

# Master informatique spécialité IMA

## Cours N°1 Principes de Base de la Microscopie Electronique en Transmission et à balayage

cours du 28 septembre 2010

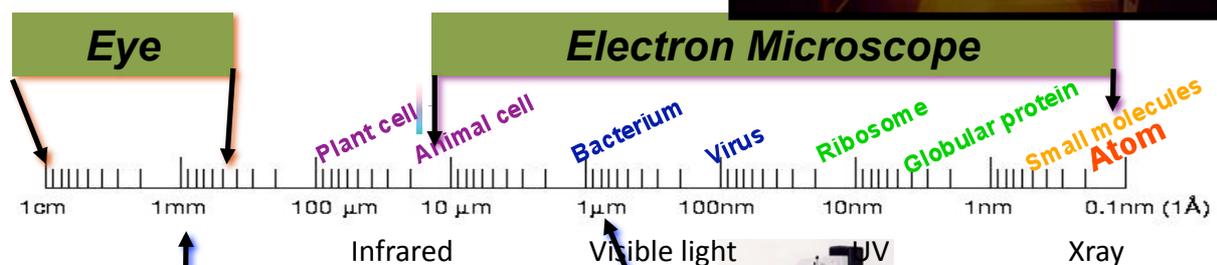
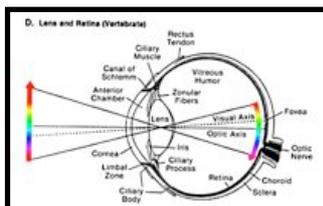
Catherine Vénien-Bryan  
 Equipe "Assemblages macromoléculaires"  
 Institut de minéralogie et de physique des milieux condensés (IMPMC)  
 CNRS UMR 7590, Universités Paris 6 et Paris 7, IPGP  
 140 Rue de Lourmel, 75015 Paris  
 Tél.: 01 44 27 72 05  
 E-mail: catherine.venien@impmc.upmc.fr  
 catherine.venien@bioch.ox.ac.uk

URL: <http://www.impmc.jussieu.fr>

<http://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/index.asp?pageid=602>

### Imaging tools

**Image** - Perception of an object using your eyes (vision).  
 One can sense an object without vision (touch, etc.).  
 Requires visible light.



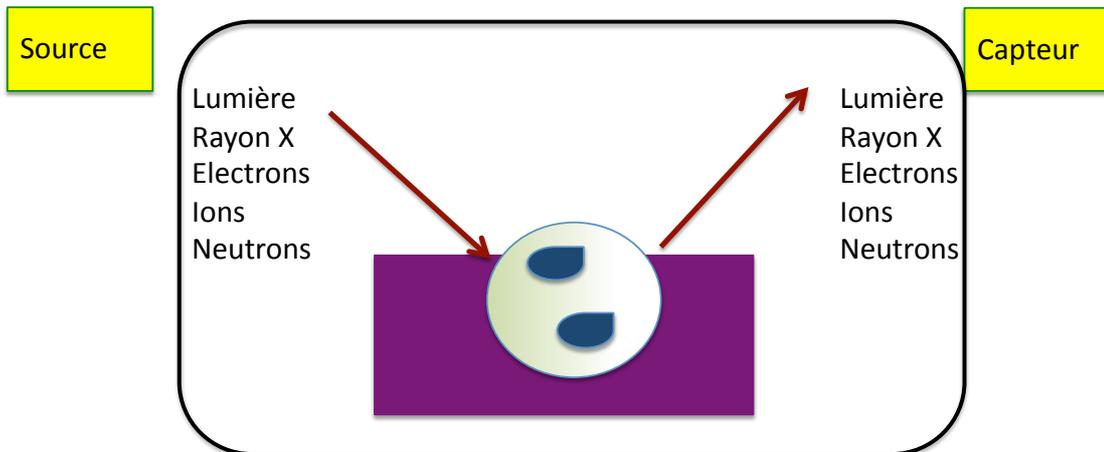
**Microscope** - A device with a lens or series of lenses that enlarge (magnify) the appearance of an object.  
 Does not apply to SEM.



Resolution is limited to approx. 1/2 the wavelength of illuminating source

Resolution  $\approx \frac{1}{2} \lambda$

## Comment observer les matériaux?



-Toujours un processus d'interaction (avec ou sans excitation) entre rayonnement incident et matériau  
--Celui-ci est "capté" par un appareil de détection (oeil, TV, photo, détecteur...)

## L'état actuel des outils d'observation

### Microscopie électronique

- Transmission
- Balayage en réflexion
- Balayage en transmission
- Analytique X dispersif en énergie
- Analytique par perte d'énergie
- Holographie électronique
- Micro Auger
- Cathodoluminescence, EBIC
- Holographie

### Microscopie à pointe

- Microscopie tunnel
- Force atomique
- Force magnétique
- Émission optique
- Champ proche

### Microscopie optique

- Microscope polarisant
- Microscope confocal
- Champ proche spectroscopie

### Fluorescence X

- Microanalyse
- Microscopie X**
- Topographie
- Tomographie
- Transmission
- Balayage
- Holographie X
- Microscopie photoémission

### Microscopie ionique

- Balayage ionique
- Microanalyse par ions
- Réactions nucléaires

### Microscopie à émission de champ

- Sonde atomique

## Particules utilisables pour l'imagerie

Nature	$\lambda$ (nm)	Energie	Libre parcours	Résolution
Photons	400-700	2eV	variable	0.2 $\mu$ m
Rayons X pour l'imagerie	0.07-0.2	5-10keV	10-100 $\mu$ m	0.1 $\mu$ m
Electrons	0.002	100-500keV	0.1-1 $\mu$ m	0.15nm
Protons	$3 \cdot 10^{-4}$	10-100keV	0.01-0.1 $\mu$ m	1-10nm
Ions	$10^{-5}$	20keV-2MeV	100nm-5 $\mu$ m	500nm
Neutrons	0.15	0.025eV	1mm	1 $\mu$ m
Ultrasons	0.4 $\mu$ m		Variable mm	1 $\mu$ m-50nm
Les pointes			0-5 nm	0.005-0.3nm

## Quelques caractéristiques des divers instruments

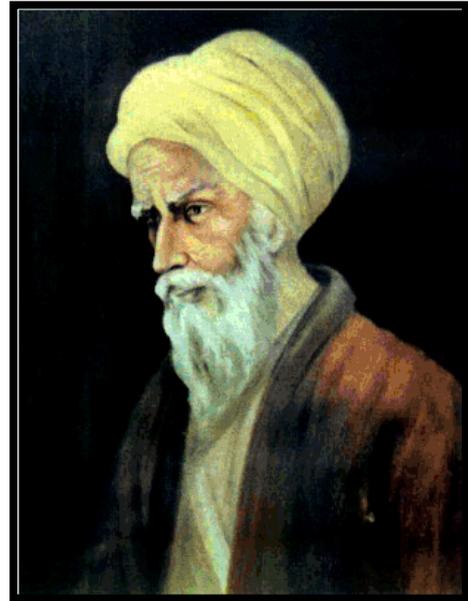
Instrument	Résolution	Détection limite	Précision	Accès
Microscopie à transmission	0.15 nm		1.5%	Facile
Microscopie à balayage	0.3-10nm		qualitatif	Très facile
Microanalyse X	1 nm	$10^{-4} \cdot 10^{-3}$	10%	Facile
Microanalyse par perte d'énergie	1-5 nm	$10^{-3} \cdot 10^{-2}$	10%	Assez facile
Cathodoluminescence	1 $\mu$ m			
Microscope réflexion à basse énergie	10nm-1 $\mu$ m			Peu d'installations
Holographie (à projection)	0.5 nm			Recherche
Microscopie à effet tunnel	0.3nm en X 0.01nm en Z			
Microscopie à force atomique	0.5nm			Très facile
Microscopie optique	0.3 $\mu$ m			Très facile
Microscopie confocale	0.15 $\mu$ m			Facile
Microscopie à champ proche	10-50 nm			Difficile
Microscope Auger	20nm	$10^{-3}$	10%	Peu d'installations
Microscope à spectro de masse des ions secondaires	50 nm	$10^{-6}-10^{-8}$	1%	Assez facile
Sonde atomique	20 nm	$10^{-3}$	1 atome	Peu d'installations
Sondes X et micro X	20-200nm	$10^{-7}$		En développement

## History:

First record of using glass lens for magnification was by **Al Hazen**, an Muslim scientist from what is now known as Iran, in the 10 and 11th century. He performed the bulk of his studies and work in Spain. His treatise on the colors of the sunset were translated to Latin.

