

IV. Microscopie électronique.

1. Introduction :

Contrairement à un microscope optique (photonique), un microscope électronique n'est pas sensible à la lumière qui émane de l'échantillon à analyser, mais aux électrons qu'il renvoie...

Le microscope électronique utilise le même principe de **lentilles** et de **faisceaux** qu'un microscope optique (photonique) classique.

Ce qui varie, c'est que le microscope électronique est doté de **lentilles électromagnétiques** et d'un **faisceau d'électrons**, alors qu'un microscope optique utilise **des lentilles en verre** et un **faisceau de lumière** (photon). La résolution des microscopes électroniques est beaucoup plus grande (le grossissement atteint 2 millions de fois, contre 2.000 fois avec un microscope optique).

Le microscope électronique. C'est un type de microscope qui utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon et des lentilles électromagnétiques pour créer des images très agrandie La résolution des microscopes électroniques atteint un grossissement de 2 millions de fois, l'image obtenue se forme directement sur l'écran fluorescent.

Tableau 1: Analogie entre le microscope optique et le microscope électronique.

Microscope optique	Microscope électronique
faisceau de lumière (photon)	faisceau d'électrons
lentilles en verre	lentilles électromagnétiques
le grossissement atteint 2.000 fois	le grossissement atteint 2 millions de fois
l'image obtenue se forme directement sur la rétine de l'observateur	l'image obtenue se forme directement sur l'écran fluorescent

2. Les différents microscopes électroniques

Il existe plusieurs sortes de microscope électronique. Les plus connus sont :

- le microscope électronique **en transmission**.
- le microscope électronique à **balayage**.

2.1. La microscopie électronique à transmission (MET).

La microscopie électronique à transmission (MET, en anglais TEM pour *Transmission Electron Microscopy*) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « **transmis** » à travers un échantillon très mince, il permet de visualiser des objets bien **plus petits** que des cellules.

Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une **image**, dont la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre.

a. Description de l'appareil.

Un microscope électronique en transmission est composé des principaux éléments suivants :

- un canon à électrons, qui fournit le faisceau électronique ;
- des lentilles magnétiques ;
- un système de détecteurs d'électrons.

Ces éléments sont placés dans un système de **vide**, autour duquel se situe un réservoir d'azote liquide, qui sert à refroidir les zones près de l'échantillon

Le faisceau d'électrons est produit au moyen d'un canon à électrons, ils se déplacent dans le vide généré par des pompes (pompes à palettes, pompes à diffusion et pompes sèche). Ces dernières nécessitent d'être refroidies par un circuit liquide.

