d'éliminer toutes les espèces non chimisorbées présentes à la surface des substrats. La figure 5 représente l'évolution de l'intensité des radiations C K_{α} , O K_{α} et Si K_{α} (transition Si 3p \rightarrow Si 1s) caractéristiques des films silanés formés en fonction de la concentration de la solution en γ -APS, les autres paramètres d'élaboration étant maintenus constants. Cette étude LEEIXS est effectuée en choisissant, pour les électrons incidents, une énergie de 3 keV (cas de la détection des radiations C K_{α} et O K_{α}) et de 4,5 keV (cas de la détection des radiations Si K_{α}) et une densité de courant de $0,1 \text{ mA.cm}^{-2}$ de façon à éviter tout problème de modification des échantillons pendant la durée de l'analyse. Les cristaux analyseurs employés sont l'OHM, le TIAP et le pentaerythritol (PET ; $2d = 0,875 \text{ nm}$) pour disperser respectivement les radiations C K_{α} , O K_{α} et Si K_{α} . A l'évidence, les résultats obtenus (Fig. 5), concernant en particulier l'évolution du signal Si K_{α} , montrent que l'épaisseur du film formé et sa structure sont optimisées pour une concentration de la solution d'environ 0,2 % dans le cas du γ -APS. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature [9] et sont par ailleurs en accord avec des données obtenues par spectrométrie photoélectronique XPS et par spectrométrie de masse des ions secondaires TOF-SIMS [10], l'épaisseur maximale des couches silanées formées étant de l'ordre de 2 à 3 nm.

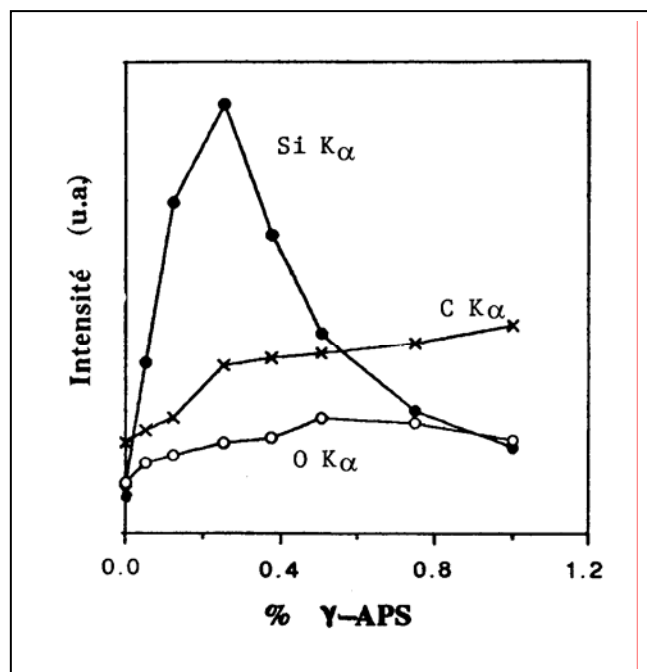


Fig. 5 - Influence de la concentration en γ -APS de la solution de silane sur l'épaisseur du film déposé (l'intensité du signal Si K_{α} mesurée par LEEIXS est directement proportionnelle à l'épaisseur).

La figure 6 est relative à des films de silane obtenus dans cet exemple par électrodéposition sur des substrats d'aluminium. L'électrolyte est constitué d'une solution contenant en volume 3 % de γ -APS, 25 % d'éthanol et 72 % d'eau distillée. Le dépôt est effectué en opérant par voie potentiostatique c'est-à-dire en appliquant une tension constante entre le substrat d'aluminium (cathode de la cellule électrochimique) et une électrode de Pt. Les substrats revêtus sont analysés par LEEIXS après un rinçage abondant (élimination des espèces peu adhérentes) et un séchage sous courant d'azote sec. La figure 6 montre l'augmentation de l'intensité du signal Si K_{α} caractéristique des films de silane en fonction de la tension appliquée aux bornes de la cellule d'une part, du pH de la solution d'autre part. Notons que chaque point expérimental de la figure 6 est relatif à une mesure sur un échantillon dont le film de silane a été électrodéposé pendant un temps constant (15 min) et à des valeurs prédéterminées de la tension appliquée (3-10 volts) et du pH (pH naturel de la solution = 10,6 ; modification par addition d'HCl). Le quasi-plateau associé à chaque courbe résulte du fait que les films électrodéposés deviennent de moins en moins conducteurs au fur et à mesure que leur épaisseur augmente. La diminution de l'épaisseur de ces mêmes films, lorsque le pH de la solution

diminue, est, quant à elle, associée à la compétition existant entre la croissance du film et sa dissolution dans l'électrolyte (dissolution beaucoup plus prononcée en milieu acide). Notons encore que les films de silane ainsi réalisés par électrodéposition présentent l'avantage d'être plus uniformément répartis à la surface des substrats qu'en utilisant le procédé conventionnel par simple immersion. Dans les exemples décrits figure 6, les épaisseurs maximales des films déposés sont inférieures à 10 nm environ (analyses XPS) [11].

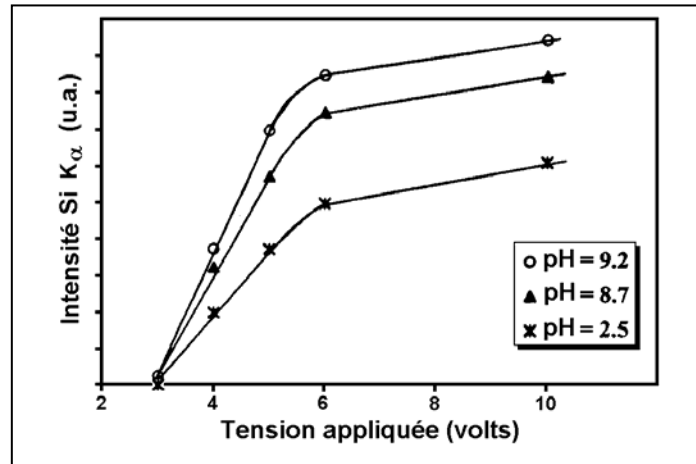


Fig. 6 - Films de silane électrodéposés sur des substrats d'aluminium. Variation de l'intensité Si K_{α} en fonction de la tension appliquée et du pH de la solution de silane (γ -APS).

