



HAL
open science

Développement de méthodes de microscopie électronique pour la caractérisation des membranes organiques et des mécanismes clés de la filtration des biomolécules

Hélène Roberge

► **To cite this version:**

Hélène Roberge. Développement de méthodes de microscopie électronique pour la caractérisation des membranes organiques et des mécanismes clés de la filtration des biomolécules. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU4068 . tel-04053928

HAL Id: tel-04053928

<https://theses.hal.science/tel-04053928v1>

Submitted on 31 Mar 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : *Sciences des matériaux*

Par

Hélène ROBERGE

Développement de méthodes de microscopie électronique pour la caractérisation des membranes organiques et des mécanismes clés de la filtration des biomolécules.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 novembre 2022

Unité de recherche : Institut des Matériaux Jean Rouxel de Nantes (IMN), UMR 6502

Laboratoire GENie des Procédés Environnement – Agroalimentaire (GEPEA), UMR-CNRS 6144

Rapporteurs avant soutenance :

Christel Causserand Professeur, Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse

Eric Maire Directeur de recherche, MATEIS Lyon

Composition du Jury :

Président : Denis Bouyer

Examineurs : Etienne Gontier

Christel Genoud

Professeure, Institut Européen des Membranes, Université de Montpellier

Ingénieur de Recherche, Bordeaux Imaging Center, Université de Bordeaux

Maître d'enseignement et de recherche (MER), UNIL - Université de Lausanne

Dir. de thèse : Estelle Couallier

Co-dir. de thèse : Philippe Moreau

Co-encadrant de thèse : Patricia Abellan

Chargée de Recherche, GEPEA – Saint-Nazaire

Professeur, IMN, Nantes Université

Chargée de Recherche, IMN, Nantes

REMERCIEMENTS

Me voici, quelques temps après avoir terminé ce travail de thèse, à rédiger les remerciements... j'ai toujours du mal à réaliser... Comme n'importe quel travail de recherche, cette thèse est le fruit de collaborations et d'échanges fructueux avec de nombreux collègues que j'ai le plaisir de présenter ici.

Tout d'abord, je tenais à remercier le financement NeXT Junior Talent e-BRIDGE qui m'a permis de travailler sur un sujet à l'interface entre deux domaines et inscrits dans la thématique de l'industrie du futur.

Je remercie Mme Christel Causserand et M. Eric Maire pour avoir porté un intérêt sincère à mes travaux et d'avoir accepté de les juger en tant que rapporteurs. Merci également à M. Denis Bouyer, Mme Christel Genoud et M. Etienne Gontier pour en avoir été les examinateurs, pour les discussions lors de la soutenance.

Un grand merci aux deux laboratoires qui m'ont chaleureusement accueillie, le GEPEA de Saint Nazaire et l'IMN de Nantes.

Pour moi, il est très important de remercier mes encadrants. Chacun d'entre vous a su m'apporter ce dont j'avais besoin, de manière complémentaire dans les bons moments, mais aussi les plus difficiles. Merci pour votre bienveillance, votre disponibilité et votre confiance. J'ai beaucoup aimé travailler avec vous.

Merci à Estelle pour sa compréhension particulière vis-à-vis des personnes « comme moi ». Merci pour tous ces moments où tu m'as épaulée, aidée à me sentir mieux et à me dépasser.

Merci à Philippe pour son soutien, pour la prise de décision, pour avoir su me rassurer et m'aider aux moments opportuns, particulièrement lors du congé maternité de Patricia ou des pannes techniques des appareils.

Enfin, merci à Patricia pour avoir vu mon potentiel et cru en moi, pour m'avoir poussée, jusqu'à repousser mes limites. J'ai tellement appris... merci pour ta confiance.

A présent, je ne peux écrire ces mots sans parler de la « team CMC », qui a été présente auprès de moi quotidiennement et qui m'a aidée et a égayé mes journées. Particulièrement, merci aux deux Nico et à Eric, le trio infernal, pour toutes ces pauses cafés et bons moments. Même vos blagues vont me manquer, comme l'ambiance dans le labo. Restez comme vous êtes.

Dans la foulée, j'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin, que ce soit par un échange, un geste ou bien un conseil. A commencer par les doctorants, sans qui les pauses du midi ou au cmc auraient été de moindre intérêt. Merci pour tous ces moments de rigolade qui m'ont aidée à gérer la pression, pour tous vos conseils bienveillants et pour votre confiance en m'élisant, par deux fois, en tant que représentant au conseil du laboratoire.

Merci à tous les collègues, aux équipes, à l'atelier, à la direction... etc, je ne préfère pas citer de nom pour n'oublier personne mais vous êtes nombreux à m'avoir aidée, sans doute sans même le savoir...

Enfin, merci à mes proches pour m'avoir supportée pendant cette période, particulièrement lors de la rédaction. Merci à ma famille et à mes amis pour votre aide inestimable. Je termine ces remerciements par un petit mot pour ma maman, merci de m'avoir poussée et d'avoir corrigé les 248 pages de cette thèse.

TABLE DES MATIERE

LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES ABBREVIATIONS	15
Liste des productions scientifiques	17
Introduction générale.....	19
Chapitre 1 : Etat de l'art, contexte général et scientifique :	27
1.1 Généralité sur la filtration membranaire et les membranes	27
1.1.1. Définition.....	27
1.1.2. Les membranes polymères.....	28
1.1.3 Les différentes conditions hydrodynamiques de filtration	30
1.1.4 Les performances de la filtration.....	31
1.2 Application : valorisation des microalgues.....	34
1.2.1 Caractéristiques, production et enjeux	34
1.2.2 L'emploi des procédés de filtration membranaire pour la valorisation des microalgues	35
1.2.3 La filtration de mélanges modèles complexes	36
1.3 Le colmatage, principal verrou du procédé.....	39
1.3.1 Le colmatage des membranes.....	39
1.2.4 La caractérisation du colmatage dans la littérature.....	43
1.4 Caractérisation des membranes de filtration par microscopie électronique	51
1.4.1 Contexte général de l'étude.....	51
1.4.2 Imagerie MEB et FIB	52
1.4.3 Imagerie MET.....	59
1.4.4 Conclusion	63
1.5 Caractérisation du colmatage des membranes par microscopie électronique	64
1.5.1 Contexte	64
1.5.2 Marquage des biomolécules dans la littérature.....	65
1.5.3 L'usage des cryotechniques pour l'exploration du colmatage en conditions natives. .	69
1.5.4 La caractérisation du colmatage des membranes par ME dans la littérature	75
1.5.5 Conclusion sur la caractérisation du colmatage par ME	78
1.6 Objectifs de recherche :	78
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes : Procédés de filtration membranaire et développements méthodologiques en (cryo) microscopie électronique.	80
2.1 Introduction.....	80

