



# 4ÈMES JOURNÉES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES DU R $\mu$ I

**La microscopie électronique à balayage (MEB)**  
**Des images en réponse à différents domaines d'application**

Isabelle Anselme-Bertrand *CMES, Université Jean Monnet St Etienne*  
Brigitte Martinie *INRA Theix*

**□MEB à pression contrôlée**

**□MEB en mode haut vide**

**□MEB et cryométhodes**

# MEB à pression contrôlée

## *Echantillons observés:*

- ❖ Epiderme de fleur
- ❖ Epiderme de feuilles
- ❖ Spermatozoïdes
- ❖ Cellules en culture (Cellules osseuses, neurones)
- ❖ Fibres musculaires + bactéries
- ❖ Insectes
- ❖ Tissus médicaux
- ❖ Biomatériaux

# Protocole utilisé

## 1 Préparation de l'échantillon avec ou sans fixation préalable et installation sur la platine porte-objet du MEB

- *Pour les échantillons solides*: Collage minutieux de l'échantillon sur le porte-objet du MEB en utilisant une pastille carbone auto collante (ou scotch carbone) comme interface afin d'assurer une bonne conduction des électrons.
- *Pour les échantillons en suspension*: dépôt d'une goutte sur un filtre ou tamis (obtention d'un film humide)

## 2 Réglages du MEB

- Choix du détecteur (ESED ou BSE)
- Choix de la tension d'accélération
- Choix de la pression dans la chambre
- Utilisation d'une la platine refroidie

# MICROSCOPE ELECTRONIQUE à BALAYAGE et à PRESSION CONTROLÉE

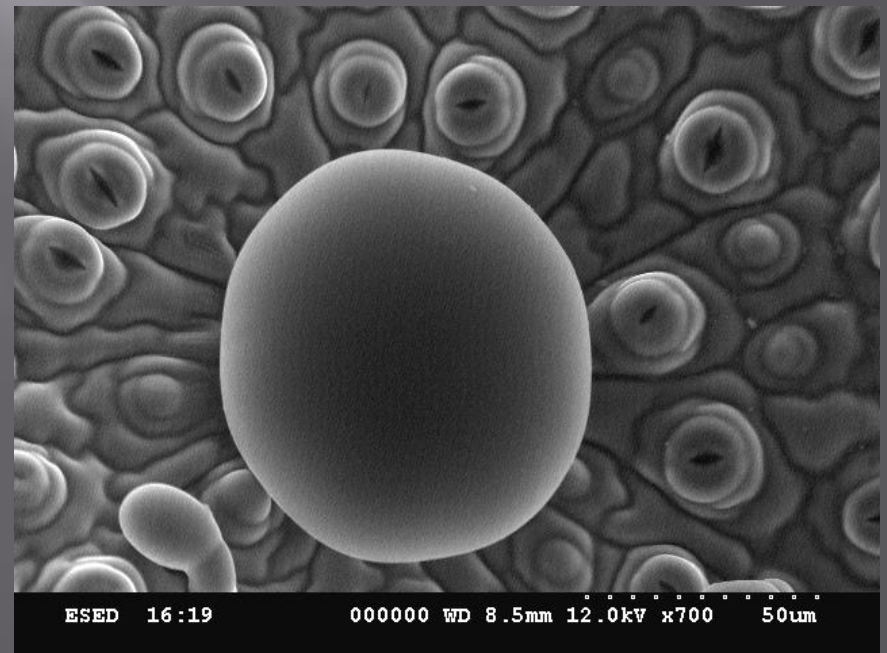
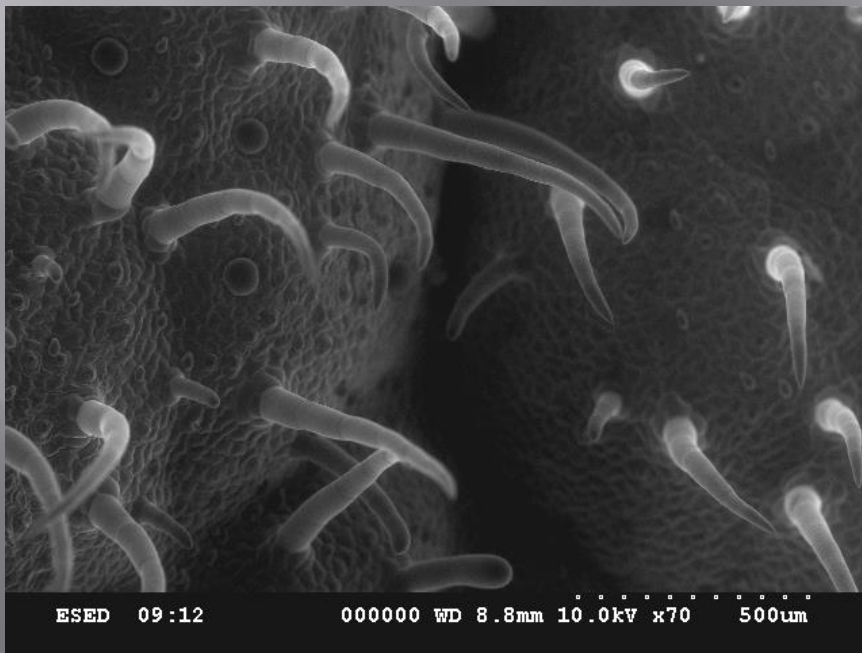
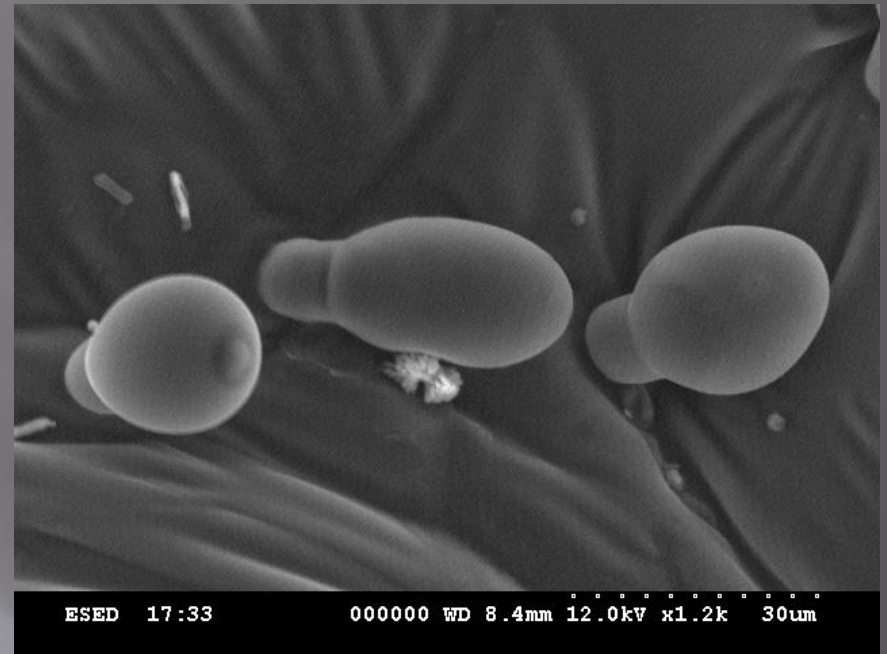
**HITACHI S3000N** équipé des détecteurs SE, BSE, ESED, EDS pour la microanalyse X et d'une platine refroidie par effet Peltier. Résolution entre 3 et 5nm



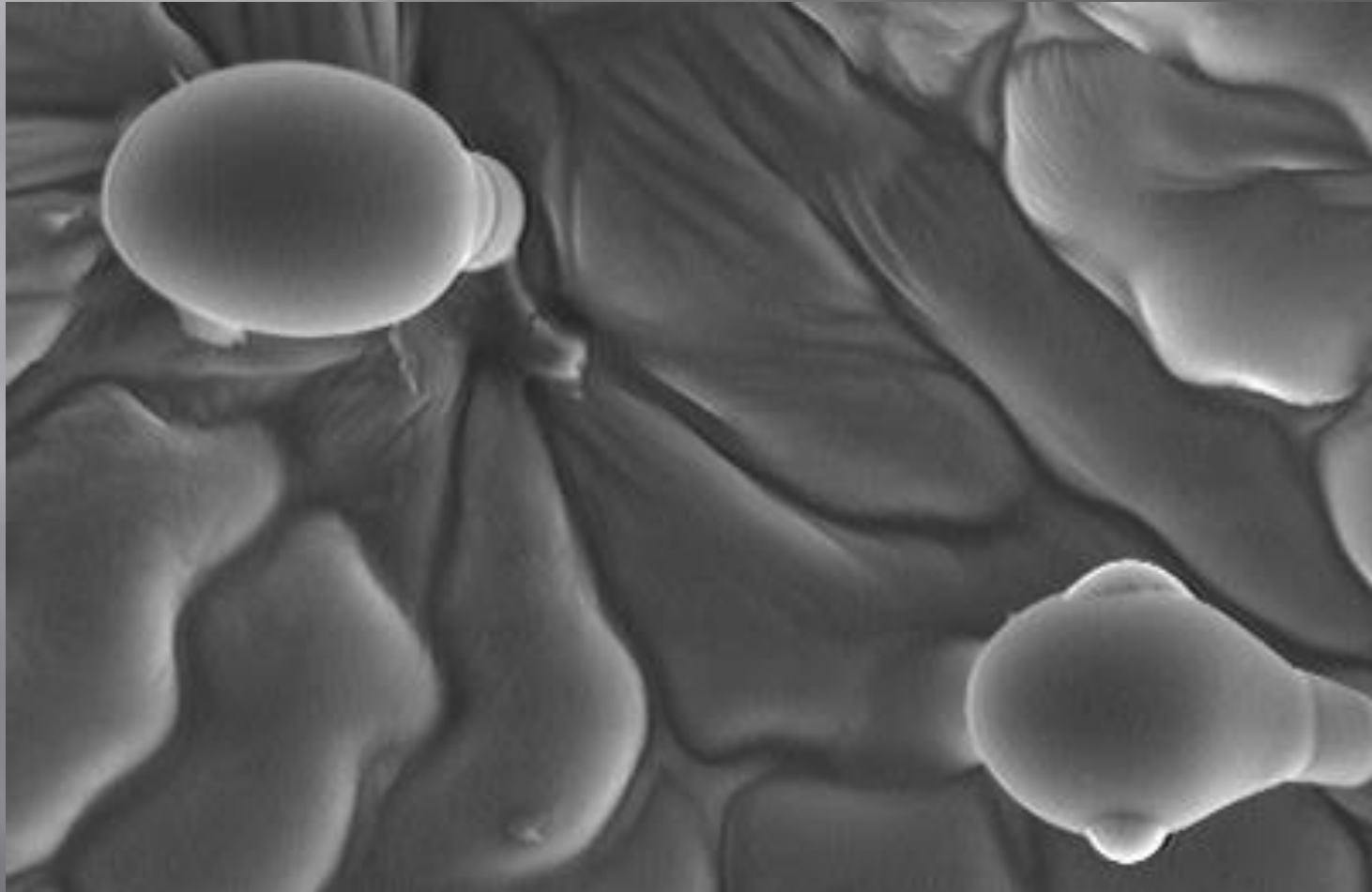
# Epiderme supérieur de feuille de menthe

Etude des structures sécrétrices  
chez les plantes aromatiques

Mode: ESED, 90Pa  
non fixé, non métallisé



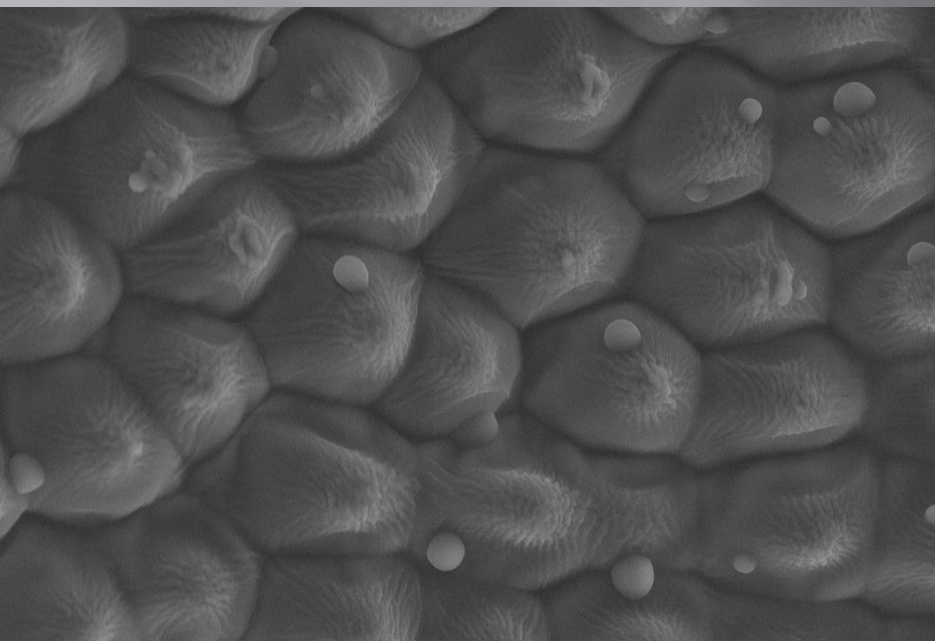
# Gouttelettes d'huiles essentielles à la surface des glandes sécrétrices d'une feuille de menthe



Mode: ESED, 90 Pa, 12kV, 1.2K; non fixé, non métallisé 7

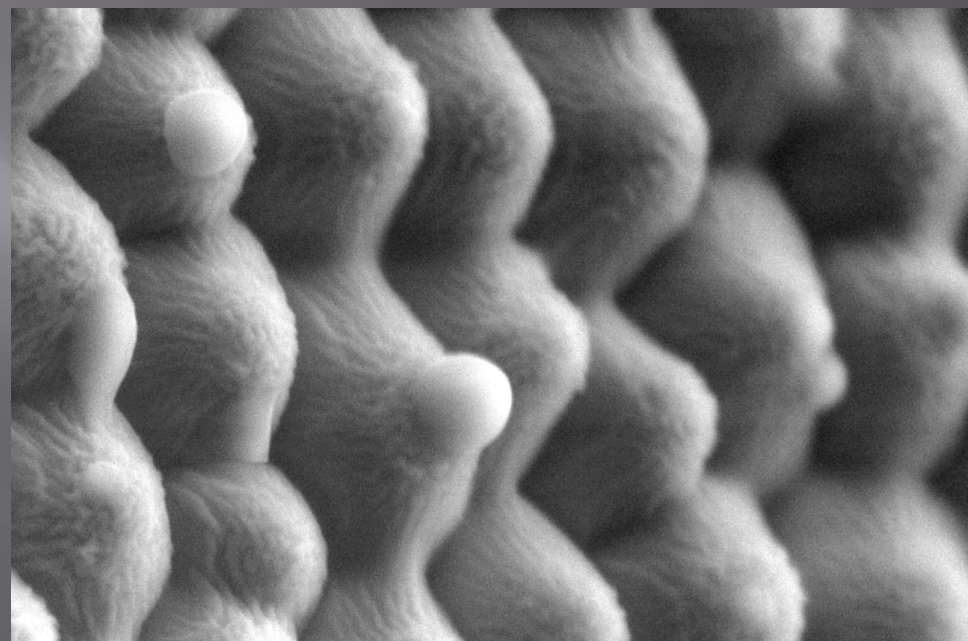
# Gouttelettes d'huiles essentielles à la surface des cellules épidermiques d'un pétale de rose

« parfum de la rose »



