UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DES SCIENCES

DÉVELOPPEMENT DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE POUR LA CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE COLLOÏDES AQUATIQUES

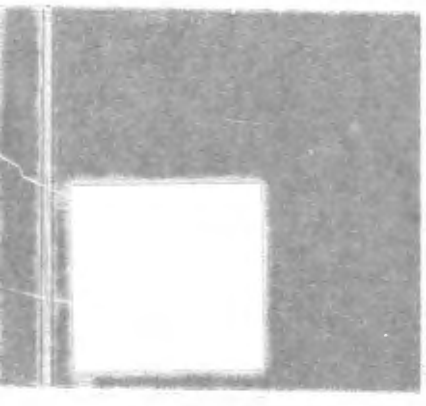
THÈSE DE DOCTORAT

PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

PAR
DENIS MAVROCORDATOS

DIPLÔMÉ EN CHIMIE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

LAUSANNE
1997



UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DES SCIENCES

DÉVELOPPEMENT DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE POUR LA CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE COLLOÏDES AQUATIQUES

THÈSE DE DOCTORAT

PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

PAR
DENIS MAVROCORDATOS

DIPLÔMÉ EN CHIMIE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

LAUSANNE
1997

Imprimatur

Université de Lausanne

Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM M. le Prof. Jean-Claude BUENZLI, directeur de thèse, MM. les Profs Jacques DUBOCHET, Garry Grant LEPPARD, et M. le Dr Didier PERRET, experts
Mme le Prof. Rose-Marie HOFER, président.

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de Monsieur Denis MAVROCORDATOS, chimiste diplômé de l'Université de Lausanne.

intitulée DEVELOPPEMENT DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE POUR LA CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE COLLOIDES AQUATIQUES

Lausanne, le 23 janvier 1997

pour *Le doyen de la Faculté des Sciences:*
Professeur Rose-Marie HOFER
R. Hofer

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....1

LA COMMUNICATION AU SEIN DE L'ENVIRONNEMENT 2

IMPORTANCE DES MICROPARTICULES..... 2

PROPRIÉTÉS DES MICROPARTICULES FACE AUX ÉLEMENTS TRACES..... 3

ANALYSES MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES DE MICROPARTICULES..... 4

MICROSCOPIE ANALYTIQUE : ABSORPTION *VERSUS* ÉMISSION 4

2. BUT ET STRUCTURE.....6

BUT 7

STRUCTURE 8

3. PRINCIPES DE LA MICROSCOPIE ANALYTIQUE.....10

3.1 LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE 11

3.1.1 PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU MICROSCOPE À TRANSMISSION 11

3.1.2 SPECTROSCOPIE ET MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE..... 13

3.1.3 PROPRIÉTÉS DE LA SPECTROSCOPIE À PERTE D'ÉNERGIE 17

3.1.4 IMAGERIE ÉLEMENTAIRE 21

3.2 LES DIFFÉRENTS SPÉCTROMÈTRES DE PERTE D'ÉNERGIE 23

3.2.1 LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION À FILTRE D'ÉNERGIE..... 25

3.2.2 L'OPTIQUE DU MICROSCOPE À TRANSMISSION À FILTRE D'ÉNERGIE 27

4. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS.....30

4.1 ECHANTILLONS..... 31

4.1.1 CENTRIFUGATION..... 31

4.1.2 FILTRATION..... 34

4.2.SPECIMENS..... 35

4.2.1 PORTE-SPÉCIMENS 36

4.2.2 PRÉPARATION DE SPÉCIMEN TEM PAR ULTRACENTRIFUGATION..... 37

4.2.3 PRÉPARATION DE SPÉCIMEN TEM PAR ULTRAMICROTOMIE..... 38

5. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....41

5.1 CHOIX DES COLLOÏDES MODÈLES..... 42

5.1.1 COLLOÏDES MODÈLES..... 42

5.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS..... 44

5.2.1 CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES..... 44

5.2.2 SPÉCIMENS DE PARTICULES MODÈLES..... 44

5.3 MICROSCOPES ET SPECTROMÈTRES COUPLÉS..... 45

6. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....47

6.1 ANALYSE QUALITATIVE..... 48

6.1.1 ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES COLLOÏDES..... 48

6.1.2 ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DE COLLOÏDES INDIVIDUELS..... 49

6.1.3 ANALYSE MORPHOLOGIQUE D'UNE MÉLANGE DE MICROPARTICULES..... 54

6.1.4 ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE D'UN MÉLANGE DE MICROPARTICULES..... 55

6.1.5 INTERPRÉTATION FINE DU SPECTRE D'OXYDE DE FER..... 57

6.1.6 IMAGERIE ÉLEMENTAIRE SUR LE FER..... 60

6.2 ANALYSE QUANTITATIVE..... 63

6.2.1 Bande $L_{2,3}$ du fer 63
6.2.2 Bande $M_{2,3}$ du fer 69
6.2.3 Effet de l'épaisseur sur le spectre EELS 73
6.3 Rappel des résultats 77

7. Corollaire 80

7.1 Résumé de la partie développement analytique 80
7.2 Application de la spectrométrie à perte d'énergie à l'environnement 81

8. Application de la microscopie électronique à filtre d'énergie à la pédologie : le cas d'un podzol 82

8.1 Introduction 83
8.2 Approche environnementale 83
8.2.1 Site et caractéristiques du podzol 86
8.3 Matériel et méthodes 87
8.3.1 Traitement des échantillons du sol 88
8.3.2 Préparation des spécimens TEM 90
8.4 Résultats et discussion 92
8.4.1 Analyse morphologique TEM 92
8.4.2 Analyse physico-chimique des colloïdes pédologiques par EF-TEM 98
8.5 Corollaire 106

9. ETUDE DE COLLOÏDES D'UN KARST AQUIFÈRE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ANALYTIQUE 107

9.1 APPROCHE ENVIRONNEMENTALE 107

9.2 CARACTÉRISTIQUES DU SITE ÉTUDIÉ 108

9.2.1 SITUATION GÉOGRAPHIQUE 109

9.2.2 GÉOLOGIE DU SITE 110

9.2.3 PÉDOLOGIE 111

9.2.4 HYDROGÉOLOGIE 112

9.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES 112

9.3.1 ANALYSES GLOBALES DE LA SOLUTION 113

9.3.2 ANALYSES DES PARTICULES INDIVIDUELLES 114

9.4 RÉSULTATS 115

9.4.1 ANALYSES GLOBALES 115

9.4.2 ANALYSES DES PARTICULES INDIVIDUELLES 116

9.5 DISCUSSION 133

9.5.1 POINT DE VUE ANALYTIQUE 133

9.5.2 POINT DE VUE ENVIRONNEMENTAL 136

9.6 COROLLAIRE 138

10. CONCLUSION 141

10.1 PRÉCIS DES RÉSULTATS 141

10.2 DISCUSSION 144

10.3 PERSPECTIVES 146

BIBLIOGRAPHIE 150

ABSTRACT

Microparticles are ubiquitous in the different compartment of the environment and play a key role in the transport of micropollutants. Their importance is enhanced owing to their high concentration in number and their large specific surface which provides a tremendous number of adsorption sites for pollutants.

Due to the restrinct means for the physico-chemical caraterization of colloids at the *per particle* scale, this study proposes to develop a new application of analytical electron microscopy. Amongst the various spectrometry, the electron energy loss spectroscopies available for the electron microscope is a powerfull tool for this purpose. This technique has been applied in biology and materials sciences but has never taken place in environmental sciences. Therefore, the main goal of this research is the optimization of this method by means of standards representative of the natural particles. Those models were selected according to environmental criteria (cristalinity, morphology, size, composition). Goethite and hematite are the iron oxydes corresponding to the ones often found in natural samples. Alumina and kaolinite are also present in the aquatic media. Therefore, those four types of colloids were used for the optimization of electron energy loss spectrometry.

The qualitative and quantitative aspects of the spectrometry were first developed with the models and then applied to natural systems. It will be proven that this technique is well adapted for the determination of the composition of model colloids at the individual scale. Moreover, the quantity of each components of a particle and its stoechiometry can be attained.

Once the qualitative parameters were optimized, natural particles from an alpine soil were studied in order to improve the analytical method for encountered specimens in natural compartments. The quantitative analysis will be demonstrated on colloids sampled in a watershed and its corresponding river. These samples were also caracterized by other analytical electron microscopies, like X-ray fluorescence coupled with transmission and scanning electron microscopes. These studies will rise to the determination of the applicability of each of the proposed methods and the range, in terms of size and composition, they are adapted to. This study will at last be interpreted in an environmental point of view, which correlates the observations on particles, their composition and the physico-chemical parameters of the samplied site in order to determine the mechanisms involved in the formation of some colloids.

RÉSUMÉ

Les microparticules aquatiques, ou colloïdes aquatiques, peuvent adsorber des micropolluants contenus dans les eaux alluviales, souterraines, lacustres et marines dans lesquelles elles sont en suspension. Ces microparticules représentent un nombre élevé de sites d'adsorption pour les polluants. Bien que leur concentration en masse soit négligeable par rapport à l'ensemble de la matière en suspension dans les eaux, leur concentration en nombre est très élevée. Leur morphologie et leur composition, à l'échelle de la particule individuelle, ne sont pas connues précisément par manque de moyens techniques adaptés.

Ce travail propose une nouvelle méthode d'analyse permettant de combler cette lacune par la microscopie électronique. Lorsque cette dernière opère en mode de transmission, les micrographies obtenues génèrent uniquement une information morphologique. Si le microsope est couplé à un spectromètre, l'analyse physico-chimique fine devient possible sur chaque particule.

Le filtre d'énergie dit de type Castaing-Henry, placé dans la colonne du microscope électronique à transmission, permet l'analyse par perte d'énergie. Ce montage donne accès aux paramètres physico-chimiques des spécimens. Cet instrument a déjà fait ses preuves en biologie et en sciences des matériaux mais n'a encore jamais été utilisé pour la caractérisation des colloïdes aquatiques.

Les conditions optimales d'analyse par cette spectrométrie ont été établies sur des particules modèles et appliquées par la suite au système naturel afin de démontrer ses limites et sa complémentarité face aux spectrométries déjà employées pour l'étude des colloïdes.

Afin de simuler au mieux les situations dans le milieu naturel, les particules modèles ont été choisies selon des critères environnementaux. Les particules d'oxydes de fer (hématite, goethite), d'alumine et d'argiles figurent parmi les entités généralement retrouvées dans les eaux. Elles représenteront les modèles utilisés. Dans un premier temps, la nature de ces colloïdes a été révélée par la spectrométrie à perte d'énergie de manière qualitative, puis l'application quantitative a été démontrée pour les modèles d'oxydes de fer.

La partie environnementale de ce travail a établi que cette spectrométrie est réellement adaptée aux échantillons naturels. Le premier exemple prouve que

l'analyse qualitative est possible sur des échantillons d'eau d'un sol alpin. Il y sera exposé des exemples d'analyses sur les différents colloïdes dont la nature n'avait encore jamais pu être révélée. L'analyse quantitative a ensuite été développée sur des spécimens obtenus à partir d'échantillons de rivière et d'eau souterraine. Parallèlement, cette dernière étude a permis de définir la complémentarité du microscope électronique à filtre d'énergie à l'analyse microscopique par fluorescence X, beaucoup plus développée pour ce genre de recherche. D'autre part, ces analyses seront interprétées d'un point de vue environnemental. En effet, la nature intime d'entités présentes dans ces eaux a pu être révélée et une hypothèse très probable sur le principe de leur formation sera élaborée.

1 INTRODUCTION

LA COMMUNICATION AU SEIN DE L'ENVIRONNEMENT 2

IMPORTANCE DES MICROPARTICULES 2

PROPRIÉTÉS DES MICROPARTICULES FACE AUX ÉLÉMENTS TRACES 3

ANALYSES MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES DE MICROPARTICULES 4

MICROSCOPIE ANALYTIQUE : ABSORPTION ET ÉMISSION 4

1. INTRODUCTION

LA COMMUNICATION AU SEIN DE L'ENVIRONNEMENT

La matière contenue dans les eaux souterraines, de rivières, lacustres, marines, existe sous plusieurs formes qui seront déterminantes pour la communication entre les différents compartiments et l'évolution de l'environnement. D'une part des messagers qui sont constitués de la matière en suspension et d'autre part des renseignements qui sont la matière dissoute qu'ils peuvent transporter. Cet ensemble messagers-renseignements est soumis aux conditions physico-chimiques des systèmes traversés, de sorte que certaines informations seront transformées en messagers et, par opposition, certains messagers deviendront des sources de renseignements. Par exemple, les particules d'oxydes de fer sont très sensibles aux conditions réductrices ou oxydantes du milieu. En effet, dans les lacs eutrophes stratifiés, durant la saison estivale, il est possible d'observer la formation et la disparition de fer particulaire à l'oxycline, profondeur à laquelle l'oxygène dissous diminue fortement pour tendre vers une concentration nulle. Dans ce cas, les conditions redox changent et le fer ferrique (particulaire) qui est le messager, va peut-être libérer des informations, telles que des métaux lourds ou d'autres contaminants, lors de sa transformation en fer ferreux (dissous). Dans d'autres cas, comme en pédologie, une argile, généralement très réfractaire aux conditions chimiques du milieu, restera intacte et jouera de cette façon son rôle de messager tout au long du profil du sol.

La stratégie de ce réseau de communication n'est pas encore bien définie et demande une attention particulière aux niveaux les plus élémentaires, c'est-à-dire à l'échelle de chaque messager, afin de déterminer leur rôle et dans quelles conditions ils interviennent dans les transferts de matière soit dissoute soit particulaire.

IMPORTANCE DES MICROPARTICULES

La matière en suspension (colloïdes ou particules) a souvent été négligée de par sa faible concentration en masse. Typiquement, ces particules (de 1nm à 0.45µm)

étaient comptées dans la fraction soluble des systèmes étudiés. Cette fraction de colloïdes ne représente qu'une fraction congrue de la masse totale des particules. Cependant, leur concentration élevée en nombre et leur surface spécifique importante représentent un nombre très élevé de sites d'adsorption pour des contaminants (Filella,1993; Ledin, 1993; Nomizu, 1988; Perret, 1994; Salbu, 1985; Sigleo, 1990; Wells, 1991), comparativement aux particules de taille supérieure au micromètre, largement étudiées soit sous leur forme synthétique en milieu contrôlé soit dans le milieu naturel (Stumm, 1985, 1987).

PROPRIÉTÉS DES MICROPARTICULES FACE AUX ÉLÉMENTS TRACES

Les interactions entre substances toxiques ou nutritives et microparticules sont établies depuis plusieurs années (Kavanaugh, 1980; Baccini, 1984; Buffle, 1988). Cependant, leur fonction dans le transport des polluants n'a été déterminé que récemment (Morel, 1987; Buffle, 1992). Notamment, les colloïdes minéraux peuvent complexer ces éléments traces et ainsi jouer le rôle d'épurateur des eaux (Buffle, 1993; Grime, 1993; Hart, 1985; Stumm,1987). Des études ont montré que la charge de surface des particules minérales était systématiquement négative, que ce soit dans les eaux de lac (Tipping, 1981a, 1981b), de rivière et d'estuaire (Hunter, 1982; Loder, 1985; Gerritsen, 1987; Beckett, 1990) ou d'océan (Newton, 1989; Isao, 1990). Cette propriété se retrouve pour tous les types de minéraux généralement identifiés et dépend des conditions physico-chimiques du milieu et plus particulièrement de la matière organique associée aux particules (polysacharides fibrillaires, substances humiques). Ces colloïdes agissent donc en tant que sites de complexation très favorables aux espèces chargées positivement comme c'est le cas pour la plupart des métaux lourds.

ANALYSES MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES DE MICROPARTICULES

Les connaissances acquises sur les colloïdes aquatiques sont relativement restreintes, de par les limites analytiques des instruments à disposition, et surtout des méthodes d'échantillonnage, de fractionnement, de préconcentration. Les analyses des propriétés chimiques et physiques sont principalement réalisables à l'échelle globale de la suspension avec des techniques couramment utilisées, par exemple : l'absorption ou l'émission atomique, la diffraction de rayons X. De plus, les méthodes de préparation pour ces analyses sont susceptibles de transformer les colloïdes et donc de fournir une information erronée sur le système (Buffle, 1988; Perret, 1990). D'autre part, étant donné le rôle important des colloïdes dans les milieux aquatiques, il s'avère primordial de définir leur composition et leur structure à l'échelle individuelle. Cette caractérisation a souvent été limitée aux particules de taille supérieure à 1μm (Wouters, 1988; Eisma, 1991) à cause de restrictions des techniques d'échantillonnage et d'analyse (Berg, 1992). Ces particules de grande taille peuvent être analysées à l'aide de la microscopie électronique, dont la résolution spatiale est suffisamment élevée, et des techniques de préparation de spécimens non-perturbantes (Burnison, 1983; Nomizu, 1986). De nombreuses applications ont montré que cette approche remplissait pleinement les conditions requises pour l'analyse de colloïdes de tailles <0.5μm (Tipping, 1981b; Wells, 1991). Néanmoins, l'utilisation de la microscopie électronique ne concède qu'une approche morphologique (forme et taille) alors que l'analyse élémentaire permettrai d'atteindre la caractérisation ultime de ces particules.

MICROSCOPIE ANALYTIQUE : ABSORPTION ET ÉMISSION

Il existe plusieurs méthodes d'extraction d'informations chimiques au sein du microscope, par exemple la spectrométrie de fluorescence X qui génère une information sur la composition et a déjà été exploitée sur ce genre de spécimens (Leppard, 1984a; Nomizu, 1987, 1988, 1989, Wells, 1991). Cependant cette technique n'autorise en analyse de routine que la détection éléments lourds (Z>13) contenus dans des colloïdes de taille >~100nm (Ottensmeyer, 1988; Van Grieken, 1988; Xhoffer, 1992). Il est dès lors intéressant d'appliquer une autre méthode d'analyse élémentaire au

niveau de la particule individuelle, qui permettrait aussi bien de détecter des éléments plus légers que des entités de plus petite taille. La spectrométrie à perte d'énergie est une technique qui a été développée récemment en microscopie électronique (Castaing, 1969; Ottensmeyer, 1984) et dont l'utilisation courante en sciences des matériaux (Browning, 1993; Stephan, 1994) et en biologie (Leapman, 1987; Ottensmeyer, 1988) pourra probablement être adaptée aux spécimens environnementaux. Le développement de cette technique fera l'objet de la présente étude.

2 BUT ET STRUCTURE

2.1 BUT.....7

2.2 STRUCTURE.....8

2.1 BUT

Cette étude s'inscrit dans un contexte global d'analyse des colloïdes aquatiques et apporte un nouvel outil qui permet d'atteindre les caractéristiques physico-chimiques les plus détaillées au niveau des particules individuelles.

DÉVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE POUR LA CARACTÉRISATION DE COLLOÏDES AQUATIQUES : LA SPECTROMÉTRIE À PERTE D'ÉNERGIE ÉLECTRONIQUE

La microscopie électronique à transmission (TEM) équipée d'un détecteur de perte d'énergie (TEM-PEELS; EFTEM; voir chap.3) est un moyen d'analyse élémentaire dont l'interprétation des résultats est accessible à l'aide de la physique quantique (Egerton, 1986; Rez, 1991). Les différentes méthodes dérivées de cette spectrométrie (enregistrement d'images élémentaires, de spectres (Reimer, 1992)) sont couramment utilisées et leur interprétation est dorénavant possible pour l'ensemble des éléments analysables (Z=1-92; (Trebbia, 1990)). Les limites atteignables par cette technique sont remarquables. En effet, des études en science des matériaux ont montré qu'il était par exemple possible d'établir, sur la base des spectres de perte d'énergie, des transitions d'une géométrie octaédrique en tétraédrique d'un alliage, avec une résolution spatiale de 1nm, et d'obtenir des informations sur les liaisons chimiques au sein de l'alliage (Brydson, 1991). D'autre études ont permis de détecter par exemple 4 atomes de fer dans une structure contenant des molécules d'hémoglobine (Leapman, 1992) ou encore de révéler 320 atomes de cuivre dans de l'hémocyanine (Leapman, 1989). D'autre part, l'information des spectres de perte d'énergie n'est pas seulement qualitative et quantitative au niveau élémentaire (mise en évidence d'un élément et détermination de sa concentration), mais donne également accès à la valence et à la coordination de élément analysé par des interprétations de la structure fine des bandes d'absorption (EXELFS : Extended Energy Loss Fine Structure et ELNES : Energy Loss Near Edge Structure; (Colliex, 1991; Fink, 1989, 1992)). Ces quelques exemples permettent de démontrer le niveau de sensibilité de la technique et ses extraordinaires potentialités.

Cependant, les conditions d'analyse élaborées jusqu'à présent et les possibilités de cette spectrométrie s'avèrent exclusivement adaptées aux spécimens idéaux comme ceux rencontrés en sciences des matériaux ou à certains spécimens biologiques préparés spécialement pour cette méthode. Au vue des performances de la spectrométrie à perte d'énergie, son application aux spécimens environnementaux apparaît comme nécessaire pour résoudre la structure fine et la composition élémentaire des colloïdes. Toutefois, la diversité morphologique et chimique des colloïdes aquatiques seront des facteurs limitants pour l'utilisation en routine de la méthode. Le but de ce travail est donc de définir les limites de cette nouvelle méthode pour étudier les spécimens environnementaux et de situer cet outil par rapport aux autres techniques existantes utilisées pour l'étude des colloïdes. La structure du travail est présentée ci-dessous afin de saisir l'approche de développement de la méthode à l'aide de modèles de particules, puis son application aux systèmes naturels.

2.2 STRUCTURE

Ce travail est partagé en deux parties distinctes : une première partie décrivant l'approche analytique et plus particulièrement le développement de la spectrométrie à perte d'énergie, et une seconde partie traitant de l'application de la méthode aux cas réels.

La première partie commence par le chapitre 3, qui expliquera les points déterminants de la théorie de la spectrométrie à perte d'énergie et permettra au lecteur de découvrir cette technique d'analyse rarement ou pas utilisée en chimie et en science environnementale. Le chapitre 4 décrira les méthodes utilisées pour la préparation d'échantillons et de spécimens environnementaux, en soulignant l'importance des différentes préparations selon les spécimens étudiés et les paramètres physico-chimiques recherchés. Le chapitre 5 décrira rapidement la pratique de ces méthodes de préparation. Le chapitre 6 proposera les paramètres qu'il est préférable d'appliquer au microscope à perte d'énergie afin d'obtenir des résultats exploitables qualitativement et quantitativement. Ce chapitre exposera d'autre part les moyens par lesquels la méthode a été développée et les résultats

qualitatifs qui peuvent être obtenus sur des systèmes modèles à un ou plusieurs composants. L'approche quantitative sera décrite avec les résultats qui permettront de définir les limites de la méthode. Cette première partie s'achèvera sur une conclusion à caractère analytique au chapitre 7.

Les applications environnementales permettant de démontrer la validité des paramètres définis auparavant seront décrites dans la deuxième partie de ce travail. Le chapitre 8 décrit l'étude d'un sol alpin et permet de prouver l'applicabilité environnementale de la spectrométrie à perte d'énergie à l'étude de la composition de colloïdes naturels au niveau de la particule individuelle. Le chapitre 9 établira le lien entre les microscopies analytiques (microscopes à balayage, à transmission équipés de détecteurs de fluorescence X ou de perte d'énergie) utilisables pour l'étude des colloïdes naturels et leurs limitations. De plus, tout en démontrant la complémentarité de ces techniques d'analyses, l'étude sur un site complexe comme le bassin versant de la Noiraigue et de sa source sera guidée par le but ultime de la découverte de la composition de certains colloïdes qui n'est atteignable que par spectrométrie à perte d'énergie. Le chapitre 10 conclura ce travail et permettra de définir la potentialité d'utilisation de cette spectrométrie couplée au microscope électronique en science environnementale.

3 PRINCIPES DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ANALYTIQUE

3.1 LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE 11

3.1.1 PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU MICROSCOPE À TRANSMISSION 11

3.1.2 SPECTROSCOPIE ET MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE 13

3.1.3 PROPRIÉTÉS DE LA SPECTROSCOPIE À PERTE D'ÉNERGIE 17

3.1.4 IMAGERIE ÉLÉMENTAIRE 21

3.2 LES DIFFÉRENTS SPECTROMÈTRES DE PERTE D'ÉNERGIE 23

3.2.1 LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION À FILTRE D'ÉNERGIE 25

3.2.2 L'OPTIQUE DU MICROSCOPE À TRANSMISSION À FILTRE D'ÉNERGIE 27

3.1 LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Il existe principalement deux types de microscopes électroniques; les microscopes à balayage (SEM: Scanning Electron Microscope) et les microscopes à transmission (TEM). Ces appareils ont, de par leur domaine de tailles observables et l'information structurale qu'ils produisent, des champs d'applications différents (Rossiter, 1991).

Le SEM permet d'observer les électrons rétrodiffusés ou réémis par le spécimen. Ce dernier doit être traité spécifiquement afin d'être conducteur. De par ce traitement, seules les structures >0.1μm sont observables. Cette dernière valeur peut être diminuée vers des tailles proches de quelques nanomètres sur les instruments récents équipés d'un canon d'électrons à émission de champ.

Le TEM donne accès à des résolutions spatiales bien supérieures (<1nm). Comme seuls les électrons transmis à travers le spécimen sont observés, la matière analysée doit être de densité électronique suffisamment élevée (matière minérale) ou, si ce n'est pas le cas (matière organique), elle ne sera visualisable que si elle est marquée par des éléments à grande densité électronique. (Lewis, 1990).

Le microscope électronique à transmission-balayage (STEM) est un instrument hybride pour lequel le faisceau d'électrons est focalisé sur le spécimen en un point de petite taille (typiquement 10nm) et balayé en x-y sur ce dernier; dans le STEM, les électrons transmis au travers du spécimen sont détectés.

Dans le domaine des tailles des entités analysées, le TEM ou le STEM semblent appropriés pour la caractérisation de colloïdes naturels (Smart, 1981; Leppard, 1992a,b).

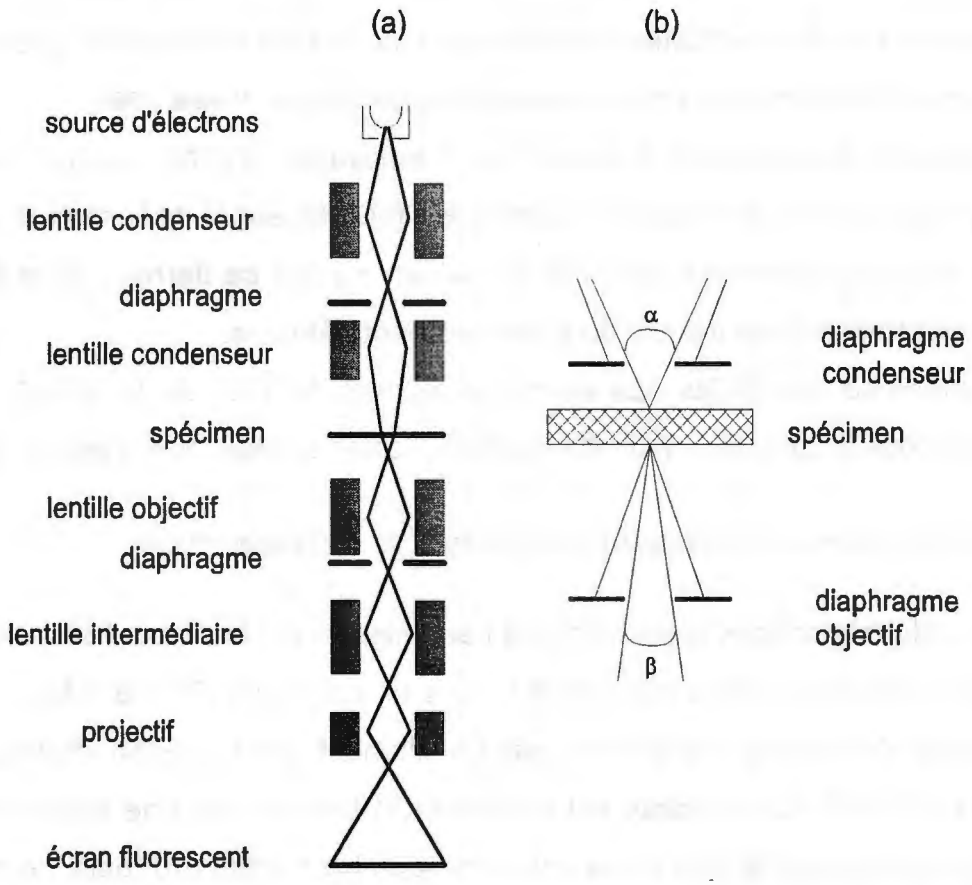
3.1.1 PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU MICROSCOPE À TRANSMISSION

Le principe du microscope électronique à transmission est basé sur l'observation des électrons susceptibles d'être transmis à travers un spécimen (Figure 3.1a).

Un faisceau d'électrons est généré par un filament sous tension (habituellement entre 60 et 200kV). Ce faisceau est condensé et focalisé par une série de lentilles magnétiques alignées le long d'une colonne, sous haut vide (~10^{-7}bar). Le spécimen est inséré dans le chemin des électrons où ces derniers vont entrer en collision avec la matière le composant.

Les diaphragmes permettent de sélectionner les électrons qui sont le moins perturbés par les éléments optiques du microscope et réduisent les aberrations chromatiques dues aux interactions parasites (électrons diffusés, diffractés, réémis). Les électrons du faisceau incident atteignent le spécimen en formant un angle solide α (angle de convergence) sélectionné par le diaphragme condenseur (Figure 3.1b). Les électrons transmis sont à leur tour sélectionnés selon un angle solide β (angle de collection) déterminé par le diaphragme objectif. Ces deux angles sont déterminants lors de la quantification EELS (Equation 3.1). En effet, α détermine les électrons qui atteignent le spécimen et β ceux qui atteignent le détecteur EELS.
Les électrons transmis sont visualisés sur un écran fluorescent placé en dessous de la colonne du microscope.

Figure 3.1 : *(a) Schéma d'un TEM et (b) angles de sélection des électrons.*



L'image obtenue est l'empreinte négative en niveaux d'intensités de fluorescence de l'écran, correspondant aux différentes épaisseurs et densités électroniques du

spécimen analysé. Lorsque l'écran est retiré, l'image est imprimée sur une émulsion négative sensible aux électrons, placée en dessous de la colonne; ce négatif permet par la suite d'obtenir une photographie positive sur papier.
Il est aussi possible de placer sous le TEM une caméra (Télévision = TV ou Charge-Coupled Device = CCD) afin d'enregistrer une image électronique, qui peut ensuite être manipulée avec les instruments informatiques adéquats, par exemple pour l'analyse d'image.

3.1.2 Spectroscopie et microscopie électronique

Les nombreuses interactions entre les électrons de la source du microscope et le spécimen génèrent des informations sur la composition de ce dernier. Cette source de renseignements peut être exploitée en couplant un ou plusieurs spectromètres au TEM.
Deux types de spectromètres sont principalement utilisés : celui à perte d'énergie (Electron Energy Loss Spectrometry : EELS) et celui de fluorescence X (généralement Energy Dispersive Spectrometry : EDS; ou parfois Wavelength Dispersive Spectrometry : WDS). Ces derniers permettent d'analyser les électrons ayant perdu de l'énergie au contact du spécimen, respectivement de mesurer le rayonnement X émis par la matière analysée.

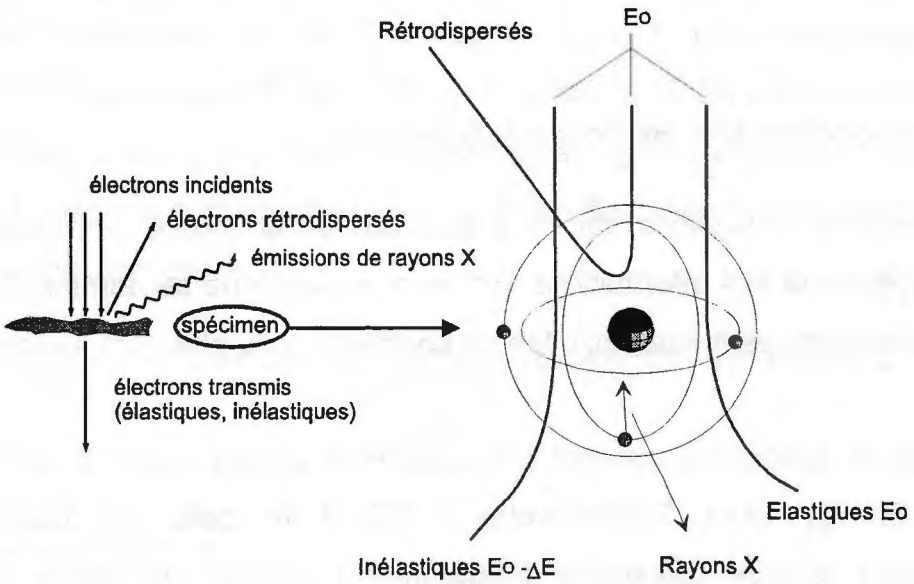
Dans le cadre de cette étude, le EELS sera la principale méthode utilisée. Les propriétés du EELS s'avèrent très complémentaires à celles de l'EDS et permettent de déterminer la composition de particules nanométriques contenant des éléments tels que ceux généralement présent dans l'environnement ou même des atomes légers jusqu'à l'hydrogène (Budd, 1988).

3.1.2.1 Principe physique

Lorsqu'un électron entre en collision avec de la matière, il subit des interactions engendrant les phénomènes suivants (Figure 3.2) : des chocs élastiques, des chocs inélastiques (EELS), conduisant notamment à la production de rayons X spécifiques aux éléments constituant le spécimen (EDS), des électrons émis (donnant lieu à la

spectrométrie Auger), et des électrons rétrodiffusés à des angles distincts suivant la morphologie et la structure du matériel présent sous le faisceau (phénomènes à l'origine du principe du SEM). La structure cristalline du spécimen peut d'autre part être obtenue par l'étude des électrons diffractés.

Figure 3.2 : *Interactions entre atomes et électrons.*



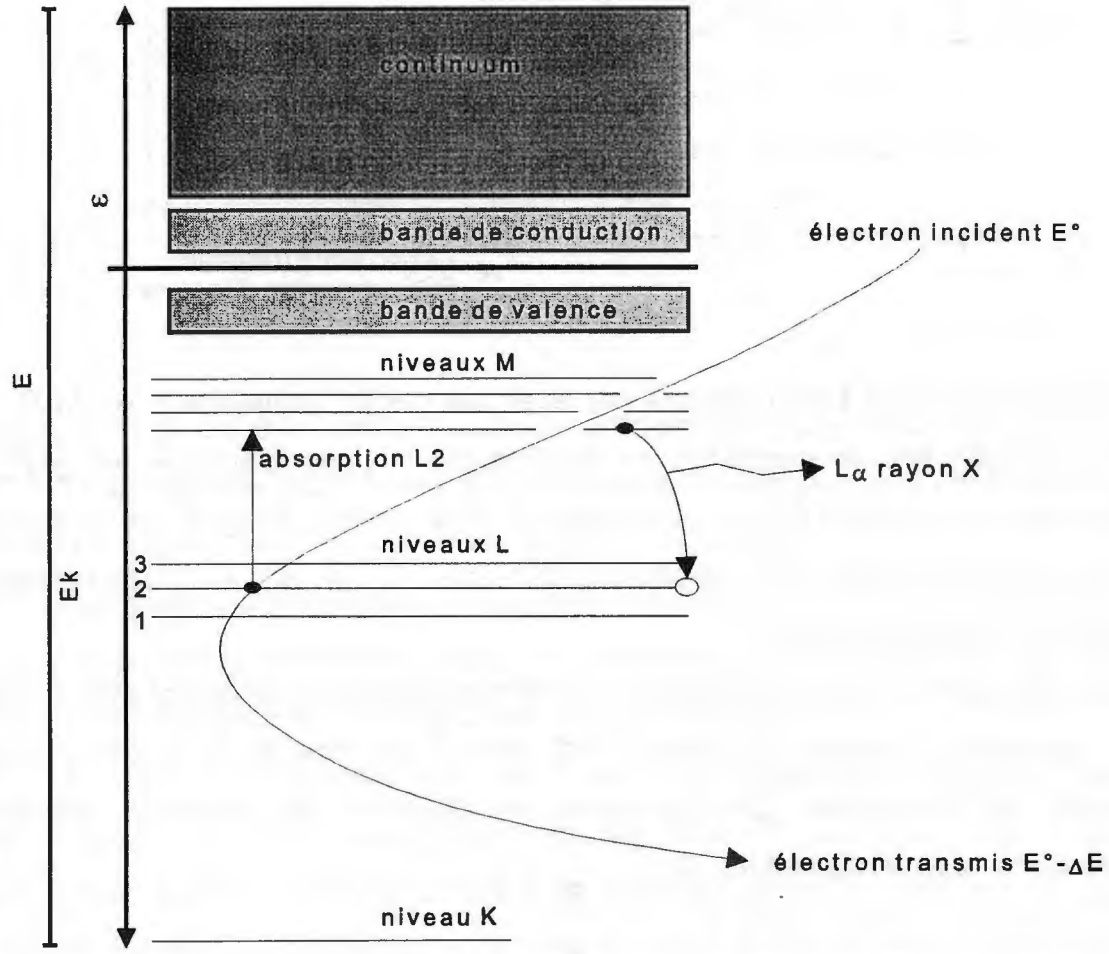
Les chocs élastiques ne modifient pas l'énergie de l'électron incident qui ne sera alors que dévié de sa trajectoire initiale vers le bas de la colonne TEM. Lors d'un choc inélastique, l'interaction entre l'électron incident (ayant une énergie initiale E°) et la matière provoque une transition électronique, voire l'éjection d'un électron de cette dernière et induit une perte d'énergie (ΔE) sur l'électron incident. Chaque valeur ΔE est fonction des éléments constituant le spécimen. Cette perte d'énergie est quantifiée et correspond à une valeur discrète. Cette propriété sera celle utilisée pour le EELS (Egerton, 1986). La nomenclature correspond aux couches et sous-couches électroniques d'où l'électron est éjecté de sorte qu'un électron arraché d'une couche L et de la deuxième sous-couche de l'atome considéré sera désigné comme L_2.

Comme mentionné plus haut, l'interaction entre un électron et la matière peut générer un rayonnement X. Cette fluorescence est caractéristique de l'élément présent sous le faisceau d'électrons. Le détecteur EDS permet de mesurer ce

rayonnement. Similairement au EELS, chaque rayonnement est nommé selon la couche d'où l'électron est arraché et la sous-couche de laquelle provient l'émission. Par exemple, un rayonnement Lα est produit par une transition d'un électron de la première sous-couche d'une couche M vers la couche L (Figure 3.3).

Ces deux sources d'informations (absorption et émission) sur la composition du spécimen sont en réalité générées par le même électron incident. Si ce dernier entre en collision avec un atome, il va perdre une quantité d'énergie donnée puis va continuer son chemin vers le bas de la colonne (détecteur EELS). L'énergie perdue par cet électron va servir à éjecter un électron d'une couche interne de l'atome. La lacune laissée par cet électron sera comblée par un électron d'une couche supérieure qui libérera son énergie sous la forme de radiation X (détecteur EDS).

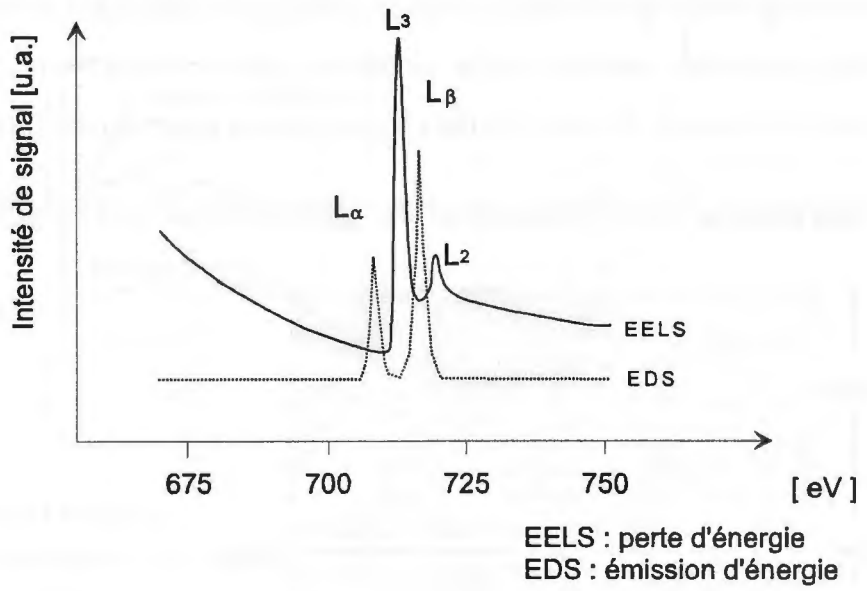
Figure 3.3 *: Diagramme des niveaux d'énergie pour un semi-conducteur ou un métal.*



E = Ek + ε, avec E = énergie d'ionisation, Ek = différence d'énergie du niveau K au niveau de Fermi et ε = énergie a fournir pour éjecter un e^- du niveau de Fermi vers le continuum.

Par exemple (Figure 3.4), lorsqu'un électron interagit avec un atome de fer, il va perdre des quanta d'énergie ΔE = 708 et 721eV (Ahn, 1983) correspondant respectivement aux bandes d'absorption L_3 et L_2; la valeur exacte de ΔE mesurée varie selon l'état d'oxydation de l'atome de fer et la structure moléculaire à son voisinage. Conséquemment, les lacunes créées sur les sous-couches L généreront des émissions X à 704 et 717eV (respectivement Lα et Lβ, Philips).

Figure 3.4 : *Schéma de spectres EELS et EDS du Fe.*



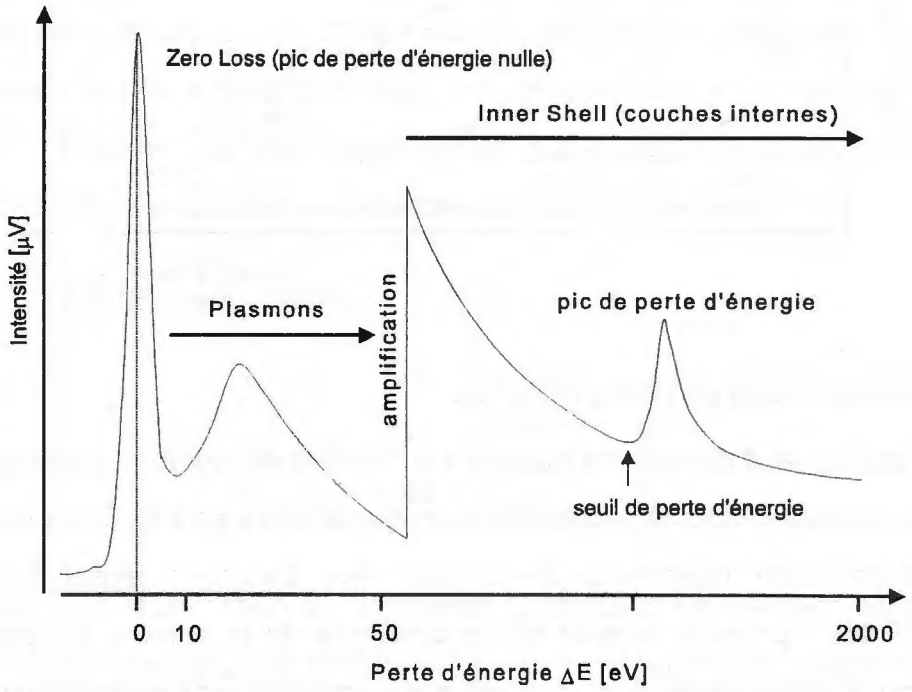
L'intensité du signal EELS mesuré par exemple par un scintillateur (en [μV]) peut être rapportée sur un graphique en fonction de la perte d'énergie (en [eV]), on obtient alors un spectre EELS caractéristique du spécimen analysé. Le fond continu du spectre EELS a la forme analytique générale AE^{-r} (A et r sont des constantes sans signification physique).

Le spectre de fluorescence présente un fond continu de type constant et des pics de type gaussien. L'intensité du signal EDS mesuré par une diode (en [coups/s] ou [coups]) est exprimée graphiquement en fonction de l'énergie d'émission (généralement exprimée en [keV]).

3.1.3 PROPRIÉTÉS DE LA SPECTROSCOPIE À PERTE D'ÉNERGIE

Le spectre de perte d'énergie (Figure 3.5) est la représentation de l'intensité (nombre d'électrons incidents atteignant le détecteur exprimé en μV) en fonction de la perte d'énergie que ces électrons ont subie (de 0 à 2000eV).

Figure 3.5 : *Spectre typique de perte d'énergie.*



Il est possible de décomposer le spectre en différentes régions selon (Reimer, 1992) :

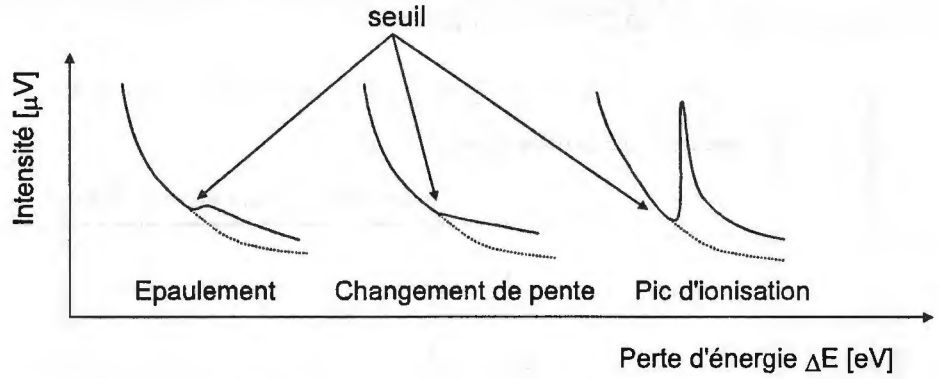
- La perte nulle (Zero Loss); pic de forme gaussienne centré en zéro de perte d'énergie, représentant l'ensemble des électrons élastiques.

- Les plasmons; représentent les premiers niveaux (gaz d'électrons libres) qui peuvent être excités soit vers la bande de conduction dans les métaux soit vers la bande de valence pour les isolants ou semi-conducteurs.

- La région des couches internes (Inner Shell, Figure 3.5); région du spectre dans laquelle les pics caractéristiques de chacun des éléments analysés apparaissent. Ces pics correspondent à la transition d'une couche interne vers le niveau de Fermi. Les pics de chacun des éléments présents (Figure 3.6) dans le spécimen se distinguent d'un fond continu soit sous la forme d'un épaulement (changement de pente avec une légère augmentation de l'intensité) soit d'un

changement de pente dans la décroissance ou encore comme un pic net, suivi d'un fond continu plus intense que celui que l'on observerait sans le seuil de perte d'énergie.

Figure 3.6 : *Les différents signaux mesurables en EELS.*



3.1.3.1 Quantification en perte d'énergie

L'intensité du signal d'absorption mesuré est fonction du nombre d'atomes analysés. Il est donc possible d'obtenir une information quantitative en EELS. La région suivant le seuil d'ionisation représente l'ensemble des électrons ayant interagit avec l'élément d'intérêt présent dans la région analysée du spécimen. En soustrayant le fond continu à partir du seuil, on obtient donc uniquement l'intensité représentative du nombre d'atomes présents. La quantification absolue en EELS (Equation 3.1) est possible mais l'erreur obtenue est généralement de l'ordre de 20% (Egerton, 1986).

Equation 3.1 : *Quantification absolue.*

$$N_A = \frac{1}{\sigma_A(\beta,\Delta)} * \frac{\int_E^{E+\Delta} I_A(\beta,\Delta)}{\int_E^{E+\Delta} I_0(\beta,\Delta)} * \frac{1}{F_A}$$

où N_A=nombre d'atomes de A par unité d'aire, $\sigma_A(\beta, \Delta)$=section efficace partielle intégrée sur un angle de collection β et une région d'énergie Δ pour l'élément A. $\int_E^{E+\Delta} I_A(\beta,\Delta)$ = intégrale du seuil d'ionisation de l'élément A. $\int_E^{E+\Delta} I_0(\beta,\Delta)$ = intégrale du pic du zero loss , F_A=facteur de correction de convergence du faisceau d'électron (dépendant de l'angle de convergence α).

Le calcul de la section efficace partielle (σ) de l'atome analysé se fait à l'aide d'un algorithme (programmes SigmaK pour le seuil K et SigmaL2 pour le seuil $L_{2,3}$, Egerton 1986), basé sur le modèle de l'atome d'hydrogène. Le facteur de correction *F* doit être calculé si l'angle de convergence (α) est supérieur à l'angle de collection (β), sinon F n'est pas considéré dans l'équation de la quantification absolue ou relative.
Afin de réduire l'erreur sur la quantification absolue, il est intéressant d'utiliser la quantification relative (Equation 3.2). En effet, la valeur de la section efficace du seuil K des éléments légers est connue avec une grande certitude (carbone, oxygène; (Egerton, 1986)). Dans le cas d'un oxyde de fer, par exemple, la quantité de fer sera aisément retrouvée à partir du calcul de la quantité d'oxygène.

Equation 3.2 : *Quantification relative.*

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{\sigma_B(\beta,\Delta)}{\sigma_A(\beta,\Delta)} * \frac{\int_E^{E+\Delta} I_A(\beta,\Delta)}{\int_E^{E+\Delta} I_B(\beta,\Delta)} * \frac{F_B}{F_A}$$

Expérimentalement, l'utilisation de standards (contenant un élément léger avec un seuil K dans la bande d'énergie 0-1000eV) permet d'atteindre des valeurs de σ très proches de la réalité (erreur : 5-10%). En effet, si le standard est un film mince d'un oxyde donné, par exemple de fer, le rapport des sections efficaces partielles σ_O / σ_{Fe} peut être utilisé pour déterminer la quantité des composés similaires (autres oxydes de fer) (Equation 3.3). Le rapport des sections efficaces partielles, couramment utilisé en quantification relative, est appelé "facteur k".

Equation 3.3 : *Quantification relative méthode des facteurs k (ici, $\alpha<\beta$).*

$$k_{AB} = \frac{\sigma_B(\beta,\Delta)}{\sigma_A(\beta,\Delta)} = \frac{\int_E^{E+\Delta} I_B(\beta,\Delta)}{\int_E^{E+\Delta} I_A(\beta,\Delta)} * \frac{N_A}{N_B}$$

3.1.3.2 Mesure de l'épaisseur du spécimen

La spectroscopie de perte d'énergie permet de mesurer l'épaisseur relative ou absolue d'un spécimen. Comme vu précédemment, les interactions entre les électrons de la source et le spécimen donnent lieu à des chocs inélastiques. Ces événements dépendent de la nature du spécimen, tandis que leur occurrence dépend de son épaisseur. Il existe une probabilité plus élevée qu'un choc inélastique se produise plusieurs fois dans un spécimen épais que dans le cas d'un spécimen mince. Si l'on considère que les événements sont indépendants les uns des autres, leur apparition dans un spécimen d'une épaisseur *t* est gérée par une statistique de Poisson. La probabilité de *n* collisions générées par un électron est donnée par :

$$P_n = \left(\frac{1}{n!}\right) * m^n * \exp(-m)$$

où *m* est le nombre moyen de collisions dans le spécimen et peut être écrit comme t/λ, où λ est la distance moyenne entre chaque collisions (appelée aussi parcours libre moyen : mean free path).