2.2	Partie 1 : Les expériences de filtration	81
2.2.1	Matériel	81
2.2.2	Conditionnement des membranes.....	84
2.2.3	Filtration des biomolécules	87
2.2.4	Marquage des biomolécules pour la MET.....	89
2.3	Partie 2 : La Microscopie électronique.....	90
2.3.1	Principes généraux de fonctionnement	91
2.3.2	Utilisation du FIB/MEB	98
2.3.3	Utilisation du MET	109
2.3.4	Spectroscopie EDX : utilisation en MET et en MEB	112
2.3.5	Défis et développements méthodologiques	117
2.4	Partie 3 : La cryo-microscopie électronique.....	126
2.4.1	Principe général.....	126
2.4.2	La cryofixation	127
2.4.3	Cryo FIB/MEB.....	133
2.4.4	Cryo MET et QFS pour les échantillons HPF	139
2.4.5	Défis techniques et développements méthodologiques	141
2.5	Conclusions.....	148
Chapitre 3 : Détermination des facteurs structuraux clés affectant la perméabilité et la sélectivité des membranes de filtration polymères PAN et PES en utilisant le 3D FIB/ MEB à température ambiante		150
3.1	Introduction.....	150
3.2	Matériel & Méthodes.....	153
3.2.1	Conditionnement des membranes de filtration PAN et PES.....	153
3.2.2	Préparation des membranes pour la microscopie électronique.....	154
3.2.3	Acquisition de données 3D FIB/MEB.....	154
3.2.4	Reconstruction 3D et analyse.....	156
3.3	Résultats :	158
3.3.1	Visualisation 3D des membranes PAN et PES	158
3.3.2	Détermination de l'épaisseur de la couche sélective de la membrane PAN	159
3.3.3	Détermination de l'épaisseur de la couche sélective pour les membranes PES.....	162
3.3.4	Estimation des pores aveugles et limites de l'analyse 2D MEB des tailles et du nombre de pores.....	165
3.4	Conclusion	167
Chapitre 4 : Nouvelles méthodes pour l'identification et la différenciation de biomolécules colmatées en utilisant la microscopie électronique conventionnelle		170
4.1	Introduction.....	170

4.2	Matériel & Méthodes.....	173
4.2.1	Préparation des solutions de biomolécules.....	173
4.2.2	Conditionnement des membranes, filtration membranaire et stockage.....	173
4.2.3	Préparation des membranes pour la ME.....	174
4.2.4	Caractérisation par (cryo) microscopie électronique et EDX.....	175
4.3	Résultat.....	177
4.3.1	Identification de colmatage de surface et interne par MEB/EDX.....	177
4.3.2	Différenciation des lipides et des protéines dans le colmatage des membranes à l'aide de techniques de marquage des métaux lourds et de cryo- MEB.....	180
4.3.3	Accès à l'interface colmatage/membrane à haute résolution par STEM-HAADF et HPF suivi de QFS.....	191
4.4	Conclusion.....	192
Chapitre 5 : Caractérisation par (cryo) EM de membranes PES colmatées par des biomolécules (lipides et protéines).....		
5.1	Introduction.....	195
5.2	Matériel & Méthodes.....	197
5.2.1	Conditionnement des membranes de filtration PES, préparation des mélanges modèles et filtration membranaire.....	197
5.2.2	Préparation des membranes pour le cryo-FIB/MEB.....	199
5.2.3	Acquisition de données par 3D cryo-FIB/MEB.....	199
5.2.4	Reconstruction 3D et analyse.....	200
5.3	Résultats.....	201
5.3.1	Intérêts des conditions cryogéniques pour l'analyse des membranes de filtration.....	201
5.3.2	Caractérisation du colmatage de la membrane PES par cryo-MEB.....	205
5.3.3	Caractérisation du colmatage de la membrane PES par 3D cryo FIB/MEB.....	206
5.3.4	Estimation des pores aveugles, « internally blocked pore », et impact indirect du colmatage sur la filtration membranaire.....	214
5.4	Conclusion.....	217
Conclusion générale et perspectives.....		
Bibliographie.....		
ANNEXE.....		
A.	Annexe du chapitre 3.....	239

