

Etat de l'art et actualités en microscopie X

Jean Susini

European Synchrotron Radiation Facility, BP220, 6, rue Jules Horowitz, 38043 Grenoble

Résumé - Cet exposé fera le point sur les évolutions récentes en microscopie X tant sur le plan instrumental que sur celui des applications. L'accent sera plus particulièrement mis sur les nouveaux développements dans la gamme des rayons X durs, tels que développés à l'ESRF. Deux configurations seront considérées : le mode imagerie avec ou sans optique et le mode microsonde à balayage couplée à des techniques de spectroscopie d'absorption X et de fluorescence X. Les avantages et inconvénients des microscopies X seront discutés et illustrés à l'aide d'exemples d'applications.

1. Introduction

Dès la découverte des rayons X par Röntgen en 1896, la possibilité de faire de l'imagerie avec des photons de très courtes longueurs d'onde a motivé un grand nombre de développements visant à faire de la microscopie X une alternative à la microscopie électronique. Les absences concomitantes d'optiques X performantes et de sources X intenses, ont fait que ces efforts sont restés infructueux et que la microscopie X n'a pas connu l'essor espéré en particulier en comparaison avec le développement considérable de la microscopie électronique et visible. Depuis une quinzaine d'années, le contexte a considérablement évolué. La microscopie X bénéficie aujourd'hui de sources synchrotrons dites de troisième génération qui offrent une grande brillance (10 ordres de grandeur plus intense qu'un tube à rayons X classique), une grande extension en longueur d'onde, un contrôle de la polarisation ainsi que de la cohérence. Les microscopes X actuels utilisent des optiques perfectionnées, produits des techniques modernes de microélectronique, qui permettent d'atteindre des résolutions inférieures à 50nm [1-3]. Enfin, le développement de nouveaux détecteurs X pour l'imagerie médicale et l'astrophysique apparaît comme un facteur d'évolution supplémentaire.

2. Deux régions spectrales distinctes

Deux domaines spectraux distincts sont à considérer. Ils diffèrent non seulement par leur instrumentation (monochromateurs, lentilles, détecteurs) mais aussi par leurs domaines d'application qui sont intrinsèquement liés aux spécificités des interactions rayonnement-matière [4].

Le domaine des *X mous* s'étend environ de 200 à 1500 eV. Ce domaine inclut d'une part la *fenêtre de l'eau*, région spectrale comprise entre le seuil K du carbone (284 eV) et celui de l'oxygène (543 eV), dans lequel le rayonnement est faiblement absorbé par l'eau (pénétration de plusieurs microns), mais assez fortement absorbé par la matière organique pour obtenir un contraste naturel sur des objets hydratés et n'ayant subi qu'un minimum de préparation. L'autre extrémité du domaine spectral, autour de 1 keV, est très riche pour la spectroscopie car il contient les seuils K de quelques éléments de grande importance biologique mais aussi les seuils L des éléments de transition et les seuils M des terres rares. Les contrastes d'absorption et de phase étant ici les mécanismes de base pour l'imagerie. Les applications vont de la biologie en milieu hydraté jusqu'à l'analyse de polymères. Cependant l'imagerie tridimensionnelle d'échantillons biologiques reste encore aujourd'hui l'un des objectifs majeurs de la microscopie X dans la fenêtre de l'eau [5]. Les avantages et les inconvénients de la microscopie en biologie sont discutés en détail dans les références [6, 7]. En parallèle aux projets utilisant le rayonnement synchrotron, des projets de microscope X de laboratoire sont également à l'étude [8].

Le domaine des *X durs* couvre approximativement une région spectrale entre 2 keV et 50 keV. Les contrastes privilégiés sont la fluorescence X et les effets de phase. La très grande pénétration des X durs associée à la grande longueur focale des optiques en font une microsonde idéale pour les études *in-situ*, qui nécessitent des environnements contrôlés (température, pression, hydratation, pH, ...). Les instruments récents se caractérisent par une approche multimodale combinant plusieurs types de détecteurs allant de la micro-diffraction, micro-fluorescence et micro-spectroscopie [9] (voir figure 1). L'utilisation de faisceaux monochromatiques, polarisés permet des seuils de détection très inférieurs au ppm et limite aussi les effets radiatifs. Les techniques émergentes sont la fluorescence X tridimensionnelle [10], la détection de métaux traces et la cartographie chimique appliquées à des domaines aussi variés que la biologie, les sciences des matériaux, l'archéologie et les sciences de l'environnement.

3. Une nouvelle approche: « Coherent X-ray Diffraction Imaging - CDI »

L'évolution de la microscopie vers des résolutions latérales nanométriques reste encore limitée par les lentilles de focalisation. Leurs efficacités et leurs ouvertures numériques restent trop faibles pour atteindre des résolutions inférieures à 10nm. Par ailleurs la profondeur de champ (de l'ordre de 1 μ m) et la longueur focale (300 μ m) limiteront, dans tous les cas, l'épaisseur des échantillons et la possibilité d'analyse *in-situ*. Ces limitations ont motivé le développement de nouvelles approches qui s'affranchissent en grande partie de l'utilisation de lentilles. L'une des plus prometteuses est basée sur la combinaison de l'analyse d'images de diffraction ou de

speckle, obtenues sur les échantillons non-périodiques, en éclairage cohérent [12]. Contrairement au cas d'un éclairage en lumière incohérente, la diffraction en mode cohérent contient non seulement l'information sur l'amplitude mais aussi sur les variations de phases. La reconstruction dans l'espace réel est alors réalisée par divers algorithmes de sur-échantillonnage utilisant des contraintes initiales [13]. La démonstration expérimentale a été réalisée avec succès sur des systèmes biologiques [14] et des matériaux durs [15]. Il a été montré que la morphologie tri-dimensionnelle est accessible à des résolutions de l'ordre de 7nm.