L'exemple suivant est relatif à des films minces de polyaniline déposés sur un substrat d'acier inoxydable par électropolymérisation (oxydation anodique) à partir d'un électrolyte constitué d'une solution aqueuse d'aniline ($C_6H_5NH_2$), de sulfate de sodium (électrolyte support) et d'acide sulfurique (ajustement du pH). La figure 7 représente des bandes d'émission C K_{α} obtenues en utilisant différentes densités de courant du faisceau d'électrons incidents (temps d'acquisition des spectres = 2 min). Comme on peut le constater, les spectres (b) et (c) correspondant aux densités de courant les plus élevées ($0,2$ et $0,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) subissent une légère modification de leur structure fine sous l'effet du faisceau d'électrons (déplacement du maximum de la bande d'émission). En revanche, le spectre (a) réalisé avec la densité de courant la plus faible ($0,1 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) ne subit aucune perturbation notable en fonction du temps d'irradiation [11, 12]. Cela signifie, dans ces conditions, que le matériau ne subit aucun dommage significatif sous le bombardement électronique. La figure 8 est relative à des films de polyaniline déposés sur des substrats en alliage de titane (TA6V) par voie potentiostatique (2 V). Elle montre, en fonction de la durée d'électropolymérisation, les variations concomitantes de l'intensité du courant traversant la cellule électrochimique et de l'intensité des radiations C K_{α} et S K_{α} (transition S 2p \rightarrow S 1s) caractéristiques respectivement du dépôt polymère et des impuretés sulfate (SO_4^{2-}) incorporées au sein de ce même dépôt durant le processus anodique. Notons que l'intensité des radiations X considérées est ici directement proportionnelle à l'épaisseur des films minces de polyaniline déposés. La première partie de ces différentes courbes (jusqu'à $t = 10$ min) correspond à la nucléation d'îlots de polyaniline sur le substrat métallique, la seconde ($10 < t < 30$ min) à la croissance du film proprement dit. Au-delà ($t > 30$ min), le dépôt devient plus ou moins pulvérulent et son adhésion au substrat diminue [11].

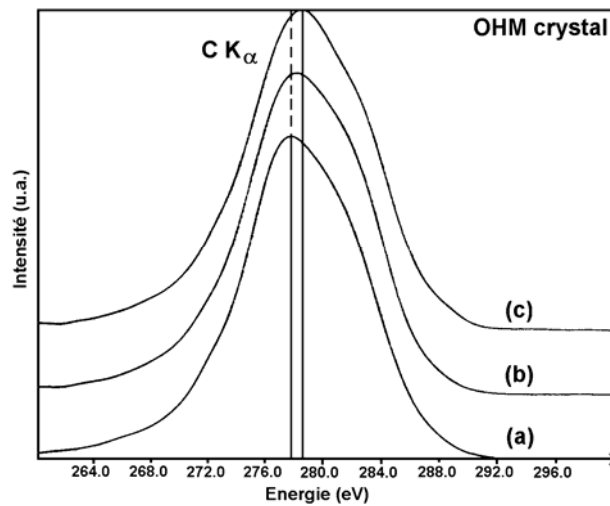


Fig. 7 - Spectres LEEIXS $C K_{\alpha}$ d'un film de polyaniline (spectres obtenus avec un faisceau électronique incident de 3 keV et différentes densités de courant (a) 0,1 ; (b) 0,3 et (c) 0,5 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$)).

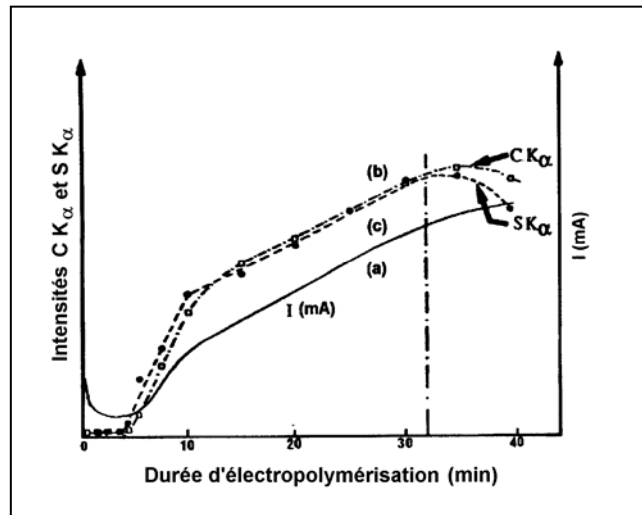


Fig. 8 - Formation d'un film de polyaniline par électropolymérisation sur un substrat de TA6V. Corrélation entre les variations de l'intensité du courant traversant la cellule électrochimique (dépôt par voie potentiostatique) et les variations d'intensité des radiations $C K_{\alpha}$ et $S K_{\alpha}$ caractéristiques des films formés.

Dans une dernière partie, il est important de montrer que la technique LEEIXS permet, en utilisant une faible densité de courant du faisceau d'électrons incidents, d'étudier directement la surface de matériaux polymères techniques possédant une stabilité chimique et thermique suffisante. A titre d'exemple, la figure 9 représente les bandes d'émission $C K_{\alpha}$, $O K_{\alpha}$ et $N K_{\alpha}$ caractéristiques de la surface d'un substrat de poly(imide) (Kapton[®]). Ces spectres sont obtenus avec un faisceau d'électrons incidents de 3 keV et une densité de courant de 0,1 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, les radiations X étant dispersées à l'aide de cristaux analyseurs d'OHM ($C K_{\alpha}$) et de TIAP ($O K_{\alpha}$), et d'un miroir multicouche ("OV 45", $2d = 4,5 \text{ nm}$) ($N K_{\alpha}$). De façon identique, la figure 10 représente les bandes d'émission $C K_{\alpha}$, $O K_{\alpha}$ et $F K_{\alpha}$ d'un substrat de poly(tétrafluoroéthylène) (Téflon[®]) avant et après son immersion (30 s et 2 min) dans une solution commerciale de naphthalénure de sodium dans le tétrahydrofurane. Soulignons que ce type de traitement est couramment utilisé pour effectuer la défluoruration de la surface de tels substrats afin d'améliorer l'adhésion par exemple à l'aide d'une colle époxy [11]. Les spectres de la figure 10 sont obtenus en dispersant les radiations X à l'aide de cristaux analyseurs d'OHM ($C K_{\alpha}$) et de TIAP ($O K_{\alpha}$ et $F K_{\alpha}$). Ils confirment la décroissance de la fluoruration du substrat et l'augmentation associée de la concentration superficielle en carbone (squelette du matériau) avec le temps de traitement. Notons que l'attaque du substrat est faite à l'abri de l'air et que la présence de l'oxygène (en faible concentration superficielle) est

essentiellement le résultat d'une post-oxygénation à l'air des surfaces activées durant le traitement proprement dit.