P_n est aussi le rapport de l'intensité I_n, intégrée sur *n* événements, sur le faisceau incident *I* :

$$P_n = \frac{I_n}{I} = \left(\frac{1}{n!}\right) * \left(\frac{t}{\lambda}\right)^n * \exp\left(-\frac{t}{\lambda}\right)$$

En ne considérant que les chocs élastiques (n=0) et en admettant que l'ensemble des électrons incidents *I* sont transmis au travers de l'échantillon ($I=I_t$), alors :

Equation 3.4 : *Mesure de l'épaisseur.*

$$\frac{I_0}{I_t} = \exp\left(-\frac{t}{\lambda}\right)$$

En conséquence, il est possible de déterminer la valeur de t/λ sur le spectre enregistré. Expérimentalement, et pour autant que $0.2<t/\lambda<5$, I_0 est égal à l'intégrale sous le pic de perte nulle, tandis que l'ensemble des électrons transmis est égal à l'intégrale du spectre complet. La valeur de λ peut être évaluée et la valeur absolue de t calculée seulement, cette grandeur est entachée d'une erreur de 20%. Dès lors cette approximation de l'épaisseur réelle est rarement utilisée.

Ainsi, λ peut être estimée à l'aide de l'équation suivante :

$$\lambda = \frac{106FE_0}{E_m \ln(2\beta E_0/E_m)}$$

où λ est en [nm], $E_m=7.6Z^{0.36}$ en [eV], avec Z le nombre atomique moyen du spécimen, β l'angle de collection [mrad], E_0 l'énergie des électrons incidents [keV] et $F = 1+\left(E_0/1022\right)\Big/\left(1+\left(E_0/511\right)\right)^2$.

3.1.4 IMAGERIE ÉLÉMENTAIRE

L'imagerie élémentaire (Electron Spectroscopic Imaging : ESI) est une propriété de la spectroscopie EELS; elle permet d'obtenir des images numériques n'exhibant que les zones d'un spécimen contenant uniquement l'élément analysé. Il est dès lors possible de générer des cartes élémentaires d'un spécimen, comme c'est le cas en EDS. En EELS, il est possible d'effectuer une analyse spectrale sur une surface identique à celle que l'on obtient en ESI, mais le spectre obtenu sera celui de l'ensemble de la zone analysée alors que le ESI mettra en évidence la composition élémentaire en chaque point de l'image. Ces deux variantes de la spectrométrie à perte d'énergie sont totalement complémentaires puisque l'une apporte une information sur l'ensemble des éléments présents en un point ou sur une surface plus grande et l'autre permet de générer des images du spécimen élément par élément.

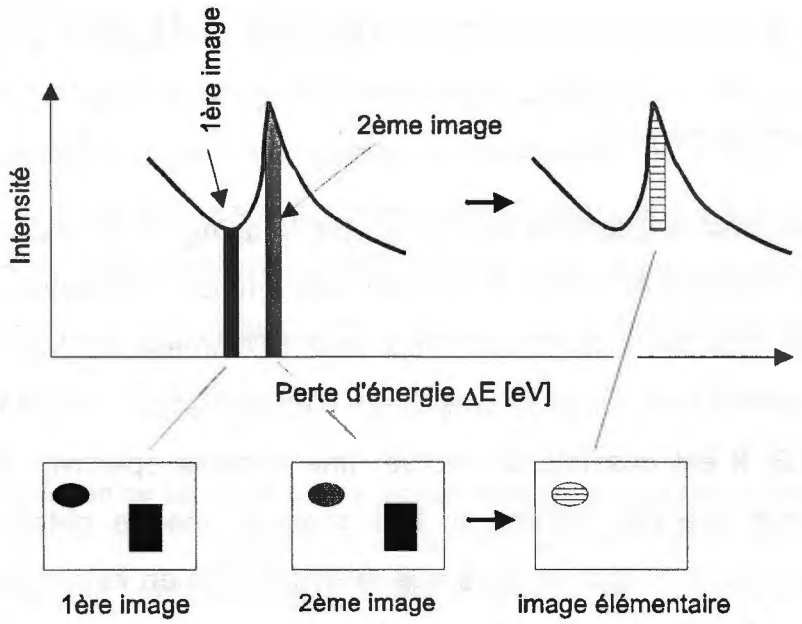
3.1.4.1 PRINCIPE DE L'IMAGERIE ÉLÉMENTAIRE

En EELS, le spectre est enregistré sur une bande de pertes d'énergie (0-2000eV) où à chaque perte d'énergie (ΔE) sera reportée avec une intensité I. En ESI par contre, chaque perte d'énergie (ΔE) est enregistrée sous forme d'une image dont l'intensité (en niveaux de gris) est I. En enregistrant ces images, il est dès lors possible d'extraire l'information élémentaire. Deux méthodes sont utilisables pour générer une image finale caractéristique de l'élément analysé.

La première méthode consiste à acquérir une image juste avant le seuil d'ionisation de l'élément et une autre image au maximum d'absorption de l'élément. La première image est alors soustraite de la deuxième et l'image ainsi obtenue ne contiendra que

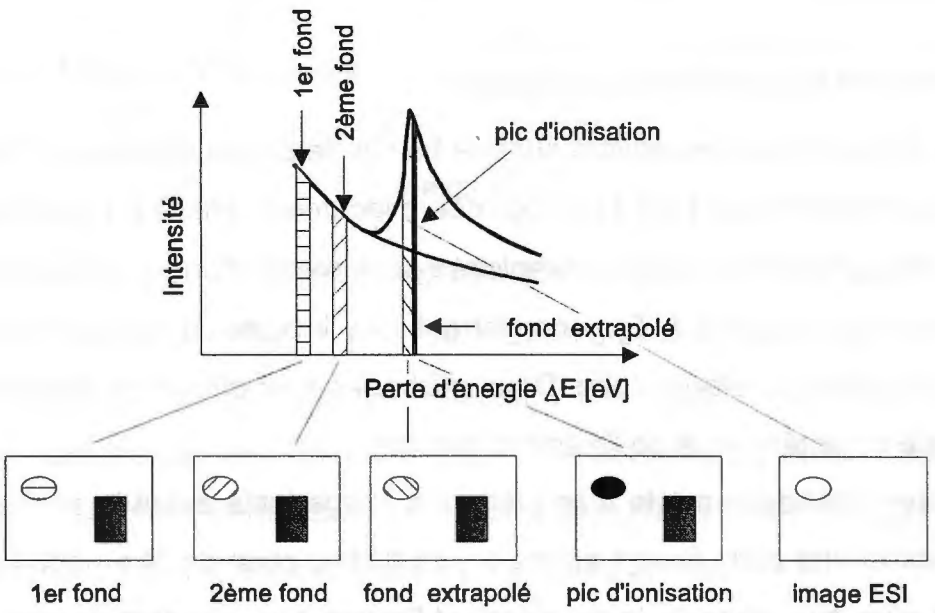
l'information sur l'élément analysé (Figure 3.7). Ce principe est connu sous le nom de "Jump Ratio" (rapport d'intensités).

Figure 3.7 : *Méthode du Jump Ratio.*



La particule ovale contient l'élément mesuré sur le spectre, celle rectangulaire ne le contient pas et l'image élémentaire qui en résulte ne fait apparaître que la particule ovale.

Figure 3.8 : *Imagerie élémentaire ESI.*



La particule ovale contient l'élément mesuré sur le spectre, celle rectangulaire ne le contient pas et l'image ESI qui en résulte ne fait apparaître que la particule ovale.

La deuxième méthode permet d'obtenir l'image élémentaire selon l'algorithme suivant :

(i) deux images sont enregistrées à deux énergies inférieures au signal d'ionisation de l'élément,

(ii) de ces deux images, une troisième image est extrapolée à l'énergie d'ionisation de l'élément analysé, selon AE^{-r}

(iii) cette image extrapolée est soustraite électroniquement d'une image enregistrée à l'énergie d'ionisation,

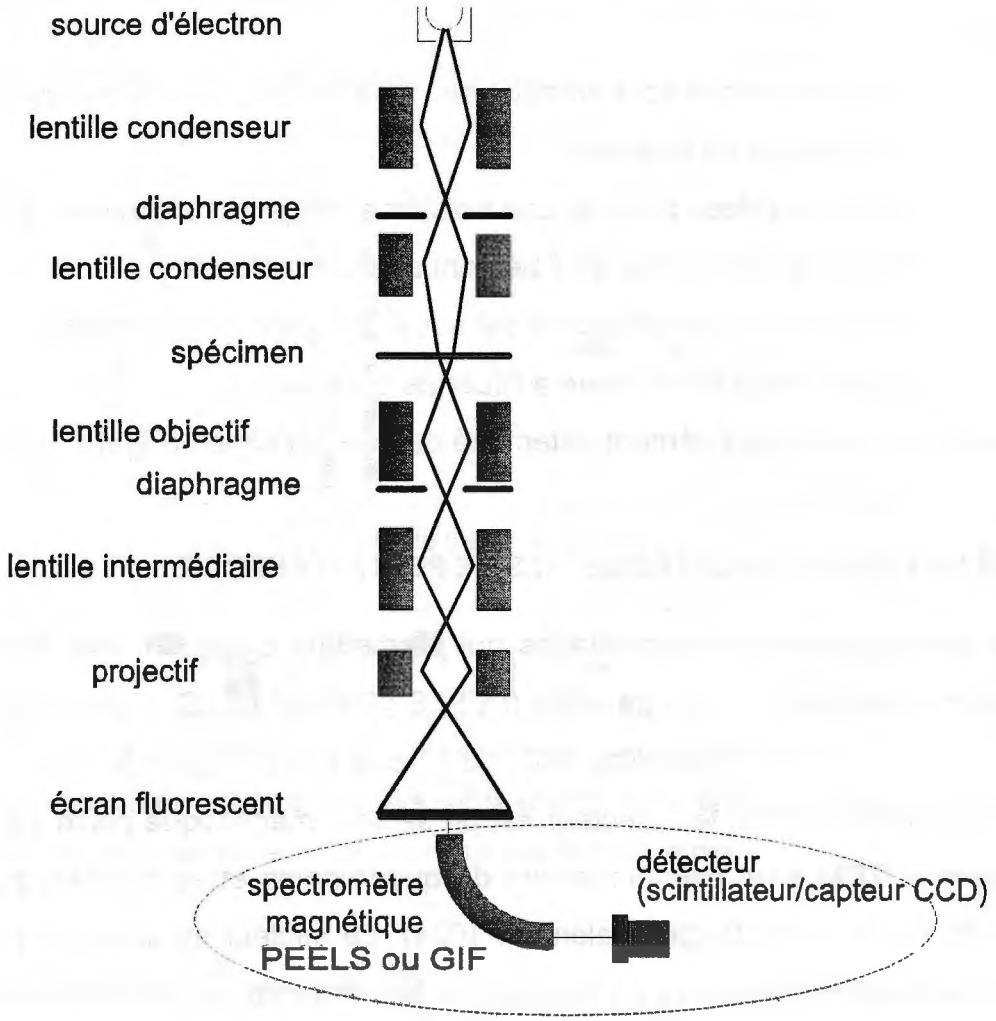
il en résulte une carte de l'élément déterminé dans le spécimen (Figure 3.8).

3.2 Les différents spectromètres de perte d'énergie

Il existe principalement deux montages qui permettent d'acquérir des informations sur la perte d'énergie : - en parallèle (PEELS : Parallel EELS, Figure 3.9),
- en série (SEELS : Serial EELS, Figure 3.11a).

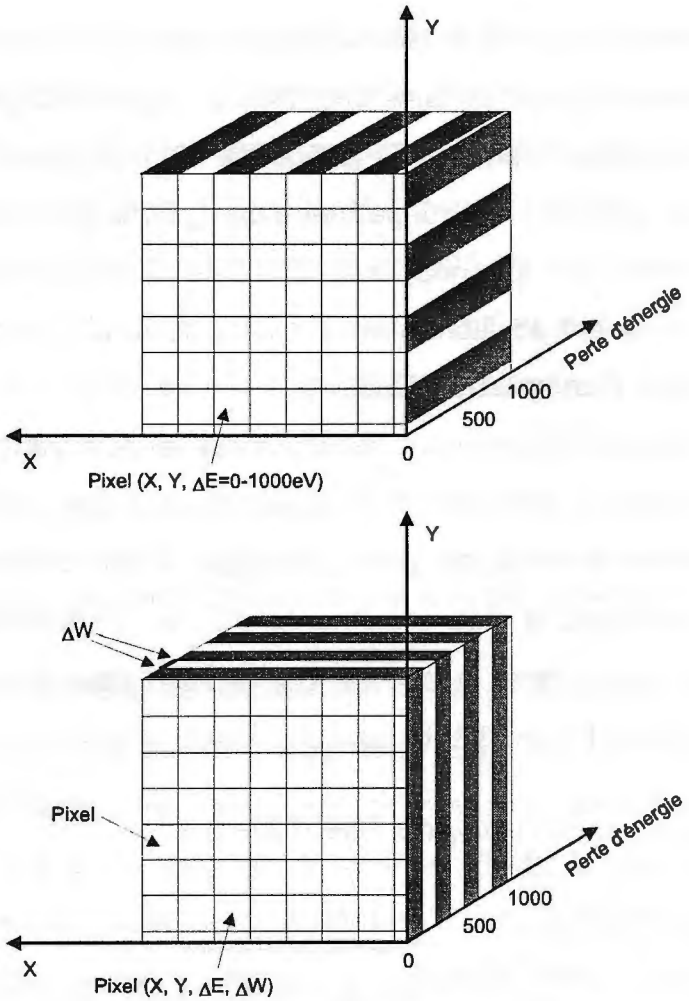
Dans le premier système, le détecteur est un secteur magnétique placé en dessous de la colonne TEM suivi éventuellement de quadrupoles et sextupoles, puis d'une barrette de capteurs CCD (généralement 1024). Le secteur magnétique permet de séparer les électrons transmis en fonction de leur énergie respective et la série de capteurs CCD permet de mesurer l'intensité du signal de chacune des bandes de perte d'énergie. Ce montage donne un accès rapide aux informations cherchées, puisque l'on peut acquérir un spectre complet en quelques secondes. Il existe un second type de spectromètre monté en parallèle qui ne permet plus d'acquérir un spectre mais une série d'images élémentaires. Il est placé sous la colonne TEM et fonctionne de la même manière que le PEELS; cependant, les capteurs CCD ne forment plus une ligne sur laquelle le spectre est projeté mais couvrent l'ensemble de l'image du spécimen. Ce détecteur est appelé Gatan Imaging Filter (GIF).

Figure 3.9 : *Spectromètres en parallèle (PEELS et GIF).*



Comme le PEELS, qui enregistre simultanément un spectre complet de la surface analysée, le détecteur GIF génère en chaque point (pixel) de l'image (région analysée) un spectre de perte d'énergie sur une gamme très large (0-1000eV) de sorte qu'une image enregistrée de cette manière contient l'ensemble des images élémentaires. Ce mode d'enregistrement est appelé "Spectrum-Image" (Figure 3.10a, (Krivaneck, 1989; Lavergne, 1992)).

Figure 3.10 : *Schéma des principes : (a) Spectrum-Image et (b) Image-Spectrum.*



(a) L'image contient en chaque pixel un spectre de perte d'énergie de ΔE=0-1000eV, (b) chaque image est enregistrée à une perte d'énergie ΔE avec une résolution ΔW.

3.2.1 La microscopie électronique à transmission à filtre d'énergie

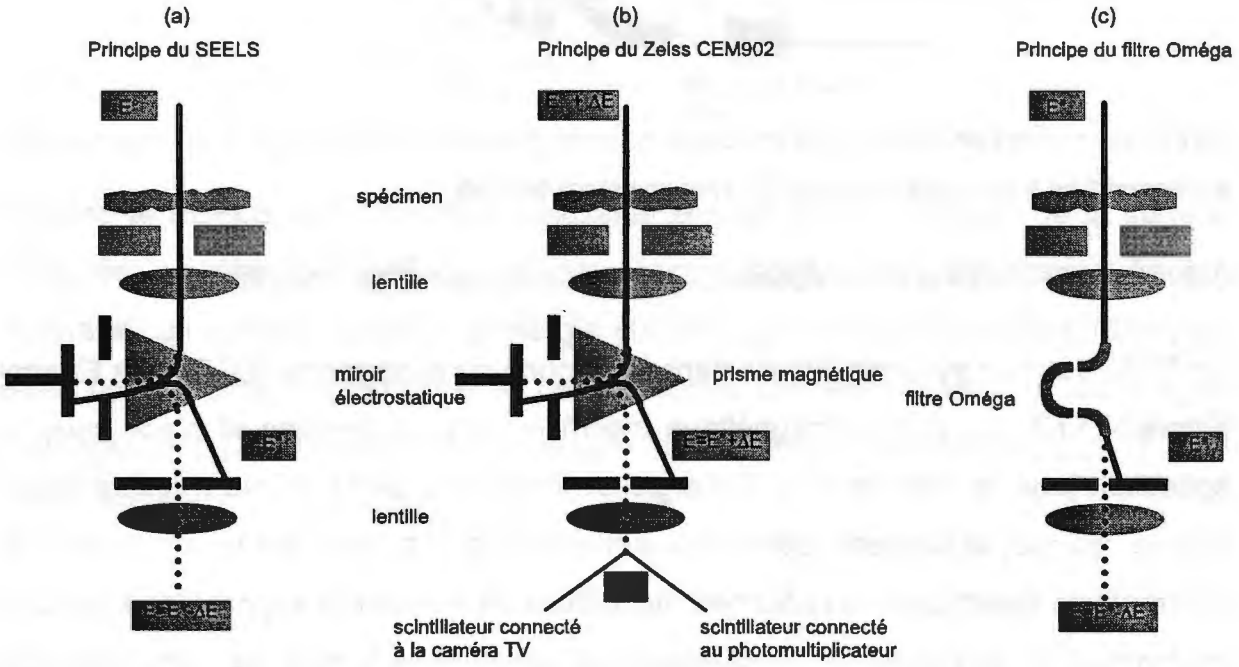
Le SEELS est un système intégré dans la colonne du microscope (EF-TEM = Energy Filtered-TEM). Un prisme magnétique inséré entre deux lentilles et placé sous le spécimen joue le rôle de filtre d'énergie et fonctionne de la même manière qu'un prisme optique; le faisceau d'électrons entrant dans le prisme, contenant toutes les informations spectrales du spécimen, est diffusé de manière à séparer les électrons en fonction de leur énergie. Ce montage est connu sous le nom de "filtre d'énergie de Castaing-Henry" (Castaing, 1969; Ottensmeyer, 1984). En fonction de la tension appliquée au prisme, seuls les électrons ayant perdu une quantité d'énergie ΔE

donnée sortent du prisme selon un trajet identique au trajet en entrée du prisme (Figure 3.11a).

L'image résultante sur l'écran fluorescent est par conséquent celle produite par les électrons n'ayant perdu qu'une certaine quantité d'énergie. Il est possible de mesurer le signal soit à l'aide d'une caméra TV (précédée d'un scintillateur) placée entre le prisme magnétique et l'écran, ce qui permet d'enregistrer des images électroniques pour une perte d'énergie donnée, soit à l'aide d'un scintillateur relié à un photomultiplicateur qui est positionné en dessous de la plaque fluorescente et qui permettra l'acquisition d'un spectre EELS.

Les images électroniques sont donc enregistrées à des pertes d'énergies fixes (différentes pour chaque élément) et l'acquisition des spectres est obtenue par balayage du domaine spectral de perte d'énergie. Il est possible d'acquérir une grande quantité d'images à des incréments ΔE de résolution énergétique ΔW constants, puis de reconstituer le spectre par la suite pour chaque valeur de x_i,y_i (mode Image-spectrum; Figure 3.10b; (Lavergne, 1992)).

Figure 3.11 : *Schéma du microscope à filtre d'énergie.*



Finalement, il existe un filtre d'énergie, placé dans la colonne du microscope de la même manière que le filtre de Castaing-Henry, appelé filtre Oméga, qui n'a plus la

géométrie d'un prisme mais d'une série d'aimants formant un oméga (Figure 3.11c). Ce détecteur fonctionne comme le prisme mais présente l'avantage de travailler avec une source de plus haut voltage (typiquement 120keV, Zeiss EM-912).

Pour des raisons de commodité expérimentale (alignement et stabilité du faisceau), le EF-TEM Zeiss 902 est conçu de la manière suivante : lors de l'acquisition d'un spectre, la tension à la source ($E° = 80keV$, tension nominale) est augmentée d'un incrément ΔE croissant (où ΔE varie entre 0 et 2000eV). Le filament est donc soumis à une tension de $E = E° + \Delta E$ (Figure 3.11b). La tension au filtre d'énergie est réglée de manière à ne permettre que la transmission d'électrons dont l'énergie est de 80keV, c'est-à-dire ayant perdu l'incrément ΔE lors de leur interaction avec le spécimen.

3.2.2 L'optique du microscope à transmission à filtre d'énergie

Comme vu précédemment, le microscope à filtre d'énergie offre la possibilité d'obtenir un spectre (EELS) ou une image filtrée (ESI).

Lorsque l'on considère une image de microscopie électronique comme une projection selon l'axe z (le long de la colonne TEM), le résultat de l'interaction électron-matière peut être représenté selon une distribution d'intensités I en fonction de coordonnées spatiales x, y (image), ou selon la perte d'énergie ΔE (spectre, image filtrée). Afin de mieux décrire les différents modes de mesure, définissons certains paramètres de ces coordonnées :

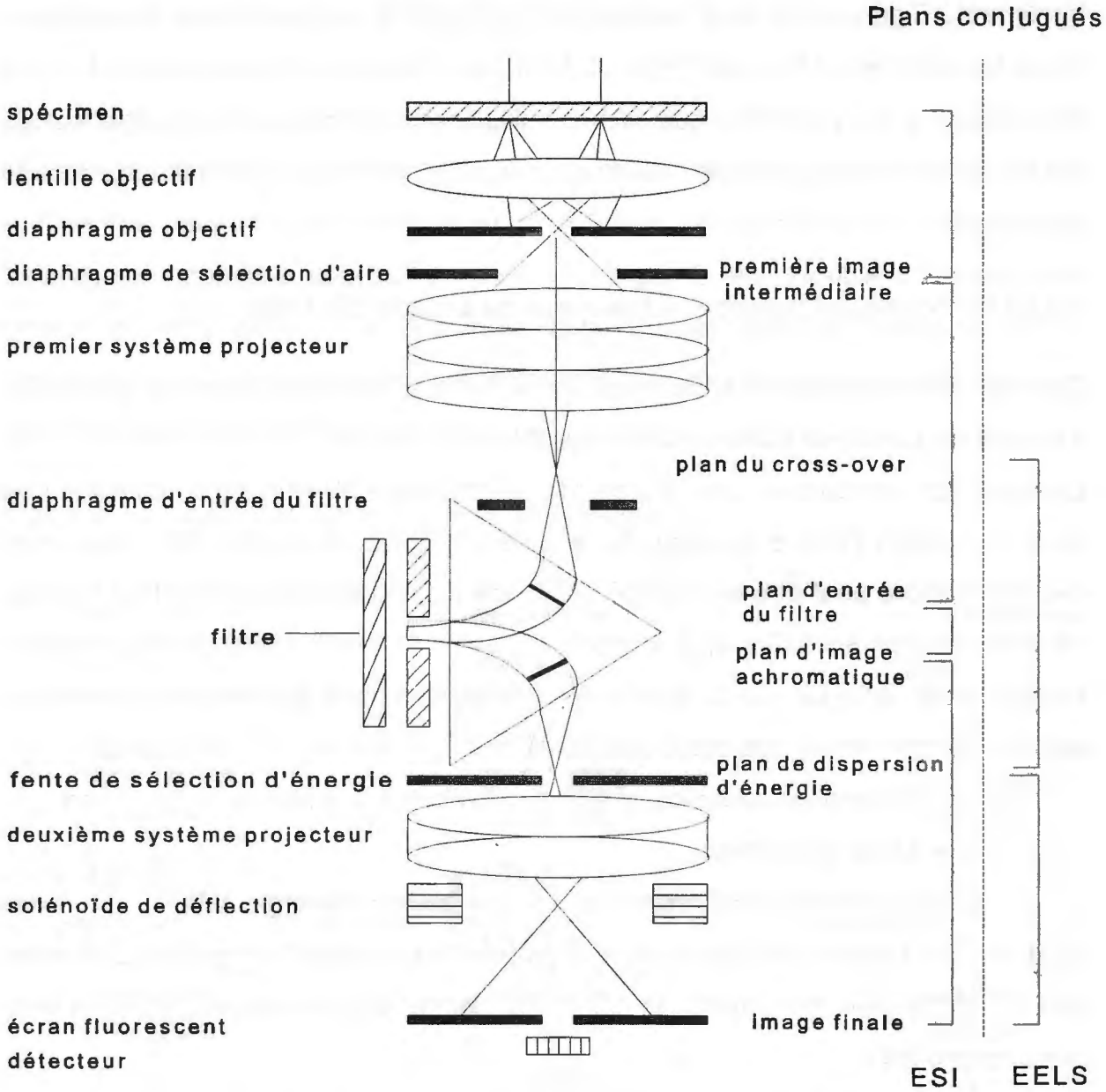
- en coordonnées spatiales; x, y correspondent à une fenêtre de sélection d'aire ΔA du spécimen.
- en perte d'énergie; ΔE correspond à une fenêtre d'énergie ΔW.

Il est dès lors possible, au moyen de ces paramètres, de définir les modes utilisables en EF-TEM (Reimer, 1988) (rem. : la diffraction électronique en énergie filtrée ne sera pas abordée ici) :

- Le ESI sera la représentation de I en fonction de x, y, ΔW.
- Le EELS lorsqu'il est enregistré en mode spectre I (ΔE, ΔA) et en mode image I (x, y, $\Delta W(t)$, ΔA) où $\Delta W(t)$ est ΔW en fonction du temps t.

Ces deux modes d'analyse sont aisément visualisables (Figure 3.12) en considérant le chemin optique des électrons à travers le filtre d'énergie et les plans conjugués (images formées au sein de la colonne TEM) créés par les différents éléments de la colonne (lentilles, condenseurs, filtre d'énergie).

Figure 3.12 : *Schéma optique du microscope à filtre d'énergie (adapté de Reimer, 1988).*



L'image obtenue en mode ESI est, selon la figure 3.12, la projection du plan achromatique sur l'écran fluorescent. Cette image est celle des électrons ayant

perdu une énergie fixée par la tension appliquée à la source (E°+ΔE) à un temps donné et de résolution énergétique fixée par la fente de sélection d'énergie (ΔW).

En mode EELS, il est possible d'acquérir le spectre soit en mode image soit en mode spectre. Le mode image est la même représentation qu'en mode ESI mais pour lequel la tension sur la source est variée en fonction du temps (E°+ΔE(t)). En mode spectre, le plan de dispersion d'énergie est projeté sur l'écran fluorescent. Dans ce cas, le spectre EELS est directement visualisé. L'ensemble de ces techniques et de ces modes d'analyses peut être résumé par les deux tableaux suivants :

	ESI	**EELS spectre**	**EELS image**
Intensité de signal en fonction de	x, y, ΔW	ΔE, ΔA	x, y, ΔW(t), ΔA
image observée sur l'écran fluorescent	image du spécimen (pseudo dark-field)	image caustique (spectre de perte d'énergie)	image du spécimen (pseudo dark-field)
enregistrement	caméra	scintillateur/PMT	scintillateur/PMT
représentation finale	image filtrée	spectre f(E)=I	spectre f(E)=I

	montage en série EF-TEM	**montage en parallèle PEELS / GIF**
ESI	oui	non/oui
EELS	oui	oui/non
t mesure	minutes	secondes
domaine d'analyse	0-2000eV	0-2000eV
résolution max.	2eV	0.4/0.8eV
analyse qualitative	oui	oui
analyse quantitative	oui	oui
élements analysables Z	1 à 92	1 à 92
domaine d'épaisseurs t/λ	0.5 à 5	0.5 à 5

4 TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

4.1 ECHANTILLONS 31

4.1.1 CENTRIFUGATION 31

4.1.2 FILTRATION 34

4.2 SPÉCIMENS 35

4.2.1 PORTE-SPÉCIMENS 36

4.2.2 PRÉPARATION DE SPÉCIMENS TEM PAR ULTRACENTRIFUGATION 37

4.2.3 PRÉPARATION DE SPÉCIMENS TEM PAR ULTRAMICROTOMIE 38

4 TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS ET SPÉCIMENS

Par définition, l'échantillon représente le matériel qui va être utilisé pour produire un spécimen de microscopie. Cette différence entre spécimens et échantillons permet d'éviter tout quiproquo sur la nature de l'objet et sera utilisée tout au long de ce travail.

4.1 ECHANTILLONS

Les colloïdes modèles et les prélèvements du terrain (sols, rivières) ont été traités selon l'une ou l'autre des deux méthodes décrites ci-dessous. Néanmoins, il existe une palette d'autres techniques de conditionnement utilisables en environnement (qui permettent d'obtenir des résultats similaires) mais qui ne seront pas développées ici. Ces dernières sont généralement plus adaptées aux analyses physico-chimiques (par exemple : AAS, ICP, XRD) à l'échelle de la suspension (ou solution) qu'aux études microscopiques des particules individuelles.

4.1.1 CENTRIFUGATION

4.1.1.1 PRINCIPE ET THÉORIE

La centrifugation permet la séparation de particules d'une suspension selon leur taille, leur densité et leur morphologie. Le temps nécessaire à ce type de séparation peut être calculé à l'aide d'une équation dérivée de la loi de Stokes (Equation 4.1), dans laquelle les particules sont considérées comme sphériques. Cette approximation reste valable dans un domaine de variabilité géométrique assez large pour une application à des échantillons environnementaux contenant des particules minérales (sphères déformées); la modélisation de la séparation de substances organiques présente en revanche plus de problèmes.

Equation 4.1 : *Temps de centrifugation d'une particule (équation dérivée de la loi de Stokes sur la vitesse de sédimentation).*

$$t = \frac{18\eta \ln(x_2 / x_1)}{(\rho - \rho_0)\omega^2 d^2}$$

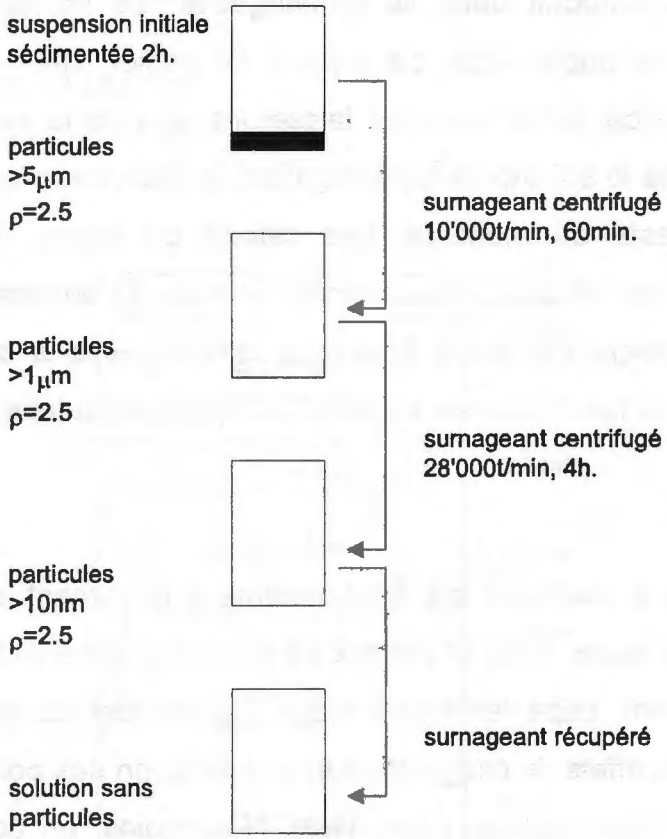
où t = temps de centrifugation [s], x_1, x_2 = position de la particule dans le tube [cm] (Figure 4.5), ρ_0 = densité de la solution [g/cm^3] et ρ = densité de la particule [g/cm^3], η = viscosité de la suspension [poise], d = diamètre de la particule [cm], ω = vitesse angulaire [rad/s].

L'utilisation de cette équation permet le calcul du temps de centrifugation maximum nécessaire pour séparer et déposer des particules de taille et de densité données sur la grille TEM (Figure 4.5) dans des conditions expérimentales données.

4.1.1.2 Fractionnement par centrifugation séquentielle

La séparation, selon le critère de taille et de densité, des particules présentes dans une suspension peut se faire selon une méthode de centrifugation où la suspension est fractionnée par des étapes successives (Figure 4.1 (Perret, 1994)). Le surnageant de chacune des séquences contient les particules de granulométrie de plus en plus fine, pour finir avec une suspension contenant exclusivement les colloïdes de taille et de densité escomptées. Les paramètres de ces séquences (temps et vitesses de centrifugation) sont calculés à l'aide de l'équation 4.1. L'exemple présenté dans la Figure 4.1 permet de suivre les centrifugations successives appliquées à la suspension et aux surnageants résultants. Les particules obtenues dans le culot de chaque centrifugation sont toujours de taille et de densité supérieures ou égales à celles déterminées lors du calcul du temps de centrifugation. Il est assez fréquent de remplacer la première étape de centrifugation par une sédimentation pour les particules suffisamment grandes (>5µm). La dernière fraction peut théoriquement ne plus contenir que les composés dissous. Chaque étape peut être utilisée pour des analyses autant microscopiques qu'à l'échelle de la suspension.

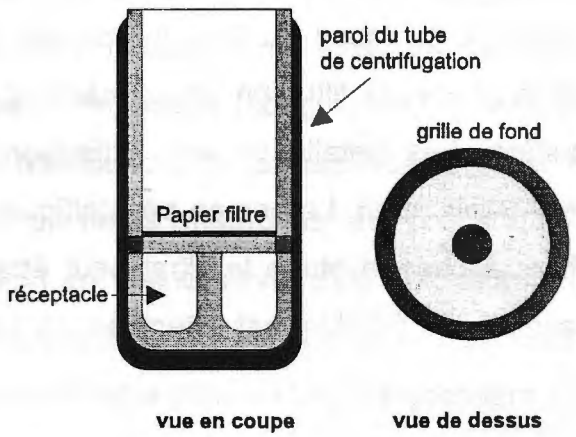
Figure 4.1 : *Exemple de schéma de centrifugation en cascade.*



4.1.1.3 PRINCIPE DE L'EXTRACTION DE SUSPENSIONS DE SOL PAR CENTRIFUGATION

Une autre méthode de centrifugation permet de récupérer l'eau contenue dans un sol. Cette technique a été développée en pédologie (Keller, 1995) et sera appliquée dans ce travail pour l'étude d'un sol alpin (podzol, chap.8).

Figure 4.2 : *Système d'extraction d'eau du sol par centrifugation.*



Afin de résumer le fonctionnement de cette méthode, la Figure 4.2 présente le montage qui sera introduit dans la centrifugeuse. Le sol est déposé avant la centrifugation sur un papier filtre. Le support de papier filtre (vue de dessus) est perforé d'une série de petits trous qui laisseront, lors de la centrifugation, passer l'eau contenue dans le sol. Après centrifugation, le réceptacle contient l'eau et peut être séparé du reste du montage. Les calculs du temps et des vitesses de centrifugation ont été établis préalablement lors de l'élaboration du système en pédologie. Le montage est prévu pour une centrifugeuse à balancier (swing-out rotor) de sorte que la force exercée sur le sol soit perpendiculaire au plan du filtre.

4.1.2 FILTRATION

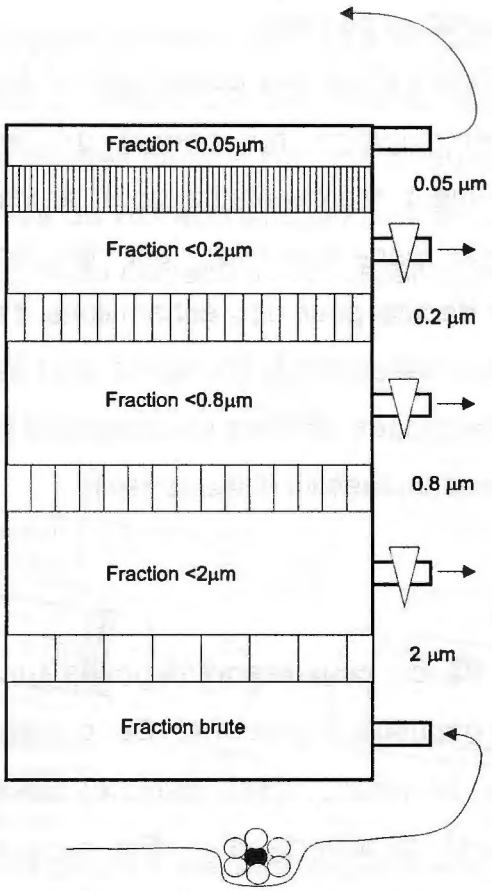
La filtration est une méthode de fractionnement largement utilisée en science environnementales (Laxen, 1982) et permet de traiter les échantillons directement sur le terrain. Cependant, cette technique induit des erreurs de séparation de tailles provoquées par des effets de coagulation et d'obstruction des pores de la membrane de filtration (Buffle, 1992; McDowell-Boyer, 1986). Néanmoins, en contrôlant le débit à travers la membrane et par conséquent la vitesse de filtration, ces effets peuvent être minimisés.

4.1.2.1 PRINCIPE DE LA FILTRATION EN CASCADE

La suspension passe à travers des membranes de filtration de porosité décroissante se succédant le long d'une colonne. Lorsque la filtration est trop lente comme dans le cas de membranes de faible porosité (typiquement $\leq 0.05\mu m$), une pression externe peut être imposée au système. Dès lors, le temps de récupération de chaque fraction peut varier de quelques dizaines de minutes à plusieurs heures. La Figure 4.3 présente le montage de filtration en cascade qui a été utilisé lors de l'étude d'un karst aquifère. Les détails de son utilisation y seront décrit plus amplement au chapitre 9 (Atteia, 1996). La pompe péristaltique conduit la suspension brute sur le premier filtre; à chaque étape le filtrat peut être récupéré et analysé. Etant donné que la cascade de filtration est effectuée de bas en haut, la fraction

récupérée en dessus de chaque filtre ne contient, en théorie, que les particules de taille inférieure à la porosité du filtre.

Figure 4.3 : *Filtration en cascade.*



La pompe péristaltique entraîne la suspension brute dans le système; à chaque étape, les vannes permettent de prélever une fraction intermédiaire.

4.2 SPÉCIMENS

La préparation de spécimens pour la TEM des suspensions de microparticules synthétiques ou naturelles requiert une attention particulière afin d'éviter des transformations physico-chimiques (coagulation, dissolution, détérioration de matériel fragile) ou des distributions de tailles biaisées (Perret, 1991a).

Il existe actuellement plusieurs méthodes de préparation de spécimens TEM (Robards, 1993). L'inclusion en résine suivie d'ultramicrotomie (voir chap. 4.2.3) et la déposition sèche sont les techniques habituellement utilisées pour des échantillons biologiques et environnementaux (Smart, 1981). La première implique un travail long,

fastidieux et produit des altérations d'échantillon principalement lors de sa déshydratation. Le principe exact sera décrit plus loin dans ce chapitre.

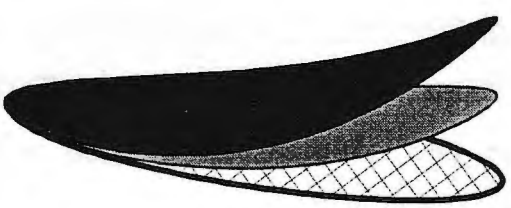
La déposition sèche est une préparation rapide et simple mais produit des artefacts tels que la formation de précipités ou la cristallisation de l'électrolyte de la suspension lors de l'évaporation de l'eau.

Ces préparations ne satisfont donc pas complètement les critères cités plus haut, contrairement à l'ultracentrifugation qui permet d'obtenir des spécimens non-perturbés et quantitativement représentatifs pour la visualisation TEM avec un recouvrement optimal du porte-spécimen par les colloïdes. Une procédure d'ultracentrifugation déjà décrite pour des échantillons d'eau de mer (Nomizu, 1986) sera appliquée aux modèles de colloïdes (Perret, 1991b) et aux sols (Mavrocordatos,1995). Il existe encore d'autres méthodes utilisées spécialement en sciences des matériaux et biologie qui ne seront pas traitées ici (Robards, 1993).

4.2.1 Porte-spécimens

Une fois les échantillons traités, ceux-ci sont déposés sur une grille porte-spécimen de 3 à 3.5 millimètres de diamètre (Figure 4.4). Cette grille peut être de composition différente (p.ex. cuivre, or, béryllium, nickel, carbone) suivant l'échantillon ou suivant l'analyse désirée. Elle est recouverte d'un film support plastique (formvar ou collodion). Le film est obtenu à partir d'une solution de collodion dans de l'acétate de pentyle. Cette solution est évaporée sur une plaque de verre. Les grilles de microscopies sont ensuite déposées sur ce film (Perret, 1989). Par ce principe, le film déposé est le plus fin possible, ce qui sera utile pour le spectrométrie en perte d'énergie. En dessus de ce film, une couche de carbone évaporé permet d'obtenir un porte-échantillon conducteur (thermiquement et électriquement). L'ensemble grille-échantillon forme le spécimen qui sera introduit dans le microscope.

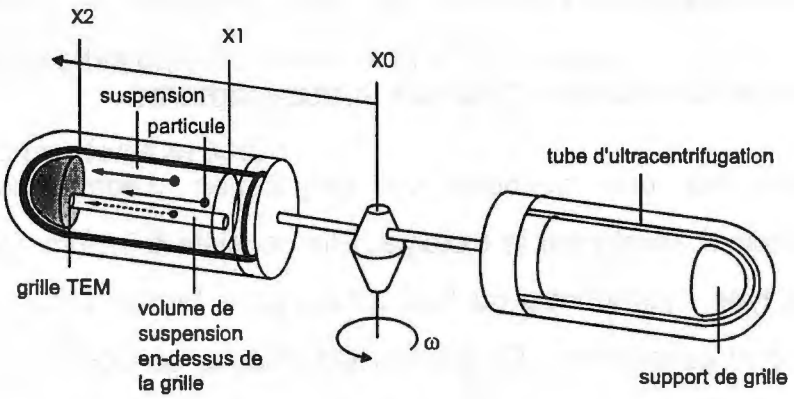
Figure 4.4 : *Porte-spécimen pour la microscopie à transmission.*



4.2.2 PRÉPARATION DE SPÉCIMENS TEM PAR ULTRACENTRIFUGATION

Les grilles de TEM sont légèrement collées sur un support de grille en résine époxy. Le support de grille est déposé au fond d'un tube de centrifugation dans lequel la suspension à analyser est lentement ajoutée (afin de ne pas décoller la grille du support). Les particules présentes dans la colonne d'eau en dessus de la grille vont s'y déposer directement lors de l'ultracentrifugation; il en résulte ainsi un spécimen quantitativement représentatif du contenu de la suspension (Figure 4.5).

Figure 4.5 : *Principe de l'ultracentrifugation d'une suspension.*



où X_2-X_1=distance maximum de parcours des particules et ω=vitesse de rotation, généralement exprimée par la force centrifuge appliquée au système.

4.2.2.1 APPLICABILITÉ AUX ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX

La méthode d'ultracentrifugation permet de déposer du matériel (colloïdes aquatiques) sur les grilles de microscopie sans en altérer ses propriétés physico-chimiques. Elle est donc particulièrement adaptée pour l'observation de suspensions de particules. Néanmoins, il faut noter que les particules présentes dans les diverses suspensions sont de taille variable. Cette contrainte explique que contrairement à l'ultramicrotomie, l'on ne contrôle absolument pas l'épaisseur du spécimen, qui, comme décrit au chap.3.1.3.2 est un paramètre déterminant en spectrométrie de perte d'énergie. Il est par conséquent important de souligner ici que la nature même des échantillons environnementaux et le mode de préparation des spécimens sont susceptibles de limiter l'applicabilité de cette spectrométrie (voir aussi chap.6.2.3).

De plus, suivant la quantité de colloïdes présents dans l'échantillon, le recouvrement de la grille sera plus ou moins idéal. En effet, si la concentration en particules est trop élevée, l'ensemble de la grille sera couvert d'un tapis de particules indiscernables les unes des autres. Il est possible de contrôler ce recouvrement par des mesures préalables de turbidité de la suspension. Ces mesures sont établies sur des échantillons de colloïdes standards, comme de l'hématite. Une série de spécimens sont préparés par centrifugation avec des concentrations croissantes de particules en suspension. Chaque suspension est ensuite mesurée et le recouvrement associé est établi par les observations microscopiques. Ainsi, la valeur de la turbidité mesurée qui correspond à un recouvrement de grille idéal sera établie pour une certaine concentration. Les valeurs obtenues pour l'hématite sont similaires à celles d'échantillons naturels.

4.2.3 Préparation de spécimens TEM par ultramicrotomie

L'ultramicrotomie est une méthode de préparation d'échantillons qui a été développée principalement pour la biologie. Elle consiste à inclure l'échantillon dans une résine (de type hydrophobe ou hydrophile) pour former un bloc de matière à analyser (résine et échantillon). Ce dernier est ensuite sectionné en fines sections (de ~30nm à quelques centaines de nm) à l'aide d'un microtome. Ces sections sont alors déposées sur les grilles de microscopie pour ensuite être visualisées.

4.2.3.1 Inclusion en résine

L'inclusion d'un échantillon en résine induit un processus d'échange entre le solvant contenu dans l'échantillon et la résine. Cet échange va se faire tout au long de la polymérisation de la résine et donnera lieu à des modifications au sein des composants de l'échantillon.

Il existe plusieurs résines de propriétés physico-chimiques très différentes. Les plus couramment utilisées en biologie sont les résines époxy hydrophobes (Epon, Spurr, (Spurr, 1969)). L'utilisation de ce type de résine avec des échantillons aqueux nécessite de substituer l'eau par de l'alcool avant l'inclusion en résine. Il existe d'autre part une résine mélamine hydrophile (Nanoplast FB101 (Frösch, 1989)), qui

permet de passer directement à l'étape de préparation du bloc de matière à sectionner, en s'affranchissant de l'étape de déshydratation.

4.2.3.2 PRÉPARATION DE SECTIONS ULTRAFINES

Afin de pouvoir sectionner les blocs, il faut préparer ces derniers. En effet, le bloc de résine polymérisée contenant la matière ne présente pas de surface plane et lisse permettant d'être aisément coupée en sections. Il faut donc pré-sectionner le bloc pour lui donner une forme de pyramide tronquée (Figure 4.6). Une fois le bloc prêt, il est introduit dans un microtome et les sections sont obtenue soit à l'aide d'un couteau de verre pour les résines époxy contenant des échantillons d'origine biologique soit à l'aide d'un couteau de diamant pour les résines de type Nanoplast ou époxy contenant du matériel minéral. Les sections obtenues sont alors déposées sur des grilles couvertes ou non de collodion et carbonées.

Figure 4.6 : *Bloc de résine et section.*

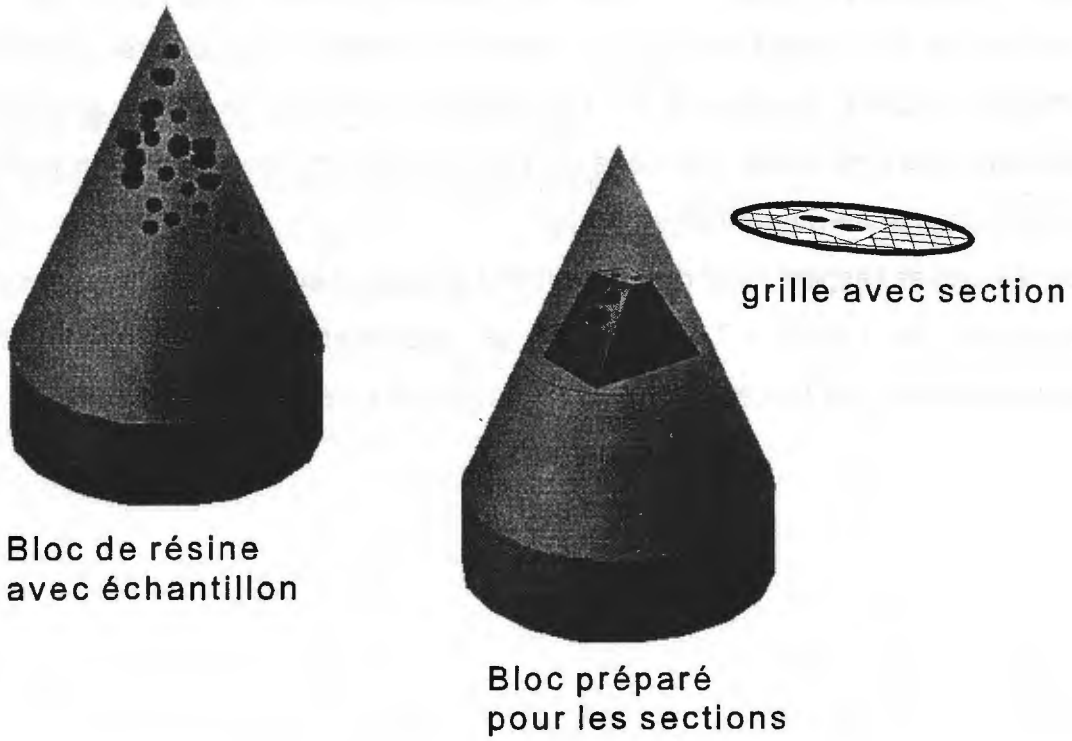
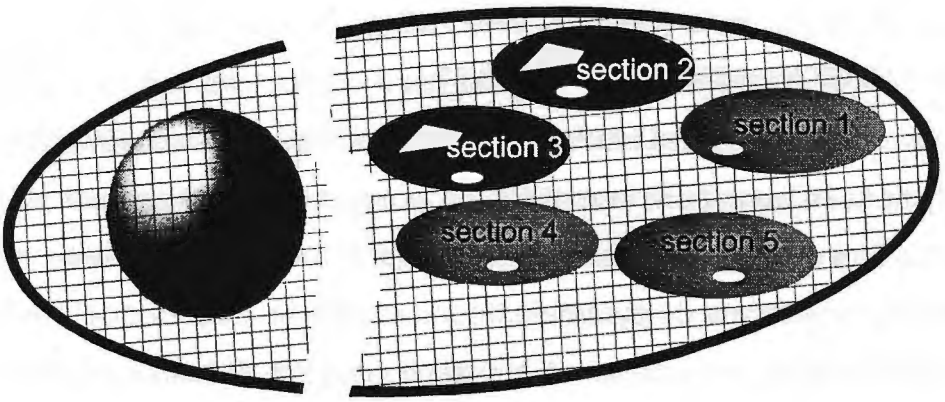


Figure 4.7 : *Déposition par ultracentrifugation et sections d'ultramicrotomie.*



particule déposée par ultracentrifugation sections de la particule par ultramicrotomie

4.2.3.3 APPLICABILITÉ AUX ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX

La microtomie et l'ultramicrotomie sont couramment utilisées en science de l'environnement en raison de leur fiabilité. Elles permettent de contrôler l'épaisseur des spécimens et donnent accès à la structure interne de la matière. Néanmoins, l'information qu'elles fournissent ne représente qu'une partie de la structure de l'échantillon. Dès lors, seule une série de sections d'un même échantillon permettra de reconstruire l'entièreté de l'objet étudié.

Afin de visualiser l'aspect final des spécimens préparés soit par microtomie soit par centrifugation, la Figure 4.7 représente un spécimen contenant une particule sphérique obtenue par l'un et l'autre de ces modes de préparation.

5 MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1 CHOIX DES COLLOÏDES MODÈLES 42

5.1.1 COLLOÏDES MODÈLES 42

5.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS 44

5.2.1 CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES 44

5.2.2 SPÉCIMENS DE PARTICULES MODÈLES 44

5.3 MICROSCOPES ET SPECTROMÈTRES COUPLÉS 45

5 MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1 CHOIX DES COLLOÏDES MODÈLES

Dans le but d'adapter les méthodologies TEM-EELS, décrites au chapitre 3, à l'étude d'échantillons aquatiques, des microparticules modèles ont été choisies selon des critères environnementaux (similaires à celles du milieu naturel), chimiques (composition connue) et morphologiques (taille <0.45μm). D'autre part, le fer, l'aluminium et les aluminosilicates jouent un rôle important dans les cycles biogéophysicochimiques dans les sols et les eaux naturelles (Duchaufour, 1984; Buffle, 1989). Ces colloïdes proviennent soit de synthèses au laboratoire, soit du commerce. L'hématite (α-Fe_2O_3), la goethite (α-FeOOH), l'alumine (Al_2O_3) et la kaolinite ($Al_2Si_2O_5(OH)_4$) sont les modèles de choix.