110Pa 04-Oct-02

WD 8.8mm 15.0kV x800 50um



200 Pa

WD10.0mm 15.0kV x1.8k 20um

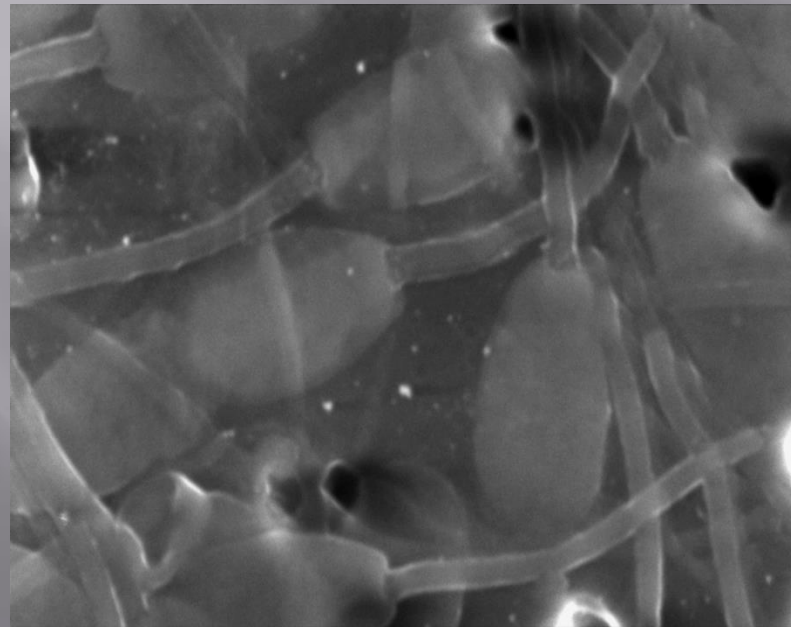
**Mode: ESED, non fixé, non métallisé**



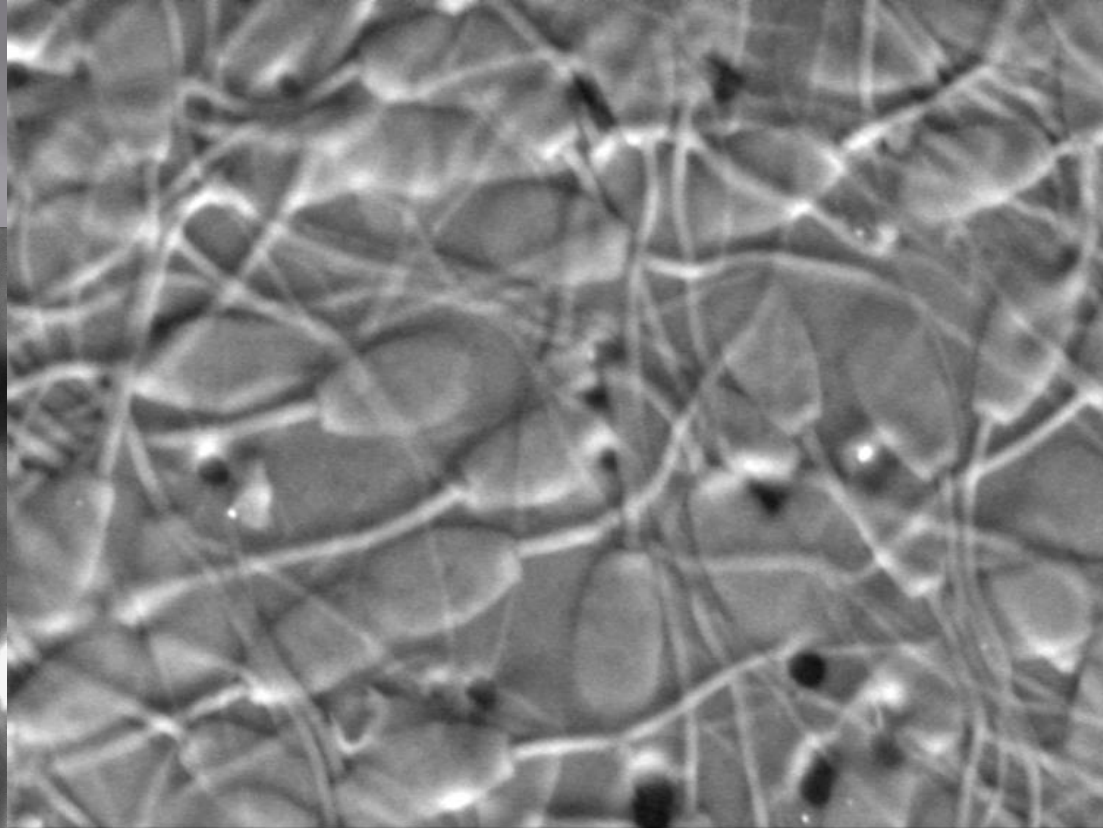
# Spermatozoïdes de Taureau

Détermination des anomalies des SPZ

Mode: ESED 110Pa,  
non fixés, non métallisés



110Pa 12:29 000000 WD 8.6mm 10.0kV x4.0k 10um

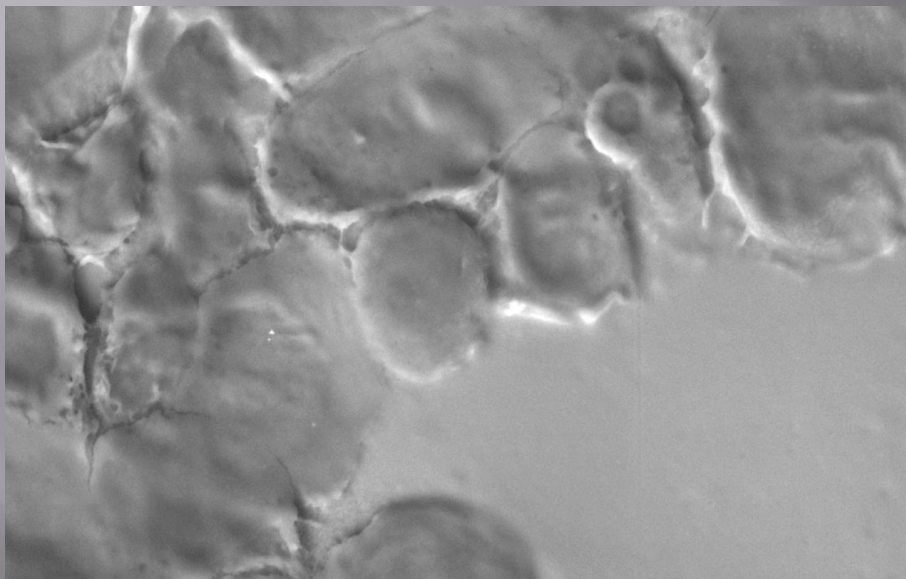


110Pa 12:24

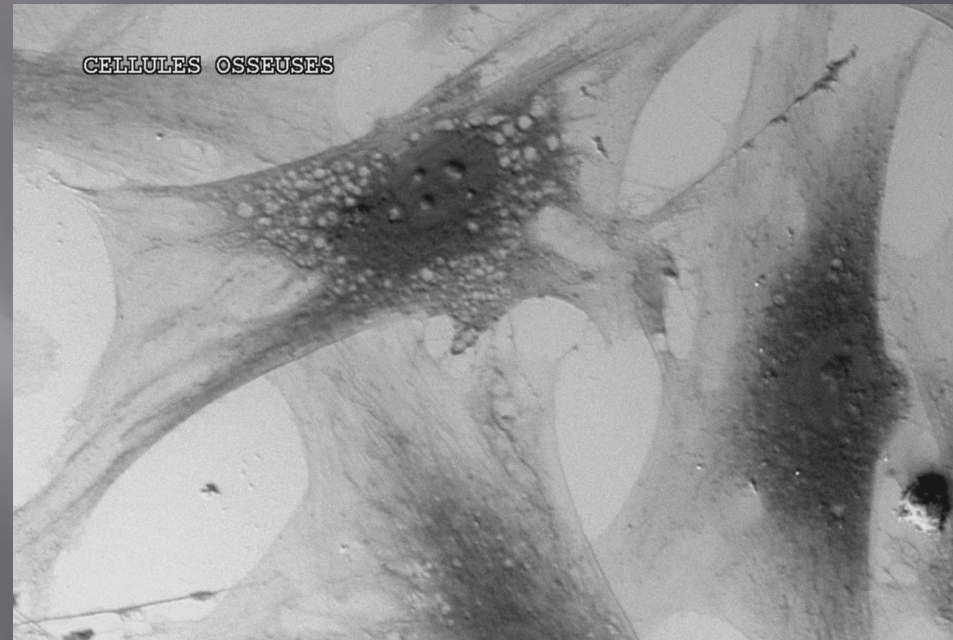
000000 WD 8.6mm 10.0kV x2.0k 20um

# Cellules osseuses en culture

Mode: BSE



150Pa 25-Nov-99 000000 WD 9.4mm 15.0kV x1.0k 50um

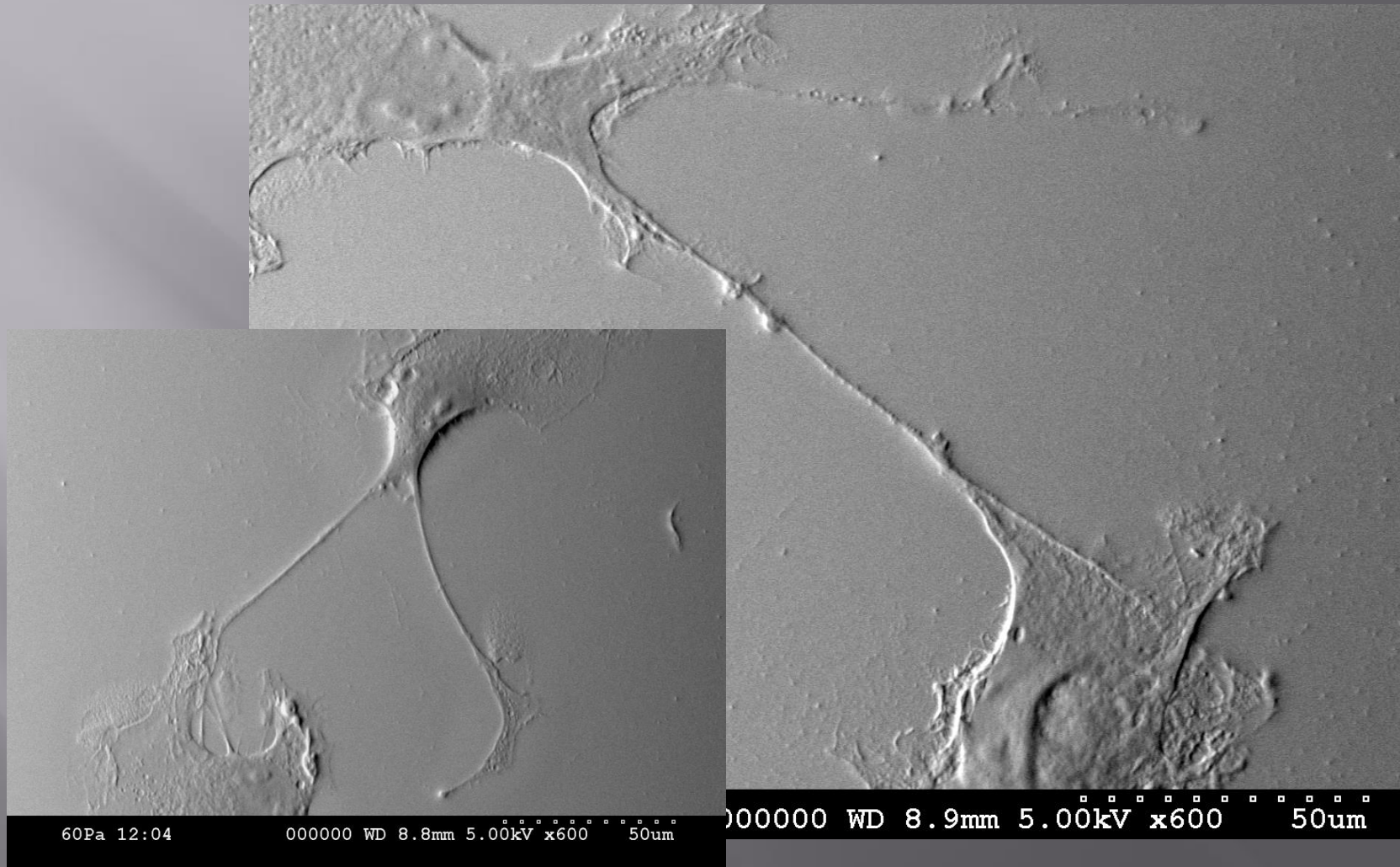


120Pa 16:02 UER WD 9.5mm 8.50kV x700 50um

**Fixées, non métallisées**

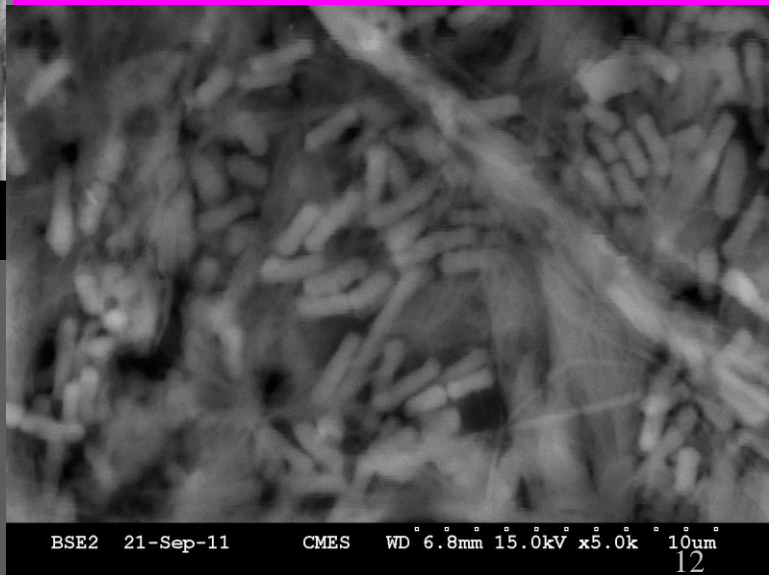
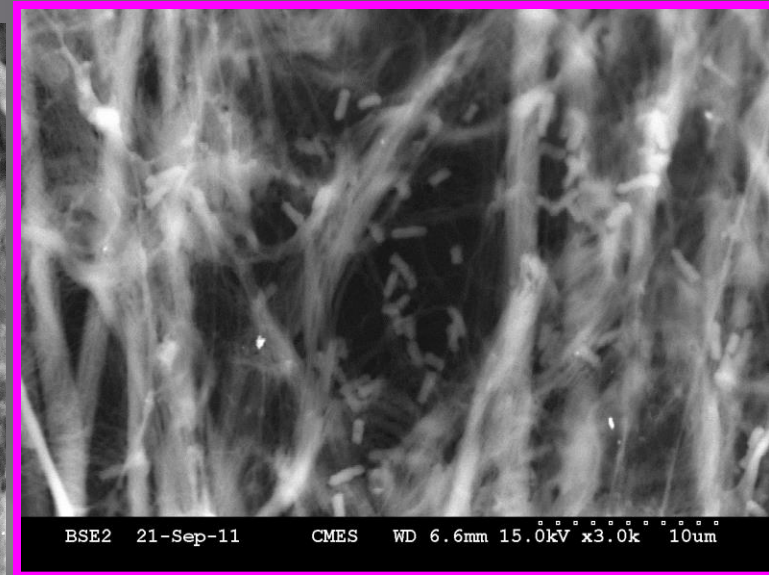
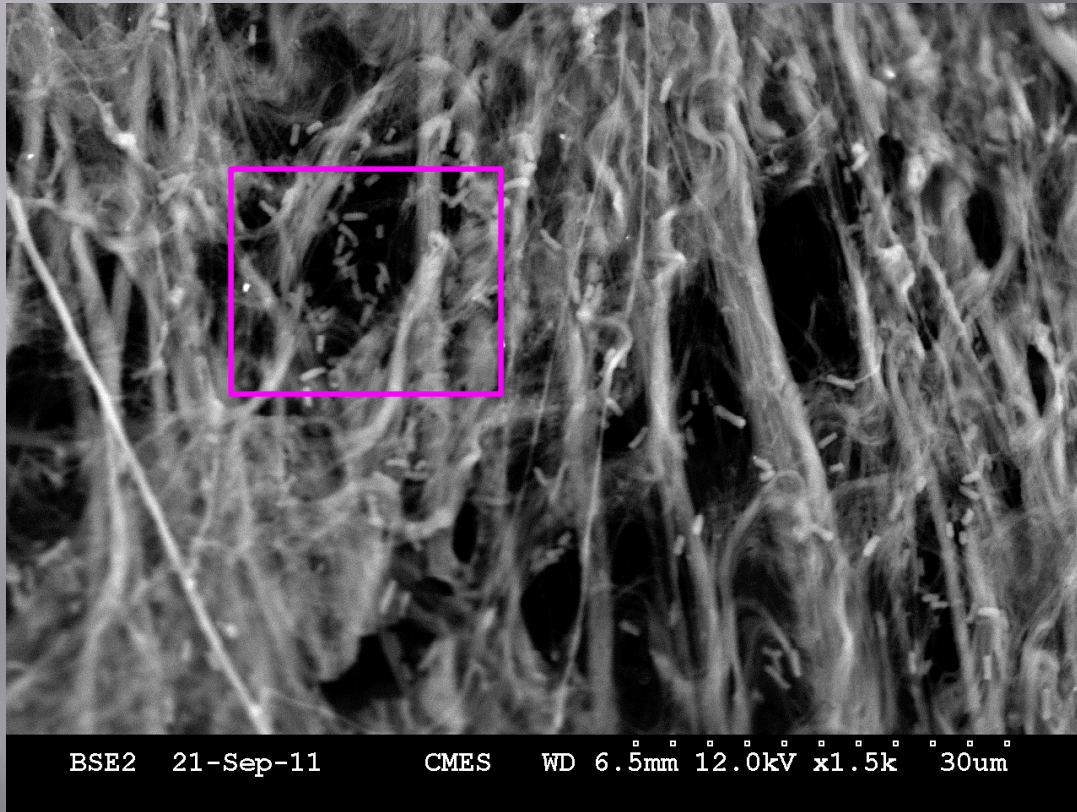
**Non fixées, non métallisées  
réalisation d'un film humide**

# Synapses entre deux neurones de Rat



**Mode: BSE 60 Pa, cultures fixées, non métallisées**

# Fibres musculaires + bactéries



**Mode BSE fixées, non métallisées**

# Capsules QUANTOMIX



Ce concept permet l'observation et l'analyse d'échantillons hydratés, humides dans un **MEB en mode haut vide avec le détecteur BSE**

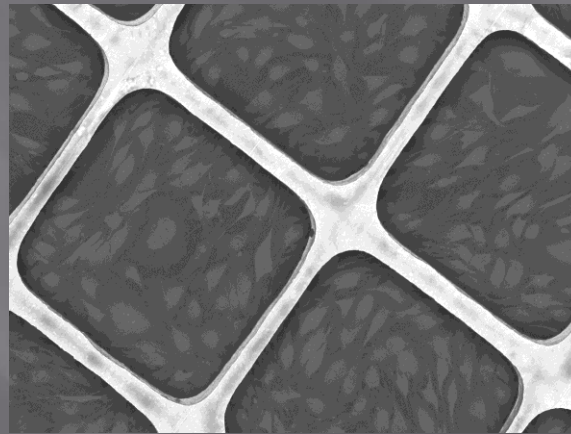
L'échantillon est introduit dans une capsule. Le spécimen est protégé par une membrane ultra-fine, résistante au vide.