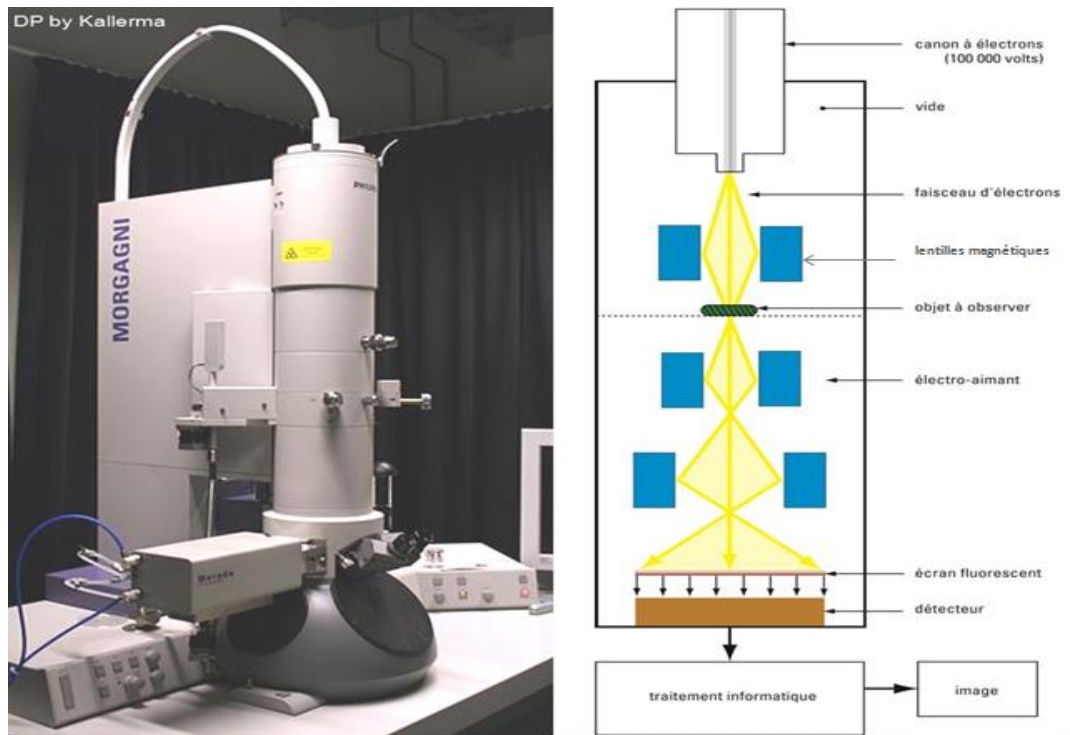


Figure 1 : Microscope électronique à transmission (MET).

b. Principe de fonctionnement.

Le canon émet des électrons en chauffant un filament de Tungstène (ou cristal d'hexaborure de lanthane). Ces électrons sont ensuite accélérés à l'aide d'une tension comprise entre 200 et 1000 kV.

Les faisceaux d'électrons passent au travers d'échantillon d'environ 3 mm de diamètre et d'épaisseur inférieure à 20 nano-mètres. Puis se focalisent à l'aide de lentilles magnétiques vers l'écran fluorescent (ou une caméra numérique) sous lequel se trouve un détecteur et donnent ainsi une image.

Le microscope électronique à transmission a deux principaux modes de fonctionnement :

- le mode image,
- le mode diffraction.

• En mode image :

Le faisceau d'électrons traverse l'échantillon. Selon son épaisseur, sa densité et sa nature chimique, les électrons sont plus ou moins absorbés.

A l'aide d'un détecteur, on peut, par transparence, observer une image de la zone irradiée. Ce principe est utilisé notamment en biologie, pour observer des cellules ou des coupes minces d'organes.

• En mode diffraction :

On utilise le comportement ondulatoire des électrons. Lorsqu'ils rencontrent de la matière organisée (des cristaux), ils sont diffractés, c'est-à-dire déviés dans certaines directions, dépendant de l'organisation des atomes.

Le faisceau est diffracté en plusieurs petits faisceaux. Selon leur direction, ceux-ci permettent d'en savoir plus sur la structure du cristal étudié.

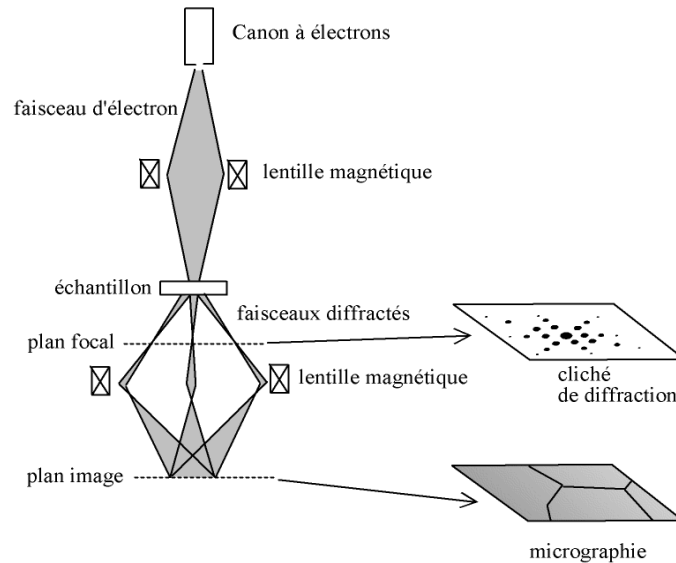


Figure 2 : Schéma de fonctionnement du MET

c. Préparation des échantillons.