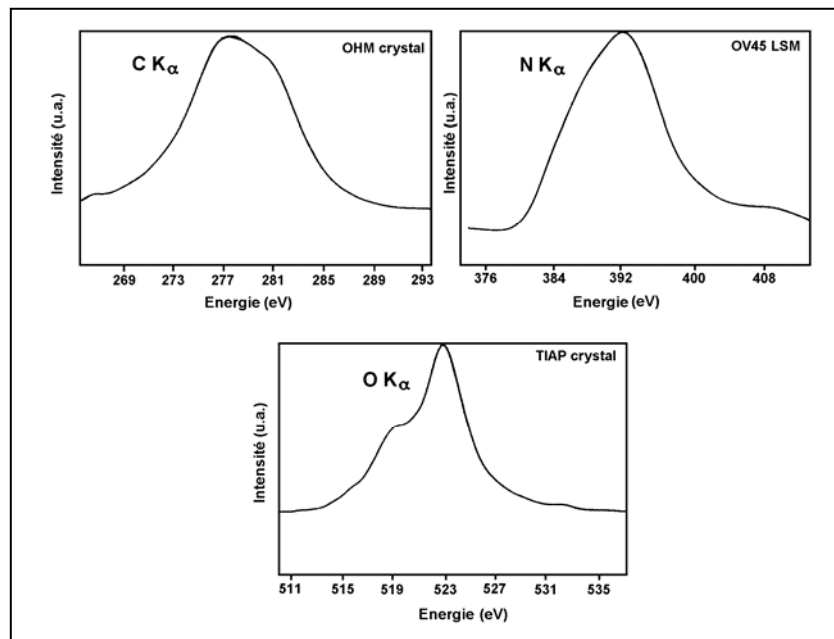


Fig. 9 - Spectres LEEIXS de la surface d'un substrat de polyimide.

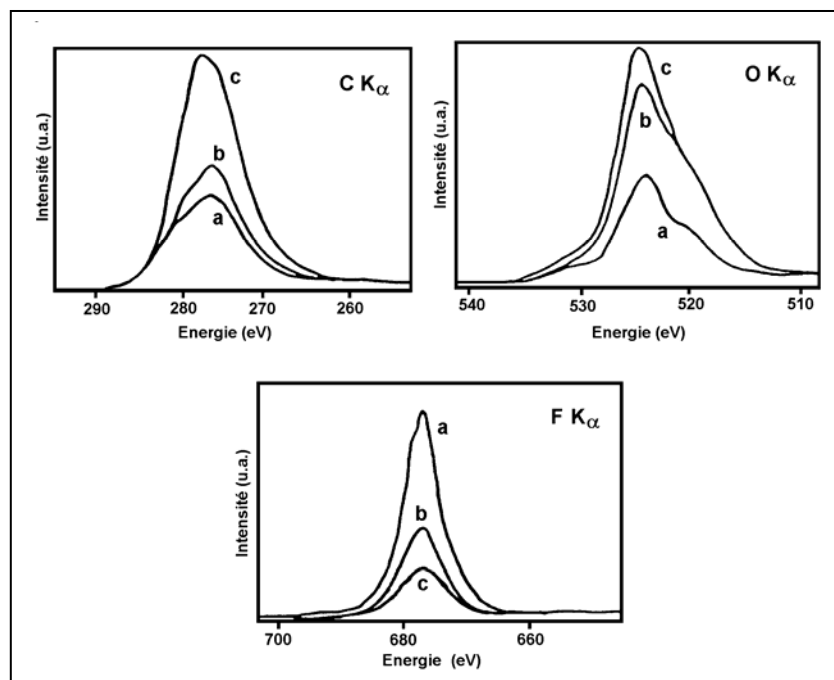


Fig. 10 - Spectres LEEIXS $C K_{\alpha}$, $O K_{\alpha}$ et $F K_{\alpha}$ de la surface d'un substrat de Téflon[®] (a) avant, (b) et (c) après un traitement de surface dans une solution de naphthalénure de sodium respectivement pendant 30 s, et 2 min.

4. Conclusions

Les exemples décrits dans le présent article illustrent un certain nombre de possibilités qu'offre la spectrométrie LEEIXS en tant qu'outil d'analyse des surfaces de matériaux polymères. Plus en détail, ces exemples mettent en exergue l'intérêt de cette technique en vue (i) d'analyser les éléments légers (C, O, N, F, Si ...) via la dispersion en longueur d'onde et la détection de leurs radiations K_{α} caractéristiques et (ii) de contrôler et d'optimiser de nombreux procédés de traitement de surface et de dépôt de films minces. Dans ce contexte, deux volets ont été particulièrement considérés, à savoir l'analyse de substrats polymères ayant ou non subi un traitement de surface, et celle de films polymères minces et ultra-minces déposés sur des substrats généralement métalliques à l'aide de différents procédés (auto-assemblage, électropolymérisation, polymérisation plasma ...). Les possibilités analytiques mises en évidence dans le présent article résultent du fonctionnement sous vide primaire du spectromètre LEEIXS d'une part, de la source d'excitation électronique utilisée d'autre part, source dont le mode d'opération permet de sonder la surface de matériaux isolants sans qu'il soit nécessaire de la revêtir préalablement d'un film conducteur. Un avantage supplémentaire de la spectrométrie LEEIXS dans le domaine considéré est lié à la gamme des épaisseurs fournissant les informations analytiques (gamme généralement comprise entre quelques nm et quelques dizaines de nm). Cette technique est donc capable de fournir des données complémentaires à celles apportées par les méthodes d'analyse d'extrême surface telles que l'ISS, le SIMS statique et en particulier l'XPS. Cependant, l'analyse LEEIXS de la surface des matériaux polymères (et plus généralement des matériaux organiques) reste limitée, malgré la faible densité de courant utilisée ($\sim 0,1 \text{ mA.cm}^{-2}$), à celle de composés doués d'une stabilité chimique et thermique suffisante. Le présent travail a néanmoins le mérite de montrer clairement le potentiel des méthodes d'émission de rayons X dans le domaine des très faibles énergies (rayons X mous et ultra-mous). Indéniablement, la voie du futur concernant l'analyse des éléments légers à la surface des matériaux polymères passera par l'utilisation de sources d'excitation X spécifiques et en particulier de sources synchrotron dédiées. A titre d'exemple, des résultats récents ont été publiés concernant la caractérisation (bande d'émission C K_{α}) de différents polymères [poly(methyl methacrylate), poly(4-vinylpyridine), poly(isoquinoline)] déposés par spin-coating sur un substrat de silicium, la source d'excitation étant un faisceau de rayons X de 300 eV délivré par le Lawrence Berkeley National Laboratory's Advanced Light Source (ALS) [13]. Les spectres C K_{α} de la polyaniline non dopée et dopée (éméraldine protonée) ont également été obtenus. L'étude de la densité d'état au niveau de Fermi a permis de vérifier le caractère métallique de la phase dopée [14, 15]. En France, les lignes "rayons X mous" seront bientôt disponibles sur le Synchrotron Soleil. Elles permettront de mettre en œuvre des expériences de fluorescence X du même type que celles décrites dans cet article.

