



HAL
open science

Principe de la microscopie électronique : optique électronique et instrumentation - Master2 IPFB - Module de microscopie électronique

Michael Trichet

► **To cite this version:**

Michael Trichet. Principe de la microscopie électronique : optique électronique et instrumentation - Master2 IPFB - Module de microscopie électronique. Master. France. 2020. hal-02870065

HAL Id: hal-02870065

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02870065>

Submitted on 17 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Principe de la microscopie électronique : optique électronique et instrumentation

Michaël Trichet

Service de Microscopie Electronique

Institut de Biologie Paris-Seine



Principe du microscope électronique :

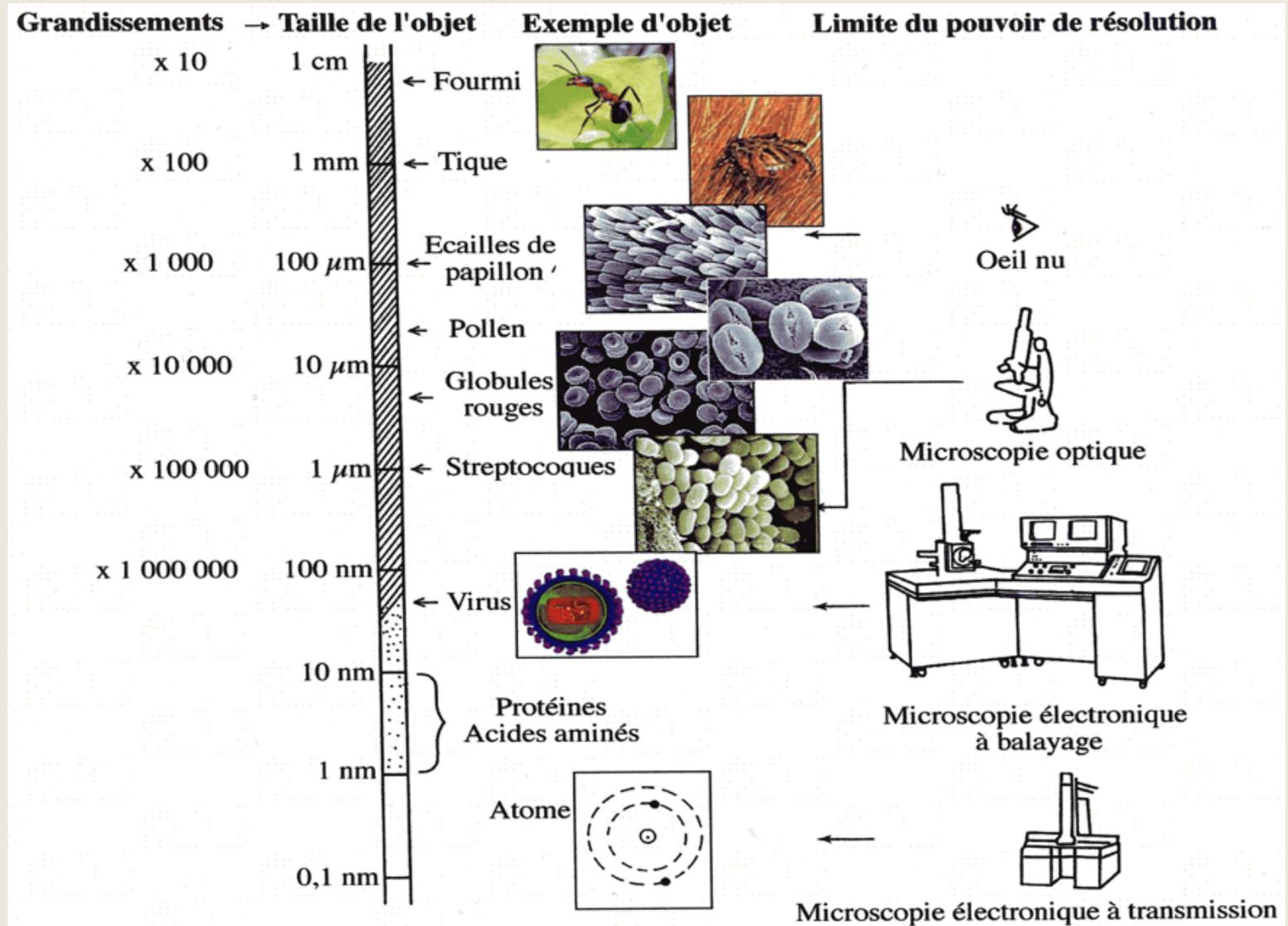
- 1) Pourquoi la microscopie électronique ?
- 2) L'électron : histoire, généralités
- 3) Le microscope électronique : sources, lentilles, optique et aberrations
- 4) Interactions électrons/matière et imagerie
- 5) Formation de l'image en MET
- 6) Formation de l'image en MEB

Imagerie avancée :

- 7) Imagerie chimique
- 8) Tomographie électronique
- 9) TP imagerie STEM-in-SEM et array tomography

1) Pourquoi la Microscopie électronique ?

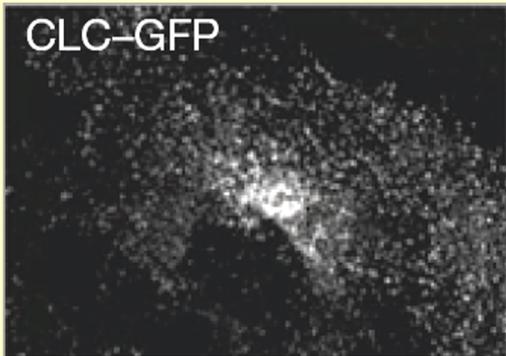
Grandissement - Résolution - Ultrastructure



1) Pourquoi la Microscopie électronique ? - L'ultrastructure

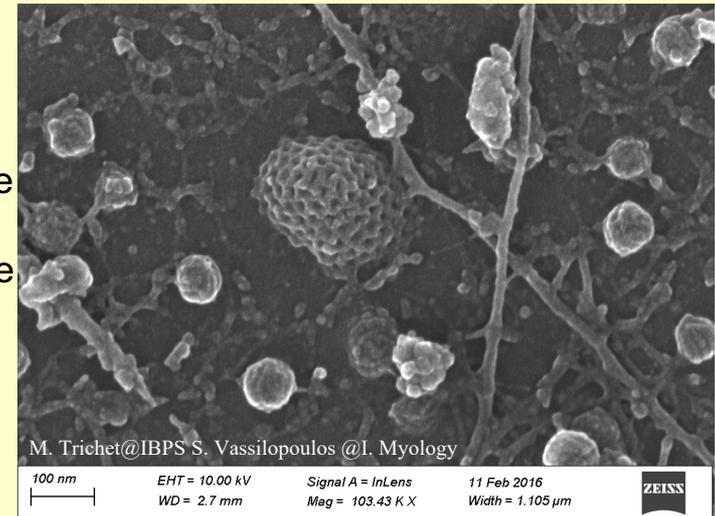
Biologie cellulaire

Microscopie champ large

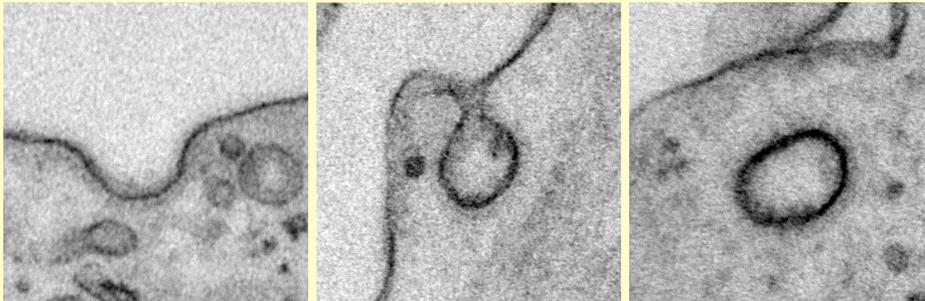


MEB

Purification de la face interne de la membrane plasmique

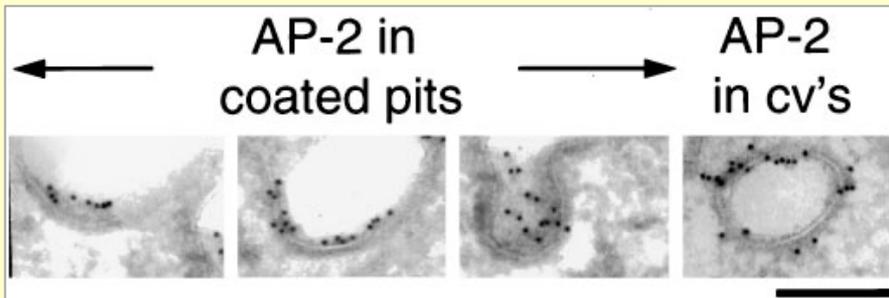


MET : cytochimie ultrastructurale



M. Trichet@IBPS

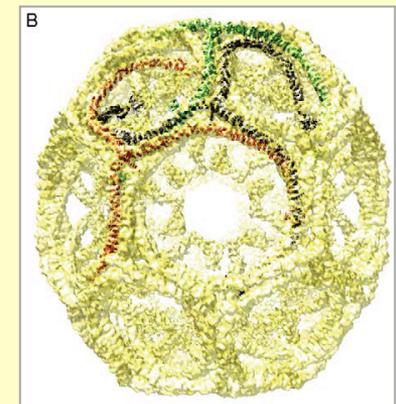
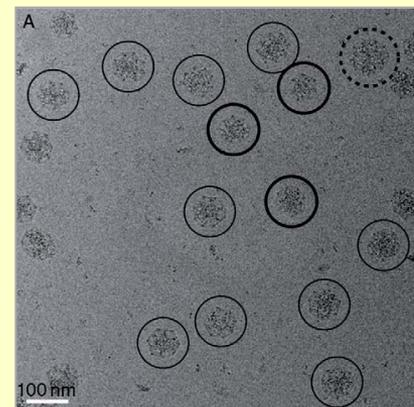
MET : immunocytochimie



Tebar et coll., 1996

Biologie structurale

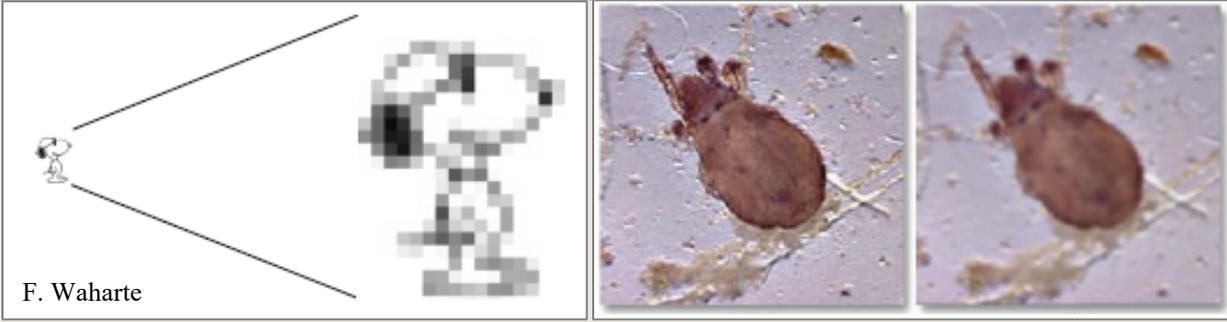
Cryo-microscopie électronique (Nobel 2018)
Cages purifiées



Cheng & Walz, 2007

1) Pourquoi la Microscopie électronique ? – Grandissement et résolution

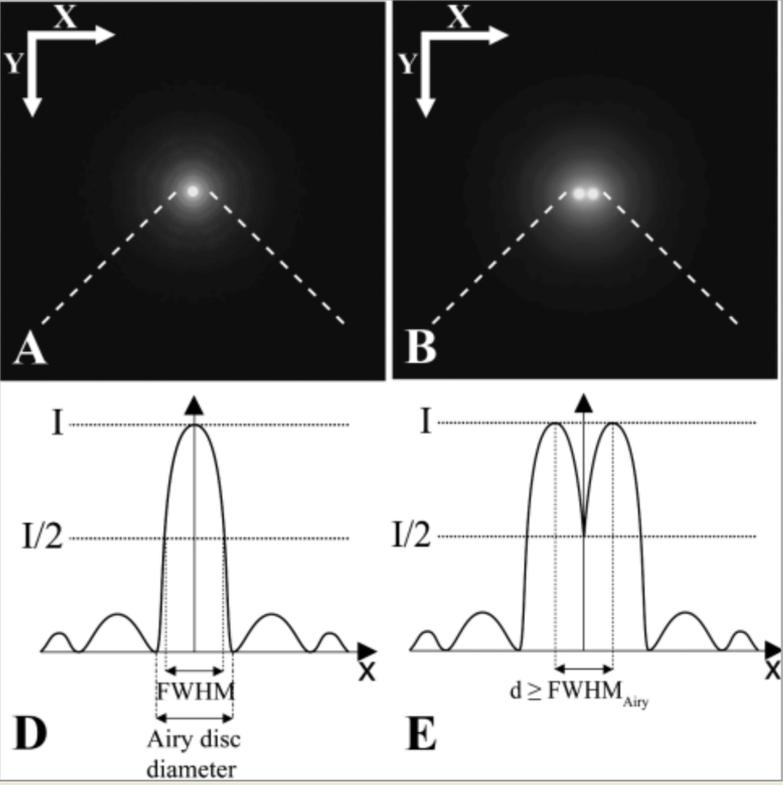
Grandissement : agrandir ne suffit pas !



F. Waharte

Résolution :

Plus petite distance entre 2 points qui permet de les séparer



Critère de Rayleigh :

Deux objets sont résolus si leurs courbes d'intensités à I/2 sont distinctes

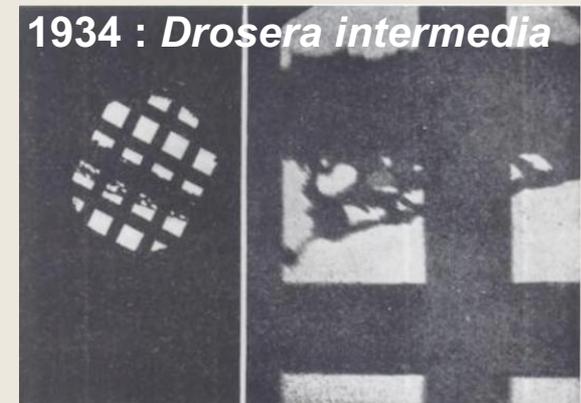
$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

2) L'électron et les microscopes électroniques : histoire

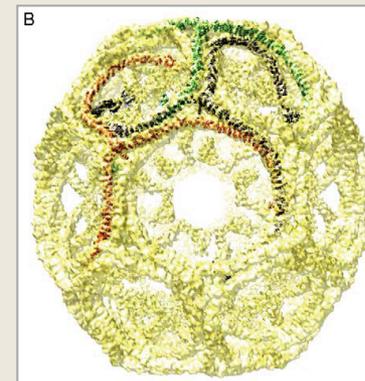
- **1897** - J. J. Thomson : découverte de l'électron
- **1924** - Louis de Broglie : nature ondulatoire des électrons
- **1926** - Hans Busch : effets des champs électrostatiques ou électromagnétiques sur les électrons (lentilles)
- **1931** - Ernst Ruska & Max Knoll : premier **MET**
- **1934** - L. Marton : première micrographie d'un matériel biologique (feuille de *Drosera*)
- **1934** - Driest & Muller : résolution microscopie photonique dépassée
- **1938** - M. von Ardenne : premier **MEB**
- **1939** - Siemens : premier MET commercial
- **1965** - Cambridge Instrument : premier MEB commercial
- **1986** - Ruska : Prix Nobel de Physique pour ses travaux sur la microscopie électronique
- **1982** - J. Dubochet : cryo-microscopie électronique
- **2003** - corrections d'aberrations : résolution < Ångström
- **2018** - Prix Nobel de Chimie : J. Dubochet, J. Frank, R. Henderson



<http://www.microscopy.ethz.ch/history.htm>



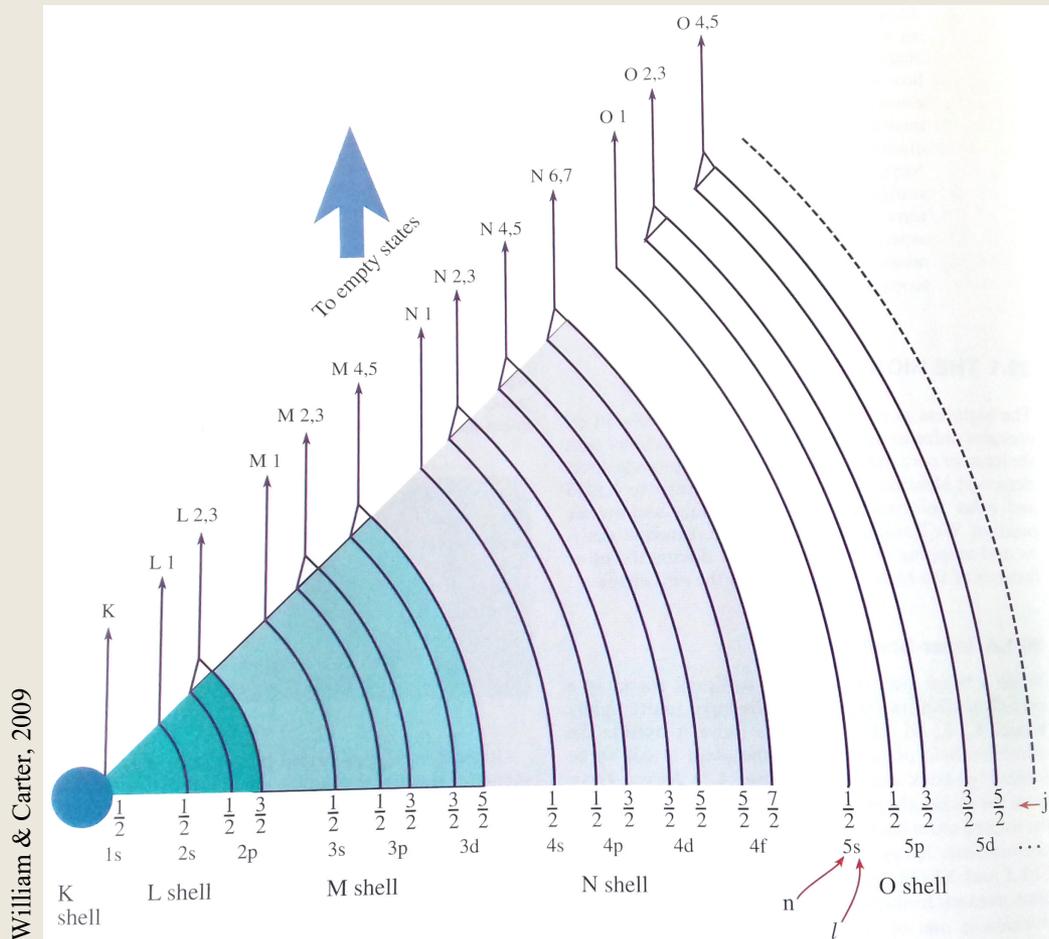
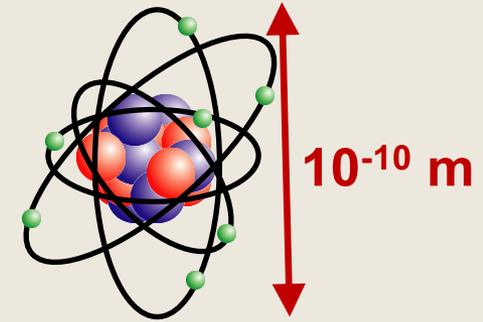
Bozzola & Ruszel, 1999



Cheng & Walz, 2007

2) L'électron : généralités

- Particules électriquement chargées : **charge négative**
 - $m_0 = 9,1 \times 10^{-31}$ kg ($\sim 1/2000$ fois la masse d'un proton)
 - $q = 1,6 \times 10^{-19}$ C (charge électrique élémentaire)
- Forment le cortège électronique des atomes
- Sont répartis en «couches» autour du noyau (K, L, M, ...)
- Sont répartis en «sous-couches» sur chaque couche (s, p, d, f, ...)