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRATEGIE DE CES TRAVAUX DE THESE.....	25
FIGURE 1.1 : SCHEMA DE LA FILTRATION MEMBRANAIRE.....	27
FIGURE 1.2 : LES DIFFERENTES GEOMETRIES DES MEMBRANES DE FILTRATION (A) FEUILLE PLATE, (B) TUBULAIRE, (C) SPIRALE ET (D) FIBRE CREUSE.....	29
FIGURE 1.3 : MORPHOLOGIE D'UNE MEMBRANE DE FILTRATION ASYMETRIQUE D'APRES REMIGY ET DESCLAUX (2007).....	30
FIGURE 1.4 : LES PROCEDES DE FILTRATION MEMBRANAIRE, D'APRES LA THESE DE SHULI LIU (2021) ET LES TRAVAUX DE BERK (2009).	31
FIGURE 1.5 : LE FLUX DE LA MEMBRANE EN FONCTION DE LA PTM PENDANT LA FILTRATION D'EAU PURE ET DE SOLUTION DE MATIERE EN SUSPENSION. JCRIT : FLUX CRITIQUE ; PCRIT : PRESSION CRITIQUE, PW : PRESSION DE TRAVAIL =90% DE LA PRESSION CRITIQUE. (D'APRES LES TRAVAUX DE THESE DE SHULI LIU (2017-2021).....	33
FIGURE 1.6 : DIFFERENTES VARIETES DE MICROALGUES, DE GAUCHE A DROITE : MICROALGUES VERTES, <i>CHLORELLA VULGARIS</i> RICHE EN PROTEINES ET UNE CYANOBACTERIE, LA <i>SPIRULINE</i>	34
FIGURE 1.7 : BIBLIOMETRIE SUR L'ETUDE DES MICROALGUES (BASE DE DONNEE "WEB OF SCIENCE" WOS).	35
FIGURE 1.8 : LES DIFFERENTS TYPES DE COLMATAGE	40
FIGURE 1.9 : LES DIFFERENTES MORPHOLOGIES DES PORES CONNECTES A LA SURFACE DE LA MEMBRANE DE FILTRATION.	41
FIGURE 1.10 : BIBLIOMETRIE SUR LA CARACTERISATION DE L'ENCRASSEMENT DES MEMBRANES. MOTEUR DE RECHERCHE : WEB OF SCIENCE ; MOTS CLES : PROTEINE, MEMBRANE, ENCRASSEMENT, CARACTERISATION.....	43
FIGURE 1.11 : EXEMPLE DES TECHNIQUES DIRECTES ET CLASSIQUES DE CARACTERISATION DU COLMATAGE PRESENTEES DANS LA LITTERATURE.....	44
FIGURE 1.12 : IMAGES AU MICROSCOPE A FLUORESCENCE DE SECTIONS TRANSVERSALES DES MEMBRANES DE MF PES A FIBRE CREUSE (FILTRATION SOUS PRESSION EXTERNE). LES TEMPS DE FILTRATION DE 50 PPM DE SOLUTION DE RHODAMINE-SA ETAIENT DE 1 MIN (A, F), 10 MIN (B, G) ET 30 MIN (C, H). LA LIGNE ROUGE PRESENTE OU EST TRACE LE PROFIL D'INTENSITE DE LA FLUORESCENCE. D'APRES HAO ET AL (2013).	48
FIGURE 1.13 : CARACTERISATION AU MEB DE LA SURFACE DE DEUX MEMBRANES EN POLYETHERSULFONE AVEC UN SEUIL DE COUPURE ANNONCE DE 0,1MM. (A) : MEMBRANE KOCH DE MICROFILTRATION MFK-618) ET (B) : MEMBRANE ORELIS DE MICROFILTRATION FORM005FRAY. D'APRES HABIBI ET AL, (2013).	53
FIGURE 1.14 COUPE TRANSVERSALE DE MEMBRANE PES AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CAP. CONCENTRATION PES/CAP (%) : (A) 100/0; (B) 90/10 ; (C) 70/30 D'APRES RAHIMPOUR ET AL 2007	53
FIGURE 1.15 : IMAGE DE LA SURFACE DE LA MEMBRANE OBTENUE AU MEB. SPECTRE EDX SUR UNE ZONE DE LA MEMBRANE MELANGEE A DE LA BENTONITE. D'APRES KUMAR ET AL, 2016.....	54
FIGURE 1.16 : VISUALISATION 3D D'UN BLOC DE COPOLYMER PS-B-P4VP D'APRES SUNDARAMOORTHY ET AL 2016.	55
FIGURE 1.17 : VISUALISATION DE L'ARTEFACT DE BRILLANCE DANS UNE PILE A COMBUSTIBLE. A GAUCHE VISUALISATION DU VOLUME 3D, AU MILIEU, PLAN FRONTAL XY ET A DROITE PLAN LONGITUDINAL YZ. LA FLECHE BLANCHE INDIQUE L'ELONGATION DES PORES DANS LE PLAN DE COUPE YZ. LES BARRES D'ECHELLE SONT DE 300 μM. EXTRAIT DE MORONI ET AL, 2020.....	56
FIGURE 1.18 : COUPE TRANSVERSALE DE LA MEMBRANE DURAPES® APRES SON INCLUSION EN RESINE EPOXY. D'APRES REINGRUBER ET AL (2011).....	57
FIGURE 1.19 : RECONSTRUCTION 3D APRES SEGMENTATION DES PORES DE LA MEMBRANE, CHAQUE COULEUR REPRESENTE DES REGIONS DE PORES AVEC UNE INTER-CONNECTIVITE. EXTRAIT DE SUNDARAMOORTHY ET AL, (2016).	59
FIGURE 1.20 PREPARATION D'UNE LAMELLE DANS UNE MEMBRANE D'OSMOSE INVERSE : A) DEPOT DE PLATINE B) ET C) CROSS SECTION D) LAMELLE TRANSFEREE ET AFFINEE SUR GRILLE MET. D'APRES QI ET AL (2018).	61
FIGURE 1.21 : EXEMPLES DE CARACTERISATION DE MEMBRANE D'OSMOSE INVERSE PAR MET. (A) D'APRES PACHECO ET AL (2010), COUPE TRANSVERSALE EN MET CLASSIQUE D'UNE MEMBRANE D'OSMOSE INVERSE ESPA3 APRES SON INCLUSION EN RESINE. (B) D'APRES LIN ET AL 2016 POUR UNE MEMBRANE DE RO SWC4+ EN MET CLASSIQUE ET (C) EN STEM ET CARTOGRAPHIE EDX (LE SOUFRE EN VERT, L'AZOTE EN ROUGE ET LE CARBONE EN BLEU).	62
FIGURE 1.22 : PRINCIPE DE L'IMMUNO-MARQUAGE EN ME AVEC BILLES D'OR. (A) SCHEMA DU PRINCIPE D'IMMUNO-MARQUAGE. (B) EXEMPLES DE MARQUAGE AVEC DES BILLES D'OR SUR UNE CELLULE D'UN GRAIN DE POLLEN D'APRES RIPPER ET AL, 2008.	67
FIGURE 1.23 : (A) EFFET DE LA DESHYDRATATION SUR LA STRUCTURE ET LA MORPHOLOGIE D'UNE GRAPPE DE RAISIN. (B) ARTEFACT POSSIBLE POUVANT INVALIDER LES RESULTATS SUITE A LA CRYOFIXATION. D'APRES LA PRESENTATION DE PAUL VERKADE, CRYO EM COURSE NOTTINGHAM, SEPTEMBER 2021.....	70