L'hématite synthétique est bien caractérisée autant chimiquement que physiquement et forme des particules sphériques, stables et monodisperses dans le domaine des valeurs éloignées du pH_{zpc}=8.5 (zpc = zero point of charge; Penners, 1985). La goethite synthétique, au même titre que l'hématite, est bien connue et se présente sous la forme d'aiguilles. L'alumine et la kaolinite proviennent du commerce et sont parfaitement caractérisées autant chimiquement que physiquement.

5.1.1 COLLOÏDES MODÈLES

Les substances chimiques utilisées pour la synthèse de colloïdes sont de qualité analytique (pro analysis); dans le cas contraire, leur pureté sera mentionnée. L'eau ultrapure utilisée (Elgastat UHQ-II) est produite par échange d'ions, adsorption de la matière organique, ultrafiltration et traitement aux UV.

La synthèse d'hématite (α-Fe_2O_3) est effectuée selon une procédure dérivée de préparations décrites dans la littérature (Matijevic, 1993; Liang, 1988; Penners, 1985). Une solution de $Fe(ClO_4)_3$ 3.5 x 10^{-2} M (pract. 97%) dans $HClO_4$ 5 x 10^{-2} M est portée à ébullition pendant 24h; les microparticules sont produites par hydrolyse forcée de Fe^{3+} et sont purifiées par trois centrifugations successives (force centrifuge relative RCFmax=10^5g, 10min; Centrikon T2070, swing-out rotor TST 28.38) dans une

solution fraîchement préparée de $HClO_4$ 10^{-3} M, dans laquelle elles sont finalement conservées.

Les particules monodisperses de ~70nm de diamètre et de densité 5.24g/cm^3 sont obtenues sous la forme d'une suspension stock (~2g/l), conservée à pH = 3. Leur analyse par diffraction X (Philips PW1730/1710) indique une structure cristalline de α-Fe_2O_3 pur. La concentration de fer a été déterminée par ICP-AES (Perkin-Elmer Plasma 1000; λFe = 208.204nm) après digestion des particules dans une solution de HNO_3 5% et de $H_2NOH.HCl$ 0.1M (100°C, 24h).

La goethite synthétique (don de Hue Nishe Pûen) en poudre (phase α) se présente sous forme d'aiguilles de 0.5-1μm de longueur par 30-50nm de diamètre.

L'alumine (Al_2O_3, Degusa), sous forme de poudre de colloïdes de 13nm de diamètre et de 3.1g/cm^3 de densité, est mise en suspension (0.1mg/l) dans l'eau à pH=7 et agitée 2h avant l'utilisation.

L'argile purifiée (kaolinite, $Al_2Si_2O_5(OH)_4$; Wards) a été mise en suspension dans l'eau (1g/l) et agitée durant 12h. Une centrifugation (5 x 10^4g; 10min) de la mixture a permis d'éliminer les agrégats et les particules de taille >500nm. Le surnageant a été récupéré pour la préparation des spécimens de microscopie. L'ensemble des particules modèles utilisées dans cette étude est résumé ci-dessous.

Tableau 5.1 : *Particules modèles.*

Particule	Morphologie	Taille [nm]	Composition
Hématite	sphères	d=~70	α-Fe_2O_3
Goethite	aiguilles	l=1000-500, d=~30	α-FeOOH
Alumine	sphères	d=~13	Al_2O_3
Kaolinite	feuillets	l<500, e<500	$Al_2Si_2O_5(OH)_4$

l = longueur, d = diamètre, e = épaisseur

5.2 PRÉPARATIONS DES ÉCHANTILLONS

5.2.1 CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Les fractionnements de colloïdes et préparations de spécimen TEM ont été effectués avec une ultracentrifugeuse Centrikon T2070, équipée d'un rotor avec des tubes à balanciers (Kontron swing-out rotor TST-28.38; 28'000t/min=135'000g), de 38.5ml de contenance ou une centrifugeuse Sorvall R5C (Du Pont Instrument) équipée d'un rotor HS4 (tubes à balanciers; 6'000t/min).

5.2.2 SPÉCIMENS DE PARTICULES MODÈLES

Dans le cadre de ce travail, seules des grilles de Cu° 200mesh (diamètres=3.05mm) recouvertes de collodion (~20nm d'épaisseur) et de carbone évaporé (5-10nm d'épaisseur) ont été utilisées.

5.2.2.1 PRÉPARATIONS PAR ULTRACENTRIFUGATION

L'optimalisation des conditions EELS a été déterminée à l'aide de microparticules d'hématite (α-Fe_2O_3) de ~70nm de diamètre; la suspension (4ml, 0.1mg/l) a été ultracentrifugée (5 $X10^4$g, 15min) sur grilles TEM. Ce volume de suspension engendre un recouvrement de grille pour lequel les colloïdes se retrouvent individuellement et uniformément répartis. Afin de déterminer les paramètres d'analyse d'autres éléments, l'alumine et la kaolinite ont été utilisées respectivement pour l'aluminium et le silicium; la suspension d'alumine (Al_2O_3, 4ml, 0.1mg/l) a été déposée sur grille par ultracentrifugation (5 $X10^4$g, 55min). La procédure a été répétée pour la suspension de kaolinite (5 $X10^4$g, 15min, 4ml).

Dans la deuxième partie de la paramétrisation du TEM-EELS, une succession de centrifugations de microparticules a permis d'intégrer plusieurs éléments préparés sous les mêmes conditions que ci-dessus dans le même spécimen. Après déposition d'hématite et élimination du surnageant, une suspension d'alumine a été centrifugée, le surnageant a également été éliminé et la suspension de kaolinite a été déposée

sur les mêmes grilles. Le spécimen obtenu contient alors l'hématite, l'alumine et la kaolinite.

5.2.2.2 PRÉPARATIONS PAR ULTRAMICROTOMIE

Les inclusions en résine ont été préparées avec la résine mélamine (Nanoplast FB101) dans les conditions suivantes : dureté moyenne (10g de résine et 0.2g de catalyseur), 200µl/bloc, polymérisation en deux étapes : la première dans un dessicateur à 40°C durant 48h suivie d'une deuxième période de 48h à 60°C à l'air.
La poudre de goethite (5mg/bloc) a été directement introduite dans la résine fraîche puis centrifugée afin d'obtenir le maximum de particules dans la partie à sectionner.
Les blocs de résine obtenus ont été sectionnés à l'aide d'un couteau en diamant Standard (Microstar). Toutes les sections ont été préparées avec un microtome MT-7 (Research and Manufacturing) et ont été coupées sur des épaisseurs de 40-200nm mesurées par la suite au microscope par EELS (réglage de l'appareil 10-300nm).

5.3 MICROSCOPES ET SPECTROMÈTRES COUPLÉS

La morphologie des spécimens a été étudiée à l'aide d'un TEM conventionnel EM-10 (CTEM, Zeiss, filament tungstène, 80keV).
Les analyses EDS ont été menées à l'aide d'un détecteur EDS (Princeton Gamma Tech : PGT), piloté par une station UNIX et programme IMIX, connecté au microscope TEMSCAN 1200 Ex II (JEOL, filament LaB_6, 80keV) en mode balayage (scan-mode).
Les analyses en mode imagerie-EDS ont été faites à l'aide d'un microscope à transmission et balayage (STEM) de type Jeol 2010F muni d'un canon à émission de champ (FEG, 200keV) et un détecteur EDS Link (sans fenêtre) piloté par un PC pentium 150MHz et par le programme LINK.
Les analyses EELS ont été effectuées avec un scintillateur connecté à un photomultiplicateur et piloté par le programme EELS 1.3 installé sur un ordinateur de type PC (Personnal Computer, 386 / 16MHz), l'ensemble faisant partie du microscope Computed EM-902 (EFTEM, Zeiss). Le ESI a été obtenu sur le même

microscope que le EELS en utilisant une caméra TV SIT 66 (Dage) connectée à un digitaliseur et pilotée par le programme IBAS.

Les analyses en mode spectre EDS ont été effectuées à l'aide d'un microscope à balayage du type Jeol JSM-35 travaillant avec une tension de 20keV et équipé d'un détecteur EDS (Link Si(Li)).

Le tableau suivant résume les microscopes utilisés selon les analyses requises.

Tableau 5.1 : Microscopes et détecteurs.

Analyses	microscope, modèle, voltage [keV]	détecteur	traitement des résultats
morphologique	TEM, Zeiss EM-10, 80 SEM, Jeol JSM-35, 20	absent	émulsion photographique
EDS	SEM, Jeol JSM-35, 20	Link Analysis, Si(Li)	ordinateur & programme Link
EDS	STEM, Jeol TEMSCAN 1200 Ex II LaB6, 80	Princeton Gamma Tech PGT	ordinateur SUN (UNIX), programme IMIX
EDS imagerie	STEM, Jeol 2010F, 200	Link Analysis, sans fenêtre	Pentium 150 & programme Link
EELS	EFTEM, Zeiss CEM-902, 80	filtre Castaing-Henry & scintillateur	PC386 & programme EELS1.3
ESI	EFTEM, Zeiss CEM-902, 80	filtre Castaing-Henry & caméra	PC386 & programme IBAS

6 RÉSULTATS ET DISCUSSION

6.1 ANALYSE QUALITATIVE 48

6.1.1 ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES COLLOÏDES 48

6.1.2 ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DE COLLOÏDES INDIVIDUELS 49

6.1.3 ANALYSE MORPHOLOGIQUE D'UNE MÉLANGE DE MICROPARTICULES 54

6.1.4 ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE D'UN MÉLANGE DE MICROPARTICULES 55

6.1.5 INTERPRÉTATION FINE DU SPECTRE D'OXYDE DE FER 57

6.1.6 IMAGERIE ÉLÉMENTAIRE SUR LE FER 60

6.2 ANALYSE QUANTITATIVE 63

6.2.1 BANDE $L_{2,3}$ DU FER 63

6.2.2 BANDE $M_{2,3}$ DU FER 69

6.2.3 EFFET DE L'ÉPAISSEUR SUR LE SPECTRE EELS 74

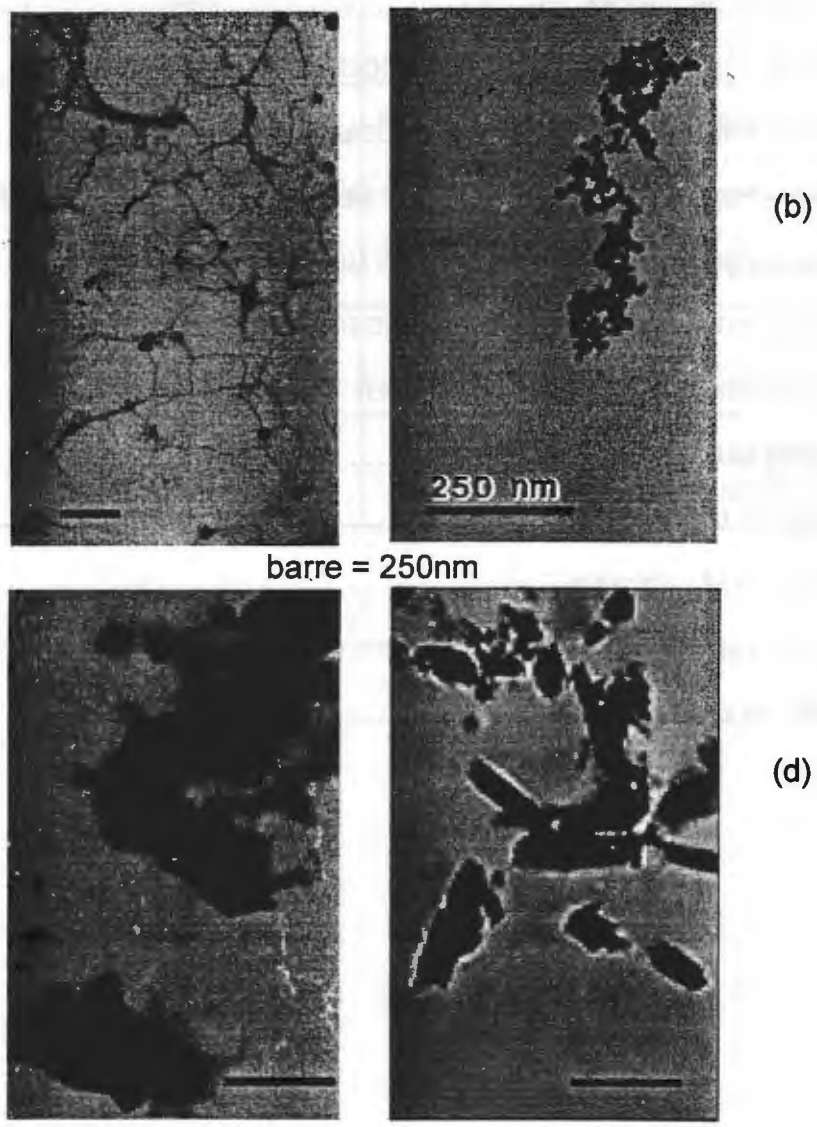
6.3 RAPPEL DES RÉSULTATS 78

6.1 ANALYSE QUALITATIVE

6.1.1 ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES COLLOÏDES

Les spécimens de microparticules choisies comme modèles pour optimaliser l'analyse par EF-TEM ont été préparés par ultracentrifugation et par ultramicrotomie. La concentration et le volume centrifugé de chacune des suspensions ont été optimalisés afin d'obtenir un recouvrement idéal des grilles de TEM. Les sections ont été coupées afin d'obtenir des épaisseurs (30-200nm; rem. pour l'hématite $t/\lambda=0.8$ correspond à 100nm) idéales pour l'analyse EELS.

Figure 6.1 : *Micrographies de microparticules (a) d'hématite, (b) d'alumine, (c) de kaolinite, (d) de goethite.*



Une première visualisation des spécimens par TEM (Zeiss EM10) a permis le contrôle de ces paramètres :

- les colloïdes sphériques d'hématite sont dans la plupart des cas soit individuels (~70nm, monodisperse) soit sous la forme d'agrégats de quelques microparticules (1-10 colloïdes/agrégat, Figure 6.1a). (rem. La micrographie présente un réseau de fibriles polysacharidiques introduites volontairement dans la suspension d'hématite afin de simuler les conditions du milieu naturel)

- Les microparticules d'alumine (13nm) sont toujours agrégées (10-100 colloïdes/agrégat, Figure 6.1b).

- Les particules de kaolinite sont généralement des entités de taille comprise entre 50 et 500nm (Figure 6.1c).

- Les particules de goethite ont la forme d'aiguilles de 30-50nm de diamètre par 100-500nm de longueur; elles sont généralement isolées ou sous la forme d'agrégats de 2-3 particules (Figure 6.1d). De part leur faible épaisseur, ces modèles (< 200nm) ne présentent pas d'inconvénients majeurs pour l'analyse physico-chimique par TEM-EELS.

6.1.2 Analyse physico-chimique de colloïdes individuels

L'analyse des microparticules modèles par EELS (Zeiss CEM 902) a été optimalisée sur les entités individuelles ou agrégées à partir des conditions expérimentales utilisées en science des matériaux, pour des spécimens obtenus par évaporation. Ces paramètres sont :

- Le diaphragme de l'objectif qui permet d'augmenter le contraste de l'image finale en ne sélectionnant qu'une partie des électrons diffusés par l'échantillon. Cette sélection n'est pas déterminante pour les analyses qualitatives mais sera déterminante pour les analyses quantitatives.

- Un agrandissement moyen (20'000-85'000x); ces valeurs d'agrandissement permettent d'obtenir une zone d'analyse du spécimen suffisamment petite sans pour autant en dégrader le spectre enregistré. En effet, lorsque l'on travaille à des grossissements élevés (>100'000x), la luminosité diminue fortement et le signal du détecteur (scintillateur/photomultiplicateur) doit être amplifié au maximum. Cette

amplification augmente drastiquement le bruit de fond et peut donner lieu à une interprétation erronée des signaux EELS.

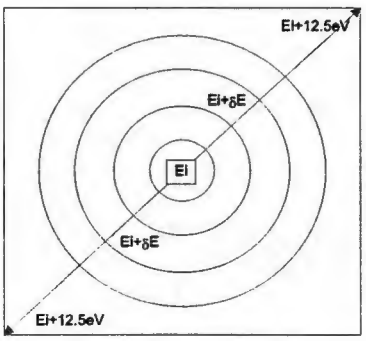
- Un diaphragme d'entrée du filtre d'énergie suffisamment petit (minimum de 100μm sur le CEM-902) afin de sélectionner une aire d'analyse ne contenant que la microparticule ou l'agrégat d'intérêt (un grossissement de 30'000x et une entrée de filtre de 100μm correspondent à une zone d'analyse du spécimen de 0.16μm^2), La sélection d'aire du spécimen est déterminée par les paramètres précédents en mode image; si l'analyse est conduite en mode spectre, alors seul le diaphragme de sélection d'aire va déterminer la surface analysée. Cependant, le mode image est conseillé ici car il permet l'analyse d'une surface plus petite qu'en mode spectre et permet de visualiser exactement la particule analysée.

- Un faisceau concentré (cross-over ou, ce qui est équivalent, le pic du zero loss saturé) pour obtenir le maximum d'intensité sur la zone analysée du spécimen.

- Le réglage de la fente du filtre détermine la résolution énergétique (maximum de 2eV). Pour une analyse qualitative, il n'est pas nécessaire que cette dernière soit élevée (typiquement 3-10eV). Si la résolution énergétique choisie est trop grande (proche de 2eV), alors l'intensité du signal enregistré sera faible et un spectre de qualité sera d'autant plus difficile à obtenir.

L'imagerie élémentaire (ESI) permet d'étudier des aires de spécimens plus grandes qu'en EELS. En effet, l'agrandissement généralement utilisé en ESI est de 10'000-30'000x. La camera TV qui permet d'acquérir les images produit un grossissement additionnel de 8x, de sorte que l'image observée est le produit des deux agrandissements.

Figure 6.2 : *Dispersion en énergie d'une image filtrée.*



E_i=énergie nominale détectée en sortie de filtre, δE=déviation énergétique.

Le diaphragme d'entrée du filtre doit sélectionner une aire qui soit de dimension équivalente ou inférieure à la surface de détection de la caméra TV. Cette dernière produit un effet d'ombrage sur les bords de l'image (shading effect) de plus, la dispersion en énergie du spectromètre va créer un décalage en énergie sur l'image (Figure 6.2). Cette déviation est, pour le CEM-902, de 12.5eV de part et d'autre du centre de l'image, c'est-à-dire que la perte d'énergie sélectionnée sur le spectromètre sera celle observée au centre de l'image mais que les bords seront à ±12.5eV. Ces limitations doivent être prises en compte lors de l'interprétation des images élémentaires.

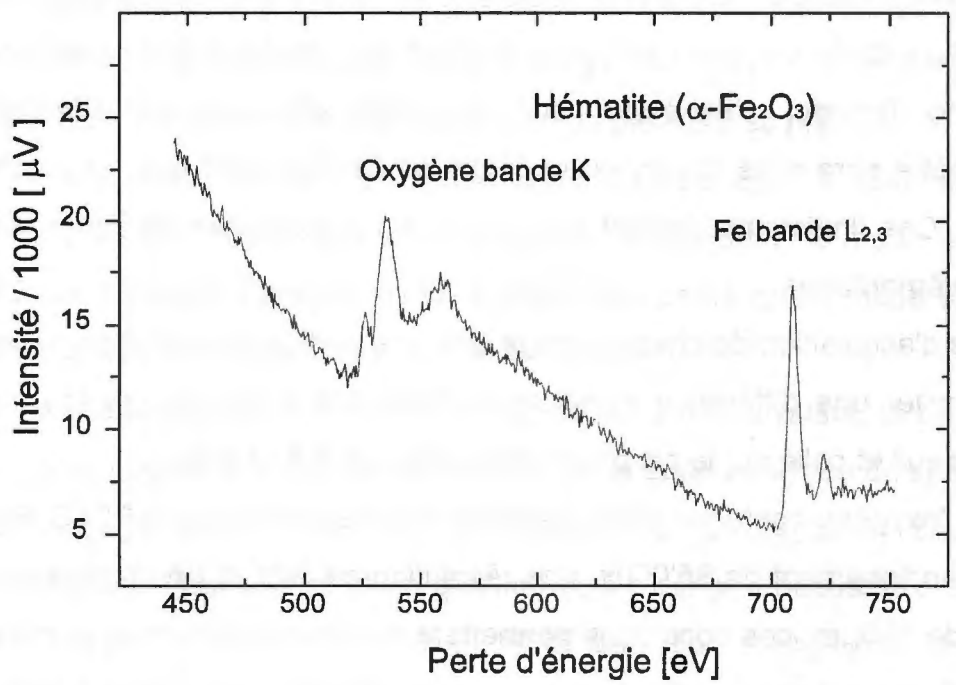
Le temps d'acquisition de chaque image doit être suffisamment long (minimum 8sec) pour détecter une différence significative d'intensité entre l'image (ou les images) avant le seuil et celle sur le pic d'ionisation (Figures 3.7 et 3.8).

Le fer et l'oxygène contenus dans l'hématite ont été mesurés par EELS (Figure 6.3a) à un agrandissement de 85'000x, une résolution de 3eV et un diaphragme d'entrée du filtre de 100μm; ces conditions permettent de caractériser chaque microparticule individuellement. Les pics d'ionisation apparaissent respectivement à 530eV (bande K de l'oxygène) et à 708 et 721eV (bandes L_3 et L_2 du fer). Le fer et l'oxygène de la goethite (Figure 6.3b) ont pu être mesurés à un agrandissement plus faible (30'000x) avec les mêmes paramètres d'analyse que l'hématite. Les seuils du fer et de l'oxygène ne présentent pas de différence notable avec l'hématite et apparaissent aux mêmes pertes d'énergie.

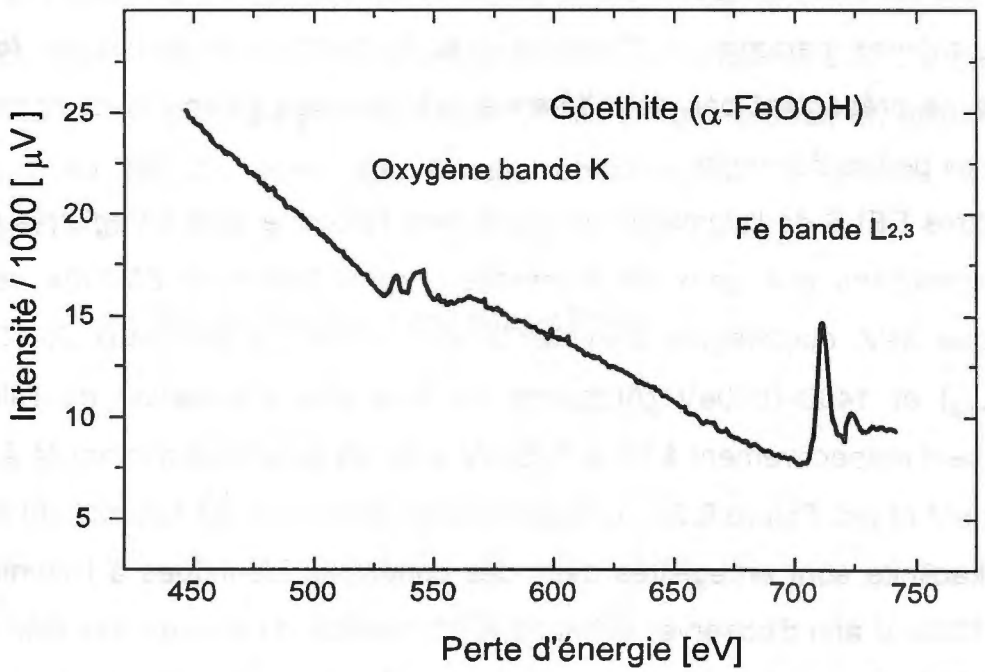
Les spectres EELS de l'aluminium présent dans l'alumine sont enregistrés sous les mêmes conditions que ceux de l'hématite : agrandissement 85'000x, résolution énergétique 3eV, diaphragme d'entrée 100μm, domaines spectraux 50-150eV (Al bande $L_{2,3}$) et 1400-1600eV (Al bande K). Les pics d'ionisation de l'aluminium apparaissent respectivement à 70 et 1560eV avec un maximum d'intensité à 1600eV (épaulement et pic, Figure 6.3c). Les spectres du silicium et de l'aluminium contenus dans la kaolinite sont enregistrés dans des conditions identiques à l'alumine entre 1400 et 1900eV afin d'observer la bande K d'ionisation de chacun des éléments. Le spectre EELS (Figure 6.3d) permet de visualiser les deux pics d'ionisation avec des seuils à 1560eV pour l'aluminium et 1830eV pour le silicium.

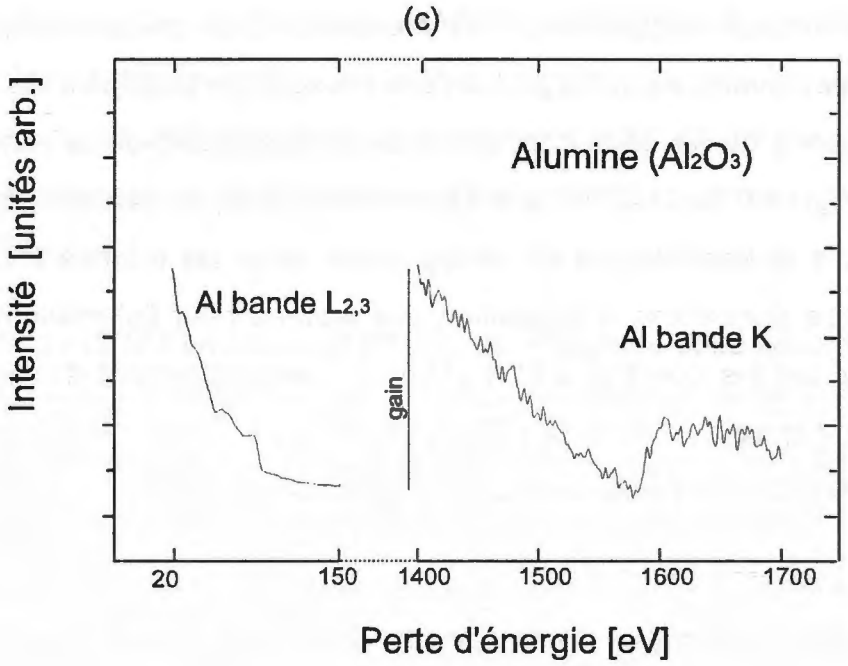
Figure 6.3: *Spectres EELS de microparticules : (a) d'hématite, (b) de goethite, (c) d'alumine, (d) de kaolinite.*

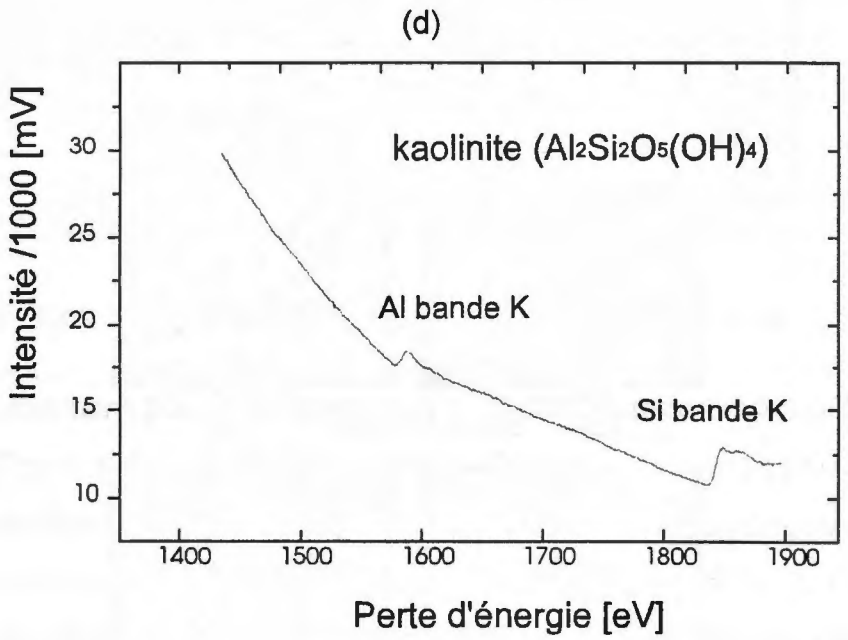
(a)



(b)



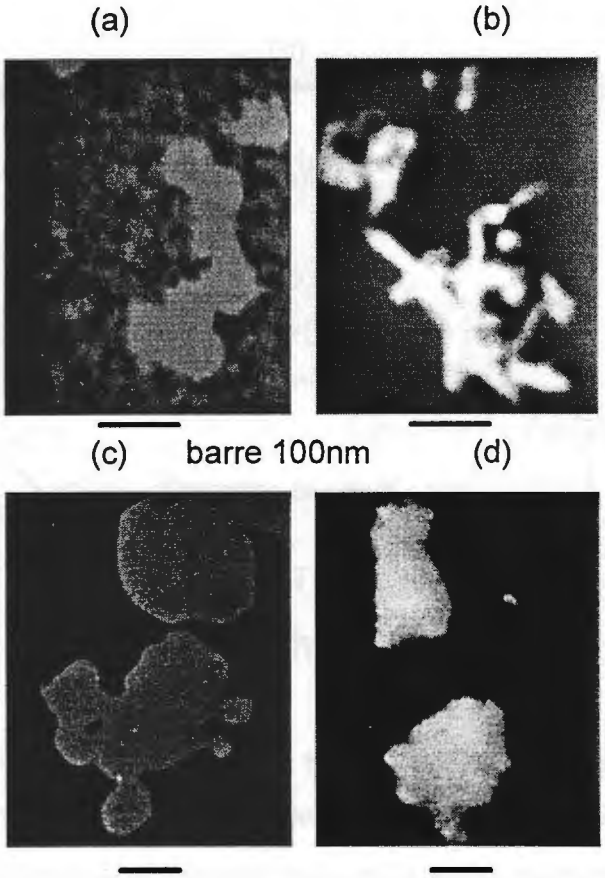




L'image élémentaire des microparticules d'hématite peut être obtenue par ESI en utilisant les conditions d'analyse suivantes : agrandissement 32'700x, temps d'acquisition de 8sec pour chaque image, résolution énergétique de 13eV. A cette résolution, les bandes du fer L_3 (ΔE_{loss} = 708eV) et L_2 (ΔE_{loss} = 721eV) ne sont pas discriminées et exhibent un maximum à ΔE_{loss} = 716eV. La séquence de l'algorithme d'extrapolation du bruit de fond a été choisie en tenant compte de cette déviation; les

deux images précédant le pic du fer sont enregistrées respectivement à 680 et 690eV puis l'image extrapolée à 716eV est soustraite de celle acquise à 716eV. L'image finale, inversée par rapport à celle enregistrée pour plus de clarté, indique bien la présence du fer dans chacune des microparticules de la zone analysée du spécimen (Figure 6.4a). Les images élémentaires (ESI) de l'aluminium et du silicium présents dans la kaolinite ont été enregistrées selon les mêmes critères que pour l'hématite. Les séquences d'acquisition des images pour l'aluminium et le silicium sont basées sur les spectres EELS obtenus : enregistrement d'images à 1500 et 1540eV avant le seuil, ainsi qu'à 1600eV sur le pic pour l'aluminium respectivement à 1760, 1800 et 1850eV pour le silicium (Figures 6.4c, 6.4d).

Figure 6.4 : *Images ESI (a) du fer dans l'hématite, (b) du fer dans la goethite, (c) de l'aluminium dans la kaolinite, (d) du silicium dans la kaolinite.*

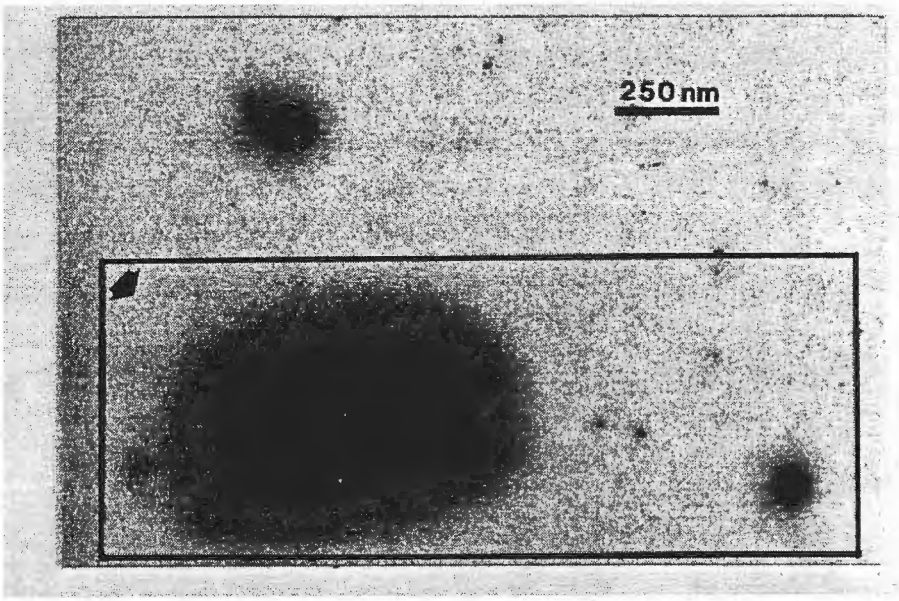


6.1.3 Analyse morphologique d'une mélange de microparticules

La mise sur grille par dépositions successives des suspensions utilisées précédemment permet d'obtenir un spécimen composé des différentes

microparticules, hématite, alumine et kaolinite, dont le recouvrement est suffisamment faible pour que les divers composants soient le mieux possible observables séparément, évitant ainsi une interprétation morphologique erronée. En effet, les agrégats de colloïdes n'ont pas changé drastiquement de taille et leurs formes sont similaires ou identiques à celles observées dans les suspensions individuelles (Figure 6.5).

Figure 6.5 *: Image TEM d'un mélange d'hématite, d'alumine et de kaolinite.*



6.1.4 Analyse physico-chimique d'un mélange de microparticules

L'imagerie élémentaire ESI et les spectres EELS des microparticules présentes dans le mélange (Figure 6.5) ont été enregistrés selon les conditions optimales décrites pour les suspensions individuelles. Les Figures 6.6a-c sont les images élémentaires du fer, de l'aluminium et du silicium, respectivement extraites de la Figure 6.5 en mode ESI. Ces images montrent que les constituants majeurs des microparticules (Al, Fe, Si) peuvent être identifiés séparément au sein même d'un spécimen hétérogène, permettant ainsi de distinguer chaque entité individuellement, même dans le cas d'un agrégat mixte.

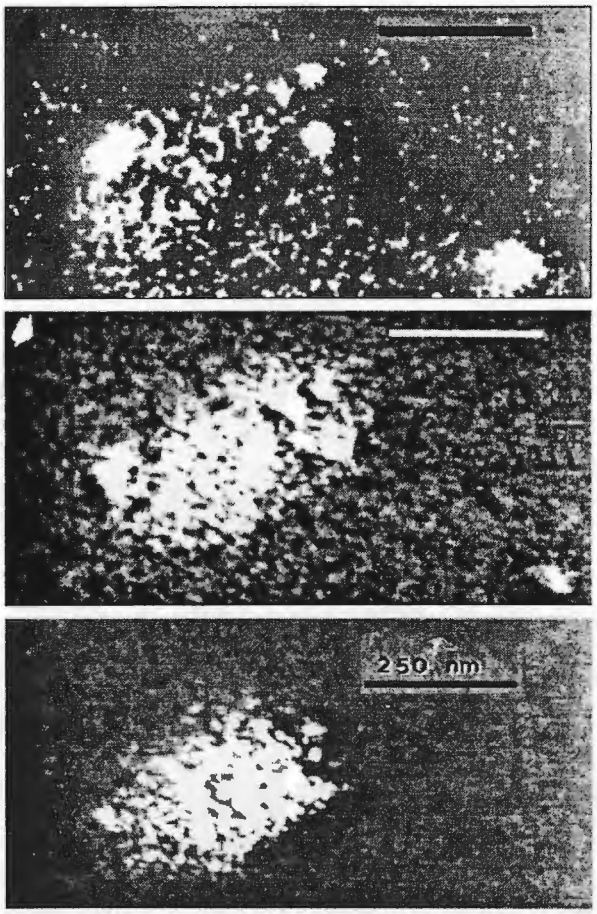
La combinaison des Figures 6.5 et 6.6a-c est particulièrement intéressante pour les raisons suivantes :

Premièrement, les microparticules riches en fer (hématite) sont clairement identifiées, même lorsqu'elles sont cachées en TEM par des entités les recouvrant (comparaison des Figures 6.5 et 6.6a).

Deuxièmement, l'image de l'aluminium montre deux entités riches en aluminium dans l'aire analysée, alors que l'image ESI du silicium n'en révèle qu'une (comparaison des Figures 6.6b et c).

De ces résultats, corrélés à l'identification morphologique de la Figure 6.5, il apparaît très clairement que la particule riche en aluminium et en silicium est de la kaolinite alors que l'agrégat riche en aluminium est un amas de colloïdes d'alumine.

Figure 6.6a-c : *ESI du mélange; (a) Fe (hématite), (b) Al (alumine), (c) Si (kaolinite).*



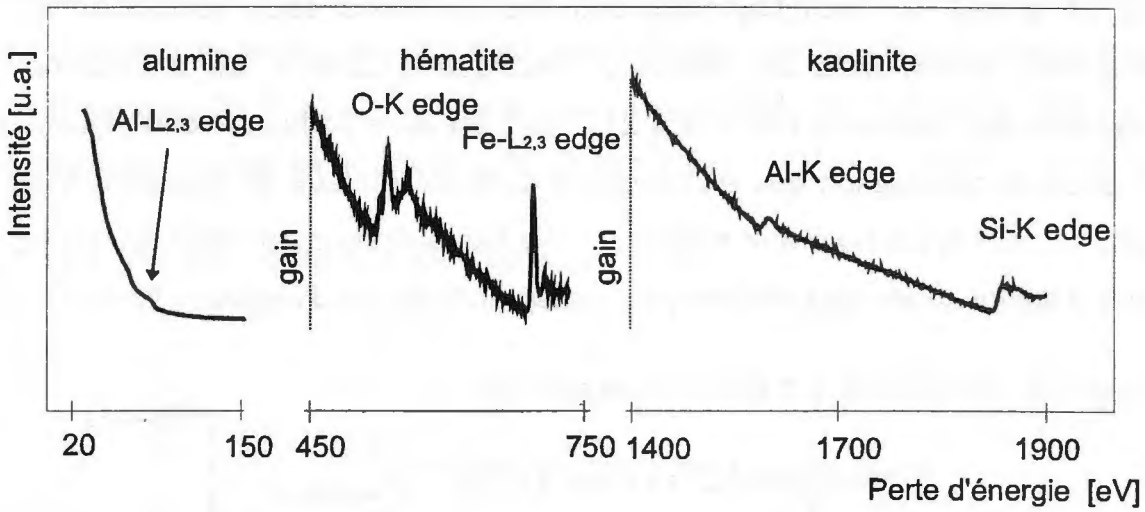
(a)

(b)

(c)

La Figure 6.7 montre les spectres EELS enregistrés séparément à un agrandissement de 20'000x pour l'hématite, l'alumine et la kaolinite présentes dans le mélange (Figure 6.5). Ces spectres sont en totale corrélation avec les images ESI obtenues sur le même mélange (Figures 6.6a-c) et permettent une analyse de la composition élémentaire de chacune des microparticules.

Figure 6.7 : *Spectres EELS des particules individuelles dans le mélange hématite, alumine et kaolinite.*



6.1.5 Interprétation fine du spectre d'oxyde de fer

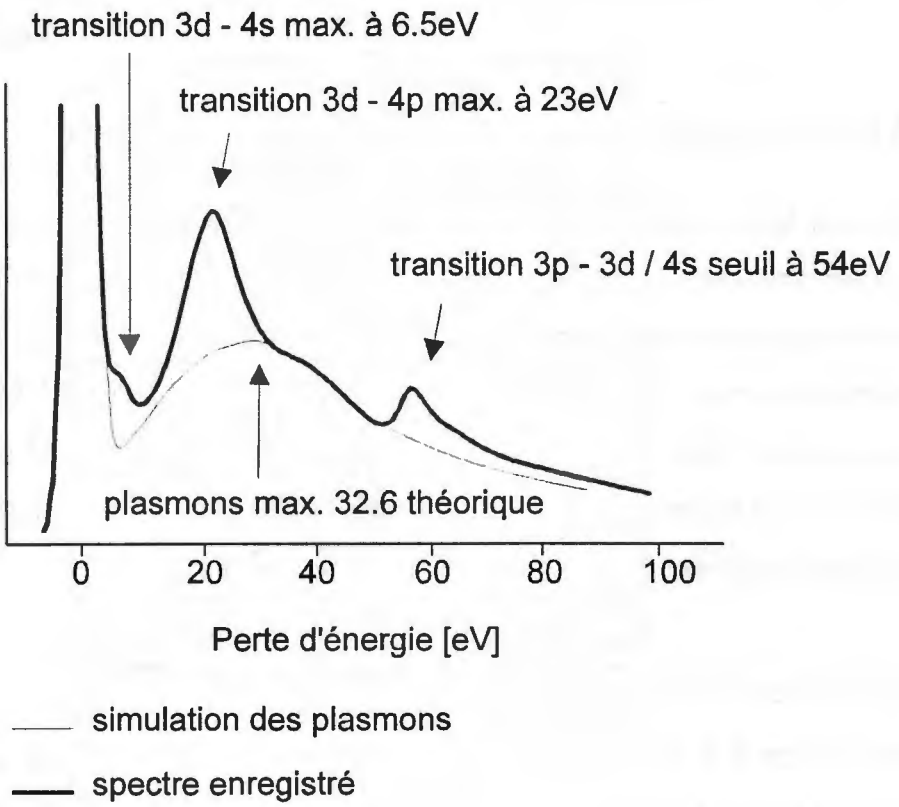
Le spectre EELS présente des seuils correspondant aux éléments présents dans le spécimen analysé. Ces seuils ont des formes qui dépendent de l'état de l'élément. Cette interprétation de spectre est connue sous le nom de : structure proche du seuil en perte d'énergie (Energy Loss Near Edge Structure : ELNES). La présence de certains pics et leur forme dépendront du degré d'oxydation et de l'environnement moléculaire de l'élément analysé. L'interprétation ELNES d'un spectre d'oxyde de fer est discutée ci-dessous pour le cas de la goethite (FeOOH).

6.1.5.1 Région des plasmons (0-100eV)

Le spectre de 0 à 100eV de la goethite présente différents pics caractéristiques du fer (Figure 6.8). Le premier pic avec un maximum à 6.5eV représente une transition du niveau 3d ($M_{4,5}$) vers le niveau 4s (N_1). Le maximum observé à 23eV représente l'excitation des électrons 3d vers des niveaux 4p vacants. Ce dernier pic est placé sur la surface des plasmons qui décroît selon AE^{-r} et sur laquelle apparaît le seuil $M_{2,3}$ du fer à 54eV. Ce pic d'ionisation représente les transitions des électrons des niveaux 3p vers les orbitales vacantes du fer (3d et 4s) et les transitions des électrons 3p vers le continuum (Dietchfield, 1975). Ce pic se présente sous la forme de dents de scie de grande intensité.

La figure 6.8 présente le spectre de 0-100eV d'une particule de goethite. Le spectre enregistré (en trait épais) présente tous les pics énumérés ci-dessus, tandis que le spectre simulé (en trait fin) représente les plasmons seuls (excitation du gaz d'électrons libres) avec un maximum théorique à 32.6eV. Le déplacement du maximum des plasmons (32.6 vers 25-30eV) est dû à l'influence des électrons 3d. En effet, la polarisation des électrons 3d dans les métaux de transition n'est pas suffisamment faible pour être négligée, mais pas suffisamment importante pour que ceux-ci soient considérés comme partie intégrante du gaz d'électrons libres.

Figure 6.8 : *Spectre de 0 à 100eV de la goethite.*



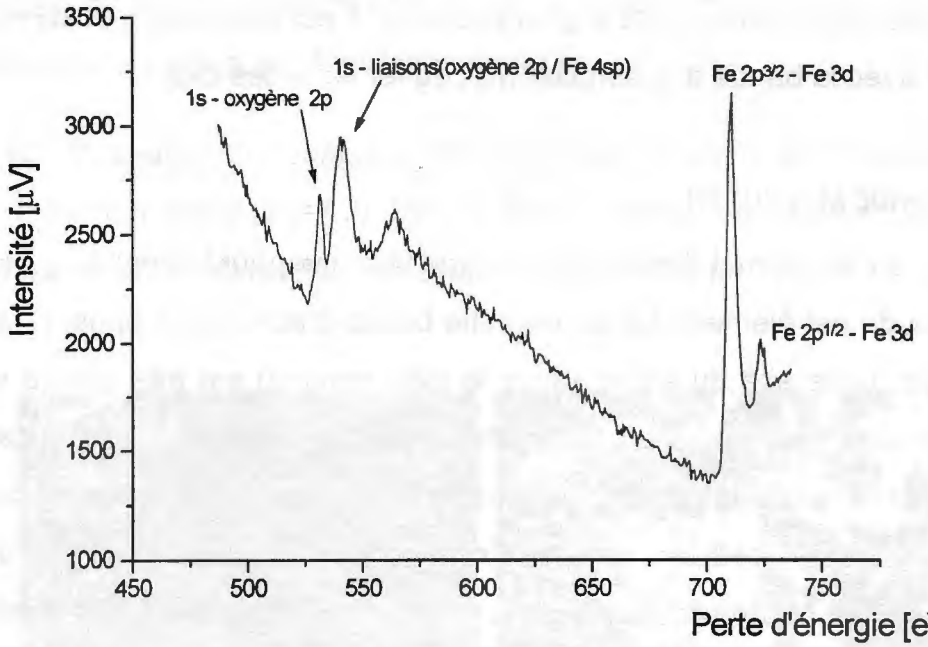
6.1.5.2 Région des couches internes (450-800eV)

Le spectre de la goethite donne lieu à deux seuils dans la région de 450-800eV (Figure 6.9). Le premier, celui de l'oxygène, n'a pas seulement la forme typique d'une bande K (généralement en dents de scie) mais présente en dessus du seuil une série de pics caractéristiques des atomes d'oxygène dans la molécule FeOOH. Le premier de ces pics correspond à une transition interne du niveau 1s au niveau 2p. Le second, représente la transition 1s vers la liaison formée par le niveau 2p de

l'oxygène et l'orbitale d'hybridation 4sp du fer. D'autre part la perte d'énergie à laquelle apparaît le seuil est aussi caractéristique du composé.

La bande $L_{2,3}$ du Fe présente deux pics en dessus du seuil d'absorption (respectivement L_3 et L_2). Ces derniers représentent des transitions du niveau 2p (respectivement $2p^{3/2}$ et $2p^{1/2}$) vers les niveaux 3d du fer. Ces pics sont généralement appelés "raies blanches" ou white lines.

Figure 6.9 : *Spectre de 450 à 800eV de la goethite.*



Il a été montré que le rapport des intensités et l'éloignement (en perte d'énergie) des pics L_3 et L_2 peuvent être utilisés pour la détermination du degré d'oxydation du fer(Colliex, 1991). Typiquement, la séparation entre les raies L_3 et L_2 est de 12-13eV pour le Fe^{III} et de 9-10eV pour le Fe^{II}, le rapport L_3/L_2 étant variable selon le microscope utilisé; dans chacun des cas, une différence entre les degrés d'oxydation du fer peut être mesurée.

Cependant, ces informations ne peuvent être assurées que si le spectromètre utilisé atteint une résolution énergétique <0.7eV. Il n'est possible de parvenir à cette résolution qu'avec une source de haut voltage (typiquement 200keV, canon à émission de champ) et un détecteur en parallèle (PEELS). Le EF-TEM, de par sa conception (prisme magnétique et source 80keV au tungstène), permet une

résolution énergétique de 2eV (Zeiss). Malgré cette moins bonne résolution comparativement à des systèmes à canon à émission de champ (200keV), le EF-TEM permet d'obtenir le détail des seuils d'absorption. Ces structures fines peuvent être utilisée comme empreinte digitale des composés analysés. En revanche, l'accès au degré d'oxydation du fer n'est pas envisageable par EF-TEM.

6.1.6 IMAGERIE ÉLÉMENTAIRE SUR LE FER

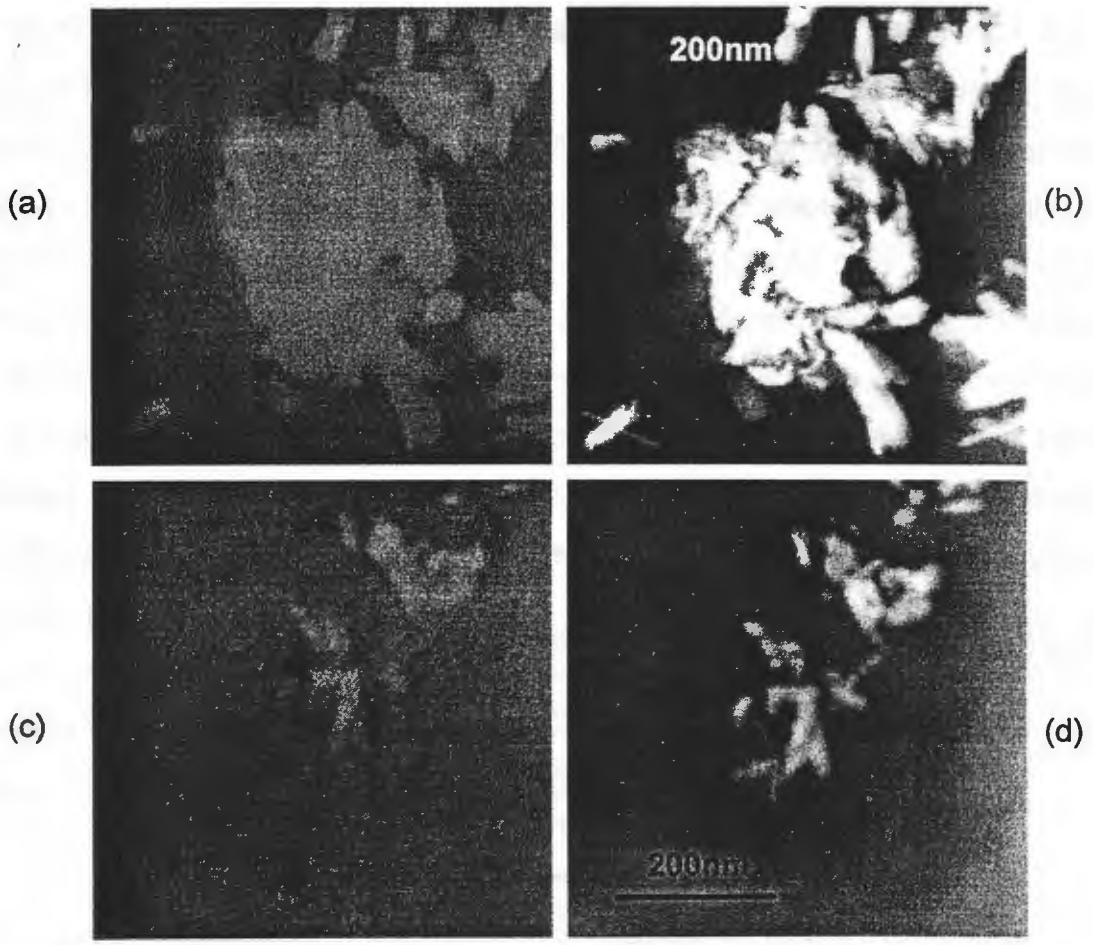
Comme discuté précédemment pour l'analyse de l'hématite et du mélange de particules, l'imagerie élémentaire du fer peut être obtenue sur la bande $L_{2,3}$. L'utilisation de cette dernière est la plus courante. Il est néanmoins aussi intéressant de travailler avec la bande d'absorption $M_{2,3}$ du fer selon les cas.