Cortège électronique des atomes
gouverne les contacts inter-
atomiques et donc tous les
phénomènes perceptibles de notre
vie quotidienne

2) L'électron : généralités

Faciles à produire



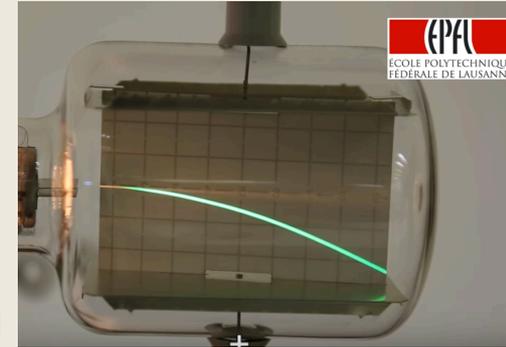
Transportables



Stockables



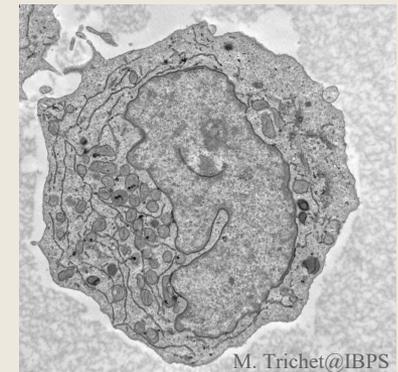
Contrôlables



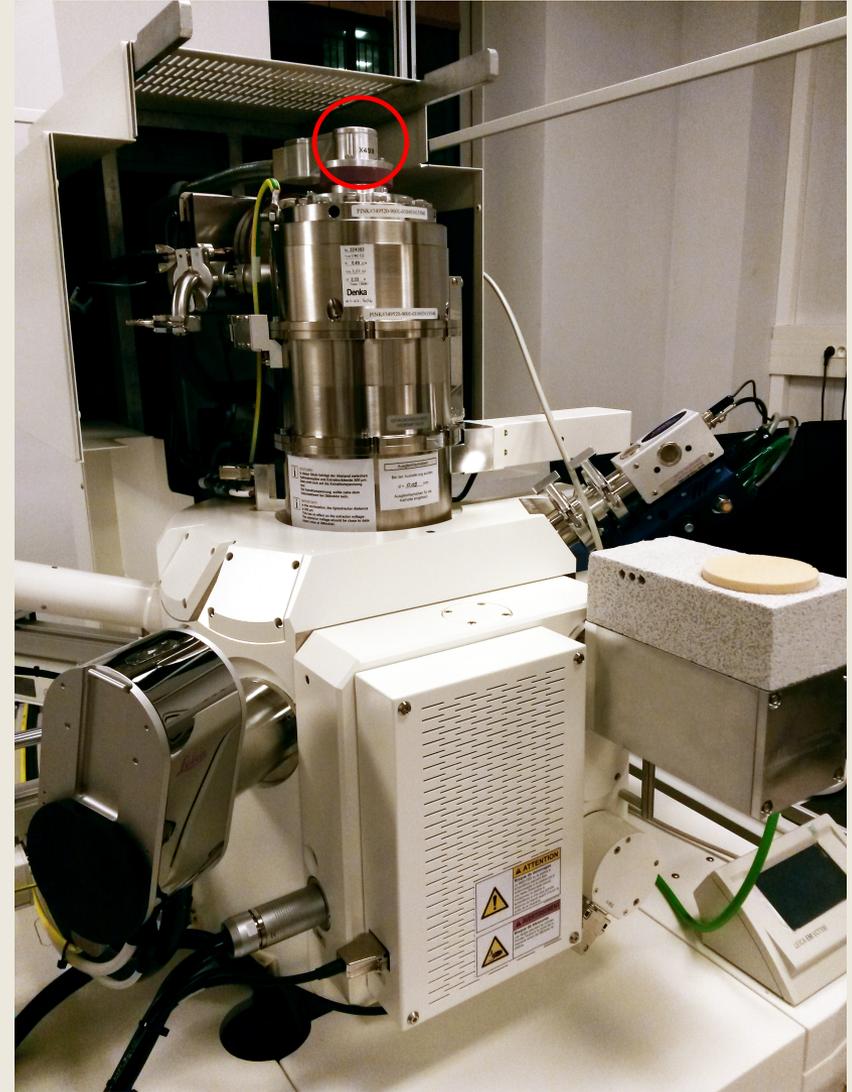
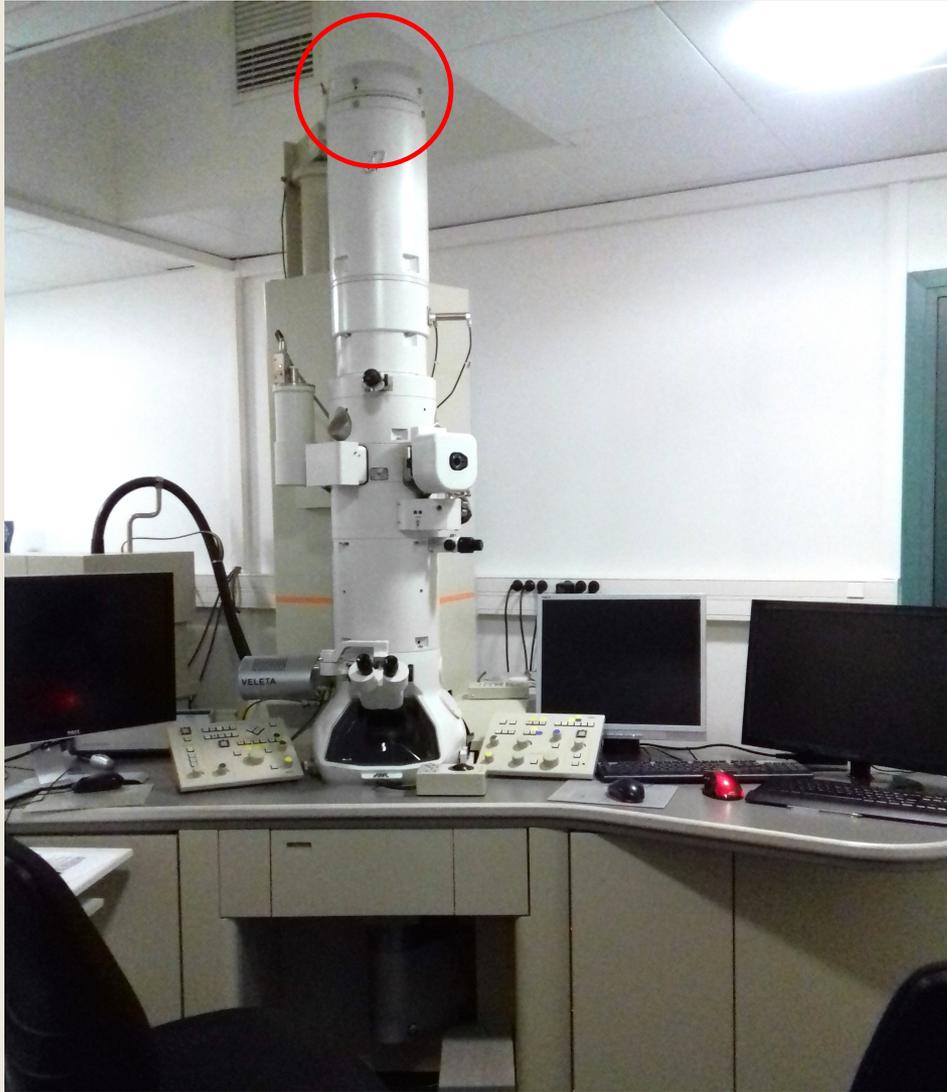
https://www.youtube.com/watch?v=x_TxCkVwPxA

- Champ électrique (accélération ou déviation rectiligne)
- Champ magnétique (déviation circulaire)

Applications nombreuses

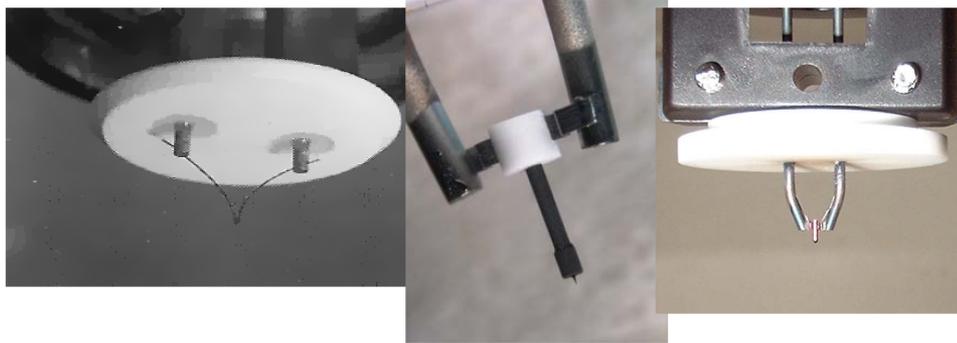


3) Le microscope électronique : sources d'électrons

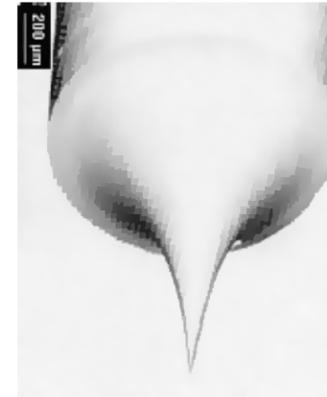


3) Le microscope électronique : sources d'électrons

Thermionic emission
(tungsten, LaB6, Schottky emitter)



Cold field emission
(quantum-mechanical tunneling)



	Tungsten	Thermionic LaB6	Schottky	Cold field emission
Material	W	LaB6	ZrO/W	W
Heating temp. (K)	2700	1800	1800	300
Normalized brightness	[Yellow wedge indicating increasing brightness from Tungsten to Cold field emission]			
Required vacuum (Pa)	high	[Grey wedge indicating increasing vacuum requirement from LaB6 to Schottky]		Ultra high
ΔE (eV)	[Orange wedge indicating chromatic aberration, with the text 'Chromatic aberration!' in the center]			
Resolution	[Red wedge indicating increasing resolution from Tungsten to Cold field emission]			

3) Le microscope électronique : source d'e⁻ et résolution

MEB source LaB₆ (résolution ≈ 8-10 nm)

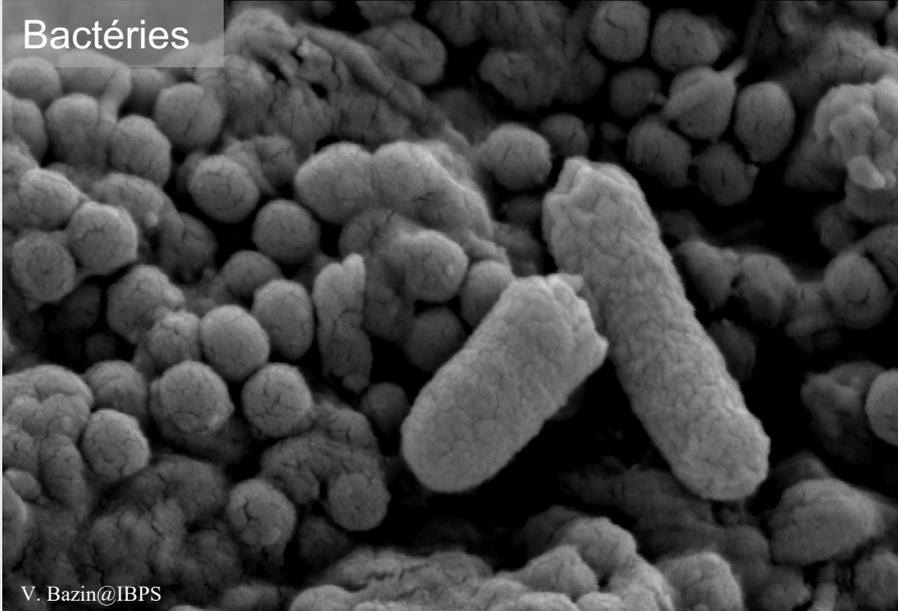


MEB source Schottky (résolution 1nm)



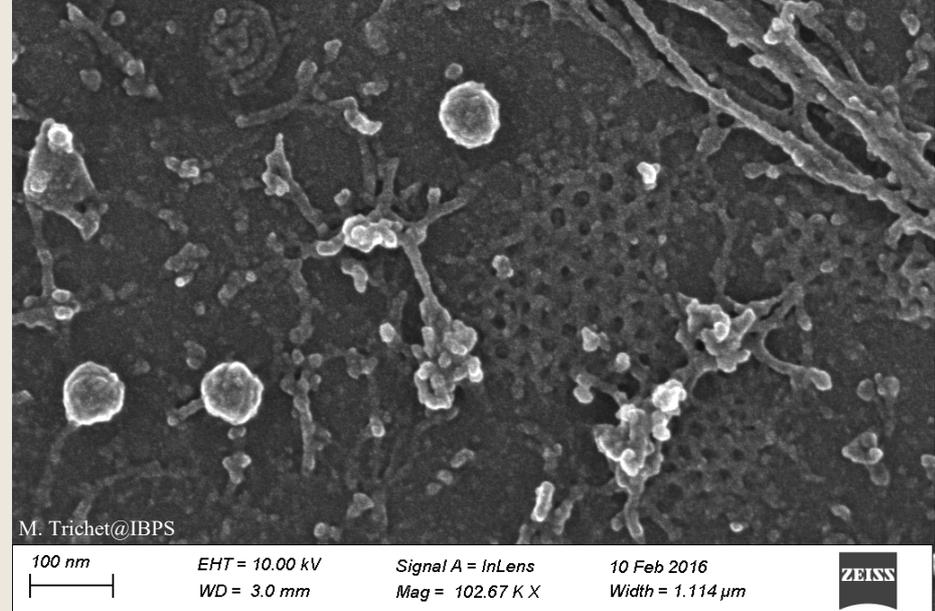
20.2kX 15kV WD:8mm S:00000 P:00001
2um

Bactéries



V. Bazin@IBPS

Clathrine, cavéoles et cytosquelette



M. Trichet@IBPS

100 nm

EHT = 10.00 kV

Signal A = InLens

10 Feb 2016

WD = 3.0 mm

Mag = 102.67 K X

Width = 1.114 μm



3) Le microscope électronique : accélérer

Longueur d'onde e⁻ dépend de la tension d'accélération (HT)

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

$$\lambda = \frac{h}{\left[2m_0eV\left(1 + \frac{eV}{2m_0c^2}\right)\right]^{1/2}}$$

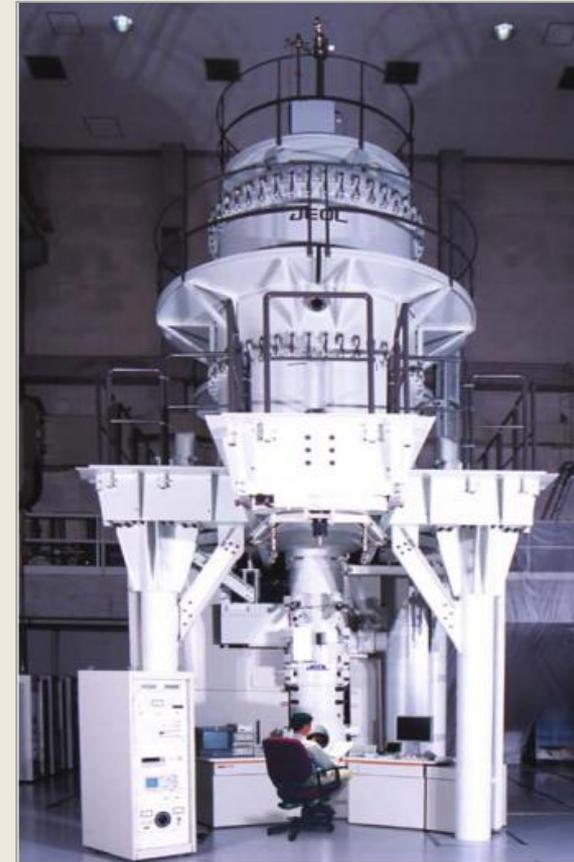
Charge (e)	(-) 1.602 × 10 ⁻¹⁹ C
1 eV	1.602 × 10 ⁻¹⁹ J
Rest mass (m ₀)	9.109 × 10 ⁻³¹ kg
Rest energy (m ₀ c ²)	511 keV
Kinetic energy (charge × voltage)	1.602 × 10 ⁻¹⁹ N m (for 1 volt potential) = J
Planck's constant (h)	6.626 × 10 ⁻³⁴ N m s
1 A	1 C/s
Speed of light in vacuum (c)	2.998 × 10 ⁸ m/s

Accelerating voltage (kV)	Relativistic wavelength (nm)
100	0.00370
120	0.00335
200	0.00251
300	0.00197
400	0.00164
1000	0.00087