Les applications sont multiples: Science de la vie (Cellules, tissus biologiques, virus, végétaux...)

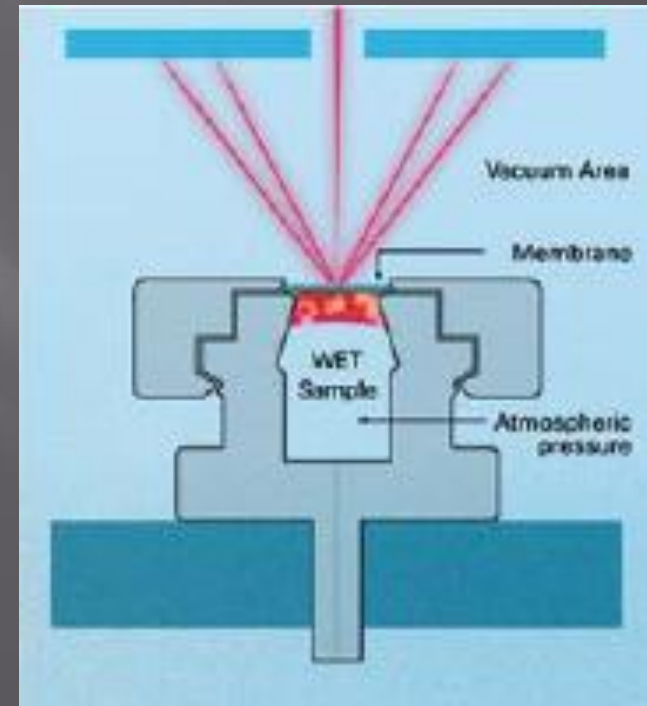
Agrolimentaire, cosmétiques, poudres, encres



Capsule vue de dessus

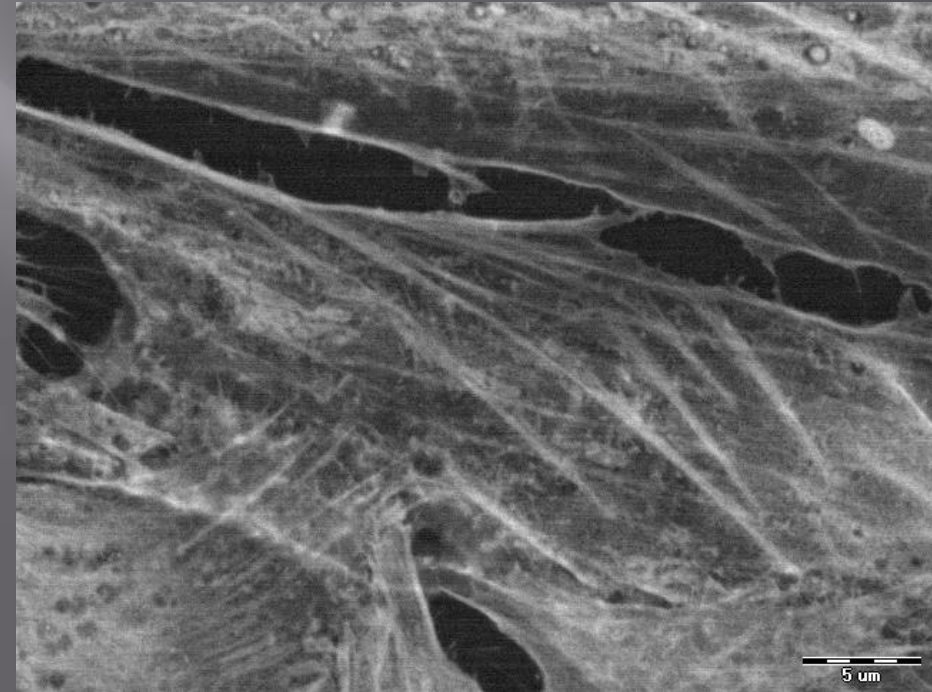
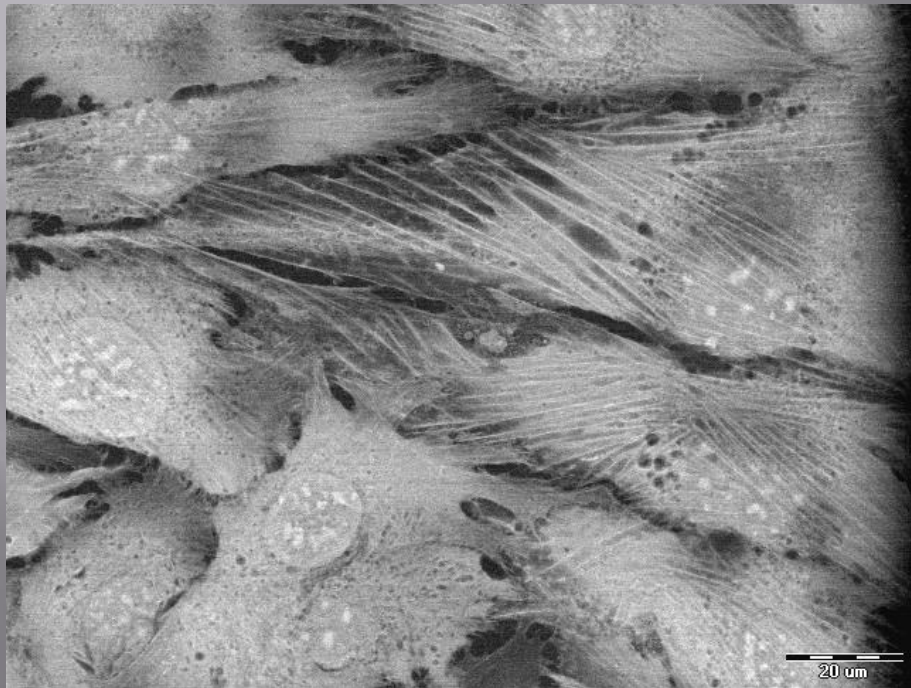


Cellules observées à travers la membrane



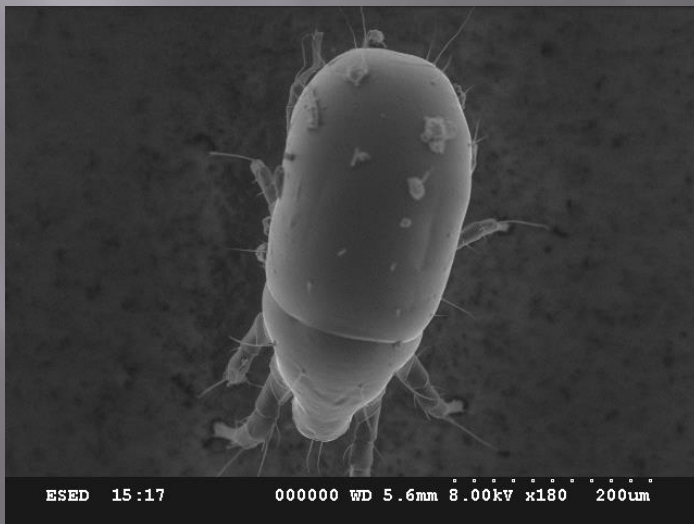
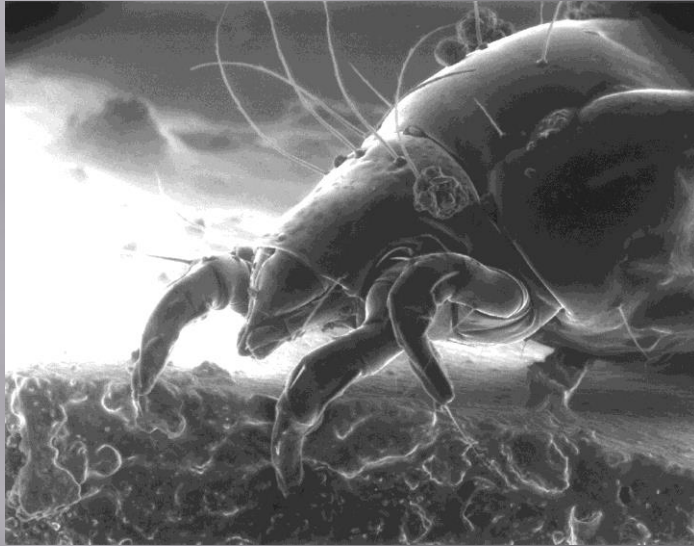
Positionnement dans la chambre du MEB

# Cellules osseuses en culture observées avec les capsules QUANTOMIX



**Mode: BSE, fixées, non métallisées**

# Insectes, Acarieus

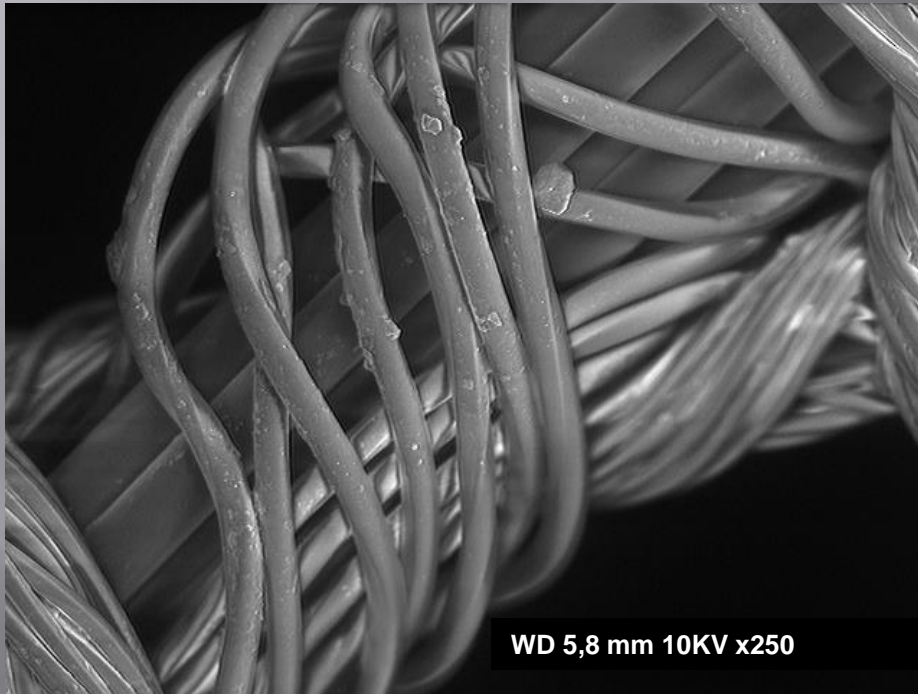


**Mode: ESED, non fixés,  
non métallisés**

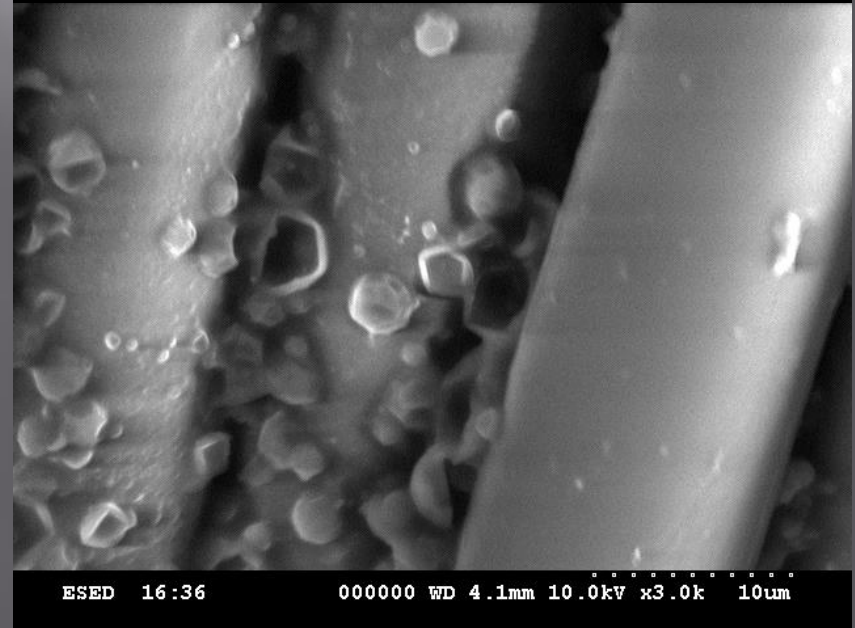
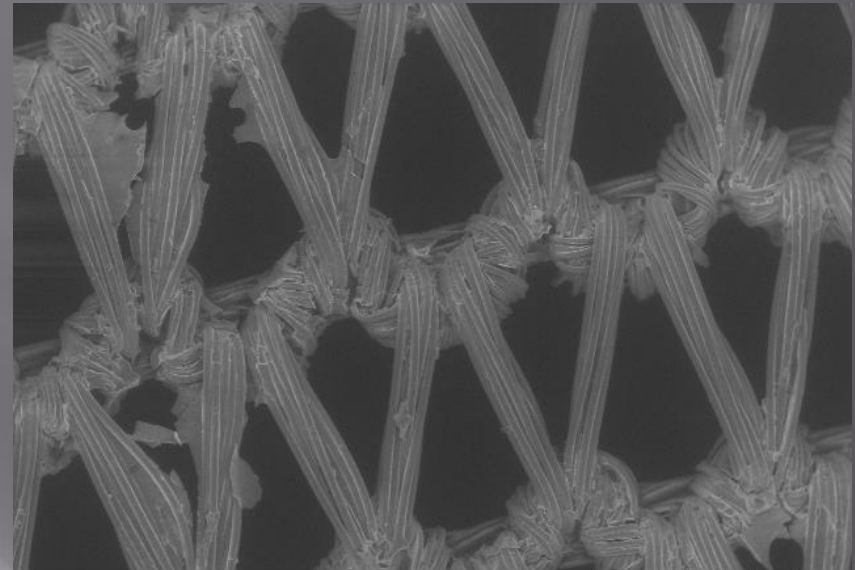
# Tissus médicaux

Tricot de polyamide autour de fibres élastannes+ micro-capsules hydratantes

(maillage de bas de contention)