He contradicted **Ptolemy's** and **Euclid's** theory of vision that objects are seen by rays of light emanating from the eyes.

According to Al Hazen, the rays originate from the object of vision and not in the eye. Because of his extensive research on vision, he has been considered by many as the father of modern optics.



<http://home.att.net/~mleary/alhazen.htm>

## History Electron microscopy, a few dates 1

Dates	Names	Evenments8
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Discovered of $\lambda$ , wavelength $\lambda = \frac{h}{mv}$
1926	Busch	Focused an electron beam with a cylindrical magnetic lens – Electron optics
1931	Ruska & Knoll	Built the first EM
1935	Knoll	Development of SEM
1957	Cowley & Moodie	Theory of electron diffraction
1960-1970	Dupuy- Toulouse Osaka Japon	Very high voltage microscope 3MeV in France, 5MeV in Japan, for material science
1968	de Rosier & Klug	3D reconstruction theory of biological macromolecules from EM micrographs of biological macromolecules.
1975	Unwin & Henderson	Determination of the 3D structure of bacteriorhodopsin at 7Å resolution(specimen embedded in sugar)
1982	Dubochet & collègues	Preparation of macromolecules frozen-hydrated in vitrious ice for cryo-electron microscopy observation

History. Electron microscopy, a few dates 2

Dates	Names	Evenments8
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Discovered of $\lambda$ , wavelength
1926	Busch	Optical electronics and how to foc
1931	Ruska & Knoll	Built the
1935	Knoll	Develop



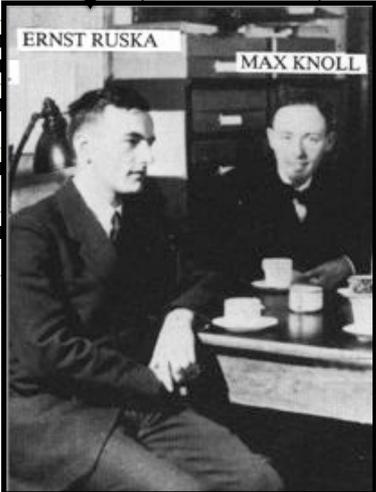
$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

*v is velocity*

**h = Planck's constant (6.624 X 10<sup>-34</sup> Joule.second)**  
**m = mass of an electron (9.11 X 10<sup>-28</sup> gram = 1/1837 of a proton)**  
**v = velocity of the electron**

History Electron microscopy, a few dates 3

Dates	Names	Evenments8
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Discovered of $\lambda$ , wavelength
1926	Busch	Focused an electron beam with a cylindrical magnetic lens – Electron optics
1931	Ruska & Knoll	Built the first EM
1935	Knoll	Development of SEM
1957	Rowley & Moodie	Theory of electron diffraction

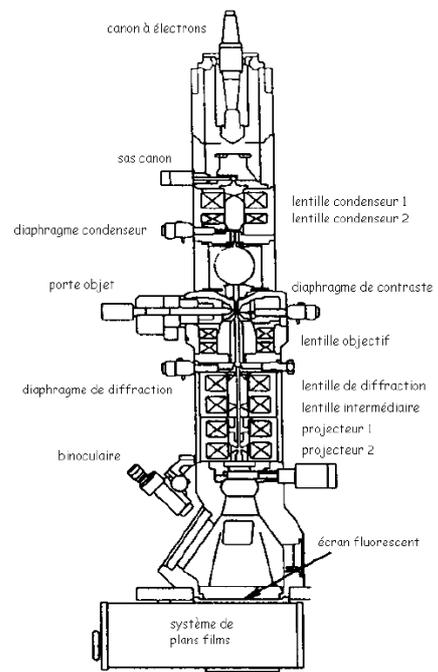
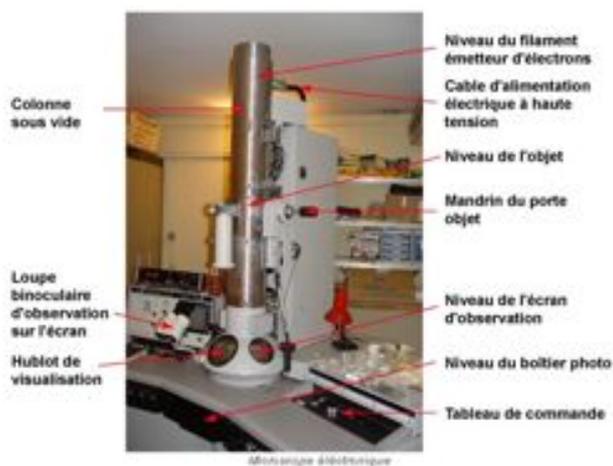




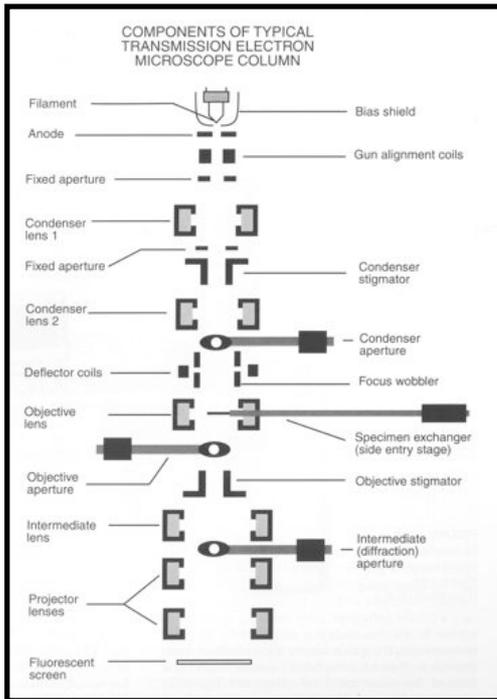
## History Electron microscopy, a few dates 4

Dates	Names	Evenments8
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Discovered of $\lambda$ , wavelength $\lambda = \frac{h}{mv}$
1926	Busch	Focused an electron beam with a cylindrical magnetic lens – Electron optics
1931	Ruska & Knoll	Built the first EM
1935	Knoll	Demonstrated the theory of the scanning electron microscope
1957	Cowley & Moodie	Theory of electron diffraction
1960-1970	Dupuy- Toulouse Osaka Japon	Very high voltage microscope 3MeV in France, 5MeV in Japan, for material science
1968	de Rosier & Klug	3D reconstruction theory of biological macromolecules from EM micrographs of biological macromolecules.
1975	Unwin & Henderson	Determination of the 3D structure of bacteriorhodopsin at 7Å resolution(specimen embedded in sugar)
1982	Dubochet & collègues	Preparation of macromolecules frozen-hydrated in vitreous ice for cryo-electron microscopy observation

## A quoi ça ressemble ?



## TEM design

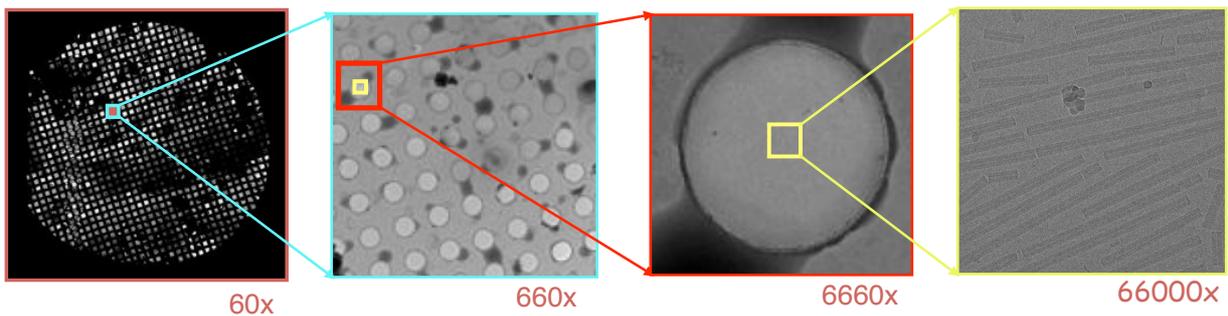


In actuality a modern TEM consists of many more components including a dual condenser system, stigmators, deflector coils, and a combination intermediate and dual projector lens.