6.1.6.1 LA BANDE $M_{2,3}$ DU FER

Le seuil $M_{2,3}$ du fer permet d'obtenir, au même titre que pour le seuil $L_{2,3}$, des images élémentaires de cet élément. Le pic de cette bande d'absorption apparaît à 54eV. A cette énergie, l'intensité du signal (avec le fond continu) est très élevée et permet donc de travailler avec une amplification minimale de la sensibilité de la caméra, ce qui représente un avantage certain (augmentation du rapport signal/bruit) par rapport au seuil $L_{2,3}$ à 708eV, très peu intense. Cependant, la forme du seuil $M_{2,3}$ et du fond continu précédant ce dernier demande une attention particulière. En effet, comme présenté dans la Figure 6.8, le pic est placé au début de la décroissante en AE^{-r} du fond continu formé par les plasmons. Ces derniers sont plus ou moins importants suivant l'épaisseur du spécimen; c'est pourquoi l'extrapolation du fond continu sous le seuil s'avère difficile, voire impossible si le spécimen est trop épais (voir à cet effet la Figure 6.14). D'autre part, lorsque la quantité de fer est trop faible, le signal $M_{2,3}$ est d'autant diminué et l'image élémentaire ne contient pas nécessairement toute l'information. Ces deux conditions limites que peut présenter le seuil $M_{2,3}$ doivent être considérées dans chacun des cas afin de sélectionner le mode d'analyse le plus adapté au conditions, c'est-à-dire le mode ESI ou le mode Jump Ratio (voir chapitre 3.1.4.1). Si le seuil est marqué et présente un pic, dans le cas d'un spécimen idéal (t/λ=0.5), il est possible de travailler soit en mode ESI, où l'extrapolation du fond

continu permet d'extraire tout le signal du fer, soit en mode Jump Ratio, car dans les deux cas l'image élémentaire obtenue sera suffisamment intense. Au contraire, lorsque la quantité de fer est très faible (particule fine, $t/\lambda<0.5$) le signal n'apparaît plus que sous la forme d'un épaulement et le seul moyen d'obtenir une image élémentaire non artefactée est d'utiliser le mode ESI qui permettra d'extraire l'information recherchée (comparaison des Figures 6.10c et d). Il existe une troisième situation où la particule analysée est trop épaisse ($t/\lambda>1.0$), générant des plasmons beaucoup plus importants. Le seuil est alors présent sous la forme d'un pic pour autant que la concentration en fer soit suffisamment élevée, et l'extrapolation du fond continu en AE^{-r} devient difficile; il faudra donc utiliser le mode Jump Ratio (comparaison des Figures 6.10a et b).

Figure 6.10 : *Illustration de l'imagerie élémentaire du fer dans la goethite sur $M_{2,3}$ (a) ESI d'un spécimen épais ($t/\lambda=1.3$), (b) JR d'un spécimen épais ($t/\lambda=1.3$),(c) JR d'un spécimen mince ($t/\lambda=0.4$) et ESI d'un spécimen mince (d) ($t/\lambda=0.4$).*



6.1.6.2 La bande $L_{2,3}$ du fer

De par sa forme, le seuil $L_{2,3}$ n'a pas les désavantages présentés ci-dessus pour la $M_{2,3}$. En effet, quelle que soit l'épaisseur de la particule analysée, le seuil $L_{2,3}$ présente une différence d'intensité par rapport au fond continu suffisamment élevée et permet donc d'obtenir des images dans les deux modes : ESI ou Jump Ratio. Cependant, comme l'intensité totale (bande d'absorption et fond continu) à ces pertes d'énergie (650-750eV) est faible, le rapport signal/bruit sera élevé et l'image élémentaire sera entachée d'un bruit de fond plus ou moins intense. Le bruit de fond observé sur ces images peut générer une interprétation erronée. Cette dernière remarque amène directement à la notion de limite de détection suivant le seuil utilisé.

6.1.6.3 Comparaison des seuils $M_{2,3}$ et $L_{2,3}$ du fer

Du point de vue de la quantification en EELS, il s'avère que la bande $M_{2,3}$ est plus sensible que la bande $L_{2,3}$ d'un facteur ~2 (Hoffer, 1993). Cette limite n'est valable que pour des spécimens idéaux (t/λ proche de 0.5) où les modes ESI et Jump Ratio sont applicables autant sur les seuils $L_{2,3}$ que $M_{2,3}$. Il sera dès lors primordial de définir l'épaisseur du spécimen avant d'en extraire l'image élémentaire. Ceci se traduit par l'enregistrement du spectre EELS, si possible dans les conditions d'analyses ESI ou Jump Ratio (α, β, ΔW) afin de déterminer, selon l'équation 3.4, la valeur de t/λ. Les domaines d'épaisseurs indiqués dans le Tableau 6.1 ont été établis à partir des spécimens modèles de goethite et permettent de choisir pour chaque analyse quel mode et quel seuil il sera préférable d'utiliser. Ce tableau peut être utilisé pour d'autres particules d'oxydes de fer et même être appliqué pour des particules environnementales de composition inconnue.

Tableau 6.1 : *Domaine d'épaisseur pour l'imagerie*

t/λ	≤ 0.2	0.2-1.0	≥ 1.0
seuil $L_{2,3}$	ESI	ESI & JR	ESI & JR
seuil $M_{2,3}$	ESI	ESI & JR	JR

6.2 Analyse quantitative

L'analyse quantitative en EELS est très délicate. En effet, tous les paramètres de réglage du microscope et du spectromètre doivent être minutieusement contrôlés afin d'assurer la validité du résultat. Une fois le spectre acquis, son traitement (extrapolation du fond continu et intégration des pics d'absorption) doit être identique pour l'ensemble des spectres traités afin d'obtenir des résultats comparables.

6.2.1 Bande $L_{2,3}$ du fer

Le seuil d'absorption L du fer permet de déterminer la quantité de fer présent dans la région du spécimen analysé. Il est possible d'obtenir une valeur absolue, par exemple en nombre d'atomes de fer par unité de surface analysée. Cependant, la valeur obtenue en quantification absolue est généralement ternie d'une large erreur (environ 20%, (Egerton, 1986)). De ce fait, il est intéressant d'utiliser la quantification relative, qui permet de réduire l'erreur à ~10% (voir chapitre 3.1.3.1).

6.2.1.1 Paramétrisation avec l'hématite et la goethite

Les conditions expérimentales ont été optimalisées sur les particules modèles d'hématite et de goethite. Ces deux oxydes de fer correspondent parfaitement aux critères de quantification relative et pour la détermination des facteurs k (Robards, 1993).

Le faisceau d'électrons atteint le spécimen sous la forme d'un angle solide (angle d'acceptance : α) généré par la lentille du condenseur et défini par son diaphragme. Les électrons sont diffusés par le spécimen selon un autre angle solide (angle de collection : β) défini par le diaphragme de l'objectif. L'aire du spécimen analysé (ΔA) est déterminée par le sélecteur d'aire (en mode spectre) ou par le diaphragme d'entrée du prisme (en mode image) et l'agrandissement choisi. La fenêtre énergétique (ΔW) est contrôlée par la fente placée en dessous du prisme. Ces éléments sont les variables physiques du microscope et du spectromètre. Pour les oxydes de fer analysés, les conditions optimales d'analyse sont :

- Une tension à la source de 80keV pour un courant de 1-10μA produit une intensité suffisante pour ce type d'analyse sans pour autant produire de dommage au spécimen. Plus le courant est élevé, plus le risque de dommage est grand.

- Une résolution énergétique ΔW de 3-5eV, cette résolution dépendant des informations recherchées. L'observation des structures fines (ELNES) de l'oxygène par exemple demande une résolution proche de 2eV mais la quantification peut très bien se faire sur un spectre enregistré avec un ΔW de 10eV.

- Un angle d'acceptance α de 2.5mrad correspondant à une ouverture de diaphragme du condenseur de 400μm (Zeiss). Cette illumination permet de travailler aisément dans le domaine des pertes d'énergie des seuils K de l'oxygène et L du fer.

- Un angle de collection β de 4mrad pour un diaphragme de l'objectif de 90μm ou une entrée de prisme de 100μm avec un agrandissement supérieur à 12'000x (mesuré à l'aide d'un film de NiO de 47nm d'épais en mode de diffraction). L'aire sélectionnée par le diaphragme d'entrée du prisme n'est pas fonction de l'agrandissement; de ce fait, en travaillant avec un agrandissement inférieur à 12'000x, l'angle de collection sera celui délimité uniquement par le diaphragme de l'objectif. Avec un agrandissement supérieur à 12'000x (jusqu'à 80'000x), l'angle diminue très faiblement de sorte que la valeur de l'angle de collection (β=4mrad) dans ces conditions d'analyse peut être utilisé. Ces valeurs ne sont pas les seules utilisables pour obtenir un spectre EELS quantifiable mais sont les mieux adaptées pour les oxydes de fer analysés.

L'interprétation du spectre se fait en plusieurs étapes (Figure 6.11) :

- L'identification des seuils d'ionisation; dans le cas des spécimens utilisés apparaissent les seuils $M_{2,3}$ du fer à 54eV, K du carbone à 284eV, K de l'oxygène à 535eV et $L_{2,3}$ du fer à 708eV.

- La soustraction du fond continu en AE^{-r} sur chacun des seuils, pour les deux oxydes étudiés, en l'occurrence les seuils K de l'oxygène et L du fer. Il est possible de déterminer aisément la valeur de A et r pour chaque cas, en prenant le logarithme

(en base 10) de l'intensité en fonction du logarithme de la perte d'énergie (reporté selon un système d'axes linéaires). Cette transformation est identique si l'on change l'échelle linéaire de l'intensité en une échelle logarithmique, tout en conservant l'échelle linéaire pour la perte d'énergie (Equation 6.1).

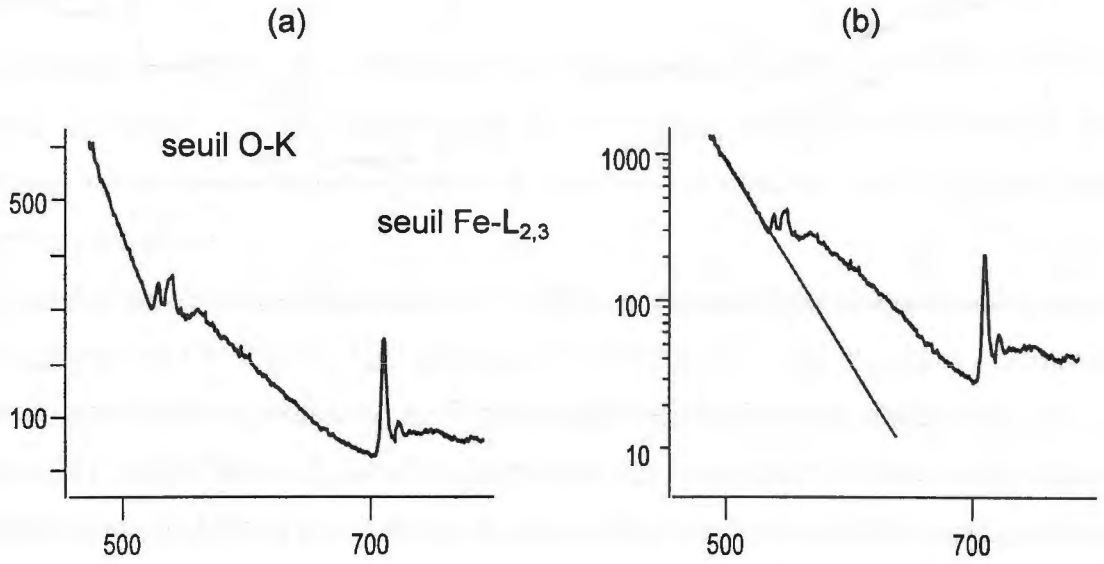
Equation 6.1 : *Expression du fond continu et extraction des constantes A et r.*

$$Y = A * E^{-r} \text{ en échelle linéaire}$$

$$LogY = Log\left[A * E^{-r}\right] = LogA - rLogE \text{ en représentation logarithmique}$$

Cette dernière expression est celle d'une droite dont les valeurs de Log(A) et r sont, sur cette échelle, l'ordonnée à l'origine et la pente de celle-ci. Il suffit dès lors de reprendre le spectre en échelle linéaire (en intensité) pour obtenir aisément le fond continu extrapolé sous le seuil étudié (Figure 6.11a-d).

Figure 6.11 : *Spectre EELS de goethite (a) détermination des bandes présentes, (b) calcul du fond continu.*



détermination des seuils

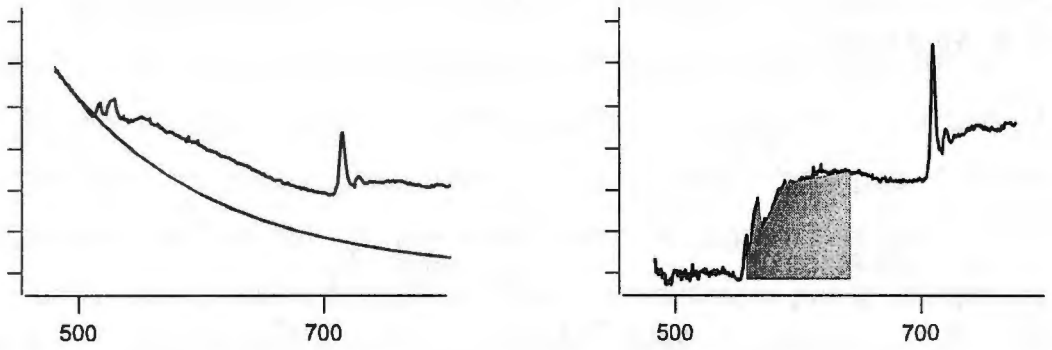
transformation de l'intensité en échelle logarithmique et régression linéaire

- Une fois le fond continu extrapolé, la soustraction de ce dernier au spectre permet d'intégrer la bande d'absorption sur un intervalle d'énergie Δ. La borne

inférieure de l'intégrale est fixée à la même perte d'énergie que celle utilisée par le programme SigmaK pour le calcul de la section efficace partielle (Egerton, 1986).
Le domaine d'intégration Δ doit être au minimum d'une dizaine d'électronvolt et peut s'étendre à 100eV. Plus la bande d'intégration sera grande plus le résultat sera exact. Comme illustré dans la figure 6.11d, pour l'oxygène, l'intégrale est prise à partir de 540eV et la borne supérieure d'intégration est fixée à 590eV, ceci afin d'intégrer la bande étudiée sur 50eV.

Figure 6.11 : *(c) Extrapolation du fond continu, (d) intégration du seuil d'ionisation K de l'oxygène de la goethite.*

(c) (d)



échelle linéaire et fond continu extrapolé soustraction du fond et intégration

- Comme décrit précédemment (Equation 3.1), la valeur de l'intégrale permet d'extraire la quantité d'atomes de l'élément étudié (quantification absolue). Néanmoins, les valeurs obtenues (Tableau 6.2) ne sont pas suffisamment exactes pour être utilisables avec une grande assurance. En revanche, le rapport élémentaire est beaucoup plus significatif et permet de retrouver la stoechiométrie du composé. L'erreur sur la quantification absolue et relative provient essentiellement de :

- l'extrapolation erronée du fond continu,
- la valeur de la section efficace partielle calculée (Egerton, 1986),

- la valeur de l'intégrale, celle-ci n'étant que l'addition de l'ensemble des "canaux de perte d'énergie" et non pas l'intégrale d'une fonction représentant le spectre.

D'autre part, le film support (collodion) contribue à la quantité d'oxygène analysée. Il est possible de tenir compte de cette participation en enregistrant un spectre d'une région du film support ne contenant pas de particules et par la suite, en la soustrayant à la quantité d'oxygène totale obtenue pour le spectre de la particule et du film. La quantité d'oxygène du film de collodion représente de 10 à 30% de la quantité totale d'oxygène. Cette quantité d'oxygène doit être établie pour toutes les mesures, car elle dépend du diaphragme de sélection d'aire en mode d'enregistrement spectre ou celui d'entrée du prisme en mode image et de l'agrandissement (voir chapitre 3.2.2). Cette contribution de l'oxygène du film sera prise en compte pour les résultats présentés ci-dessous.

6.2.1.2 Détermination du facteur K_{FeO} et de la section efficace partielle de l'hématite

Le principe du facteur k a été décrit au chapitre 3; il s'agit d'analyser un spécimen connu (généralement un oxyde) et de retrouver expérimentalement la section efficace partielle du métal composant l'oxyde, connaissant avec grande précision celle de l'oxygène.

Les particules d'hématite répondent parfaitement à l'ensemble des critères requis pour déterminer le facteur k_{FeO} (épaisseur, composition, résistance au dommage du faisceau d'électrons). En intégrant la bande d'absorption K de l'oxygène et la bande $L_{2,3}$ du fer, et en connaissant le rapport stoechiométrique Fe/O, le facteur k peut être aisément obtenu. Une fois ce facteur déterminé, la section efficace partielle du fer sur la bande $L_{2,3}$ est calculée en introduisant le σ de l'oxygène dans l'équation 3.3. La valeur du facteur k obtenu n'est valable que pour les conditions d'analyse dans lesquelles le spectre a été enregistré (E_0, α, β, Δ) (Tableau 6.2).

Tableau 6.2 : *Résultats de la quantification obtenue avec l'hématite.*

Paramètres du microscope

source	80keV
diaphragme condenseur (α)	400µm (2.5mrad)
diaphragme objectif	90µm
entrée du prisme	100µm
angle de collection (β)	4mrad
ΔW	3eV
détecteur	scintillateur/ photomultiplicateur
agrandissement	21'900x

Analyse des spectres de l'hématite

domaine d'énergie	0-800eV
fenêtre d'intégration	50eV
seuil O-K (domaine d'intégration)	535eV (540-590)
seuil Fe-L2,3 (domaine d'intégration)	708eV (710-760)
σ (O-K) calculé (β=4mrad, Δ=50eV)	3.27E-22
σ (Fe-L2,3) calculé (β=4mrad, Δ=50eV)	4.60E-22
σ (O-K) / σ (Fe-L2,3)	0.7

Résultats des analyses

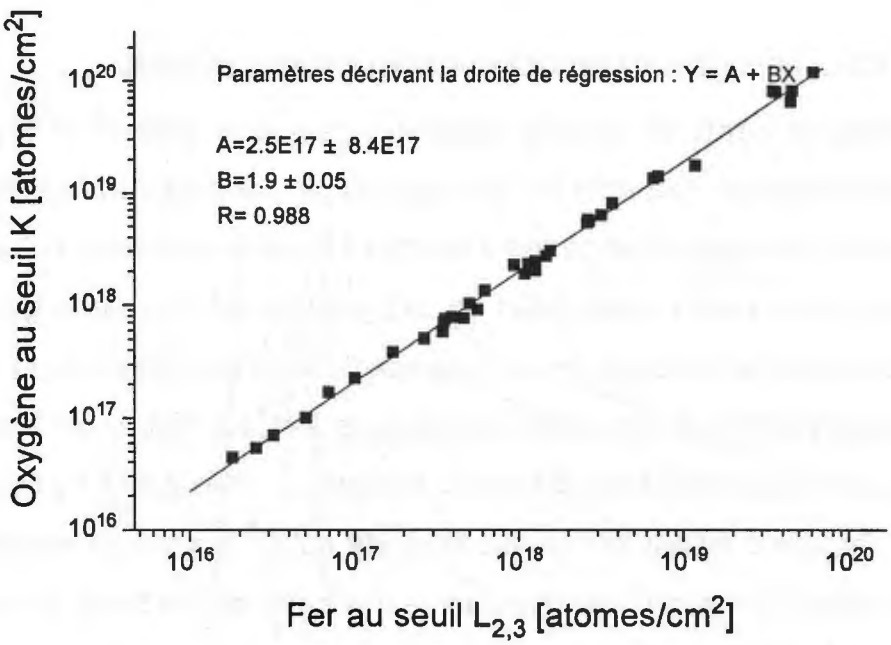
Fer [atoms/cm2]	Oxygène [atoms/cm2]
1.52E+21 ± 3E20	2.5E+21 ± 5E20

rapport Fe/O mesuré	facteur k
0.61±0.6	0.645

6.2.1.3 Application du facteur K_{FeO} sur la goethite

Une fois le k_{FeO} obtenu, il peut être utilisé pour d'autres oxydes de fer. L'application à la goethite (α-FeOOH) est idéale pour la validation des résultats obtenus avec l'hématite. En utilisant le spécimen de α-FeOOH comme un inconnu, il est intéressant de retrouver sa stoechiométrie (rapport Fe/O). Les analyses ont été faites sur plus de 50 spectres de goethite (de tailles et d'épaisseurs variables) afin d'assurer la valeur obtenue.

Figure 6.12 : *Graphique de corrélation des signaux de l'oxygène (seuil K) en fonction du fer (seuil $L_{2,3}$).*



Le rapport Fe/O (Fe/O=1/b sur la Figure 6.12) ainsi obtenu pour la goethite est bien de 0.53 comme prévu par la stoechiométrie du composé, à ±10% (erreur théorique de quantification relative). Ce résultat est très prometteur; en effet, il est dorénavant possible de déterminer la stoechiométrie entre divers éléments d'une particule et ceci à l'échelle du nanomètre.

6.2.2 Bande $M_{2,3}$ du fer

Les éléments de la première période des métaux de transition (K-Zn) présentent deux seuils d'ionisation dans le domaine d'énergie de la plupart des spectromètres (0-2000eV). La bande $L_{2,3}$ apparaît entre 290 et 1020eV tandis que la bande $M_{2,3}$ est présente entre 30 et 100eV. Alors que le seuil $L_{2,3}$ est couramment utilisé (Ahn, 1983; Egerton, 1986; Hoffer, 1993), le seuil $M_{2,3}$ est moins bien caractérisé et donc moins utilisé. Néanmoins, comme nous l'avons discuté précédemment, cette bande est particulièrement intéressante de par sa grande intensité et peut apporter une augmentation de la limite de détection pour ces éléments. Il a été montré que le seuil $M_{2,3}$ pouvait, selon les éléments, augmenter la limite de détection d'un facteur ~2

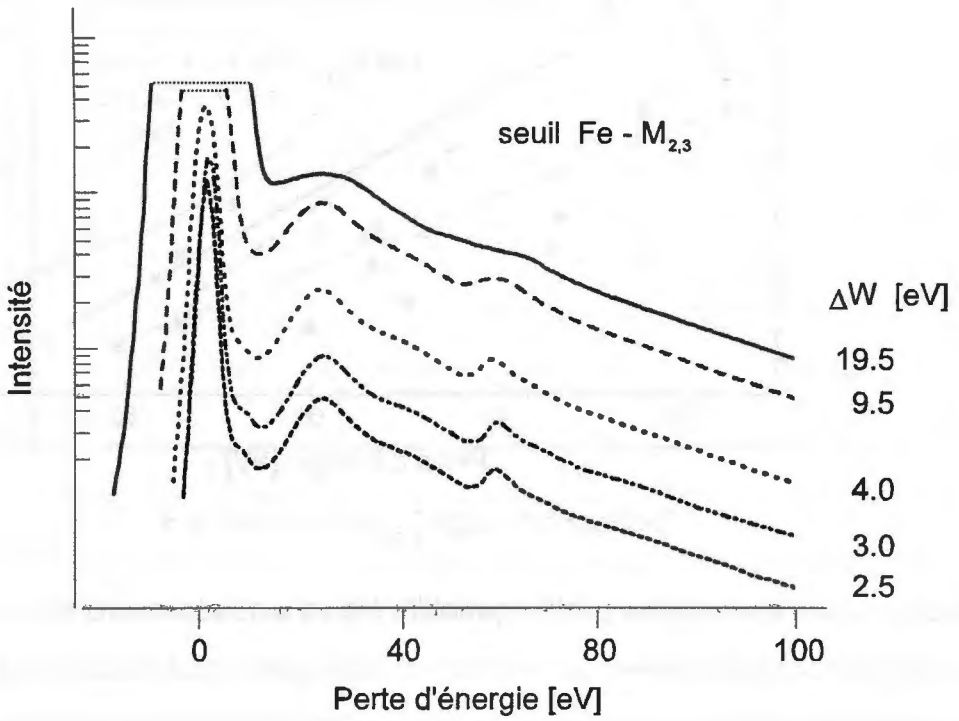
(Hoffer, 1993). D'autre part, lors de recouvrements de seuils (p.ex. $L_{2,3}$ du potassium à 290eV avec le seuil K du carbone à 284eV), l'analyse devient très difficile voir impossible. Il est donc très favorable d'utiliser dans certains cas la bande $M_{2,3}$.

6.2.2.1 Effet de la résolution énergétique sur la forme du seuil

De par sa forme en dents de scie, le seuil $M_{2,3}$ peut être atténué si la résolution énergétique est diminuée. Cet effet de "lissage" du pic est dû à l'enregistrement par le détecteur du signal moyen des pertes d'énergie ΔE comprises dans la fenêtre ΔW. Dans notre cas, nous avons testé l'effet de ΔW sur le seuil $M_{2,3}$ de la goethite; les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions d'amplification du signal, en changeant exclusivement la résolution énergétique ΔW. La Figure 6.13 montre les spectres obtenus à des résolutions d'énergie comprises entre 2.5 et 19.5eV (ΔW est mesuré sur la largeur à mi-hauteur du pic de perte nulle). Il apparaît clairement que lorsque la résolution est trop faible (typiquement à partir de 19.5eV), le seuil ne se distingue plus du fond que par un changement de pente, difficile à interpréter.

Cette étude sur la résolution n'a que peu d'implications pour l'enregistrement de spectres EELS puisqu'il est généralement plus judicieux de travailler dans des conditions de résolution énergétique élevée. Cependant, en imagerie ESI, il est préférable de travailler avec des résolutions plutôt faibles (typiquement de 10 à 25eV) afin d'obtenir des images élémentaires plus contrastées, particulièrement celles enregistrées sur la bande d'absorption. Il est dès lors important de considérer ce paramètre afin d'éviter des artefacts d'analyses lors de l'utilisation de la bande $M_{2,3}$.

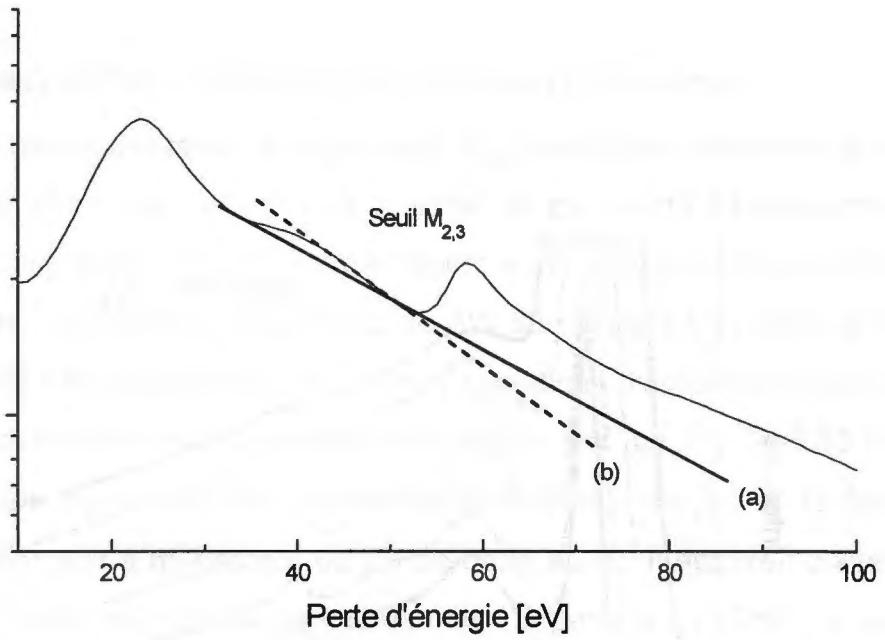
Figure 6.13 : *Effet de la résolution énergétique ΔW sur l'intensité et la forme de la bande $M_{2,3}$ du fer.*



6.2.2.2 Détermination de la section efficace partielle

Comme nous l'avons vu précédemment, la méthode des facteurs k peut être utilisée pour déterminer la section efficace partielle, sous certaines conditions, des bandes d'absorption d'un élément. Dès lors, la valeur de σ pour la bande $M_{2,3}$ est accessible. Cependant, l'extrapolation du bruit de fond sous le seuil n'est pas aussi aisée que pour la bande L. En effet, de par la présence d'un large pic (transition 3d-4p), les plasmons n'ont plus nécessairement une décroissance en AE^{-r}, mais présentent une légère sigmoïde qui induit une grande erreur lors de l'extrapolation du fond sous le seuil $M_{2,3}$ (Figure 6.14). Cette déviation est d'autant plus grande lorsque l'épaisseur du spécimen croît, puisque les plasmons deviennent plus importants.

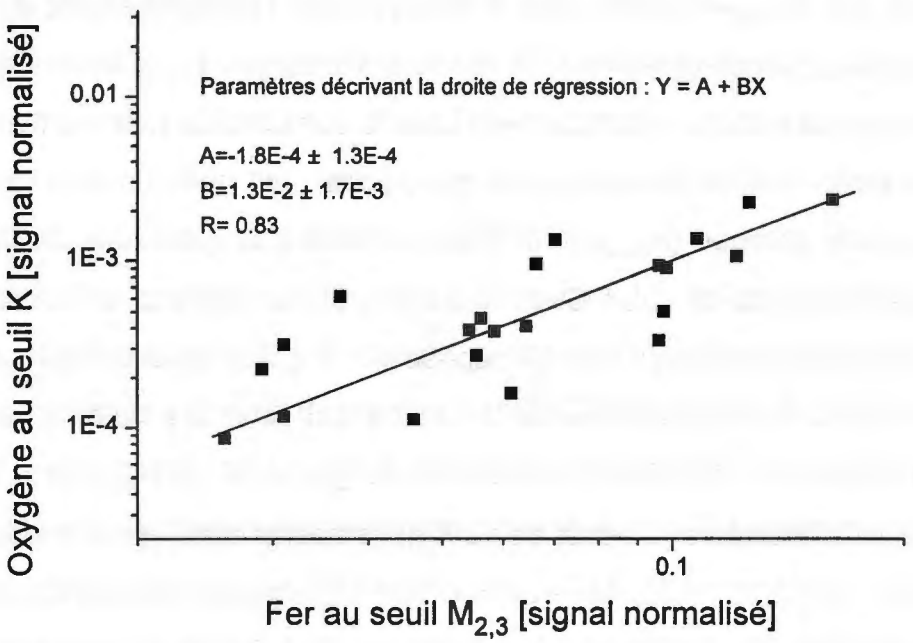
Figure 6.14 : *Extrapolation du fond continu sur la bande $M_{2,3}$ du fer dans la goethite.*



L'extrapolation du fond continu en pointillé (b) va induire une valeur du signal (lors de son intégration) très élevée par rapport à celle que l'on obtient dans le cas (a). Cette différence créera une erreur sur la quantification du nombre d'atomes de fer, ou sur le rapport stoechiométrique du composé.

La Figure 6.15 présente l'intensité du signal de la bande O-K normalisée sur le pic du zero loss en fonction du signal de la bande Fe-$M_{2,3}$, également normalisée. Chaque point du graphique représente un spectre enregistré sur une particule individuelle ou un petit agrégat dans un large intervalle d'épaisseurs.

Figure 6.15 : *Graphique de corrélation des signaux de l'oxygène (seuil K) en fonction du fer (seuil $M_{2,3}$).*



Dans un cas idéal, l'ensemble des points devraient être parfaitement alignés (voir la Figure 6.12). Le produit de la pente de la droite ainsi formée, par la section efficace partielle de l'oxygène ($\sigma_{O\text{-}K}(\Delta, \beta)$) et par le rapport stoechiométrique entre le fer et l'oxygène est égal à la section efficace partielle du fer ($\sigma_{Fe\text{-}M2,3}(\Delta, \beta)$), selon :

$$Y = mX + h$$

où h=0, Y=signal de l'oxygène normalisé, X=signal du fer normalisé

en tenant compte de :

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{\sigma_B(\beta,\Delta)}{\sigma_A(\beta,\Delta)} * \frac{\int_E^{E+\Delta} I_A(\beta,\Delta)}{\int_E^{E+\Delta} I_B(\beta,\Delta)} = m * \frac{\sigma_B(\beta,\Delta)}{\sigma_A(\beta,\Delta)}$$

on obtient :

$$\frac{N_{Fe\text{-}M2,3}}{N_{O\text{-}K}} * \sigma_{Fe\text{-}M2,3}(\beta,\Delta) = \sigma_{O\text{-}K}(\beta,\Delta) * m$$

Dans le cas présent, le rapport stoechiométrique de la goethite est connu et le $\sigma_{OK}(\Delta,\beta)$ est calculé. Cependant, les points ne sont pas parfaitement alignés, ce qui

se justifie par les erreurs suivantes : comme discuté plus haut, l'extrapolation du fond continu sous le seuil $M_{2,3}$ du fer n'est pas aisée et peut être légèrement différente d'un spectre à l'autre; de plus l'amplification du scintillateur/photomultiplicateur n'est pas nécessairement la même sur chacun des spectres. Cette amplification doit être ajustée à partir de ΔE_{loss}~=100eV, c'est-à-dire qu'entre l'enregistrement des seuils Fe-$M_{2,3}$ et O-K, l'amplification est nécessairement variée par l'opérateur. Comme la réponse du détecteur n'est pas parfaitement linéaire sur toute sa gamme dynamique, il apparaît une erreur lors de l'interprétation du spectre.

La valeur moyenne obtenue ($\sigma_{M2,3}=1\cdot10^{-19}$) est de l'ordre de grandeur établi pour la section efficace du fer sur ce seuil. Cependant, ces études ont été réalisées à l'aide de spécimens idéaux (film d'oxyde de fer déposé sur la grille) avec un microscope du type STEM travaillant à 120keV (Hoffer, 1993), ce qui rend les valeurs mesurées difficilement comparables. Dès lors, seul l'ordre de grandeur de $\sigma_{M2,3}$ peut être mis en parallèle avec la littérature. L'erreur de 10% qui entache cette valeur est faible par rapport à l'erreur de 10-20% proposée dans la littérature pour la quantification EELS (Egerton, 1986). Néanmoins, ce résultat doit être utilisé prudemment. En effet, il correspond à l'analyse d'un type de particule (FeOOH) avec un jeu précis de conditions opérationnelles. Malgré ces limitations, comme montré précédemment (méthode des facteurs k), la valeur du $\sigma_{M2,3}$ pourra être exploitée pour d'autres particules de fer comme par exemple les colloïdes de fer observées dans les lacs (générés à l'oxycline, (Buffle, 1992), dans les zones alluviales (Perret, 1994) ou d'origine pédologique (Mavrocordatos, 1995), oxydation du Fe^{II} des tourbières au contact de la rivière (chapitre 9)).

6.2.3 Effet de l'épaisseur du spécimen sur le spectre EELS

La principale limitation du EELS est l'épaisseur du spécimen. Comme vu précédemment, si la particule analysée est très épaisse (proche de t/λ=5), alors la probabilité d'obtenir plusieurs diffusions (multi-scattering) pour un électron la traversant est très élevée. Cette limitation n'a pas d'effet pour les spécimens en sciences des matériaux, car ceux-ci se présentent généralement sous forme de films le plus fin possible, ce paramètre étant contrôlé par la méthode de préparation. Dans le cas d'échantillons de particules aquatiques, l'ultracentrifugation permet de déposer

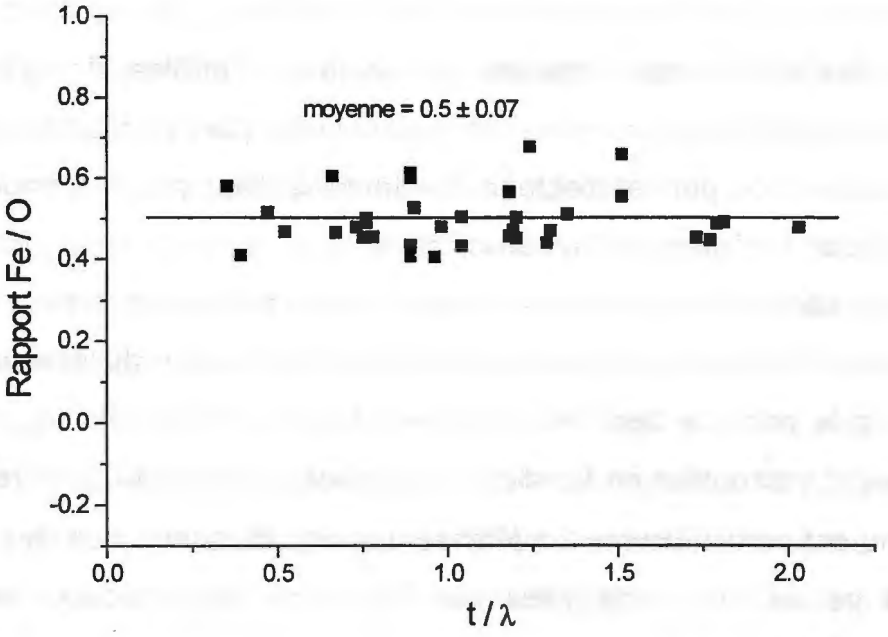
les particules sur la grille de microscopie, mais n'autorise aucun contrôle de l'épaisseur de chacune d'elles. D'autre part, les particules étudiées en environnement présentent une grande hétérogénéité de tailles. Il est donc important de déterminer le domaine d'application du EELS en fonction de ce paramètre primordial.

Afin d'obtenir des spécimens d'épaisseur différente et contrôlée, des particules de goethite ont été incluses en résine et sectionnées par ultramicrotomie. Cette méthode de préparation permet d'obtenir des sections d'épaisseurs comprises entre 30 et 300nm, selon le réglage de l'ultramicrotome.

L'ensemble des spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions que celles utilisées en quantification. La mesure précise de l'épaisseur du spécimen à été effectuée selon le principe décrit au chapitre 3.1.3 (équation 3.4). Les valeurs du rapport Fe/O sont présentées en fonction de l'épaisseur relative t/λ (Figure 6.16). Ce résultat obtenu est particulièrement intéressant, puisqu'il montre que des particules riches en fer peuvent être analysées par EELS lorsque l'épaisseur relative est comprise entre 0.3-2.1, ce qui correspond à une épaisseur absolue de t=28nm à t=200nm. Il apparaît que ce rapport reste constant sur le domaine des épaisseurs mesurées. Cependant il a été montré pour certains composés comme le cristal de BN que le rapport de B/N diminue de 1 à 0.7 pour un t/λ de 0.5 à 2.0 (Zaluzec, 1980). Il est donc important de vérifier cette déviation pour les composés à analyser. Néanmoins, lorsque les éléments sont les mêmes (dans ce cas Fe et O), il est possible d'utiliser ces valeurs d'épaisseurs obtenues comme références de base.

Le rapport présenté ci-dessous est obtenu à partir des intégrales de la bande Fe-$L_{2,3}$ et de la bande O-K. L'effet de l'épaisseur est identique sur l'ensemble du spectre et donc aussi bien sur la bande $L_{2,3}$ du fer que sur sa bande $M_{2,3}$. Cependant, l'extrapolation du fond continu sous le seuil $M_{2,3}$ peut devenir très difficile pour des systèmes épais ($t/\lambda>1.5$). De ce fait, il est préférable d'utiliser la bande $L_{2,3}$.

Figure 6.16 : *Rapport stoechiométrique Fe/O mesuré en fonction de t/λ pour des particules de goethite incluses en résine.*



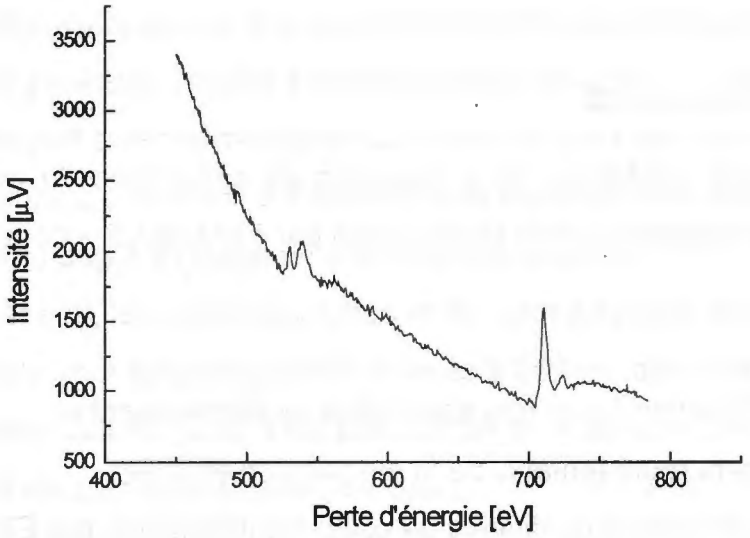
L'écart observé entre les différents points du graphique est justifié par l'erreur sur la mesure de l'épaisseur relative qui, en théorie est précise à 20% et, comme dans le cas de la quantification élémentaire, par l'erreur sur l'intégrale de chacun des pics analysés.

6.2.4 Dommages générés aux spécimens par les électrons de la source

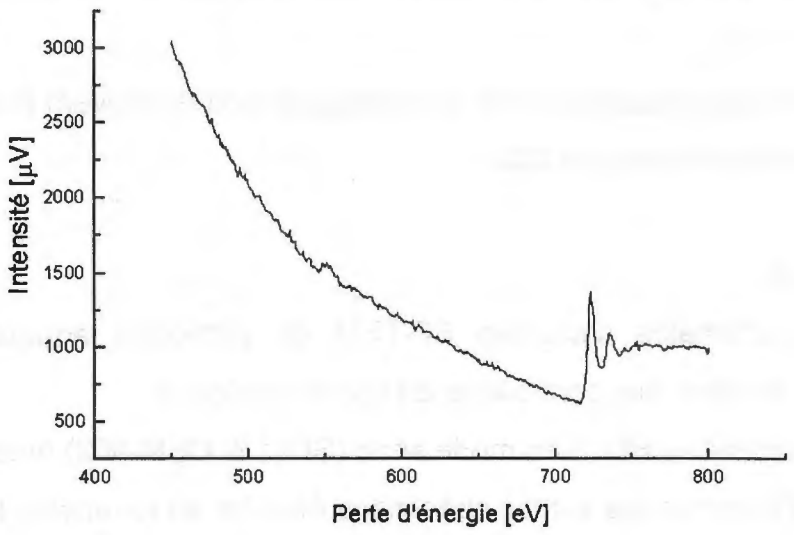
Les analyses quantitatives EELS ont montré que le rapport stoechiométrique d'un composé pouvait être mesuré de manière suffisamment précise. Cette propriété peut dès lors être utilisée pour mettre en évidence l'effet du faisceau d'électrons incidents sur des particules de goethite. Après quelques heures d'exposition aux électrons, ces particules subissent une transformation morphologique observable visuellement. Cette transformation apparaît clairement sur les deux spectres de la Figure 6.17, enregistrés à 4 heures d'intervalle lors d'une exposition continue du spécimen au faisceau d'électrons.

Figure 6.17 : *Effet du faisceau d'électrons incidents sur le rapport stoechiométrique Fe/O mesuré en fonction du temps d'irradiation du spécimen.*

(a) au début de l'exposition



(b) après 4 heures d'exposition



Le spectre après 4 heures d'exposition présente un seuil K de l'oxygène nettement moins intense que celui enregistré au début de l'exposition. En conséquence, le rapport Fe/O originellement de 0.5, est passé à 1.3; la quantité d'oxygène a donc diminué d'un facteur 2.6. Cette variation peut être expliquée par une réduction du Fe^{III} en Fe^{II} et donc une diminution concomitante de la quantité d'oxygène dans la

particule analysée. La transformation de l'espèce oxydée en une espèce partiellement réduite se traduit par un changement de la forme du seuil du fer. Cette analyse permet de démontrer l'aspect important de la forme des seuils en EELS, propriété qu'il serait loisible d'exploiter pour créer des "empreintes digitales" des colloïdes analysés.

6.3 Rappel des résultats

La mise au point des méthodes de préparation de spécimens de microparticules modèles à l'aide de la centrifugation et d'analyse par TEM-EELS a démontré que :

Qualitativement :

- L'ultracentrifugation fourni des spécimens qualitativement et quantitativement représentatifs de la suspension étudiée.
- L'analyse élémentaire qualitative de colloïdes individuels par EELS est possible, ceci pour l'aluminium, le fer, le silicium et l'oxygène.
- La cartographie élémentaire d'une zone d'intérêt peut être établie très rapidement par ESI, sur les mêmes éléments et les mêmes seuils qu'en EELS.
- Les particules présentes dans des agrégats mixtes peuvent être séparées spectrométriquement par ESI.

Quantitativement :

Les conditions optimales d'analyse EF-TEM de particules aquatiques ont été déterminées en fonction des contraintes du spécimen étudié

- La spectrométrie EELS en mode série (SEELS; CEM-902) produit un grand nombre d'informations sur les spécimens étudiés; en revanche, l'accès à l'environnement moléculaire de l'élément analysé est limité par sa faible résolution énergétique (ΔW_{min}=2eV), qui ne permet pas d'études ELNES sérieuses.
- L'épaisseur du spécimen peut être mesurée par l'analyse EELS et est déterminante.

- Le fer et l'oxygène peuvent être quantifiés individuellement (avec une précision de ~20%), ou relativement l'un à l'autre (avec une précision de ~10%).
- La section efficace partielle de la bande $L_{2,3}$ du fer mesurée par la méthode des facteurs k est significativement plus exacte (erreur réduite de moitié) que la section calculée sur la base du modèle de l'atome d'hydrogène.
- Le fer peut être analysé soit sur son seuil $M_{2,3}$ soit sur son seuil $L_{2,3}$.
- Le rapport stoechiométrique d'un composé peut être déterminé et utilisé afin de quantifier des effets d'altération de la matière, voire éventuellement de révéler le degré d'oxydation d'un élément analysé.
- En général, les particules riches en fer sont aisément analysables lorsque leur taille (leur épaisseur) est inférieure à 200nm; dans les conditions d'analyse optimalisées, il est possible de détecter des particules de taille proche de 2nm (Bazett-Jones, com. pers.).

7 COROLLAIRE

7.1 RÉSUMÉ DE LA PARTIE DÉVELOPPEMENT ANALYTIQUE 80

7.2 APPLICATION DE LA MICROSCOPIE ANALYTIQUE À L'ENVIRONNEMENT 81

7 COROLLAIRE

A ce niveau de l'étude, il est important de résumer les pages précédentes et de décrire brièvement la suite de ce travail qui traitera de l'application de la microscopie à perte d'énergie à l'étude d'échantillons naturels.

7.1 RÉSUMÉ DE LA PARTIE DÉVELOPPEMENT ANALYTIQUE

Des colloïdes modèles, tels que l'hématite, la goethite, l'alumine, la kaolinite, dont la composition est typiquement celle trouvée dans les particules aquatiques, ont permis de définir précisement les conditions optimales d'analyses EELS et de démontrer l'étendue des possibilités de la technique.

Il a été montré que les analyses élémentaires en ESI ou en EELS peuvent être réalisée sur des particules individuelles ou présentes dans des agrégats.

Dès lors, l'analyse qualitative et quantitative est possible en EELS sur des colloïdes de petite taille, typiquement <200nm et l'imagerie élémentaire permet de determiner rapidement la composition des particules étudiées même pour certains cas difficiles (p.ex. recouvrement d'une hématite par une argile). D'autre part, l'analyse fine des spectres démontre un aspect très intéressant d'un point de vue environnemental qui est celui d'"empreinte digitale" d'une particule. Ce concept peut avoir des applications très importante, comme par exemple de suivre la trace de particules de même structure et composition entre deux points d'un site étudié.

D'un point de vue quantitatif, il est dorénavant possible de retrouver le rapport stoechiométrique de deux éléments dans une particule (p.ex. le fer et l'oxygène dans les oxydes modèles), de déterminer l'épaisseur du spécimen étudié ou même d'obtenir, avec une erreur inférieure à 20%, la quantité absolue d'un ou plusieurs éléments, dans une entité colloïdale.

7.2 APPLICATION DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ANALYTIQUE À L'ENVIRONNEMENT

Les deux applications qui suivent permettent de prouver les possibilités de la microscopie électronique analytique (AEM) et de définir les limitations quant à son utilisation lors de l'étude de colloïdes aquatiques. La première étude a été réalisée sur un sol, un podzol alpin, dont la composition et le fonctionnement à l'échelle globale ont été intensivement étudiés (Keller, 1995).

Cette première application environnementale a été réalisée durant la mise au point de la méthode d'analyse des colloïdes par EF-TEM, afin d'orienter exactement la suite du développement de la technique d'analyse. De ce fait, seul l'aspect qualitatif des analyses sera exposé ici. Le but originel n'était pas de comprendre, à l'aide de la microscopie, le fonctionnement d'un système aussi complexe qu'un podzol mais de démontrer l'applicabilité de la microscopie électronique à perte d'énergie à un système contenant des colloïdes minéraux et organo-minéraux. Cependant, en plus de mettre en valeur cette technique, il a été possible de démontrer la représentativité du mode de préparation des spécimens et leur analyse, de sorte que les particules analysées représentent clairement l'horizon duquel elles proviennent.

La deuxième étude, réalisée après la mise au point du EF-TEM sur les colloïdes modèles, a été menée sur un site incluant un bassin versant et une source. Les mesures ont été réalisées sur ces deux lieux de prélèvement à l'aide de la microscopie à balayage couplée à un détecteur de fluorescence X (SEM-EDS), de microscopes à transmission permettant aussi l'analyse EDS (TEM-EDS; STEM-EDS) et d'un microscope à filtre d'énergie (EF-TEM). L'ensemble des résultats obtenus pour les différents microscopes a permis de montrer la complémentarité des spectrométries applicables et ainsi de rationaliser l'approche par microscopie électronique analytique de système environnementaux complexes. De plus, les analyses ont généré des résultats interprétables pour la compréhension de certains mécanismes de formation de particules qui n'auraient pas vu le jour avec des études à l'échelle globale de la suspension (ou solution).

8 APPLICATION DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À FILTRE D'ÉNERGIE À LA PÉDOLOGIE : LE CAS D'UN PODZOL

8.1 INTRODUCTION 83

8.2 APPROCHE ENVIRONNEMENTALE 83

8.2.1 SITE ET CARACTÉRISTIQUES DU PODZOL 86

8.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES 87

8.3.1 TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS DU SOL 88

8.3.2 PRÉPARATION DES SPÉCIMENS TEM 90

8.4 RÉSULTATS ET DISCUSSION 92

8.2.1 ANALYSE MORPHOLOGIQUE TEM 92

8.3.1 ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DES COLLOÏDES PÉDOLOGIQUES PAR EF-TEM ... 98

8.5 COROLLAIRE 106

8 APPLICATION DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À FILTRE D'ÉNERGIE À LA PÉDOLOGIE : LE CAS D'UN PODZOL

8.1 INTRODUCTION

Les sols sont généralement formés par altération de la roche mère et par accumulation de matière organique et minérale. Cette pédogénèse est gérée par plusieurs paramètres : le climat, la situation géographique, la végétation, la nature du substrat géologique, le temps et les conditions physico-chimiques du milieu. Au sein du sol, les composés organiques et minéraux subissent des transformations qui sont conditionnées par l'acidité, le potentiel redox et l'activité biologique.

8.2 APPROCHE ENVIRONNEMENTALE

De par la nature stratifiée du sol, les conditions physico-chimiques changent d'un horizon (strate de quelques centimètres) à l'autre si bien qu'en solution, certains éléments sont soit dissous ou complexés (p.ex. le Fe^{II}) soit en suspension sous forme colloïdale ou particulaire (Fe^{III}). Les particules de la solution du sol sont aussi bien exogènes (précipitations, dépositions éoliennes) qu'endogènes (oxydes, produits de dégradations organiques). Elles jouent un rôle déterminant dans le transfert de matière dans le sol et dans son évolution (cas du lessivage des argiles (Duchaufour, 1983)). D'autre part, la matière en suspension peut participer activement au transport de micropolluants le long du profil du sol (Gasser, 1994).