FIGURE 1.24 : LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CRYOFIXATION : A : PAR FREEZING OU CRYO-FREEZING, B : PAR CRYO-PLUNGE ET C : PAR HPF	71
FIGURE 1.25 : A : DIAGRAMME DE PHASE DE L'EAU, D'APRES LA THESE DE FELIX J B BÄUERLEIN. B : SUPPORT, « CARRIER » POUR LES ECHANTILLONS HPF	73
FIGURE 1.26 : MEMBRANE DE MF PES EN CONDITIONS CRYOGENIQUES : FORMATION D'UN GATEAU A LA SURFACE DE LA MEMBRANE COLMATEE. VUE DE LA SURFACE (A) ET VUE EN CROSS SECTION (B). LE CERCLE ROUGE INDIQUE UNE ZONE DE COLMATAGE A LA SURFACE DE LA MEMBRANE. D'APRES HUANG ET AL (2019)	76
FIGURE 2.1 : MORPHOLOGIE DES MEMBRANES POLYMERES DE FILTRATION PES ET PAN. OBSERVATION PAR MEB DE LA TRANCHE DES MEMBRANES.	82
FIGURE 2.2 : MODULE DE FILTRATION TANGENTIELLE : (A) LE MODULE RAYFLOW® DEMONTE POUR VOIR LES DIFFERENTS ELEMENTS (LES PLAQUES SUPPORTS DANS LESQUELLES CIRCULE LE RETENTAT, LE COLLECTEUR DE PERMEAT SUR LEQUEL LES MEMBRANES SONT POSITIONNEES ET MAINTENUE PAR DES JOINTS), (B) SCHEMA DU FONCTIONNEMENT DU MODULE.....	83
FIGURE 2.3 : (A) LA CELLULE DE FILTRATION FRONTALE DYNAMIQUE AMICON®. (B) SCHEMA DU FONCTIONNEMENT DE LA CELLULE.	84
FIGURE 2.4 : PREPARATION DES SOLUTIONS DE MELANGES MODELES. (A) HOMOGENEISATION DE LA SOLUTION CONCENTREE DE LIPIDES PAR SONDE ULTRASONIQUE ET (B), S_p ET S_L PREPAREES.....	86
FIGURE 2.5 : EXEMPLE DE SUIVI DU FLUX DE FILTRATION DE BIOMOLECULE (LIPIDES ET PROTEINE MML/P) PAR UNE MEMBRANE PAN. LE POINT ORANGE MONTRE LE FLUX CALCULE A L'EAU AVANT LA FILTRATION (JH ₂ O).	88
FIGURE 2.6: SIGNAUX GENERES LORSQU'UN FAISCEAU D'ELECTRONS DE HAUTE ENERGIE INTERAGIT AVEC UN SPECIMEN MINCE. LA PLUPART DE CES SIGNAUX PEUVENT ETRE DETECTES DANS DIFFERENTS TYPES DE ME. LES DIRECTIONS INDIQUEES POUR CHAQUE SIGNAL NE REPRESENTENT PAS TOUJOURS LA DIRECTION PHYSIQUE DU SIGNAL MAIS INDIQUENT, DE MANIERE RELATIVE, LA OU IL EST DETECTE. (WILLIAMS ET CARTER, CHAPITRE 1, TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY, 2009)	91
FIGURE 2.7 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN MET. (A) PHOTO D'UN MET CLASSIQUE, ICI H-9000 NAR D'HITACHI (1995) (IMN NANTES), (B) SCHEMA DE FONCTIONNEMENT CLASSIQUE D'UN MET AVEC LES DIFFERENTES PARTIES QUI LE CONSTITUENT. MODIFIE D'APRES LES TRAVAUX DE THESE DE EL AMIN KOUADRI BOUDJELTHIA (2012).	92
FIGURE 2.8 : LES DEUX MODES D'IMAGERIE. (A) LE MODE MET EN FAISCEAU PARALLELE ET (B), LE MODE STEM EN FAISCEAU CONVERGEANT. D'APRES WILLIAM AND CARTER (2008).	93
FIGURE 2.9 : LE PORTE ECHANTILLON OU PORTE OBJET (PO) (IMN NANTES), (A) UN PO DOUBLE TILT CLASSIQUE, (B) ZOOM ET EMPLACEMENT DE LA GRILLE, (C) PO ADAPTE AUX ECHANTILLONS CRYO ET (D) STATION DE STOCKAGE SOUS VIDE DES PO.....	94