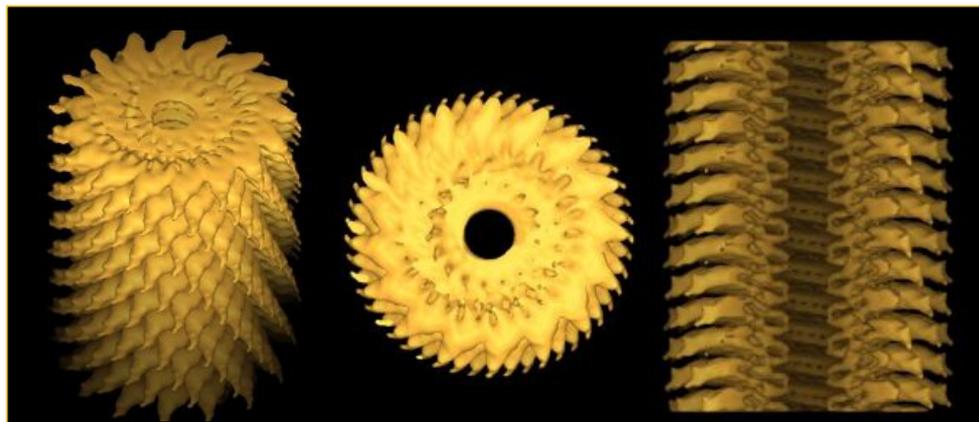


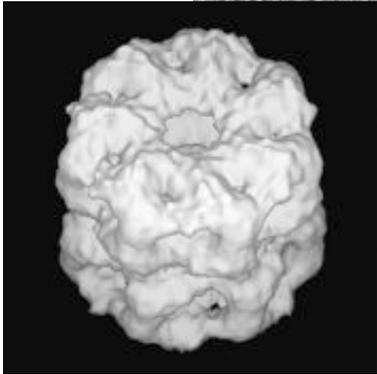
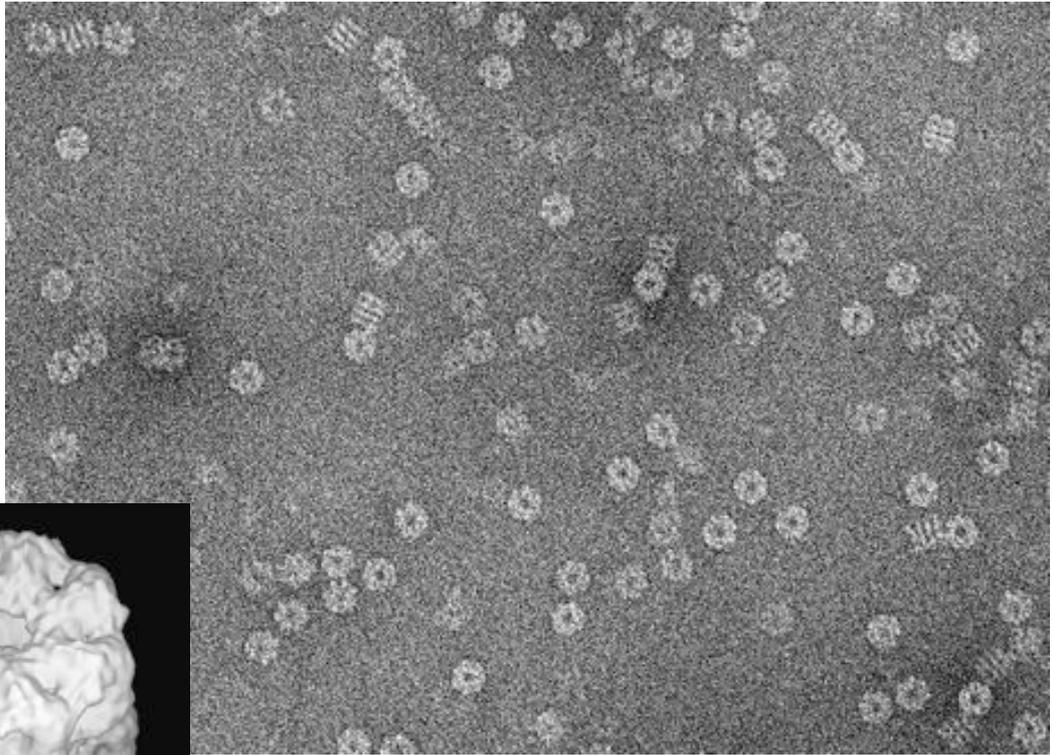
FEG 300 kV cooled with Helium

Si on associe la cryo-microscopie électronique sur spécimen congelé-hydraté avec l'analyse d'images



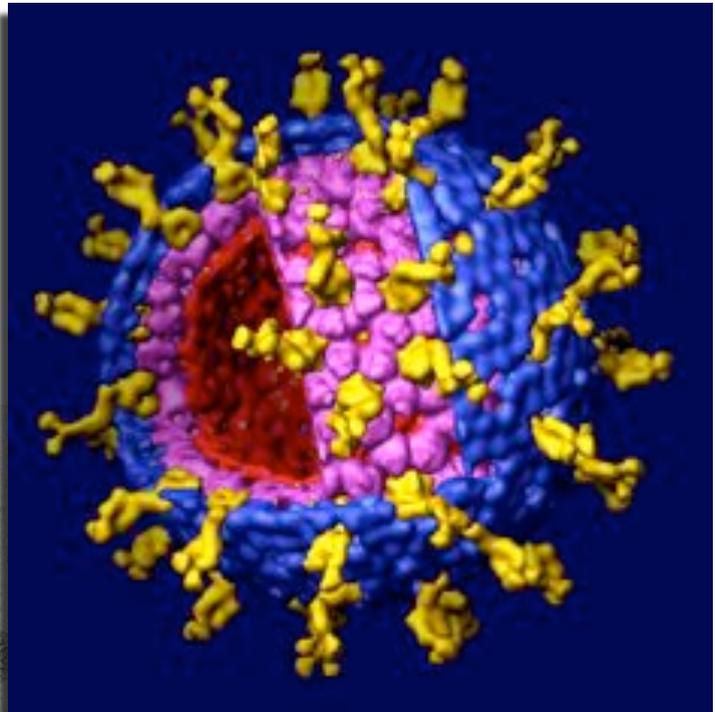
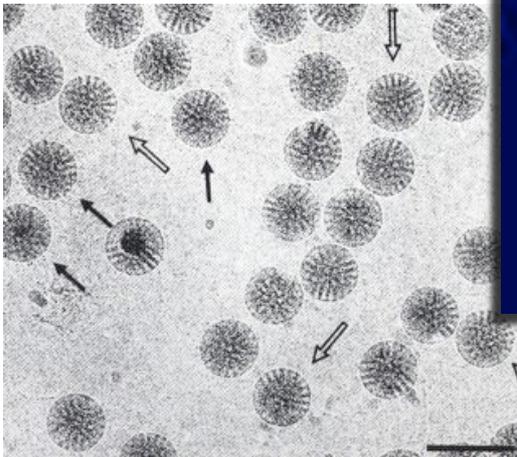
Bridget Carragher  
 Clint Potter  
 Ron Milligan  
Scripps Inst.  
San Diego