Parmi les études pédologiques sur les colloïdes de la solution du sol, certaines ont été entreprises sur des aluminosilicates afin de déterminer leurs paramètres physico-chimiques et leurs interactions (adsorption et/ou complexation) avec d'autres composants du sol (métaux lourds, substances humiques) (Guillet, 1979; Jackson, 1964). De par la grande diversité des sols décrits et de leurs différents horizons associés (Duchaufour, 1983), une variété importante de microparticules minérales (oxydes, argiles, substances humiques associées ou non à la matière minérale) pourront être retrouvées dans la solution du sol (Allen, 1983).

De plus, la composition d'un horizon déterminée à l'échelle globale (AAS, ICP, XRF) est probablement étroitement liée à celle de ses colloïdes associés. Par exemple, l'horizon d'accumulation BPh d'un podzol contient principalement du fer avec de la matière organique. Les microparticules de la solution de cet horizon devraient par conséquent être principalement des oxydes du même type et d'éventuelles entités organiques (substances humiques) qui peuvent intervenir comme liants de matière minérale.

La notion de "particules" en environnement est basée essentiellement sur un critère de taille. Cependant, les particules d'intérêt dans les différents compartiments de l'environnement (air, sol, eau) existent dans des domaines de taille très différents. Dans les lacs et rivières, les particules de grande taille (typiquement 5-10μm) ont un temps de résidence trop court pour jouer un rôle déterminant alors que dans les sols, celles-ci ont un rôle important puisqu'elles peuvent migrer au travers du sol et donc intervenir dans l'évolution de ses horizons (Mellor, 1986). Malgré ces différences, les particules de taille submicrométrique (ou colloïdes) sont omniprésentes et jouent un rôle clef dans le transport de micropolluants grâce à l'importance de leur surface d'adsorption, d'où l'intérêt d'étudier les particules de taille inférieure à 0.45μm. La valeur de 0.45μm a souvent été utilisée comme valeur de référence afin de discriminer les phases soluble et insoluble en sciences environnementales (Buffle, 1990). Cependant, même si cette limite de taille n'est plus actuellement vraie pour l'étude des colloïdes, elle a été choisie ici comme premier critère de séparation.

La grande différenciation existant entre les horizons d'un podzol permettra de mettre en valeur les colloïdes de ce dernier qui sera donc utilisé comme "modèle" environnemental pour la caractérisation de particules submicrométriques par microscopie à filtre d'énergie. Afin d'atteindre ce but, il est nécessaire de développer des méthodes :

(i) d'extraction des colloïdes contenus dans le sol,

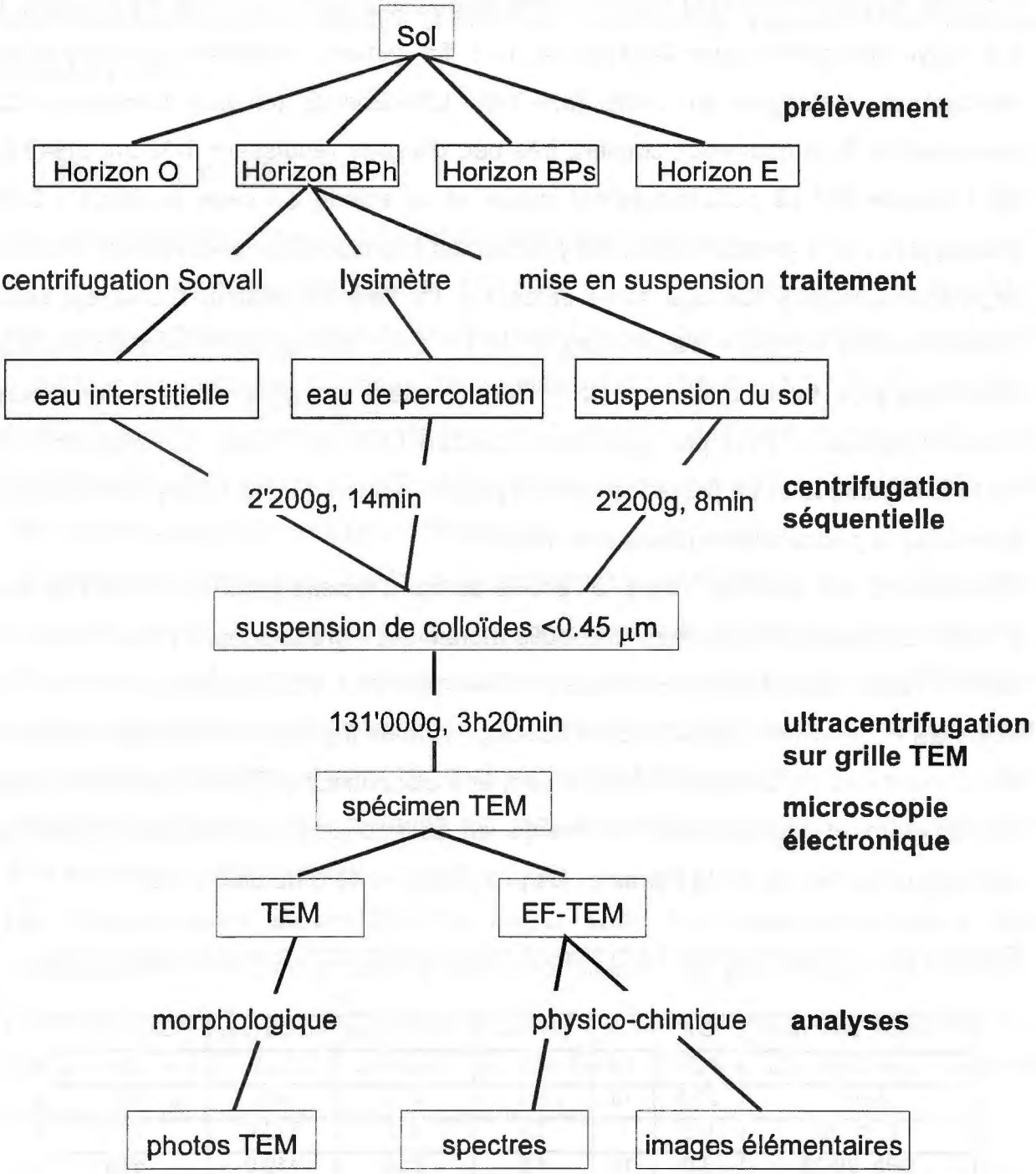
(ii) de séparation de tailles,

(iii) de préparation de spécimens TEM.

Les principes satisfaisant aux points (ii) et (iii) ci-dessus ont été exposés dans la partie analytique de ce travail; les méthodes ad hoc y ont également été développées, optimalisées et commentées. Les détails des procédures d'extraction

de colloïdes du sol seront décrits plus loin (chap. 8.3). Le schéma global d'analyse d'un podzol que nous proposons, et qui résulte des développements mentionnés, est présenté ci-dessous pour plus de clarté.

Figure 8.1 : *Schéma global des opérations effectuées sur les quatre horizons du sol.*



8.2.1 Site et caractéristiques du podzol

D'une manière générale, le podzol est un sol évolué à fort contraste entre les horizons (morphologie et propriétés). Cette différenciation entre horizons impose une description horizon par horizon. L'horizon de surface est entièrement organique, d'acidité élevée (pH=3-4) et généralement d'épaisseur comprise entre 10 et 20cm. Il est suivi directement par l'horizon A très fin (~1cm) contenant des agrégats coprogènes mélangés au sable (pH=3-4). L'horizon E (éluvial) blanchâtre ou cendreux de type quartzeux contient très peu d'argiles (épaisseur 1-30cm, pH=3.5-4). L'horizon BP (B podzolique) est illuvial et se scinde en deux horizons : BPh (humique) et BPs (sesquioxides). Le premier est l'horizon d'accumulation de matière organique amorphe (de 5 à 10%) et de fer. Le BPs de couleur rouille est celui d'accumulation d'oxydes d'aluminium et de fer avec une concentration en matière organique plus faible que dans BPh. Cette matière est généralement composée d'acides fulviques. Plus profondément, l'horizon C a une faible concentration en matière organique et sa présence dans le podzol indique qu'une phase de lessivage a précédé la podzolisation (Duchaufour, 1984).

Le sol étudié est situé en Valais, à l'entrée du val d'Arpette (coord.int. 46°41'18"N - 6°44'60"E), sur une roche-mère d'éboulis morainiques granitiques sur une pente de 68%. C'est un podzol alpin (nomenclatures : Commission Pour la Classification des Sols, 1967 et Référentiel Podzosol Français, 1992) bien développé, mais il présente une hétérogénéité d'épaisseur des horizons, certains pouvant être discontinus (A, BPh). L'horizon E est particulièrement bien stratifié. La charge en cailloux et blocs augmente avec la profondeur (présence de la moraine) jusqu'à atteindre 40% du poids total.

Tableau 8.1 : *Caractéristiques physico-chimiques du podzol (adapté de Keller, 1994).*

Horizon, prof. [cm]	C%	C/N	pH eau	Fe2O3 [g/kg]	Al2O3 [g/kg]	SiO2 [g/kg]
O, 20-0	42.3	30	3.6	5.0	25.0	157
A, 0-1	25.5	18	3.6	10.0	66.0	397
E, 1.-20	0.5	/	3.9	5.0	112.0	794
BPh, 20-25	3.0	16	4.6	25.0	119.0	699
BPs, 25-60	0.6	/	5.1	22.0	121.0	761
C, 60-90	0.4	/	5.1	9.0	118.0	779

Comme le montre clairement le tableau 8.1, le pH augmente le long du profil, de 3.6 dans l'horizon O (0-20cm de profondeur) à 5.1 dans l'horizon C (60-90cm). La proportion de carbone est légèrement inférieure à celle attendue dans ce type de sol pour l'horizon BPh (Duchaufour, 1983; Robert, 1980). Les analyses par fusion alcaline (Jeanroy, 1973) permettent de mettre en valeur la teneur élevée en fer et en aluminium des horizons d'accumulation BPh et BPs. Les horizons A et C ne seront pas étudiés dans ce travail.

8.3 Matériel et méthodes

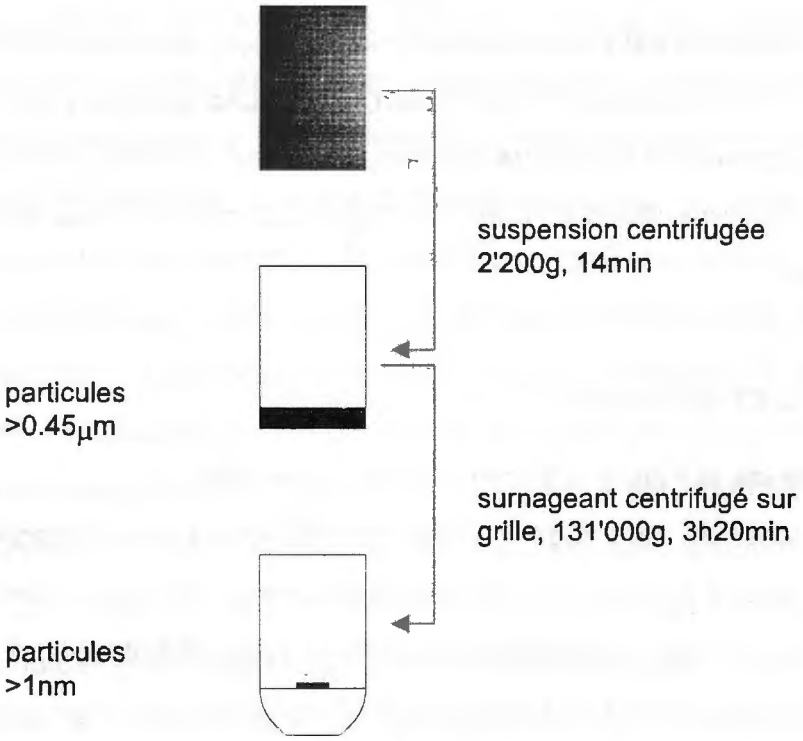
Les traitements de la Figure 8.1 sont décrits ci-dessous.

Une méthodologie de centrifugation déjà mise au point en pédologie pour l'analyse des éléments traces de l'eau interstitielle du sol (Keller, 1995) peut être adaptée afin de récupérer les colloïdes contenus dans celle-ci (voir chapitre 4.1.1.2). Cependant, cette séparation ne permet pas de recueillir l'ensemble des microparticules d'intérêt (<0.45μm) à cause de compactage de la matière du sol sur le filtre. Dès lors, elle doit être complétée par d'autres types d'extraction.

En limnologie, l'utilisation de la centrifugation séquentielle est de plus en plus fréquente (Perret, 1994; Ecowise, http://www.science.mcmaster.ca/Biology/ecowise/partA3.html). Elle permet de séparer les particules contenues dans une suspension en différentes fractions de taille et de densité (Figure 8.2). Par cette procédure, les particules de grosse taille sont éliminées (les fractions de surnageant ne contiennent plus que les tailles recherchées). Cette méthode est proposée ici pour l'extraction de colloïdes d'un sol mis en suspension (Mavrocordatos, 1995).

Les microparticules susceptibles de migrer entre les horizons ne seront pas nécessairement présentes dans le sol échantillonné. Le prélèvement de l'eau de percolation est effectué à l'aide de lysimètres placés entre chaque horizon. La suspension ainsi récoltée contient les éléments mobiles de l'horizon associé (substances dissoutes et microparticules mobiles).

Figure 8.2 : Schéma d'une centrifugation en cascade.



La suspension brute est centrifugée afin de séparer les colloïdes de taille >0.45μm, puis le surnageant est ultracentrifugé sur grille TEM.

8.3.1 TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SOL

8.3.1.1 ECHANTILLONNAGE

Les échantillons de sol (~100g/horizon) ont été extraits séparément de chaque horizon à l'aide d'une spatule et transportés au laboratoire dans des sacs de polyéthylène, puis conservés à 4°C entre chaque manipulation afin d'éviter un développement bactérien.

La densité moyenne des particules minérales contenues dans ce podzol a été estimée (colloïdes organo-minéraux) à 2.5g/cm^3, indépendamment des horizons. Cette valeur a été utilisée afin de calculer (Equation 4.1) les temps de centrifugation pour chacun des traitements, à l'exception de l'extraction de l'eau interstitielle, pour laquelle les paramètres de centrifugation ont déjà été déterminés (Keller, 1995). L'étude morphologique TEM a permis d'éprouver la valeur de la densité estimée

8.3.1.2 Extraction de l'eau interstitielle

L'eau interstitielle est extraite en suivant la procédure de centrifugation mise au point en pédologie. Le sol (~30g/horizon) est déposé dans un récipient en téflon dont le fond est perforé (porosité de 0.5mm) et recouvert d'un papier filtre. L'eau contenue dans le sol est récupérée lors de la centrifugation (3'400g, 1h30min, Sorvall R5C) dans un réceptacle placé sous le récipient (Figure 4.2).

Chaque suspension extraite séparément des différents horizons (2ml/horizon) est diluée dans 28ml d'eau ultrapure et centrifugée (2'200g, 14min, Kontron) afin d'éliminer les particules >0.45μm. Le surnageant récupéré (25ml) contient principalement les colloïdes <0.45μm.

8.3.1.3 Suspension de sol

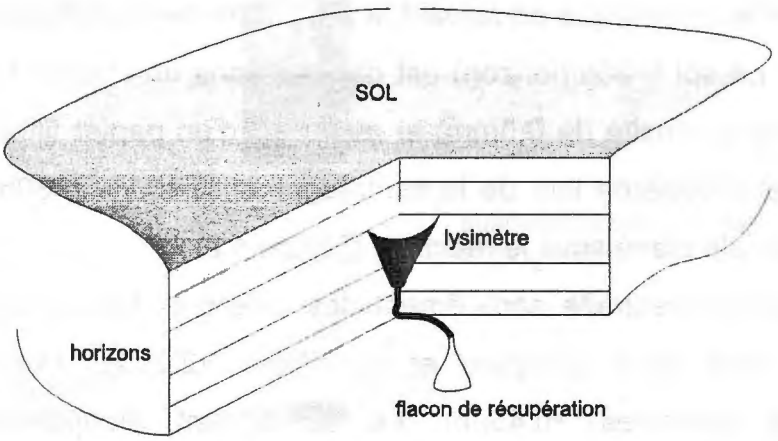
Chaque échantillon d'horizon (~10g/horizon) est mis en suspension dans 10ml d'eau ultrapure sans autre additif. Une centrifugation préliminaire (2'200g, 8min) de la suspension concentrée permet d'éliminer le matériel grossier et les particules de taille >1μm.

La fraction supérieure (5ml) du surnageant est récupérée et diluée dans de l'eau ultrapure (25ml) puis recentrifugée (2'200g, 14min). Cette dernière centrifugation permet de séparer les particules >0.45μm et les microparticules d'intérêt, récupérées dans le surnageant (25ml).

8.3.1.4 Eau de percolation

L'eau de percolation est collectée sous chaque horizon avec un lysimètre sans tension connecté à une bouteille de polyéthylène (Figure 8.3) (Keller, 1991; Juchler, 1988). Ces dernières ont été mises en place 4 semaines avant le prélèvement. Les fractions récupérées sont conservées dans les mêmes conditions que les échantillons de sol.

Figure 8.3 : *Schéma d'un lysimètre.*



L'eau de percolation (30ml) est fractionnée comme suit : les macroparticules >0.45μm sont directement éliminées par centrifugation (2'200g, 14min) et la fraction supérieure (25ml, contenant les microparticules <0.45μm) du surnageant est récupérée pour l'étape de déposition sur grille (Figure 8.2).

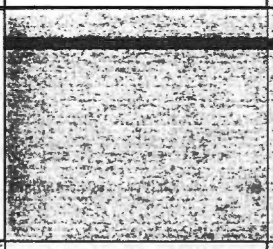
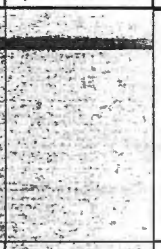
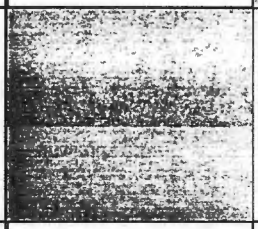
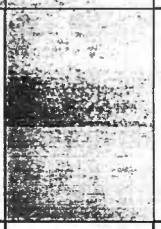
8.3.2 Préparation des spécimens TEM

Les échantillons obtenus (eau interstitielle, suspension du sol, eau de percolation) sont déposés sur des grilles de TEM suivant la procédure précédemment décrite (Figure 4.1) :

- deux grilles de TEM par support,
- ajout dans le tube de la suspension à analyser (25ml),
- ultracentrifugation des colloïdes à 131'000g pendant 3h20min.

L'ensemble des traitements appliqués aux échantillons est résumé dans le Tableau 8.2 où les volumes et poids sont indiqués pour chaque horizon et chaque étape.

Tableau 8.2 : *Résumé des traitements appliqués aux échantillons.*

étapes du traitement	sol brut avant / après centrif.	suspension de sol	eau de percolation	conditions de centrifugation
extraction de l'eau interstitielle du sol	poids en [g] O: 32.84 / 17.45 E: 32.9 / 30.24 BPh: 32.69 / 27.95 BPs: 32.77 / 29.3			Sorvall R5C 3'400g 1h30min
récupération du surnageant de la suspension du sol		O: 10.49g + 10ml eau E: 10.97g + 10ml eau BPh: 10.37g + 10ml eau BPs: 10.43g + 10ml eau		Kontron TST28 2'200g 8min
élimination des particules supérieures à 0.45µm	O: 2ml + 28ml d'eau E: 2ml + 28ml d'eau BPh: 2ml + 28ml d'eau BPs: 2ml + 28ml d'eau	O: 5ml + 25ml d'eau E: 5ml + 25ml d'eau BPh: 5ml + 25ml d'eau BPs: 5ml + 25ml d'eau	O: 30ml E: 30ml BPh: 30ml BPs: 30ml	Kontron TST28 2'200g 14min
déposition du surnageant sur grille TEM	O: 25ml E: 25ml BPh: 25ml BPs: 25ml	O: 25ml E: 25ml BPh: 25ml BPs: 25ml	O: 25ml E: 25ml BPh:25 ml BPs:25 ml	Kontron, TST28 131'000g 3h20min

8.4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

8.4.1 ANALYSE MORPHOLOGIQUE TEM

La méthode de séparation des particules, habituellement utilisée sur des échantillons aquatiques, peut s'adapter à l'extraction de colloïdes de sol et de l'eau lysimétrique. De manière à obtenir une information représentative issue des spécimens TEM, 30 micrographies ont été enregistrées pour chaque horizon (au total 360 photos, 3 préparations différentes, 4 horizons). De cet ensemble, les 12 plus représentatives (3 préparations, 4 horizons) ont été choisies pour la présentation ci-dessous.

8.4.1.1 EAU INTERSTITIELLE

Les Figures 8.5a-d présentent les images TEM obtenues sur les eaux interstitielles des différents horizons. L'extraction par centrifugation (centrifugeuse Sorvall) et fractionnement (ultracentrifugeuse Kontron) des microparticules ne permet de récupérer qu'une portion restreinte des particules présentes dans le sol.

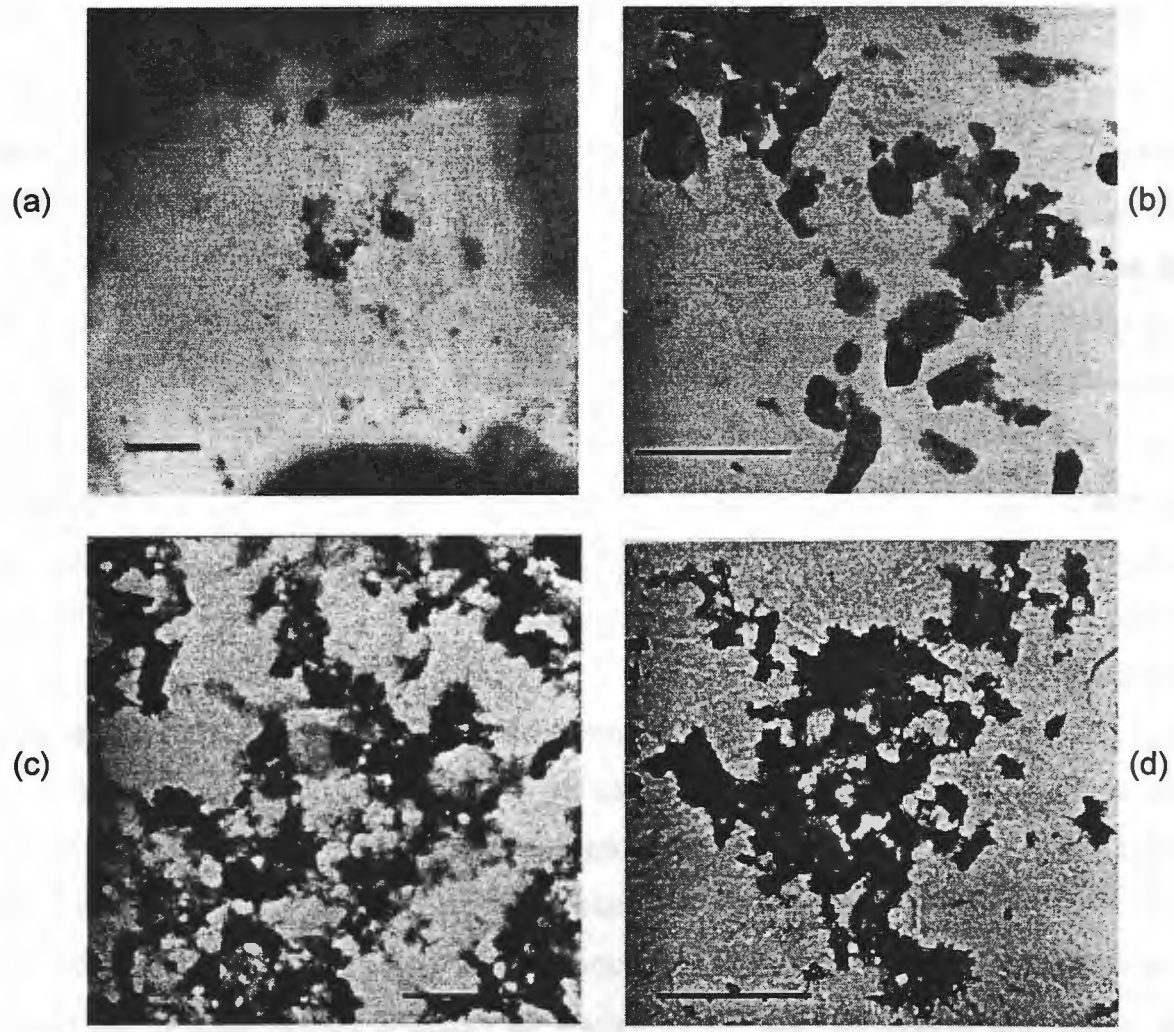
En effet, la fraction observée de l'horizon organique O (Figure 8.5a) n'est constituée que de microparticules de 10-50nm (cependant, on y observe aussi des bactéries) alors que le même horizon mis en suspension et fractionné par centrifugation séquentielle (Figure 8.6) présente une palette de tailles nettement plus étendue.

Au niveau analytique, cette déviation peut s'expliquer par le principe même de la première centrifugation (système Sorvall) : le sol est centrifugé dans un récipient dont le fond perforé est recouvert d'un papier filtre. Le compactage du sol sur ce fond crée un "filtre" de ~1cm d'épaisseur (selon la quantité de sol) qui trappe une grande partie des particules présentes dans l'eau interstitielle. La suspension récupérée est alors très faiblement chargée en microparticules de taille >100nm. Au niveau environnemental, les colloïdes de la suspension du sol sont aussi bien ceux capables de migrer que de résider dans l'horizon étudié alors que les microparticules de l'eau interstitielle font partie de la phase mobile du sol.

L'horizon O (Figure 8.5a) présente une énorme quantité de bactéries. Ces dernières ne se retrouvent pas en concentration aussi élevée dans les autres horizons, ni

même avec d'autres préparations. Il peut dans ce cas s'agir d'un artefact dû à différents facteurs : une contamination extérieure (p.ex. le récipient de centrifugation), une prolifération accélérée due à un stress de ces bactéries ou encore une contamination postérieure à la préparation, directement sur la grille de microscopie. Ces hypothèses n'ont pas pu être validées, mais la présence d'un réseau de fibriles organiques reliant les bactéries indique une prolifération et une agrégation de celles-ci à la suite d'un stress extérieur. Ce phénomène est bien connu des microbiologistes et est observable dans différents milieux environnementaux ou de culture (Leppard, communication personnelle).

Figure 8.5 : *Micrographies TEM des colloïdes dans les eaux interstitielles, pour les différents horizons; (a) horizon O, (b) horizon E, (c) horizon BPh, (d) horizon BPs.*



La fraction de l'horizon E présente des microparticules de densité électronique élevée et de morphologie très géométrique, ce qui est généralement le cas des particules minérales cristallisées. Dans ce cas, le phénomène de compactage observé lors de la préparation par centrifugation est beaucoup moins important de par la texture de l'horizon.

Les horizons BPh et BPs exhibent de nombreux agrégats organo-minéraux de même morphologie que ceux obtenus avec les suspensions de sol (comparaison des Figures 8.5c et 8.6c, respectivement 8.5d et 8.6d). On constate que seule la taille des agrégats change d'une préparation à l'autre; les agrégats obtenus à partir de l'eau interstitielle sont en moyenne 10 fois plus petits que ceux de la suspension, ce qui peut aussi s'expliquer par le compactage du sol sur le fond du récipient, lors de la préparation.

8.4.1.2 Suspension du sol

La première étape de fractionnement de la suspension du sol a permis d'éliminer l'ensemble du matériel grossier et de récupérer exclusivement les particules ayant des tailles comprises entre quelques micromètres et quelques nanomètres.

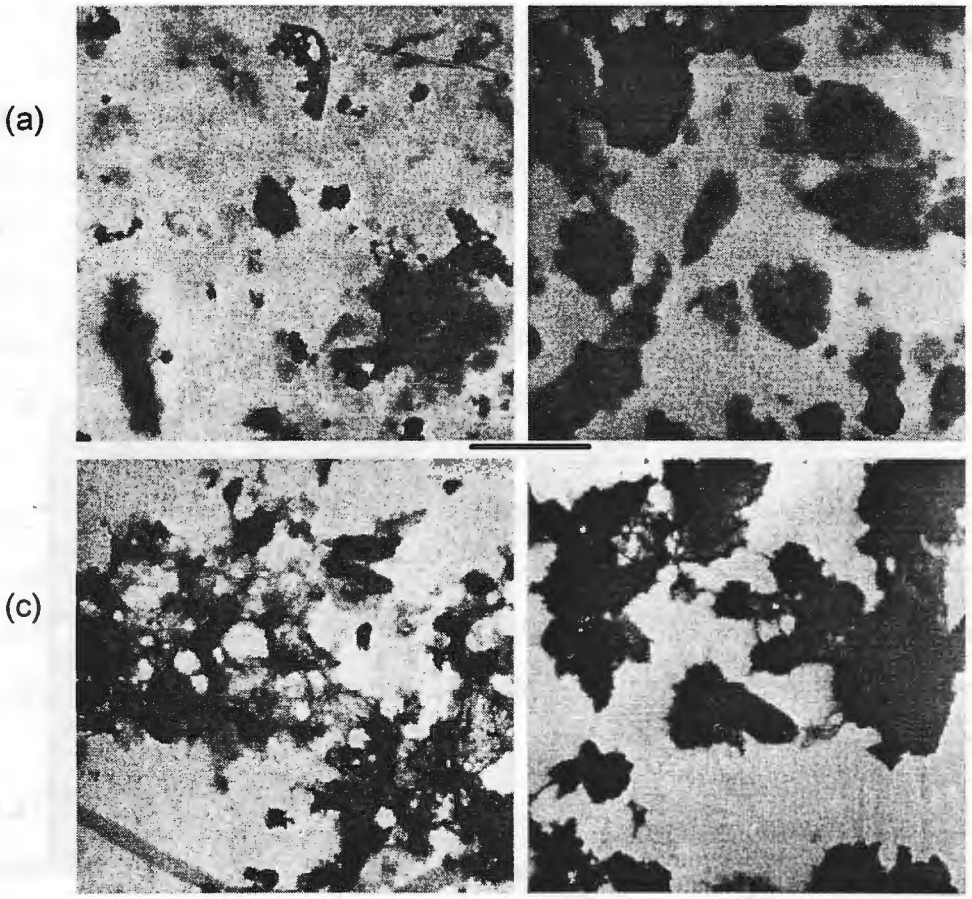
La seconde séquence de centrifugation a permis de séparer les particules à proprement parler (>0.45μm) et les microparticules. Ces dernières ont été récupérées sur les grilles de microscopie et visualisées par TEM.

Dans l'horizon organique (O), les entités organiques sont clairement reconnaissables comme des objets de densité électronique faiblement plus élevée que le support de spécimen (collodion et carbone; fond gris, Figure 8.6a), en comparaison aux microparticules minérales fortement opaques et présentant une frontière nette avec le milieu (particules noires).

Alors que l'horizon E contient seulement des microparticules minérales ayant souvent une forme géométrique marquée (critère qualitatif de cristallinité), les horizons BP et en particulier le BPh présentent nettement des réseaux de matière organique de structure spongieuse, associées à des colloïdes minéraux. Ces réseaux sont de dimension largement supérieure à 0.45μm, ce qui est probablement dû au fait que la densité ρ_{MO} est inférieure au $\rho_{moyen}=2.5 g/cm^3$ estimé. La matière

organique se retrouve dans le surnageant de l'ultime étape de fractionnement et est récupérée sur les grilles TEM lors de l'ultracentrifugation.

Figure 8.6 : *Photos TEM des colloïdes dans les suspensions du sol, pour les différents horizons; (a) horizon O, (b) horizon E, (c) horizon BPh, (d) horizon BPs.*



De par sa faible densité électronique, la matière organique naturelle est généralement difficile à visualiser par TEM et requiert un marquage avec un produit riche en électrons (sel d'uranium ou de tungstène, rouge de ruthénium) afin d'augmenter son contraste. Dans le cas du sol, la matière organique apparaît suffisamment contrastée, sans marqueur; ce fait s'explique par la présence en grande concentration de cations (aluminium, calcium, fer) complexés ou adsorbés sur la matière organique.

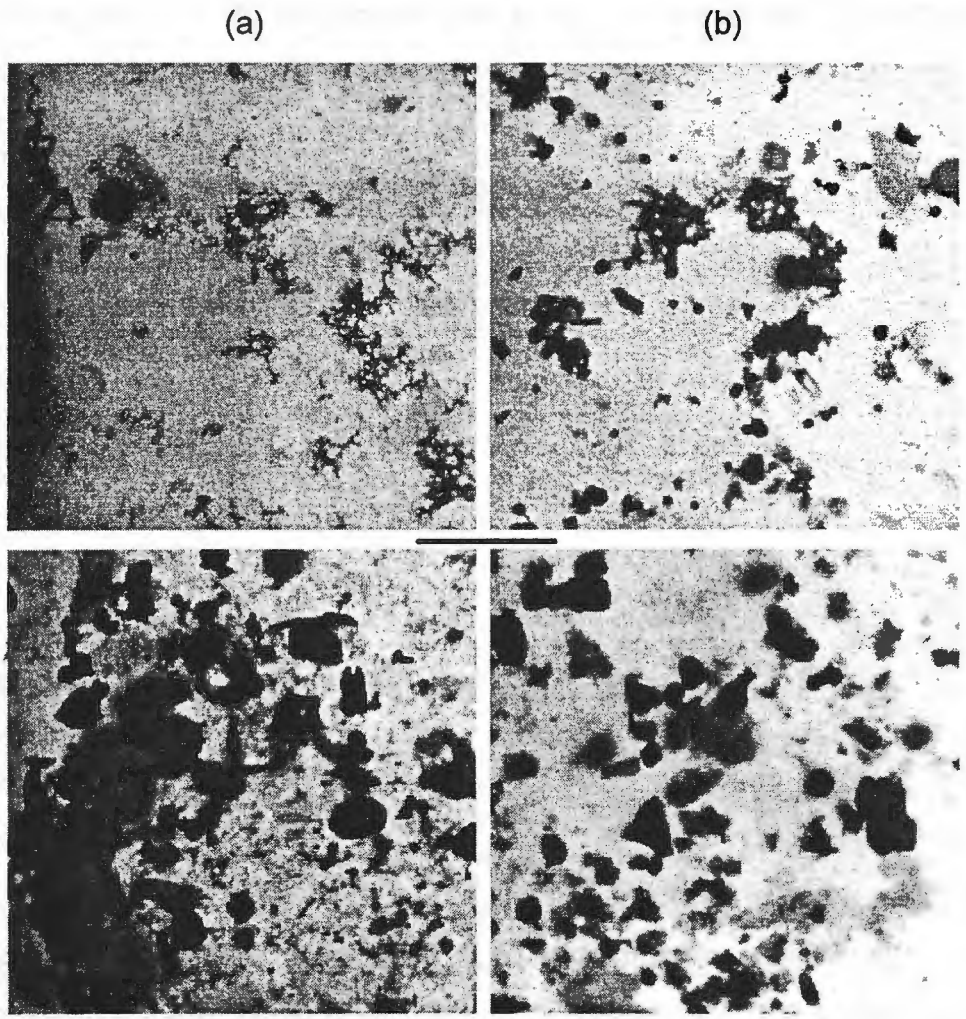
8.4.1.3 Eau de percolation

Les colloïdes minéraux de l'eau de percolation (Figures 8.7a-d) sont présents principalement sous forme de particules individuelles et non pas sous la forme d'agrégats. Dans l'échantillon provenant du lysimètre placé sous l'horizon O (Figure 8.7a), les microparticules sont présentes sous diverses formes, soit associées à la surface de réseaux organiques, soit individuelles; cependant, leur nombre est relativement faible dans cet échantillon, en comparaison des horizons E, BPh et BPs.

La fraction des eaux lysimétriques récupérées sous l'horizon E (Figure 8.7b) contient de la matière organique rarement associée à des colloïdes minéraux. Ces derniers ont des morphologies très variables allant de structures amorphes à des formes parfaitement géométriques (sphères et polygones), ce qui révèle une grande diversité de la cristallinité des particules.

Les eaux lysimétriques placées sous les horizons BPh et BPs (Figures 8.7c et d) ne contiennent que très peu de matière organique, ce qui est assez représentatif des phénomènes observés à l'échelle macroscopique pour l'horizon BPh. Comme les horizons BP sont des horizons d'accumulation, ils sont donc susceptibles de relarguer moins de particules que les horizons supérieurs. Les microparticules de ces deux lysimètres sont observées dans le domaine des tailles comprises entre 10 et 250nm; de plus, elles présentent des structures plutôt amorphes selon une appréciation morphologique.

Figure 8.7 : *Micrographies TEM des colloïdes des suspensions de lysimètres, pour les différents horizons; (a) horizon O, (b) horizon E, (c) horizon BPh, (d) horizon BPs.*



En conclusion, l'analyse morphologique TEM effectuée sur les différents horizons du podzol, préparés selon trois méthodes différentes, permet de mettre en évidence les similitudes et disparités existant entre les différents horizons. Cependant, l'applicabilité de ces voies de préparation dépend des paramètres recherchés. L'utilisation de la centrifugation du sol afin de récupérer l'eau interstitielle a été développée dans le but d'analyser les métaux traces en solution dans le sol.

Néanmoins, il s'avère que cette technique n'est pas particulièrement adaptée à l'étude de la phase colloïdale. En effet, les particules ainsi récupérées ne représentent qu'une infime partie de celle-ci.

La mise en suspension du sol suivie de centrifugations séquentielles est parfaitement adaptée à la préparation des spécimens. Cependant, d'un point de vue environnemental, ce traitement génère une information sur l'ensemble des colloïdes du sol et ne permet en aucun cas de discriminer les particules susceptibles de migrer le long du profil de celles résidant au sein d'un horizon. Les lysimètres placés entre les horizons ne permettent de récupérer que la phase mobile du sol et ses colloïdes associés. Les centrifugations séquentielles qui suivent les préparations de base sont indissociables et permettent d'éliminer (ou de séparer) les particules en fonction de leur densité et de leur taille. L'ultracentrifugation (étape de préparation des spécimens) n'est pas exclusive mais donne accès à l'analyse microscopique de spécimens dont le caractère natif est pleinement conservé. Afin de procéder à une caractérisation complète des colloïdes, il est cependant nécessaire d'avoir recours à une analyse physico-chimique à l'échelle de la particule individuelle.

8.4.2 Analyse physico-chimique des colloïdes pédologiques par EF-TEM

Cette partie de l'étude a pour objet de démontrer l'applicabilité de l'analyse EELS à des échantillons de sol. C'est dans cette optique que des exemples particulièrement démonstratifs seront présentés.

Suite aux observations morphologiques et en regard des considérations exposées ci-dessus, seuls les spécimens TEM de microparticules extraites de la suspension du sol ont été étudiés au niveau physico-chimique par EELS et ESI. En effet, la taille (idéale pour l'analyse EELS) des colloïdes extraits par mise en suspension du sol et la représentativité morphologique macroscopique et microscopique révélée par cette approche préparative justifient largement son utilisation exclusive (Keller, 1996).

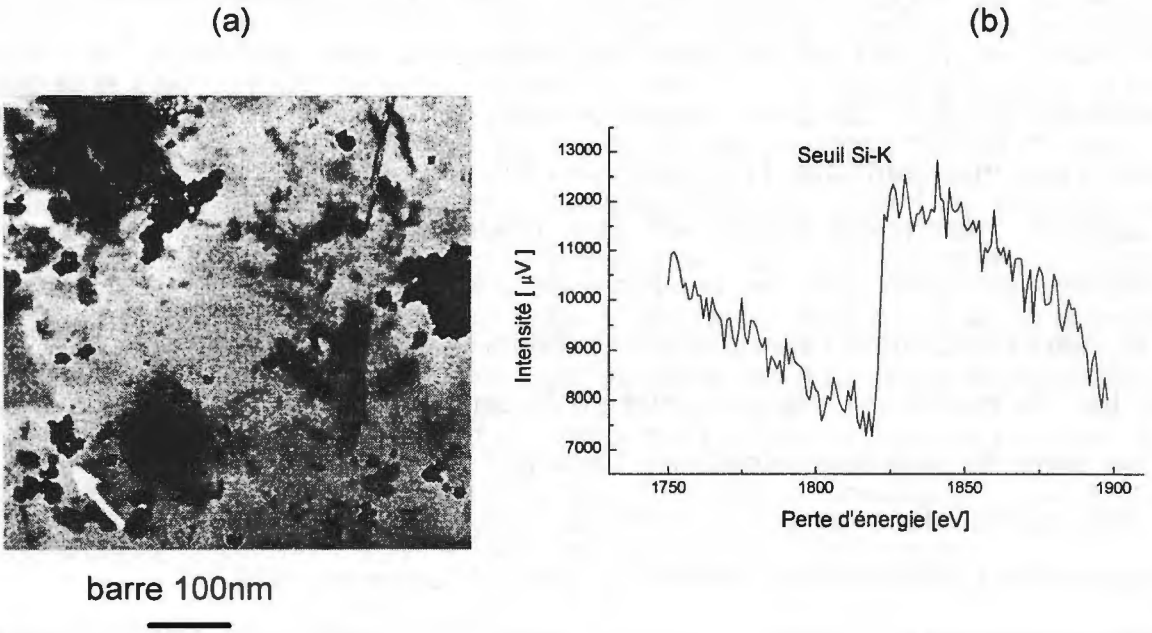
8.4.2.1 Horizon organique O

L'analyse globale du sol (Tableau 8.1) indique que l'horizon O est principalement composé de matière organique (42% de C) et d'oxyde de silicium (157g/kg de sol (Keller, 1994)). Les autres composants sont en très faibles concentrations (5g de Fe_2O_3 / kg de sol et 25g d'Al_2O_3 / kg de sol). Ces caractéristiques permettent de cibler l'étude des microparticules sur le silicium présent en grande concentration. Par cette approche, l'étude ne peut pas être exhaustive mais permet d'obtenir une analyse par EELS et ESI d'une grande quantité de colloïdes, sans rechercher sur chacune des microparticules l'ensemble des éléments qui la composent. L'analyse du carbone, néanmoins présent en plus grande quantité que le silicium, est difficilement réalisable dans les conditions de préparation des spécimens, puisque ces derniers sont déposés sur un support collodion-carbone.

Il est tout de même possible de mettre en évidence les composés organiques par augmentation du contraste du carbone. Cette technique appelée "Contrast Tuning" a été développée dans le domaine de la biologie et adaptée en science de l'environnement pour la matière organique fibrillaire (Lienemann, 1996).

La micrographie du spécimen (horizon O, Figure 8.6a) présente une grande diversité dans la géométrie des colloïdes présents. L'interprétation de cette photo sur la base exclusive de l'analyse morphologique peut donner lieu des conclusions erronées. En effet, même si des microparticules ont des formes différentes, leur composition élémentaire peut être similaire, voire identique. Le spectre EELS (Figure 8.8b) enregistré sur un agrégat de microparticules (Figure 8.8a) présente le seuil d'ionisation K du silicium. Le domaine de perte d'énergie du spectre (1400-2000eV) permet d'infirmer la présence d'aluminium (Al bande K = 1560eV). Les autres microparticules sont de composition similaire; cependant, certaines d'entre elles (de forme polygonale) contiennent de l'aluminium en faible proportion. Cette dernière remarque est basée sur une évaluation qualitative du rapport d'intensité des signaux EELS de Si et d'Al.

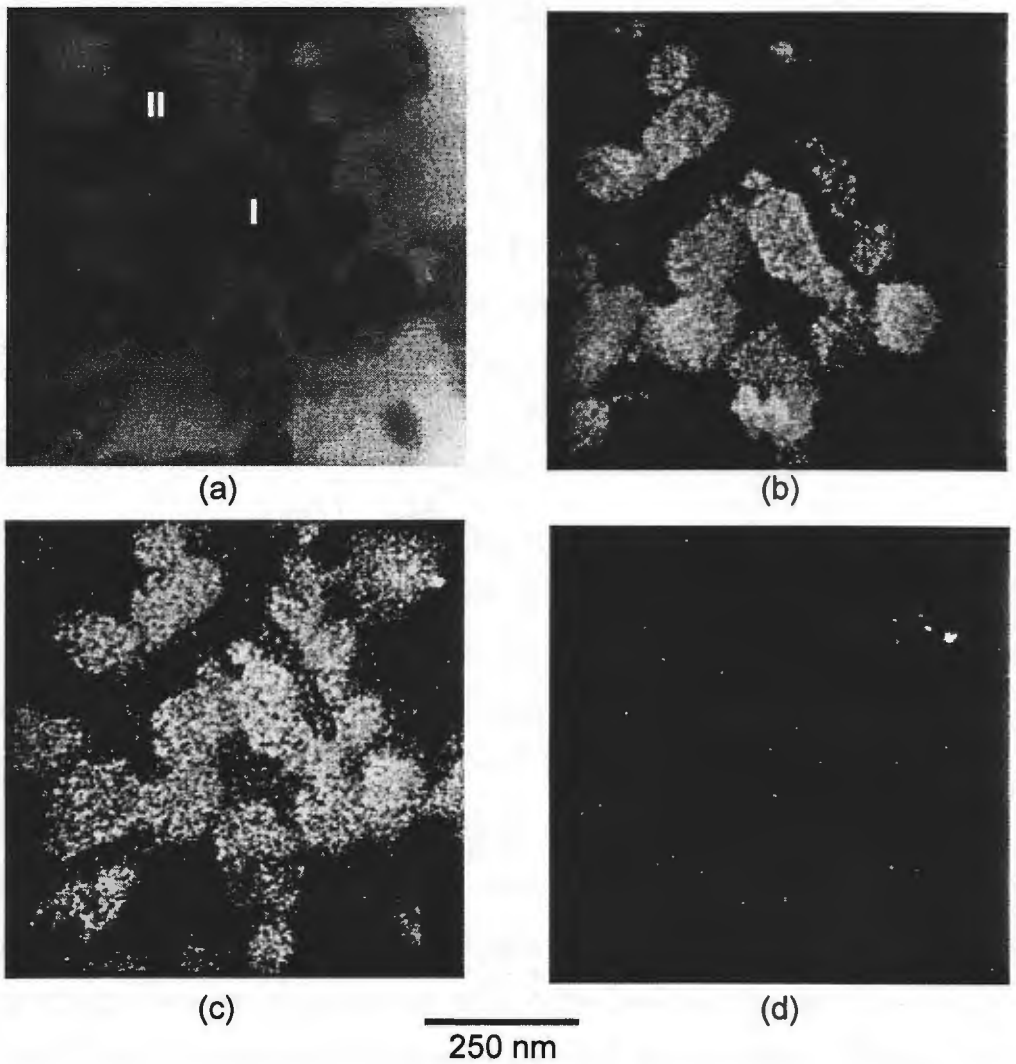
Figure 8.8 : *(a) Micrographie TEM et (b) spectre EELS du Si présent dans un agrégat de l'horizon O.*



8.4.2.2 Horizon de lessivage E

La Figure 8.9a est l'image TEM de la zone analysée par ESI du silicium (Figure 8.9b), de l'aluminium (Figure 8.9c) et du fer (Figure 8.9d). Ces cartes élémentaires permettent de localiser les éléments sur chacune des microparticules. L'image ESI du fer, particulièrement spectaculaire, montre que seul un agrégat ou une particule individuelle de dimension proche de 10nm, sur l'ensemble de la surface analysée, contient cet élément. De plus, cette entité présente une quantité nettement plus importante d'aluminium que de silicium (comparaison des Figures 8.9b et 8.9c), contrairement aux autres entités qui sont principalement des alumino-silicates. Il n'existe pas dans cette zone analysée de colloïdes composés uniquement de silicium.

Figure 8.9 : *(a) Micrographie TEM, (b) ESI du Si, (c) ESI de l'Al, (d) ESI du Fe dans l'horizon E.*

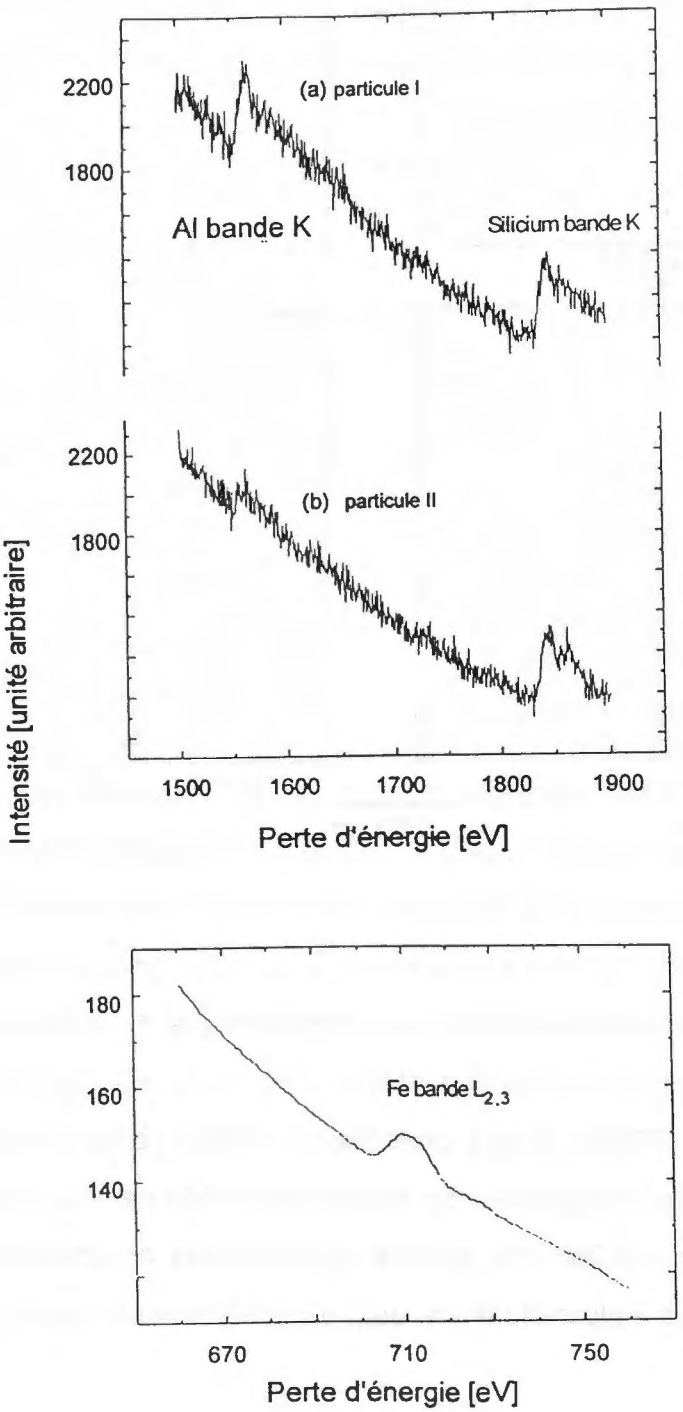


Les spectres EELS des microparticules ou agrégats I et II sont présentés dans la Figure 8.10a.

Grâce aux spectres EELS, il est possible d'accéder à des informations plus détaillées qu'en ESI. Le spectre de la Figure 8.10a a été enregistré sur la microparticule I (Figure 8.9a). Ce spectre présente un pic de silicium d'intensité équivalente à celui de l'aluminium ce qui, qualitativement, permet de classer la

microparticule dans la famille des alumino-silicates dont le rapport Si / Al est proche de 1. L'analyse (Figure 8.10b) de la microparticule II montre qu'elle appartient plutôt à la classe des argiles dont le rapport Si / Al est proche de 2. La faible intensité du signal du fer indique une faible concentration de fer présent dans cet agrégat (Figure 8.10c).