Références

- [1] R. BADOR, M. ROMAND, M. CHARBONNIER, A. ROCHE, *Adv. X-Ray Anal.*, 24, 351-361, (1981).
- [2] M. ROMAND, R. BADOR, M. CHARBONNIER, F. GAILLARD, *X-Ray Spectrom.*, 16, 7-16, (1987).
- [3] M. CHARBONNIER, M. ROMAND, F. GAILLARD, *Microbeam Analysis* (J.R. MICHAEL, P. INGRAM Eds.), San Francisco Press Inc., San Francisco, pp. 257-259, (1990).
- [4] M. ROMAND, F. GAILLARD, M. CHARBONNIER, D.S. URCH, *Adv. X-Ray Anal.*, 34, 105-121, (1991).
- [5] M. ROMAND, F. GAILLARD, M. CHARBONNIER, *Adv. X-Ray Anal.*, 35 B, 767-781, (1992).
- [6] P.B. LEGRAND, J.P. DAUCHOT, M. HECQ, M. CHARBONNIER, M. ROMAND, *J. Vac. Sci. Technol.*, A 12, 1551-1556, (1994).
- [7] M. ROMAND, M. CHARBONNIER, J. BABOROWSKI, *Adv. X-Ray Anal.*, 40, (1997), CD-ROM Publication, International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA, USA, (1998).
- [8] L. DESHAYES, M. CHARBONNIER, N.S. PRAKASH, M. ROMAND, *J. Adhesion*, 43, 209-221, (1993).
- [9] K.L. MITTAL, *Silanes and Other Coupling Agents*, VSP, Utrecht, (1992).
- [10] N.S. PRAKASH, L. EL AARCH, M. CHARBONNIER, M. ROMAND, L. LIANOS, TRAN MINH DUC, *Le Vide : Science, Technique et Applications*, 277, 26-29, (1995).
- [11] M. ROMAND, M. CHARBONNIER, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 15 (8), 945-965, (2001).
- [12] M. ROMAND, M. CHARBONNIER, J. BABOROWSKI, *J. Physique IV*, 6, C4-467/474, (1996).
- [13] R.P. WINARSKI, D.L. EDERER, J.C. PIVIN, E.Z. KURMAEV, S.N. SHAMIN, A. MOEWES, G.S. CHANG, C.N. WHANG, K. ENDO, T. IDA, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*, 145, 401-408, (1998).
- [14] E.Z. KURMAEV, M.I. KATSNELSON, A. MOEWES, M. MAGNUSON, J.-H. GUO, S.M. BUTORIN, J. NORDGREN, D.L. EDERER, *J. Phys.: Condens. Matter*, 13, 3907, (2001).
- [15] E.Z. KURMAEV, A. MOEWES, D.L. EDERER, *X-Ray Spectrom.*, 31, 219-224, (2002).

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

David Ruch, Julien Bardon, Nathalie Bonnel de Longchamp

CRP Henri Tudor, Laboratoire de Technologies Industrielles, Villa Bleue, 70 Rue de Luxembourg,
BP 144, L-4002 Esch/Alzette, Luxembourg
david.ruch@tudor.lu

Résumé: L'apparition de techniques de caractérisation novatrices associées à une combinaison de leur potentiel a permis le développement de nouveaux traitements spécifiques à certains constituants organiques tels que les fibres capillaires. En effet, les dimensions micrométriques des polymères biologiques imposent l'emploi d'une instrumentation de test adaptée à leur échelle.

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

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

Après une brève présentation des principes et des domaines de validité des techniques de nano-rayure, nano-indentation et d'interférométrie 3D en lumière blanche, nous nous attachons à décrire l'influence de divers traitements cosmétiques sur les caractéristiques intrinsèques du cheveu. Ainsi, nous quantifions parallèlement les modifications intervenant suite à ces traitements au niveau du coefficient de frottement, du module d'Young, de la dureté et de la topographie des fibres.

1. Introduction

1.1. Complémentarité de la méthode combinée

Ces méthodes ont comme principal avantage de permettre une étude des fibres capillaires complémentaire à celle de l'AFM puisqu'elle autorise une diversité des paramètres mesurés plus élargie et ce à une échelle différente. En outre, bien que la résolution de nos méthodes soit moindre que celle de l'AFM, l'acquisition de données est beaucoup plus rapide et sans contrainte notable de préparation ou de vide.

1.2. Présentation des instruments employés

1.2.1. La nano-indentation

Tous les tests de nanoindentation sont effectués par un Nano Indenter[®] XP de MTS. Celui-ci est employé avec une tête Nano DCM (Dynamic Contact Modulus) pour l'analyse des cheveux. Le nombre d'indents par échantillon est fonction de sa géométrie (entre cinq et dix). Les résultats sont analysés par la méthode d'Oliver & Pharr [3].

1.2.2. La nano-rayure

L'ensemble des essais de nano-rayure est réalisé avec le Nano-Scratch Tester[®] de CSM Instruments. La configuration utilisée est une lame haute résolution (HR) montée d'une pointe de rayon de courbure 1 μm . En moyenne, cinq passes sont réalisées pour un mode simple passe et une

cinquantaime pour un mode multipasse sous une charge normale constante et à faible vitesse de glissement ($< 1 \text{ mm/mn}$).

1.2.3. L'interférométrie 3D en lumière blanche

La topographie trois dimension des échantillons de fibres est reconstituée grâce à l'un interféromètre 3D en lumière blanche *Surface Profilers* de la société WYKO. La plupart des mesures sont obtenu à l'objectif _50 qui est un interféromètre de Mirau. Le mode VSI (Vertical Scanning Interferometry) est employé en raison de la forte rugosité des fibres capillaires.

2. Démarche expérimentale

2.1. Thèmes abordés

Notre étude des polymères biologiques s'articule autour de deux thèmes :

- Identification des domaines de pertinence et de validité pour l'utilisation de nos appareils avec application à un cas d'étude concret,
- Mise en évidence de la nécessité de combiner les trois techniques de nano-indentation, de nano-rayure et d'interférométrie. Application au couple { Nano-scratch, Interféromètre},
- Analyse de cheveux provenant de diverses ethnies (africaine, européenne, asiatique),
- Quantification des conséquences de traitements cosmétologiques de décoloration, coloration, shampooinage sur les paramètres mesurées à partir de cheveux d'ethnie européenne.

2.2. Domaine d'utilisation

Nous mettons en évidence les domaines de recouvrement et de complémentarité des couples de techniques {Microscopie à force atomique, Nano-rayure} et {Microscopie à force atomique, Interférométrie en lumière blanche}.

2.3. Combinaison des appareils

Les principaux atouts de notre technique sont principalement sa complémentarité vis-à-vis de la microscopie à force atomique et la « supplémentation » de chacune d'entre elles. Ainsi, nous illustrons cela par un exemple d'analyse post-expérimentale d'une rayure par interférométrie qui permet de caractériser rapidement et précisément l'état de surface de la fibre après rayure. Il pourrait en être de même après une nano-indentation.

2.4. Influence de la zone de test et de l'origine des cheveux

L'origine ethnique et la zone de sélection sur le cuir chevelu fournissent des cheveux d'aspect et de géométrie variables. Par ailleurs, ceci est confirmé au travers d'une étude antérieure ([4]).

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

Une étude couplée de nos appareils met en évidence des différences notables au niveau des propriétés mesurées. Une discrimination nette est établie au niveau des coefficients de frottement entre un cheveu asiatique, un cheveu européen et un cheveu africain qui présentent respectivement un frottement minimal, intermédiaire et maximal. De la même manière, il est constaté de fortes disparités à la fois sur la dureté et sur le module d'Young puisque le cheveu d'origine asiatique possède des valeurs assez inférieures à celles du couple {Européen, Africain}

A ce stade de l'étude, seule l'influence ethnique est abordée. Les hétérogénéités de propriétés le long de la fibre capillaire ne feront pas l'objet de commentaires.

