



Portrait de fourmi  
(Document CNRS-1 PRI5 - L. Beaunier, S.  
Borensztajn)

100 μm

## La Microscopie électronique à balayage : une loupe puissante

par Luc Beaunier et Stephan Borensztajn

**Pour observer de plus en plus petit, les techniques actuelles d'observation peuvent faire appel à un outil particulièrement performant, le microscope électronique. L'avantage du microscope électronique à balayage réside principalement dans l'observation de la surface d'un échantillon (un insecte !) entier, en structure tridimensionnelle, sous réserve que celui-ci "supporte" le vide indispensable au passage du flux des électrons. Évidemment, on est déjà loin de la représentation plane d'un dessin ou du faible grossissement de la loupe et du microscope optique. Ici, on s'affranchit de la délicate préparation des coupes fines d'échantillons, de leur montage entre lame et lamelle de verre... L'insecte apparaît alors dans tout son volume.**

Si l'on veut voir des détails extrêmement fins, on dispose devant l'œil des appareils optiques grossissants plus ou moins perfectionnés. D'abord des loupes ou objectifs macrophotographiques, qui permettent un grossissement de 0 à 20 pour l'observation d'insectes entiers vivants ou préparés, ou encore des loupes binoculaires pouvant atteindre un grossissement de 600 fois. On a ici encore

une vision macroscopique du relief avec une résolution de l'ordre de 10 micromètres. L'image est obtenue par réflexion de la lumière et les variations de contraste qui permettent l'observation sont dues au relief.

Dans une deuxième étape, on utilise un microscope optique classique (avec oculaire et objectif) permettant de couvrir tous les besoins jusqu'à un grossissement

de 2 000 fois. L'excellente résolution de ces appareils permet l'observation de détails très fins jusqu'à environ 0,3 micromètre, mais pas plus. En effet, pour des raisons physiques relatives à la propagation ondulatoire de la lumière et à la conception physique des lentilles optiques, dans le domaine visible on sera limité par des phénomènes de diffraction (la formule d'Airy donne une résolution limite de  $0,61 \lambda/\alpha$ , où  $\lambda$  est la longueur d'onde de la lumière et  $\alpha$  l'angle d'ouverture de la dernière lentille du microscope). Par ailleurs, la profondeur de champ est presque nulle ce qui signifie que l'on a une image quasiment plane où le relief n'apparaît pas. L'image est cette fois obtenue par transmission de la lumière à travers l'objet. Il faut donc travailler sur des prélèvements fins ou même des coupes fines pour qu'ils soient transparents à la lumière. Les détails observés sont dus aux variations de contraste dues aux différences d'absorption de la lumière.

### Ouvrons l'œil...

Pour que nous puissions voir un objet, il faut qu'il soit éclairé par une source de lumière et que son image soit enregistrée par un capteur. Pour nous, la source de lumière est le soleil ou l'électricité. Les photons lumineux émis couvrent le domaine des ondes visibles par notre œil. Le spectre s'étend du rouge à 0,8 micromètre (un micromètre est la millionième partie du mètre) au bleu à 0,4 micromètre de longueur d'onde en couvrant toutes les couleurs de l'arc-en-ciel. Quand un objet est éclairé, il absorbe une partie de la lumière et nous en renvoie l'autre partie. C'est la différence entre les spectres incidents et émis qui détermine la couleur des objets.

Notre capteur naturel est la rétine, laquelle est située derrière une optique constituée par la cornée, la pupille, l'iris et le cristallin. L'ensemble a une résolution de 0,1 millimètre (100 micromètres). C'est-à-dire que notre œil est capable de distinguer deux points distants de 0,1 mm à une distance de 50 cm. La rétine retransmet ensuite l'information au cerveau, lequel interprète la distance, la forme, la couleur et le mouvement.