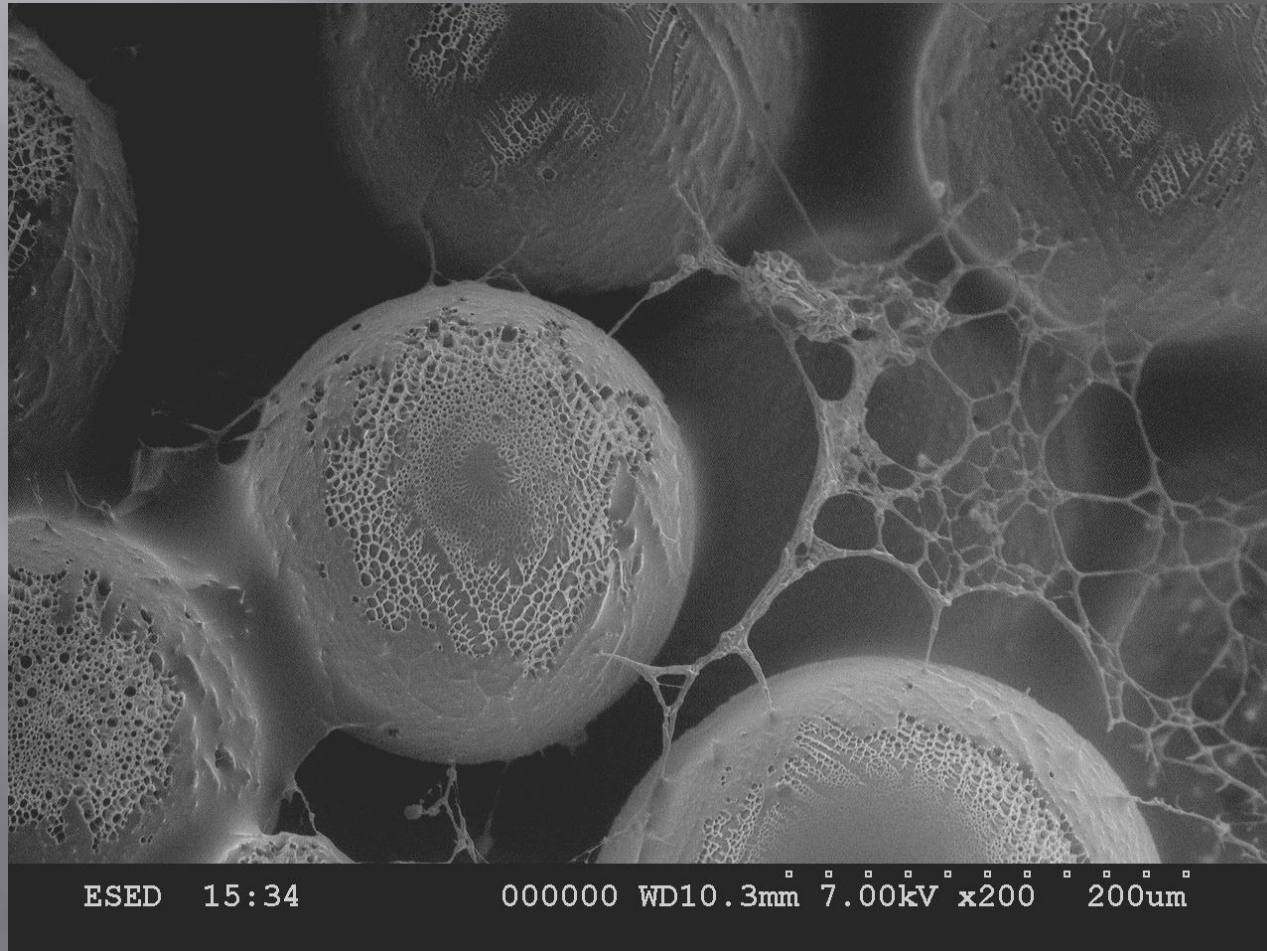
**Mode: ESED 70Pa, non fixé,  
non métallisé**





# Micro capsules de gélatine et gomme arabique constituées de multicouches microporeuses

Application : diffusion d'actifs tels que désodorisants, désinfectants...

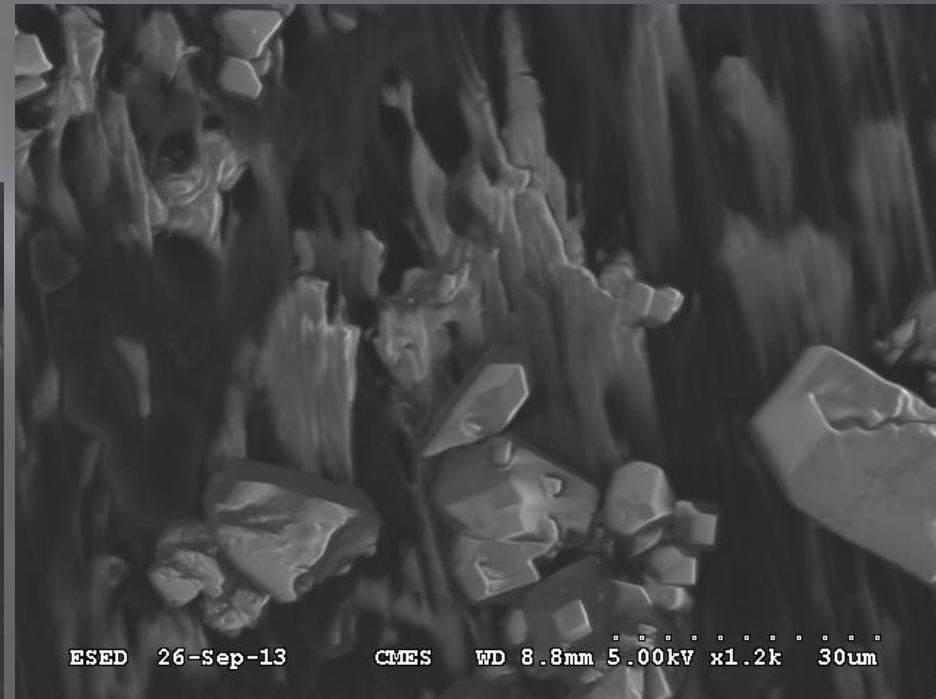
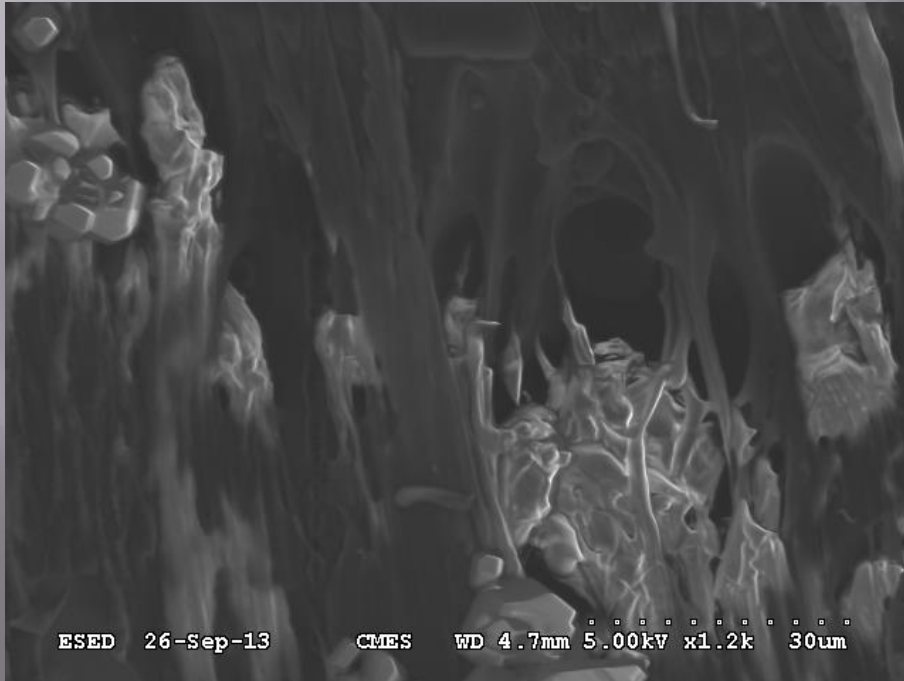


**Mode: ESED, non fixées, non métallisées**

# Biomatériaux

Mise au point d'un Bioplastique hydrosoluble  
à base de protéine de lait (caseinate) + ecoflex .

Application: agroalimentaire, bague antiparasitaires pour vaches,  
Timer hydrosoluble pour aquarium,  
Pigments pour aquarelles...



**Mode: ESED 70Pa, non fixés,  
non métallisés**

**Caseinate + Ecoflex 30%**

# MEB en haut vide

## Echantillons observés sans point critique:

- ❖ Cellules en culture
- ❖ Bactéries
- ❖ Plaquettes sanguines
- ❖ Insectes/parasites
- ❖ Tissus
- ❖ Polymères avec amidon
- ❖ Diatomées

## Echantillons observés après point critique:

- ❖ Sections transversales de muscles
- ❖ Protozoaires et champignons
- ❖ Comestibles
- ❖ Cornée

# Technique de préparation de cultures de cellules, des bactéries et plaquettes sans point critique

**FIXATION** dans *Glutaraldéhyde 2% ou 2.5%* + tampon cacodylate de sodium 0.1M ou tampon phosphate (Sorensen) pH 7.4 . 15mn minimum à 1 heure (mélange final)

**RINÇAGE** dans tampon cacodylate de sodium 0.2M ou tampon phosphate (Sorensen) 2 à 3 fois 10mn à 15mn

**POST-FIXATION** dans *Tétroxyde d'osmium (OSO<sub>4</sub>) 1%* + cacodylate de sodium ou tampon phosphate (Sorensen) 0.1M. 15mn minimum à 1 heure (mélange final)

**RINÇAGE** dans tampon et/ou passage rapide dans H<sub>2</sub>O

## **DESHYDRATATION**

- - dans série d'alcools : 50, 70° ( 1 bain de 10mn chacun), 95° (2 bains de 10mn chacun) et 100° ( 3 bains de 10mn)
- - dans un bain alcool 100° + *HMDS (Hexaméthylidizilasane)* volume à volume 10mn
- - dans un bain *HMDS 100%* 10mn ;  
au bout de 10mn ôter le surplus ou laisser évaporer une nuit

## **METALLISATION**

N.B. : Tampon Sorensen : Phosphate Mono /Di sodique

# Métallisation des échantillons en vue de l'observation au MEB en mode haut vide ou pression contrôlée

Rendre l'échantillon conducteur sous le faisceau d'électrons



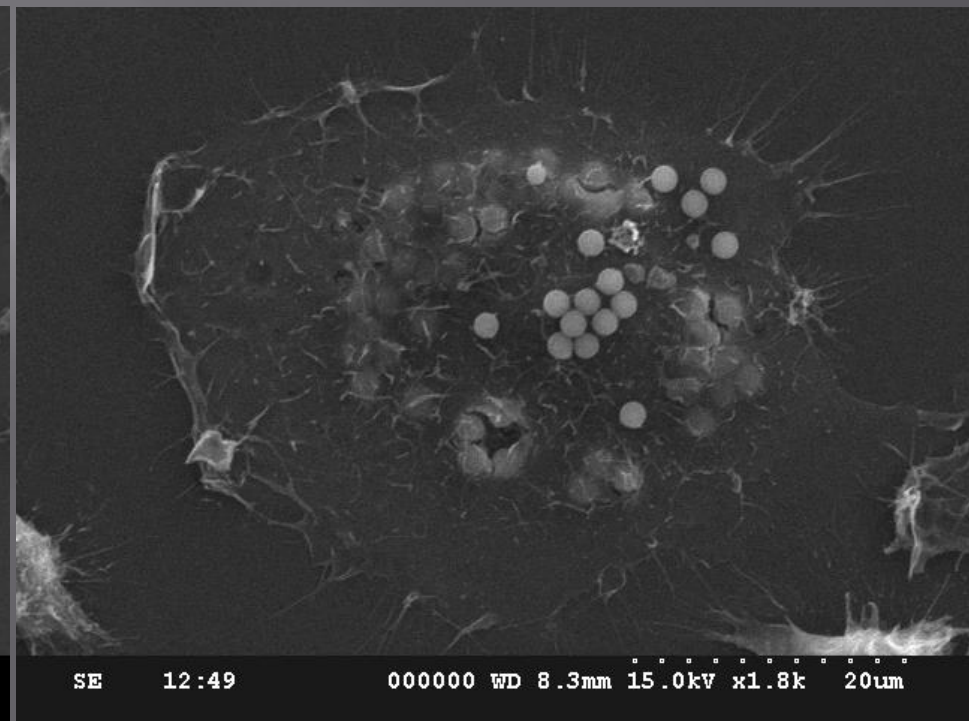
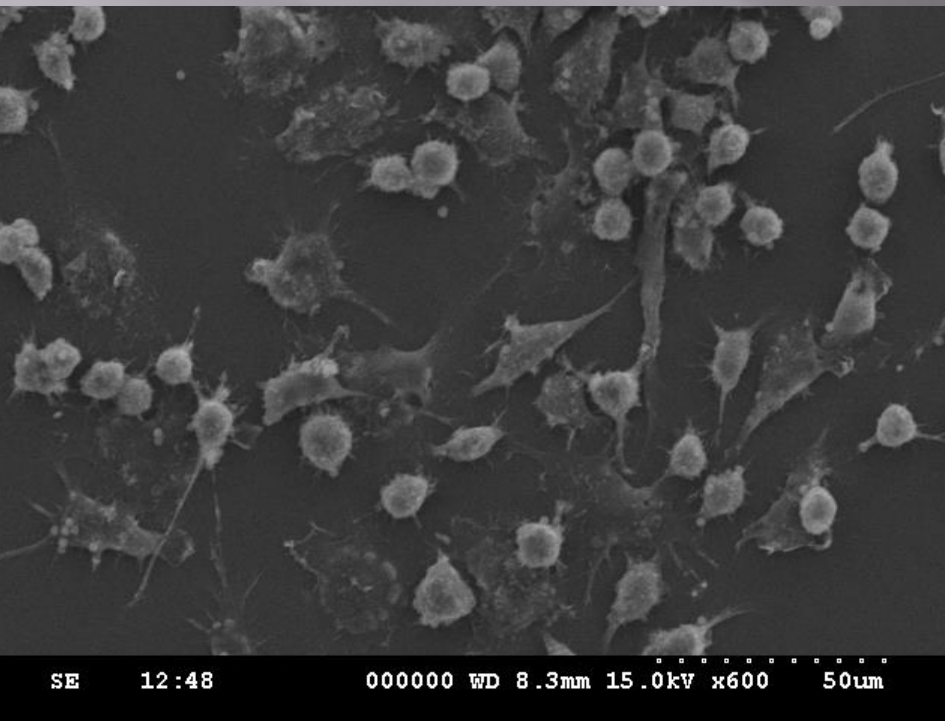
Fixation des objets sur scotch carbone et/ou avec colle à l'argent

Métallisation des objets sous atmosphère Argon, dépôt d'une couche d'Or/Palladium de quelques nm d'épaisseur

*Evaporateur cathodique  
Polarion SC 7620*

# Macrophages

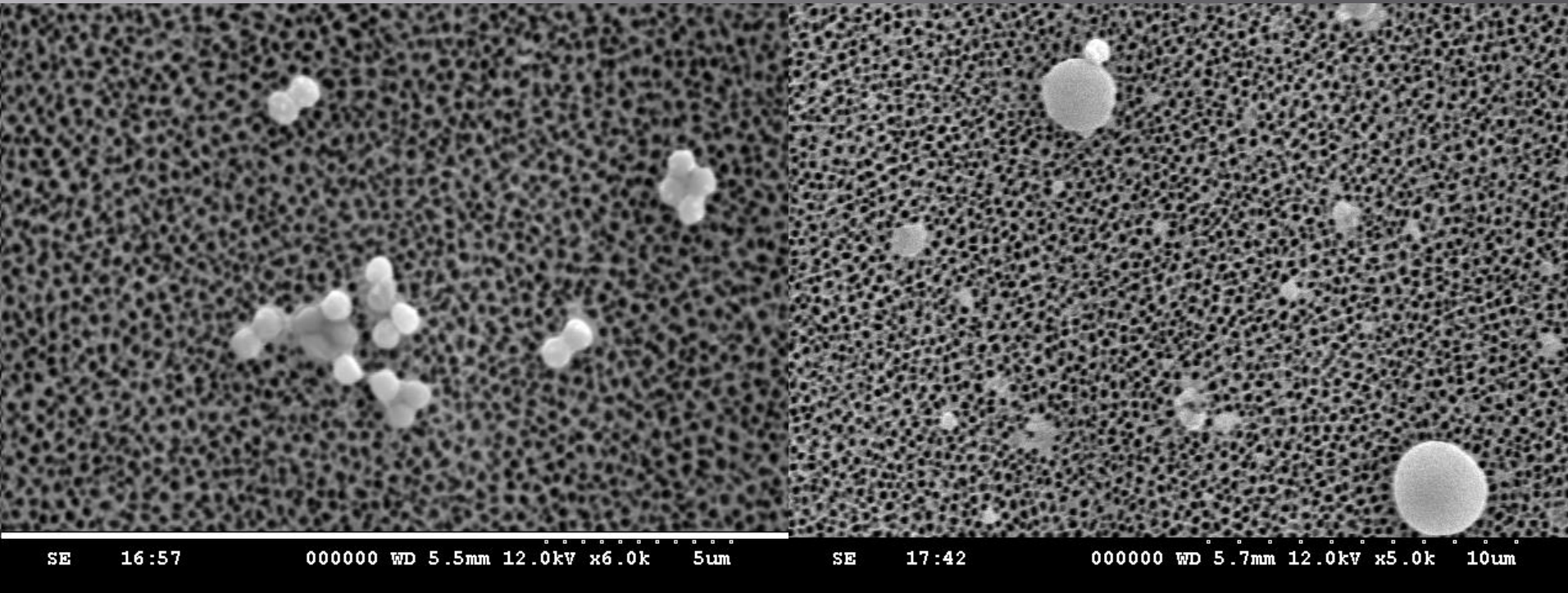
Culture de macrophages ayant phagocyté des billes de silice en vue d'une étude de cytotoxicité. Compréhension des interactions nanoparticules /cellules et tissus biologiques