2.5. Etude de l'influence des traitements cosmétologiques

L'analyse par nano-rayure montre d'ores et déjà une altération quantifiable des propriétés de frottement du cheveu consécutivement à un traitement de décoloration ou de coloration. Deux

phases d'évolution sont identifiées pour ces deux types de traitements. À savoir une première phase durant laquelle le coefficient de frottement apparent augmente (jusqu'à 25 minutes) puis une seconde phase durant laquelle il suit une décroissance (entre 25 minutes et 60 minutes).

Parallèlement, l'analyse des duretés n'a pas mis en évidence d'écart notable par rapport à une fibre non-traitées

Par ailleurs, l'application d'une solution shampooineuse et d'un après-shampooing montre leur influence sur les propriétés de surface du cheveu. Le dépôt polymérique d'un après-shampooing se formant sur la cuticule de la fibre adhère plus ou moins aisément selon le pré-traitement que celui-ci subit (application d'un shampooing ou non). Ces constatations faites sur le coefficient de frottement ont pu être reliées par interférométrie à l'aspect de surface du cheveu.

Enfin, des hétérogénéités de résistance à l'usure par analyse combinée de nano-rayure et d'interférométrie sont observées entre des cheveux de personnes distinctes. Elles ne sont pas présentées ici.

3. Conclusion

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

Nous avons montré que la complémentarité de nos méthodes vis-à-vis de celles préexistantes offre une nouvelle voie pour la caractérisation des fibres capillaires et de leurs traitements. En outre, leur fort potentiel combinatoire permet d'accéder à une plus grande richesse d'analyse. Des illustrations probantes quant aux discriminations possibles entre cheveux d'ethnies différentes ou ayant subi un traitement cosmétologiques appuient fortement le potentiel de nos tests.

Par la suite, notre étude se poursuivra au travers de tests sur d'autres parties du cheveu (variabilité des propriétés le long de la tige) et du cuir chevelu dans son ensemble (vertex, régions pariétale, frontale, occipitale) ainsi que par des tests de résistance à l'usure après traitements.

Références

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

Utilisation de la microscopie électronique à balayage en Biologie Marine

G. SINQUIN

Groupe de Microscopie Electronique – UFR Sciences – CS 93837 – 29238 Brest Cedex3
gerard.sinquin@univ-brest.fr

Résumé: L'étude de micro-organismes dans le tractus digestif de Bivalves marins a nécessité la mise au point d'une technique combinant l'histologie classique et la microscopie électronique à balayage. Elle a permis l'examen in situ de la microflore intestinale et du bol alimentaire. Lors de la découverte de Bivalves de sites profonds hydrothermaux, cette même technique, associée à des examens en microscopie à transmission, a été adaptée pour comprendre leurs stratégies nutritionnelles dans des zones pauvres en ressources trophiques. Ultérieurement, l'observation à fort grossissement de coupes histologiques a été particulièrement utile dans le cadre de l'étude de l'ovogenèse chez la coquille St Jacques et la spermatogenèse chez des requins de grands fonds.

1. Etude de micro-organismes dans le tractus digestif de Mollusques Bivalves marins

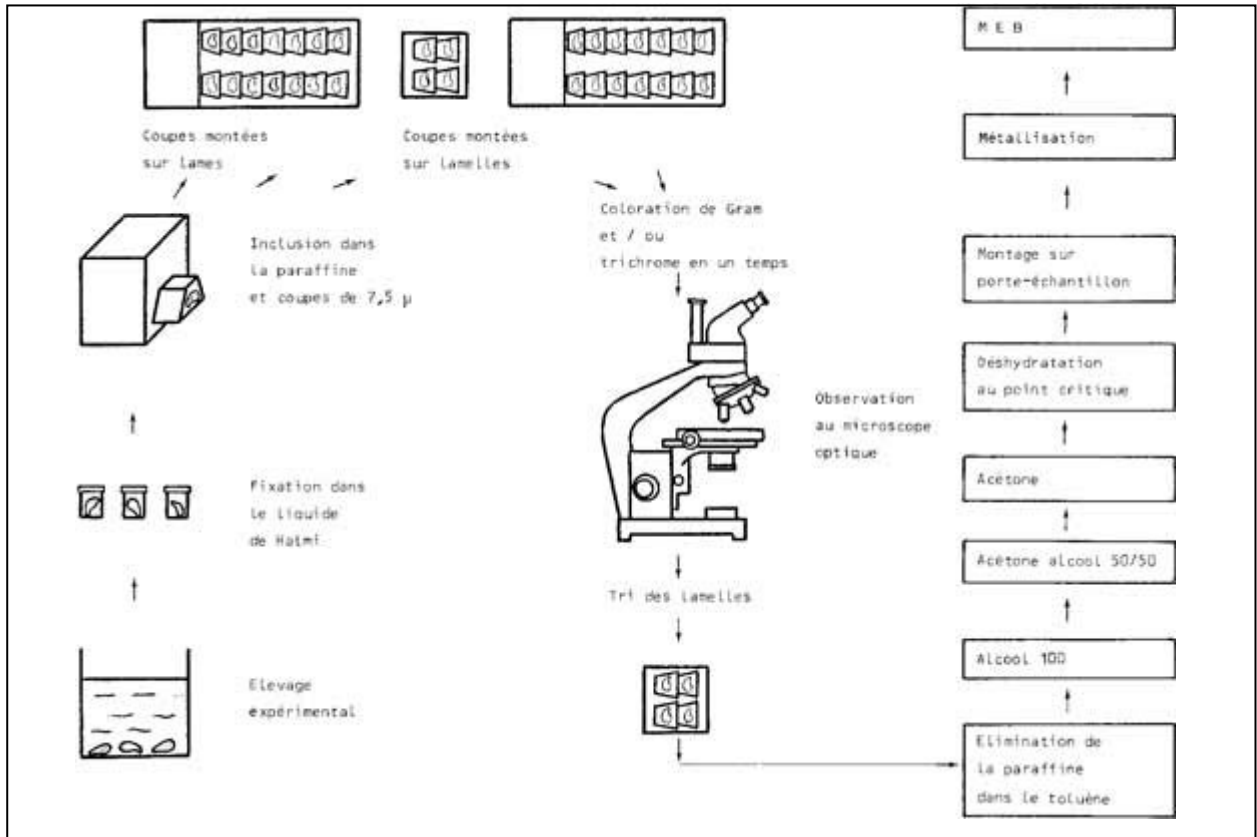
Dans les eaux et sédiments du littoral, les bactéries sont présentes en concentration importantes. Pour les bivalves marins, suspensivores ou déposivores, ces micro-organismes constituent donc une source de nourriture potentielle. Aussi, des travaux ont été consacrés à l'étude des relations entre les bivalves marins et les bactéries hétérotrophes en milieu marin.