## Des électrons remplacent la lumière

Pour améliorer la résolution, on aura compris qu'il faut raccourcir la longueur d'onde de la lumière qui éclaire l'objet et donc sortir du domaine des longueurs d'ondes visibles par notre œil. Pour changer la longueur d'onde des photons qui éclairent la surface de l'objet, une solution est d'utiliser des faisceaux de particules car, du fait de la dualité onde - corpuscule (fondement de la mécanique ondulatoire), il leur est associé une longueur d'onde très courte. Il faut donc imaginer des appareils d'optique (autres que les lentilles de verre) qui puissent laisser passer ces particules et des capteurs capables de les voir et de les enregistrer. Les électrons sont de bons candidats, car leur longueur d'onde associée  $\lambda$  permet une résolution d'image de l'ordre de grandeur des détails à observer à de forts grossissements. En effet, la longueur d'onde est liée à la tension d'accélération  $V$  des électrons par la formule :

$$\lambda = \sqrt{\frac{1,5}{V}}$$

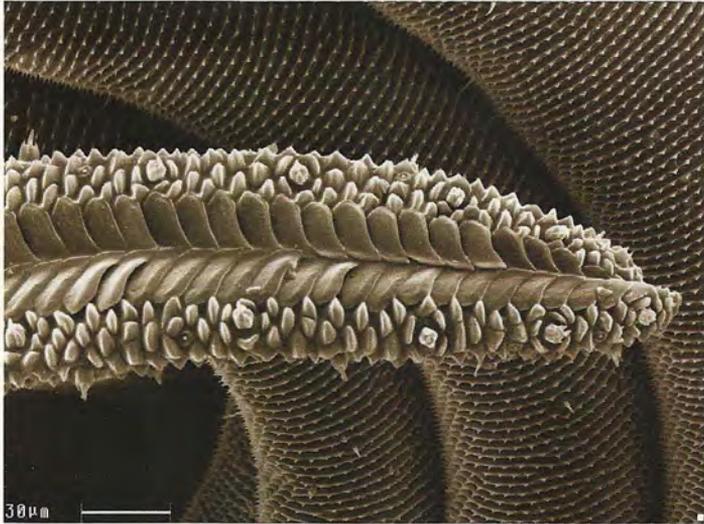
Plus la tension d'accélération des électrons est élevée, plus la vitesse des électrons est élevée. On obtient par exemple :

Tension d'accélération des électrons	Longueur d'onde obtenue
V (volt)	l (nanomètre)
1	1,22
10	0,387
10 <sup>4</sup>	0,012
10 <sup>5</sup>	0,00387
10 <sup>6</sup>	0,0012

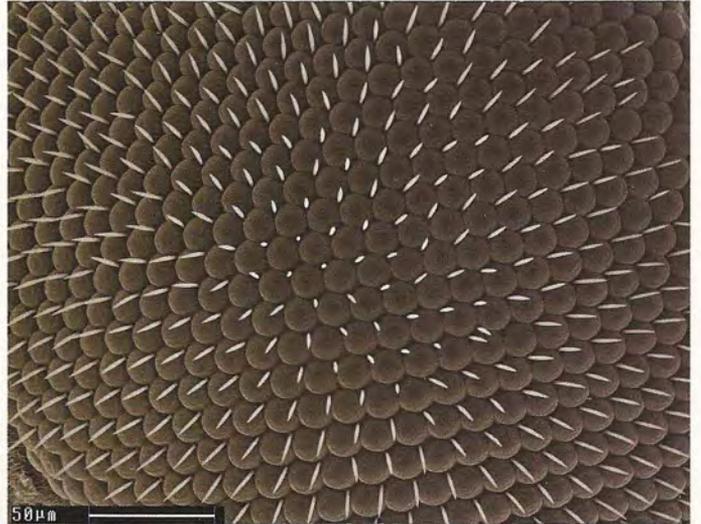
En profitant des progrès techniques, les scientifiques ont donc mis au point des microscopes faisant intervenir les électrons : les microscopes électroniques. Il en existe deux types : le microscope électronique à transmission et le microscope électronique à balayage. Dans les deux cas, la source de "lumière" est un canon à électrons et la propagation du faisceau se fait dans une colonne sous un vide élevé (vide secondaire 10<sup>-5</sup> torr). Le faisceau est mis en forme par des lentilles électromagnétiques. Le microscope électronique à transmission (MET, ou en anglais "*Transmission Electron Microscope*", TEM), dont l'ancêtre est le microscope d'E. Ruska (1931) a été continuellement amélioré jusqu'à nos jours. La surface observée est "éclairée" en permanence par un faisceau d'électrons qui traverse l'échantillon. Il est par conséquent nécessaire que celui-ci soit monté entre lame et lamelle, donc en coupes suffisamment minces pour permettre le passage des électrons, c'est-à-dire de l'ordre 100 nanomètres (un nanomètre est un milliardième de mètre). Les contrastes de l'image transmise sont dus à la résultante de l'interaction des électrons incidents avec les atomes et électrons de la matière traversée. En biologie, ils sont dus à des phénomènes d'absorption résultant des différences de densité de la matière traversée. Les rapports de grossissements utiles vont jusqu'à 50 000 fois. Ces microscopes offrent des résolutions importantes permettant d'observer et de caractériser la structure des tissus et des membranes avec une résolution de 3 nanomètres. L'image est captée sur un plan-film photographique ou sur une caméra à bas niveau de lumière pour être traitée sur ordinateur