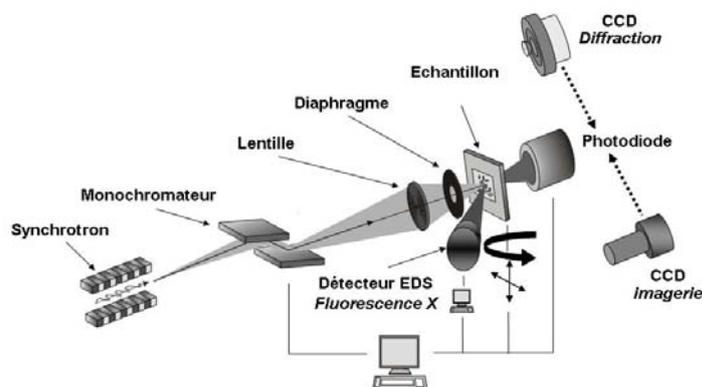


Figure 1: schéma de principe d'une ligne de lumière synchrotron moderne utilisant une microsonde X.

4. Références

- [1] W. Chao, B. Harteneck, J. Liddle, E. Anderson, et D. Attwood, Soft x-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm, *Nature* **435** (2005) 1210-1213.
- [2] H. Mimura, H. Yumoto, S. Matsuyama, Y. Sano, K. Yamamura, Y. Mori, M. Yabashi, Y. Nishino, K. Tamasaku, T. Ishikawa et K. Yamauchi, *Efficient focusing of hard x rays to 25 nm by a total reflection mirror*, *Applied Physics Letters*, **90** (2007) 051903-051906.
- [3] H. Kang, J. Maser, G. Stephenson, C. Liu, R. Conley, A. Macrander et S. Vogt, Nanometer linear focusing of hard X rays by a multilayer Laue lens, *Physical Review Letters* **96** (2006) 127401-127044.
- [4] M. Howells, C. Jacobsen et T. Warwick, *Principles and applications of zone plate X-ray microscopes*, *Science of Microscopy*, Eds. Peter W. Hawkes & John C.H. Spence, XXXVI, Berlin, Springer (2007).
- [5] C.A. Larabell et M.A. Le Gros, *X-ray tomography generates 3D reconstruction of the yeast, Saccharomyces cerevisiae, at 60 nm resolution*, *Mol. Biol. of the Cell* **15** (2004) 957-962.
- [6] R. Henderson, *The potential and limitations of neutrons, electrons, and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules*, *Q. Rev. Biophys.* **28** (1995) 171-193.
- [7] J. Kirz, C. Jacobsen, et M. Howells, *Soft X-ray microscopes and their biological applications*, *Q. Rev. Biophys.* **28** (1995) 33-130.
- [8] J.F. Adam, J.P. Moy et J. Susini, *Top table water window transmission x-ray microscopy: Review of the key issues and conceptual design of an instrument for biology*, *Review of scientific instruments* **76** (2005) 0910301-0910315.
- [9] A. Manceau, M. A. Marcus, et N. Tamura, *Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques*, *Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Sciences* **49** (2002) 341-428.
- [10] J. Susini, *Synchrotron Based X-ray Microscopy and Micro-Spectroscopy: Multidisciplinary Tools*, *Microscopy and Microanalysis* **11** (2005) 678-679, Cambridge University Press.
- [11] B. Golosio, A. Somogyi, A. Simionovici, P. Bleuet, L. Lemelle et J. Susini, *Non destructive Three-dimensional elemental micro-analysis by combined helical X-ray micro-tomographies*, *Applied Physics Letters* **84** (2004). 2199-2201.
- [12] D. Sayre et H. N. Chapman, *X-ray microscopy*, *Acta Crystallogr.* **A 51** (1995) 237-252.
- [13] J. Miao, P. Charalambous, J. Kirz, et D. Sayre, *Extending the methodology of X-ray crystallography to allow imaging of micrometre-sized non-crystalline specimens*, *Nature* **400** (1999) 342-344.
- [14] D. Shapiro, P. Thibault, T. Beetz, V. Elser, M. Howells, C. Jacobsen, J. Kirz, E. Lima, H. Miao, A. M. Neiman, et D. Sayre, *Biological imaging by soft x-ray diffraction microscopy*, *PNAS* **102** (43) (2005) 15343-15346.
- [15] G. J. Williams, M. A. Pfeifer, I. A. Vartanyants et I. K. Robinson, *Three-dimensional imaging of microstructure in gold nanocrystals*, *Phys. Rev. Lett.* **90** (2003) 175501-175506.