Figure 8.10 : *spectres EELS de colloïdes présent dans l'horizon E et identifiés dans la Figure 8.9a; (a) Si/Al dans la particule I, (b) Si/Al dans la particule II et (c) du fer.*



8.4.2.3 Horizons d'accumulation BP

Les colloïdes organiques provenant des horizons BPh et BPs sont visualisables grâce à la présence de matière minérale adsorbée/complexée sur leur surface (Figure 8.11a). La composition élémentaire de ces horizons (analyses globales) indique une concentration en oxyde de fer (25g/kg de sol dans BPh et 22g/kg de sol dans BPs) et en oxyde d'aluminium (119g/kg de sol dans BPh et 121g/kg de sol dans BPs) qui est ~10 fois supérieure à celle rencontrée dans l'horizon O. Le silicium reste constant sur le profil dès l'horizon E et jusqu'à l'horizon C.

Le marquage de la matière organique peut être dû à des concentrations relativement élevées en fer et en aluminium dans le milieu. L'analyse ESI permet de déterminer quels éléments sont présents sur la matière organique.

8.4.2.3.1 Horizon humique

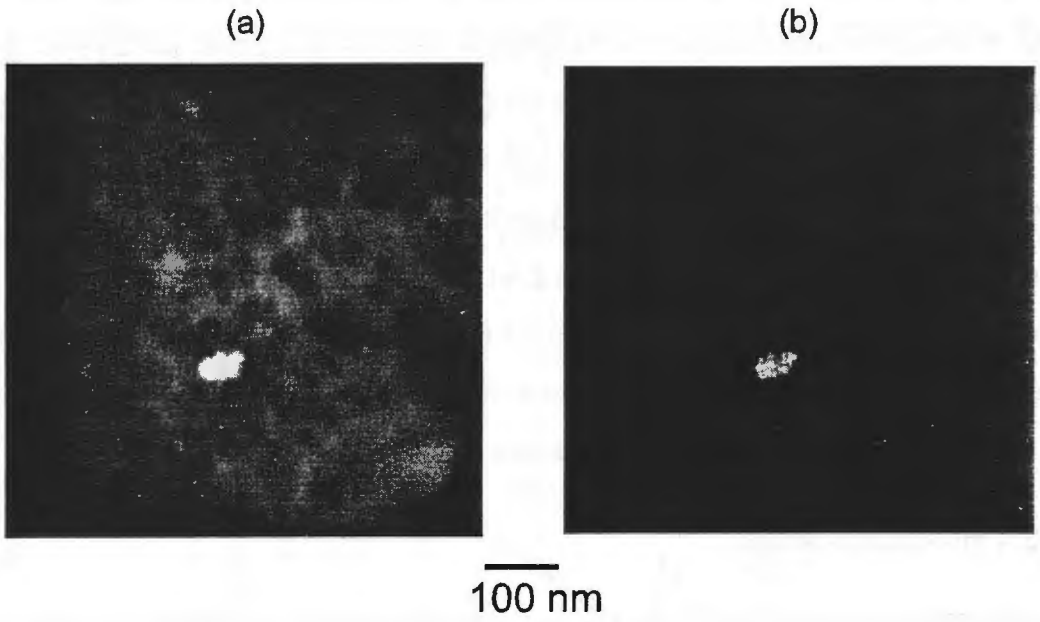
L'horizon BPh contient des entités organo-minérales de structure spongieuse dont l'analyse permet de révéler la teneur en fer. L'image élémentaire du fer (Figure 8.11b) confirme effectivement l'interaction (adsorption et/ou complexation) entre la matière organique et les particules minérales (composée ici principalement de fer) présents dans le sol.

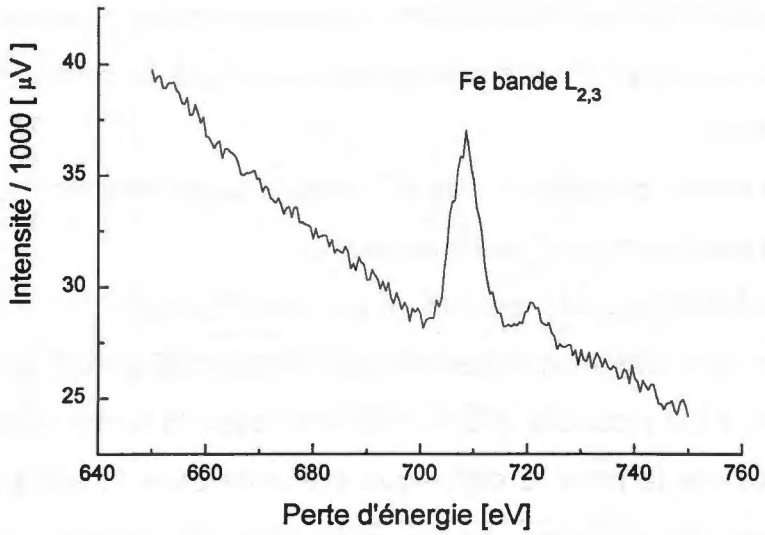
Les analyses des autres constituants de ces entités organo-minérales ont démontré que le silicium et l'aluminium sont aussi présents.

Le fer, présent en faible quantité, produit un spectre (Figure 8.11c) dont le signal est relativement faible, en comparaison de celui de l'hématite (Figure 6.3a).

Dans le cas du fer, il est probable que cet élément, sous la forme dissoute et réduite Fe^{2+} soit complexé par la matière organique présente dans le sol, puis s'oxyde en oxyhydroxydes qui feront alors partie intégrante de l'entité organo-minérale résultante (Buurman, 1987; Farmer, 1987). Ce mécanisme a aussi été observé en laboratoire (oxydation de Fe^{2+} en présence de polysacharides) et dans les milieux aquatiques (Lienemann, thèse en préparation).

Figure 8.11 : *(a) Micrographie TEM, (b) image ESI du fer, (c) spectre EELS du Fe dans des colloïdes organiques de l'horizon BPh.*





8.4.2.3.2 Horizon sesquioxyde

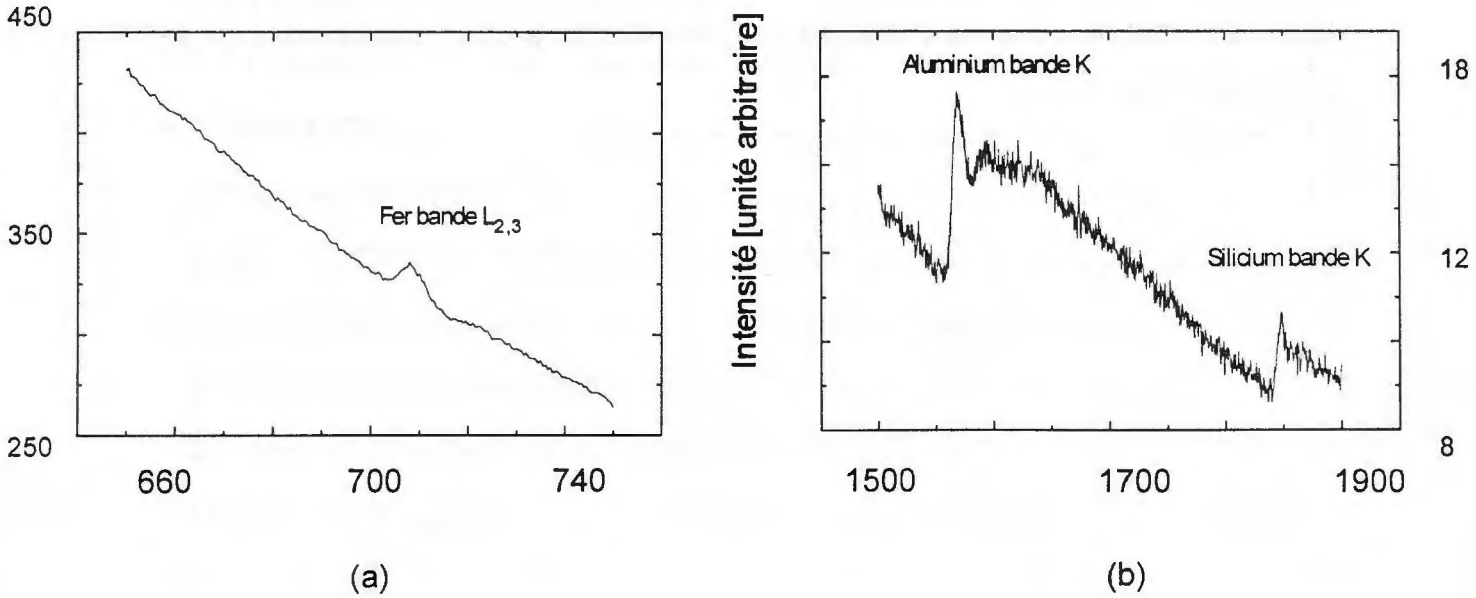
Entre autres résultats, l'image ESI du silicium (Figure 8.12b) montre distinctement la localisation de cet élément sur toute la surface des réseaux organiques. Les microparticules minérales associées à ces entités sont aussi principalement composées de silicium.

Figure 8.12 : *(a) Micrographie TEM, (b) ESI du silicium associé à la matière organique de l'horizon BPs.*



Les spectres EELS enregistrés sur ces réseaux montrent qu'il existe d'autres éléments tel que le fer et l'aluminium qui y sont associés en quantités suffisantes pour marquer la matière organique. Cependant, le spectre du fer (Figure 8.13a) présente un signal assez peu intense, comme observé dans l'horizon BPh. Le silicium, comme lors de l'analyse ESI, présente un signal EELS très marqué.

Figure 8.13 : *Spectres EELS (a) de Fe, (b) d'Al et de Si dans les colloïdes de l'horizon BPs.*



8.5 COROLLAIRE

L'étude microscopique effectuée sur les différents horizons du podzol a permis de mettre en évidence une concentration élevée en nombre de microparticules. Ces dernières présentent des formes très différentes (géométriques ou non) au sein même des horizons et à l'interface de ceux-ci (échantillons de l'eau lysimétrique). L'extraction de microparticules d'origine pédologique par centrifugation d'un sol mis en suspension permet d'obtenir des spécimens TEM de manière simple et représentative de la suspension étudiée. En revanche, la méthode de centrifugation pour la récupération des eaux interstitielles (Keller, 1995) produit des artefacts de fractionnement : seules les microparticules de petite taille sont extraites, comparativement à celles extraites de la suspension de sol, ou à celles obtenues dans les eaux lysimétriques qui contiennent aussi bien les petites que les plus grandes (<45μm).

L'analyse morphologique des colloïdes (TEM conventionnel) produit des informations sur leur structure, leur taille, leur nature et leurs interactions, mais ne permet pas de connaître leur composition élémentaire. D'autre part, les résultats de l'analyse élémentaire des différents horizons démontrent l'applicabilité de la spectrométrie EELS et ESI à des échantillons naturels. Il est dès lors possible d'utiliser cette technique pour l'analyse des colloïdes naturels, dans les limites de tailles (d'épaisseurs) définies sur les colloïdes modèles et aux éléments couramment retrouvés dans les sols et dans les différents compartiments de l'environnement. Néanmoins, cette spectrométrie ne se limite pas aux éléments analysés dans cette étude. En effet, le domaine d'analyse peut être étendu a une gamme allant de Z=1 à Z=92 (Ahn, 1983).

9 ETUDE DE COLLOÏDES D'UN KARST AQUIFÈRE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ANALYTIQUE

9.1 APPROCHE ENVIRONNEMENTALE 108

9.2 CARACTÉRISTIQUES DU SITE ÉTUDIÉ 109

9.2.1 SITUATION GÉOGRAPHIQUE 109

9.2.2 GÉOLOGIE DU SITE 110

9.2.3 PÉDOLOGIE 111

9.2.4 HYDROGÉOLOGIE 112

9.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES 112

9.3.1 ANALYSES GLOBALES DE LA SOLUTION 113

9.3.2 ANALYSES DES PARTICULES INDIVIDUELLES 114

9.4 RÉSULTATS 115

9.4.1 ANALYSES GLOBALES 115

9.4.2 ANALYSES DES PARTICULES INDIVIDUELLES 116

9.5 DISCUSSION 133

9.5.1 POINT DE VUE ANALYTIQUE 133

9.5.2 POINT DE VUE ENVIRONNEMENTAL 136

9.6 COROLLAIRE 138

9 ETUDE DE COLLOÏDES D'UN KARST AQUIFÈRE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ANALYTIQUE

9.1 INTRODUCTION

Les régions calcaires, telles que le Jura, présentent généralement des reliefs karstiques (aussi appelés reliefs calcaires) formés par la dissolution aqueuse des carbonates de calcium. Les eaux souterraines et les eaux de surface participent à cette érosion qui produit entre autres des dolines, des grottes, des vallées sèches ou aveugles. A la surface de ces reliefs calcaires, des strates de différents types de sédiments se sont accumulées et forment ainsi une couche plus ou moins imperméable. Ce sédiment est à son tour couvert de dépôts glaciers et/ou de sol, comme, par exemple pour le site étudié, des tourbières.

9.1.1 APPROCHE ENVIRONNEMENTALE

Les transports de matière particulaire dans les régions karstiques sont principalement gérés par la spécificité du karst, par exemple l'existence de soudaines et importantes variations de relargage de colloïdes (Kiraly, 1988). Ces variations sont principalement dues à un système hydrique dans lequel deux réseaux fonctionnent en parallèle (voir chapitre 9.2.4). Comme dans les autres systèmes aquatiques (lacs, rivières; Buffle, 1993), les particules présentes dans les eaux souterraines ou de surface jouent un rôle important dans le transport des micropolluants en raison de leur grande surface spécifique et de leur concentration élevée en nombre, (Perret, 1994).

De ce fait, leurs caractéristiques physico-chimiques doivent être définies à l'échelle globale de la solution (émission atomique : ICP) et à l'échelle individuelle (SEM-EDS, STEM-EDS et EF-TEM). Le rôle de ces particules est d'autant plus important que leur temps de résidence (dépendant de leur densité, de leur taille et de la vitesse d'écoulement de l'eau en milieu souterrain). Ces deux paramètres (composition et temps de résidence) doivent être reliés afin de comprendre, et par la suite gérer voire prédire, les transferts de matière dans un karst tel que celui étudié.

La microscopie électronique permet d'apporter une information sur la morphologie des particules et, comme présenté dans la partie analytique de ce travail, des renseignements sur leur composition. De ce fait, les résultats présentés ici sont basés principalement sur la microscopie électronique analytique et seront corrélés avec des études menées en parallèle à l'échelle globale de la solution.

Les eaux de surface du bassin versant de la source de la Noiraigue sont chargées de particules organiques (principalement originaires des tourbières) et minérales (dépositions atmosphériques et lessivage des sols) ou encore d'agrégats organo-minéraux qui sont le produit d'associations au sein de la rivière ou lors de leur formation dans le sol. Ces particules et agrégats seront transportés vers l'aquifère soit par le drainage de la rivière du Bied située dans le fond de la vallée soit par les infiltrations sur les anticlinaux la délimitant. Les particules qui peuvent être prélevées à la sortie du karst (source de la Noiraigue) proviennent donc du mélange des eaux du Bied et des flancs de la vallée. Il s'avère actuellement très difficile, voire impossible, de prélever des échantillons d'eaux de percolation alors que les eaux du Bied et de la source de la Noiraigue sont manifestement d'une grande accessibilité. En l'absence de toute possibilité de caractériser et de démontrer la transformation des particules au sein même de l'aquifère, l'analyse portera donc sur ces deux derniers sites, qui constituent d'une part l'une des entrées et d'autre part l'unique exutoire de l'aquifère.

9.2 Caractéristiques du site étudié

9.2.1 Situation géographique

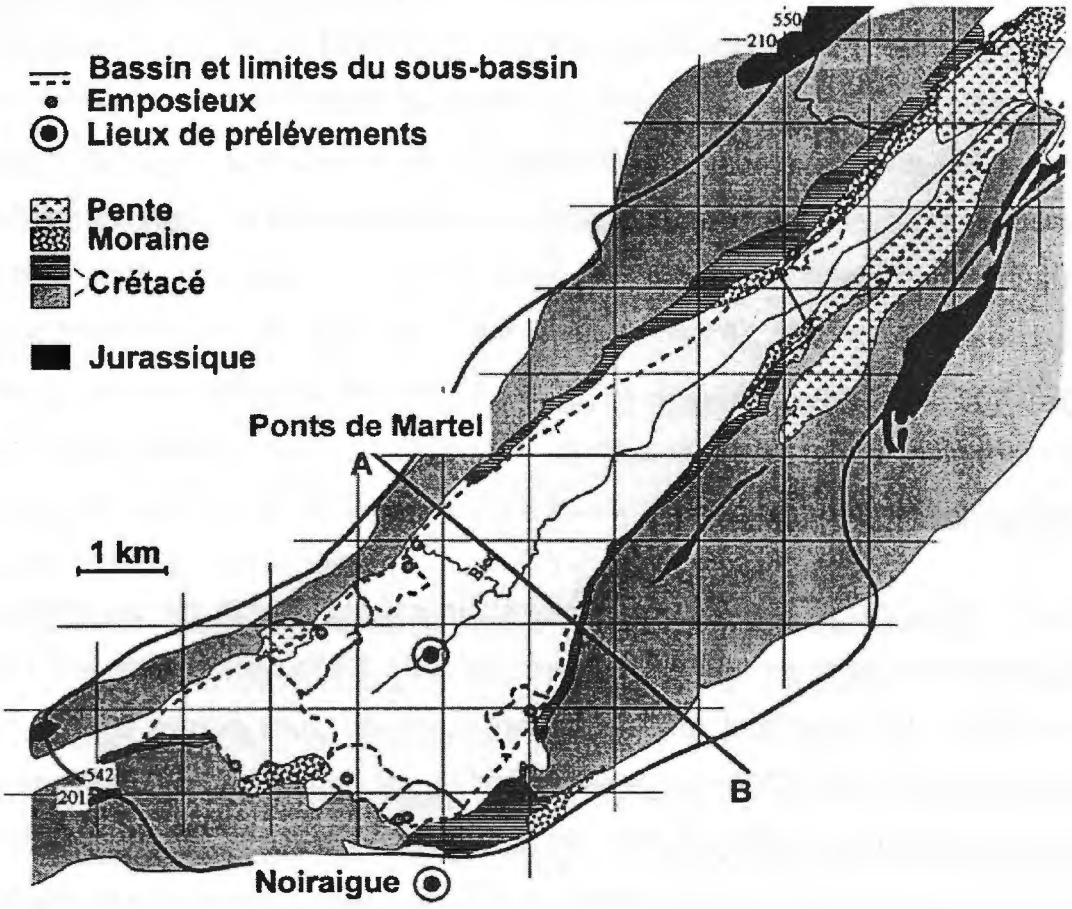
Le bassin versant de la source de la Noiraigue est représenté par la Vallée de la Sagne et des Ponts orientée selon un axe NE-SW. Cette vallée plate est située à environ 20km de Neuchâtel dans les montagnes du Jura suisse à une altitude comprise entre 1000 et 1300m. Elle est délimitée par deux anticlinaux (Figure 9.1a). Le bassin versant du karst aquifère de la Noiraigue s'étend sur une surface de 60km^2 dont 35% représentent la vallée et 65% les flancs calcaires (anticlinaux de chaque côté de la vallée).

9.2.2 GÉOLOGIE DU SITE

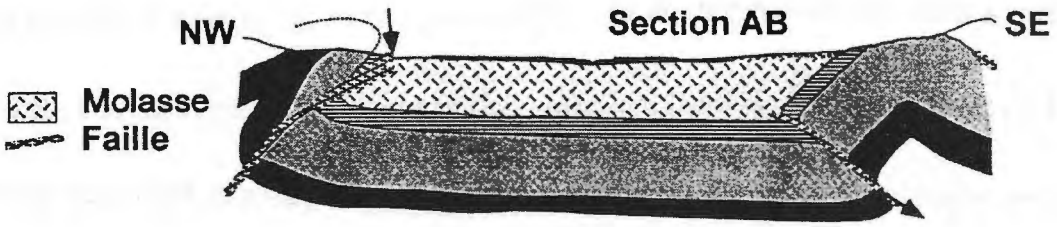
L'ère secondaire, période à laquelle l'ensemble des terres étaient recouvertes d'océans, généra des sédiments calcaires qui s'accumulèrent et formèrent la marne (roche carbonatée mésozoïque).

Au début de l'ère tertiaire, la formation des Alpes et leur érosion créa un dépôt de molasse sur l'ensemble du plateau suisse. De plus, elle engendra des plissements sur le plateau qui donnèrent lieu, à la fin de l'ère tertiaire, à la formation du Jura. La marne était alors recouverte de molasse sur toute sa surface (épaisse d'environ 300m sur ce site, variable d'un endroit à l'autre). L'érosion agit sur les sommets des plis du Jura pour laisser à nouveau la marne apparaître et former ainsi des vallées de molasse dont les flancs érodés sont de type calcaire sous les différents sols (Figure 9.1b).

Figure 9.1 : *(a) Schéma du bassin versant de la Noiraigue.*



(b) *Transect selon la section AB.*



L'ère quaternaire (ère des grandes glaciations), laissa des dépôts morainiques, principalement composés d'argiles. Ces dépôts Würmiens (dernière glaciation, glacier du Würm) contiennent surtout de la kaolinite et sont à la base de couches arables caractérisées par des petites collines, des zones alluviales en forme d'éventails sur les bords de la vallée, des tourbières et des sols brunifiés.
La vallée étudiée est marquée par deux fractures nettes (Figure 9.1b) dont une d'orientation peu courante (NW-SE).

9.2.3 Pédologie

La couverture pédologique du bassin versant de la Noiraigue, selon un profil du Bied vers les anticlinaux, est composée principalement de sols hydromorphes allant de tourbes acides épaisses à peu épaisses jusqu'à des profils de type tourbes minéralisées et, sur les anticlinaux, des sols brunifiés.
Les sols hydromorphes ont pu se développer dans cette région grâce à la présence d'une couche d'argile quaternaire très peu perméable. En effet, cette strate crée un milieu en permanence saturé en eau. Le système devient exclusivement organique (produits de la dégradation des végétaux) et les seules "contaminations" en matière minérale sont d'origine biologique. En raison de la forte anaérobiose qui ralentit considérablement l'activité biologique aérobe, la décomposition de la matière organique fraîche est très lente et incomplète, de sorte que la perte par minéralisation est inférieure aux apports annuels. La couche de matière organique augmente donc chaque année et peut atteindre quelques mètres. Le système évoluera dans ce sens jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint, le milieu devenant plus aéré en surface, ce qui accélère la décomposition (Duchaufour, 1983). Les sols brunifiés sont superposés à la moraine et aux produits de désagrégation des

calcaires. Les profils rencontrés sont de types brun à brun calcique (dans les pentes supérieures à 10%) qui proviennent de la décarbonatation du calcaire de la marne, ou brun à brun lessivé en bas de la pente.

9.2.4 Hydrogéologie

Comme mentionné plus haut, le karst présente un système hydrique double. Le premier, très perméable, consiste en un réseau de fractures qui joue le rôle de drain alors que le deuxième, presque imperméable, est constitué d'une matrice rocheuse. L'infiltration directe des précipitations par les anticlinaux représente l'apport principal de la source. Ces eaux de pluie (les précipitations moyennes durant les 70 dernières années étaient de 1500mm/an) peuvent être retenues dans les nappes aquifères du karst. Dans le cas étudié, il existe principalement deux nappes (Figure 9.1b). La première (le Malm), la plus importante, est délimitée en sa partie supérieure par de la molasse et repose sur une assise marneuse. La deuxième (formation crétacée), est délimitée par une couche très peu perméable de marnes Argovien.

Dans la vallée, le drainage des eaux de surface et plus particulièrement des tourbières est géré par deux réseaux hydriques; le Petit Bied et le Grand Bied qui se rejoignent pour former la rivière du Bied. Ces eaux s'engouffrent par la suite dans un emposieux.

La source de la Noiraigue située à une altitude de 740m à environ 4km de l'emposieux au niveau des strates du séquanien (placée juste en dessus de la couche de marne) représente la seule sortie pour l'aquifère.

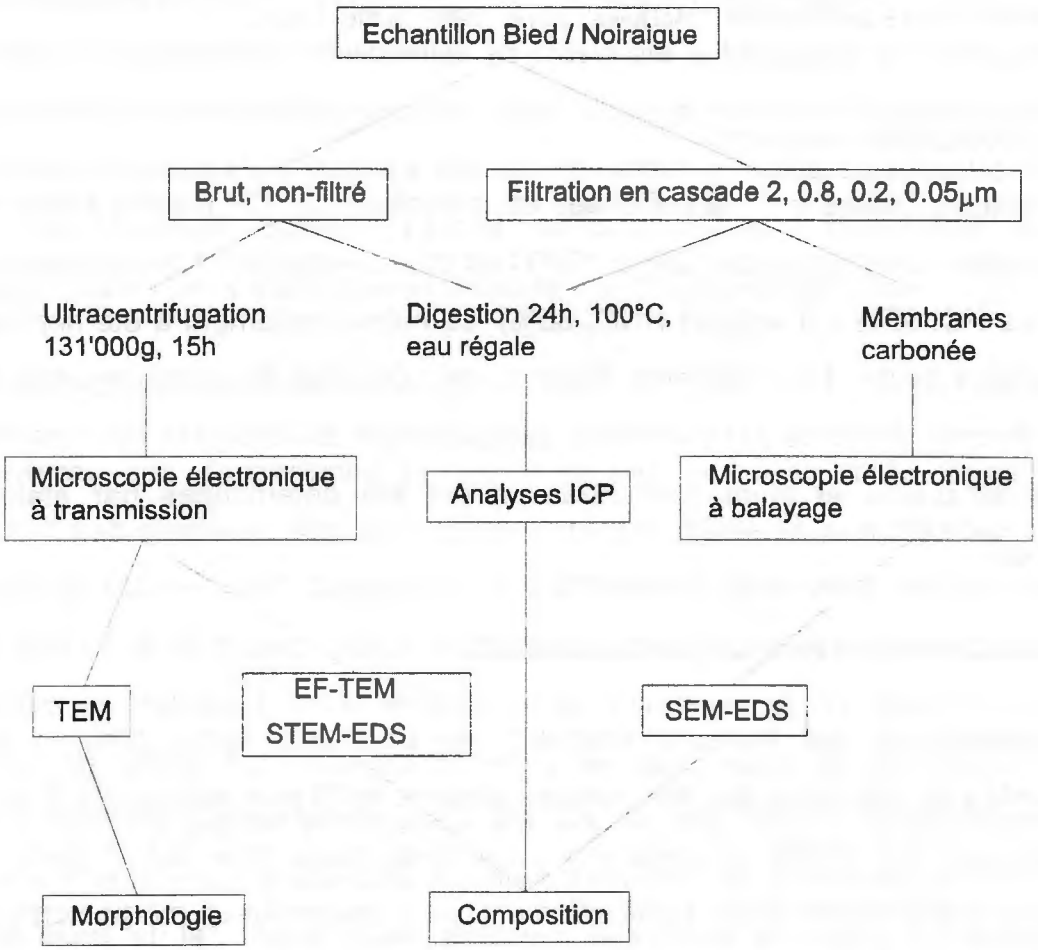
9.3 Matériel et Méthodes

Seuls les microscopes électroniques non cités dans la partie analytique et utilisés ici seront décrits en détails. Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité suprapur; seule l'eau ultrapure, ultrafiltrée et traitée aux U.V a été utilisée comme solvant.

Les échantillons ont été prélevés une fois par mois durant quatre mois. Chacune des quatre campagnes de prélèvements a été traitée de la même manière, tout en conservant au mieux pour la microscopie le caractère natif de la matière en

suspension et en évitant si possible toute contamination pour les analyses globales ou individuelles. Afin de rendre plus clair l'ensemble des traitements appliqués, le schéma suivant présente les différentes étapes.

Figure 9.2 : *Diagramme analytique appliqué aux échantillons.*



9.3.1 Analyses globales de la solution

Les échantillons ont été séparés en deux fractions; la première pour la filtration en cascade et la deuxième pour l'analyse de la suspension brute.

9.3.1.1 Filtration

La fraction brute est filtrée dans un premier temps par gravité (avec une colonne d'eau de 20cm). La suspension passe à travers des membranes Nuclepore® en polycarbonate de porosité décroissante (2, 0.8, 0.2, 0.05µm, Ø 47mm) se succédant de bas en haut le long d'une colonne. Une pression supérieure est imposée au

système pour la filtration à travers la membrane de 0.05μm (Figure 4.3). Le temps de filtration total est de 2 à 4 heures pour récupérer 50ml de chaque fraction.
La filtration est une méthode largement utilisée (Laxen, 1982) et permet de traiter les échantillons directement sur le terrain. Cependant, cette technique induit des erreurs de séparation de taille, dues à des effets de coagulation et d'obstruction des pores de la membrane de filtration (McDowell-Boyer, 1986; Buffle, 1992).

9.3.1.2 Analyses chimiques

Les fractions filtrées ont été prélevées et analysées par ICP (Perkin Elmer Plasma 1000) après digestion durant 24h à 100°C en milieu acide (3 volumes échantillon + 2 volumes HCl 37% + 1 volume HNO_3 65%). Le même traitement a été appliqué à la suspension brute. Les éléments majeurs (Al, Ba, Ca, Fe, Mn, Mg, Na, Si, Sr) généralement présents dans le milieu aquatique ont été analysés pour les fractions filtrées et brutes et leurs concentrations ont été déterminées par étalonnages externes.

9.3.2 Analyses des particules individuelles

Les membranes sur lesquels reposent les particules après filtration ont été découpées et déposées sur des porte-spécimens SEM puis recouverts d'un film de carbone afin de rendre le spécimen conducteur, sans pour autant perturber les mesures élémentaires EDS. Habituellement, pour les analyses morphologiques, les spécimens SEM sont couverts d'un film d'or (bien meilleur conducteur que le carbone). Les membranes de filtration ont été analysées par microscopie à balayage (Jeol JSM-35, 20keV) pour la détermination de la morphologie des particules et de leur composition par EDS à l'aide d'un détecteur Si(Li) (Link) couplé au microscope.
Les spécimens TEM des suspensions brutes ont été préparés par ultracentifugation directe des particules sur des grilles de cuivre (chapitre 5.2). Les micrographies donnant accès à la morphologie des particules de ces suspensions ont été obtenues par microscopie électronique à transmission (Zeiss EM-10). Les analyses élémentaires par STEM-EDS (Jeol TEMSCAN 1200 Ex II, détecteur EDS : PGT; Jeol 2010F, détecteur EDS : Link) et EF-TEM (Zeiss CEM-902) des suspensions brutes

ont été conduites soit en mode spectre (EDS, EELS) soit en mode image (EDS-imaging, ESI) selon les conditions d'analyses déterminées dans la partie analytique.

9.4 Résultats

Les résultats des analyses, qu'ils soient au niveau de la suspension globale (ICP) ou au niveau des particules individuelles (microscopie à balayage ou transmission), sont présentés séparément ci-dessous. Les relations pouvant lier ces techniques d'analyses et les résultats qu'elles produisent seront établies au chapitre 9.5. La dualité des résultats obtenus permet de scinder cette discussion en une interprétation purement analytique et une analyse environnementale.

9.4.1 Analyses globales de la solution

Les mesures des suspensions brutes et filtrées avant et après digestion ne permettent pas d'extraire des corrélations entre les éléments analysés sur chacun des sites de prélèvement. Cependant, les différences observées ou non entre le bassin versant et la source permettent de discriminer les éléments conservateurs (concentration invariante entre le Bied et la Noiraigue) et les éléments dont la concentration diffère significativement entre les deux sites de prélèvement. Les analyses montrent que les éléments Al, Ba, Ca, Mg, Na, Si sont conservateur alors que le Fe et le Mn voient leur concentration diminuer très fortement (de 74 à 97%) entre le Bied et la Source. Contrairement aux deux éléments précédents, la concentration de Sr augmente d'un facteur 1.5 à 2.5. Les filtrats prélevés entre chaque filtre suivent la même tendance que la suspension brute correspondante. D'autre part, les échantillons du Bied subissent une altération importante lors de la digestion acide alors que ceux de la Noiraigue présentent un caractère réfractaire à ce dernier traitement. Généralement les particules qui présentent ce type de réaction face aux digestions sont cristallines. Dès lors, il semble que les particules du Bied sont plus amorphes que celles de la Noiraigue. Cette hypothèse pourra être confirmée ou infirmée par les études morphologiques des colloïdes de ces deux sites.

9.4.2 Analyses des particules individuelles

Les particules individuelles ont été analysées à l'aide de différents microscopes selon des critères de tailles (SEM, STEM ou TEM) et de composition (EDS, EF-TEM).

9.4.2.1 Analyses SEM et SEM-EDS

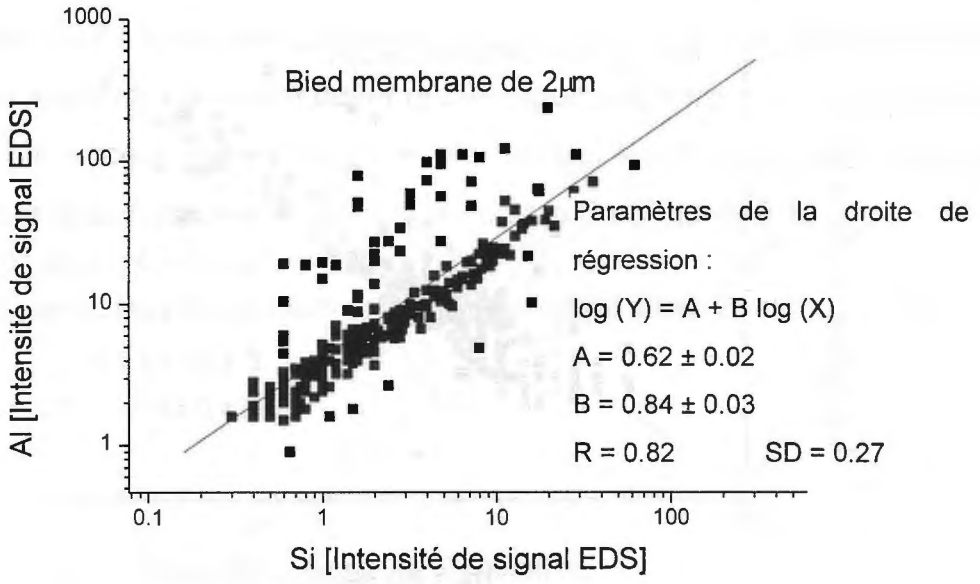
Le microscope à balayage utilisé, couplé à un détecteur EDS, permet de déterminer, dans le cas de nos spécimens carbonés, la composition des particules de taille supérieure à 0.5μm. Cette limitation est fonction du rapport signal / bruit obtenu en EDS; seuls les pics d'émission dont le rapport est >2 permettent d'affirmer la présence de l'élément. Cette limite ne permet d'analyser que les membranes de filtration de porosité 2.0 et 0.8μm, puisque celles-ci discriminent théoriquement les particules >0.8μm. De par la grande variabilité des résultats, les membranes de 0.2μm et 0.05μm, qui représentent la limite de détection pratique atteinte sur le SEM utilisé, n'ont pas été prise en considération.

L'analyse morphologique par SEM des particules récupérées sur les filtres indique que celles-ci ne sont pas nécessairement dans la gamme des tailles attendues, de sorte qu'une quantité non négligeable de colloïdes de taille inférieure à la porosité des membranes sont retrouvées sur ces dernières. Par exemple, sur les filtres de 0.8μm, il n'est pas rare de retrouver des particules de 0.5 à 0.2μm. Cette déviation a été observée dans plusieurs études (Buffle, 1992, Laxen, 1982).

Les analyses élémentaires ont été effectuées sous des conditions d'analyses identiques sur plus de 3000 particules choisies aléatoirement pour les 4 campagnes. Les bandes d'émission des éléments présents dans l'environnement (Mg, Al, Si, P, K, Ca, Ti, Mn, Fe) ont été plus spécialement étudiées (région de 0 à 10keV). Les résultats sont exprimés comme le rapport des intensités d'émission pour les éléments considérés. La surface des filtres analysée est de 25μm^2 pour chaque spécimen.

Figure 9.3 : *Corrélation aluminium/silicium dans les particules individuelles sur les filtres de (a) Bied, 2μm; (b) Bied, 0.8μm.*

(a)



(b)

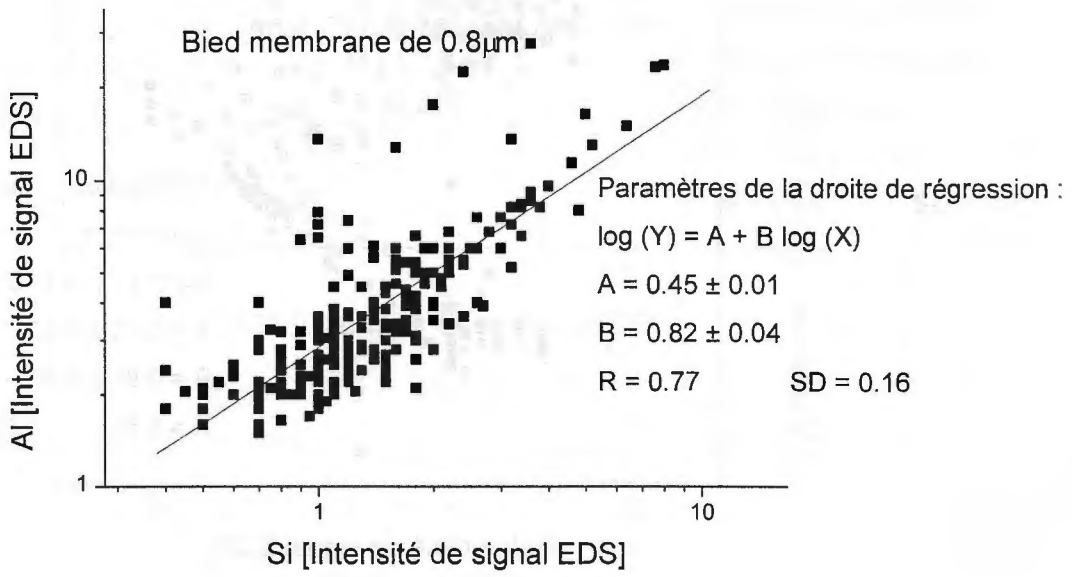
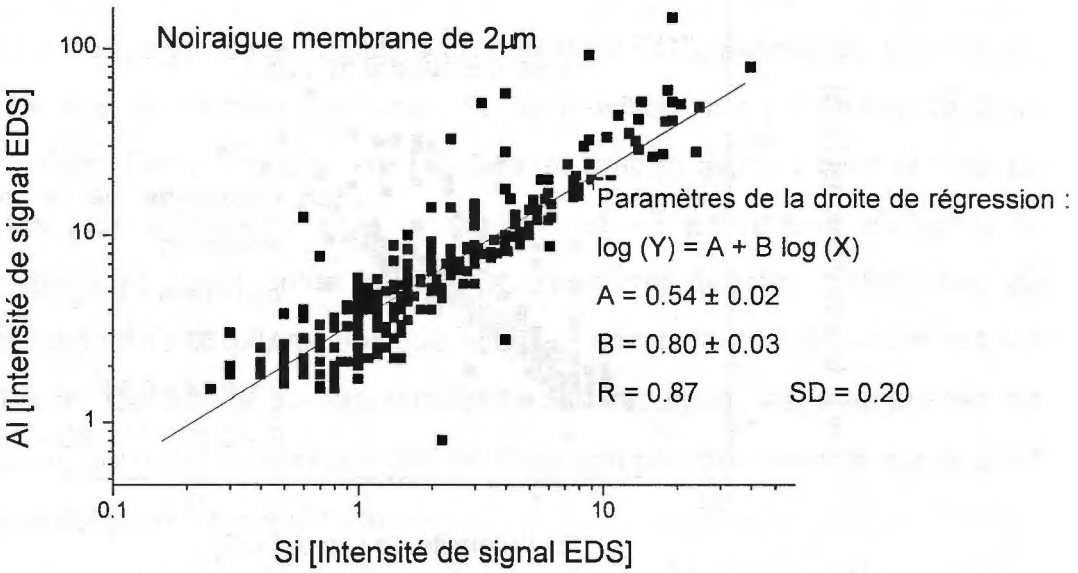
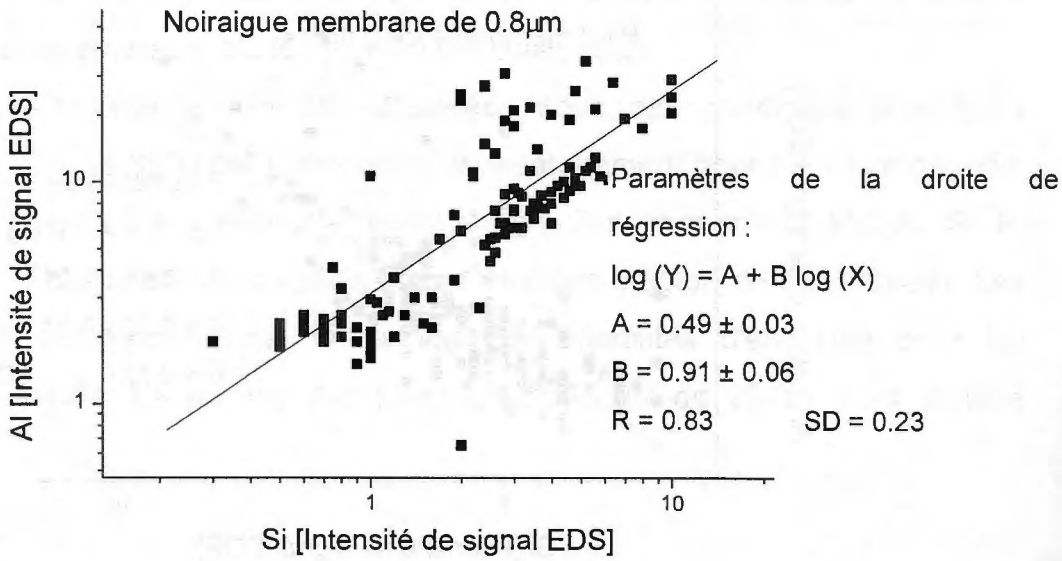


Figure 9.3 : *Corrélation aluminium/silicium dans les particules individuelles sur les filtres de (c) Noiraigue, 2μm; (d) Noiraigue, 0.8μm.*

(c)



(d)



Certains éléments analysés présentent des corrélations soit dans le Bied soit à la source. Le Si et l'Al, que ce soit dans les particules individuelles du Bied ou de la Noiraigue, sont intimement dépendants et ceci pour les membranes de 2 et 0.8μm (Figures 9.3a-d). Cette relation n'est pas surprenante, puisque les argiles sont présentes dans les deux sites de prélèvement. Le Fe et le Ca ne sont pas corrélables pour les membranes de 2μm de la Noiraigue (Figure 9.4c). L'analyse des membranes de 0.8μm, sur les quatre campagnes, ne révèle que quelques particules (1-2 par prélèvement) contenant du fer et du calcium, de sorte que les graphiques ne mettent en évidence aucune corrélation. Par contre, les membranes de 2 et 0.8μm du Bied révèlent nettement un lien entre le Fe et le Ca (Figures 9.4a, b).

Figure 9.4 : *Corrélation fer/calcium sur les filtres de (a) Bied, 2μm.*

(a)

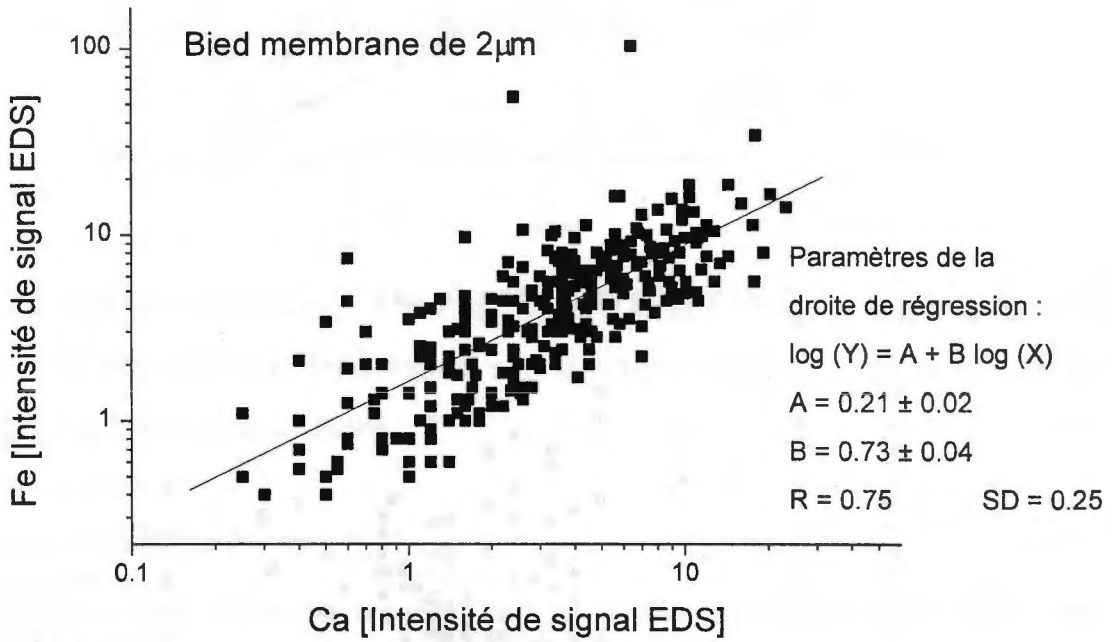
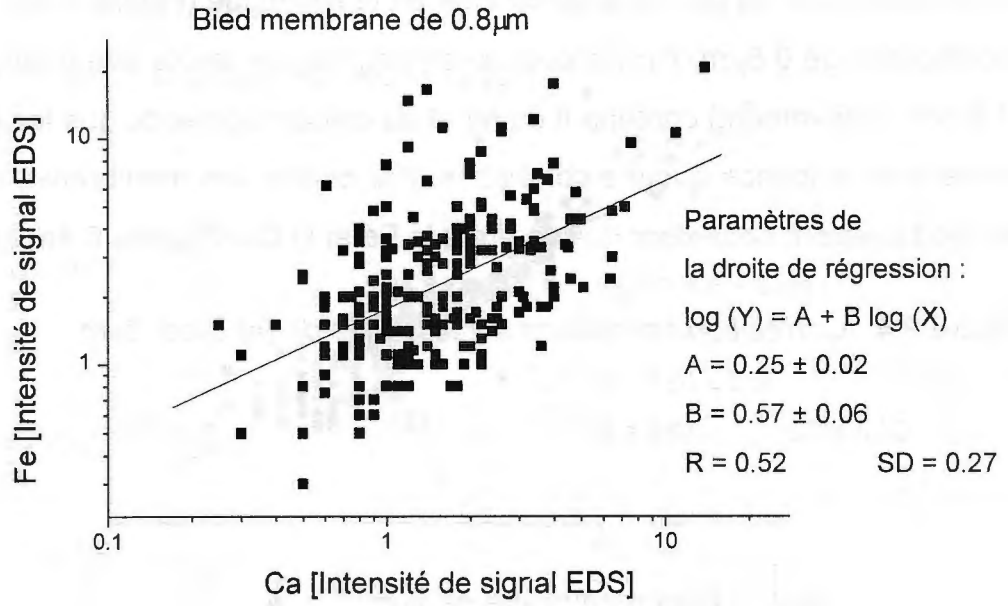
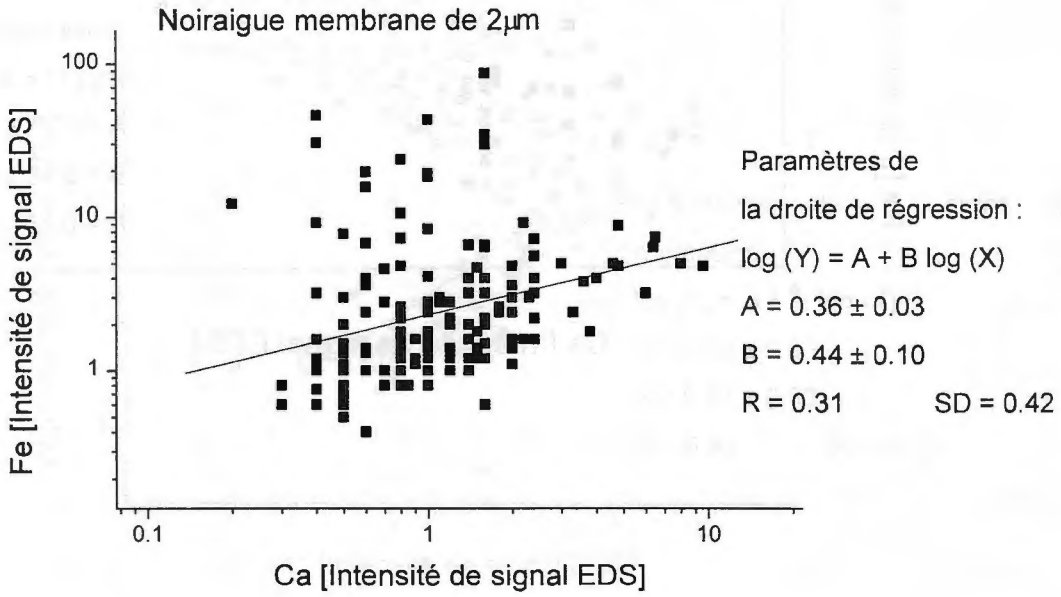


Figure 9.4 : *Corrélation fer/calcium sur les filtres de (b) Bied, 0.8μm (c) Noiraigue, 2μm.*

(b)

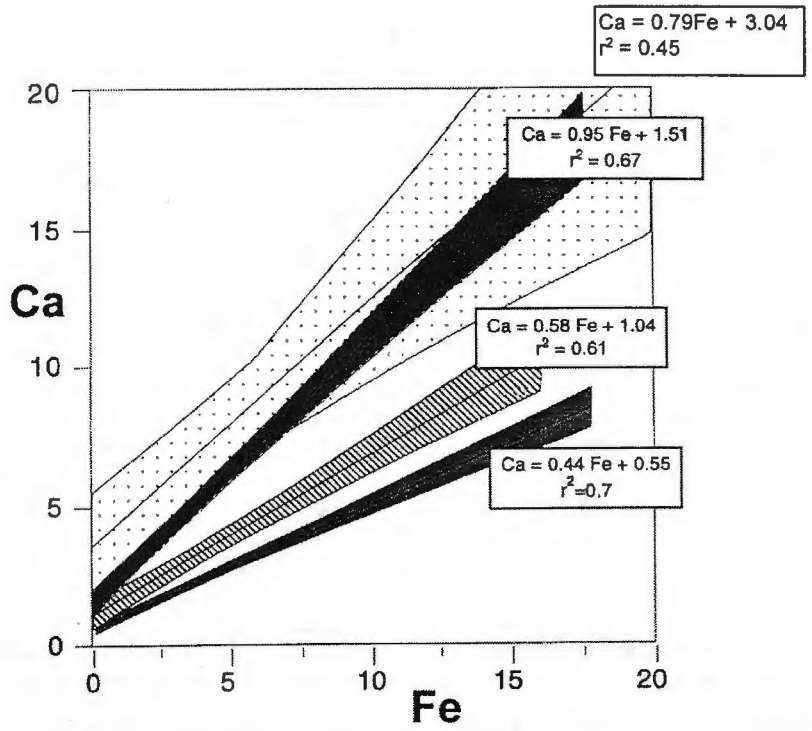


(c)



Dans le Bied, la corrélation Fe/Ca est valable pour toutes les membranes de filtration examinées, mais il s'avère que le rapport entre le fer et le calcium varie d'un prélèvement à l'autre. La Figure 9.5 représente les droites de régression et les intervalles de confiance (95%) obtenus pour les quatre campagnes.