FIGURE 2.10 : PRINCIPES DE FONCTIONNEMENT D'UN MEB, (A) SCHEMA DE FONCTIONNEMENT CLASSIQUE D'UN MEB (D'APRES TURSUNOV ET AL, 2015)ET (B) PHOTO D'UN MEB, ICI LE JEOL 7600 (2009) (IMN NANTES)	95
FIGURE 2.11 : INTERACTION ELECTRON-MATIERE POUR LE MEB. (A) SIGNAUX RESULTANTS DE LA COLLISION ENTRE LE FAISCEAU D'ELECTRON ET L'ECHANTILLON, UN SCHEMA DE LA POIRE D'INTERACTION RESULTANTE EST MONTREE AVEC LA PROFONDEUR RELATIVE APPROXIMATIVE DES DIFFERENTS SIGNAUX OBTENUS DANS UN MICROSCOPE MEB. (B) DIFFUSION INELASTIQUE DES ELECTRONS SECONDAIRES, ILS PERMETTENT D'INFORMER SUR LA TOPOGRAPHIE DE L'ECHANTILLON. (C) DIFFUSION ELASTIQUE DES ELECTRONS RETRODIFFUSES, ILS PERMETTENT D'INFORMER SUR LA NATURE CHIMIQUE DE L'ECHANTILLON.	96
FIGURE 2.12 : PRINCIPE DU FIB/MEB. (A), POSITIONNEMENT DES COLONNES ELECTRONIQUE ET IONIQUE DANS LE FIB/MEB. (B), USINAGE DE LA MATIERE ET (C) DEPOT DE PLATINE, AVEC UNE RESOLUTION NANOMETRIQUE. D'APRES LA BROCHURE DE ZEISS (ZEISS CROSSBEAM FAMILY, VERSION 3.0, 2018).....	97
FIGURE 2.13 : LE CROSSBEAM 550L ZEISS DE L'IMN. VUE DE L'EXTERIEUR (A GAUCHE) ET VUE DE L'INTERIEUR (A DROITE).	98
FIGURE 2.14 : LES APPLICATIONS DU FIB/MEB A TEMPERATURE AMBIANTE UTILISEES DANS CETTE ETUDE.	99
FIGURE 2.15 : PROCEDURES POUR L'ACQUISITION DE DONNEES 2D ET LA RECONSTRUCTION DE VOLUME 3D POUR LA MEMBRANE PES PAR FIB/MEB.....	101
FIGURE 2.16 : LES DIFFERENTS ARTEFACTS OBTENUS EN 3D FIB/MEB. (A) DEFORMATION DU VOLUME DANS LE PLAN XZ (VUE DU DESSUS DU VOLUME) DU AU MANQUE D'ALIGNEMENT DU STACK. (B) L'ARTEFACT DE CURTAINING (LIGNES VERTICALES).	103
FIGURE 2.17 : RESULTATS DES DEUX TECHNIQUES DE SEGMENTATION UTILISEES POUR CETTE ETUDE : (A) LA TECHNIQUE DE SELECTION DE GRIS (THRESHOLD), ICI POUR SEGMENTER LES PORES DE LA MEMBRANE PES. ET (B), LA METHODE SEMI-AUTOMATIQUE AVEC SEGMENTATION WISARD, ICI TROIS PHASES, LES PORES (BLEU FONCE), LE COLMATAGE (ROUGE) ET LA MEMBRANE PES (CYAN).	104
FIGURE 2.18 : ILLUSTRATIONS DES PRINCIPALES ETAPES DE L'ANALYSE 3D DANS LE CAS DE LA MEMBRANE PES. LES PORES ONT ETE SEGMENTEES PAR NIVEAUX DE GRIS. UNE ANALYSE QUANTITATIVE DE LA POROSITE VOLUMIQUE, DE LA TAILLE MOYENNE DES PORES, DE LA TORTUOSITE ET DE LA CONNECTIVITE DES PORES ONT ETE CALCULES A PARTIR DE LA SEGMENTATION.	105
FIGURE 2.19 : LES OUTILS DE CALCUL DE TAILLE, DE TORTUOSITE ET DE CONNECTIVITE DES PORES. (A) TAILLE DES PORES SELON LE PROCEDURE DE « THICKNESS MESH », (B) LA TORTUOSITE D'UN PORE ET (C) LA CONNECTIVITE D'UN PORE.....	106