La qualité des résultats obtenus dépende de la finesse des échantillons traversés par le faisceau d'électrons. Leur épaisseur doit être de l'ordre de 10 à 100 nanomètres maximum.

En général, on fait un trou à bords minces dans l'échantillon, et on observe les bords du trou.

On peut faire ce trou :

- par abrasion mécanique, avec une cuvetteuse ;
- par dissolution électrochimique (principe de l'attaque acide) ;
- par amincissement ionique (on bombarde l'échantillon avec un jet d'ions sous vide).



Figure 3 : Échantillon métallique

En biologie, on se sert du contraste d'absorption ; il suffit de faire des lames minces, les électrons traversent facilement la matière organique.

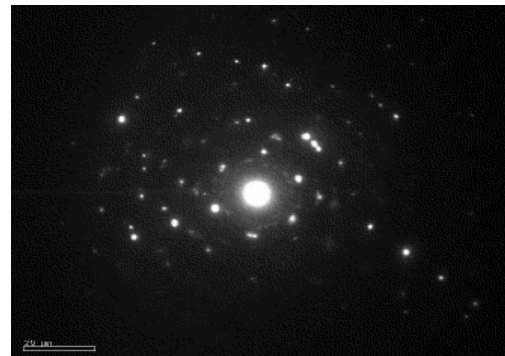
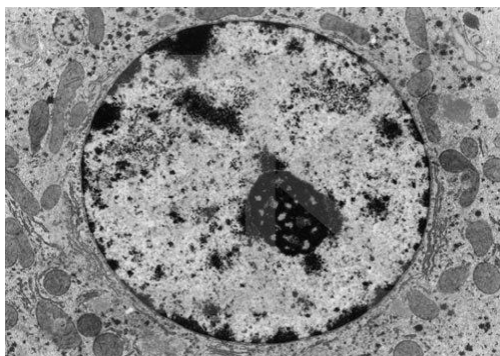


Figure 4: Micrographie en champ clair et Cliché de diffraction prise avec le MET

2.2 .La microscopie électronique à balayage (MEB).

Le microscope électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais pour *scanning electron microscopy*)

C'est une technique de **microscopie électronique** capable de produire des images en relief (haute résolution) de la surface d'un échantillon en utilisant, **le principe des interactions électrons-matière** grâce un balayage du microscope.

a. Description de l'appareil.

Un microscope électronique à balayage se compose de:

- un canon à électrons, qui fournit le faisceau électronique
- des lentilles magnétiques
- un circuit de pompage pour l'obtention d'un vide secondaire
- un système de détecteurs d'électrons
- un générateur de balayage
- un amplificateur de signal
- une bobine de déflexion

L'interaction entre les électrons et l'échantillon, provoque la formation de nouveaux **électrons** de plus faible **énergie** (secondaires, rétrodiffuse...). Ils sont amplifiés par un amplificateur de signal puis détectés par un système de détecteurs d'électrons et convertis en un **signal électrique**.

Le contrôle du balayage de la surface de l'échantillon est assuré par la bobine de déflexion.