## Cas du microscope électronique à balayage (MEB)

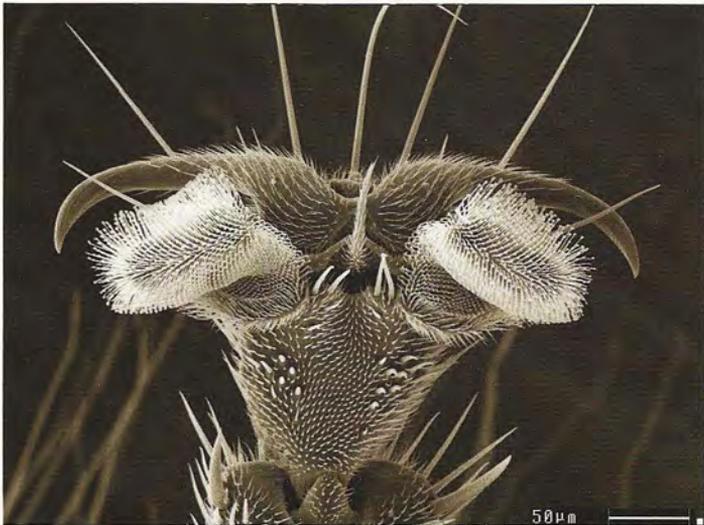
Toutefois, lorsque l'on étudie les insectes, l'observation détaillée de leur surface permet de recueillir un grand nombre de caractères morphologiques essentiels à leur détermination. Le principe du MEB (ou en anglais *Scanning Electron Microscope*, SEM) consiste donc à balayer la surface d'un échantillon avec un fin faisceau d'électrons pour en obtenir l'image et ce, sans préparation de coupes montées entre lame et lamelle. Ce type de microscope possède également une source d'électrons et des lentilles de mise en forme du faisceau. C'est dans les années 1930 qu'a été créé par Knoll et von Ardenne le principe de fonctionnement du MEB. Il faudra attendre 1965 pour voir le premier MEB commercialisé. Il a été constamment amélioré depuis. Cette fois, le faisceau d'électrons est affiné à une taille d'environ 4 nanomètres. Il balaye l'échantillon de façon séquentielle (ligne par ligne), comme en télévision. Sous l'impact des électrons primaires, l'interaction avec le matériau crée différents signaux : électrons primaires rétrodiffusés avec la même énergie que les particules incidentes, électrons secondaires de faible énergie, électrons Auger, rayons X (pour l'analyse chimique des éléments présents)... Pour visualiser la surface, nous utilisons un détecteur d'électrons secondaires. Ces derniers, de très faible énergie, sont par conséquent émis sur une épaisseur très faible de la surface ce qui permet de visualiser le relief de l'échantillon. Le signal est détecté de façon synchrone avec le balayage sur l'échantillon et retransmis après amplification sur un moniteur équivalent à un poste de télévision. On observe la topographie grâce aux variations de contraste induites par les reliefs de la surface. Le grandis-