FIGURE 2.20 : LA PROCEDURE DE PREPARATION D'UNE LAMELLE MET AU FIB/MEB. (A) DEPOTS ELECTRONIQUES ET IONIQUES DE PLATINE. (B) DECOUPE DE SECTIONS TRANSVERSALES TRAPEZOÏDALES DE PART ET D'AUTRE DU DEPOT. ET (C), EXTRACTION DE LA LAMELLE AVEC LE NANOMANIPULATEUR.	108
FIGURE 2.21 : PROCEDURE D'AMINCISSEMENT DE LA LAMELLE MET. (A) LA LAMELLE EST FIXEE A UNE GRILLE MET SUR UN COTE RECTILIGNE. (B) UNE PARTIE DE LA LAMELLE EST AMINCIE (FLECHE ROUGE). ET (C), LA LAMELLE EST FRAGILISEE PAR L'AMINCISSEMENT, CE QUI IMPLIQUE ICI UNE DEFORMATION.	108
FIGURE 2.22 : LE NANT'THEMIS DE L'IMN. (A), VUE DE L'EXTERIEUR AVEC LE CAISSON PERMETTANT DE GARDER DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES STABLES ET PROTEGEANT LE MICROSCOPE. (B), VUE DE L'INTERIEUR DU CAISSON. ET (C), SCHEMA DE L'INTERIEUR DU MICROSCOPE ET DE CES DIFFERENTES PARTIES.	109
FIGURE 2.23 : SCHEMA DU FONCTIONNEMENT D'UN ULTRAMICROTOME A) VUE DE PROFIL B) VUE DU DESSUS AVEC RECUPERATION DES COUPES SUR UNE GRILLE MET. WILLIAMS ET CARTER, CHAPITRE 10, TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY, 2009.....	111
FIGURE 2.24 : LES DIFFERENTS DETECTEURS STEM (LE FAISCEAU INCIDENT ETANT FOCALISE SUR L'ECHANTILLON). ADF (ANNULAR DARK FIELD), BF (BRIGHT FIELD) ET HAADF (HIGH ANGLE ANNULAR DARK FIELD) (Z CONTRAST). D'APRES WILLIAM AND CARTER (2009)	112
FIGURE 2.25 : A) ÉMISSION DE RAYONS X SUITE A L'INTERACTION AVEC LE FAISCEAU D'ELECTRONS. B) IMAGE EN STEM-HAADF D'UN AGREGAT DE PARTICULE DE SILICIUM, LIANT ET SEI C) LA CARTOGRAPHIE EDX REVELE LA NATURE DE L'AGREGAT, AVEC DU SILICIUM (BLEU), OXYGENE (VERT), ZINC (VIOLET). LA BARRE D'ECHELLE EST DE 100 NM. D'APRES LA THESE DE LUCAS HUET (2022, THEMIS Z DE L'IMN)	114
FIGURE 2.26 : DISPOSITION DES DETECTEURS EDX DANS LE NANT'THEMIS, SCHEMA EXTRAIT DES TRAVAUX DE THESE DE ANGELICA LAURITA (2022)	115
FIGURE 2.27 : (A) CARTOGRAPHIE EDX D'UNE CROSS SECTION, LA ZONE SOMBRE CORRESPOND A L'ANGLE MORT DE DETECTION DU DETECTEUR. (B) POSITIONNEMENT DU DETECTEUR EDX DANS LA CHAMBRE MEB A UN ANGLE FIXE.....	116
FIGURE 2.28 : IMPACT DES FAISCEAUX D'ELECTRONS (A GAUCHE) ET D'IONS (A DROITE) SUR LA SURFACE D'UNE MEMBRANE DE FILTRATION POLYMERE.....	118
FIGURE 2.29 : TEST DE DIFFERENTS COURANTS DU FAISCEAU D'ELECTRONS AVEC LE MEME GRANDISSEMENT (TAILLE DE PIXEL) ET LES MEMES TEMPS D'EXPOSITION SUR LA MEMBRANES PES.	120
FIGURE 2.30 OBSERVATIONS EMPIRIQUES POUR OBTENIR (A) UN DEPOT CORRECT DE PLATINE ET (B) UNE CROSS SECTION HOMOGENE SANS DOMMAGE, EN FAISANT VARIER LES VALEURS DU COURANT DU FAISCEAU D'IONS (pA). LES IMAGES SONT OBTENUES PAR MEB APRES FRAISAGE OU DEPOT DE PLATINE, AVEC DES COURANTS TROP FAIBLES (i), OPTIMAUX (ii) ET TROP ELEVES (iii). DES SCHEMAS DES DEPOTS OU DES CROSS SECTIONS OBTENUS SUR LES MEMBRANES SONT PRESENTES DANS LE PLAN YZ.	121
FIGURE 2.31 : LE PROTOCOLE MIS EN PLACE POUR EVALUER L'IMPACT DE LA PREPARATION DES MEMBRANE POUR LE 3D FIB/MEB (DEPOTS DE PLATINE). (A) UNE COUCHE D'OR EST DEPOSEE PAR PLASMA, SUIVIE D'UNE COUCHE DE CARBONE A LA SURFACE DE LA MEMBRANE. (B) CONTRASTE DE LA MEMBRANE, DE L'OR ET DU CARBONE EN BSE (C) LA COUCHE DE CARBONE EST RECOUVERTE PAR UN DEPOT DE PLATINE (PREPARATION 3D FIB/MEB).	122
FIGURE 2.32 : OBSERVATION DE L'IMPACT SUR LA SURFACE DE LA MEMBRANE PES DE LA PREPARATION POUR LE 3D/FIB/MEB. (A) CROSS SECTION DE LA MEMBRANE APRES DEPOT D'UNE COUCHE D'OR ET D'UNE COUCHE DE CARBONE, LES DETECTEURS INLENS ET BSE SONT UTILISES. (B) CROSS SECTION APRES LES DEPOTS DE PLATINE ET OBSERVATION DE L'IMPACT DE CES DEPOTS SUR LES COUCHES DE CARBONE ET D'OR.	123
FIGURE 2.33 : ILLUSTRATION ET IMPACT DE L'ARTEFACT "SHINE THROUGH" DANS LA MEMBRANE POLYMERE PES VIDE ET ENRESINEE. A) LA MEMBRANE VIDE PRESENTE UN BON CONTRASTE MAIS AUSSI DES PROBLEMES DE MORPHOLOGIE DUS A L'ALLONGEMENT DES PORES DANS LA DIRECTION Z (INDIQUE PAR LES FLECHES ROUGES). B) LA MEMBRANE INTEGREE PRESENTE UN CONTRASTE PLUS FAIBLE MAIS UNE MORPHOLOGIE PLUS PROCHE DE LA REALITE. C) QUANTIFICATIONS DES PORES EN 2D (ZONES COLOREES) POUR LES PLANS XY ET YZ DE LA MEMBRANE PES VIDE (PAR LOCAL THICKNESS AVEC DES CERCLES EN 2D). LE TABLEAU INDIQUE LA TAILLE MOYENNE DES PORES, PAR MESURE DE L'EPAISSEUR LOCALE (LT) ET DU DIAMETRE MOYEN DE FERET (FD). LA POROSITE EST EXTRAITE DE LA SEGMENTATION 2D SUR LES DEUX PLANS. FIGURE EXTRAITE DE ROBERGE ET AL, JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE, 2022.....	125
FIGURE 2.34 : DIFFERENCES ENTRE LA GLACE CRISTALLINE (A GAUCHE) ET LA GLACE VITREUSE (A DROITE) D'UN POINT DE VUE MOLECULAIRE ET D'UN POINT DE VUE IMAGE.....	127
FIGURE 2.35 : CRYOFIXATION DES BIOMOLECULES EN SUSPENSION PAR CRYO-PLUNGE. (A) LE MODELE DE L'APPAREIL UTILISE DANS CETTE ETUDE. (B) ZOOM SUR LE RESERVOIR D'ETHANE LIQUIDE (CARRE ROUGE, DE LA PHOTO (A)), LA GRILLE, PLACEE AU BOUT DE LA PINCE EST PLONGEE A L'INTERIEUR. (C) BOITES DE CONSERVATION ET TRANSPORT DES GRILLES MET APRES LEUR CRYOFIXATION.	128