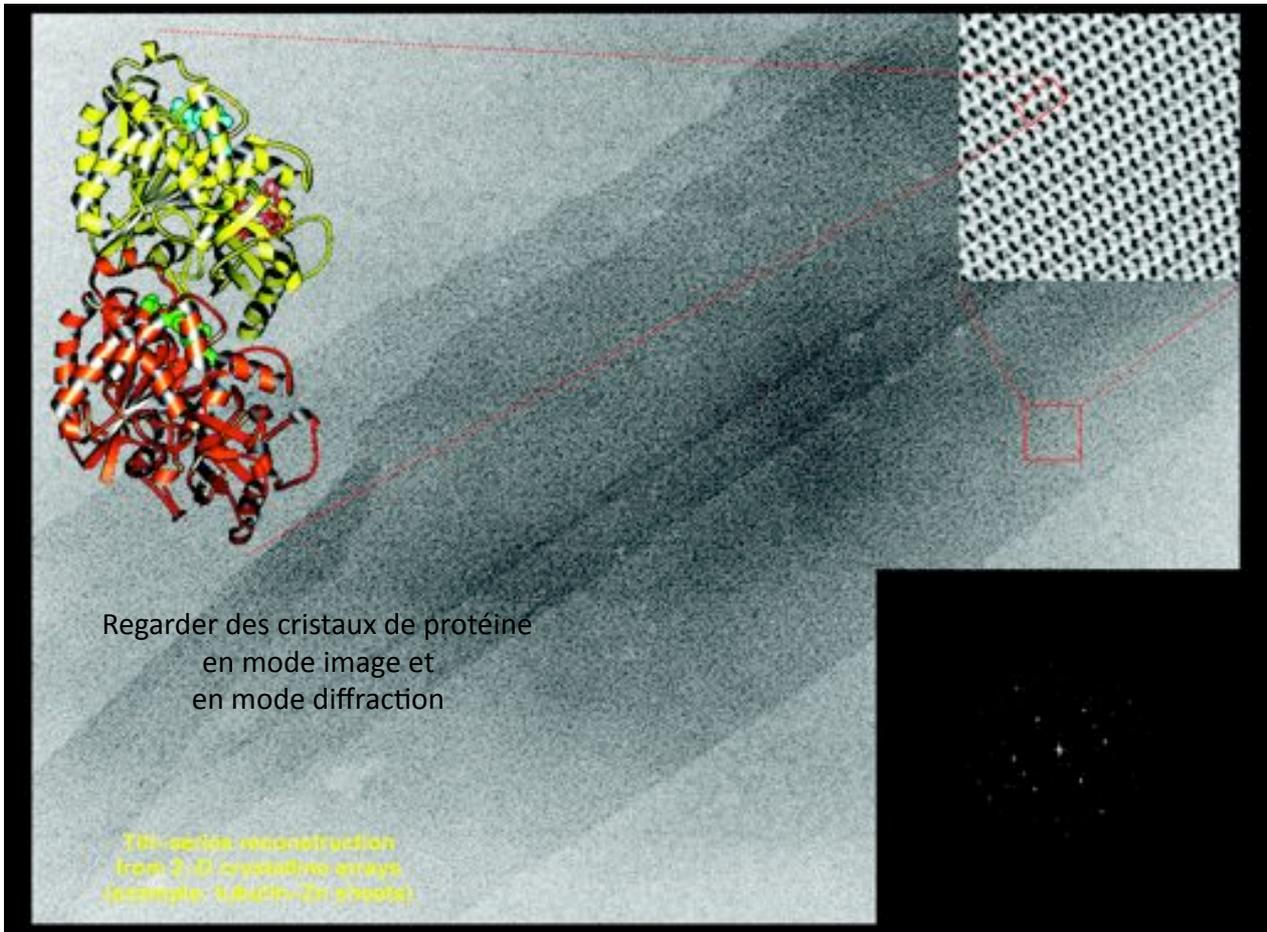


Observer des protéines en coloration négative  
(De Carlo et al.)

Observer et reconstruire  
des virus à partir d'images  
de cryo-microscopie

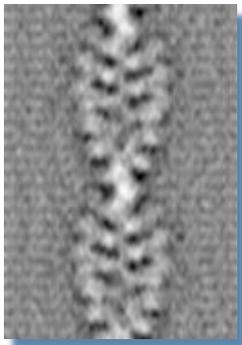


Rotavirus  
(Yeager Lab  
Scripps, San Diego)



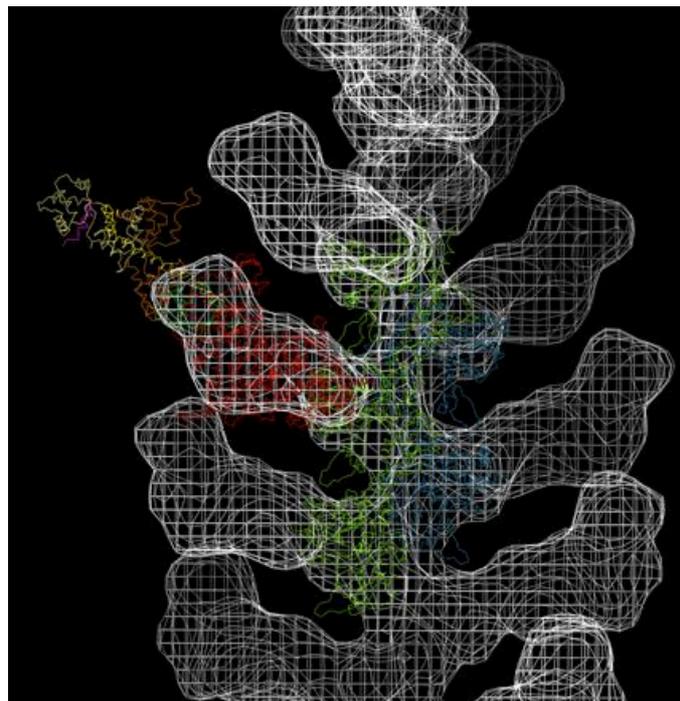
### Pour quoi faire ?

Pour relier la structure à la fonction en intégrant des informations provenant d'autres méthodes (cristallographie X, RMN)



Actin decorated with Dictyostelium S1

(Manstein Lab, Heidelberg  
Image: T. Wendt)



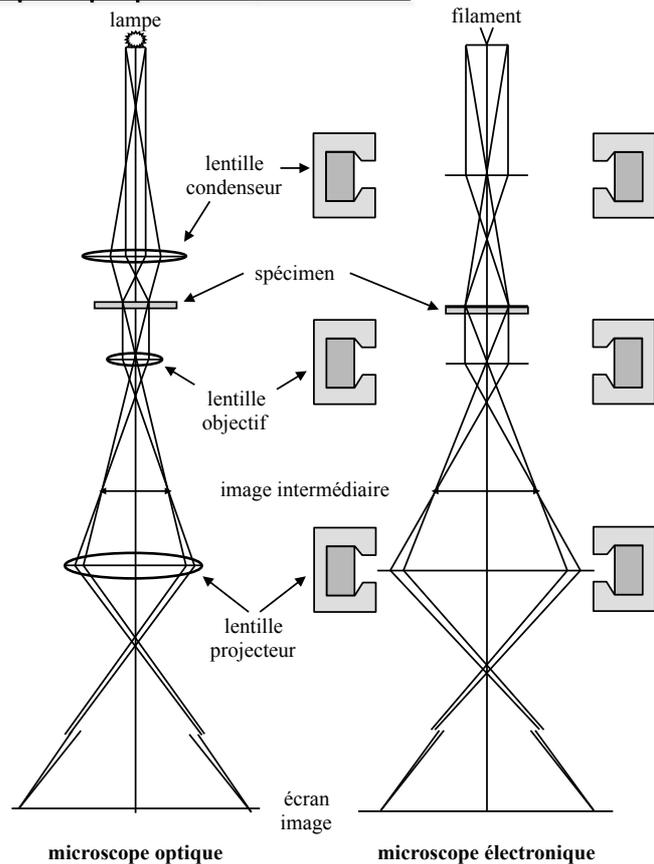
## Comparaison Microscopie optique-MET Similarités

1) **Système d'illumination:** Produit les radiations et les dirige sur le spécimen. Il est constitué d'une SOURCE qui émet les radiations, d'une lentille CONDENSEUR qui focalise le faisceau incident, permettant de faire varier l'intensité de l'illumination sur le spécimen.