William & Carter, 2009

Microscopes Electroniques en Transmission

1,25 MV



200 kV

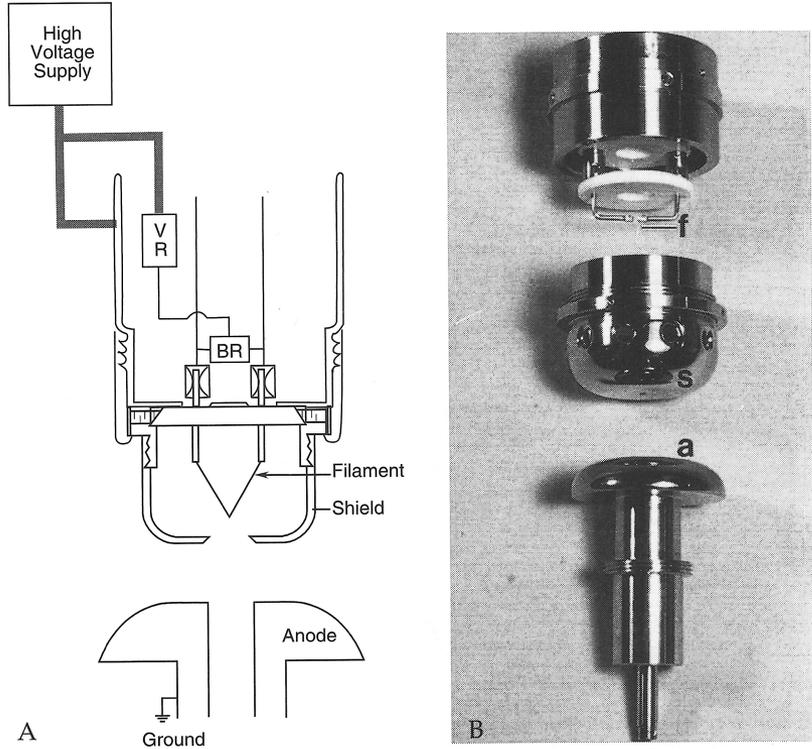


IBPS, Paris

KBSI, Corée

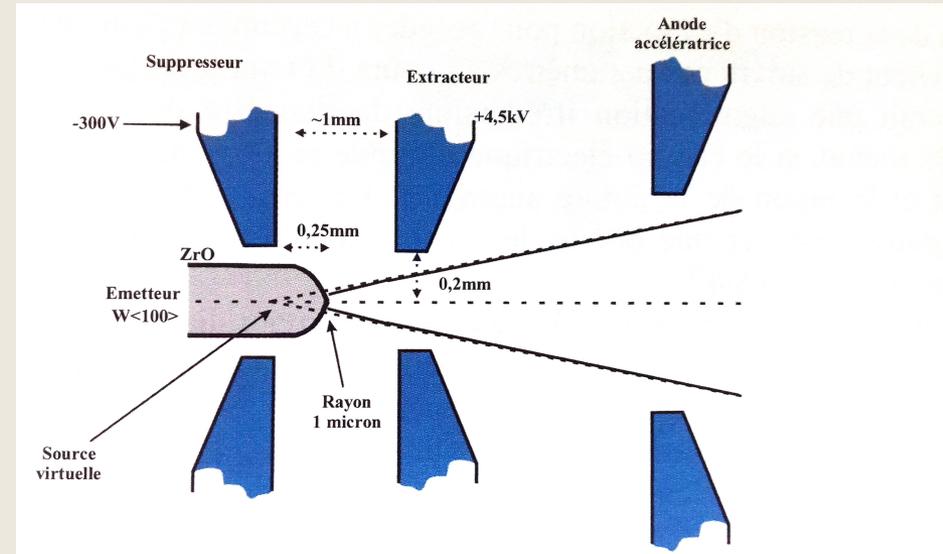
3) Le microscope électronique : accélérer

Thermoionique : filament et Wehnelt



Bozzola & Russel, 1999

Field-emission gun : filament et extracteur

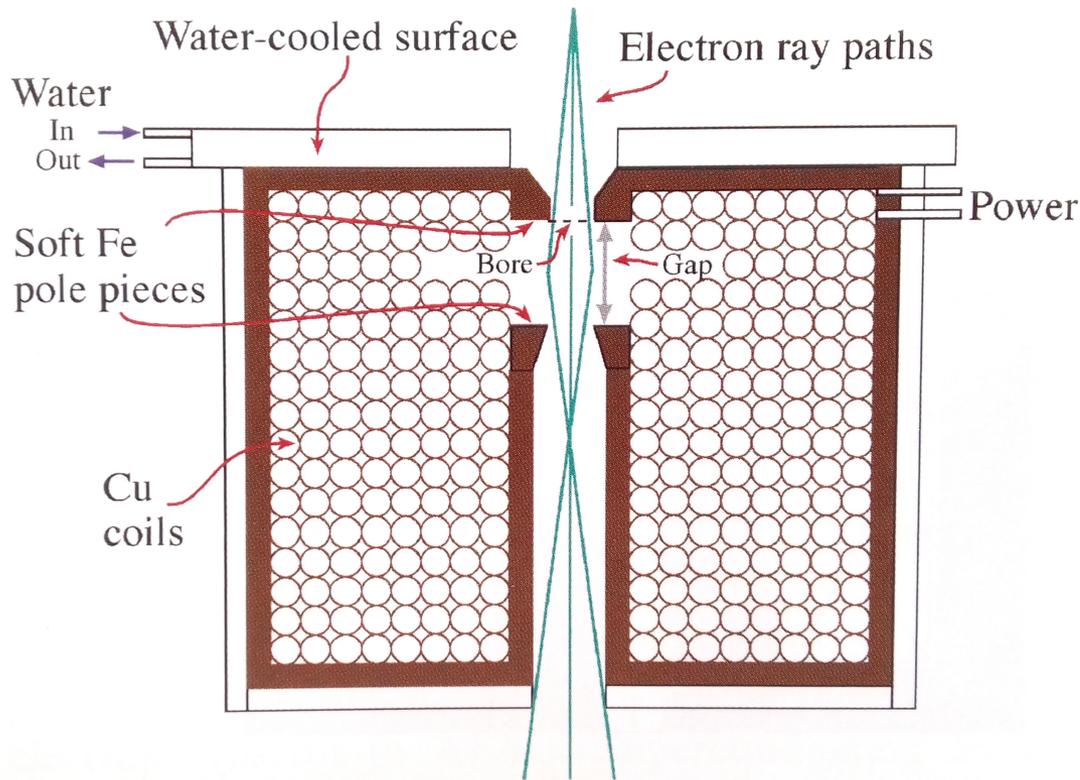


F. Brisset & GN-MEBA, 2008

3) Le microscope électronique : contrôler la trajectoire

Lentilles électromagnétiques :

- Champ magnétique dévie la trajectoire des électrons
- Bobine dans laquelle passe un courant électrique
- Intensité champ magnétique fonction intensité courant électrique
- Changement courant de lentille : modification distance focale

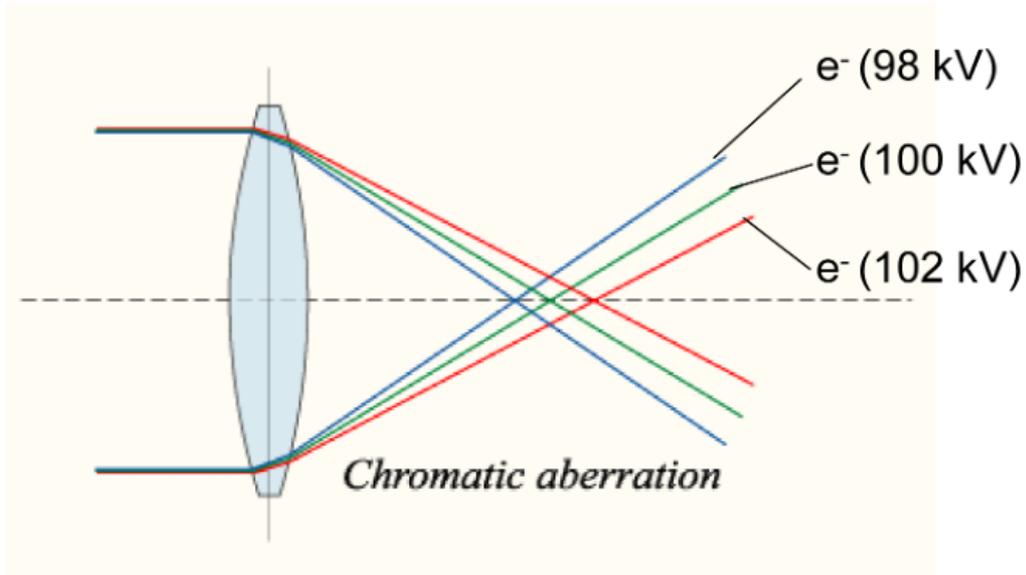


Aucun mouvements de lentilles pour changer le grandissement ou le focus !

3) Le microscope électronique : aberrations

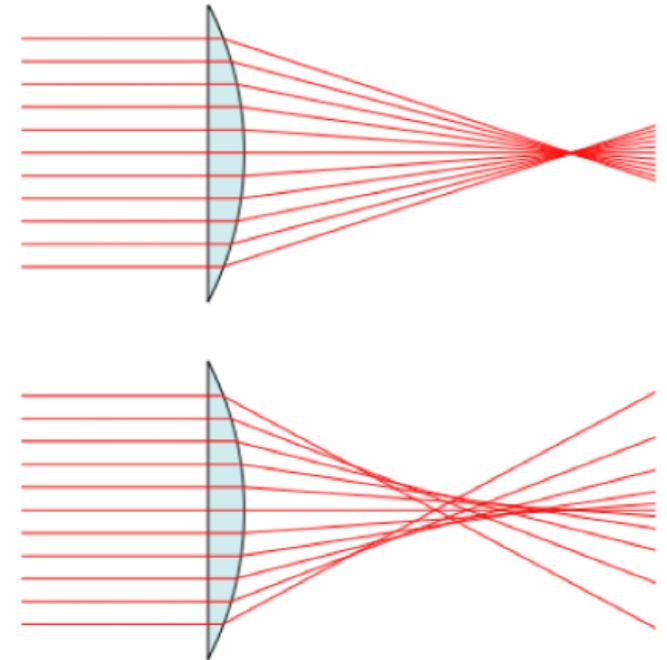
Chromatic aberration

Due to energy difference of electrons (wavelength)



Focalisation sur plans différents en fonction de l'énergie des électrons (imperfections des sources d' e^-)

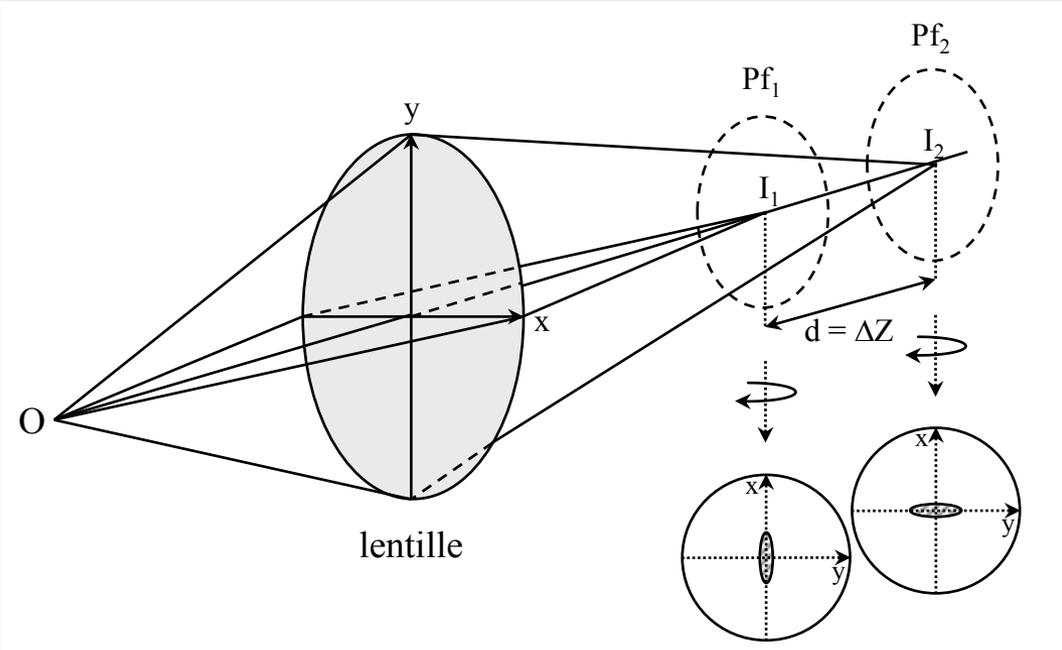
Spherical aberrations



D'après Andres Kaech

Imperfections des lentilles : déviation inhomogène selon l'éloignement à l'axe optique

3) Le microscope électronique : aberrations

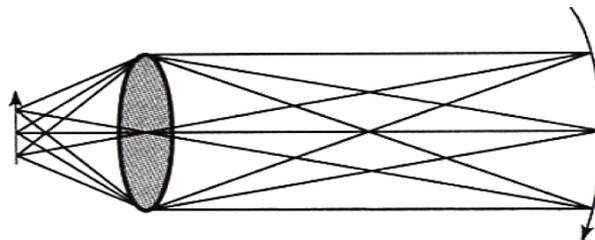


Astigmatisme

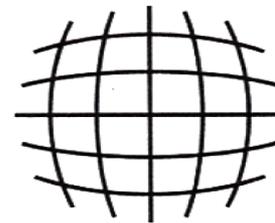
Imperfection des lentilles qui convergent plus ou moins en fonction des axes X et Y.

Corrigeable à l'acquisition (stigmatiseurs).

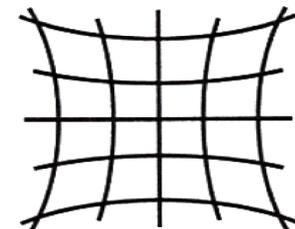
Curvature and distortion of field



Field curvature

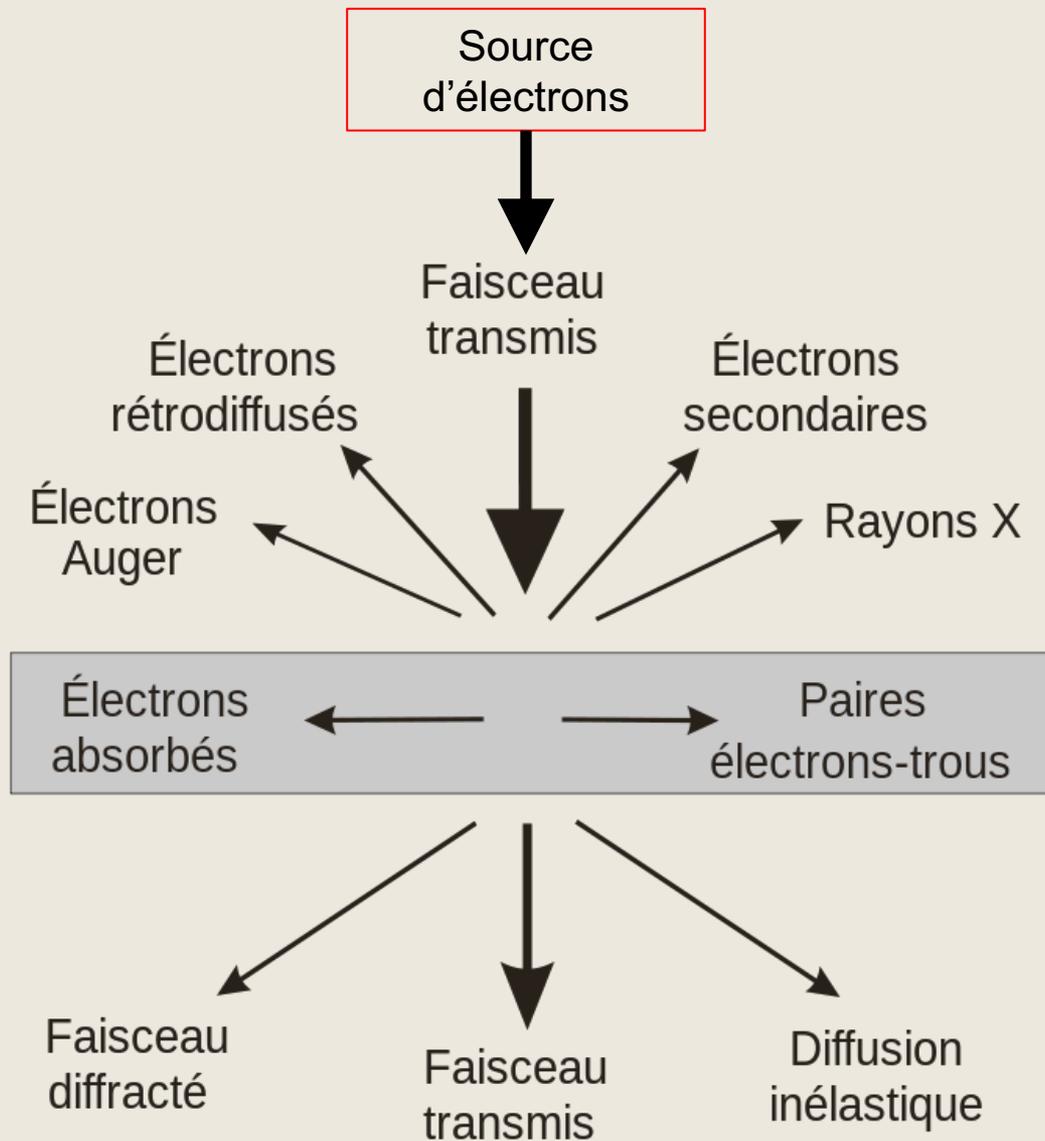


Barrel distortion



Pincushion distortion

4) interactions électrons-matière et imageries



4) Propriétés de l'électron : interactions avec l'air

Energy (MeV)	Range of Alpha		Range of Electron	
	Air 0,001204 g.cm ⁻³	Water 1 g.cm ⁻³	Air 0,001204 g.cm ⁻³	Water 1 g.cm ⁻³
5 keV	93,4 μm	989 Å	0,4 mm	450 nm
20 keV	313 μm	3775 Å	8 mm	8,5 μm
50 keV	660 μm	8150 Å	4 cm	43 μm
100 keV	1,1 mm	1,3 μm	13,5 cm	0,14 mm
500 keV	3,1 mm	3,6 μm	1,6 m	0,2 cm
1	5,2 mm	5,9 μm	4,1 m	0,4 cm
2	1 cm	11,4 μm	9 m	1 cm
3	1,7 cm	18,4 μm	13,7 m	1,5 cm
5	3,5 cm	37,3 μm	23 m	2,5 cm
7	5,9 cm	62 μm	31,2 m	3,5 cm
10	10,4 cm	110 μm	43 m ^a	5 cm
15	20,5 cm	215 μm	61,5 m	7,2 cm
20	33,6 cm	353 μm	78,4 m	9,3 cm
50	1,7 m	1,8 mm	161 m	19,8 cm
100	5,83 m	6,3 mm	263 m ^b	32,5 cm