Afin de mieux connaître le mécanisme d'ingestion des bactéries, une attention particulière a été portée à la microflore du tractus digestif des Bivalves marins. Préalablement, cette microflore a été étudiée selon des techniques bactériologiques (culture, isolement de souches, détermination). Cependant, il est paru utile de disposer d'une technique permettant d'observer et de localiser ces microflores dans le tractus digestif. Dans un premier temps, en raison de la difficulté à disséquer cet organe du fait de la fragilité des tissus, un examen de coupes histologiques a été effectué. Toutefois, l'observation de ces coupes en microscopie optique ne permet pas d'affirmer dans tous les cas la présence de bactéries même après une coloration de Gram associée à une coloration topographique.

Afin d'améliorer la qualité des observations, certaines coupes, préparée pour l'histologie, ont alors été traitées spécifiquement pour la microscopie à balayage [1].

1.1. Méthode

Après repérage des zones intéressantes en microscopie optique, les lamelles portant les coupes sériées proches des coupes observées sont traitées pour la microscopie à balayage. Elles sont déparaffinées dans le toluène puis déshydratées dans de l'alcool 100 suivi d'un mélange alcool/acétone (50:50) et terminé par un bain d'acétone pur. La déshydratation s'achève par un passage dans un appareil à point critique. Les lamelles sont ensuite métallisées à l'or et observées au microscope électronique à balayage.



1.2 Résultats

Chez des moules juvéniles *Mytilus edulis* fixées immédiatement après la récolte dans le milieu naturel, l'examen en microscopie électronique à balayage a permis de vérifier la présence de bactéries enrobées de mucus dans le bol alimentaire présent dans l'estomac (photo 1 & 2). Des fragments de diatomées (figure3) et de spicules d'éponges (photo 4) sont aussi identifiés.

Observations en microscopie à balayage du tractus digestif de moules juvéniles Mytilus edulis récoltées dans le milieu naturel

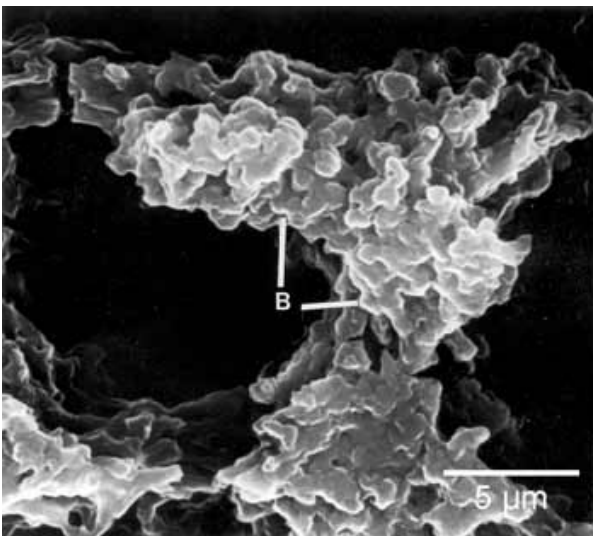


Photo 1: Amas de bactéries (B) dans l'estomac

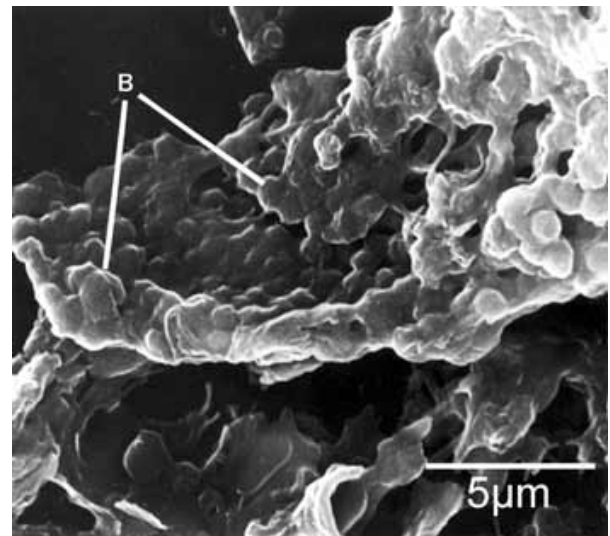


Photo 2 : Amas de bactéries (B) dans l'estomac

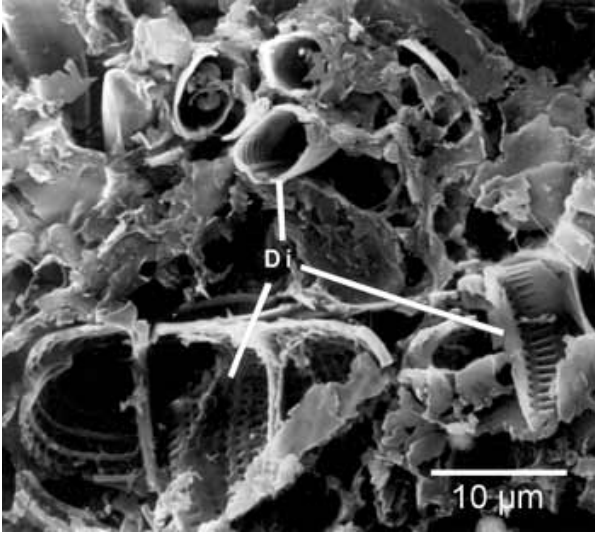


Photo 3 : fragments de diatomées (Di) dans l'estomac

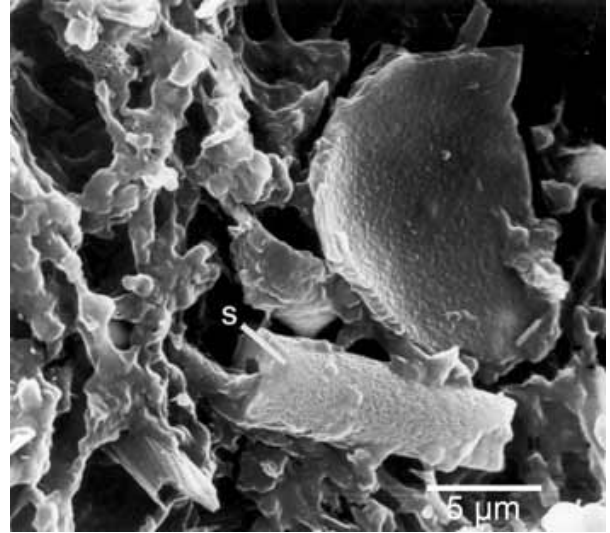


Photo 4 : fragment de spicule d'éponge (S) dans l'estomac

A la suite de ces premiers résultats, une étude expérimentale sur l'ingestion de souches bactériennes sélectionnées est menée chez des moules juvéniles *Mytilus edulis* maintenues à jeun pendant une semaine. Toutes les souches sont indifféremment ingérées et, quinze minutes après la distribution de la suspension bactérienne, les bactéries sont observées dans tous les compartiments du tractus digestif (œsophage, estomac, glande digestive, intestin postérieur). Six heures après le début de l'ingestion, des bactéries lysées sont observées dans l'estomac (photo 5). Par contre, des bactéries intactes sont observées dans l'intestin où certaines, avec des résultats marquants pour les souches de *Vibrio*, peuvent demeurer jusqu'à vingt heures après l'ingestion (photo 6).