FIGURE 2.36 : PREPARATION DES ECHANTILLON POUR LA CRYO-FIXATION PAR FREEZING DANS L'AZOTE PATEUX. (A) UNE GOUTTE DE SOLUTION EST ECRASEE PAR UN RIVET POUR OBTENIR UN MENISQUE PLAT. (B) APRES LA CRYOFIXATION, LE RIVET EST RETIRE A L'AIDE D'UN COUTEAU DANS LE SAS DU MICROSCOPE. (C) PREPARATION D'UNE MEMBRANE COLMATEE POUR LA CRYOFIXATION.	130
FIGURE 2.37 : CRYOFIXATION PAR HPF. (A) LE MODELE D'HPF EM PACT2 UTILISE DANS CETTE ETUDE. (B) LE PUNCHER UTILISE POUR COUPER LES MEMBRANES A LA TAILLE DES CARRIERS. (C) CARRIER AVEC LA MEMBRANE DECOUPEE. (D) DIMENSION D'UN CARRIER ET (D), MODALITES DE REMPLISSAGE DU CARRIER POUR UNE CRYOFIXATION OPTIMALE.	131
FIGURE 2.38 : CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLON CRYOFIXES POUR LEUR VOYAGE ET STOCKAGE A FROID (-196°C).	132
FIGURE 2.39 : LE SYSTEME CRYO QUORUM® RATTACHE AU FIB/MEB DE L'IMN. (A) VUE D'ENSEMBLE DU SYSTEME AVEC TOUS LES EQUIPEMENTS COMME LA STATION DE TRAVAIL, LE CRYO-SAS ET UN DES DEWARD DE REFROIDISSEMENT. (B) INSTALLATION DE LA PLATINE CRYO DANS LA CHAMBRE MEB. (C) SCHEMA SIMPLIFIE DU SYSTEME DE REFROIDISSEMENT DU MICROSCOPE.	134
FIGURE 2.40 : PREPARATION ET TRANSFERT D'UN ECHANTILLON CRYO DEPUIS LA STATION DE TRAVAIL, ICI AVEC UNE CRYOFIXATION PAR AZOTE PATEUX. (A) CRYOFIXATION, (B) TRANSFERT DANS LE SAS DE LA CANNE ET (C) TRANSFERT DANS LE CRYO-SAS DU CRYOMEIB. (D) LES DIFFERENTS PORTOIRS DISPONIBLE A L'IMN ET (E), LE PORTOIR UTILISE PRINCIPALEMENT DANS CETTE ETUDE.	135
FIGURE 2.41 : ETAPES SUPPLEMENTAIRES DE LA PREPARATION DES ECHANTILLONS DANS LE CRYO-SAS. (A) ET (B), CRYO-FRACTURE D'UNE MEMBRANE AVEC LE HOLDER EN ETAU A L'AIDE DU COUTEAU DU CRYO-SAS. (C), METALLISATION AU PLATINE. (D) ET (E), TRANSFERT DANS LE CRYO-SAS ET DANS LA CHAMBRE DU CRYOMEIB VIA LA CANNE DE TRANSFERT.	136
FIGURE 2.42 : ACQUISITION 3D AU CRYO FIB/MEB ET TRAITEMENT DES DONNEES (APRES LA PREPARATION DE LA MEMBRANE PES).	137
FIGURE 2.43 : LE PORTE-OBJET UTILISE DANS CETTE ETUDE, AVEC LA STATION DE TRANSFERT (A), LA LANGUETTE AMOVIBLE POUR PROTEGER L'ECHANTILLON (B) ET (C) LE REMPLISSAGE DU RESERVOIR A LN2.	139
FIGURE 2.44 : KIT DE QFS AVEC (A), LE KIT AVEC L'ECHANTILLON ET LE THERMOMETRE ET (B) LE SUIVI DANS LE TEMPS DE LA TEMPERATURE.	140
FIGURE 2.45 : DEPOT DE PLATINE A LA SURFACE D'UN ECHANTILLON EN CONDITIONS CRYOGENIQUES. (A) IMPORTANT DEPOT DE PLATINE OBTENU EN QUELQUES MINUTES (15µM D'EPaisseur). (B) PURIFICATION DU DEPOT DE PLATINE PAR IRRADIATION ELECTRONIQUE.....	142
FIGURE 2.46 : CROSS SECTION DE MEMBRANE EN CONDITION CRYOGENIQUE. (A) CROSS SECTION AVEC DES PARAMETRES NON OPTIMISES, ON NOTE LA PRESENCE D'UN EFFET DE MUR, DE BORDS FLOUS ET DE L'ARTEFACT DE CURTAINING. (B) CROSS SECTION APRES OPTIMISATION DES PARAMETRES DU FIB. MEME APRES LE BLOTING, UNE COUCHE MINCE D'EAU EST PRESENTE SUR LA SURFACE DE LA MEMBRANE.	143
FIGURE 2.47 : STRATEGIES MISES EN PLACE POUR L'OPTIMISATION DE L'USAGE DES CONDITIONS CRYOGENIQUES. (A) PASSAGE D'UNE BOUTEILLE DE 60 L (A DROITE) A UNE BOUTEILLE DE 196 L (A GAUCHE) D'AZOTE LIQUIDE. (B) RECHAUFFAGE DES OUTILS ET DE LA STATION DE TRAVAIL AVEC UN SECHE-CHEVEUX EN DEBUT DE SEANCE. (C) EFFET DE GRADIENT DE LA COUCHE D'EAU (DE PLUS FINE (GAUCHE) A PLUS EPAISSE (DROITE)) OBTENUE APRES LE BLOTING.	145
FIGURE 2.48 : CONDITIONS REQUISES POUR ANALYSER LES ECHANTILLONS HPF AU CRYO FIB/MEB. (A) HOLDER SPECIFIQUE POUVANT CONTENIR UN CARRIER. (B) POSITION DU PORTOIR AVANT L'AJUSTEMENT PAR LE CONSTRUCTEUR. ICI, LE PORTOIR RISQUE DE TOUCHER LA COLONNE ALORS QUE LA DISTANCE DE TRAVAIL EST DE 8,3 AU LIEU DE 5,1 MM.....	146
FIGURE 2.49 : CONCEPTION D'UN PLOT CUSTOMISE POUR ANALYSER LES ECHANTILLONS HPF. (A) PLACEMENT DU PLOT PAR RAPPORT A LA COLONNE MEB, LE POINT DE COÏNCIDENCE EST ATTEINT SANS COLLISION (DISTANCE DE TRAVAIL DE 5,1 MM). (B) PLAN DE PROFIL DU PLOT CUSTOMISE. (C) IMAGE DU PLOT AVEC UN ZOOM OU ON PEUT APERCEVOIR LA POSITION DU CARRIER.	147
FIGURE 3.1: ILLUSTRATION OF THE MAIN 3D ANALYSIS STEPS IN THE PES MEMBRANE AS AN EXAMPLE. (A) PROCEDURE USED IN THIS STUDY TO ANALYSE MEMBRANES IN 3D. FOR EACH MEMBRANE REFERENCE (PAN OR PES), TWO EXPERIMENTAL CONDITIONS, EMPTY (WITHOUT RESIN, BLUE EMPTY PORES) AND EMBEDDED (WITH RESIN, BLUE FILLED PORES) MEMBRANES WERE STUDIED. FOR EACH EXPERIMENTAL CONDITION, TWO DIFFERENT VOLUMES WERE ACQUIRED. IN EACH 3D DATA ACQUISITION, THREE 3D SMALLER VOLUMES (TRIPPLICATES) WERE DEFINED AND ANALYZED USING THE DRAGONFLY® SOFTWARE. (B) ANALYSIS OF AN EXTRACTED VOLUME OF PES MEMBRANE. THE EXTRACTED VOLUME WAS DIVIDED IN LAYERS PARALLEL TO THE MEMBRANE SURFACE. EACH LAYER HAS A THICKNESS OF 300 NM AND THE DISTANCE SEPARATING THE LAYERS WAS SET TO 150 NM. FOR EACH LAYER, PORES WERE SEGMENTED IN ORDER TO EXTRACT THEIR VOLUME, THE MEAN PORE SIZE, THE TORTUOSITY AND THE CONNECTIVITY.....	157
FIGURE 3.2: 3D VISUALIZATION OF (A) PAN AND (B) PES MEMBRANES, RESPECTIVELY, WITH 5 NM AND 10 NM RESOLUTIONS. VOLUMES OBTAINED BY 3D FIB/SEM FOR EMPTY (UPPER IMAGES) AND EMBEDDED (LOWER IMAGES) MEMBRANES USING THE SESI DETECTOR.....	158