MEB

MET

Radioéléments émetteurs β⁻

- ³H : 5,7 keV

- ¹⁴C : 156 keV

- ⁹⁰Sr : 546 keV

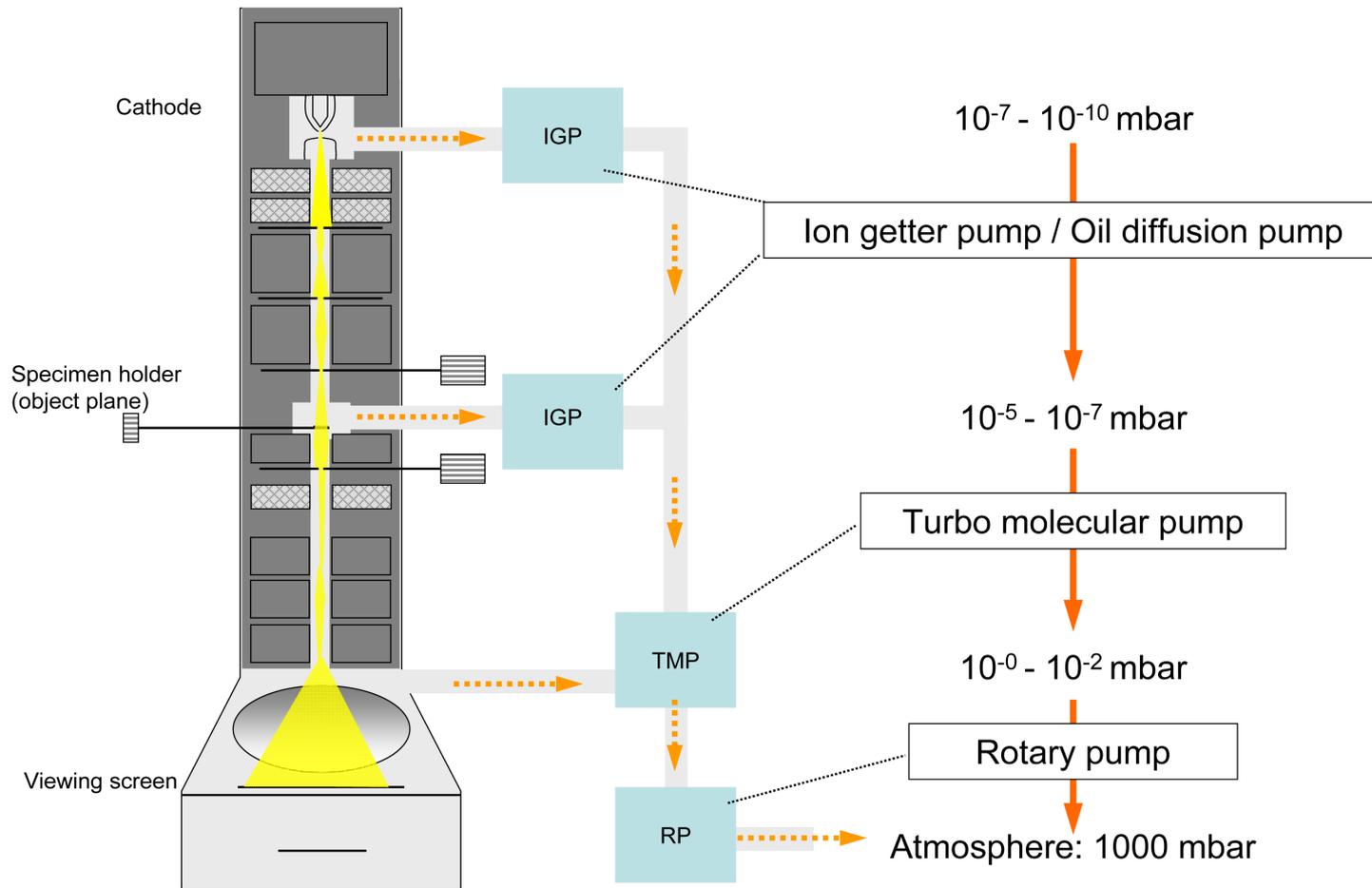
- ³²P : 1,71 MeV

En ME la pénétration des e⁻ dans la matière dépend de la tension d'accélération

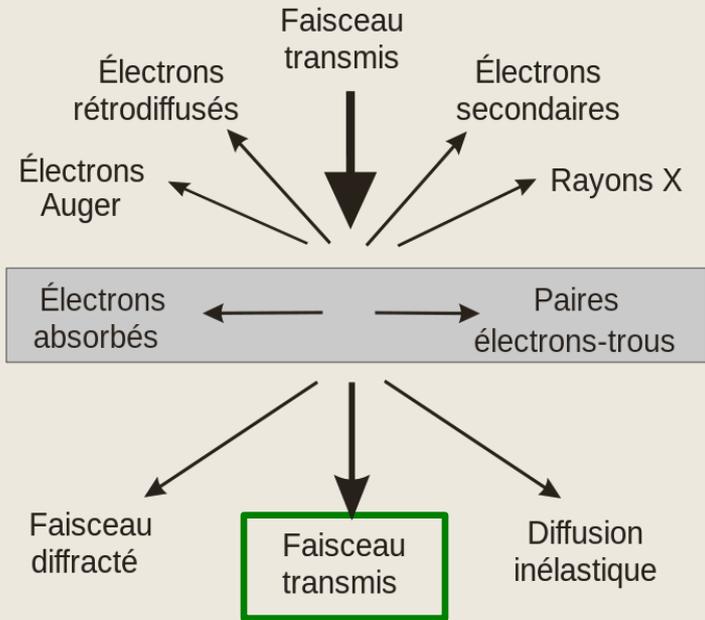
4) Propriétés de l'électron : interactions avec l'air

Contrainte pour les microscopes électroniques

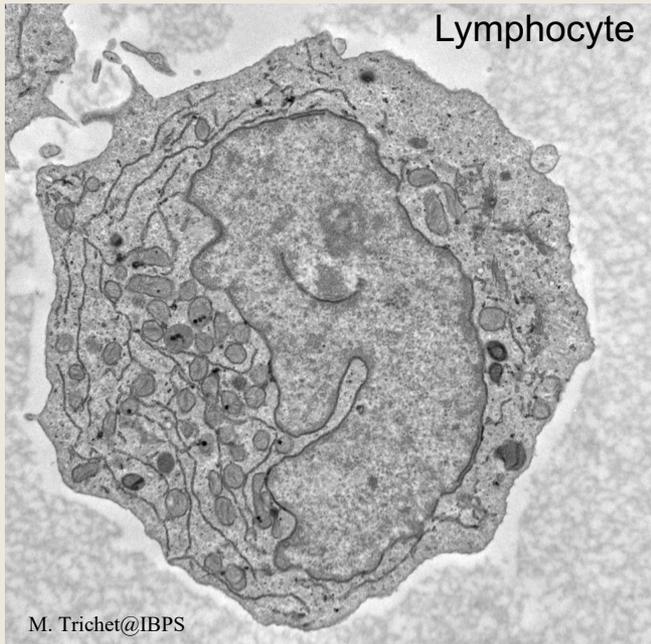
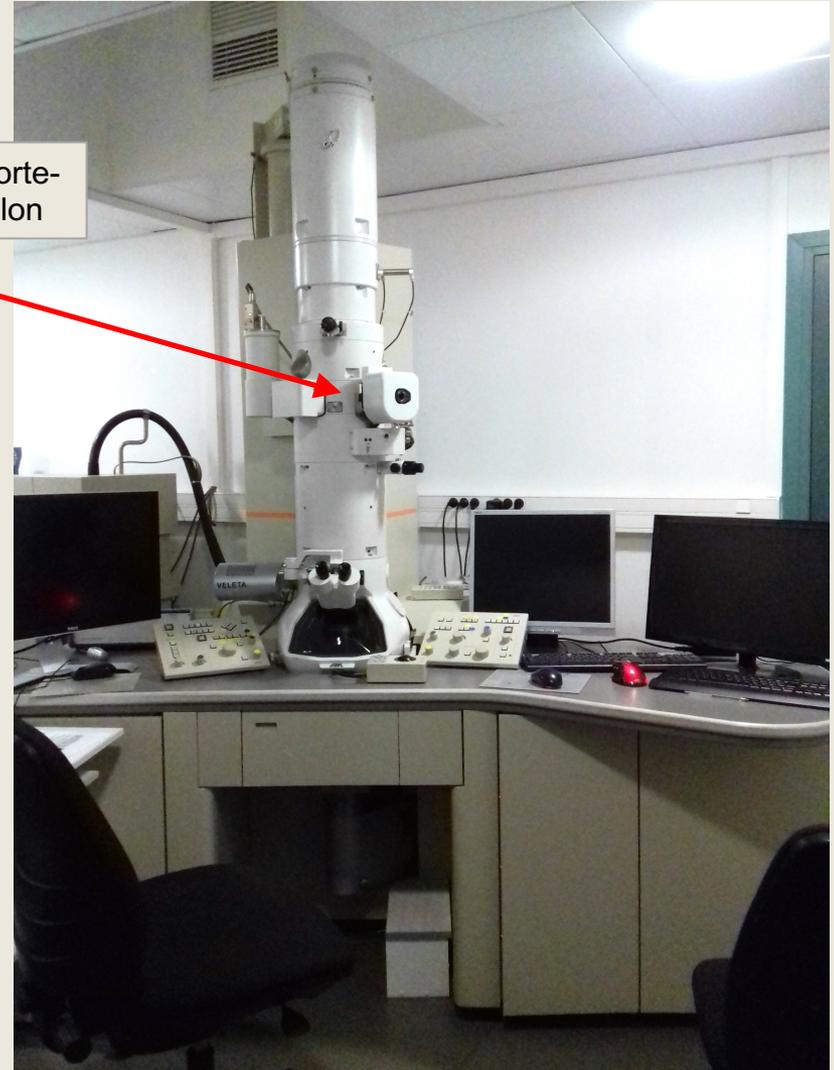
Exemple: Transmission electron microscope



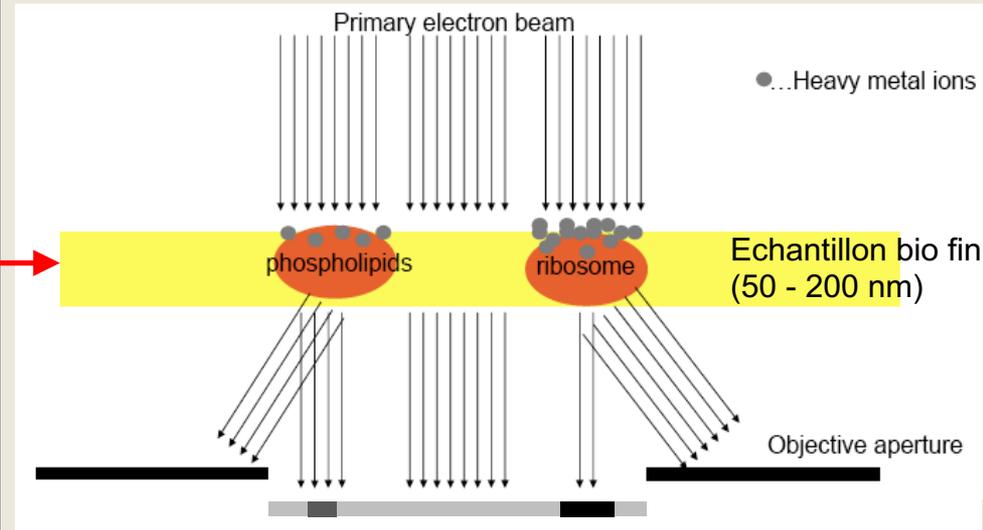
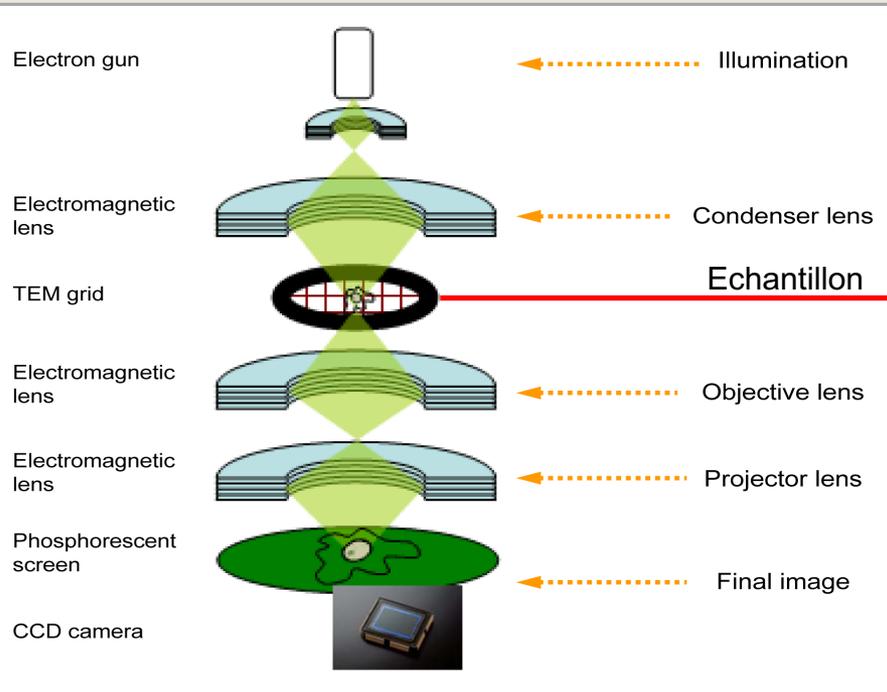
5) Propriétés de l'électron : formation de l'image en MET



Canne porte-échantillon



5) Propriétés de l'électron : formation de l'image en MET



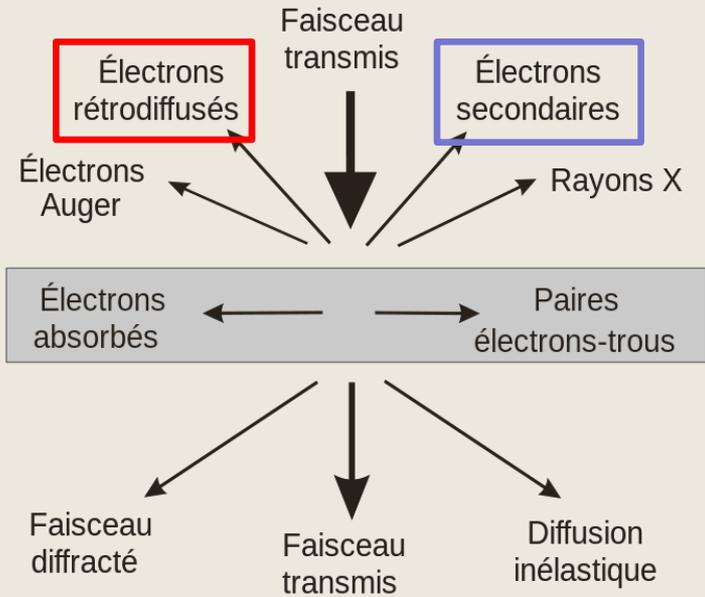
Principe :

- Faisceau d'e⁻ **traverse** l'échantillon (épaisseur 50 - 200 nm), grandissement optique par jeux de lentilles
- Tension d'accélération : 60 - 300 kV
- Résolution augmente avec la HT $\approx 0,1$ nm, limitée à ≈ 1 nm en biologie par les traitements pour préparer les échantillons

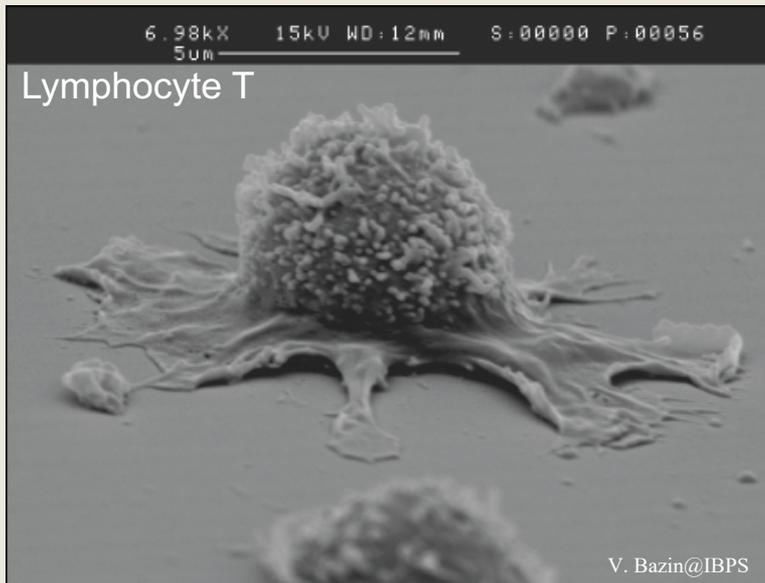
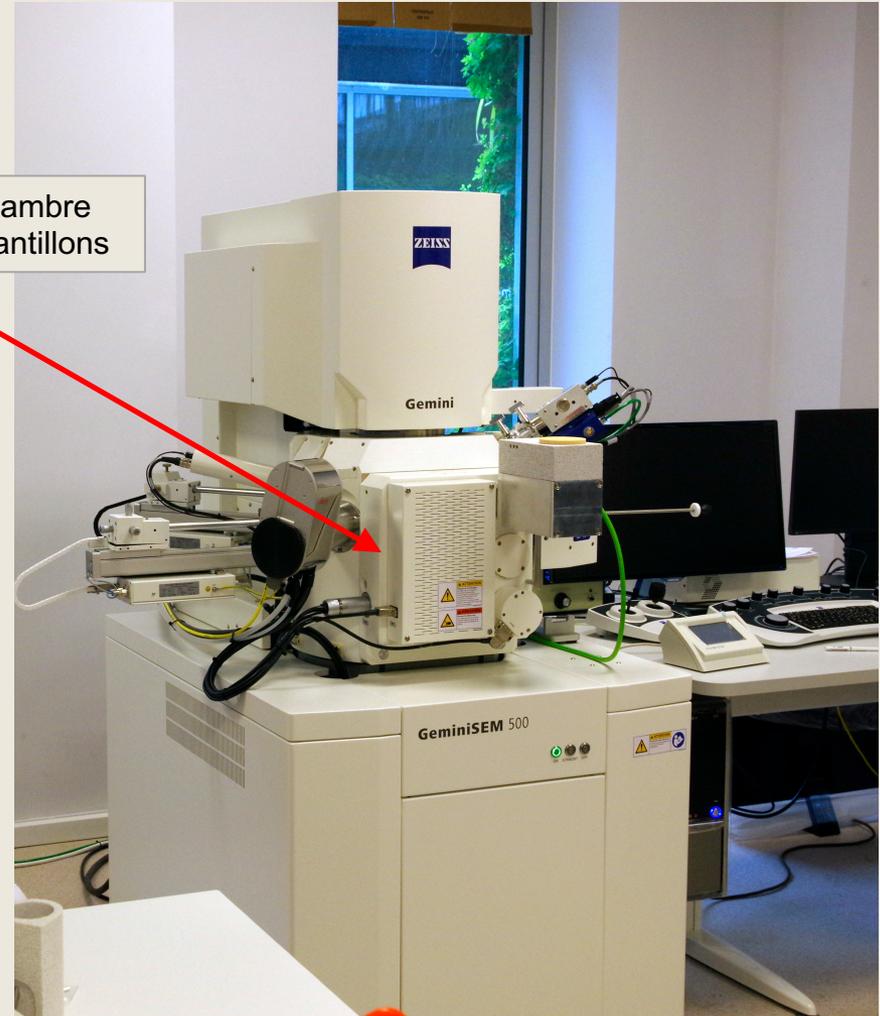
Contraste dépend :