2) **L'étage du spécimen:** situé entre les systèmes d'illumination et d'imagerie.

3) **Système d'imagerie:** Combinaison de lentilles qui produisent une image finale magnifiée du spécimen. Il contient (1) une Lentille OBJECTIF qui focalise le faisceau après qu'il soit passé au travers du spécimen, et qui forme une image intermédiaires du spécimen, et (2) de lentille(s) PROJECTEURS qui grossissent une portion de l'image intermédiaire pour former l'image finale.

4) **Système d'enregistrement:** Qui convertit les radiations en une image permanente sur support photographique (négatifs) ou numérique (caméras).

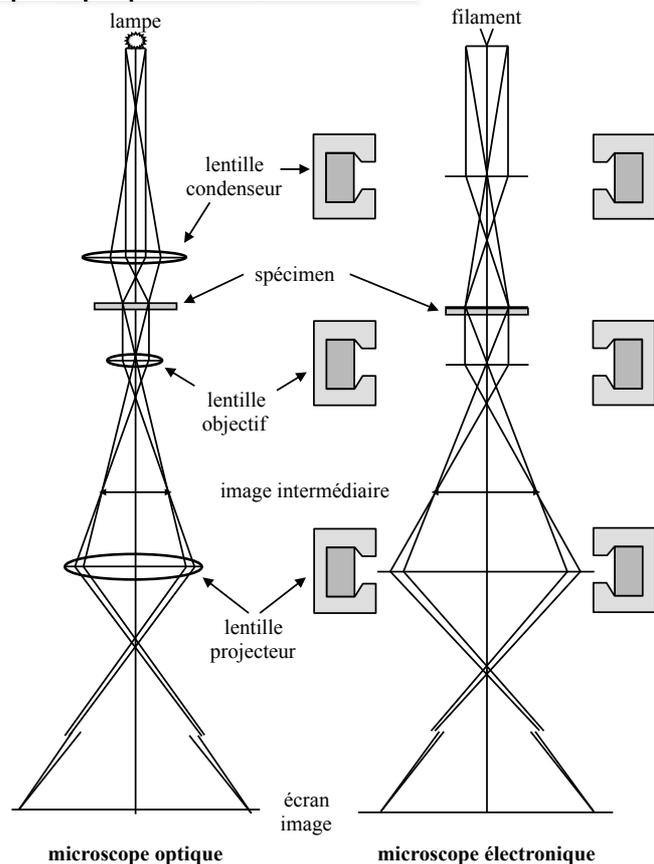


## Comparaison Microscopie optique-MET Différences

1) Les Lentilles optiques sont généralement faites de verre et ont une distance focale fixe, alors que les lentilles magnétiques sont constituées d'électro-aimants, dont la distance focale est variable en changeant l'intensité du courant qui traverse les bobines de cuivre.

2) En microscopie optique, le grossissement est modulé en changeant les lentilles objectif montées sur un disque rotatif au dessus de l'échantillon. Il peut aussi être modifié si les lentilles oculaires sont changées. Sur un MET le grossissement (distance focale) de la lentille objectif reste constant, et c'est en modifiant la distance focale des lentilles projecteurs qu'on fait varier le grossissement.

**DONC! Les performances d'un TEM dépendent principalement de la qualité de sa lentille objectif.**



## Comparaison Microscopie optique-MET Différences

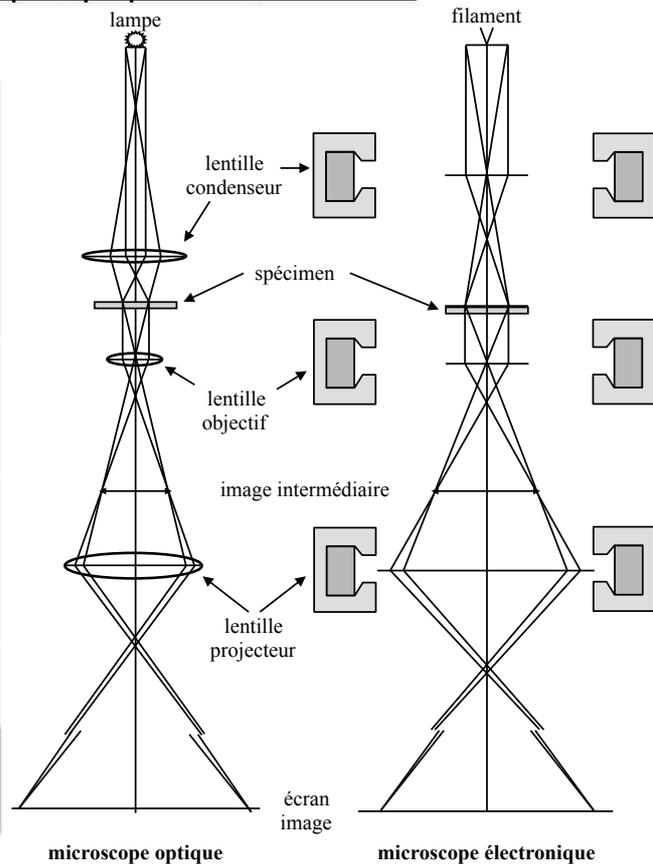
3) Le Microscope Optique a une faible profondeur de champ, ainsi on peut focaliser et voir différents niveaux d'un même échantillon (application directe la microscopie confocale). La (relative) grande profondeur de champ du M.E.T. permet de visualiser entièrement un échantillon (mince < 100 nm).

4) Sur un Microscope Optique la source est généralement située en bas, alors que sur le M.E.T. la source est en haut de l'instrument.

5) Le M.E.T. fonctionne à très haut vide pour permettre le passage électrons, donc les spécimens biologiques sont souvent déshydratés (pas d'observation *in vivo*).

6) Le faisceau d'électron du MET détruit rapidement les échantillons biologiques.

7) Plus grand pouvoir de résolution du microscope électronique. Les longueurs d'ondes diffèrent d'un facteur de plusieurs milliers



## La résolution

**Limite de résolution d'un instrument** liée à la nature ondulatoire du rayonnement, phénomène de diffraction Disque d'Airy

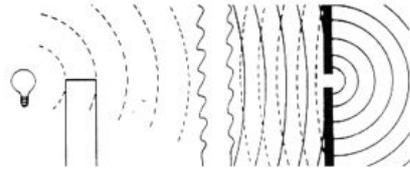
**Pouvoir de résolution** ou pouvoir séparateur mesure la distance transversale minimale entre deux points dont les taches de diffraction peuvent être séparées critère de Rayleigh

**La résolution** sera toujours égale ou inférieure au pouvoir de résolution, et c'est une valeur qui va dépendre des conditions expérimentales d'observation

# Image idéale, Image réelle

Image idéale: Un système optique idéal produit une image exacte de l'objet où chaque point de l'objet est reproduit correctement. Le phénomène de diffraction rend malheureusement le phénomène impossible.

Image réelle: Le phénomène de diffraction provient de l'inflexion du trajet de la lumière au passage à proximité d'un obstacle. Le bord de l'obstacle se comporte alors lui-même comme une source lumineuse. Si la lumière est suffisamment cohérente, on voit apparaître des franges d'interférence sur l'image.

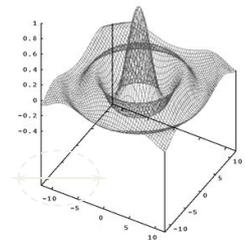
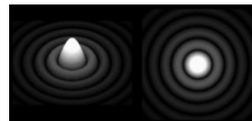


Des franges d'interférences entre la lumière diffractée par la fente et l'onde d'origine, au bord d'une fente.

## La limite de résolution, disque d'Airy

En réalité, chaque point est représenté par un disque de diffusion (Disque de Airy) dans le plan de l'image.