*Trompe de papillon*



*Œil de drosophile*



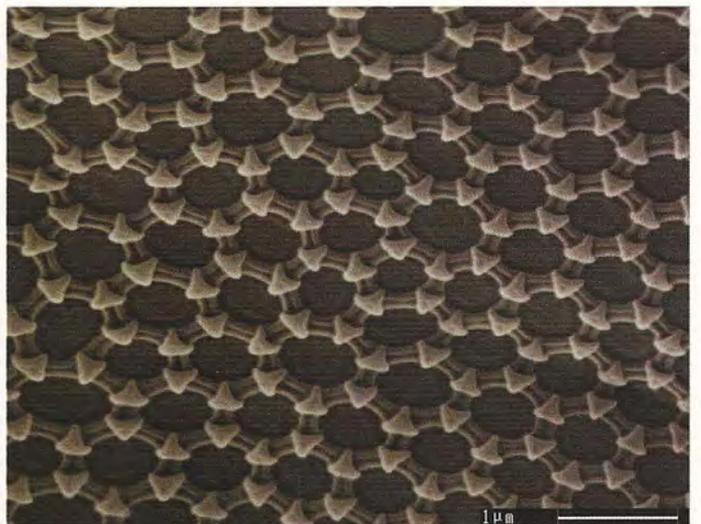
*Patte de mouche*



*Grains de pollen sur soies d'abeille*

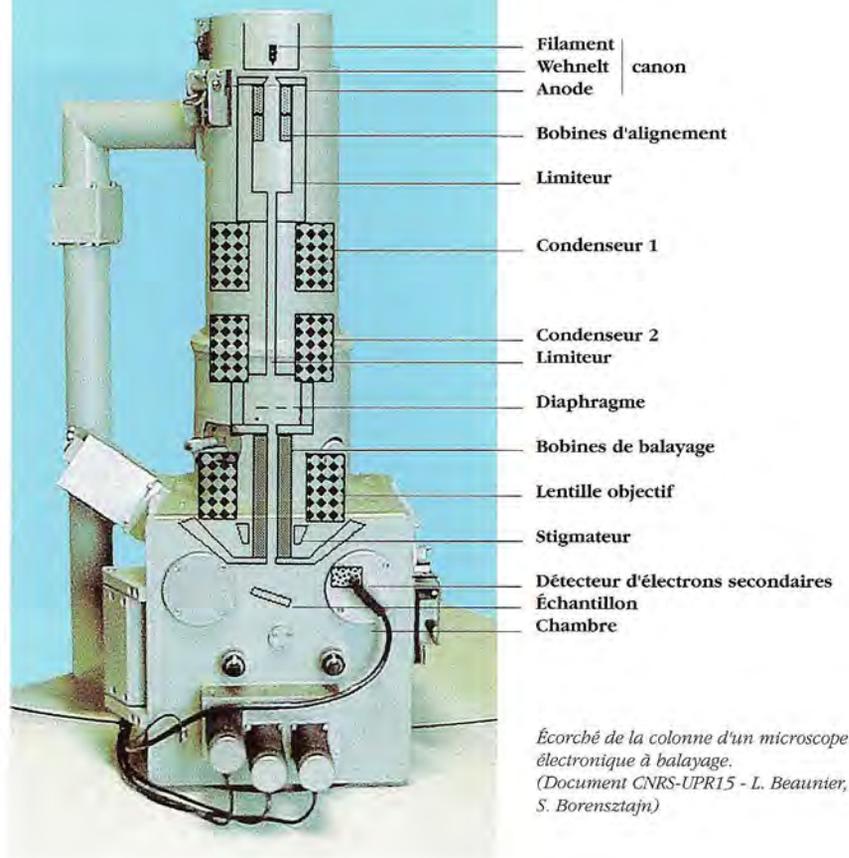


*Puceron*



*Collembole : détail de l'antenne*

(Document CNRS-UPR15 - L. Beaunier,  
S. Borensztajn)