- Diamètre du diaphragme objectif
- Absorption et déviation e⁻ est fonction de la HT, épaisseur, numéro atomique (Z)
=> augmenter le contraste en biologie : diminuer la HT, fermer le diaphragme objectif et ajout de métaux lourds (Os, U, Pb)

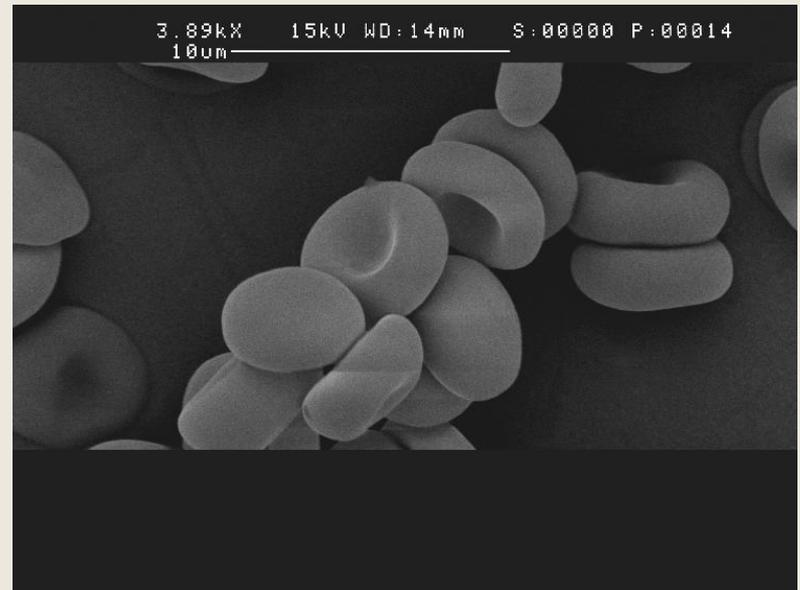
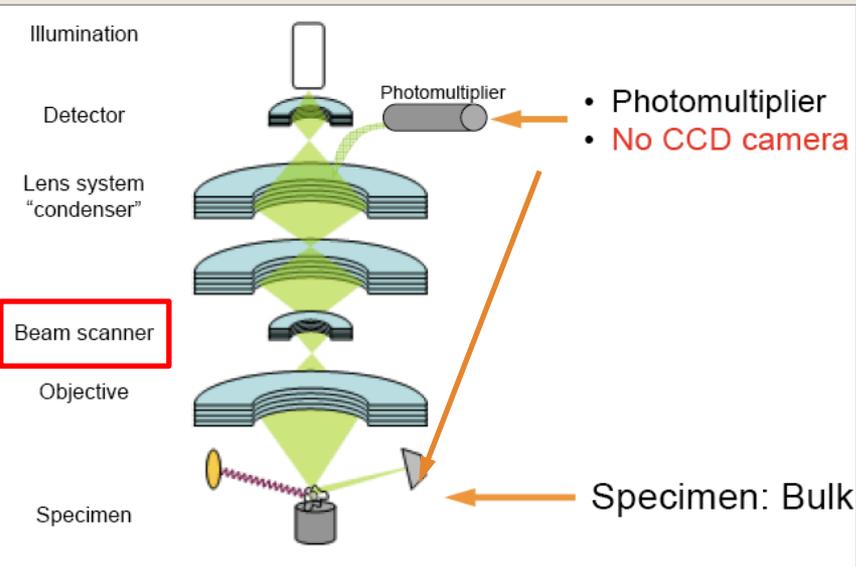
6) Propriétés de l'électron : formation de l'image en MEB



Chambre échantillons



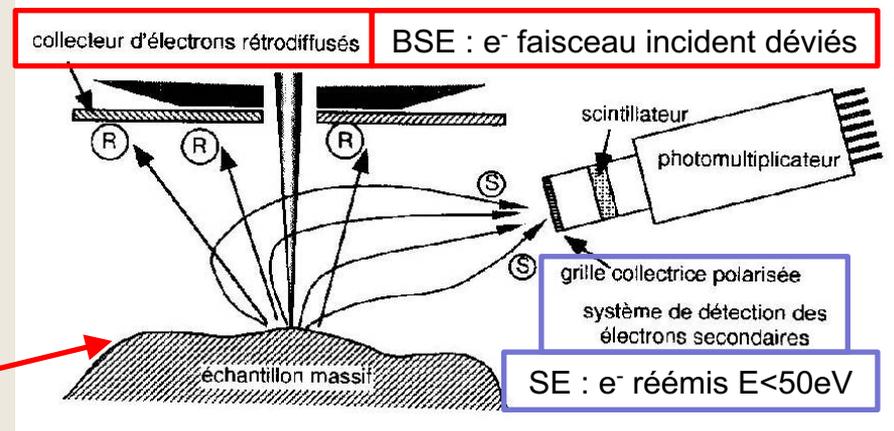
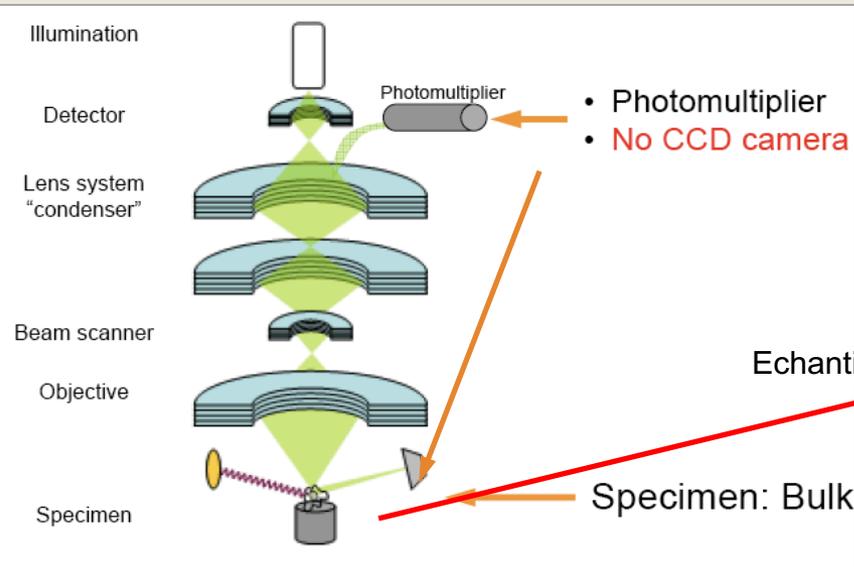
6) Propriétés de l'électron : formation de l'image en MEB



Principe :

- Faisceau fin d'e⁻ **balaye** (sonde) la surface de l'échantillon, image formée point par point
- Collection des e⁻ de surface (SE : Secondary Electrons, $E < 50\text{eV}$) et BSE (Backscattered)
- Tension d'accélération : 0,1 - 30 kV
- Résolution $\approx 1\text{ nm}$, dépend de la HT

6) Propriétés de l'électron : formation de l'image en MEB



C. Colliex

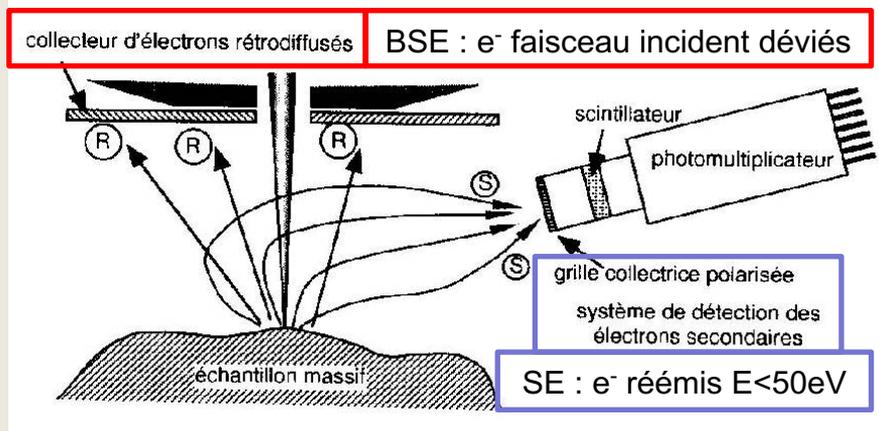
Principe :

- Faisceau fin d' e^- balaye (sonde) la surface de l'échantillon, image formée point par point
- **Collection des e^- de surface (SE : Secondary Electrons, $E < 50\text{eV}$) et BSE (Backscattered)**
- Tension d'accélération : 0,1 - 30 kV
- Résolution $\approx 1 \text{ nm}$, dépend de la HT

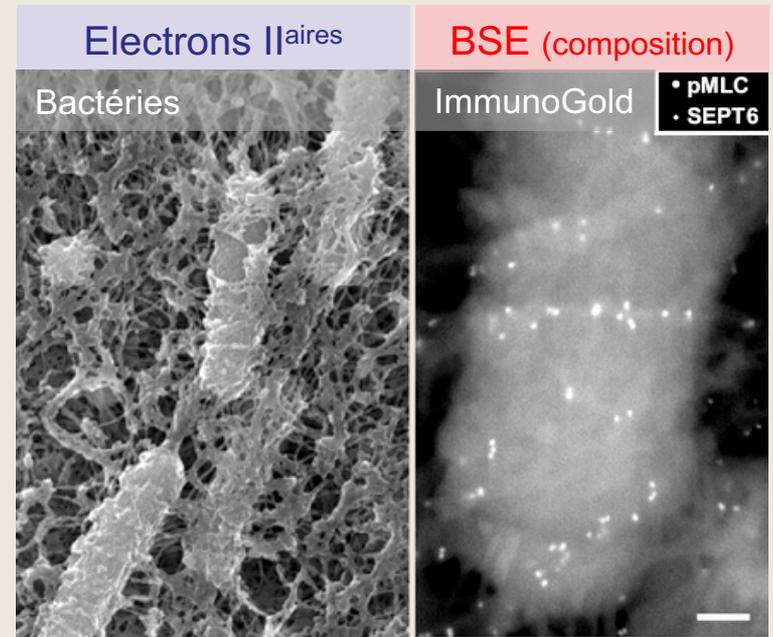
Contraste dépend :

- Topographie de l'échantillon
- Localisation des détecteurs et de l'illumination
- **Emission SE** et **déviations BSE** dépend de la HT, numéro atomique (Z), stratification :
 - ⇒ SE : topologie
 - ⇒ BSE : contraste chimique

6) Propriétés de l'électron : formation de l'image en MEB



C. Colliex



S. Mostowy, 2010

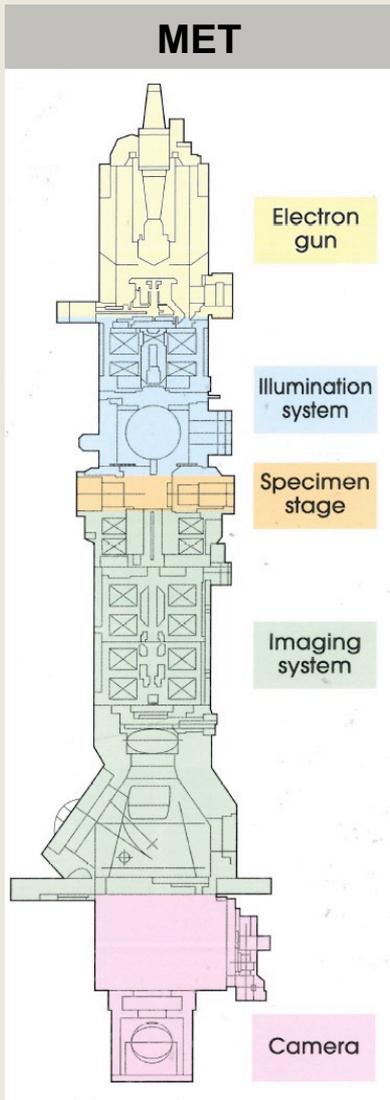
Principe :

- Faisceau fin d'e⁻ balaye (sonde) la surface de l'échantillon, image formée point par point
- **Collection des e⁻ de surface (SE : Secondary Electrons, E < 50eV) et BSE (Backscattered)**
- Tension d'accélération : 0,1 - 30 kV
- Résolution ≈ 1 nm, dépend de la HT

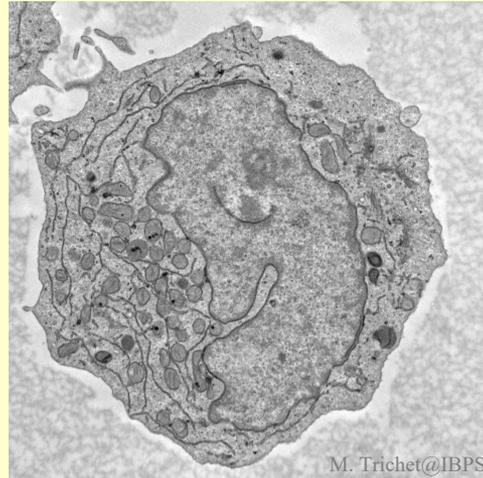
Contraste dépend :

- Topographie de l'échantillon
- Localisation des détecteurs et de l'illumination
- **Emission SE** et **déviatiion BSE** dépend de la HT, numéro atomique (Z), stratification :
 - ⇒ **SE : topologie**
 - ⇒ **BSE : contraste chimique**