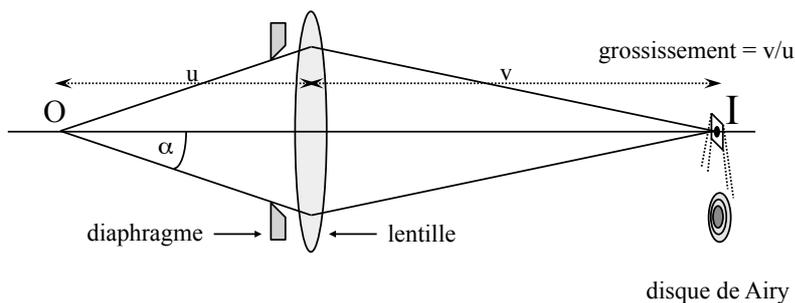
-Ce disque de diffusion est due au phénomène de **diffraction induit par le diaphragme de la lentille**



$\lambda$  = longueur d'onde  
 $n = 1$  indice de réfringence  
 $\alpha$  = demi-angle d'ouverture

$$d = \frac{1,21 \lambda}{n \sin(\alpha)}$$

- Son diamètre est inversement proportionnel au diamètre de l'ouverture
- $d \propto 1/\text{diamètre de l'ouverture}$  donc pour avoir un disque aussi petit que possible Il faut utiliser une grande ouverture
- Le spot central est le plus intense  $\sim 84\%$  de l'intensité totale.-



## Pouvoir de résolution Critère de Rayleigh

Critère de Rayleigh: La plus petite distance entre deux disques de Airy pour qu'ils apparaissent partiellement séparés

-Le maximum de l'intensité du disque d'Airy coïncide avec le premier minimum de l'autre disque d'Airy

-la plus petite distance est égale au ½ diamètre du disque.

Cette distance  $d = \frac{1}{2} D$  correspond à :

$$d = 0,61 \lambda / n \sin(\alpha)$$

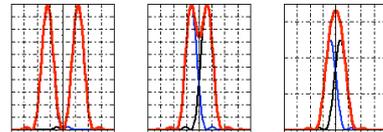
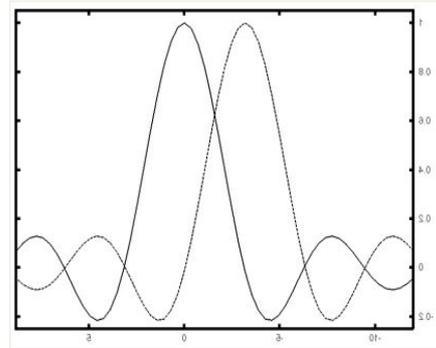
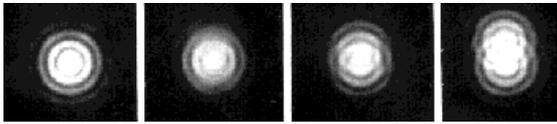
$$\lambda_{100\text{keV}} = 0,0037 \text{ nm} = 0,037 \text{ \AA}$$

$$n = 1$$

$$\sin(\alpha) = 0,05$$

$$r = 0,02 \text{ nm} (0,2 \text{ \AA}) \text{ plus petit que la taille d'un atome !!!!}$$

En fait la résolution est limitée à 1 Å du aux pbms d'aberration des lentilles



## Transmission Electron Microscopy

$$\lambda \approx (150 / V)^{1/2} \text{ Angstroms}$$

Substituting 200 eV for V gives  $\lambda$  a of 0.87 Angstroms

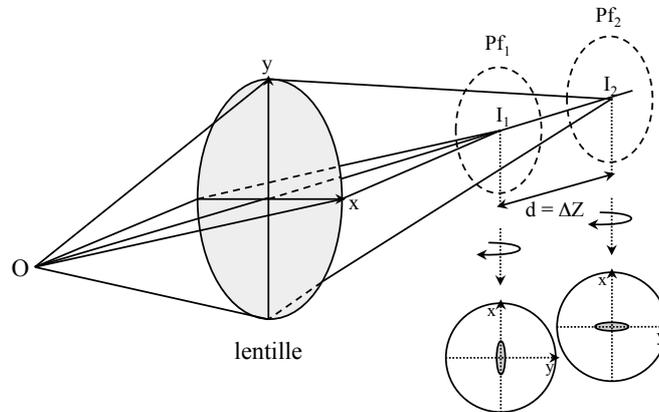
For a beam of 100 KeV we get a wavelength of 0.0389 and a theoretical resolution of 0.0195 Angstroms!

But in actuality most TEMs will only have an actual resolution 2.4 Angstroms at 100KeV

## Les défauts des lentilles

### Astigmatisme

Comme en optique, une lentille astigmatique converge plus ou moins bien en X et en Y. Au lieu de produire une image ponctuelle, **un point produit une image oblongue horizontale ou verticale suivant le plan focal considéré.**

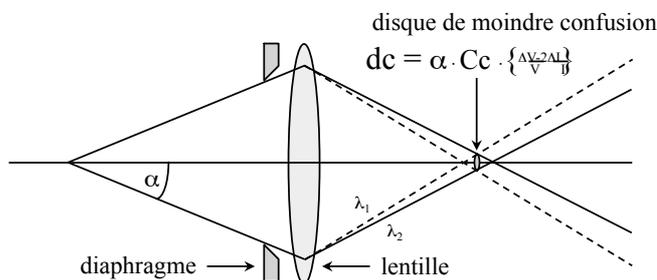


Ici l'observateur peut corriger l'astigmatisme en équilibrant le courant passant dans les lentilles électromagnétiques multipolaires.

## Les défauts des lentilles

### L'aberration chromatique

**Des électrons de différentes longueurs d'ondes (vitesses différentes), provenant d'un même point objet, ne vont pas être focalisés dans le même plan image.** Ici aussi, il y a formation de trajectoires coniques avec un disque de moindre confusion :



$Cc$  = Constante d'aberration de chromaticité  
 $\alpha$  = demi-angle d'ouverture  
 $\Delta v/v$  = Variations de tension d'accélération  
 $\Delta I/I$  = Variations d'intensité de la cathode

Pour des échantillons minces, l'aberration chromatique reste faible ( $dc \sim 0.1$  nm).

Trois causes induisent des variations de longueurs d'ondes:

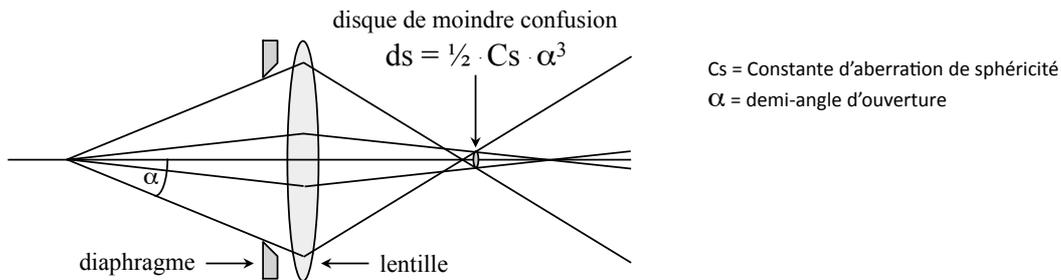
- des fluctuations dans les circuits de haute tension (normalement moins de  $1 \cdot 10^{-5}$  volts).
- des variations de vitesse des électrons émis par la cathode ( $\pm 3.5$  parties/million)
- des pertes d'énergie dues aux chocs inélastiques des électrons avec le spécimen.

## Les défauts des lentilles

### L'aberration de sphéricité des lentilles ( $C_s$ )

C'est l'un des principaux facteurs limitant la résolution des microscopes électroniques. Historiquement, pour la microscopie optique ce problème venait d'un défaut de polissage des lentilles en verre, d'où le nom d'aberration de sphéricité. Dans les lentilles électromagnétiques on observe un défaut similaire.