**Mode: SE à 15 Kv Fixation + métallisation**

# Bactéries

## *Staphylococcus aureus*



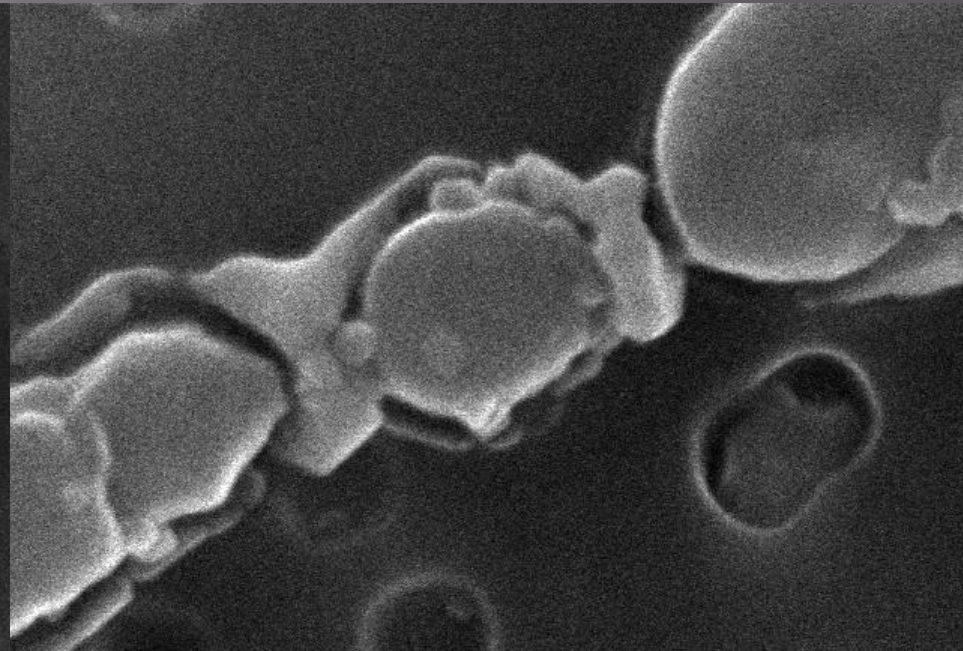
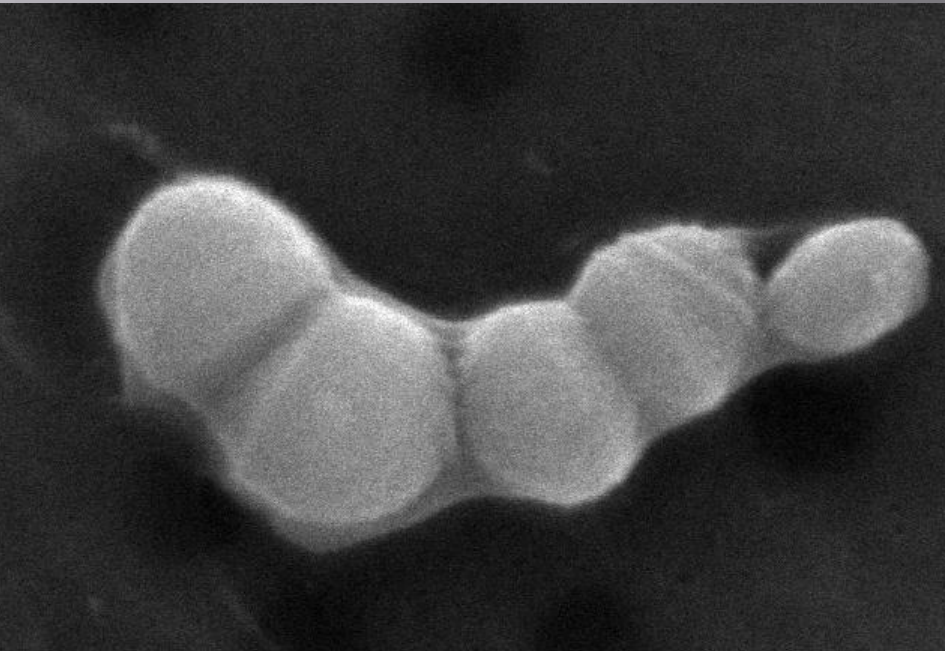
Témoin

En présence d'huile essentielle  
d'écorce de cannelle de Ceylan  
Effet bactéricide puissant

**Mode SE à 12 Kv Fixation + métallisation**

# Bactéries

## Streptococcus pyogenes



Témoin

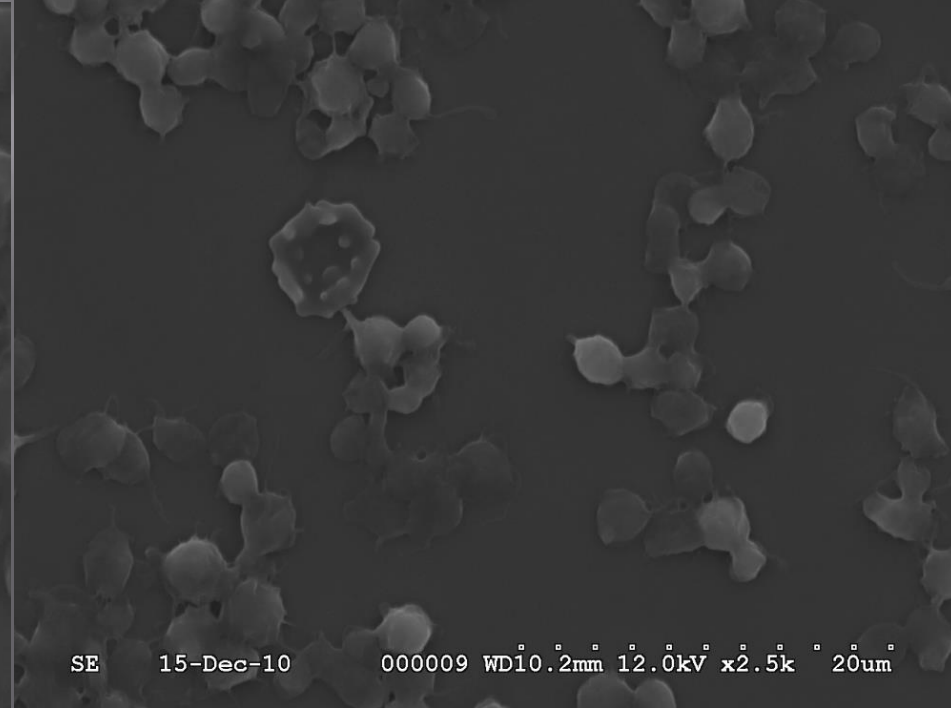
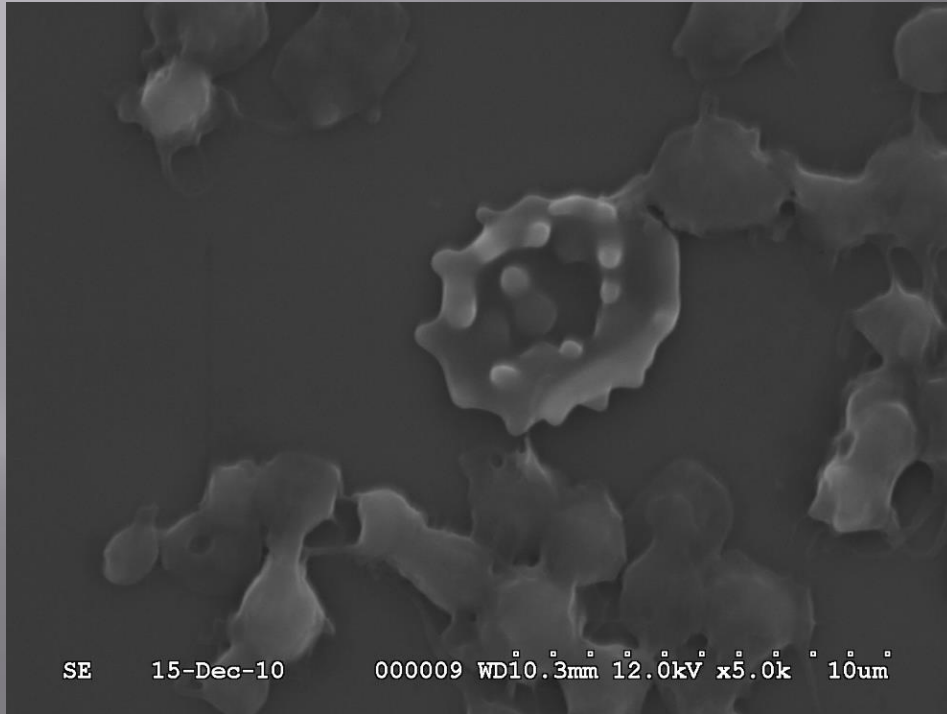
En présence d'Huile essentielle  
d'écorce de cannelle de Ceylan  
Effet bactéricide puissant

**Mode SE à 12 Kv, Fixation + métallisation**



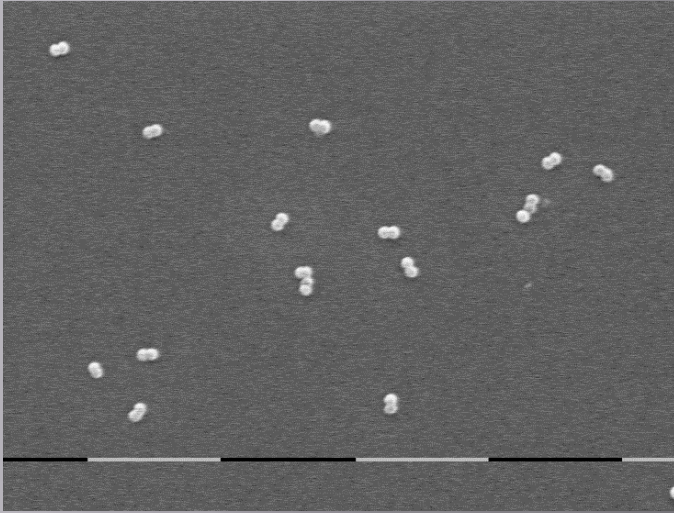
# Plaquettes sanguines

Mise au point d'une technique de préparation et visualisation des changements morphologiques des plaquettes impliquées dans diverses pathologies inflammatoires: maladie de Crohn, HIV...

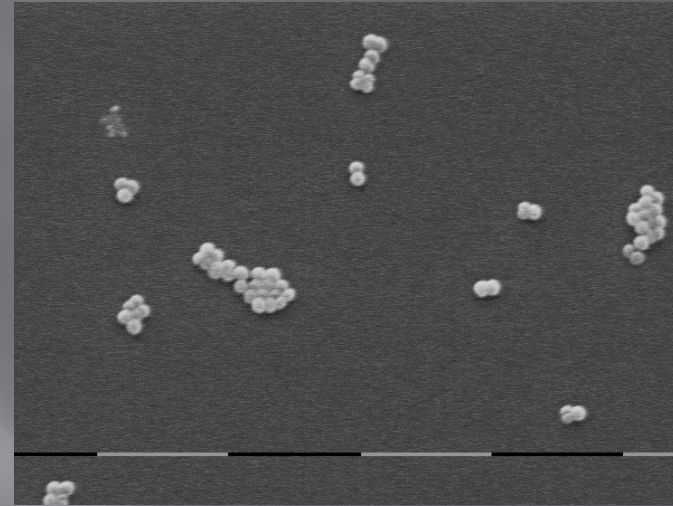


**Mode SE à 12 Kv Fixation + métallisation**

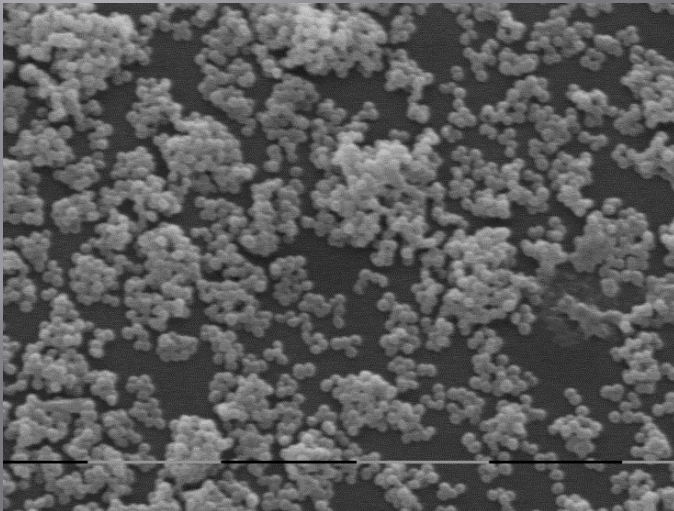
# Formation d'un biofilm de *Staphylococcus xylosus*