6) Propriétés de l'électron : des contraintes pour observer

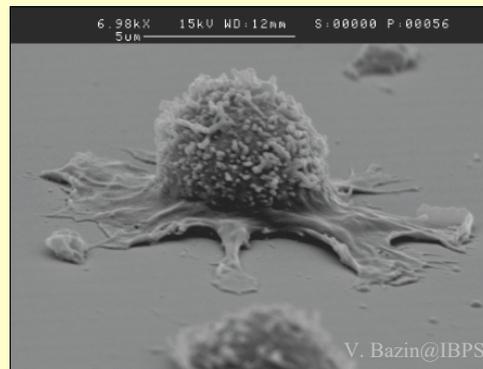


JEOL

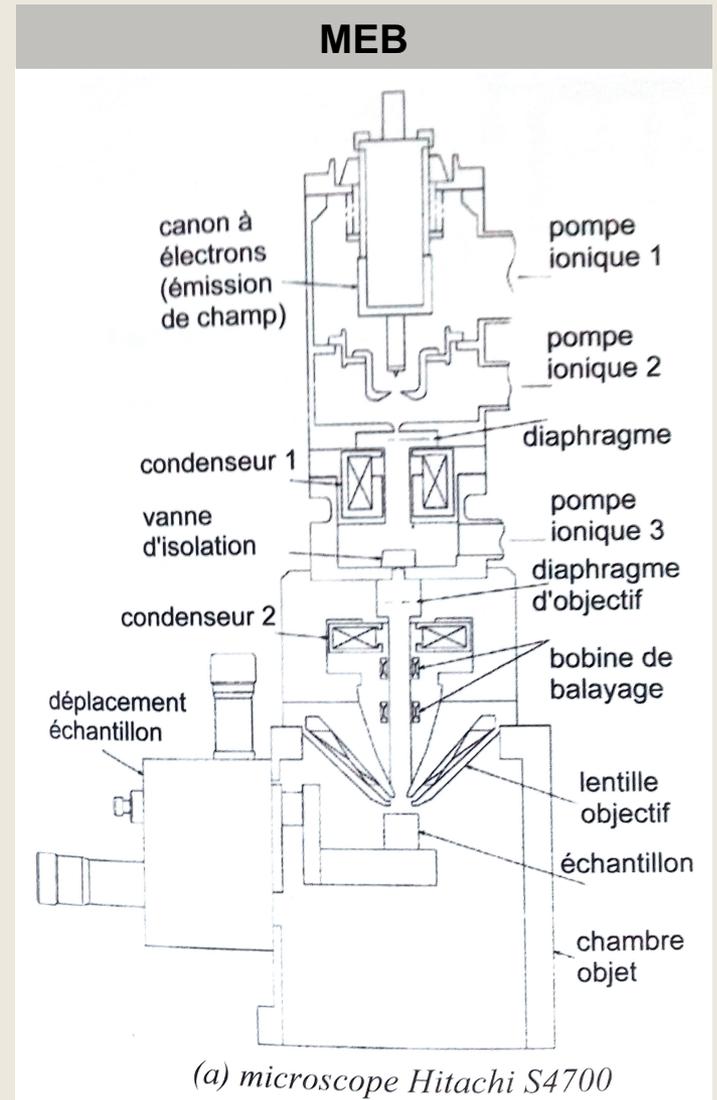


M. Trichet@IBPS

PREPARATION D'ÉCHANTILLONS



V. Bazin@IBPS



F. Brisset & GN-MEBA, 2008

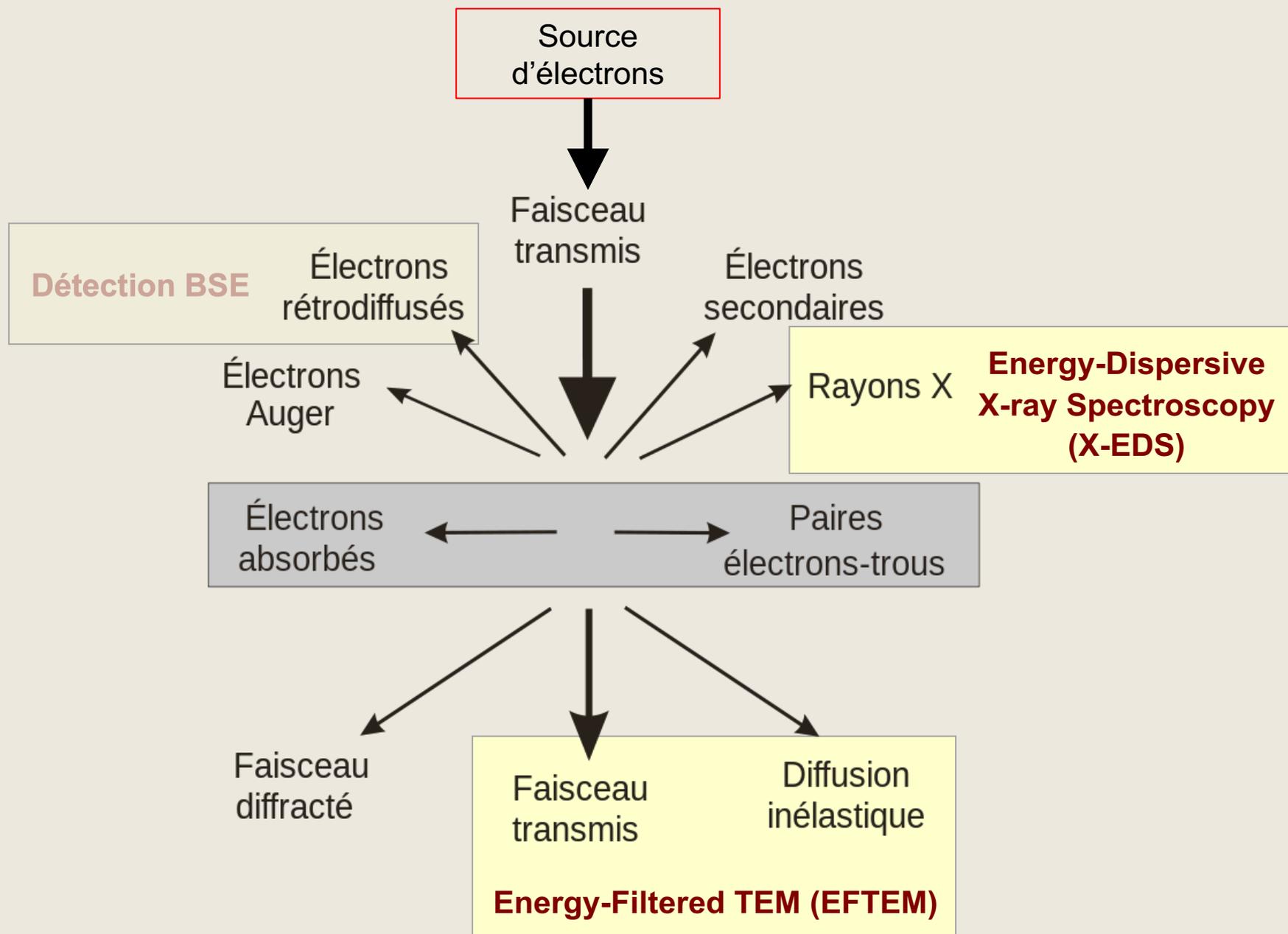
Principe du microscope électronique :

- 1) Pourquoi la microscopie électronique ?
- 2) L'électron : histoire, généralités
- 3) Le microscope électronique : sources, lentilles, optique et aberrations
- 4) Interactions électrons/matière et imagerie
- 5) Formation de l'image en MET
- 6) Formation de l'image en MEB

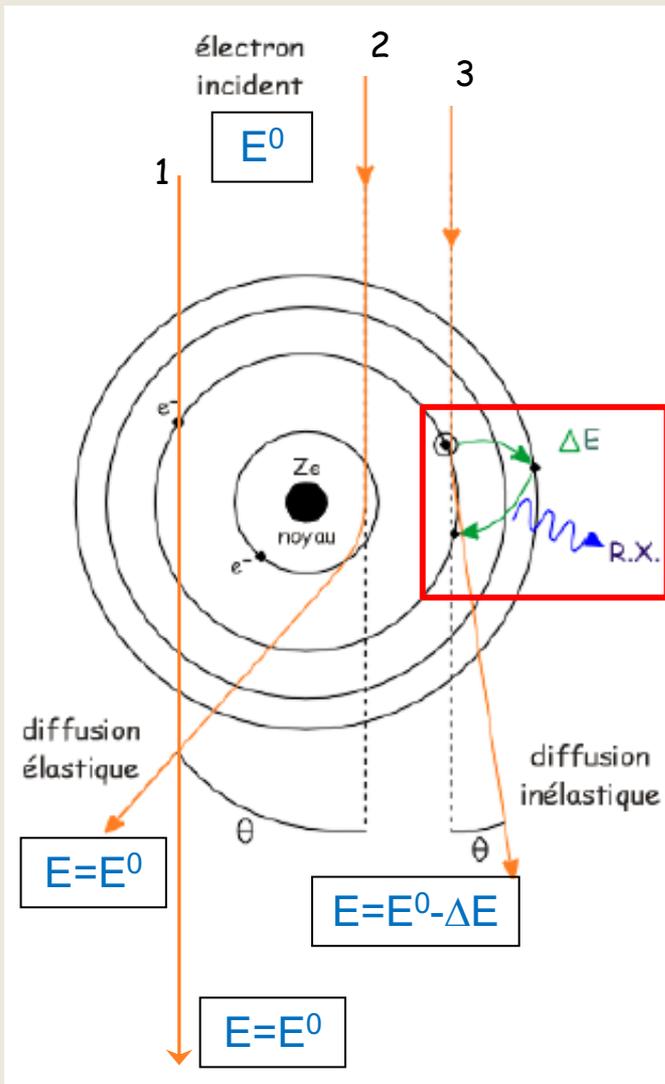
Imagerie avancée :

- 7) Imagerie chimique
- 8) Tomographie électronique
- 9) TP imagerie STEM-in-SEM et array tomography

7) Microanalyse chimique : identification des composés



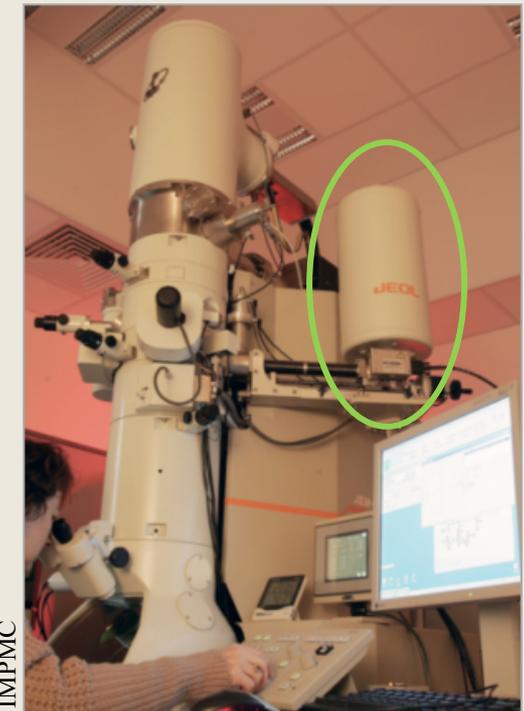
7) Microanalyse chimique : identification des composés



Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (X EDS)

- diffusion inélastique : e^- incident cède son énergie (ΔE) aux e^- de l'atome rencontré
- rayons X émis lors du retour de l'atome à son état fondamental
- E rayons X caractéristiques de l'atome rencontré : ANALYSE

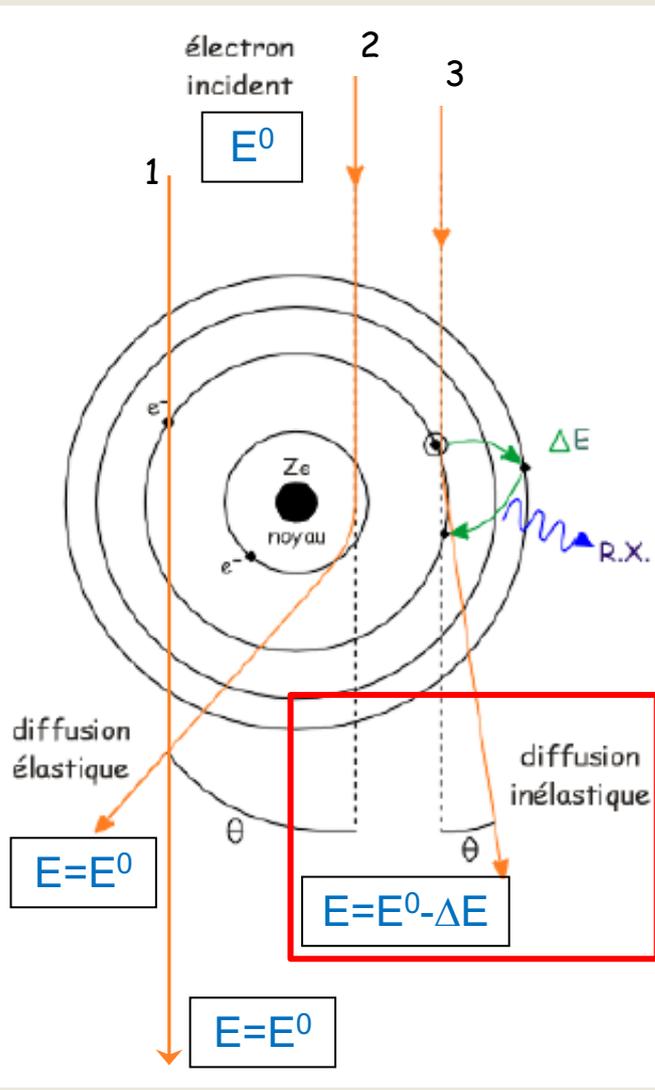
Détecteur X-EDS sur MET



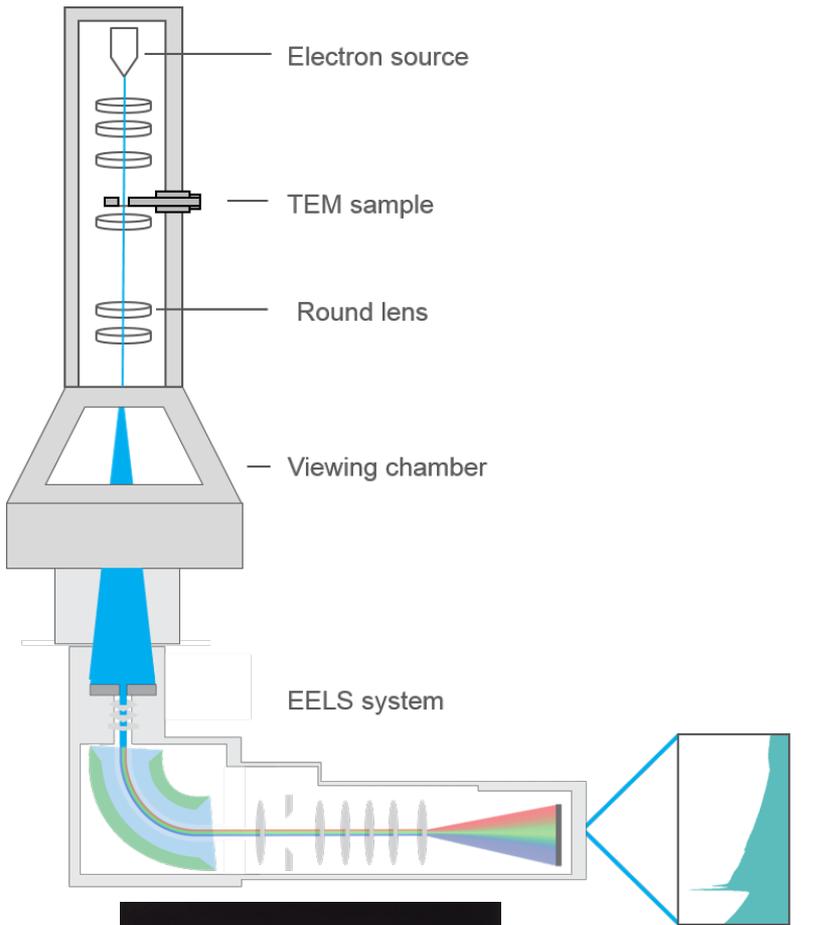
7) Microanalyse chimique : identification des composés

Energy-Filtered TEM (EFTEM)

- diffusion inélastique : e^- incident cède son énergie (ΔE) aux e^- de l'atome rencontré
- e^- transmis ont perdu cette énergie (ΔE)
- ΔE caractéristiques de l'atome rencontré :
ANALYSE

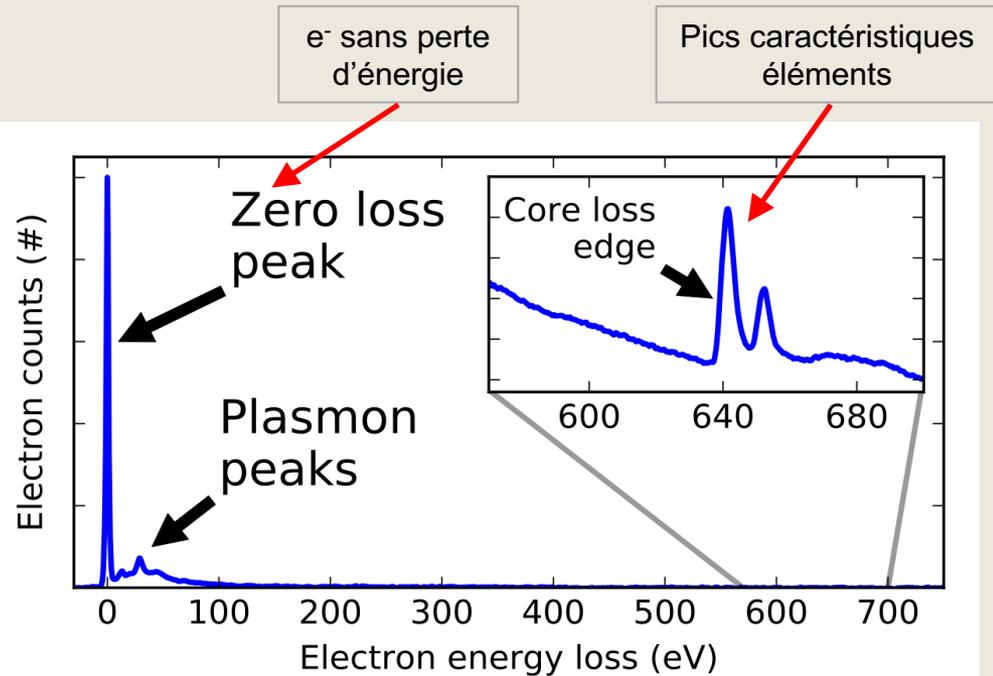


7) Microanalyse chimique : identification des composés

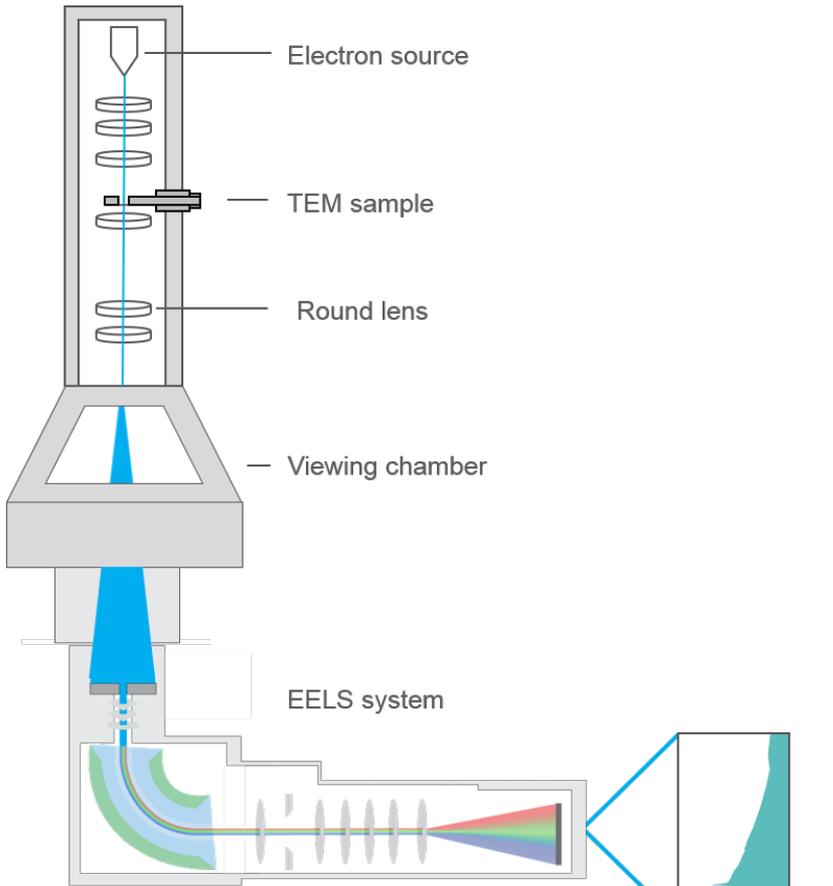


Energy-Filtered TEM (EFTEM)

- diffusion inélastique : e^- incident cède son énergie (ΔE) aux e^- de l'atome rencontré
- e^- transmis ont perdu cette énergie (ΔE)
- ΔE caractéristiques de l'atome rencontré :
ANALYSE

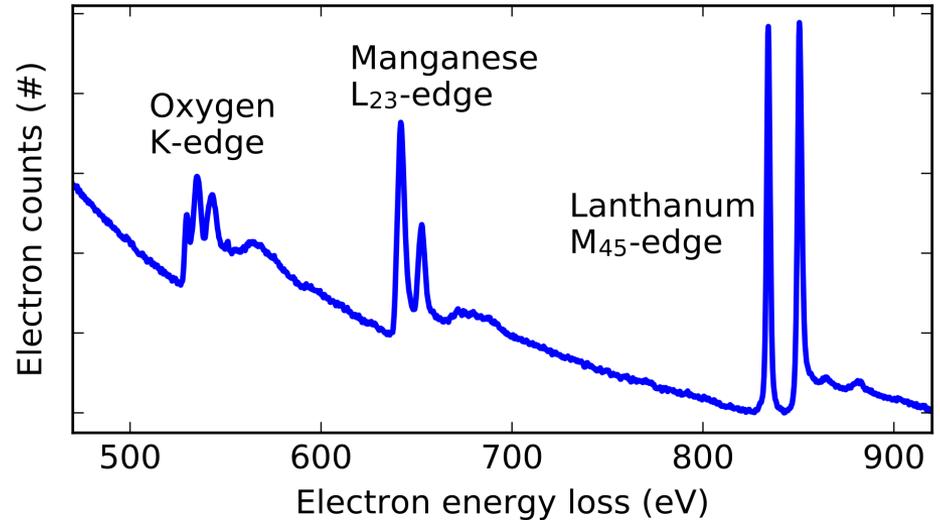


7) Microanalyse chimique : identification des composés



Energy-Filtered TEM (EFTEM)