**Les électrons passant près du centre de la lentille sont moins déviés de leurs trajectoires que des électrons passant près des bords de la lentille.**

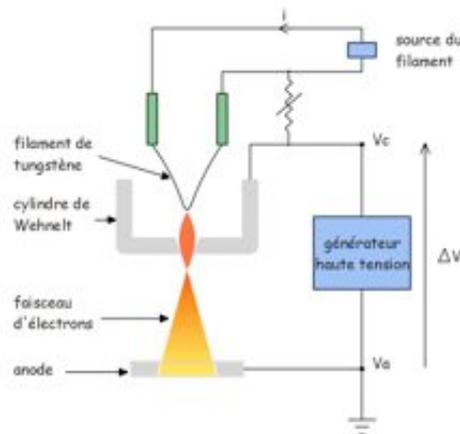


Ainsi un objet ponctuel produit une série de trajectoires coniques. Et l'enveloppe de ces diverses trajectoires possède un diamètre minimum qu'on nomme le disque de moindre confusion  $ds$ .

## Microscopie électronique et éléments de construction

La source d'électrons, le canon à électrons

**Emission thermique, tungstène**



- Le filament de tungstène est chauffé à une température voisine de 2700°C.
- Les électrons sont extraits du métal et forment un nuage entourant le filament.
- L'électrode de **Wehnelt** est portée à un potentiel négatif de quelques centaines de Volts par rapport au filament, pour réunir les électrons en un point finement focalisé, le cross-over.
- Les électrons émis par le filament ont des vitesses variables mais faibles (0,2 V).
- Les électrons sont ensuite accélérés en direction de l'anode par la haute tension (plusieurs centaines de milliers de volts).

# Microscopie électronique et éléments de construction

La source d'électrons, le canon à électrons

**Emission thermique, tungstène et LaB6 (source plus cohérente)**



	T°C d'utilisation	Energie fournie pour franchir le mur de potentiel (eV)	Dispersion en énergie (eV)	Pression du vide (mbar)	Brillance (A/sr.cm <sup>2</sup> ) (sr :stéradian unité d'angle solide)
Filament de tungstène	2700	4,1	Environ 1	<10 <sup>-4</sup>	5.10 <sup>8</sup>
Filament de LaB6	1500	2,5	1 - 0,6	10 <sup>-6</sup> à 10 <sup>-8</sup>	5.10 <sup>9</sup> à 10 <sup>10</sup>



Une pointe de monocristal d'hexaborure de Lanthane (LaB6) accrochée à un filament en carbone

Remarque : par rapport au filament de tungstène, le filament de LaB6 délivre un flux de courant environ 30 fois supérieur à partir d'une zone émissive plus réduite.

# Microscopie électronique et éléments de construction

La source d'électrons, le canon à électrons

**Emission de champ**

Le canon à émission de champ utilise à nouveau une pointe de tungstène, mais l'effet de champ électrique très intense revient à créer une source virtuelle d'électrons en dehors de cette pointe. Ce type de source très cohérente nécessite un vide très poussé (technologie chère) mais la cohérence et la luminosité du faisceau sont incomparables.

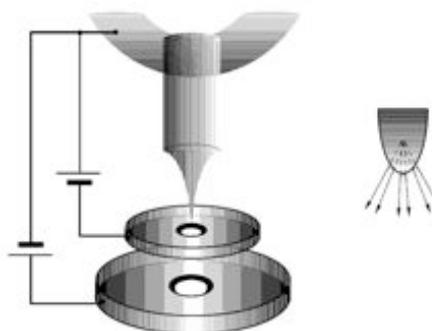
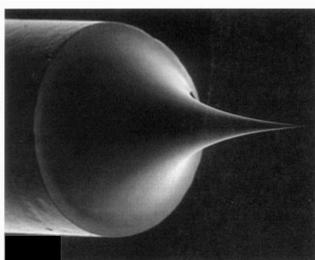
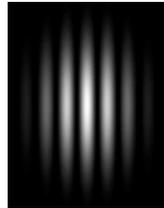
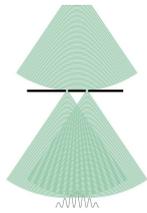


Figure III.2 L'émission d'électrons à partir de la pointe dans une source à effet de champ.

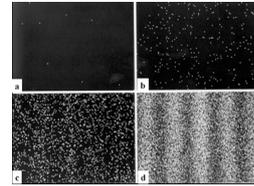
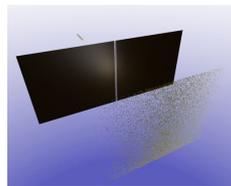
# La formation de l'image

**La dualité onde-particule:** Principe selon lequel tous les objets de l'univers microscopique présentent simultanément des propriétés d'ondes et de particules. Fondement de la mécanique quantique

Ondes



Particules



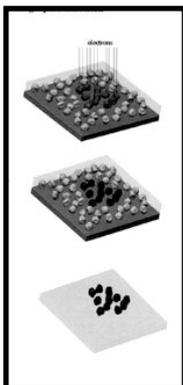
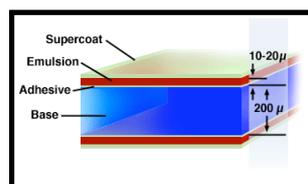
Comportement ondulatoire de la lumière

Aspect corpusculaire de la lumière

Fentes d'Young

## Capturing images

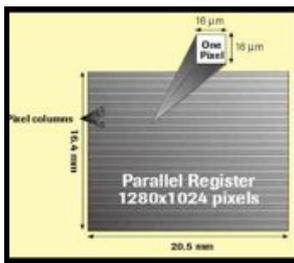
- 1) Phosphorescent screen
- 2) Micrographs( silver halide grains embedded in an emulsion)



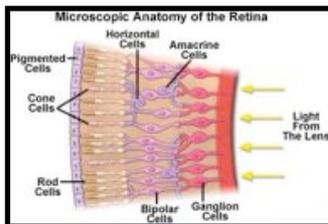
Some of the halide grains will become exposed due to the energy of the transmitted electrons striking them. Upon development these exposed grains become deposited as metallic silver. This is the "latent" image. After fixation unexposed (and thus undeveloped) silver grains are removed from the emulsion by a process known as fixation.

## Capturing images-2

### 3) CCD camera (Charge Coupled Device camera)



The CCD is comprised of many individual signal capture units, each of which corresponds to a single pixel in the final digital image.



In fact the design of most CCDs is more similar to that of the human retina which is an array of light sensing neurons.

### Micrographs versus CCD camera

- High quantum efficiency
- Large dynamic range
- High linearity

Micrographs are still better at high frequency compared with CCD camera

## La formation de l'image

Comportement d'un électron à haute énergie au voisinage d'un atome

3 cas:

1) **Electron transmis non diffusé**, ne "voit" pas l'échantillon

2) **Electron diffusé élastiquement, déflécté.**

- Interaction avec un atome de l'échantillon
- Pas de changement d'énergie.  $\lambda$  ne change pas due à la masse très élevée du noyau comparée à la masse de l'électron
- La phase change
- Sa trajectoire est déviée de façon importante ( $10^{-2}$  radian,  $0.5^\circ$ )

3) **Electron diffusé inélastiquement, déflécté**

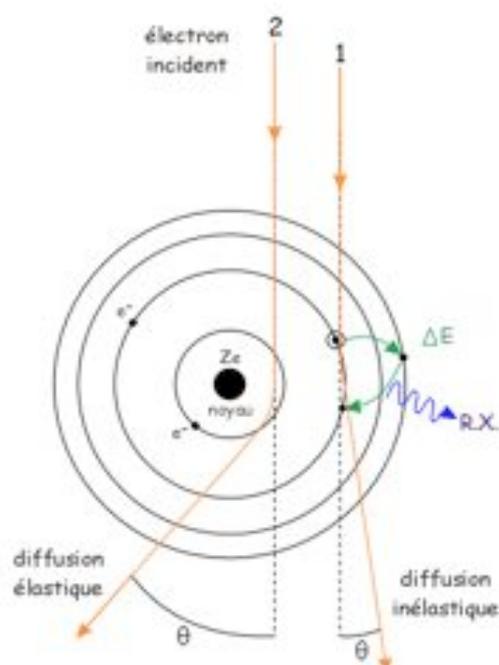
- Interaction avec les  $e^-$  lors de la traversée du nuage des orbitales  $e^-$
- Communication d'énergie par collision (10-20 eV). Les  $e^-$  passent d'un niveau à l'autre ou sont éjectés
- Sa trajectoire est déviée légèrement ( $10^{-4}$  radian)