*Observation en microscopie à balayage de l'ingestion de différentes souches bactériennes par des moules juvéniles *Mytilus edulis**

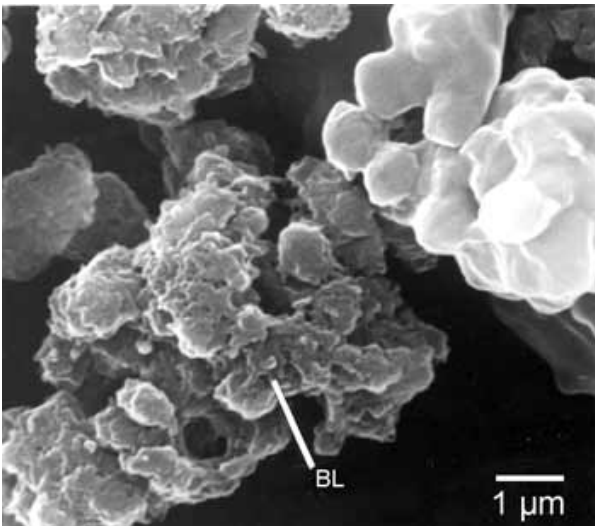


Photo 5 : bactéries lysées (BL) et intactes, six heures après le début de l'ingestion, au niveau de l'estomac

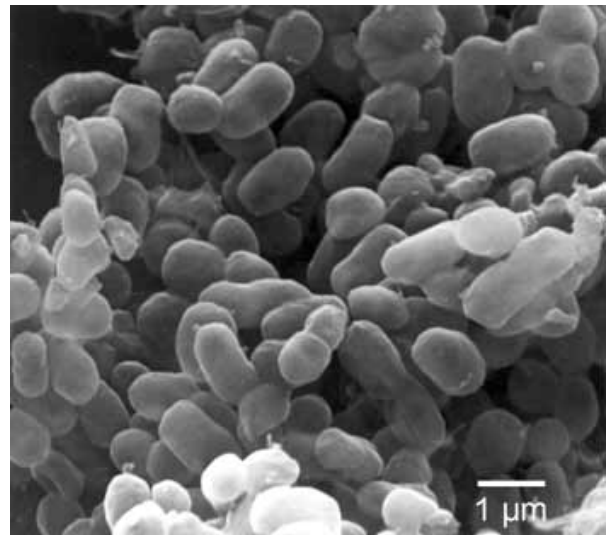


Photo 6: bactéries intactes, vingt heures après l'ingestion, dans l'intestin postérieur

1.3 Conclusion

Les résultats présentés montrent qu'il est possible d'effectuer des observations à fort grossissement en microscopie à balayage sur des échantillons préparés au départ pour de l'histologie classique. La réalisation en alternance de coupes sériées pour la microscopie optique et la microscopie à balayage permet d'examiner la totalité du tractus digestif d'un animal de petite taille et d'y identifier *in situ* les micro-organismes présents dans les différents compartiments.

Associée à des techniques d'analyses bactériologiques et à des observations en microscopie à transmission (stade larvaire), cette méthode montre l'installation chez les moules *Mytilus edulis* d'une microflore intestinale plus riche en bactéries Gram négatif à métabolisme fermentatif que le milieu ambiant avec une représentation plus importante du genre *Vibrio*. Ce mécanisme, lié à la lenteur du transit intestinal, expliquerait la concentration par les Bivalves de micro-organismes toxiques ou de bactéries fécales dans les zones polluées [2].

Toutefois, il existe aussi des relations trophiques entre les bivalves et les bactéries puisque certaines d'entre elles sont lysées au niveau de l'estomac. Elles auraient donc une double fonction dans l'alimentation des bivalves, d'une part un rôle nutritif et d'autre part une participation à la digestion. Il faut cependant noter que, dans le milieu naturel, le bol alimentaire est plus diversifié et les bactéries ne semblent pas dominantes. Des résultats comparables ont été observés chez la coquille St Jacques *Crassostrea gigas* et la palourde *Ruditapes philippinarum* [2].

Autres exemples d'utilisation de la technique d'observation de coupes histologiques en microscopie électronique à balayage

2. Nutrition d'un mytilidae *Bathymodiolus thermophilus* d'un site hydrothermal profond de la dorsale du Pacifique oriental

Lors de la découverte de mollusques bivalves sur les sites profonds hydrothermaux s'est posée la question de leur alimentation à des profondeurs généralement pauvres en ressources trophiques. La présence à des concentrations élevées de bactéries chémoautotrophes dans les fluides hydrothermaux laisse supposer qu'elles sont à la base de la chaîne alimentaire [3]. Afin d'apporter une réponse à cette hypothèse, des études anatomiques du tractus digestif ont été effectuées.

L'observation au microscope à balayage de coupes histologiques s'est portée plus particulièrement sur l'estomac et a permis d'identifier des cellules bactériennes (photo 7), des tests de foraminifères et des débris de frustules de diatomées (photo 8).

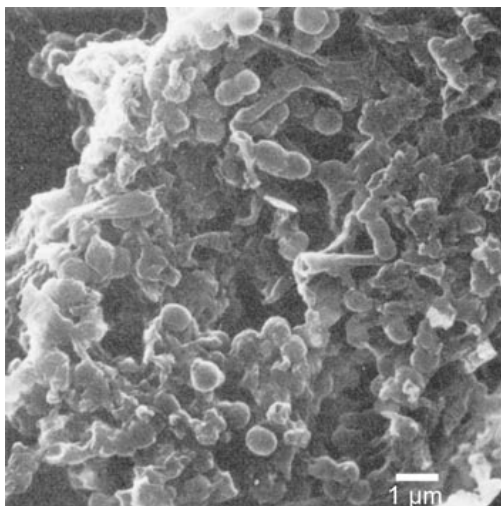


Photo 7 : cellules bactériennes dans l'estomac

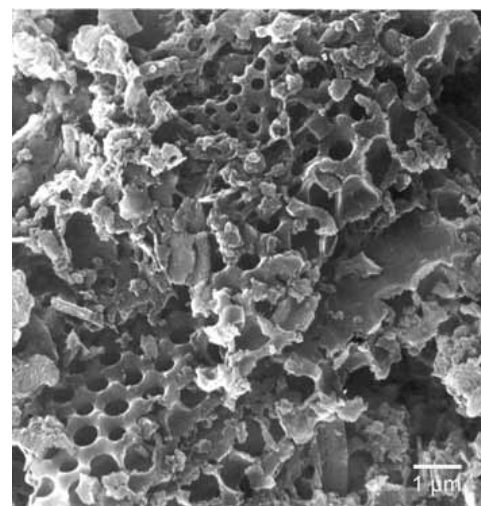


Photo 8 : débris de frustules de diatomées dans l'estomac

L'examen du contenu du tractus digestif montre que ce bivalve ingère les bactéries hydrothermales mais aussi d'autres micro-organismes provenant de la couche profonde et de la zone photique de l'océan. Ces derniers seraient apportés par des courants de fond créés par les fluides chauds sortant des cheminées [3].