- diffusion inélastique : e^- incident cède son énergie (ΔE) aux e^- de l'atome rencontré
- e^- transmis ont perdu cette énergie (ΔE)
- ΔE caractéristiques de l'atome rencontré :
ANALYSE



7) Microanalyse chimique en MET : application de l'EFTEM

***Lucina pectinata* :**

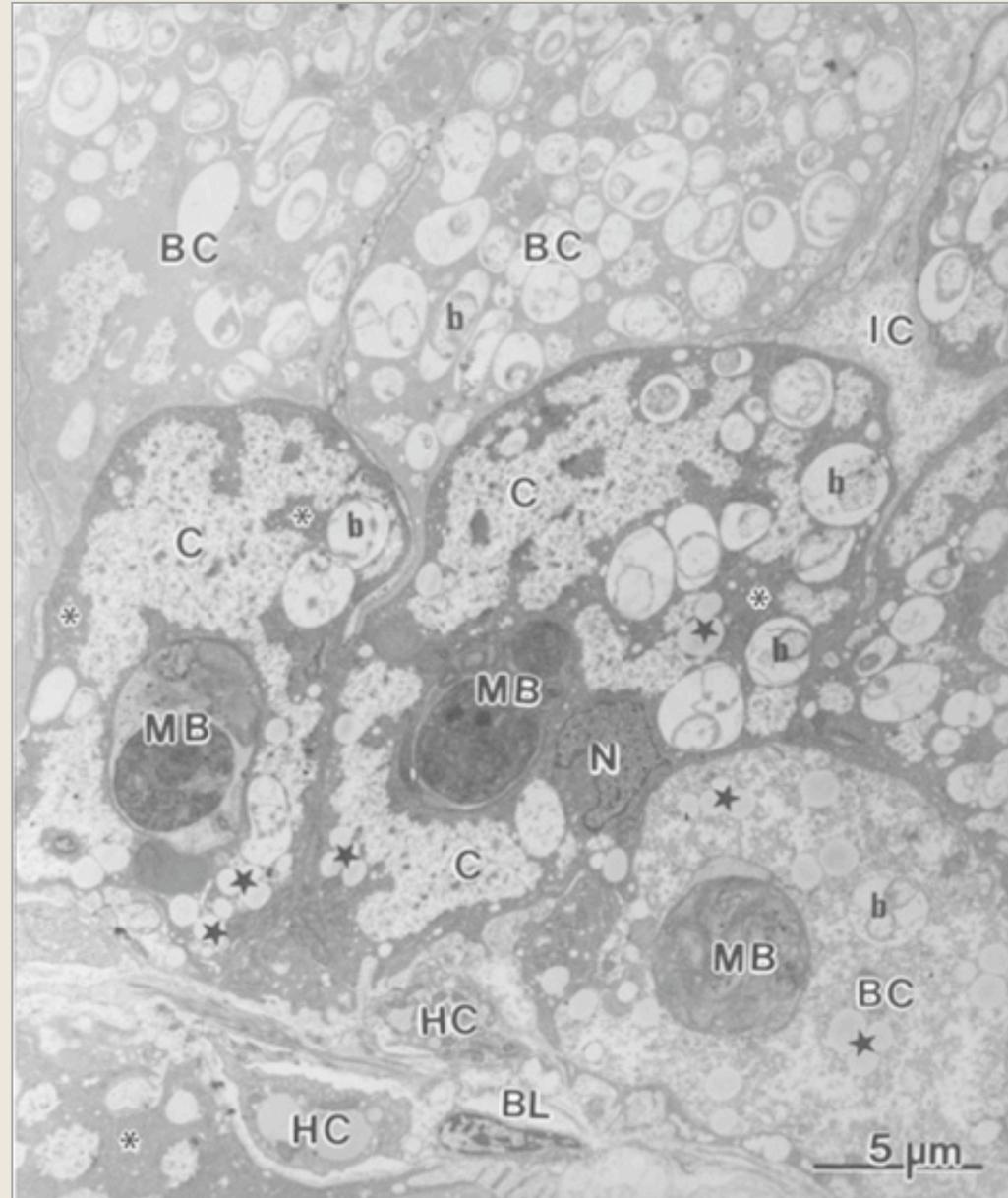
Symbiose entre un mollusque bivalve (BC) et une bactérie oxydant le soufre (b)

=> Localisation cellulaire du soufre ?



Ultrastructure *Lucina pectinata* :

- b bacterial symbionts
- BC Bacteriocytes
- ★ electron-lucent vesicles (constituants extraits pendant la préparation)
- HC Haemotocytes
- MB Lysosome-like microbodies
- N Nucleus



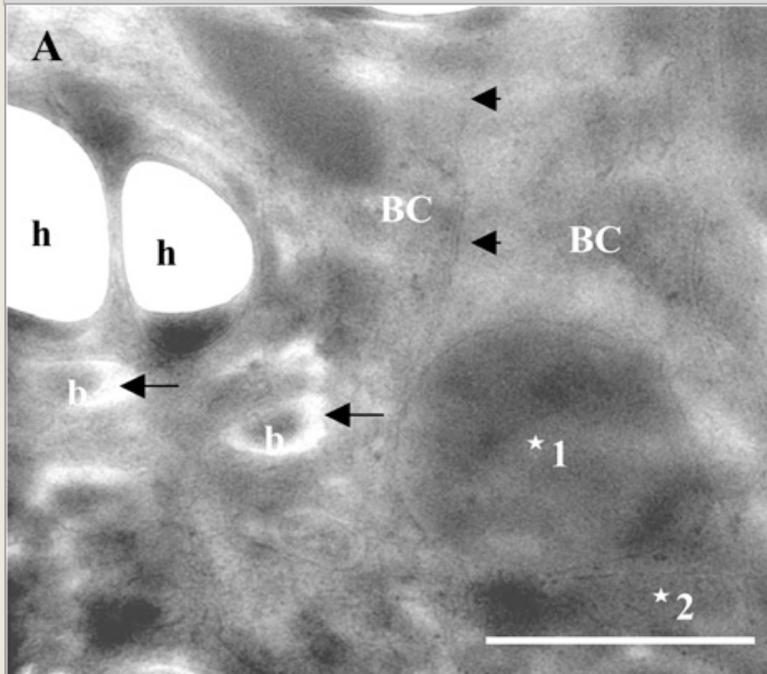
7) Microanalyse chimique en MET : application de l'EFTEM

Lucina pectinata :

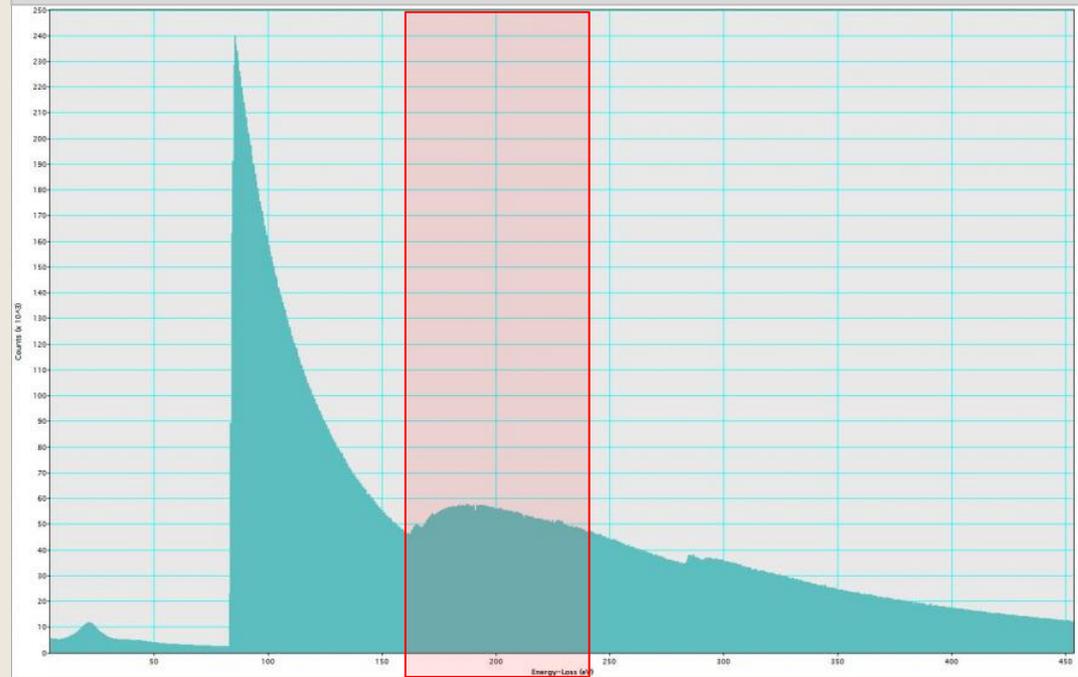
Symbiose entre un mollusque bivalve (BC) et une bactérie oxydant le soufre (b)
=> Localisation cellulaire du soufre ?

Electron Spectroscopic Imaging (ESI)

Préparation cryo
(préservation éléments chimiques)



Pic caractéristique du Soufre est référencé
(bases de données)



<https://eels.info/atlas/sulfur>

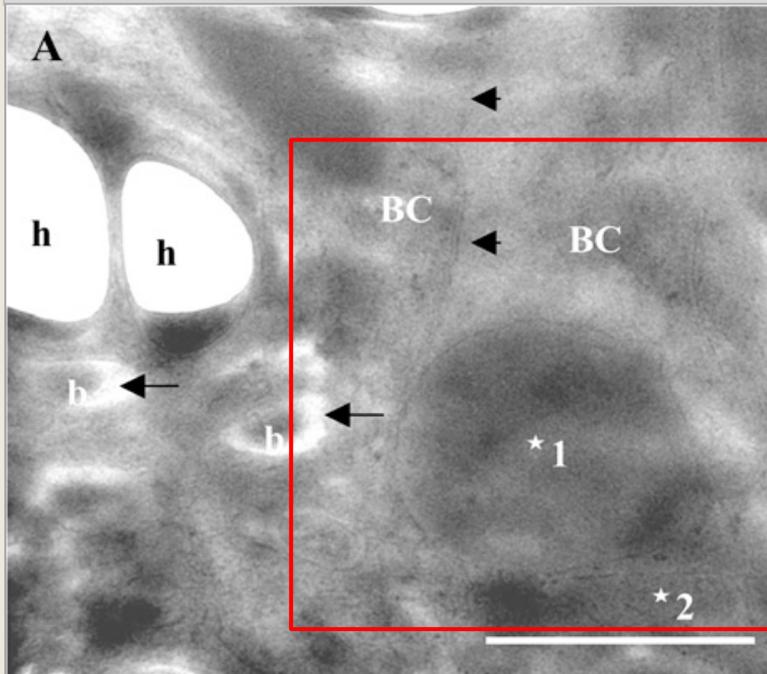
7) Microanalyse chimique en MET : application de l'EFTEM

Lucina pectinata :

Symbiose entre un mollusque bivalve (BC) et
une bactérie oxydant le soufre (b)

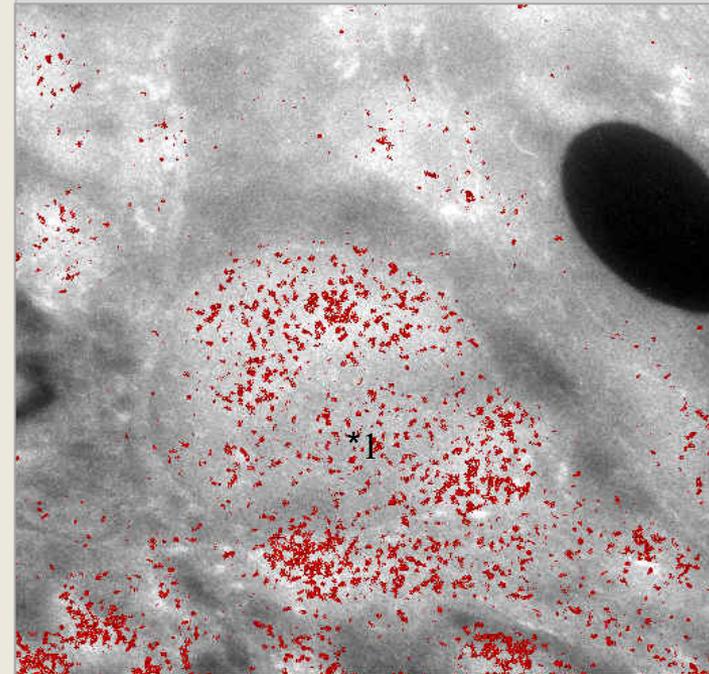
=> Localisation cellulaire du soufre ?

Préparation cryo
(préservation éléments chimiques)



Electron Spectroscopic Imaging
(ESI)

Sélection des e^- de ΔE dans la
fenêtre du pic du soufre



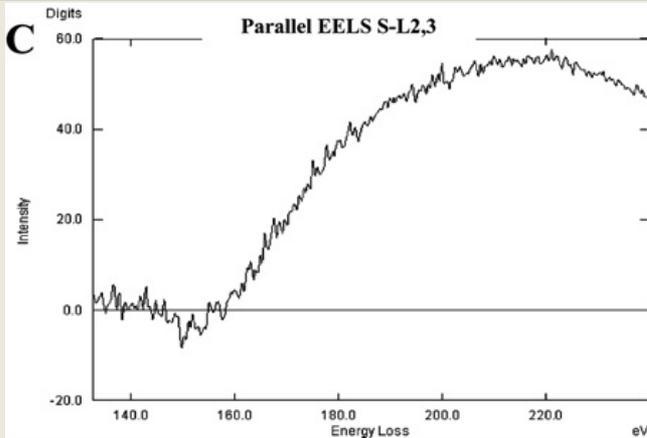
7) Microanalyse chimique en MET : application de l'EFTEM

Lucina pectinata :

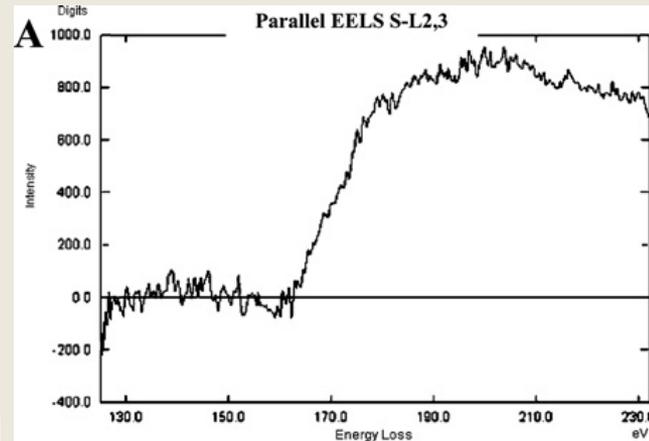
Symbiose entre un mollusque bivalve (BC) et une bactérie oxydant le soufre (b)
=> **Forme chimique du soufre ?**

Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS)

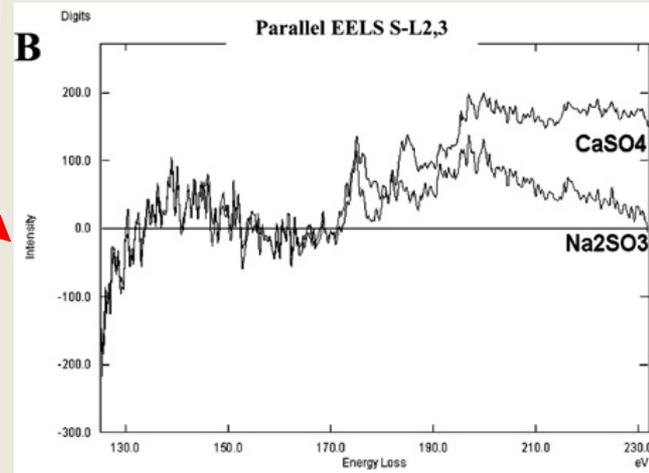
Spectre vésicules *L. Pectinata*



Comparaison

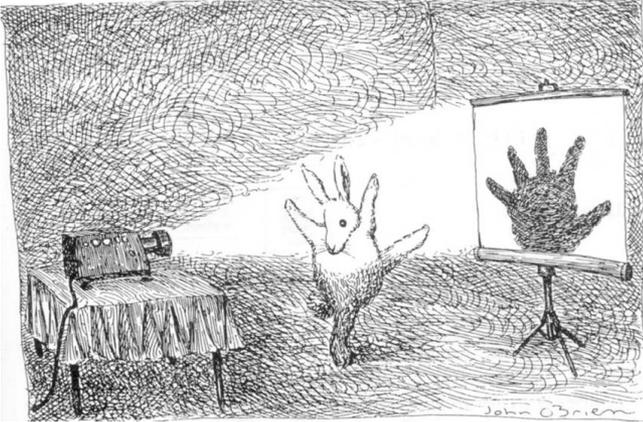


Spectre soufre élémentaire

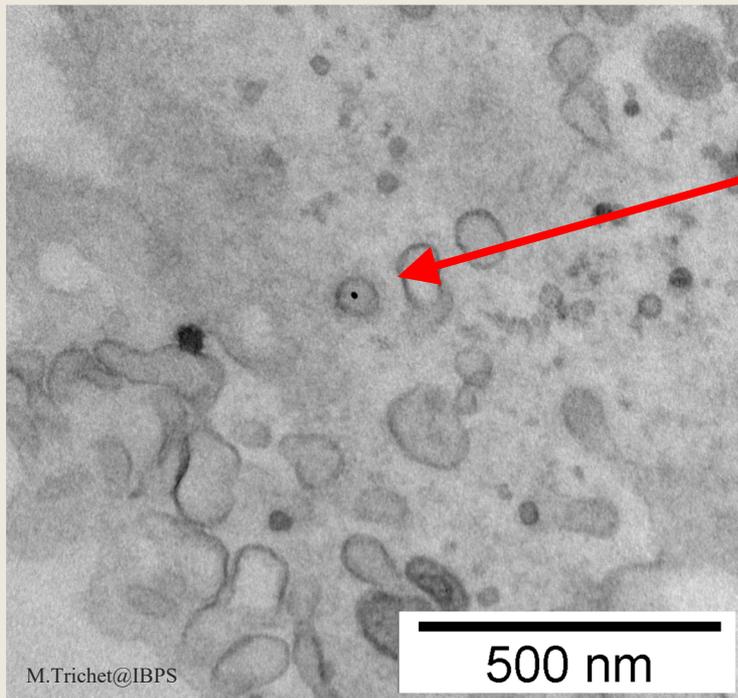


Spectres sulfite et sulfate

8) Applications en MET : tomographie électronique

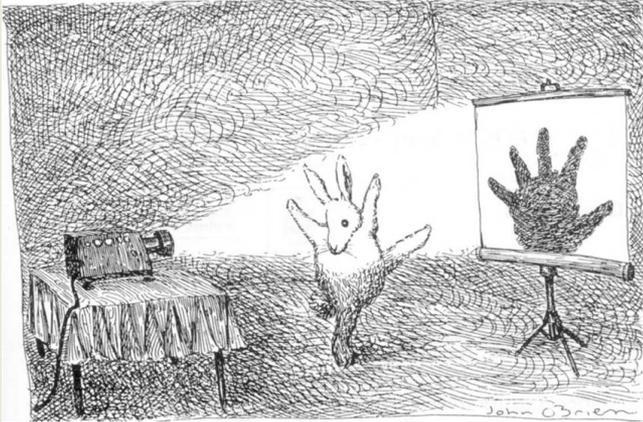


Micrographes :
projections 2D de structures 3D
=
pertes d'informations sur la profondeur