**La proportion de collisions élastiques et inélastiques dépend de la tension d'accélération des électrons et de la nature de l'échantillon.**

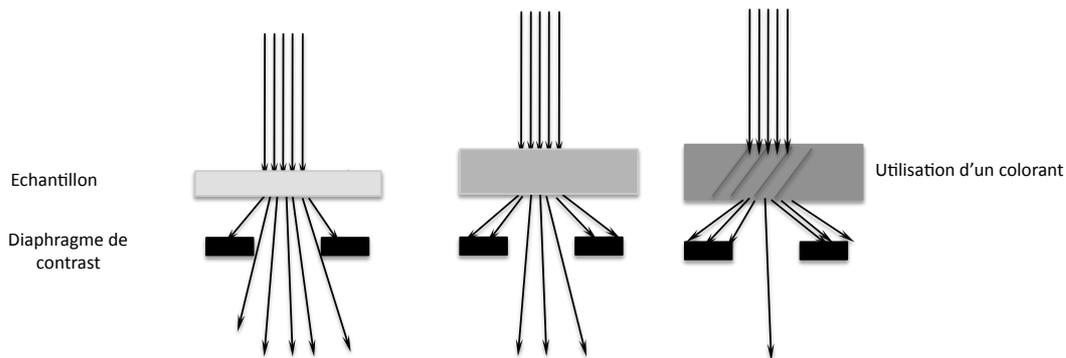
Soit un échantillon constitué d'un film de carbone de 50 nm d'épaisseur illuminé par un faisceau d'électrons sous une tension d'accélération de 50 kV,

- 34% des électrons ne sont pas déviés,
- 11% des électrons subissent une diffusion élastique
- 55% des électrons subissent des chocs inélastiques.

Les chocs inélastiques diminuent lorsque l'on augmente la tension d'accélération des électrons



## Contraste d'amplitude (électrons diffusés élastiquement)



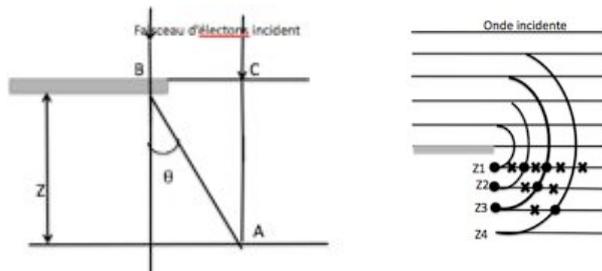
- Le nombre d'électrons défectés augmente avec l'épaisseur du spécimen
- Le contraste d'amplitude est créé par l'introduction d'un diaphragme à la sortie de l'échantillon pour sélectionner une partie des électrons diffusés et transmis
- On peut donc discriminer deux points sur l'échantillon dont le pouvoir diffuseur est différent
- Le pouvoir diffuseur: nature des atomes constitutifs, nombre des ces atonmes, épaisseur locale
- La matière biologique, est composée d'atomes légers C, H,O et N des atomes lourds sont souvent utilisés pour augmenter le contrast

### Remarques:

- L'utilisation d'un petit diaphragme augmente le contraste (mais diminue la résolution)
- L'utilisation d'en voltage plus élevé cause une perte du contraste d'amplitude de l'image

## Contraste de phase Electrons non diffusés et diffusés élastiquement

Les électrons diffusés élastiquement et qui passent à travers l'ouverture du diaphragme objectif contribus aussi au contraste car ils peuvent interférer constructivement avec les électrons non diffusés on a formation des **franges de Fresnel**



- Dans le plan focal, il n'y a pas de contraste de phase
  - Quand on défocalise, on change le plan focal. IL n'y a pas de changement de phase des ondes électroniques transmises non diffusés par contre, les phase des ondes diffusées varie beaucoup et dépendent de la valeur du focus.
  - Les ondes diffusées sont alors en phase ou non avec les ondes transmises, et une différence d'amplitude apparaîtra sur l'image.-
  - BA diffusé par le specimen interagit avec CA non diffusé On peut calculer la différence de chemin  $\Delta$  entre les 2 faisceaux
- $$\Delta = \frac{Z}{\cos\theta} - Z + \Psi$$
- Quand  $\Delta = a$  un nombre entier de l, on aura un max d'intensité et pour un nombre impair de  $\lambda/2$  un minimum d'intensité

Z= distance du plan focal

Différence de marche du au passage à travers le spécimen

## Contraste de phase

### Electrons non diffusés et diffusés élastiquement

Le contraste de phase est :

- Indépendant de la présence d'ouverture d'objectif.
- Dépendent seulement légèrement du voltage d'accélération et du nombre atomique des atomes qui diffusent
- Permet la visualisation des détails du spécimen composé d'éléments à faible nombre atomique qui ne donnerait pas lieu à un contraste d'amplitude.
- Le risque lorsque la phase change est que l'on passe à travers le plan focal, on a donc une inversion du contraste.

#### Rappel contraste d'amplitude et contraste de phase:

- Le contraste d'amplitudes des électrons diffusés élastiquement sont stoppés par l'ouverture de l'objectif.
- Le contraste de phase des électrons élastiques passent au travers de l'ouverture et interfèrent avec les faisceaux non diffusés.

En général, le contraste d'amplitude est dominant pour les structures larges.

Le contraste de phase est important pour les petites structures et devient en fait la seule source de contraste pour de petits objets avec un petit nombre atomique.

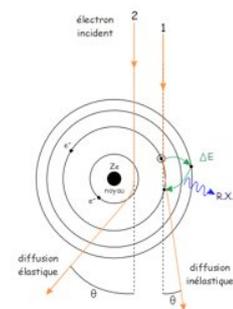
En coloration négative : la contribution contraste amplitude = 37%

En cryo microscope : la contribution contraste d'amplitude = 7%

On peut jouer sur différents éléments pour augmenter le contraste : augmenter le voltage et diminuer l'ouverture de l'objectif. Cependant à bas voltage, il y a un problème d'aberration chromatique qui implique une perte de brillance et une perte de résolution de même l'utilisation du diaphragme diminue la résolution.

## La diffusion inélastique

- Un électron interagit avec les électrons de l'atome, il y a interaction entre 2 entités d'une même masse donc énergie transmise à l'un des électrons des orbitales électroniques
- L'énergie perdue: 10 à 20eV pas plus de 100 eV
- IL ya a une variation de l et d'
- Plus l'échantillon est fin moins il y a de diffusion inélastique
- Ces électrons sont diffusés avec des petits angles ( $10^{-4}$  radian) donc passent tous par l'ouverture du diaphragme objectif.



### Problèmes liés à la diffusion inélastique

- Ils contribuent au bruit de fond, perte de finesse de contrast et de la qualité de l'image
- Formation de radicaux libres très réactifs , réarrangement moléculaires, perte de masse du spécimen

#### Irradiation du spécimen, dégradation

$$\frac{N_e}{N_i} \approx \frac{Z}{20}$$

Z = nombre atomique pour un objet biologique,  $N_i > N_e$

### Avantages liés à la diffusion inélastique (microscopie EELS, MEB)

#### Ou comment tirer profit de la diffusion inélastique

- Suite à cette interaction, l'atome est ionisé (un électron est éjecté). La désexcitation se fait par des sauts électroniques de façon à ce que l'atome retrouve sa configuration stable. L'atome restitue l'énergie acquise sous forme de photon X quand un électron de l' orbitale extérieure retombe sur l'orbitale de l'électron éjecté. Ce photon X a une énergie caractéristique de l'atome ionisé. On pourra mesurer les énergies des photons X réémis par l'échantillon pour déterminer la composition chimique de l'échantillon (microanalyse).

- L'interaction électron/matière engendre d'autres phénomènes que l'on utilise en **microanalyse** (EELS) ou en microscopie à balayage (MEB) pour déterminer la composition ou l'état de surface de l'échantillon.