Figure 9.5 : *Corrélation entre le fer et le calcium dans le Bied pour les quatre campagnes de prélèvement.*



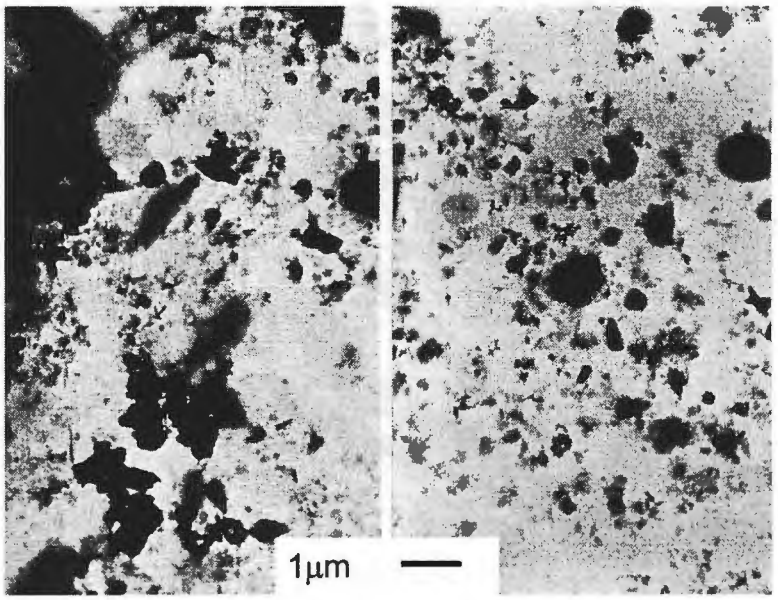
Ces faisceaux démontrent, comme sur la Figure 9.4, la corrélation entre le fer et le calcium, mais ajoutent une information sur la variation du rapport de ces deux éléments d'une campagne à l'autre.

9.4.2.2 Analyses TEM

La morphologie des colloïdes du Bied et de la Noiraigue démontre une nette différence entre ces deux sites. Cette constatation n'était pas envisageable lors de l'analyse SEM en raison de la limite de résolution spatiale du SEM et du carbonnage des spécimens. Le bassin versant contient un grand nombre de colloïdes organo-minéraux qui sont soit de la matière minérale adsorbée sur des fibres ou fibriles de matière organique, soit des particules minérales attachées ou non à des colloïdes organiques. Il est possible d'interpréter ces phénomènes d'adsorption ou

d'agrégation tels qu'ils sont observés sur les micrographies, en tenant compte de la densité électronique des différentes entités dans le spécimen étudié. La matière organique exempte de substances minérales adsorbées n'est pas ou très mal observable par microscopie à transmission, alors que si celle-ci est marquée, naturellement ou en laboratoire, elle devient visualisable.

Figure 9.6 : *Micrographies TEM (a) de colloïdes du Bied, (b) de colloïdes de la Noiraigue.*



La morphologie des colloïdes minéraux donne une information sur leur cristallinité. Par exemple, une particule de géométrie très bien définie (polygone régulier ou irrégulier) aura très probablement une structure cristalline, alors qu'un colloïde de forme peu définie présentera des caractéristiques plutôt amorphes. Ce type d'interprétation peut être appliqué ici. En effet, les particules du Bied sont généralement plutôt amorphes alors que celles de la Noiraigue sont nettement plus cristallines (comparaison des Figure 9.6a et 9.6b).

D'autre part, Il est possible par l'analyse TEM d'établir une première classification de taille en considérant le nombre de particules (par opposition à la concentration généralement utilisée lors d'analyses globales de la suspension). Les grosses particules (>2μm) sont très peu fréquentes alors que la majorité se retrouvent dans la classe inférieure à 1μm, que ce soit pour le Bied ou la Noiraigue. Cette dernière

classe supporte un sous-ensemble qui sera arbitrairement fixé à 0.5μm (Figure 9.7a et b).

9.4.2.3 ANALYSES STEM-EDS

Les particules de la suspension brute déposées par ultracentrifugation sur les grilles ont été analysées par EDS en microscopie à transmission en mode balayage. Les 600 particules étudiées pour le Bied et la Noiraigue ont été classées par taille et par composition (Figures 9.7a et 9.7b). Les trois classes de tailles (>1.0, 1.0-0.5, <0.5μm) ont été choisies selon les critères des observations morphologiques TEM. Seuls les éléments majoritairement présents dans chaque particule ont été considérés pour la classification par composition.

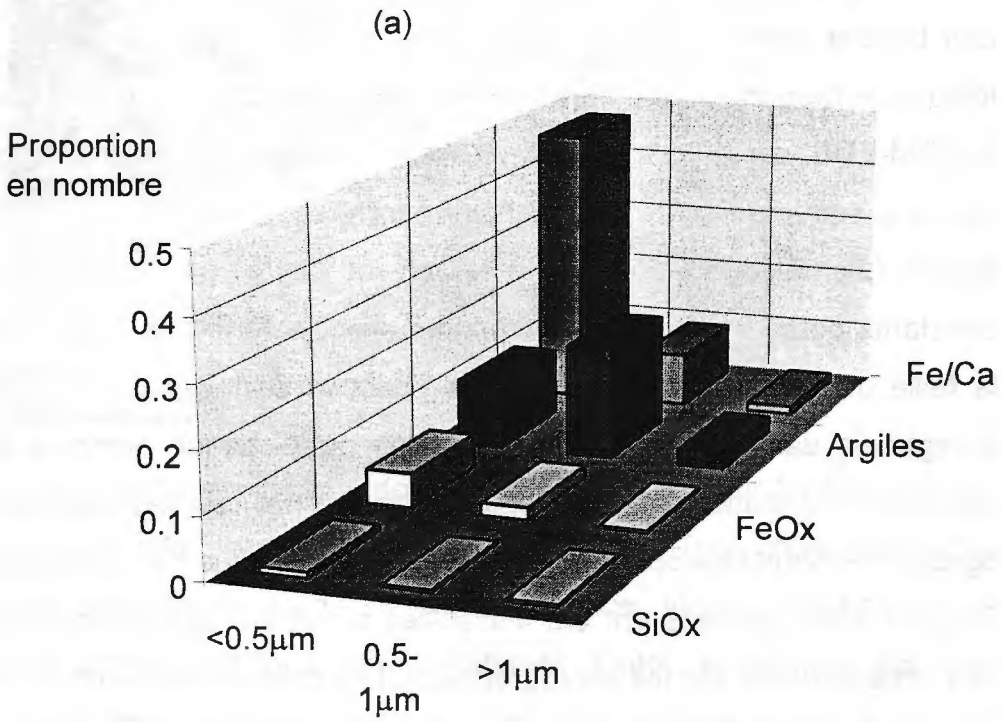
Les bandes d'émission X des éléments présents n'ont été prises en compte que lorsque le rapport signal / bruit était supérieur à 2. La région d'analyse, comme pour le SEM-EDS, a été limitée de 0 à 10keV. Les signaux enregistrés ont été utilisés à des fins semi-quantitatives. Contrairement aux analyses SEM-EDS où la taille de sonde (diamètre du faisceau incident) et l'agrandissement ont été maintenus constants pour l'ensemble des mesures afin d'obtenir des signaux proportionnels à la taille de la particule analysée, les spectres enregistrés en STEM-EDS ont été enregistrés dans les conditions optimales pour chaque particule afin d'extraire la meilleure information sur leur composition. De par ces réglages (taille de sonde et agrandissement), les spectres enregistrés ne sont plus comparables. C'est pourquoi les particules étudiées ont été classifiées selon leur composition (spectre EDS) et leur taille (mesure sur les micrographies). Les diagrammes en trois dimensions où la concentration en nombre de particules est reportée en fonction de la taille et de la composition permettent de visualiser la répartition des particules et leur évolution entre le Bied et la Noiraigue (respectivement Figures 9.7a et b).

Il s'avère que dans le Bied, la majorité des colloïdes (>50% du total) sont dans la classe de tailles <0.5μm et les éléments majoritaires sont le Fe et le Ca. La classe des argiles (Al et Si) est concentrée dans les tailles comprises entre 0.5 et 1.0μm (12% du total, 55% des argiles). Ces deux classes (Fe/Ca, Al/Si) représentent 57% des particules de la suspension brute du Bied. Les 43% restant sont répartis sur

l'ensemble des classes de tailles et de compositions. Les particules d'argile du Bied sont principalement composées, en plus de l'Al et du Si, de K, Ca et Fe.

En effectuant une séparation plus détaillée des particules de fer (Figure 9.8) il est possible de montrer que l'entité Fe/Ca <0.5µm reste majoritaire (35%) et que la plupart des colloïdes (90%) sont majoritairement composés de fer et de calcium. Cette remarque est aisément justifiée par la hauteur, bien supérieure, des bandes d'émission du Fe et du Ca par rapport à celles des autres composants des particules (p.ex. le phosphore, Figure 9.9).

Figure 9.7 : *Classification des particules du Bied en fonction de leur taille et de leur composition (a) Bied, (b) Noiraigue.*



(b)

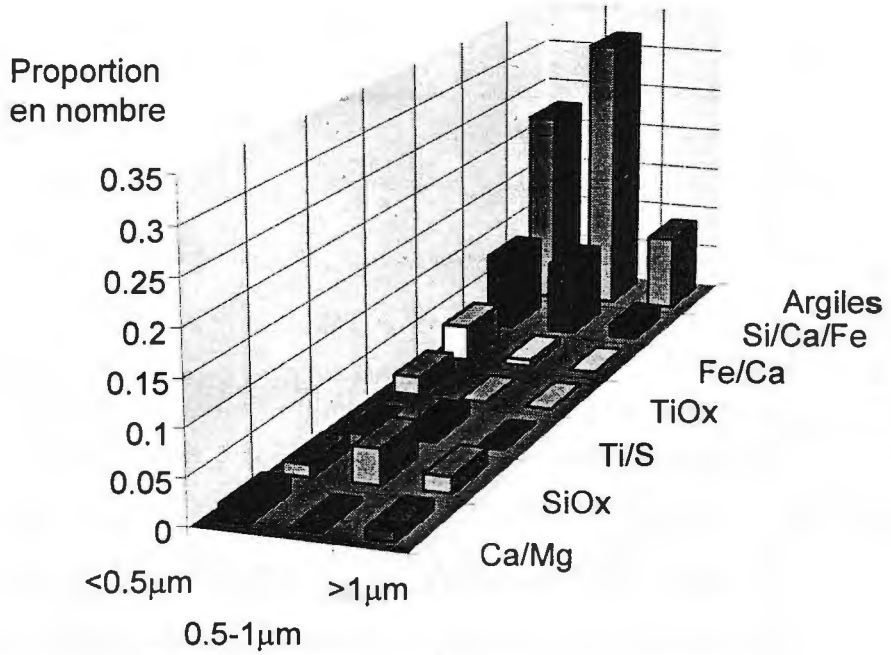


Figure 9.8 : *Classification des particules de fer du Bied en fonction de leur taille.*

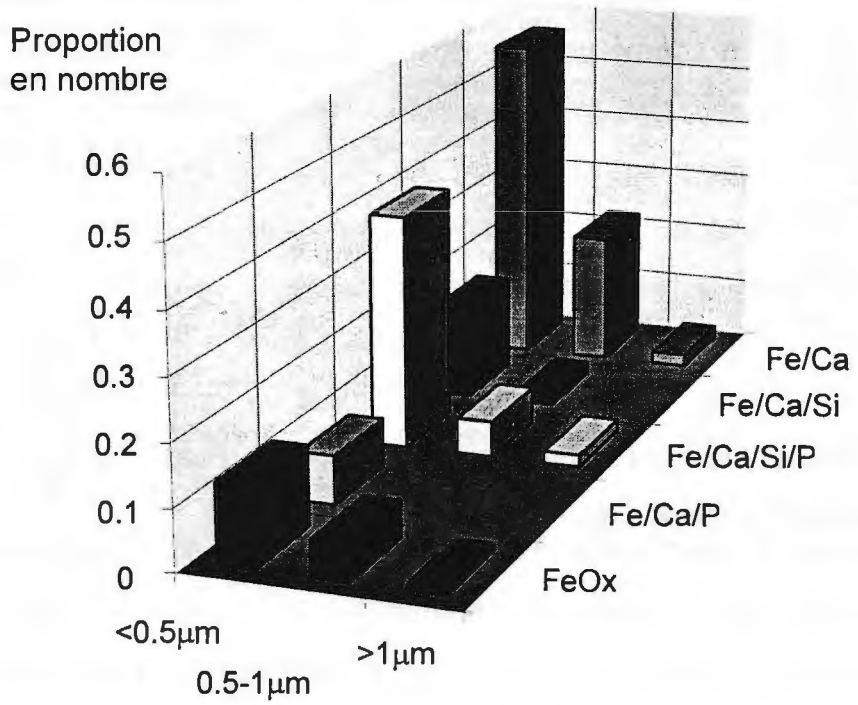
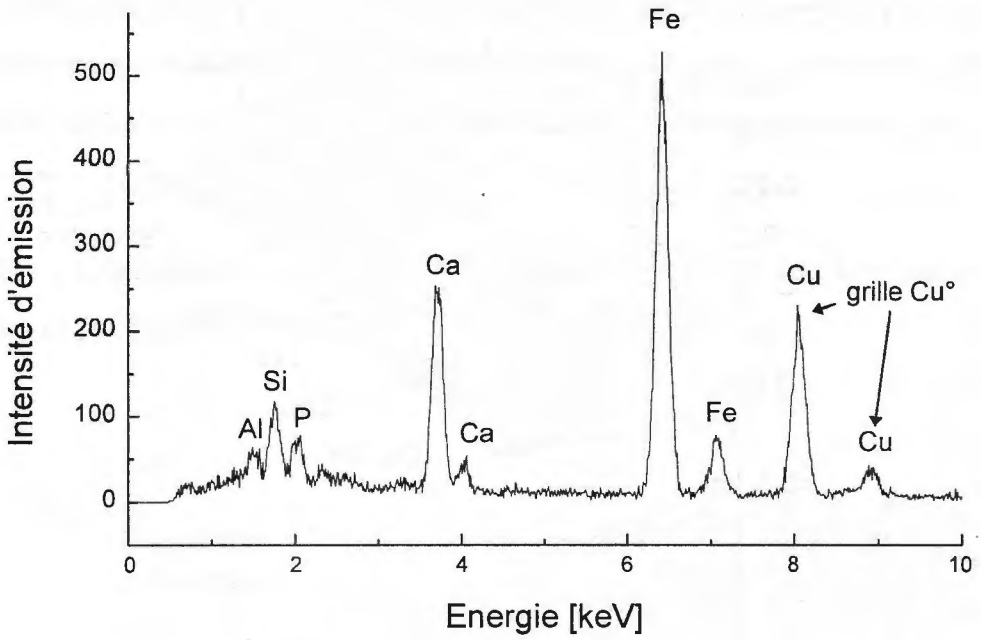
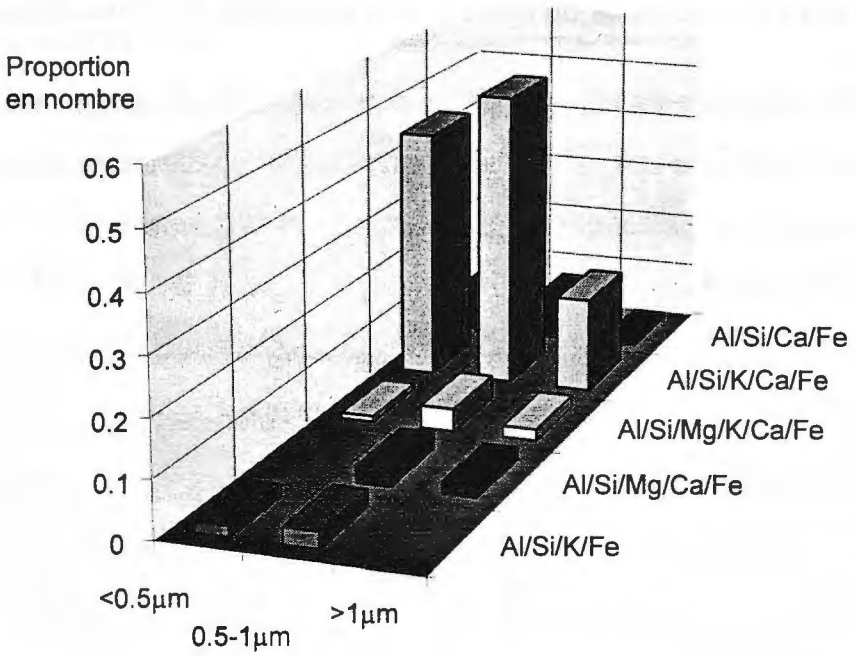


Figure 9.9 : *Exemple d'un spectre EDS d'une particule du Bied contenant du fer, du calcium et du phosphore.*



D'autre part, dans la Noiraigue, la distribution des colloïdes montre clairement la dominance des argiles (58% du total) et principalement dans la classe de tailles comprises entre 0.5 et 1.0μm (29.5% du total, 50% des argiles, Figure 9.7b). Les autres colloïdes de la source peuvent être de nature diverse, comme par exemple des oxydes de titane ou des particules riches en magnésium et calcium. L'analyse fine des argiles (Figure 9.10) permet de mettre en évidence une classe plus abondante (74%) dans laquelle on retrouve en plus de l'Al et du Si, du K, Ca et Fe, déjà mentionné dans le cas du Bied. Des analyses de diffraction X (Atteia, 1996) ont permis de définir les principales argiles contenues dans le Bied et dans la Noiraigue. Les micas représentent ~60% du total des argiles, la kaolinite ~20% et la chlorite ~20%. Les valeurs mesurées sont les mêmes pour le Bied que pour la Noiraigue, aux erreurs expérimentales près.

Figure 9.10 : *Classification des particules d'argile de la Noiraigue en fonction de leur taille et de leur composition.*

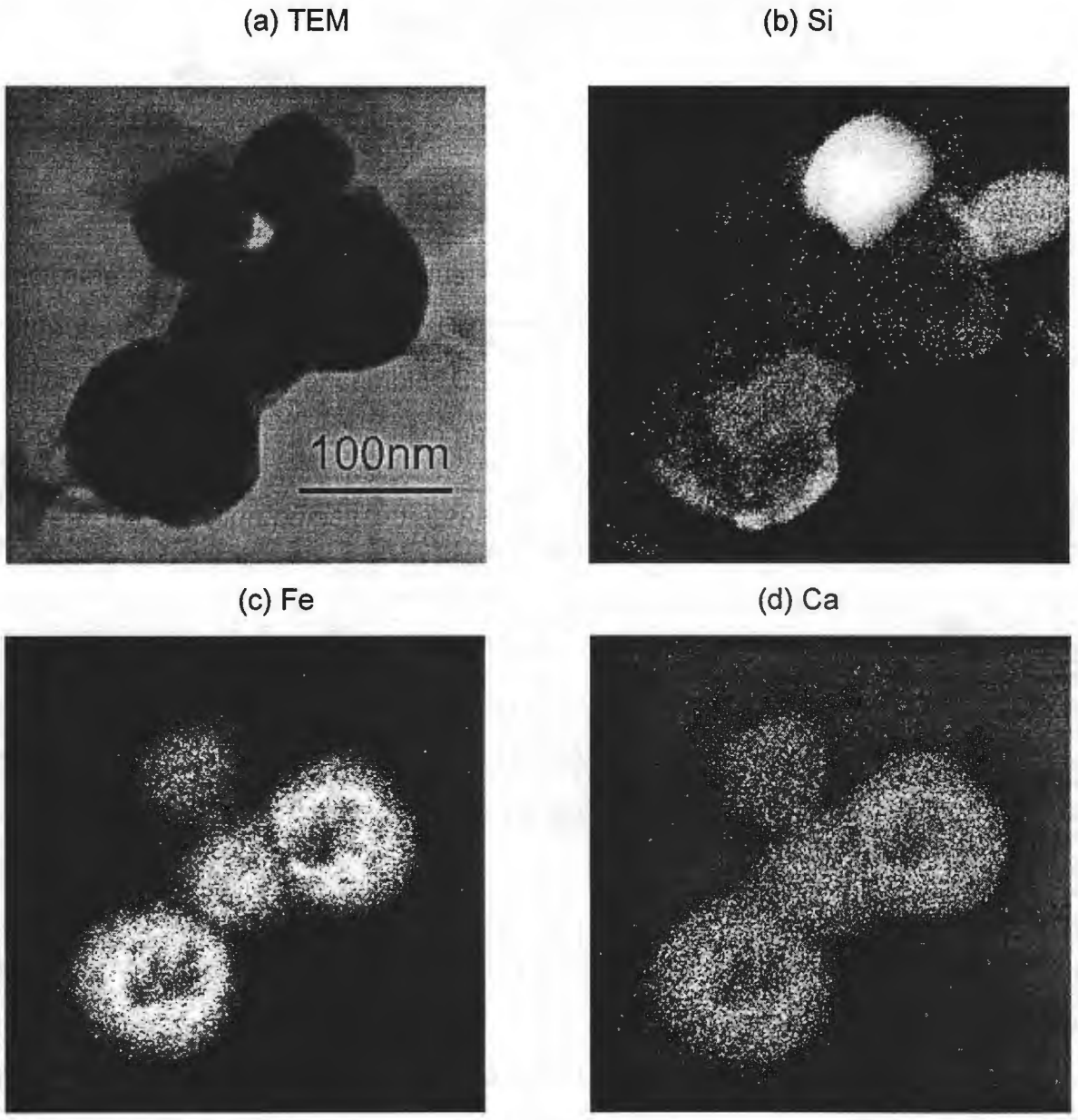


La structure intime des colloïdes de Fe/Ca présents dans le Bied peut être investiguée par l'EDS en mode imagerie à l'aide d'un microscope FEG-STEM. Cette technique a comme avantage de donner une information détaillée de la répartition des éléments au sein d'une particule. Cependant, le temps d'acquisition des signaux de fluorescence X va déterminer la qualité de l'information, de sorte que si ce temps est trop court (typiquement 5 minutes), l'image résultante ne permettra pas de distinguer spacialement des différences en concentrations. Un temps d'acquisition plus élevé (~20-30min), n'est en revanche envisageable que sur un instrument capable de corriger en continu le déplacement latéral généralement inévitable du spécimen en cours de mesure, ce qui est réalisé avec le FEG-STEM-EDS grâce au programme Link utilisé.

Les entités Fe/Ca étudiées dans ce mode d'analyse (Figure 9.11) avec un temps d'acquisition de 30min, apparaissent comme des sphères de fer et de calcium dont le noyau de certaines d'entre elles n'est pas identifié; le coeur de ces entités est dès lors susceptible de contenir des éléments légers, tels C ou O, difficiles à mesurer en

spectrométrie d'émission X. De plus, il apparaît qu'un "film" de silicium est détecté tout autour de l'agrégat étudié. Ce silicium semble agir comme un ciment qui maintient les particules ensemble. Cette exemple de ciment n'est pas unique pour ces particules mais il représente un phénomène peut fréquent dans le Bied.

Figure 9.11 : *Micrographies d'un agrégat du Bied; (a) TEM, (b) image élémentaire du Si, (c) du Fe et (d) du Ca par EDS.*



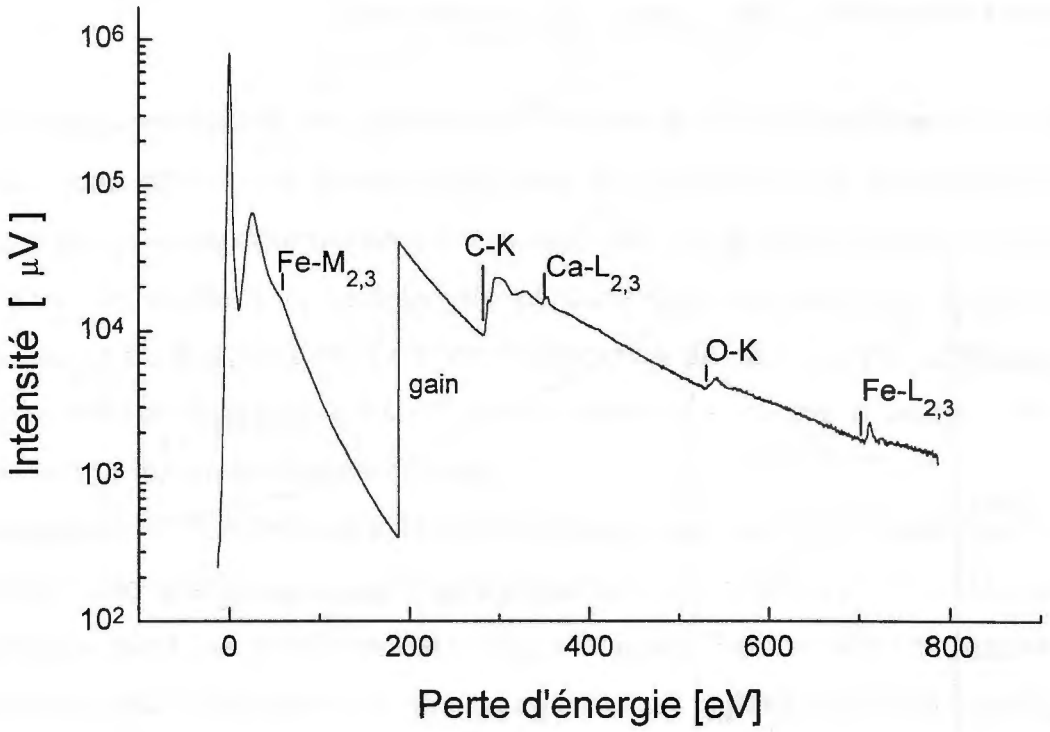
La composition du centre de ces particules peut être connue en utilisant la microscopie à perte d'énergie. Le EELS permet l'analyse sans équivoque des

éléments légers alors que les détecteurs EDS ne permettent généralement pas une résolution spectrale suffisante pour discriminer ces derniers.

9.4.2.4 Analyses EF-TEM

Les images et les spectres ont été enregistrés sur des spécimens préparés par ultracentrifugation de suspensions brutes du Bied et exclusivement sur les colloïdes de Fe/Ca. Ces analyses par perte d'énergie permettront de comparer les résultats obtenus par EDS et par EELS. Le domaine spectral EELS de 0-850eV sélectionné contient les bandes d'absorption du fer ($M_{2,3}$ 54eV et $L_{2,3}$ 708eV), du carbone (K 284eV) de l'oxygène (K 540eV) et du calcium ($L_{2,3}$ 340eV).

Figure 9.12 : *Spectre EELS d'une particule de type Fe/Ca du Bied.*



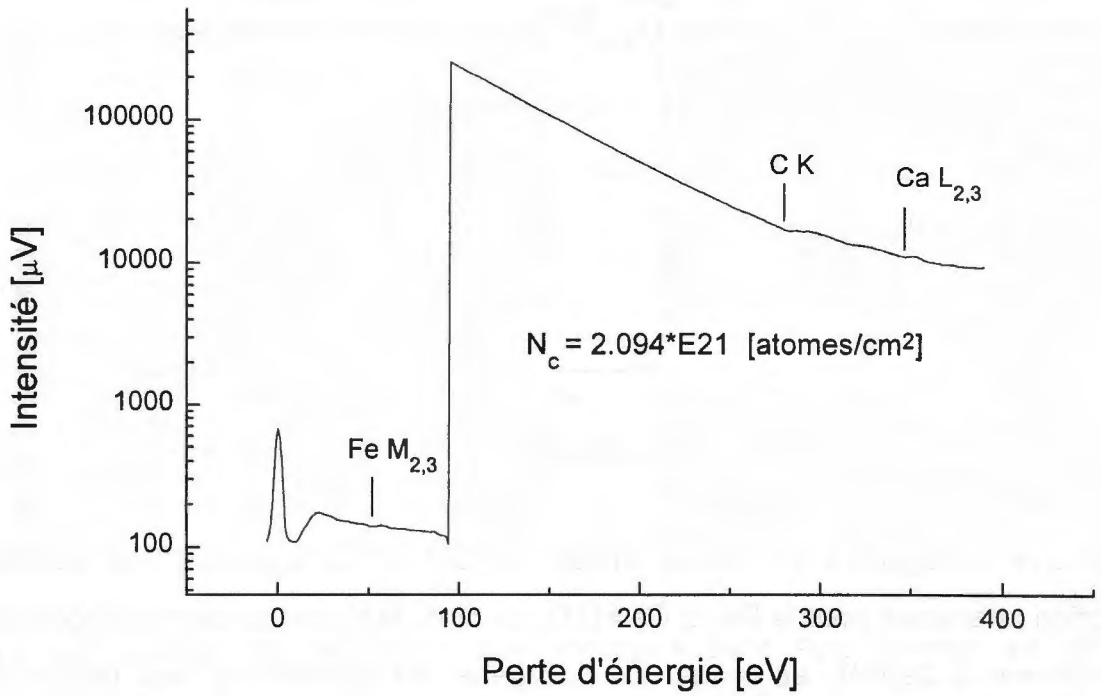
Les spectres enregistrés en mode image (Figure 9.12) exhibent les bandes d'absorption attendues pour le Fe, le Ca et l'O; de plus, le signal du carbone apparaît très nettement à 284eV. Le signal de l'oxygène est généré par les particules analysées et par le film de collodion. Similairement, le signal du carbone n'est pas

nécessairement dû qu'au noyau de la particule. En effet, le film de collodion et de carbone sur lequel reposent les colloïdes génère un signal de carbone non négligeable. Cette hypothèse peut être confirmée en analysant le film sans ces particules d'intérêt, puis celui les contenant.

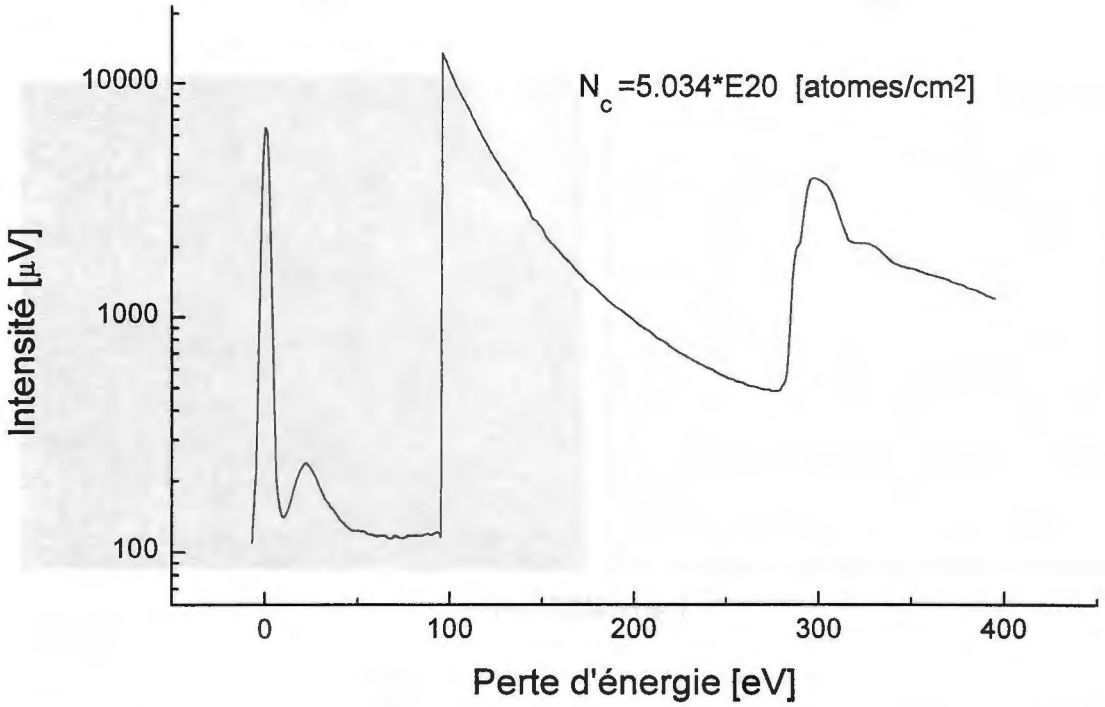
La Figure 9.13 présente les spectre de ces deux situations. Les deux spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions pour permettre une quantification précise du contenu en carbone dans les deux situations. Le traitement des spectres afin d'obtenir des valeurs de quantification absolue pour le carbone a été effectuée suivant les paramètres décrits aux chapitres 3 et 6. Cette quantification a été faite sur en intégrant le seuil K du carbone sur un domaine de 100eV afin de réduire l'erreur due à l'extrapolation du fond continu. Comme décrit au chapitre 3.1.3.1 (Equation 3.1), cette intégrale est normalisée par rapport à l'intégrale du spectre de 0 à 100eV.

Figure 9.13 : *(a) Spectre EELS du carbone contenu dans deux particules agrégées et dans le film support, (b) film support (C° et collodion).*

(a)



(b)

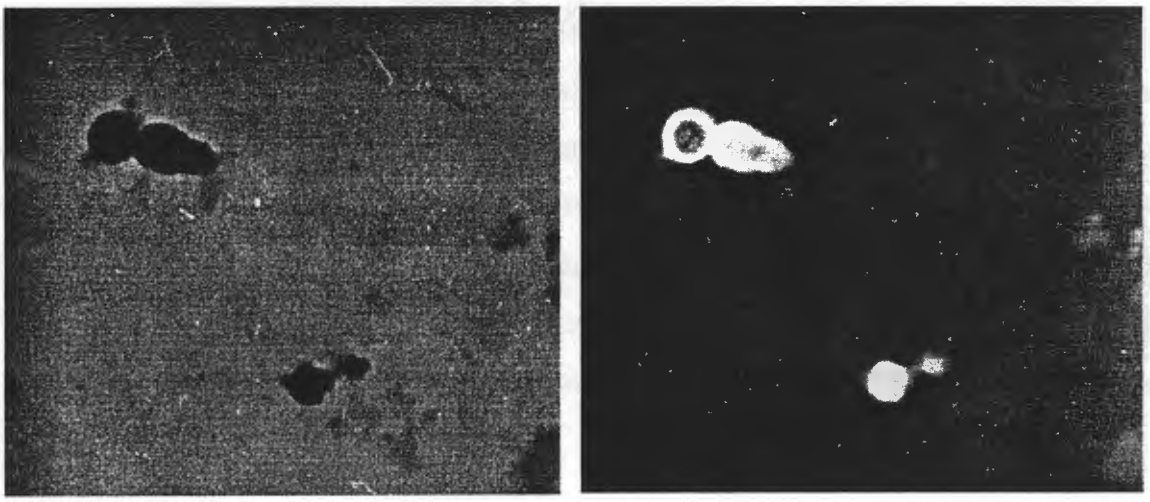


Lors de la quantification, chaque spectre doit être normalisé de cette manière, car le nombre total d'électrons transmis dépend de l'épaisseur du spécimen. Ainsi, la quantité de carbone déterminée sur le spectre du film support (carbone et collodion) peut être soustraite à la quantité de carbone obtenue sur le spectre des deux particules et du film support. Le nombre d'atomes de carbone par unité de surface obtenu dans les deux particules analysées est 4 fois supérieur à celui du film, ce qui confirme leur teneur élevée en carbone.

La micrographie TEM (Figure 9.14a) présente une particule sphérique dont l'intensité en niveaux de gris ne permet pas d'interpréter sa structure. En effet, si le centre de la particule avait été plus perméable aux électrons, il apparaîtrait plus clair, ce qui n'est pas le cas. Cependant, l'image enregistrée sur la bande d'absorption $M_{2,3}$ du fer (54eV) et reproduite sur négatif (sans soustraction du fond continu, Figure 9.14b) révèle clairement une enveloppe plus intense que le coeur de la particule.

Figure 9.14 : *(a) Micrographie TEM et (b) image filtrée d'une particule du Bied sur le seuil $M_{2,3}$ du fer.*

(a) (b)

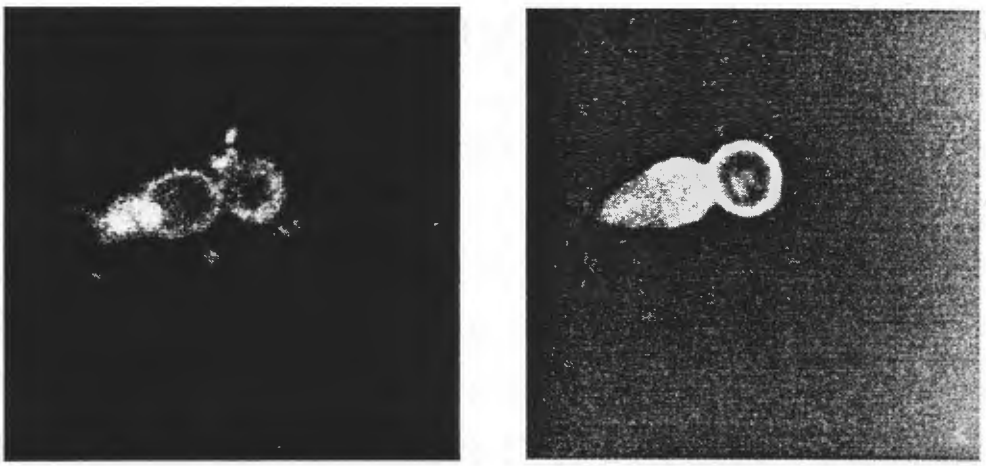


barre 400 nm

L'image élémentaire calculée à partir de la séquence de trois images enregistrées respectivement aux énergies 680, 690 et 716eV (bande $L_{2,3}$ du fer) par une caméra et traitée électroniquement en mode ESI confirme la concentration élevée en fer dans la-dite particule de type Fe/Ca (Figure 9.15a). Le temps d'acquisition de la séquence complète est de 24 secondes et celui d'exposition du négatif de 4 secondes. Le calcium est lui aussi présent en plus grande concentration sur l'extérieur de la sphère qu'au centre de la particule (Figure 9.15b), la série d'images ESI du Ca a été enregistrée selon la séquence suivante : 320, 330 et 350eV. L'oxygène ne présente pas la même répartition spatiale mais est omniprésent sur l'ensemble de la particule (Figure 9.15c, séquence : 510, 520, 560eV).

Figure 9.15 : *Images ESI (a) du Fe (seuil $L_{2,3}$), (b) du Ca (seuil $L_{2,3}$), (c) de l'O (seuil K) dans les particules Fe/Ca de la Figure 9.14.*

(a) (b)



(c)



9.5 Discussion

9.5.1 Point de vue analytique

Les analyses à l'échelle de la suspension globale sont en général difficilement comparables à celles obtenues à l'échelle des particules individuelles. En effet, l'émission atomique (ICP) ne permet par exemple pas de distinguer les éléments dissous de ceux composant la matière particulaire dans le cas d'un échantillon brut,

de sorte que les analyses élémentaires par microscopie n'y sont pas nécessairement reliées. Dans cette étude, les analyses ICP permettent de définir quels éléments sont conservatifs ou non entre l'entrée et la sortie de l'aquifère, mais ne présentent pas les relations entre éléments sur le même site, par exemple le fer et le calcium dans le Bied. Il semble dès lors que ces deux approches (globale et individuelle) soient très complémentaires mais que les résultats de chacune d'elles doivent être considérés de manière critique.

Les microscopes utilisés ont des champs d'application complémentaires dans différents domaines de tailles, c'est-à-dire des limites de résolution spatiale très différentes.

Le microscope à balayage équipé d'une source au tungstène (chapitre 3.1) permet de visualiser des spécimens de taille supérieure à une centaine de nanomètres mais l'analyse élémentaire EDS se limite aux particules les plus grandes (dans ce cas, >0.5-0.8μm). Son maniement aisé permet en revanche d'effectuer rapidement un grand nombre d'analyses (dans notre cas : >3000 particules et agrégats analysés). La microscopie à transmission comble cette lacune en résolution puisqu'elle permet des analyses morphologiques de particules de quelques nanomètres et que l'analyse EDS peut être réalisée sur des colloïdes du même ordre de grandeur suivant le microscope.

En effet, le microscope à transmission utilisé en mode balayage (STEM) est équipé d'une source LaB_6 qui produit une sonde très lumineuse pour des agrandissements élevés et de taille proche de 10nm, permettant ainsi d'analyser des particules de taille similaire ou légèrement inférieure si celles-ci ne font pas partie d'un agrégat. Ce microscope a donc permis d'effectuer une caractérisation élémentaire EDS sur un nombre élevé de particules (~600) afin d'obtenir une information représentative de la composition des colloïdes présents dans le spécimen.

Néanmoins, il s'avère que l'analyse d'une centaine de particules permet déjà d'établir un diagramme similaire à celui présenté dans la Figure 9.7. Le temps d'acquisition de chaque spectre est dicté par la quantité de matière présente dans la particule. Cependant, ce dernier se situe généralement entre 60 et 120 secondes, de sorte qu'il est tout a fait possible de réaliser en quelques heures une série de mesures qui soit représentative du spécimen. Les informations obtenues dans ce cas ne sont,

malgré tout, que semi-quantitatives et ne fournissent aucun détail sur la structure fine (type d'oxyde, argile ou structure moléculaire) des colloïdes. Le détecteur EDS utilisé ici n'autorise que la détection des éléments plus lourds que l'aluminium. Cette contrainte implique des réserves sur l'interprétation de la nature des particules étudiées.

La structure intime des colloïdes est atteignable à l'aide de microscopes très performants comme le STEM dont la source est un canon à émission de champ (200keV) et pour lequel le détecteur EDS (FEG-STEM-EDS) permet l'analyse des éléments légers (jusqu'au carbone). La résolution spatiale de ce microscope est inférieure au nanomètre (agrandissement jusqu'à 1'500'000X, c'est-à-dire 1nm=1.5cm sur la caméra ou l'écran fluorescent) et la taille de sonde peut être réduite à ~2nm. De par sa grande stabilité (pas ou très peu de dérive du spécimen; correction automatique en cas de dérive), ce microscope a permis l'acquisition d'images élémentaires (Figure 9.11) malgré un temps de mesure très long (30 minutes). Dans ce cas, l'utilisation du EF-TEM s'avère particulièrement bien adaptée que ce soit pour l'analyse des éléments légers (jusqu'à l'hydrogène) en mode image ou pour limiter le temps d'exposition du spécimen aux électrons de la source. En effet, les images obtenues en mode EDS peuvent aussi bien être acquises en mode ESI (Figure 9.15) mais, comme discuté ci-dessus, en un temps très court (24 secondes/élément). Ainsi, les informations détaillées sont plus accessibles par EF-TEM que par FEG-STEM-EDS, grâce au temps d'acquisition des images beaucoup plus court. Le mode spectre en revanche est en compétition sur d'autres paramètres. L'EDS produit un spectre sur toute la bande d'énergie de fluorescence des éléments retrouvés dans l'environnement en quelques minutes alors que le EELS (avec un filtre d'énergie) demande pour la même analyse quelques dizaines de minutes (typiquement 2s/eV, ~30min/1000eV). Cependant, le EELS fournira un seuil d'ionisation même pour les éléments très légers alors que l'EDS (suivant le modèle de détecteur) se limitera à la fluorescence du carbone. De plus, la fluorescence X ne révèle pas les propriétés moléculaires du composé analysé alors qu'il est possible en absorption (spectrométrie EELS) de retrouver certains de ces paramètres.

9.5.2 Point de vue environnemental

L'étude d'un site aussi complexe que celui d'un bassin versant de plusieurs kilomètres carrés, d'un aquifère karstique et de la source associée, ne peut être complète exclusivement par les analyses réalisées durant cette campagne de prélèvements. Cependant, les informations extraites des analyses à l'échelle macroscopique et microscopique sont de première importance pour orienter une recherche hautement focalisée sur ce site. En effet, les analyses ICP ont montré que la concentration de certains éléments variait de l'entrée à la sortie de l'aquifère. Ces résultats sont d'importance puisqu'ils ont permis de diriger l'étude microscopique. Le fer, par exemple, se retrouve en concentration beaucoup plus faible à la source que dans le Bied. Dès lors, la structure et la composition intime des particules de fer dans le bassin versant et, par la suite, à la source pourront apporter des renseignements vitaux sur le fonctionnement de l'aquifère.

L'analyse EDS sur un grand nombre de particules démontre en effet que les particules riches en fer présentent une différence (en nombre) entre le Bied et la Noiraigue et aussi une différence en composition. Le Bied contient des entités organo-minérales (dont la source probable sera exposée plus bas) alors que la Noiraigue contient des particules presqu'exclusivement minérales (analyses morphologiques et élémentaires). Il existe donc entre le Bied et la Noiraigue une transformation de la matière en suspension, particulièrement pour les entités contenant du fer.

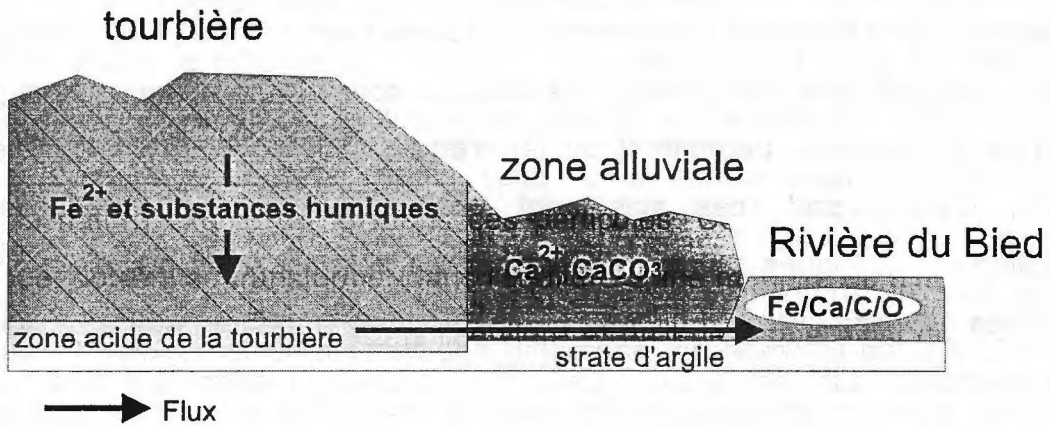
Les conditions physico-chimiques de l'aquifère sont mal connues. De ce fait, les transformations au sein de ce dernier ne peuvent être déduites, actuellement, que par l'observation du système en entrée et en sortie. Les analyses EDS indiquent clairement le caractère réfractaire aux transformations de certaines argiles (Al, Si, K, Ca, Fe) lors du passage à travers le karst puisque les corrélations [Al] : [Si] observées sont identiques sur le Bied et la Noiraigue. La corrélation entre le fer et le calcium dans le Bied n'est pas retrouvée dans la Noiraigue. Cette différence est certainement due à une transformation physico-chimique des colloïdes lors du passage dans l'aquifère. Les particules de fer sont très sensibles aux conditions physico-chimiques du milieu, comme par exemple le pH, la force ionique et les

conditions redox. Dans notre cas, cet indicateur sensible (relation Fe/Ca) permet de démontrer qu'il existe effectivement de faibles variations des conditions physico-chimiques au sein de l'aquifère. Si ces changements étaient plus important, les colloïdes moins sensibles, tels que les argiles, subiraient des transformations observables grâce aux corrélations élémentaires établies par les analyses SEM-EDS.

A l'échelle de la particule individuelle, les analyses microscopiques fines de la composition des colloïdes riches en Fe, Ca, C, O du Bied suggèrent que ceux-ci proviennent d'une accumulation de matière minérale autour d'un noyau organique. La présence de la tourbière en couverture du bassin versant joue très probablement un rôle important dans leur genèse. En effet, les conditions anoxiques et le pH bas (3.5-4) de la tourbière permettent au fer d'être sous sa forme réduite (Fe^{2+}) en solution. D'autre part, ces sols sont très riches en matières organiques principalement humiques (Matthey, 1986; Duchaufour, 1983) et la présence de colloïdes organiques de cette taille n'est pas négligeable. Il est donc très probable que le fer réduit s'adsorbe sur ces entités. L'eau de percolation entraînant ces colloïdes traverse le sol pour ensuite s'écouler vers la couche imperméable argileuse. A ce niveau, la suspension évolue vers les ruisseaux qui drainent le bassin versant. Cette dernière étape est essentielle puisque les conditions physico-chimiques du système changent drastiquement d'anoxique à oxique et d'acide à neutre. Le fer réduit est par conséquent susceptible de s'oxyder rapidement en Fe^{III} à la surface des granules organiques. Dans le même temps, vient se greffer à ce transfert vers un milieu oxydant une adsorption de calcium qui peut être envisagée sous plusieurs formes. En effet, le sol de la zone alluviale n'est plus une tourbière mais un sol composé de silt et d'argiles sableux, très riches en calcium (principalement des carbonates). Les eaux qui le traversent se chargent en matière minérale et c'est à l'interface tourbière-zone alluviale que les colloïdes organiques couverts de Fe^{2+} s'oxydent et adsorbent le calcium à leur surface. Par la suite ces colloïdes vont évoluer dans le Bied et l'aquifère. Cependant, les substances humiques présentes dans le milieu ont tendance à complexer et stabiliser le Fe^{2+}. Dès lors, le fer contenu dans ces colloïdes n'est pas nécessairement du Fe^{III} mais pourrait très bien se présenter partiellement sous la forme de Fe^{II} particulaire stabilisé. Il n'est donc pas possible de

définir la nature exacte du fer dans ces particules. Ces entités absentes dans la Noiraigue, doivent se transformer dans l'aquifère d'une manière ou d'une autre. Il est possible que le fer soit libéré dans l'aquifère et qu'il devienne ainsi disponible pour s'adsorber sur d'autres colloïdes ou alors former des oxyhydroxydes ou des oxydes particulaires et former dès lors de nouvelles espèces. La Figure 9.16 résume la formation et l'évolution hypothétique des colloïdes de Fe/Ca/C.

Figure 9.16 : *Schéma de la formation et évolution hypothétique des particules de Fe/Ca/C.*



En suivant un raisonnement similaire, il est possible d'interpréter la corrélation entre le fer et le silicium ou le fer et l'aluminium. Les argiles (micas, kaolinite, chlorites) présentes dans le Bied et dans la Noiraigue ne devraient pas contenir de fer ou y être associées. Néanmoins, il n'est pas exclu que les argiles présentes dans le Bied adsorbent le fer dissous ou en suspension et apparaissent lors des mesures (SEM-EDS ou STEM-EDS) comme des entités contenant de l'aluminium, du silicium et du fer.

9.6 Corollaire

L'application des techniques de microscopie analytique a montré leurs limites, leur complémentarité et leur applicabilité à un système environnemental complexe. Dès lors, il est possible d'interpréter une partie du fonctionnement des colloïdes encore très peu caractérisés, faute de moyens, et de prévoir des phénomènes de transfert et transport de matière au sein d'un système étudié. Néanmoins, l'analyse

microscopique de la matière en suspension dans les eaux doit être couplée à d'autres études à l'échelle macroscopique permettant de conserver une vision d'ensemble du système. En effet, la représentativité, par rapport au bassin versant et à la source, des analyses microscopiques est difficile à estimer, de sorte que ce qui est déposé sur les grilles de TEM, par exemple, ne représente qu'une infime partie de ce qui est contenu dans les eaux des deux sites. L'analyse EDS est représentative des colloïdes observés (déjà à partir de 100 particules) mais pas nécessairement du volume total prélevé et encore plus difficilement de la rivière. Le tableau 9.1 résume les possibilités des microscopes analytiques utilisables pour l'analyse d'échantillons environnementaux.

Tableau 9.1 : *Comparatif des différents microscopes analytiques.*

	SEM-EDS	TEM/STEM-EDS	TEM-EELS/EF-TEM
résolution spatiale	≥ 0.5μm	≥ 0.05μm	≥ 0.01μm
résolution énergétique	≥ 0.5keV	≥ 0.5keV	≥ 0.2keV (EF-TEM) ≥ 0.05keV (PEELS)
éléments analysables (Z)	≥ Na (10), selon détecteur : ≥ C (6)	≥ Na (10), selon détecteur : ≥ C (6)	≥ H (1)
rapidité d'analyse	secondes	secondes minutes (imagerie)	EF-TEM : minutes PEELS : secondes
information élémentaire	oui	oui	oui
information moléculaire	non	non	oui
quantification absolue	oui	oui	possible
quantification relative	bonne	bonne	bonne
imagerie élémentaire, temps	bonne, minutes	bonne, minutes	bonne, secondes

10 Conclusion

10 Conclusion 141

10.1 Précis des résultats 141

10.2 Discussion 144

10.3 Perspéctives 146

10 CONCLUSION

Les nouvelles applications de la microscopie électronique analytique à l'environnement permettent d'accéder à des niveaux d'information encore ignorés jusqu'à présent, de sorte que la caractérisation élémentaire de colloïdes par microscopie à filtre d'énergie à l'échelle individuelle est dorénavant possible. Comme cette spectrométrie donne accès à la composition des particules avec des seuils de détection très faibles, ainsi qu'à leur structure intime, des approches nouvelles permettant d'étudier le transport de contaminants et le transfert de matière dans les eaux sont donc envisageables.