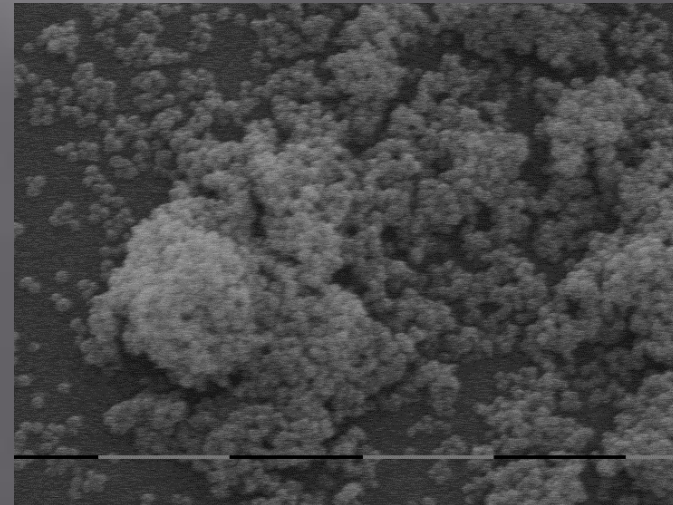
2H



4H

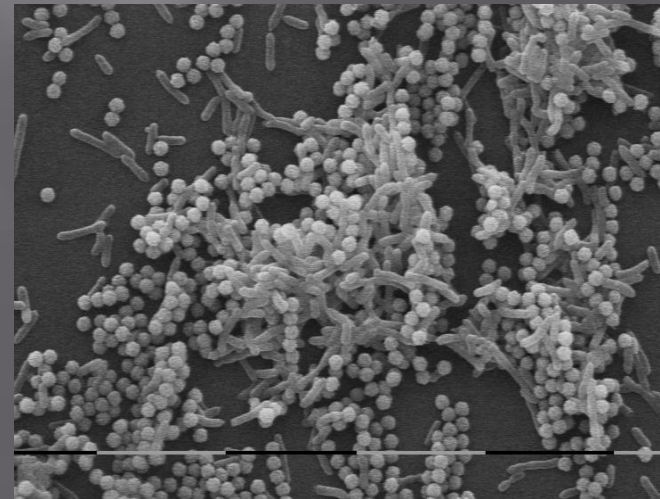
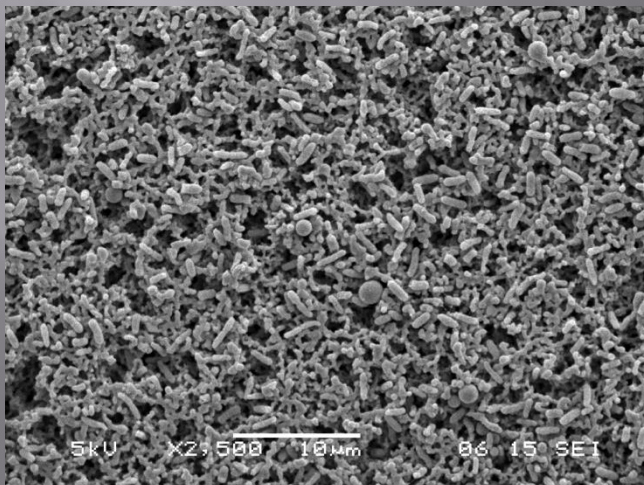
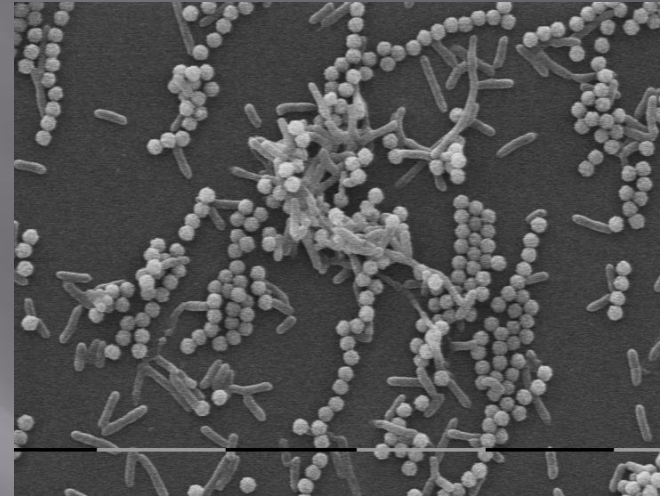
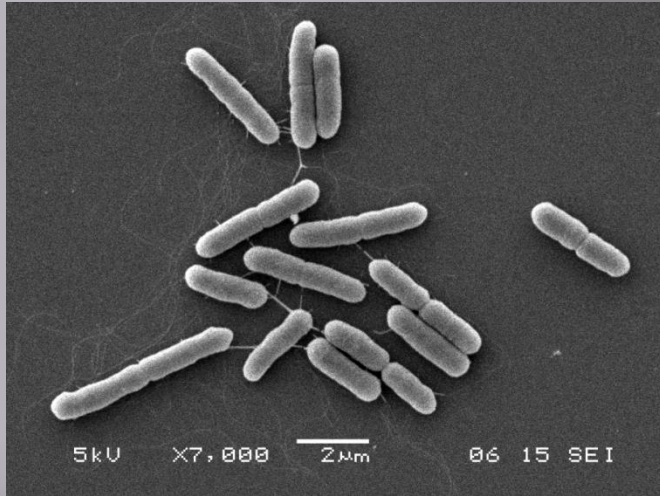


9H



24H

# Bactéries: *E.coli*

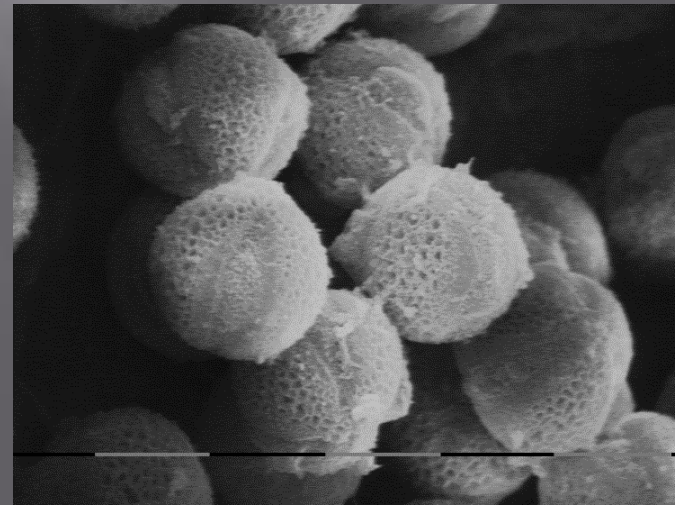
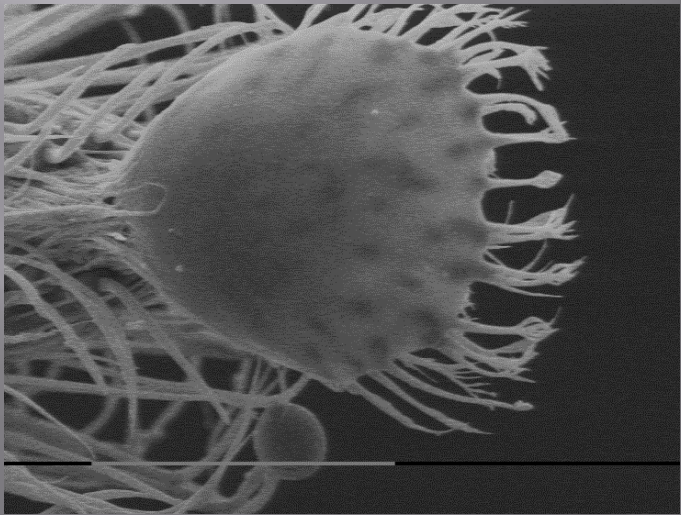
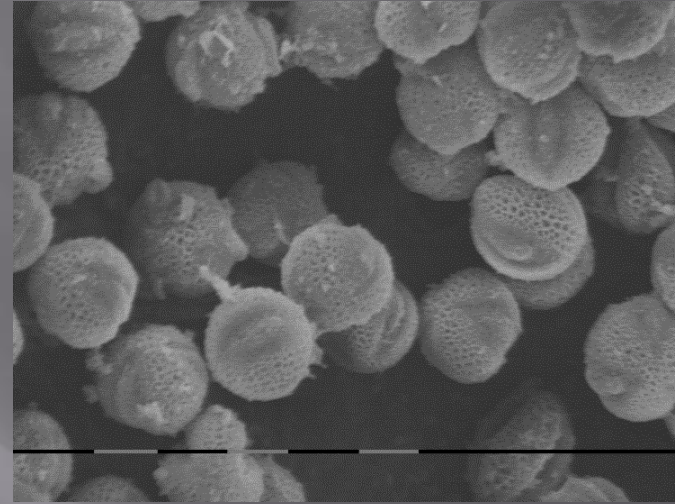
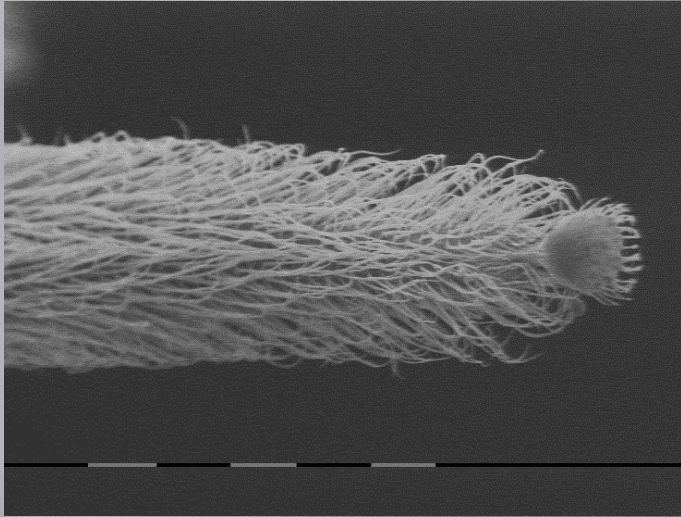


**5Kv**

**Mode SE fixation gluta+métallisation**

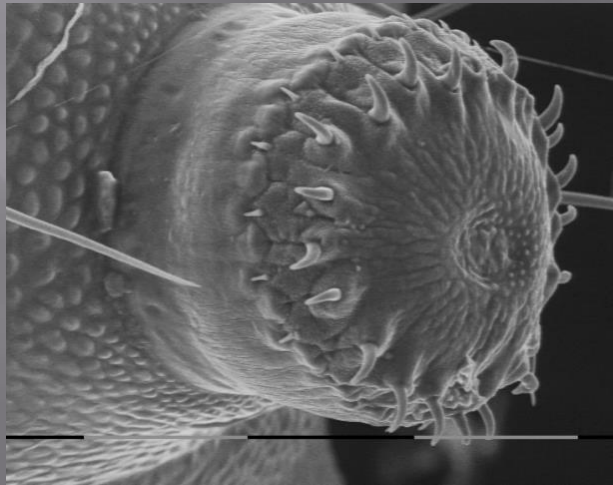
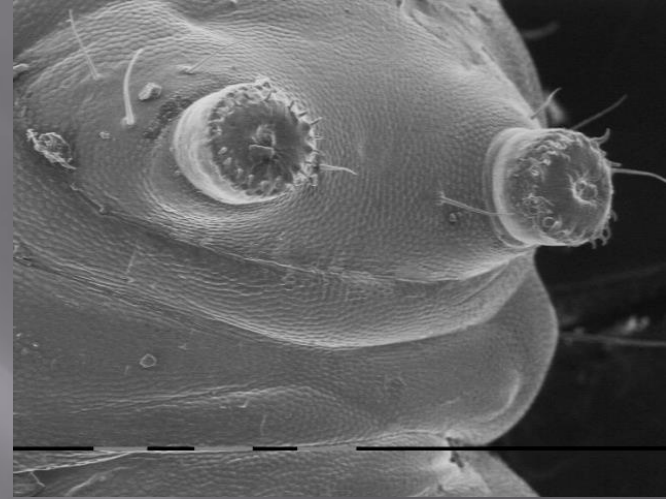
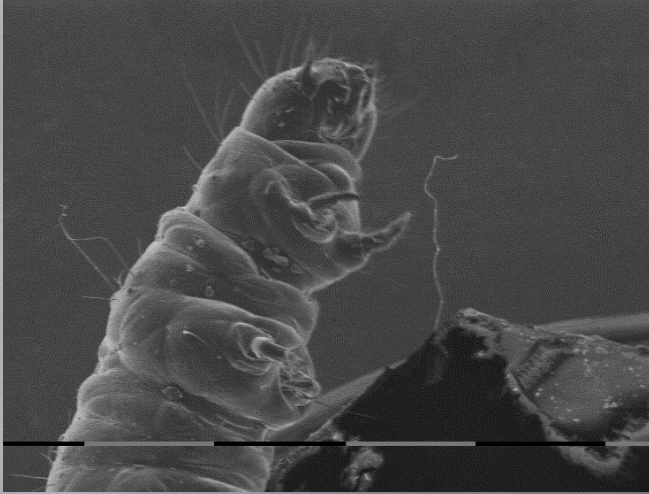
**20 Kv**

# Chez l'abeille: langue et pollen



Mode SE à 15 Kv fixation +métallisation

# Alternatives sur teigne de blé

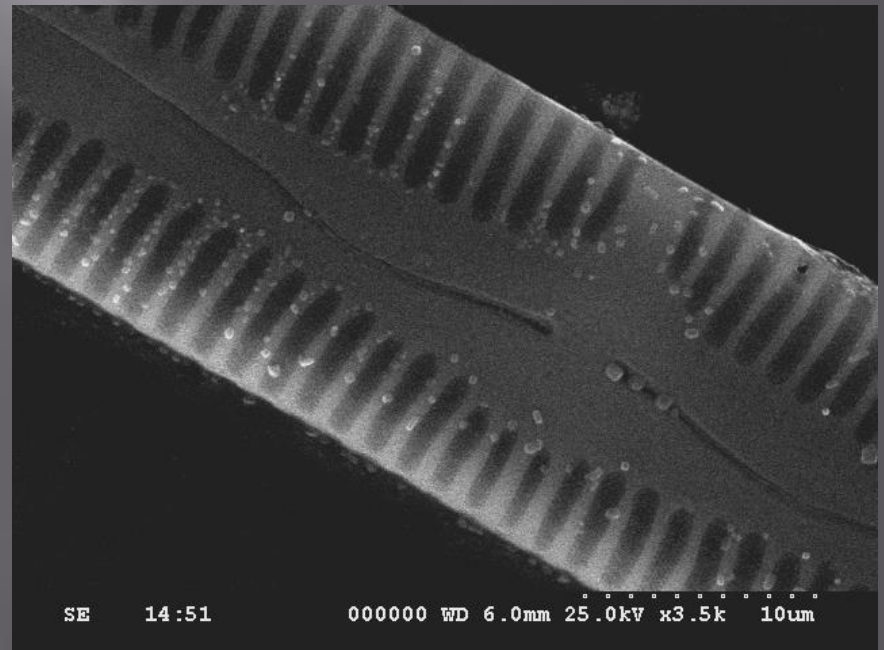
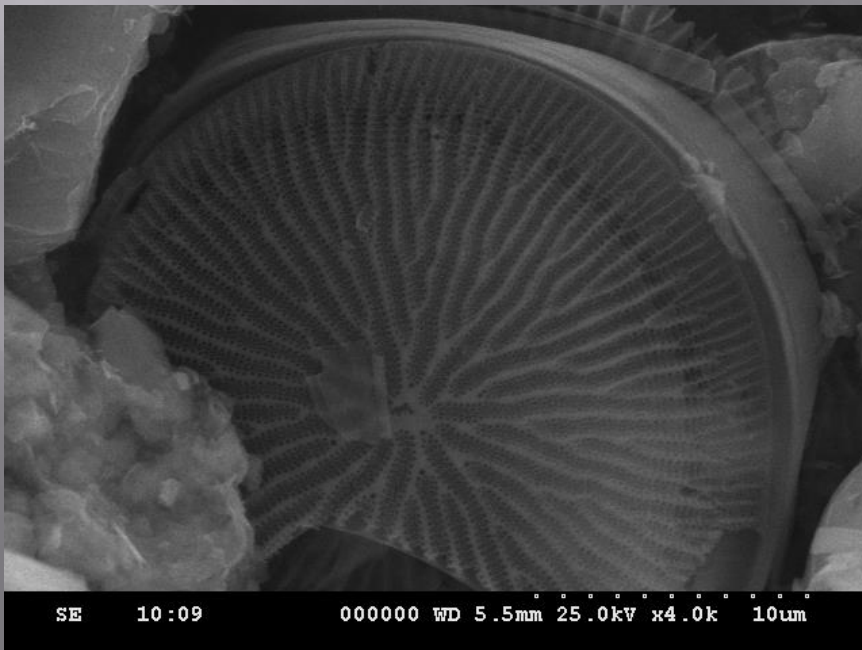
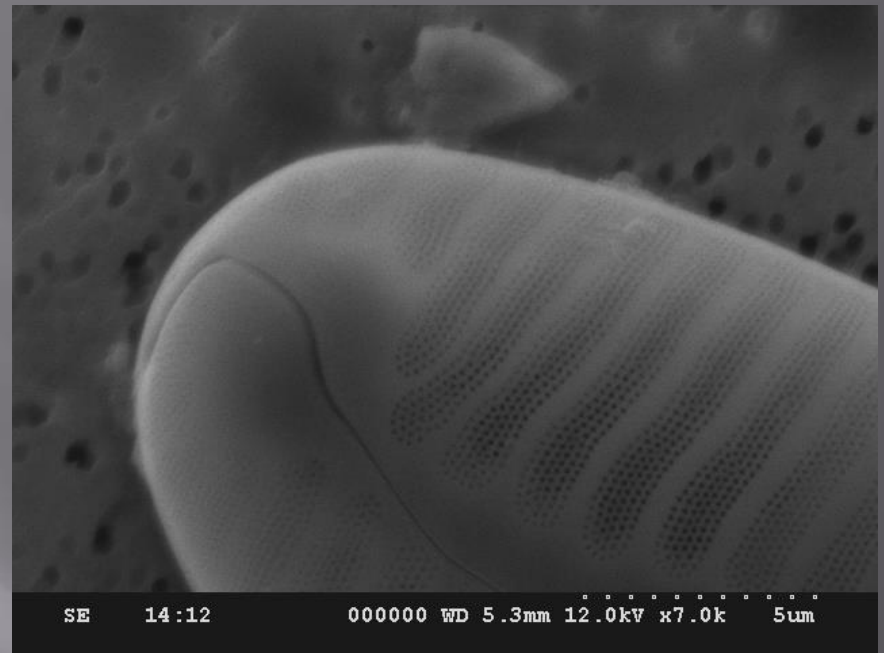