sement est déterminé par le rapport entre la longueur balayée sur l'échantillon et la largeur de l'image sur l'écran. L'intérêt principal du microscope électronique à balayage est d'avoir une très grande profondeur de champ pouvant atteindre un centimètre et plus. Nous pouvons donc voir les insectes en volume. Les électrons secondaires ne sont émis que par la surface et donnent une image topographique de celle-ci en gamme de gris. Si le microscope est analogique, l'image est transmise sur un écran à haute résolution pour y être photographiée. Si le microscope est numérique, l'image peut être améliorée, modifiée ou mise en fausses couleurs par ordinateur et imprimée directement. Le numérique apporte une grande souplesse de travail car on peut stocker l'image sur le disque dur de l'ordinateur pour la transmettre par un réseau informatique ou sur un support mémoire. La platine porte objet du microscope autorise tous les mouvements ce qui permet d'orienter l'échantillon pour choisir l'angle de prise de vue par déplacements linéaires, rotation et inclinaison. Par cette méthode, on observe des insectes entiers sauf

pour les très gros spécimens, sur lesquels on procédera à des prélèvements. Par contre, puisque l'on travaille avec des électrons qui ont une charge négative, si l'objet observé est non conducteur (cas des insectes), il y a accumulation sur la surface des charges électroniques négatives qui repoussent les électrons incidents et perturbent fortement l'image. Dans ce cas, il faut rendre la surface conductrice. On procède donc sur l'insecte à l'évaporation d'une couche d'or de 8 nanomètres d'épaisseur. Bien évidemment, l'insecte doit avoir subi une bonne déshydratation (de la surface au moins) car on travaille sous vide. Dans ce cas, on procédera comme pour la préparation des pièces pour les collections de références (voir article de J.-L. Domanget, *Insectes* n°114). Bien évidemment, nous ne pourrons observer que les parties solides qui subsistent, à moins de geler l'objet (cryo-préparation) et de le garder gelé pendant l'observation sur une platine froide. Le microscope électronique à balayage est donc utilisé comme une grosse loupe avec des rapports de grandissements allant jusqu'à 100 000 fois et avec une

résolution de 4 nanomètres pour les canons à électrons à filament de tungstène. On atteint 0,8 nanomètre pour les canons à émission de champ. Avec ceux-ci, il est possible de travailler à basse tension sans métallisation des surfaces au coût d'une perte de résolution à 4 nanomètres. De récents modèles de microscopes électroniques à balayage permettent maintenant de travailler en atmosphère humide (sous une pression de 0,2 torr), sans métallisation, pour regarder des échantillons non séchés et même parfois vivants. On a ainsi pu observer des acariens vivants (sous faisceau d'électrons) pendant un temps suffisamment long pour les voir marcher dans des grottes immenses, sur des croûtes de fromage. Le microscope électronique à balayage ouvre ainsi la possibilité d'observer des détails très fins, non observables par les autres techniques (voir la planche photographique p. 13).

#### Pour en savoir plus :

**Agius B., Froment M., Beaunier L. et al.**, 1990 - Surfaces, interfaces et films minces - MET, MEB - éd. Dunod.

**Colliex C.**, 1998 - La microscopie électronique - collection "Que sais-je ?", éd. PUF.

**Grillon F.**, 1997 - Le point sur la microscopie électronique à balayage - *Spectra Analysis*, n°197, p. 20.

**Marraud A.**, 1999 - Le point sur la microscopie électronique à transmission - *Spectra Analysis*, n°209, p. 7.

Microanalyse, microscopie électronique à balayage, 1979 - Éditions de Physique, ANRT.

Des ouvrages de base sont également disponibles (liste sur demande) à l'ANRT - Groupement 8 - 41, boulevard des Capucines - 75002 PARIS.

#### Les auteurs

**Luc Beaunier** est chargé de recherche CNRS (UPR 15).  
beaunier@ccr.jussieu.fr

**Stephan Borensztajn** est technicien de recherche au sein de la même unité.  
Contacts : UPR 15 CNRS Case 133 - 4, place Jussieu - 75252 Paris Cedex 05