10.1 PRÉCIS DES RÉSULTATS

La première partie de ce travail a présenté les résultats obtenus à l'aide du microscope à filtre d'énergie sur des particules modèles. Il ressort de cette mise au point que les analyses EELS et ESI permettent de caractériser chaque colloïde présent soit sous forme isolée soit sous forme d'agrégat, pour une palette élevée d'éléments, de l'oxygène au fer, pouvant être étendue aux éléments plus légers comme l'hydrogène ou plus lourds comme l'uranium. Les spectres de perte d'énergie ne fournissent pas seulement une information sur la composition du spécimen, mais aussi, dans certains cas, sur l'environnement moléculaire de l'atome examiné. Ces renseignements structuraux peuvent être interprétés afin de déterminer le type de particule analysée ou être simplement utilisés comme empreinte digitale, de sorte qu'un colloïde est reconnaissable spacialement (d'un site à l'autre) ou temporellement (sur un même site). Le spectre EELS de la goethite a été interprété pour démontrer la finesse de l'information accessible et la notion d'empreinte digitale a été démontrée par l'intermédiaire d'un exemple de dommage du spécimen par le faisceau d'électrons. Le caractère peu réfractaire de la goethite, comparativement à l'hématite, perturbe l'observation trop longue sous le microscope électronique de sorte que lorsque ces particules sont exposées trop longtemps aux électrons, le fer se réduit. Cet effet se traduit dans le spectre de perte d'énergie par une atténuation du signal d'absorption de l'oxygène et un changement de l'allure du seuil du fer. Il est

dès lors évident que pour des oxydes de fer différents présents dans l'environnement, il sera possible de les distinguer par la simple comparaison de leurs spectres. Cette interprétation doit cependant être utilisée avec circonspection, puisqu'il est très difficile de distinguer par EELS deux oxydes dont le cation est au même degré d'oxydation, en tout cas avec la résolution énergétique (2eV) du microscope à filtre d'énergie.

Au point de vue quantitatif, les analyses des modèles d'oxydes de fer ont montré que la stoechiométrie des composés est entachée d'une erreur de 10% environ et que la quantification absolue ne permet qu'un résultat proche de la réalité à seulement 20-30%. Dans ces études de quantification, il a été démontré que le facteur limitant de la méthode est principalement l'épaisseur du spécimen, mais une approche qualitative n'est pas erronée dans les cas (typiquement ≥250nm ($t/\lambda \geq 2.8$) pour la goethite) où le spécimen est nettement en deçà de la limite tolérable pour la quantification ($t/\lambda=0.5$), ce qui correspond aux conditions idéales d'analyse. Cette limite est variable d'un composé à l'autre et diminue avec l'augmentation du numéro atomique. Cependant pour le fer, il est possible de déterminer la stoechiométrie du composé sous forme d'oxyde pour une épaisseur relative double de celle du libre chemin moyen ($t/\lambda=2$), ou, ce qui est équivalent, à 180nm. Le fer présente deux seuils d'ionisation dans la bande d'analyse du EELS (0-2000eV) : la bande $M_{2,3}$ et la bande $L_{2,3}$. Ces deux signaux d'absorption sont utilisables en EELS et en ESI; cependant, le seuil de la première bande ne présente pas de distinction nette pour l'utilisation des empreintes digitales, alors que la bande $L_{2,3}$ est très sensible aux changements au sein des spécimens. Le fond continu avant le seuil $M_{2,3}$ est très différent selon l'épaisseur du spécimen alors que celui de la deuxième bande est invariant dans sa forme et est toujours simulable par une décroissance polynomiale.

L'imagerie en mode ESI ou JR a été mise au point sur les mêmes spécimens modèles que le EELS et a démontré sa grande capacité à discriminer des particules de compositions différentes. Les premières images élémentaires obtenues sur les spécimens de particules telles que l'hématite, la goethite, l'alumine et la kaolinite ont permis de déterminer les réglages idéaux du microscope pour ce genre d'analyse. Par la suite, le mélange de ces colloïdes modèles sur un même spécimen a permis de mettre en évidence les capacités de la technique. En effet, même des particules

cachées en mode d'observation conventionnelle (TEM) ont pu être mises en valeur. L'imagerie élémentaire est contrainte aux mêmes limites que le EELS, puisqu'en définitive ces deux modes d'analyse sont basés sur le même phénomène. L'épaisseur représente le principal facteur limitant et peut être une source d'erreur d'interprétation. Par exemple, lorsqu'une particule trop épaisse de goethite est analysée en mode ESI, il est nécessaire de travailler sur la bande d'absorption $L_{2,3}$ plutôt que sur la bande $M_{2,3}$, car le fond continu avant le seuil d'ionisation ne suit plus une décroissante polynomiale et pourra difficilement être modélisé. Le JR est l'alternative à cette déviation si l'analyse doit absolument se faire sur la bande $M_{2,3}$. L'utilisation de ce seuil en imagerie est justifié par la grande intensité lumineuse à ces pertes d'énergie (30-100eV) et dans le cas où un autre élément, comme le manganèse (Mn L_3 : 637eV, L_2 : 650eV), présent dans le spécimen gênerait l'analyse sur la bande $L_{2,3}$ du fer (708 et 721eV).

A la suite de ce développement des conditions d'analyse, deux applications environnementales ont permis de démontrer les possibilités de la technique. Le premier système étudié avait pour but d'exporter la méthodologie EF-TEM vers la caractérisation de spécimens naturels de composition inconnue à l'échelle de la particule individuelle. Les colloïdes contenus dans les échantillons de sol ont été extraits par différentes techniques de centrifugation. La limite de taille sélectionnée de 0.45μm ne correspond qu'à des critères opérationnels, de sorte que les spécimens contiennent aussi des particules trop épaisses pour l'analyse EELS. Les résultats des analyses qualitatives ont prouvé les possibilités de la méthode soit en mode ESI soit en mode EELS. De plus, les informations microscopiques ont pu être corrélées aux observations macroscopiques.

La deuxième étude sur des eaux de rivière et souterraines du Jura a été réalisée selon une approche microscopiques afin de démontrer les possibilités de chacune de ces techniques et de définir leurs limites du point de vue analytique et environnemental. La microscopie électronique à balayage équipé d'un détecteur EDS a permis d'analyser les particules de grande taille (>0.5μm) collectées sur des membranes de filtration. Les analyses morphologiques ont confirmé des erreurs inhérentes à la filtration, tel des effets d'obstruction des pores de la membrane, ou de retrouver des particules de taille inférieure à la porosité des membranes. D'autre

part, les analyses élémentaires par fluorescence X se sont révélées particulièrement intéressante, puisqu'il a été possible de corréler certains éléments présents sur le site, comme par exemple le fer et le calcium dans le Bied ou le silicium et l'aluminium dans le Bied et la Noiraigue.

Les suspensions brutes prélevées sur les différents sites ont été observées par microscopie à transmission et analysées avec les deux spectromètres complémentaires : EDS et EELS. Cette partie de l'étude a permis de faire ressortir les limitations de ces deux spectromètries au niveau purement analytique et leur complémentarité environnementale. En effet, les études EDS donnent lieu à des résultats à caractère plutôt statistique, tandis que les analyses EELS génèrent des informations sur la composition intime des colloïdes. Les spectres EDS des particules des suspensions brutes révèlent que ces analyses de routine sont limitées à des colloïdes de taille supérieure à ~100nm. Cette limite de détection peut être étendue vers des tailles nettement inférieures (typiquement quelques dizaines de nanomètres) avec les microscopes à balayage modernes à haute résolution. Cependant, en analyses de routine, le microscope à filtre d'énergie permet de caractériser ces colloïdes de très petites dimensions. Les éléments analysables avec un détecteur EDS conventionnel, comme celui utilisé ici, sont limités à $Z \geq 10$ et, si le détecteur est sans fenêtre (en anglais "windowless"), à $Z \geq 6$. Par contre, les spectres enregistrés sur le microscope à filtre d'énergie montrent que des élements légers comme l'oxygène et le carbone sont aisément détectables. Les images élementaires obtenues en EDS révèlent la répartition spatiale exacte des élements plus lourds que le carbone sur le spécimen avec des temps d'acquisition longs (~30min), alors qu'en imagerie ESI, ces cartes élémentaires produisent la même information en un temps court (~30sec), même pour des éléments légers comme le carbone.

10.2 Discussion

L'abrégé des résultats propose une discussion sur l'envergure et la validité de cette nouvelle application du microscope à filtre d'énergie. Cependant afin de discuter sa portée, il est nécessaire de situer la microscopie par rapport à l'environnement. Ce

mode d'observation a été rarement utilisé avant la présente étude et est actuellement en développement. Associés à la microscopie, les spectromètres rendent la technique considérablement plus intéressante pour la caractérisation des colloïdes à l'échelle individuelle. Il semble dès lors que la microscopie analytique devient un outil indispensable à l'étude des suspensions de particules et colloïdes. Néanmoins, elle reste complémentaire aux moyens d'analyse existants et utilisés en routine dans les laboratoires.

Dans ce contexte, la microscopie à filtre d'énergie trouve sa place dans le "groupe" des microscopies analytiques. Elle donne accès aux informations détaillées de la particule qui ne peuvent pas être révélée par les autres spectromètres. Cependant, les résultats de la partie développement montrent dans quelle mesure il est possible de l'utiliser, tandis que la partie application établit, par rapport à l'environnement, à quelles fins elle doit être appliquée.

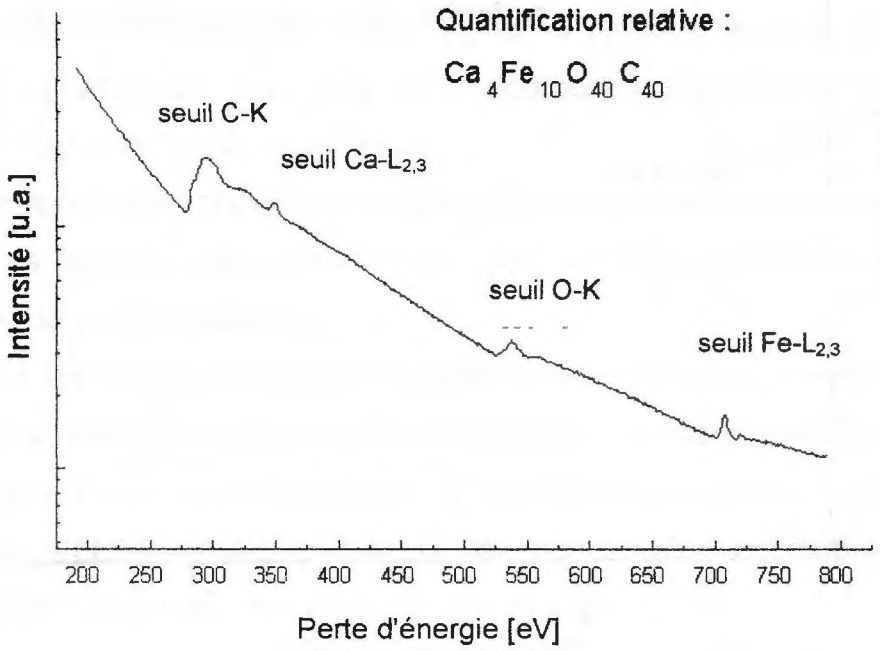
L'épaisseur du spécimen représente la principale limitation du EELS. Cette condition *sine qua non* ne rend l'analyse possible que sur des colloïdes de petite taille (<200nm d'épais). En contrepartie, les informations structurales contenues dans les spectres et la sensibilité aux éléments légers justifient pleinement son application pour l'étude des particules. L'imagerie peut être une source d'informations précieuse puisqu'elle présente des cartes élémentaires dont la limite de détection permet d'observer quelques dizaines d'atomes de fer. Il semble dans ces conditions que le filtre d'énergie est adapté aux analyses de composition et à l'identification (empreintes digitales) des particules. D'autre part, l'ESI est la clef pour atteindre la détection de quelques atomes et le moyen de résoudre des systèmes complexes où des particules ne deviennent apparentes que lorsque leur composition est révélée par les cartes élémentaires.

L'analyse EDS souvent utilisée en parallèle avec le EELS lui est très complémentaire. Les analyses des eaux du Jura ont permis de démontrer cette complémentarité puisqu'il ressort clairement de cette étude que l'enregistrement des spectres en mode EDS s'avère plus rapide qu'avec le filtre d'énergie et est donc mieux adaptée aux études statistiques, mais que l'information produite est limitée aux éléments lourds. Cependant, les cartes élémentaires qui peuvent être produites

en EDS sont trop longues à acquérir (10-30 minutes; dérive du spécimen, dégat au spécimen), alors qu'en ESI, la même image est réalisée en quelques secondes.
Les résultats obtenus lors de l'étude sur les eaux du Jura ont montré que certaines hypothèses sur le fonctionnement d'un système hydrique peuvent être posées et même partiellement élucidées. Le cas des particules contenant du fer et du calcium dans le Bied n'a été révélé que par les analyses élémentaires EDS des particules à l'échelle individuelles et que certaines hypothèses découlant de ces résultats ont pu être résolues à l'aide du EELS, qui a révélé que le coeur de ces particules était riche en carbone. Cependant, une fois que la nature de ces particules a été dévoilée, l'interprétation environnementale de la présence de ces colloïdes ne peut être résolue exclusivement par microscopie, mais nécessite l'interprétation d'autres paramètres tels que les conditions de pH et redox des milieux traversés par ces colloïdes. Dans le cas du bassin versant de la Noiraigue, l'interprétation de la formation des particules de Fe/Ca/C a été élucidée théoriquement par la connaissance des caractéristiques physico-chimiques de la tourbières, la zone alluviale et la rivière du Bied établies par des mesures classiques (acidimétrie, potentiométrie, XRD, ICP, AAS), à l'échelle de la suspension.

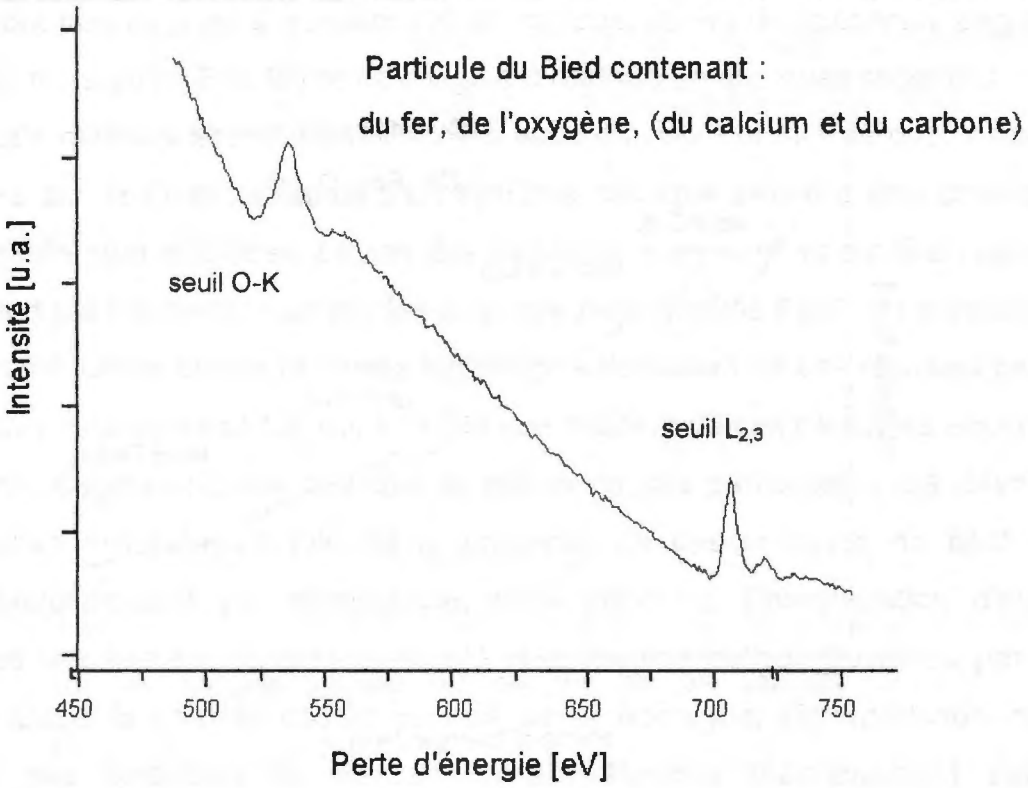
10.3 Perspectives

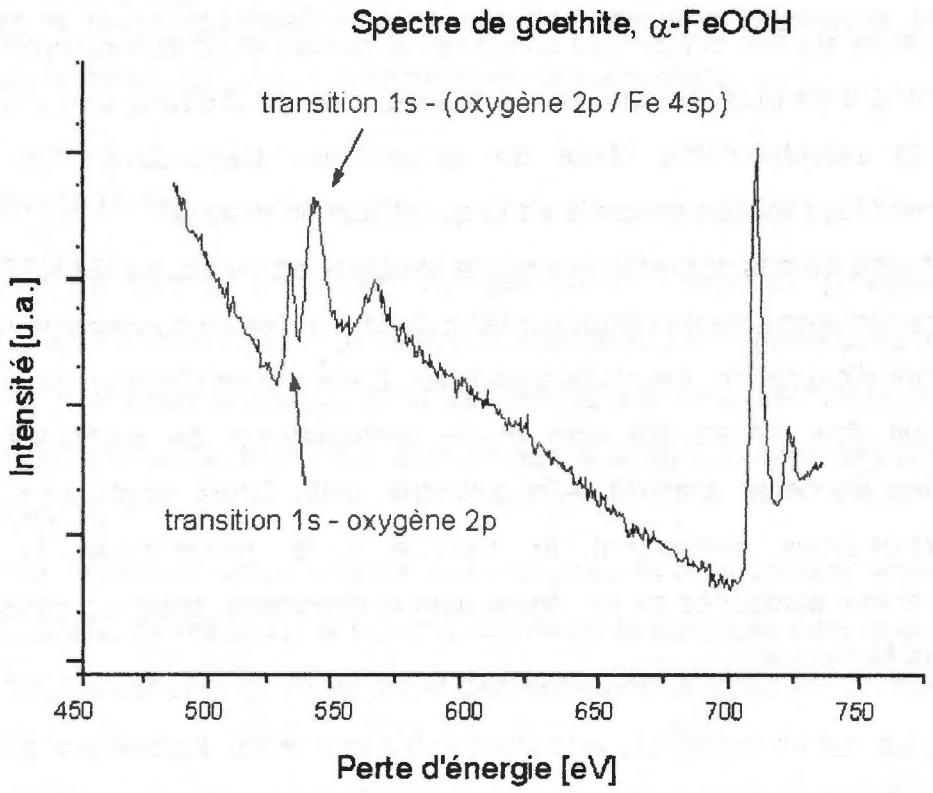
Cette étude n'a pas la prétention de démontrer toutes les possibilités de la microscopie à filtre d'énergie ou de la spectrométrie EELS. Il est apparu tout au long de ce travail que cette technique n'est pas limitée aux analyses élémentaires mais qu'elle permet d'apporter beaucoup d'informations dans l'analyse des transporteurs de contaminants.
Par exemple, la quantification relative des composants d'un colloïde aquatique peut être exploitée afin de retrouver la stoechiométrie de la particule, ceci avec une erreur d'environ 10%. Il est clair qu'un tel projet demande une analyse sur un nombre élevé de colloïdes, cependant, dans le cas des particules contenant du fer, du calcium, de l'oxygène et du carbone la quantification obtenue rejoint bien ce but. Le spectre ci-dessous a été enregistré sur une de ces particules.



La stoechiométrie présentée pour cette particule est un exemple préliminaire qui ne tient pas compte du film support du spécimen et devrait donc être complété par une étude qui intégrerait tous les paramètres susceptibles de produire une déviation par rapport à la stoechiométrie réelle de la particule. Cependant, elle démontre indéniablement l'application concrète de la quantification relative.

D'autre part, des études approfondies sur la structure de particules (ELNES) peuvent apporter des renseignements vitaux sur l'état de la matière en suspension (empreinte digitale, degré d'oxydation, structure cristalline). Cette notion d'empreinte digitale des colloïdes doit être basée sur une étude systématique de particules modèles contenant les éléments d'intérêt. Afin d'illustrer cette future application, les deux spectres ci-dessous présentent le modèle : la goethite et la particule environnementale composée de fer, de calcium et d'oxygène, prélevée dans le bassin versant de la Noiraigue.





Ces deux spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions et surtout avec la même résolution énergétique (ici de 2eV). Dans ces spectres, la bande K de

Ces deux spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions et surtout avec la même résolution énergétique (ici de 2eV). Dans ces spectres, la bande K de l'oxygène présente un seuil très différent pour la particule modèle et la particule naturelle. Il apparaît dès lors que cette approche peut amener de nouvelles informations sur les colloïdes aquatiques.

L'exploration des propriétés des colloïdes avec les contaminants associés pourrait être réalisée à l'aide de cette spectrométrie, dont les limites de détection théoriques sont proches de quelques atomes.

Enfin, comme les éléments traces sont généralement associés aux particules, il est possible que certains métaux lourds, soient systématiquement associés aux mêmes types de particules (oxydes, argiles). Il serait donc possible, en alliant les interprétations ELNES avec une limite de détection élevée, de comprendre le type de liaison existant entre les contaminants et la matière.

BIBLIOGRAPHIE

Ahn C.C., Krivanek O.L., Burgner R.P., Disko M.M. and Swann P.R. (1983). *EELS Atlas*, Gatan, Warrendale.

Allen B.L. and Fanning D.S. (1983). *Composition and soil genesis* In : *Pedogenesis and soil taxonomy* Vol.1 (L.P. Wilding, N.E. Smeck and G.F. Hall, Editors). 141-184. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherland.

Atteia O., Perret D., Adatte T., Kozel R. and Rossi P. (1996). *Characterization of natural colloids from a karstic aquifer.* submitted to Env. Geol.

Baccini P. (Editor) (1984). *Regulation of trace metal concentrations in freshwater systems.* In : *Metal ions in biological systems.* Vol. 18. Dekker, New York.

Beckett R. and Le N.P.(1990). *The role of organic matter and ionic composition in determining the surface charge of suspended particles in natural waters.* Colloids Surf. 44, 35-49.

Berg R.H. (1992). *Sample concentration in particle size analysis.* Amer. Lab. 24, 83-84.

Browning N.D., Chisholm M.F. and Pennycook S.J. (1993). *Atomic-resolution chemical analysis using a scanning transmission electron microscope.* Nature 366, 143-146.

Brydson R (1991). *Interpretation of Near-Edge structure in the electron energy-loss spectrum*, EMSA Bull 21:2, 57-67.

Budd P. M. and Goodhew P. J. (1988). *Light-Element Analysis in the Transmission Electron Microscope* In : *WEDX and EELS,* Vol.16, Oxford University Press, Royal Microscopical Society, Microscopy Handbooks.

Buffle J., DeVitre R., Perret D. and Leppard G.G. (1988). *Combining field measurements for speciation in non perturbable water samples.* In : *Metal speciation theory, analysis and applications* (J.R. Kramer, H.E. Allen, Editors), 99-124. Lewis Publishers, Michigan.

Buffle J., DeVitre R., Perret D. and Leppard G.G. (1989). *Physico-chemical characteristics of a colloidal iron phosphate species formed at the oxic-anoxic interface of a eutrophic lake.* Geochim. Cosmochim. Acta. 53, 399-408.

Buffle J.(1990). *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach.* Ellis Horwood series in analytical chemistry. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England.

Buffle J., Perret D. and Newman M. (1992). *The use of filtration and ultrafiltration for size fractionation of aquatic particles, colloids and macromolecules.* In : *Environmental Particles I* (J. Buffle, H.P. Van Leeuwen, Editors),171-230. Lewis Publishers, Michigan.

Buffle J. and Van Leeuwen H.P. (Editors) (1992). *Environmental particles I.* Lewis Publishers, Michigan.

Buffle J. and Van Leeuwen H.P. (Editors) (1993). *Environmental particles II.* Lewis Publishers, Michigan.

Burnison B.K. and Leppard G.G. (1983). *Isolation of colloidal fibrils from lake water by physical separation techniques.* Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40, 373-381.

Buurman P (1987). *pH dependant character of complexation in podzols* In : *Podzols et Podzolisation* (D. Righi, A. Chauvel, Editors),181-186. INRA, France.

Castaing R. and Henry L.(1969). *Filtrage magnétique des vitesses en microscopie électronique.* C.R. Acad. Sci. B255, 76-78. Paris, France.

Colliex C. (1991). *ELNES in the iron-oxygen system,* Phys. Rev. B, 44-20,11402-11411.

Dietchfield R.W. (1975). *Measurement and interpretation of the EELS of iron and its oxides,* Sol. State Com., 17, 1367-1368.

Duchaufour Ph.and Souchier B. (Editors) (1983). *Pédogénèse et classification* Vol.1. Masson, Paris, France.

Duchaufour Ph. (Editor) (1984). *Pédologie.* Abrégés. Masson, Paris, France.

Egerton R.F. (1986). *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope.* Plenum Press, New York.

Eisma D. (1991). *Particle size of suspended matter in estuaries.* Geo-Marine Lett. 11, 147-153.

Farmer V.C. (1987). *Le rôle des formes inorganiques dans la migration de l'aluminium dans les podzols* In : *Podzols et Podzolisation* (D. Righi, A. Chauvel, Editors),187-194. INRA, France.

Filella M. and Buffle J. (1993). *Factors controlling the stability of submicron colloids in natural waters.* Colloids Surf. A. 73, 255-273.

Fink J. (1989). *Recent developments in energy-loss spectroscopy.* Adv. Electron. Electron Phys. 79, 121-232.

Fink J. (1992). *Transmission electron energy-loss spectroscopy.* In : *Unoccupied Electronic States*, 203-241. Springer-Verlag, Berlin.

Frösch D.and Westphal C. (1989). *Melamine resins and their application in electron microscopy*: Electron Microsc. Rev., 2, 231-255.

Gasser U. G., Juchler S. J. and Sticher H. (1994). *Chemistry and speciation of soil water from serpentinitic soils : importance of colloids in the transport of Cr, Fe, Mg and Ni.* Soil Sci., 158, 314-322.

Gerritsen J. and Bradley S.W. (1987). *Electrophoretic mobility of natural particles and cultured organisms in freshwaters.* Limnol. Oceanogr. 32, 1049-1058.

Grime G.W. and Davison W. (1993). *The use of nuclear microprobe techniques to study the chemistry of lacustrine sediments and particles.* Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B77, 430-435.

Guillet B., Roullier J and Védy J.-C. (1979). *Dispersion et migration de minéraux argileux dans les podzols. Contribution des composés organiques associés, leur rôle sur les formes et l'état de l'aluminium.* Colloques internationaux du CNRS. no 303: pp. 49-56. *Migrations organo-minérales dans les sols tempérés.* Nancy 24-28 septembre 1979, Editions du CNRS, Paris.

Hart B.T. (Editor) (1985). *The Role of Particulate Matter in the Transport and Fate of Contaminants.* Water Studies Center, Monash University, Melbourne.

Hoffer F. (1993). *EELS microanalysis of the elements Ca to Cu using $M_{2,3}$ edges,* Ultramicroscopy, 49, 189-197.

Hunter K.A. and Liss P.S. (1982). *Organic matter and the surface charge of suspended particles in estuarine waters.* Limnol. Oceanogr. 27, 322-335.

Koike I., Hara S., Terauchi K. and Kogure K. (1990). *Role of sub-micrometer particles in the ocean.* Nature. 345, 242-244.

Jackson M.L. (1964). *Chemical composition of soils* In : *Chemistry of the soil* 2nd ed. (F.E. Bear, Editor). Reinhold, New York, N.Y.

Jeanroy E.(1973). *Analyse totale par spectrométrie d'absorption atomique de roches, sols, minerais, ciments, après fusion au métaborate de strontium.* Analysis 2, 703-712.

Juchler S.J. (1988). *Die Boden auf Serpentinit in der Subalpinen Stüfe bei Davos.* Dissertation de Doctorat. ETH n°8716, Université de Zurich, Suisse.

Kavanaugh M.C. and Leckie J.O. (1980). *Particulates in water.* In : *Advances in chemistry series.* Vol. 189, American Chemical Society. Washington, D.C.

Keller C. and Védy J.-C. (1991). *Apports de la lysimétrie sans tension pour l'étude des transferts de Cu et Cd dans des sols forestiers faiblement pollués.* Science du sol 29, 107-124.

Keller C. and Védy J.-C. (1994). *Distribution of copper and cadmium fractions in two forest soils.* Journal of Environmental Quality 23, 987-999.

Keller C. (1995). *Application of centifuging to heavy metal studies in soil solutions,* Com. Soil Sci. Plant Anal, 29-9/10, 1621-1636.

Keller C. and Mavrocordatos D. (1996). *Particulate matter and transfer of K, Cu, Al and Fe in the soil solutions of a podzosol : preliminary results on a semi-quantitative and qualitative approaches.* Proceedings of the 3rd International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. Paris, France.

Kiraly L. (1988). *Large scale 3-d groundwater flow modelling in highly heterogeneous geologic medium* In : *Groundwater flow and quality modelling*, (E. Custodio and others, Editors), Reidel Publishing Company, 761-775.

Krivaneck O.L., Patterson J.H. and Poppa H.R. (1989). *Performance of the Gatan PEELS on the VG HB501 STEM,* Proc. 47th Annual Meeting of EMSA (G.W. Bailey, Editor) 410-411, S.F. Press, San Fransisco.

Lavergne J.-L., Martin J.-M. and Belin M. (1992). *Interactive electron energy-loss elemental mapping by the "imaging-spectrum" method.* Microsc. Microanal. Microstruct. 3, 517-528.

Laxen D.P.and Chandler I.M. (1982). *Comparaison of filtration techniques for size distribution in freshwater.* Anal. Chem., 54, 1350-1355.

Leapman R.D., Fiori C.E. and Gorlen K.E. (1987). *Elemental imaging by EELS and EDXS in the analytical electron microscope.* Biol. Tr. Elem. Res. 13, 89-102.

Leapman R.D. (1989). *Application of parallel-detection electron energy loss spectroscopy in biology.* In : *Electron Probe Microanalysis* : Applications in Biology and Medicine (K. Zierold, H.K. Hagler, Editors), 113-125. Springer-Verlag, Berlin.

Leapman R.D. and Andrews S.B. (1992). *Characterization of biological macromolecules by combined mass mapping and electron energy-loss spectroscopy.* J. Microsc. 165, 225-238.

Leapman R.D. and Newbury D.E. (1993). *Trace elemental analysis at nanometer spatial resolution by parallel-detection electron energy loss spectroscopy.* Anal. Chem. 65, 2409-2414.

Ledin A. (1993). *Colloidal Carrier Substances : Properties and Impact on Trace Metal Distribution in Natural Waters.* Dissertation de Doctorat n°91. Université de Linköping. Suède.

Leppard G.G. (1984a). *The ultrastructure of lacustrine sedimenting materials in the colloidal size range.* Arch. Hydrobiol. 101, 521-530.

Leppard G.G. (1984b). *Organic coatings on suspended particles in lake water.* Arch. Hydrobiol. 102, 265-269.

Leppard G.G., Buffle J., DeVitre R., and Perret D. (1988). *The ultrastructure and physical characteristics of a distinctive colloidal iron particulate isolated from a small eutrophic lake.* Arch. Hydrobiol. 113, 405-424.

Leppard G.G. (1992a). *Size, morphology and composition of particulates in aquatic ecosystems : solving speciation problems by correlative electron microscopy.* Analyst 117, 595-603.

Leppard G.G. (1992b). *Evaluation of electron microscope techniques for the description of aquatic colloids.* In: *Environmental Particles I* (J. Buffle, H.P. Van Leeuwen, Editors), 231-289. Lewis Publishers, Michigan.

Lewis P.R. and Knight D.P. (1990). *Staining Methods for Sectioned Material.* North-Holland/Elsevier, Amsterdam.

Liang L. (1988). *Effects of Surface Chemistry on Kinetics of Coagulation of Submicron Iron Oxide Particles (α-Fe_2O_3) in Water* , Thèse de doctorat, Caltech, Pasadena.

Lienemann C.-P., Mavrocordatos D.and Perret D. (1996). *Enhanced visualization of polysaccharides from water suspensions.*Mikrochim. Acta. In press.

Loder T.C. and Liss P.S. (1985). *Control by organic coatings of the surface charge of estuarine suspended particles.* Limnol. Oceanogr. 30, 418-421.

Matijevic E. (1993). *Preparation and properties of uniform size colloids.* Chem. Mater. 5, 412-426.

Matthey Y. (1986). *Etude phytochimique du complexe de tourbières du Bois-des-Lattes,* Bull. Soc. Neuchâteloise Sci. Nat. (Suisse), 109, 137-145.

Mavrocordatos D., Lienemann C.-P. and Perret D. (1994). *Energy filtered TEM for the physico-chemical characterization of aquatic submicron colloids.* Mikrochim. Acta 117, 39-47.

Mavrocordatos D. and Perret D. (1995). *Non-artefacted TEM specimen preparation for submicron particles of soil.* Comm. Soil Sci. Pl. Anal. 26 (15-16), 2593-2602.

McDowell-Boyer L.M., Hunt J.R. and Sitar N. (1986). *Particles transport through porous media,* Water Resour. Res., 22, 1901-1921.

Mellor A. (1986). *A micromorphological examination of two alpine chronosequences, Southern Norway.* Geoderma 39, 41-57.

Morel F.M.M. and Gschwend P.M. (1987). *The role of colloids in the partitioning of solutes in natural waters.* In : *Aquatic surface chemistry* (W. Stumm, Editor), 405-422. Wiley-Interscience, New York.

Newman M., Filella M., Chen Y., Nègre J.-C., Perret D. and Buffle J. (1994). *Submicron particles in the Rhine River; part II : comparison of field observations and model predictions.* Water Res., 28, 107-118.

Newton P.P. and Liss P.S. (1989). *Surface charge characteristics of oceanic suspended particles.* Deep-Sea Res. 36, 759-767.

Nomizu T. and Mizuike A. (1986). *Electron microscopy of submicron particles in natural waters : specimen preparation by centrifugation.* Mikrochim. Acta I, 65-72.

Nomizu T., Nozue T. and Mizuike A. (1987). *Electron microscopy of submicron particles in natural waters : morphology and elemental analysis of particles in fresh waters.* Mikrochim. Acta II, 99-106.

Nomizu T., Goto K. and Mizuike A. (1988). *Electron microscopy of nanometer particles in freshwater.* Anal. Chem. 60, 2653-2656.

Nomizu T., Nagamine J. and Mizuike A. (1989). *Electron microscopy of submicron particles in natural waters : detection of organic substances.* Mikrochim. Acta. III, 69-73.

Ottensmeyer F.P. (1984). *Electron spectroscopic imaging : parallel energy filtering and microanalysis in the fixed-beam electron microscope.* J. Ultrastruct. Res. 88, 121-134.

Ottensmeyer F.P., Andrews D.W., Arsenault A.L., Heng Y.M., Simon G.T. and Weatherly G.C. (1988). *Elemental imaging by electron energy loss microscopy.* Scanning 10, 227-238.

Penners N.H.G. (1985). *The Preparation and Stability of Monodisperse Colloidal Haematite (α-Fe_2O_3),* Thèse de doctorat, University of Wageningen, Wageningen.

Perret D. (1989). *Caractéristiques physico-chimiques et dynamique de transport des formes du fer dans un lac eutrophe*, Thèse de doctorat n° 2395, Université de Genève.

Perret D., DeVitre R., Leppard G.G. and Buffle J. (1990). *Characterizing autochthonous iron particles and colloids : the need for better particle analysis methods.* In : *Large lakes : ecological structure and function* (M.M. Tilzer, C. Serruya, Editors), 224-244. Springer Verlag, Heidelberg.

Perret D., Leppard G.G., Müller M., Belzile N., DeVitre R. and Buffle J. (1991a). *Electron microscopy of aquatic colloids : non perturbing preparation of specimens in the field.* Water Res. 25, 1333-1343.

Perret D., Newman M., Nègre J.-C., Chen Y. and Buffle J. (1991b). *Study of submicron particles in natural waters by transmission electron microscopy : a quantitative approach.* Poster presented at the international conference on interfacial phenomena in the environment. 6-11 October 1991. Davos, Switzerland.

Perret D., Newman M., Nègre J.-C., Chen Y. and Buffle J. (1994). *Submicron particles in the Rhine River; part I : physico-chemical characterization.* Water Res., 28, 91-106.

Perret D., Lienemann C.-P. and Mavrocordatos D. (1995). *EELS-ESI identification of heterogeneous suspensions of aquatic microparticles.* Microsc. Microanal. Microstruct. 6, 41-51.

Philips N. V., *X-ray wavelengthts and two-theta tables reference*, Almelo, Hollande.

Reimer L., Fromm I. and Rennekamp R. (1988). *Operation modes of electron microscopic imaging and EELS in a transmission electron microscope,* Ultramicrotomy, 24, 339-354.

Reimer L., Fromm I., Hirsch P., Plate U. and Rennekamp R. (1992). *Combination of EELS modes and electron spectroscopic imaging and diffraction in an energy-filtering electron microscope.* Ultramicrosc. 46, 335-347.

Rez P. (1991). *Microanalysis by electron energy loss spectroscopy and energy dispersive X-ray analysis.* In : *Physical Methods of Chemistry*, vol IV : Microscopy (B.W. Rossiter, J.F. Hamilton, Editors), 203-237. Wiley-Interscience, New York.

Robards A. W. and Wilson A. J. (1993). *Procedures in Electron Microscopy*, Vol.1, (John Wiley and sons). New-York.

Robert M., Cabidoche Y.-M. and Berrier J. (1980). *Pédogénèse et minéralogie des sols de haute montagne cristalline (étage alpin et sub-alpin)-Alpes-Pyrénées* : 4, Sciences du sol, 3313-336.

Rossiter B.W. and J.F. Hamilton (1991). *Physical Methods of Chemistry* : *Microscopy*, vol IV, Wiley-Interscience, New York.

Salbu B., Bjørnstad H.E., Lindstrøm N.S., Lydersen E., Brevik E.M., Rambaek J.P. and Paus P.E. (1985). *Size fractionation techniques in the determination of elements associated with particulate or colloidal matter in natural fresh waters.* Talanta 9, 907-913.

Sigleo A.C. and Means J.C. (1990). *Organic and inorganic components in estuarine colloids : implications for sorption and transport of pollutants.* Rev. Environ. Contamin. Toxicol. 112, 123-147.

Smart P. and Tovey N.K. (1981). *Electron Microscopy of Soils and Sediments : Examples.* Clarendon Press, Oxford.

Spurr A. R. (1969). *A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.* J. Ultrastruct. Res., 26, 31-43.

Stephan O., Ajayan P.M. and Colliex C. (1994). *Electron energy-loss spectroscopy from encapsulating carbon nanotubes.* Proceedings of the 13th International Congress on Electron Microscopy, Paris, 2A, 331-332.

Stumm W. (1985). *Chemical processes in lakes.* Wiley-Interscience, New York.

Stumm W. (1987). *Aquatic surface chemistry.* Wiley-Interscience, New York.

Tamm O. (1992). *Eine Methode zur bestimmung der anorganischen Komponeneten der Gelkomplexes in Boden.* Medd. Statens Skogsförsökans Falt 19, 385-404.

Tipping E. (1981a). *The adsorption of aquatic humic substances by iron oxides.* Geochim. Cosmochim. Acta 45, 191-199.

Tipping E., Woof C. and Cooke D. (1981b). *Iron oxide from a seasonally anoxic lake.* Geochim. Cosmochim. Acta 45, 1411-1419.

Trebbia P., Jeanguillaume C. and Walls M. (1990). *EELS : Instrumentation, theory, practice and instrumentation.* In : *Biophysical Electron Microscopy* (P.W. Hawkes, U. Valdré, Editors), 413-478. Academic Press, London.

Van Grieken R., Artaxo P., Bernard P., Bruynseels F., Otten P., Storms H. and Xhoffer C. (1988). *Characterization of individual environmental particles.* Stud. Environ. Sci. 34, 307-316.

Wells M.L. and Goldberg E.D. (1991). *Occurence of small colloids in sea water.* Nature 353, 342-344.

Wouters L., Bernard P. and Van Grieken R. (1988). *Characterization of individual estuarine and marine particles by LAMMA and EPXMA.* Intern. J. Environ. Anal. Chem. 34, 17-29.

Xhoffer C., Wouters L., Artaxo P., Van Put A. and Van Grieken P. (1992). *Characterization of individual environmental particles by beam techniques.* In: *Environmental Particles I* (J. Buffle, H.P. Van Leeuwen, Editors), 107-143. Lewis Publishers, Michigan.

C. Zeiss. *Operating instructions for the CEM-902.* Oberkochen, West Germany.

Zaluzec N. (1980).*The influence of specimen thickness in the quantitative electron energy-loss spectroscopy,* Proceeding of the 38th meeting of electron microscopy soc. am. 112-113.

PUBLICATIONS

- Mavrocordatos D., Perret D.; Qualitative and quantitative characterization of aquatic iron oxyhydroxide particles by TEM-EELS-ESI : behind the edges, (1996) en préparation.

- Leppard G. G.,Flannigan D. T., Mavrocordatos D., Marvin C. H., Bryant W., McCarry B. E.; Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by size classes of particulate in Hamilton Harbour water, (1996) en préparation.

- Couture C., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D., Perret D.; New directions towards the understanding of physico-chemical processes in aquatic systems. Chimia, 50 (1996), 625-629.

- Lienemann C.-P., Mavrocordatos D., Perret D.; Enhanced visualization of polysaccharides from water suspensions. Mikrochim. Acta, (1996) sous presse.

- Keller C., Mavrocordatos D.; Particulate matter and transfer of K, Cu, Al and Fe in the soil solutions of a podzosol: preliminary results on semi-quantitative and qualitative approaches. Proceedings of the 3rd internationnal conference on the biogeochemistry of trace elements, (1996) sous presse, Versailles, France.

- Mavrocordatos D., Perret D.; Non-artefacted specimen preparation for transmission electron microscopy of submicron soil particles, Comm. Soil Sci. Plant Anal., 26 (1995) 2593-2602.

- Perret D., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D.; EELS-ESI identification of heterogeneous suspensions of aquatic microparticles, Microsc. Microstruct. Microanal., 6 (1995) 41-51.

- Mavrocordatos D.; Caractérisation physico-chimique de colloïdes dans un podzol : Proposition d'un schéma complet d'analyse à l'échelle microscopique, Diplôme postgrade en sciences de l'environnement, 1995, EPFL, Lausanne, Suisse

- Mavrocordatos D., Lienemann C.-P., Perret D., Energy filtered transmission electron microscopy for the physico-chemical characterization of aquatic submicron colloids, Mikrochim. Acta, 117, (1994), 39-47.

- Perret D., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D.; Natural microparticles-macromolecules interactions: an EF-TEM approach, Proceeeding of the international congress on electron microscopy, 1994, 1277-78.

PRÉSENTATIONS

- EELS quantification : thickness measurement and partial cross-section determination for iron(III) $M_{2,3}$ edge using goethite (α-FeOOH) as an environmental model particle. Australian conference on electron microscopy, février 1996. Sydney, Australie.

- Separation of colloids by sequential centrifugation. Workshop on Microbial floc architecture, Ryerson Polytechnic University, Toronto, Canada.

-New horizons for environmental colloids analysis. Conférence invitée McMaster University, janvier 1994. Hamilton, Canada.

- Caractérisation physico-chimique de colloïdes dans un podzol : Proposition d'un schéma complet d'analyse à l'échelle microscopique, Présentation publique du diplôme postgrade en sciences de l'environnement, 1995, EPFL, Lausanne, Suisse

- Natural microparticles-macromolecules interactions: an EF-TEM approach, International congress on electron microscopy, 1994, Paris, France.

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier tous les; cependant, néanmoins, parce que, en effet, par conséquent, tandis que, etc... qui m'ont permis d'écrire ce texte afin qu'il soit lisible.

D'autre part, les personnes qui m'ont aidé intimement, de près ou de très loin, voire encore plus éloigné.

Ensuite, il y a aussi ceux que je remercie, même s'ils ne me connaissent pas, mais à qui j'aimerai témoigner de ma gratitude.

Et par ordre "alphabétique" il y a :

Mon Papa, ma Maman, mon Frère, ma Copine, ma Belle-soeur, ma nièce (remarquez qu'elle n'est pas assez grande pour avoir une majuscule, tout comme son frère), mon neveu, ma Grand-mère.

Ceux qui le seront ou qui ne sont pas : Charlot, Christine, Derrick, Enrico, Franco, Fred, Hugues, Jean-Denis, Loïc, Manu, Marc, Marie-Laure, Nicolas, Peter, Stan, Stéphane.

Ceux qui sont déjà : Olivier Atteia, Dave McCombe, Sousan Dadras, France-Line Domergue, Catherine Keller.

Ceux qui ont presque oublié qu'ils le sont : Prof. J.C. Bünzli, Prof. D. Bazett-Jones, Prof. J. Dubochet, Prof. R.F. Egerton, Prof. P. Faivre, Prof. S. Fakan, Prof. G.G. Leppard, Prof. J. Lott, Prof. J.-C. Védy.

Les équipes des centres de microscopie électronique : de l'UNILausanne , de McMaster (Hamilton) et de l'Université de Calgary.

Le Fond National de la Recherche Scientifique (projets n°21-36593.92 et 20-42250.94).

et surtout Didier Perret sans l'aide de qui je n'aurai pu réaliser ce travail.

Curriculum Vitæ

Nom, prénoms :	MAVROCORDATOS, Denis Nicolas
Date et lieu de naissance :	26 octobre 1968, Pully (VD)
Nationalité :	Suisse
Etat civil :	Célibataire
Adresse privée :	Av. de la Dôle 3, 1005 Lausanne
	tél. 021/311.65.90
Adresse professionnelle :	Institut de Chimie Minérale et Analytique
	Université de Lausanne
	BCH
	CH-1015 Lausanne
	tél. ##41-21-692.39.30
	fax. ##41-21-692.39.35
	E-mail dmavroco@ul9000.unil.ch
Langues :	Français, anglais

Etudes supérieures :	Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Institut de Génie de l'Environnement, 1993-95
	Université de Lausanne, Faculté des Sciences, Section de Chimie, 1986-92
	Ecole Roche, Lausanne 1984-86
Diplômes :	Diplôme Postgrade en Sciences de l'Environnement, spécialisation en Pédologie, 1995, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
	Diplôme de Chimiste, 1992, Université de Lausanne
	Maturité Fédérale Type C, 1986

Expérience professionnelle :

- Enseignant remplaçant dans les établissements secondaires de Béthusy (1991-92), de l'Ouest Lausannois (1989-1992), de Nyon (1987) en tant que professeur de branches scientifiques.

- Représentant pour la promotion dans les écoles secondaires de la campagne "Info-Energie" de Sorane SA, mandaté par l'Etat de Vaud, (1991-92).

Autres expériences :

- Veilleur de nuit au Centre de Réfugiés de la Croix-Rouge, (1990-92).

- Veilleur de nuit au Foyer du Midi, EMS psychiatrique, (1988-1990).

Expérience scientifique :

Stages à l'étranger :

- 1995 McMaster University, Ontario, Canada. Deux stages : (i) Développement de la microscopie laser confocal à l'étude de flocs organique de station d'épuration, (ii) étude de spécimens de colloïdes aquatiques préparés par centrifugation séquentielle et analysés par STEM-EDS.

- 1995 University of Calgary, Alberta, Canada. Etude du seuil $M_{2,3}$ du fer par EF-TEM.

Affiches :

- Probing biological flocs with confocal scanning laser microscopy. Australian conference on electron microscopy, février 1996. Sydney, Australie.

- Electron microscopy and bulk chemistry of particles in a jurassic aquifer. Australian conference on electron microscopy, février 1996. Sydney, Australie.

- EELS-ESI as a powerful technique for the identification of heterogeneous mixtures of aquatic species, Electron Energy-Loss Spectroscopy and Imaging, 1994, Leukerbad, Suisse.

- Natural microparticles-macromolecules interactions: an EF-TEM approach, International congress on electron microscopy, 1994, Paris, France.

Publications :

- Mavrocordatos D., Perret D.; Qualitative and quantitative characterization of aquatic iron oxihydroxide particles by TEM-EELS-ESI : behind the edges, (1996) en préparation.

- Couture C., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D., Perret D.; New directions towards the understanding of physico-chemical processes in aquatic systems. Chimia, (1996) accepté.

- Lienemann C.-P., Mavrocordatos D., Perret D.; Enhanced visualization of polysaccharides from water suspensions. Mikrochim. Acta, (1996) sous presse.

- Leppard G. G.,Flannigan D. T., Mavrocordatos D., Marvin C. H., Bryant W., McCarry B. E.; Binding of Polycyclic aromatic hydrocarbons by size classes of particulate in Hamilton Harbour water, (1996) en préparation.

- Keller C., Mavrocordatos D.; Particulate matter and transfer of K, Cu, Al and Fe in the soil solutions of a podzosol: preliminary results on semi-quantitative and qualitative approaches. Proceedings of the 3rd internationnal conference on the biogeochemistry of trace elements, (1996) sous presse, Versailles, France.

- Mavrocordatos D., Perret D.; Non-artefacted specimen preparation for transmission electron microscopy of submicron soil particles, Comm. Soil Sci. Plant Anal., 26 (1995) 2593-2602.

- Perret D., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D.; EELS-ESI identification of heterogeneous suspensions of aquatic microparticles, Microsc. Microstruct. Microanal., 6 (1995) 41-51.

- Mavrocordatos D.; Caractérisation physico-chimique de colloïdes dans un podzol : Proposition d'un schéma complet d'analyse à l'échelle microscopique, Diplôme postgrade en sciences de l'environnement, 1995, EPFL, Lausanne, Suisse

- Mavrocordatos D., Lienemann C.-P., Perret D., Energy filtered transmission electron microscopy for the physico-chemical characterization of aquatic submicron colloids, Mikrochim. Acta, 117, (1994), 39-47.

- Perret D., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D.; Natural microparticles-macromolecules interactions: an EF-TEM approach, Proceeeding of the international congress on electron microscopy, 1994, 1277-78.

Présentations :

- EELS quantification : thickness measurement and partial cross-section determination for iron(III) $M_{2,3}$ edge using goethite (α-FeOOH) as an environmental model particle. Australian conference on electron microscopy, février 1996. Sydney, Australie.

- Separation of colloids by sequential centrifugation. Workshop on Microbial floc architecture, Ryerson Polytechnic University, Toronto, Canada.

-New horizons for environmental colloids analysis. Conférence invitée McMaster University, janvier 1994. Hamilton, Canada.

- Caractérisation physico-chimique de colloïdes dans un podzol : Proposition d'un schéma complet d'analyse à l'échelle microscopique, Présentation publique du diplôme postgrade en sciences de l'environnement, 1995, EPFL, Lausanne, Suisse

- Natural microparticles-macromolecules interactions: an EF-TEM approach, International congress on electron microscopy, 1994, Paris, France.

- Etude de microparticules par EF-TEM, Centre de Microscopie Electronique, 1994, Université de Lausannne, Suisse

Collaboration :

- ECOWISE, the McMaster Eco-Research Program for Hamilton Harbour, University of McMaster, Hamilton, Ontario, Canada.

- Prof. G.G. Leppard, McMaster University, Hamilton, Canada; caractéristiques de colloïdes aquatiques.

Subsides :

- Fondation du 450e Anniversaire; subside pour un projet de recherche au Canada; 1995.