Parallèlement, des observations sur les branchies, de très grande taille chez cette espèce, en microscopie électronique à balayage et à transmission ont montré la présence de bactéries dégradées dans l'épithélium branchial. L'ensemble de ces informations permet de démontrer l'existence chez ces bivalves d'un régime alimentaire à la fois hétérotrophique et autotrophique par l'intermédiaire de bactéries symbiotiques [4].

Ces techniques d'études ont aussi été appliquées pour comprendre les stratégies nutritionnelles d'autres familles de bivalves hydrothermaux. Ainsi, l'analyse structurale et ultrastructurale du tractus digestif du pectinidé *Bathypecten vulcani* montre la prédominance de la voie hétérotrophique chez cette espèce. Par contre, chez le bivalve vesicomidae *Calyplogena phaseoliformis* la taille réduite du tractus digestif et la présence de bactéries au niveau des branchies suggèrent un rôle plus important à la voie autotrophique [5].

3. Ovogenèse chez la coquille St Jacques *Pecten maximus* de la baie de St Brieuc

Dans le cadre de travaux sur la reproduction chez les bivalves marins et plus particulièrement chez la coquille St Jacques *Pecten maximus*, cette technique d'observation des coupes histologiques a aussi été mise à contribution.

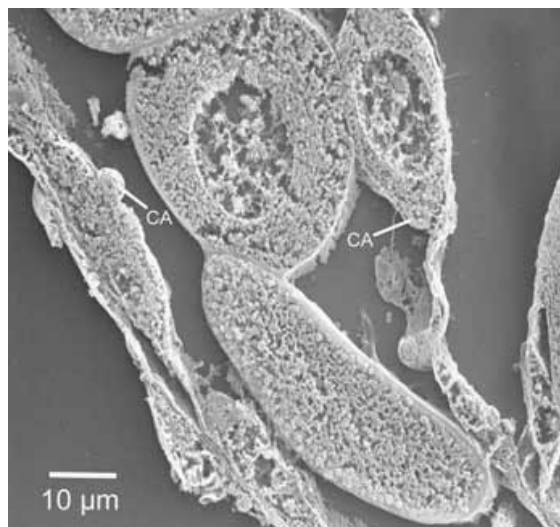


Photo9 : Cellules auxiliaires (CA) accolées à de jeunes ovocytes

L'analyse au microscope à balayage a révélé la présence de "cellules auxiliaires" accolées aux ovocytes en cours de maturation. Des études complémentaires en microscopie à transmission ont montré que ces cellules ont un rôle dans la vitellogenèse et plus particulièrement dans la mise en place du manteau vitellin entourant l'ovocyte [6].

4. Système reproducteur de deux espèces de requins de grands fonds *Centrophorus squamosus* et *Centroscymnus coelopsis*

La raréfaction des ressources traditionnelles sur le plateau continental au large des côtes françaises a orienté l'effort de pêche vers des ressources halieutiques à de plus grandes profondeurs entraînant l'exploitation de nouvelles espèces. Afin d'estimer et de mieux gérer ces ressources, des études ont été effectuées sur la détermination de l'âge et la reproduction chez deux espèces de requins exploités sous le nom commun de "sikis".

Concernant la reproduction, des coupes histologiques de testicules ont ainsi été observées en microscopie à balayage facilitant l'identification du stade de maturation des spermatozoïdes dans les spermatocystes.

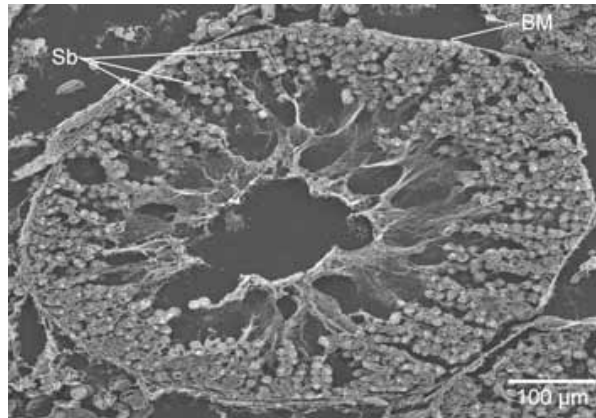


Photo 10 : Spermatoblastes (Sb) dans un spermatocyste entouré d'une membrane basale (BM) à un stade précoce de la spermatogénèse (*Centrophorus squasomus*)

Ainsi, l'observation de coupes transversales de testicules a montré une succession de zones arrangées diamétralement correspondant chacune à un stade spermatogénique bien défini; le développement des spermatocystes se faisant depuis une zone germinale jusqu'au canaux efférents. Ces investigations ont ainsi participé à la détermination du mode de reproduction de ces poissons et ont permis la validation d'échelles de maturité en rapprochant, particulièrement chez les mâles, les examens microscopiques des observations macroscopiques [7].

5. Conclusions

A l'origine, la mise au point de la technique d'observation de coupes histologiques en microscopie électronique à balayage est liée à la nécessité d'identifier des microparticules au sein de structures plus importantes difficiles à disséquer. Elle a utilisé les possibilités du microscope à balayage de travailler alternativement à faible grossissement pour identifier les organes présentant un intérêt (estomac, intestin) et à fort grossissement pour reconnaître les micro-organismes s'y trouvant. Depuis, ce protocole a été fréquemment utilisé en Biologie marine pour répondre à cette même problématique lors d'études dont quelques exemples ont été décrits ci-dessus. Cependant, dans la plupart des cas, ce procédé a été employé comme méthode d'investigation complémentaire s'ajoutant à des observations préalables en microscopie optique et, très souvent, complétée par des examens en microscopie électronique à transmission. Bien que déjà ancienne, cette technique reste cependant un outil efficace comme le prouve les observations récentes effectuées sur le tractus digestif de la crépidule *Crepidula fornicata* afin de comprendre le rôle de ce mollusque dans la dissolution de la silice biogénique (diatomées).

Bibliographie

- [1] D. PRIEUR, C.R. Acad. Sc. Paris, t. 290, sér. D, 1087-1089, (1980)
- [2] D. PRIEUR, Haliotis, 11, 251-260, (1981)
- [3] M. LE PENNEC & D. PRIEUR, C. R. Acad. Sc. Paris, t. 298, sér. III (17), 493-498, (1984)
- [4] M. LE PENNEC, Oceanologica Acta, N°SP. 8, 181-190, (1988)
- [5] M. LE PENNEC, A. DONVAL & A. HERRY, Prog. Oceanog, 24, 71-80, (1990)
- [6] G. DORANGE & M. LE PENNEC, Marine Biol., 103, 339-348, (1989)
- [7] M. GIRARD, P. RIVALAN & G. SINQUIN, J. Fish Biol., 57, 1575-1589, (2000)