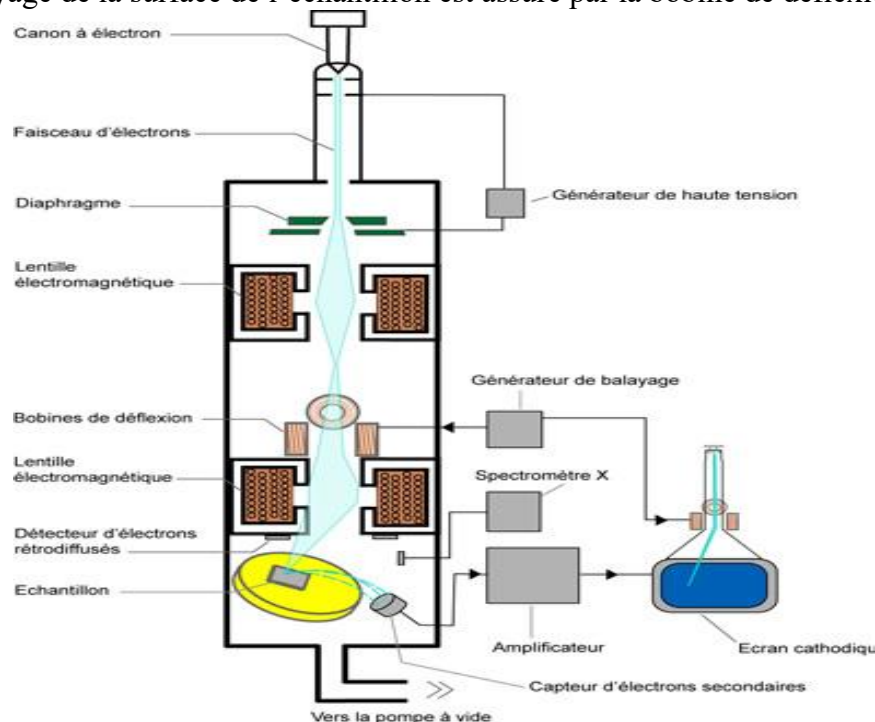


Figure 5 : Microscopie électronique à balayage (MEB).

b.Principe de fonctionnement

Le canon produit un faisceau d'électrons grâce à un filament de tungstène chauffé par un courant. Ce faisceau est accéléré par un générateur de haute tension (jusqu'à 30 KV).

Il est ensuite focalisé sur l'échantillon par une série de 3 lentilles électromagnétiques en une sonde de moins de 4 nm.

Le faisceau en touchant la surface de l'échantillon produit des **interactions** dont les suivantes:

- des électrons **secondaires**,
- des électrons **rétrodiffusés**,
- des électrons **auger**
- des **rayons X**...

Ces interactions sont amplifiées et collectées par un détecteur adéquat pour être ensuite converties en un **signal électrique**. Ce processus est réalisé en **chaque point de l'échantillon** par un **balayage** du microscope, a fin de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief.

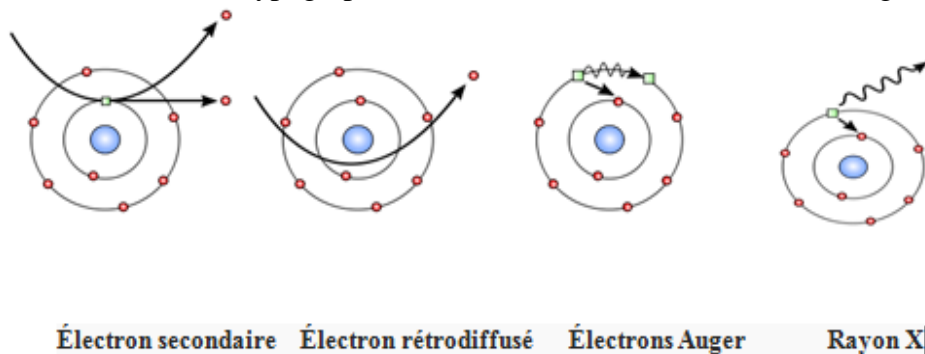


Figure 6 : Interaction entre la matière et les électrons

c. Préparation des échantillons.

La qualité des images obtenues en microscopie électronique à balayage dépend de la qualité de l'échantillon analysé. Celui-ci doit être absolument propre, plat, de dimensions de l'ordre de 1 à 2 centimètres et doit conduire l'électricité afin de pouvoir évacuer les électrons.

Les échantillons métalliques nécessitent peu de préparation à l'exception du nettoyage et du montage.

Par nature, les échantillons biologiques contiennent de l'eau et sont plus ou moins mous. Ils doivent être déshydratés puis subir un traitement pour devenir conducteur (fixation des tissus, nettoyage et métallisation).

La déshydratation : l'échantillon passe de l'eau à l'éthanol puis au CO_2 liquide, pour qu'il soit sec.

La métallisation : on passe une couche métallique sur l'échantillon biologique pour qu'il devienne conducteur.