**Mode SE 15 Kv**  
Fixation + acétone au lieu  
de HMDS+métallisation

# Diatomées

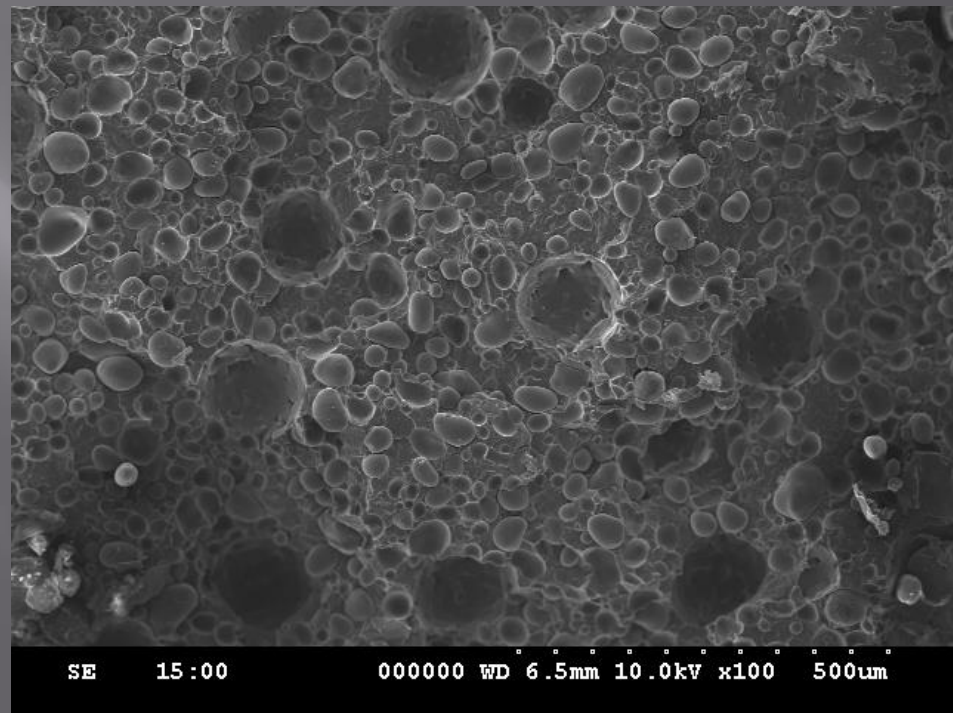
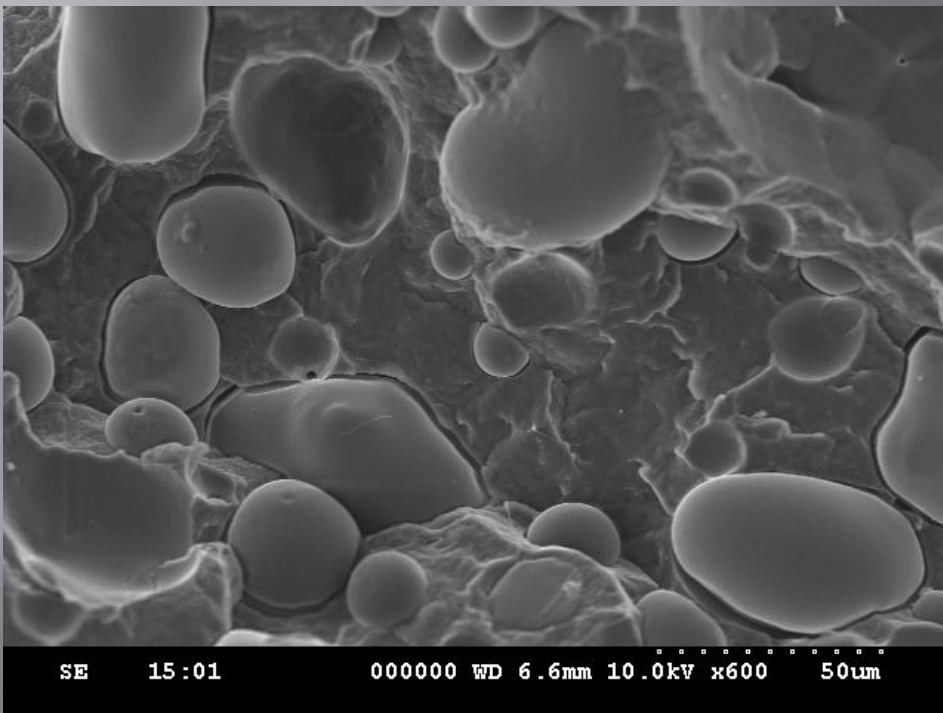
Détermination des espèces à partir de l'ornementation des tests siliceux

**Mode SE 12Kv et 25Kv**  
**pas de fixation + métallisation**



# Polymères contenant de l'amidon

Application: agroalimentaire (sacs biodégradables)



**Mode SE 10 Kv**  
échantillon fracturé dans l'azote et métallisé

# Technique de préparation par la méthode du point critique

**FIXATION** dans **Glutaraldéhyde 2% ou 2.5%** + tampon cacodylate de sodium 0.1M ou tampon phosphate (Sorensen) pH 7.4 . 15mn minimum à 1 heure (mélange final)

**RINÇAGE** dans tampon cacodylate de sodium 0.2M ou tampon phosphate (Sorensen) 2 à 3 fois 10mn à 15mn

**POST-FIXATION** dans **Tétroxyde d'osmium (OSO<sub>4</sub>) 1%** + cacodylate de sodium ou tampon phosphate (Sorensen) 0.1M. 15mn minimum à 1 heure (mélange final)

**RINÇAGE** dans tampon

## **DESHYDRATATION**

dans série d'alcools : 50, 70° ( 1 bain de 10mn chacun), 95° (2 bains de 10mn chacun) et 100° ( 3 bains de 10mn) puis :

déshydratation progressive jusqu'à l'acétone 100 % avant point critique

ou

Introduction directe dans alcool 100 ou Acétone 100 pour point critique



# Méthode du point critique



EMSCOPE CPD 750



Polaron

Transférer les échantillons dans un cristalliseur rempli d'acétone ou d'alcool 100%.

Placer également les paniers ouverts de l'appareil à point critique et les couvercles

Positionner les échantillons et fermer les paniers toujours sous acétone ou alcool

Refroidir l'enceinte de l'appareil à point critique en dessous de 5 °C ( le CO<sub>2</sub> n'est liquide qu'au-dessous de 16°C)

Remplir l'enceinte avec l'acétone ou l'alcool et placer les paniers et fermer

Rincer l'acétone ou l'alcool par le CO<sub>2</sub> liquide en réalisant un courant continu de liquide ( 4 à 5 rinçages)

Fermer les vannes après avoir rempli à moitié l'enceinte et enclencher le chauffage. **Le point critique est atteint à 31°C et à une pression de 73 bars soit 7300 000 Pa.**

Lorsque la température est atteinte , ouvrir la vanne et laisser échapper le gaz très lentement pour éviter une recondensation liquide par une trop brusque baisse de pression. Le retour à la pression atmosphérique prend environ 20 minutes

Ouvrir l'enceinte et récupérer les échantillons secs et blanchâtres

# Métallisation des échantillons en vue de l'observation au MEB en mode haut vide ou pression contrôlée

Rendre l'échantillon conducteur sous le faisceau d'électrons



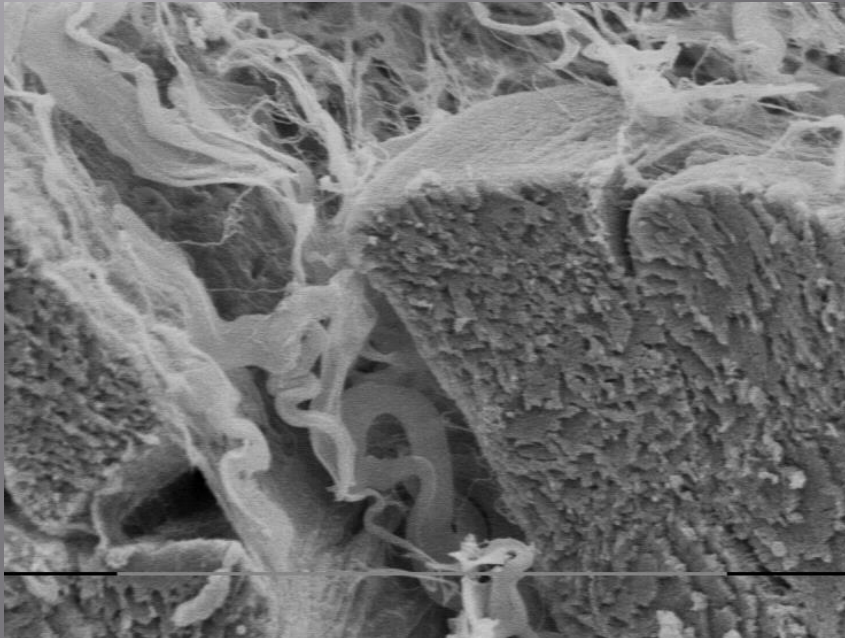
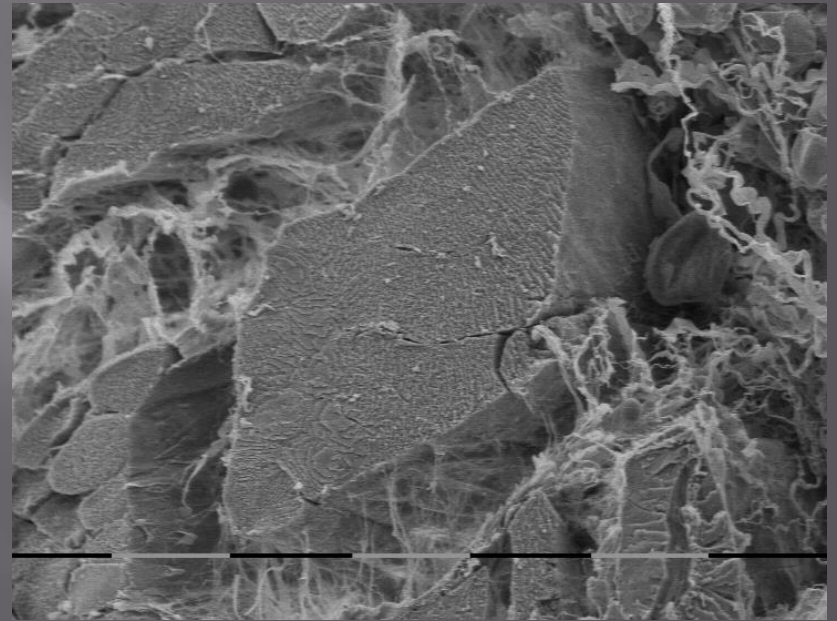
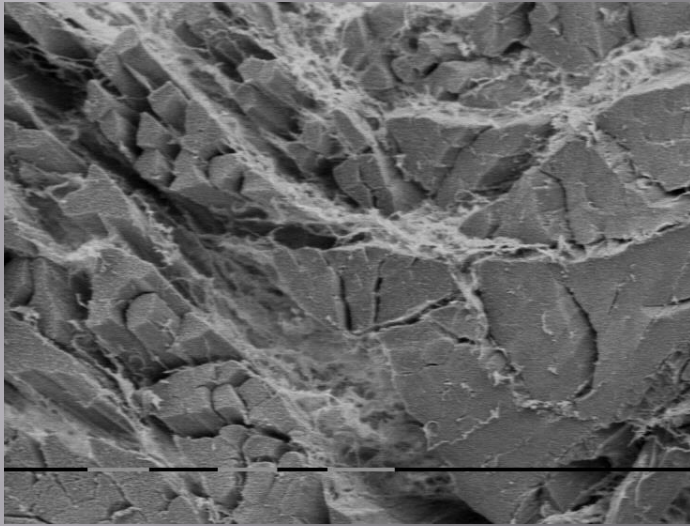
Fixation des objets sur scotch carbone et/ou avec colle à l'argent



Métallisation des objets sous atmosphère Argon, dépôt d'une couche d'Or/Palladium de quelques nm d'épaisseur

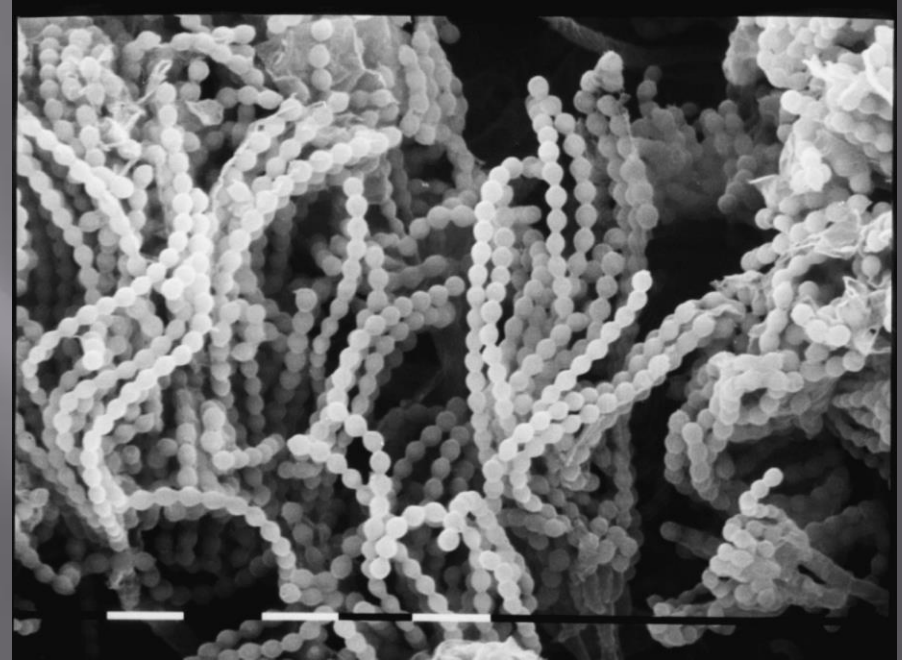
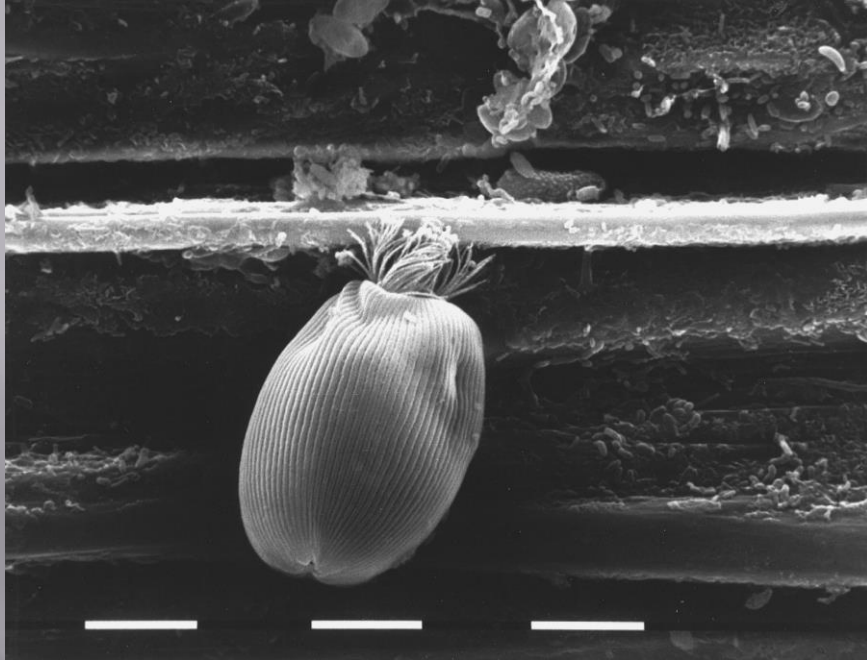
*Evaporateur cathodique  
Polarion SC 7620*