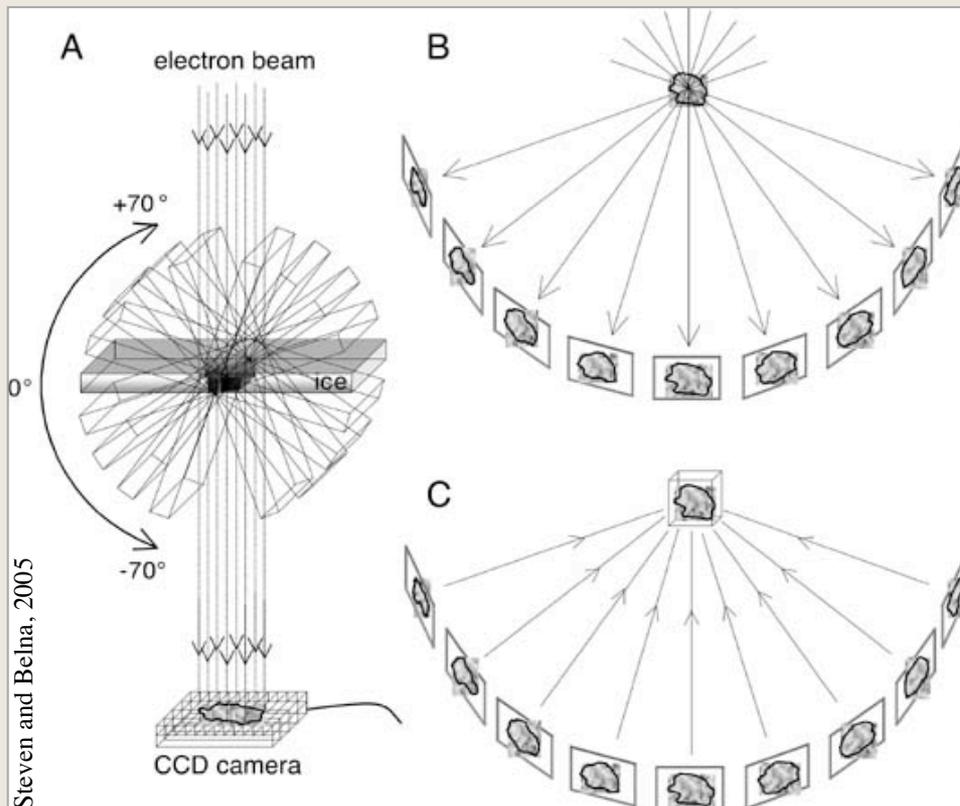


Vésicule ou tubule sectionné
transversalement ?

8) Applications en MET : tomographie électronique



Micrographes :
projections 2D de structures 3D
=
pertes d'informations sur la profondeur



Steven and Belna, 2005

Tomographie électronique :

A-B

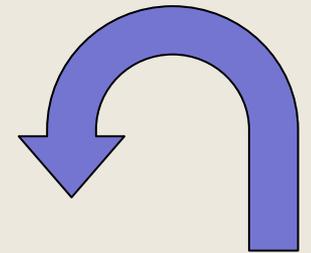
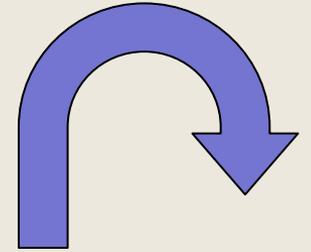
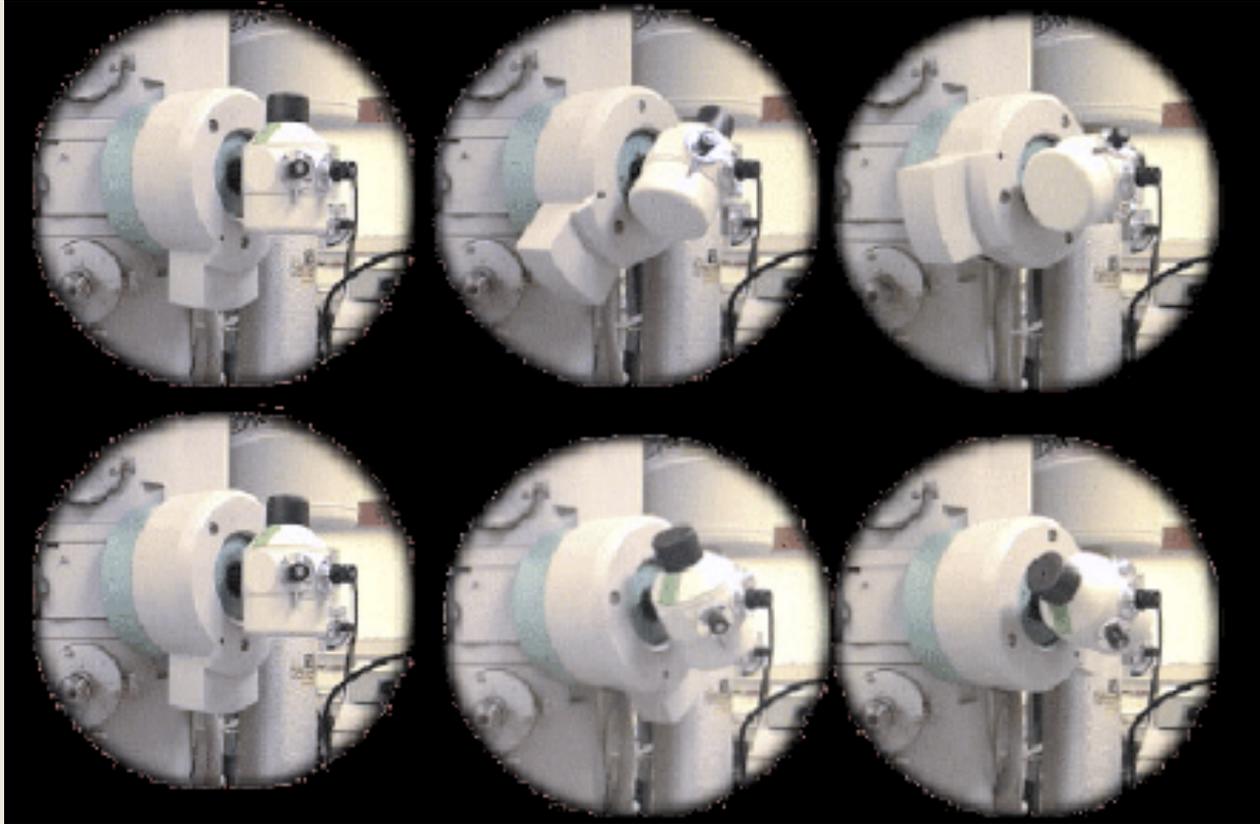
Acquisition d'une série d'images d'un même objet, tilté sous différents angles de vue.

C

Reconstruction 3D avec algorithmes de rétroprojection (logiciels : Imod, TomoJ).

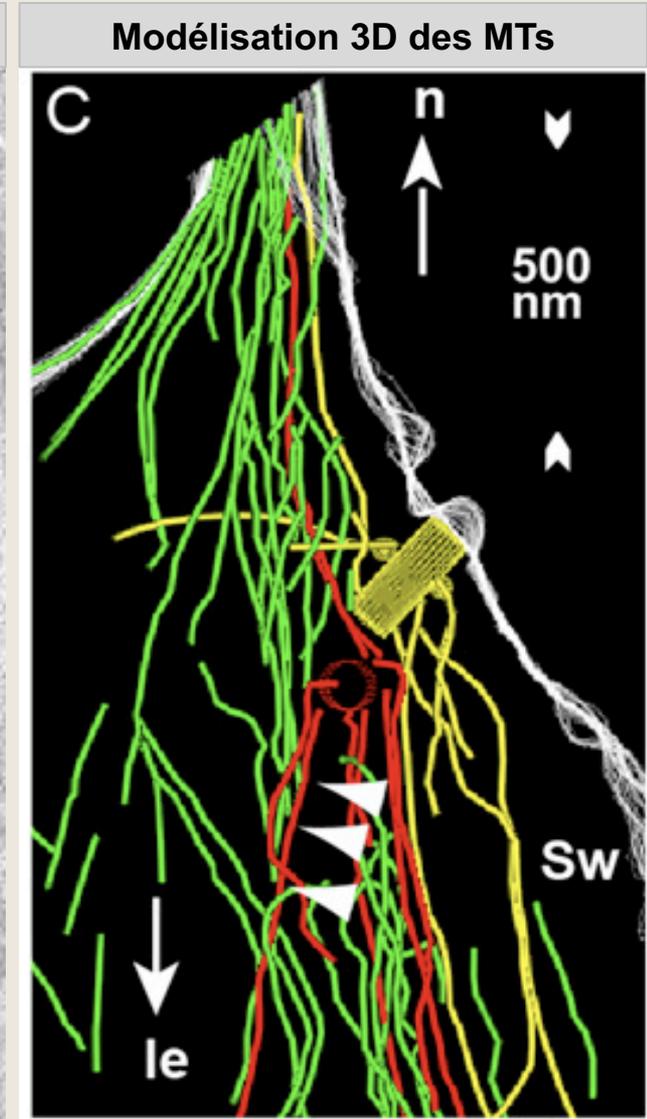
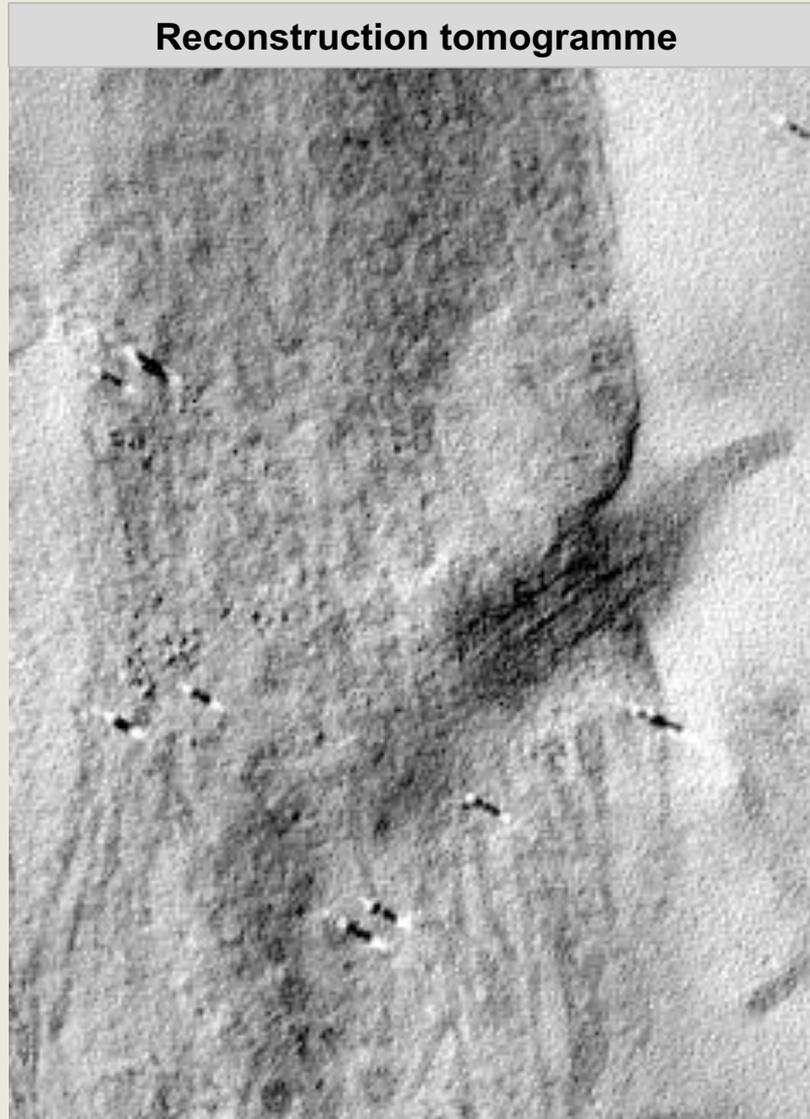
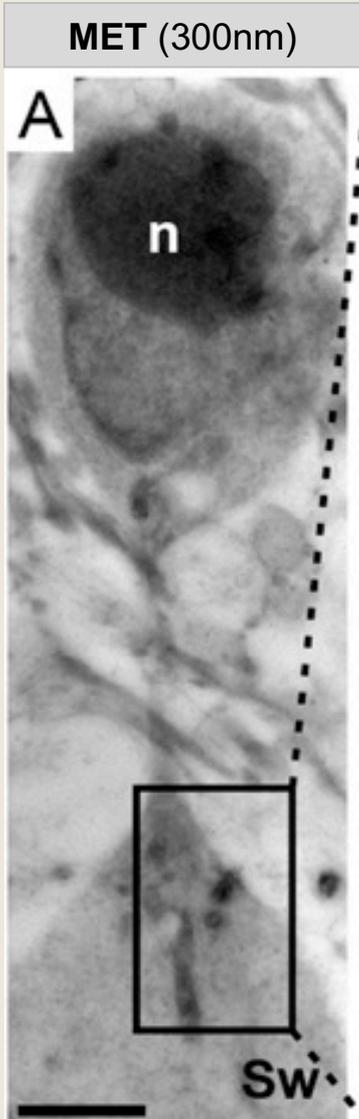
Résolution Z : quelques nm

3) Applications en MET : tomographie électronique

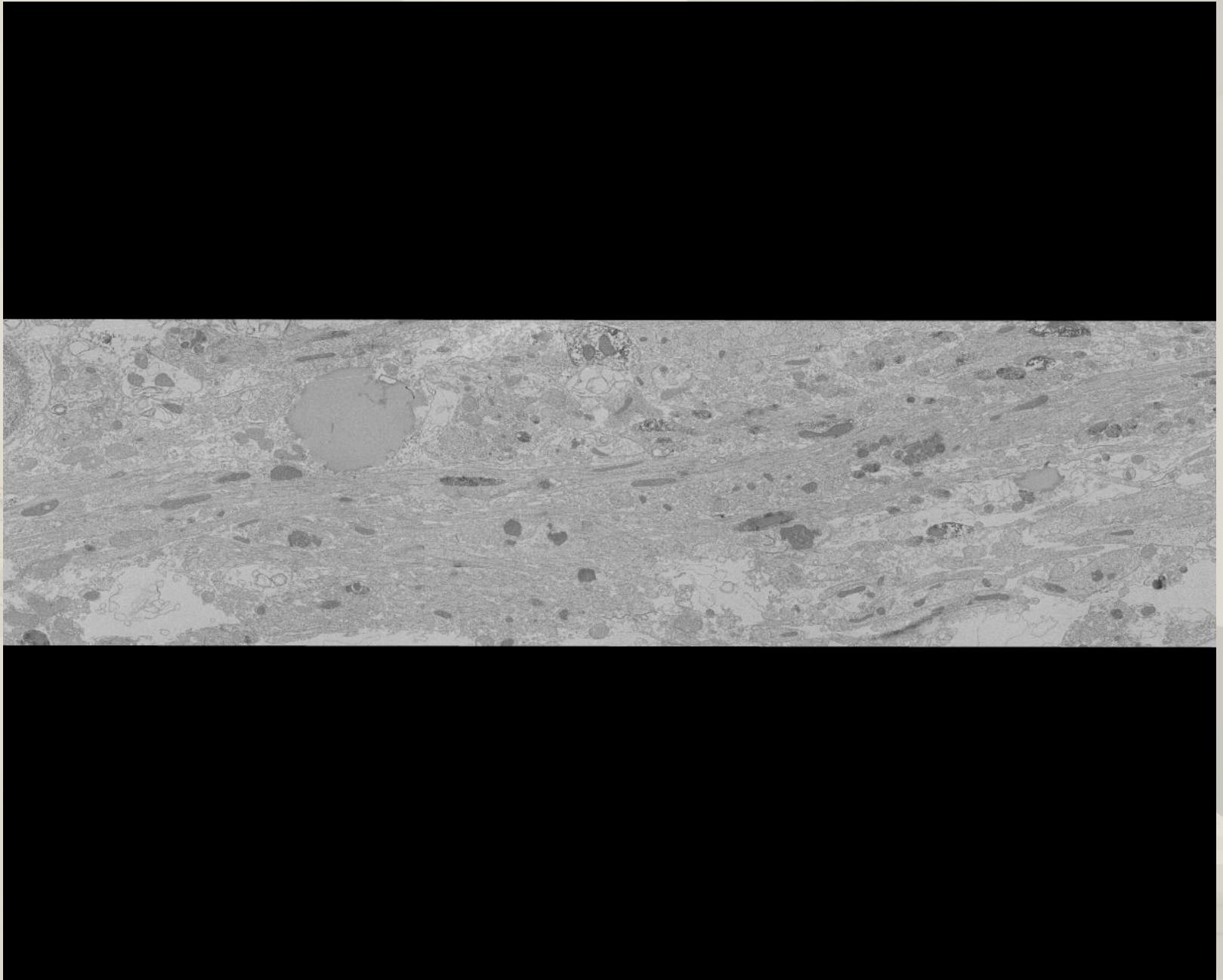


8) Applications en MET : tomographie électronique

Organisation microtubules dans neurones en migration



9) TP imagerie STEM-in-SEM et array tomography



IBPS, le Service de Microscopie Electronique

Virginie Bazin

Alexis Canette

Audrey Geeverding

Michaël TRICHET