# Sections transversales de muscles



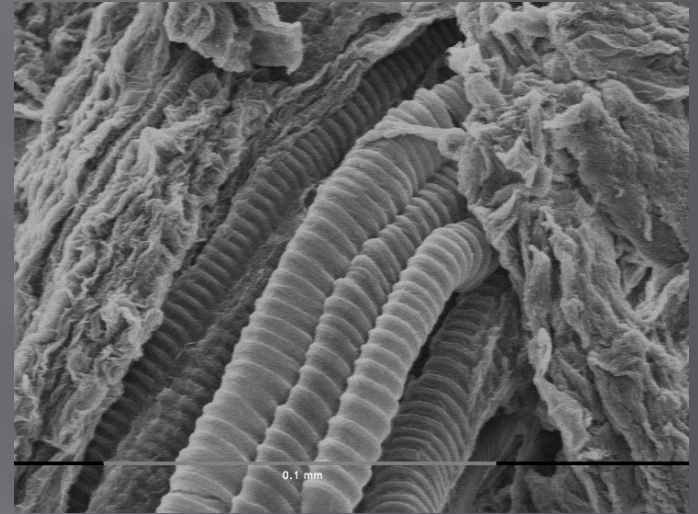
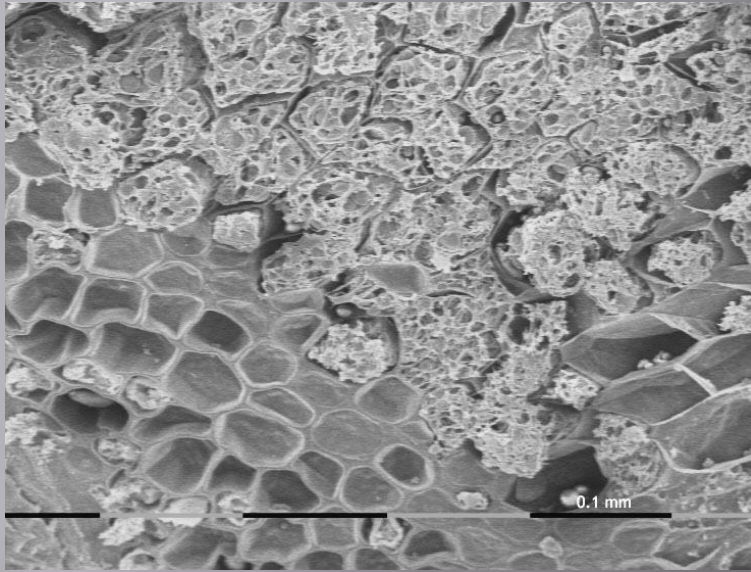
**Mode SE 15 Kv échelle 0.1 mm**

# Protozoaires et champignons.....

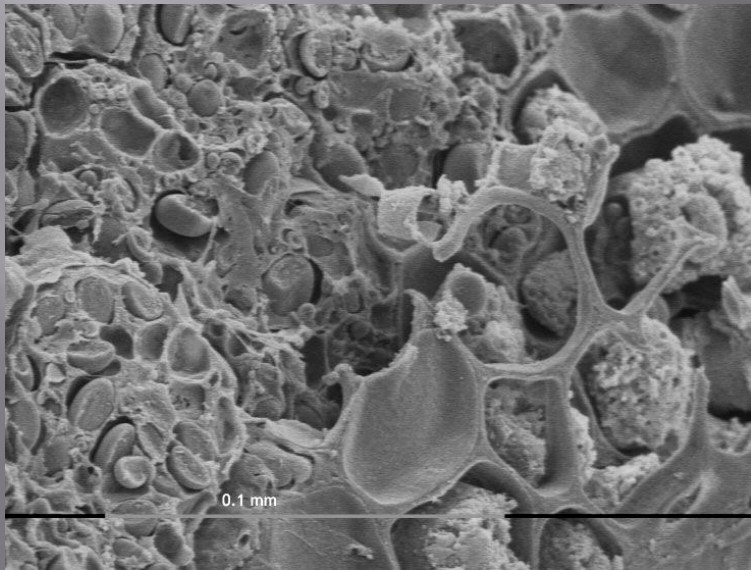


**Mode SE 15 Kv**

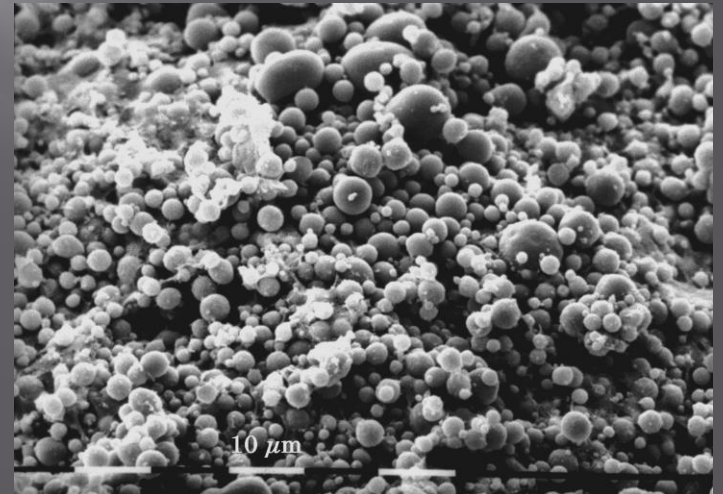
# Comestibles



Nervure de chou



Pain type 80



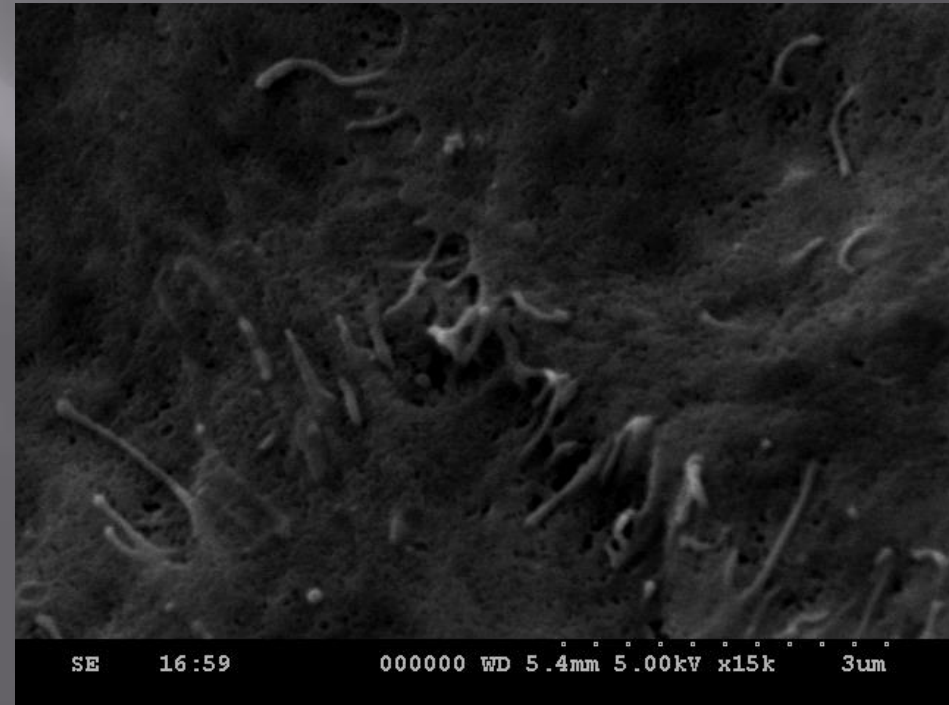
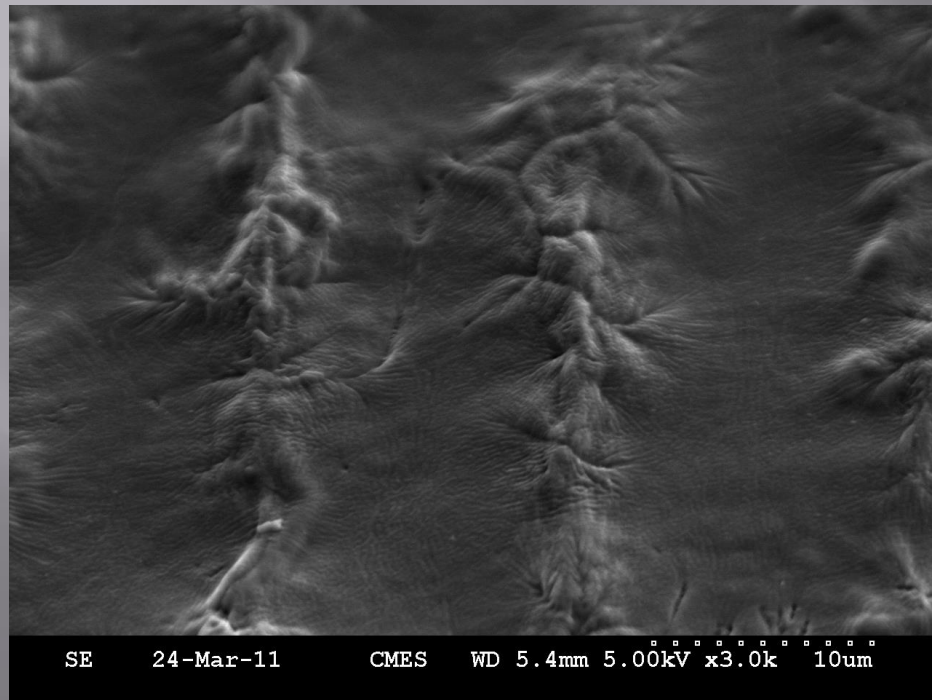
Mayonnaise

Mode SE 15 Kv

# Cornée

Etude de la membrane de Descemet  
cornée humaine  
après découpe au laser en vue de greffe

Etude de l'influence du milieu de  
conservation cornéen sur les  
cellules endothéliales de cornée  
de lapin



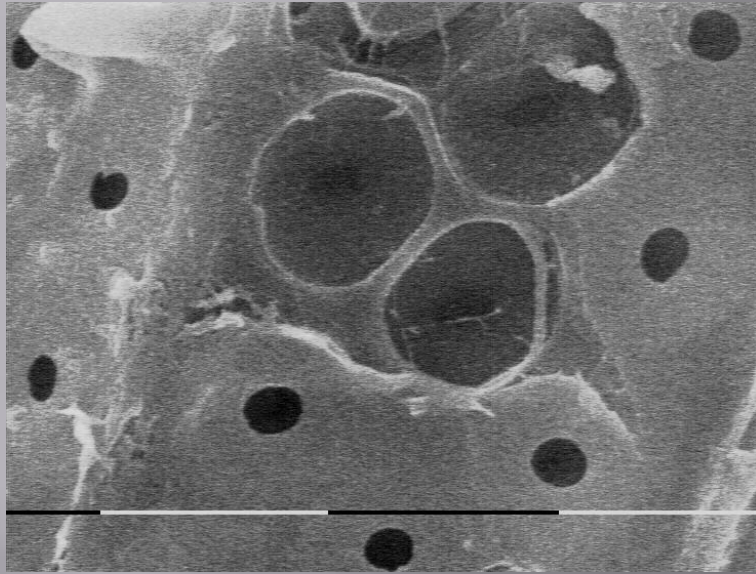
**Mode SE à 5 Kv fixé, métallisé**

# Comparatifs cryométhodes sur matériel végétal

Film de préparation des échantillons pour une observation en cryo-MEB réalisé lors de la 1<sup>ère</sup> réunion GT Cryo RCCM

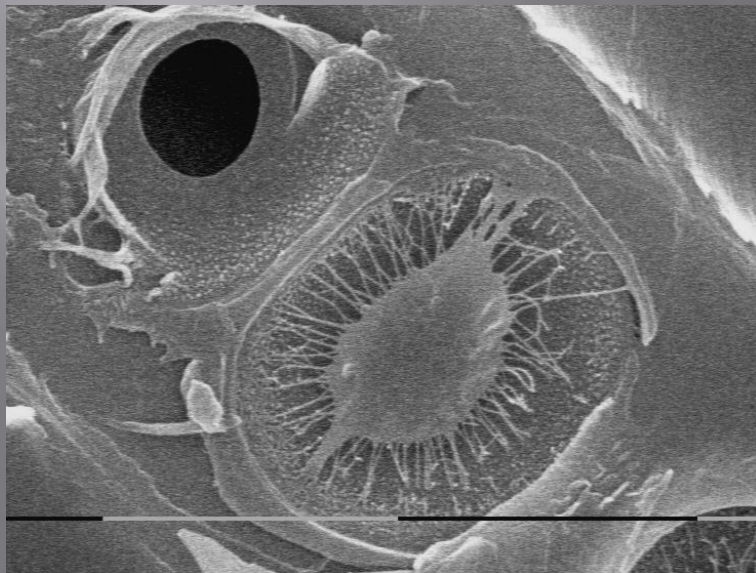
suivi d'un comparatif en fonction de l'appareillage utilisé

# Cryo-MEB sur peuplier avec MEB 505 Philips avec étage cryogénique Hexland



Non métallisé

Mode SE 15 KV



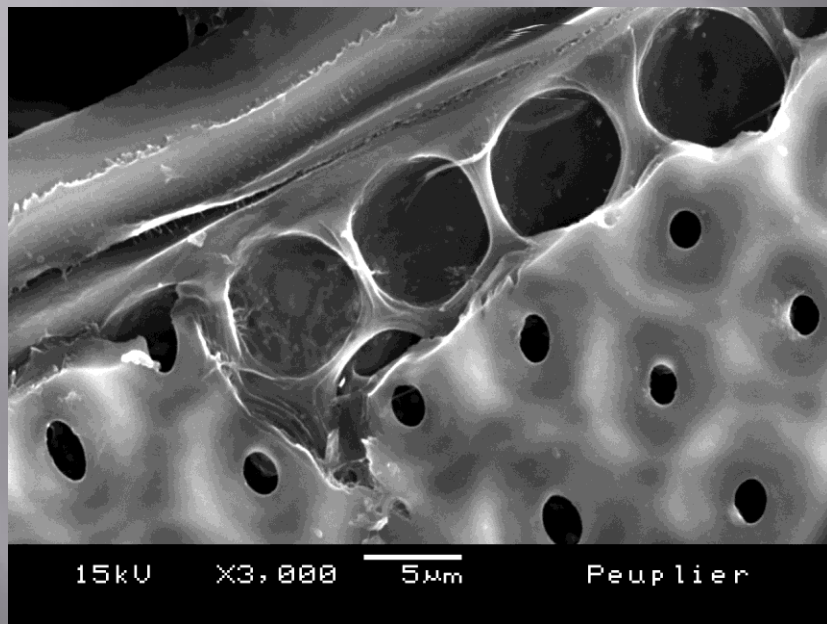
Métallisé



Dernier SEM 505 en état de marche et 1<sup>er</sup> étage cryogénique Hexland installé en France (1983)

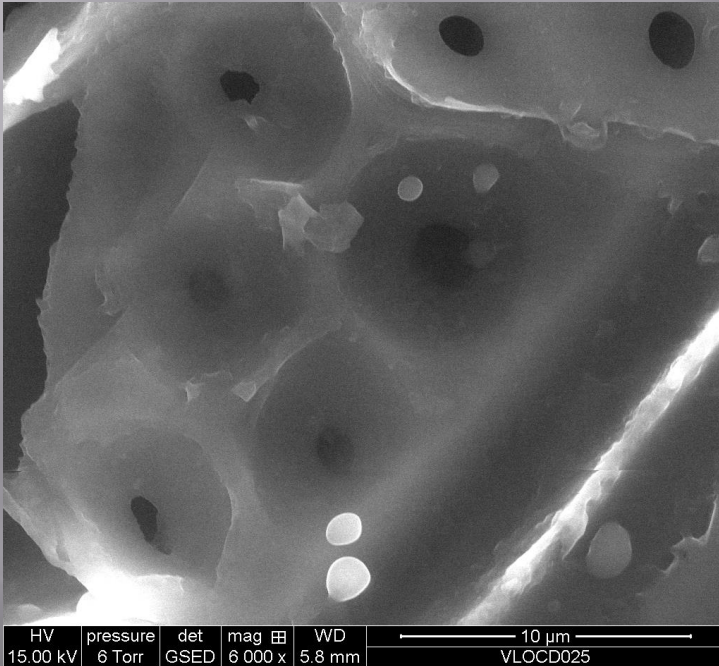


# Cryo-MEB sur peuplier avec SEM Jeol 5910 en low vacuum



**Métallisation et observation à 15 Kv**

# Cryo-MEB sur peuplier avec un ESEM-FEG FEI Quanta 250 CTμ Lyon



**Non métallisé et observation à 15 Kv**

# Conclusion

## Evolution des techniques de préparation:

Méthode du point critique moins utilisée car longue et source d'artefacts

Méthode de dessiccation par évaporation (HMDS) plus rapide et avec bons résultats sur petits échantillons (bactéries, cultures cellulaires....)

Cryo-méthodes à condition d'être équipés

## Evolution des instruments:

Microscopie conventionnelle et à pression contrôlée augmentent le champ d'applications mais sont limitées en résolution

Microscope à effet de champ : l'avenir et l'incontournable pour les cryométhodes à condition d'avoir les moyens financiers