FIGURE 3.3: 3D QUANTIFICATION OF PORE STRUCTURAL PROPERTIES FOR THE PAN MEMBRANES (EMPTY IN GREEN, EMBEDDED IN BLACK) FROM THE TOP SURFACE TO THE BOTTOM OF THE VOLUME (Y DIRECTION). MEAN PORE SIZE (3A), POROSITY (3B) AND TORTUOSITY (3C) OF PORES ARE PRESENTED ACCORDING TO THE DEPTH.	159
FIGURE 3.4: A: QUANTIFICATION OF THE INTRINSIC PERMEABILITY (DEPENDING ON MEAN THE PORE SIZE, THE POROSITY AND THE TORTUOSITY) OF THE PAN MEMBRANE BETWEEN THE TOP SURFACE AND THE END OF THE VOLUME (Y DIRECTION). B: ILLUSTRATION OF THE MORPHOLOGY OF THE MEMBRANE, INCLUDING THE SELECTIVE LAYER THICKNESS OF 505 NM HIGHLIGHTED IN THE PORE QUANTIFICATION.	160
FIGURE 3.5 : QUANTIFICATION OF PORE STRUCTURAL PROPERTIES OF THE PES MEMBRANE FROM THE TOP SURFACE TO THE BOTTOM OF THE VOLUME (Y DIRECTION). MEAN PORE SIZE (5A), POROSITY (5B) AND TORTUOSITY (5C) OF PORES ARE PRESENTED AS A FUNCTION OF THE DEPTH.....	162
FIGURE 3.6 : (A) INTRINSIC PERMEABILITY (DEPENDING ON THE MEAN PORE SIZE, THE POROSITY AND THE TORTUOSITY) OF THE PES MEMBRANE FROM THE TOP SURFACE TO THE END OF THE VOLUME (Y DIRECTION). (B) SCHEMATIC CROSS-SECTIONAL VIEW OF THE MEMBRANE MORPHOLOGY.	163
FIGURE 3.7 : 2D CROSS SECTIONS OBTAINED BY FIB AND OBSERVED BY SEM. (A) CROSS SECTION OF THE PAN MEMBRANE WITH A MAGNIFIED VIEW ON THE XY PLANE. THE MEMBRANE MORPHOLOGY IS PRESENTED WITH THE SELECTIVE LAYER (SL)(RED DOTTED LINE) DEPOSITED ON A POROUS LAYER. (B)CROSS SECTION OF THE PES MEMBRANE WITH A MAGNIFIED VIEW ON THE XY PLANE. THE MEMBRANE MORPHOLOGY IS PRESENTED WITH THE SELECTIVE SKIN (SS)(BLUE ARROWS) DEPOSITED ON A POROUS LAYER.	164
FIGURE 3.8 : VISUALIZATION OF THE PAN (8A) AND THE PES MEMBRANE (8B) SURFACES BY SEM FOLLOWED BY 2D SEGMENTATION AND PORE SIZE (BY LOCAL THICKNESS) AND 2D POROSITY QUANTIFICATION.	166
FIGURE 3.9 : VISUALISATION OF PORES CONNECTED (IN PURPLE) TO THE SURFACE AND GOING THROUGH EITHER THE SELECTIVE LAYER OR SKIN (OPEN PORES) OF PAN AND PES, RESPECTIVELY. OTHER PORES STARTING AT DIFFERENT DEPTHS OF THE MEMBRANE ARE INDICATED BY DIFFERENT COLORS AS SHOWN IN THE SCALE.....	167
FIGURE 4.1 : EM OBSERVATIONS AND EDX ANALYSIS OF CLEAN AND FOULED (B) MEMBRANE SURFACES. (i): INLENS SE IMAGES SURFACE INFORMATION ON THE DISTRIBUTION OF LIPID FOULING AT SPECIFIC POINTS ON THE SURFACE OF THE B-MEMBRANE. IMAGES AT HIGHER MAGNIFICATION, M = 5 000 X, (B HIGH-MAG) SHOW A COMPARISON OF THE CONTRAST OBSERVED FROM AN AREA DISPLAYING THE DARKER CONTRAST, CONSISTENT TO THE LIPID FOULING IN SEM IMAGES WITH THE INLENS SE DETECTOR AND TWO MORE DETECTORS FOR SE (SESI) AND BSE (BSD). (ii): EDX ANALYSIS OF DARK (SOLID LINE) AND BRIGHT (DOTTED LINE) AREAS BY FOCUSING THE ELECTRON BEAM AT AN INCIDENT POINT (SIGNALLED BY A X IN THE REGION OF ANALYSIS PICTURES) AND COLLECTING THE X-RAYS EMITTED. SPECTRA WERE ACQUIRED WITH 4, 7 AND 10 KEV OF ENERGY AND ≈600 pA OF CURRENT DURING 50 s OF ACQUISITION. ENLARGED VIEW OF THE CARBON KA INTENSITY PEAKS INDICATED WITH A DOTTED RECTANGLE IN THE FULL EDX SPECTRA ARE ALSO SHOWN. THIS FIGURE IS MODIFIED FROM ROUQUIE, [...], ROBERGE ET AL, SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY (2022).	178
FIGURE 4.2 : THE DIFFERENT TESTS THAT FAILED DURING THE DEVELOPMENT OF THE STAINING PROTOCOL. NOTE : CONTRAST ARE INVERTED IN THE CASE OF STEM-HAADF IMAGES (STAINING APPEAR BRIGHT INSTEAD OF DARK IN TEM IMAGING). (A) STAINING OF LIPIDS WITH O ₅ O ₄ , RESULTING IN DEGRADATION OF THE BIOMOLECULES. AND (B), STAINING OF PROTEINS WITH PTA IN A SOLUTION CONTAINING LIPIDS AND PROTEINS. PTA APPEARS IN CLEAR AND SEEMS TO ATTACH TO THE PROTEIN-CONTAINING AREAS AROUND THE LIPIDS. IN BOTH CASES, THE LIPIDS ARE INDICATED WITH BLACK ARROWS.....	183
FIGURE 4.3 : IMAGES MET DE LIPIDES (A GAUCHE) ET DE PROTEINES (A DROITE) SANS (1A ET 1B) ET AVEC (1C ET 1D) L'AJOUT DE CONTRASTANT, ICI DE L'URANYLESS® POUR LES LIPIDES ET DU PTA POUR LES PROTEINES.	184
FIGURE 4.4 : IMAGE STEM HAADF (i) ET ANALYSE EDX (ii ET iii) D'UNE SOLUTION MELANGE DE LIPIDES ET DE PROTEINES MARQUES.	185
FIGURE 4.5 : IMAGE AU CRYO-MEB ET ANALYSE EDX DE CROSS SECTION D'UNE MEMBRANE PES COLMATEES AVEC DES BIOMOLECULES MARQUEES. REMARQUE : LE C EST EN ROUGE SUR CETTE IMAGE (CONTRE LA EN ROUGE SUR LA FIGURE 4.4).	188
FIGURE 5.1 : 2D (XY AND YZ PLANES) AND 3D VISUALISATION OF THE PES MEMBRANE. VOLUMES WERE OBTAINED BY 3D FIB/SEM FOR A CLEAN MEMBRANE AT ROOM TEMPERATURE (RT) (UPPER IMAGES) AND UNDER CRYOGENIC CONDITIONS (LOWER IMAGES, CONTRAST WAS INVERTED TO ALLOW BETTER COMPARISON WITH RT IMAGES) USING THE SESI DETECTOR.	202
FIGURE 5.2 : 3D QUANTIFICATION OF MEAN PORE SIZE (2A) AND POROSITY (2B) FOR THE PES MEMBRANE AT ROOM TEMPERATURE (PINK AND RED LINES WITH SQUARES) AND UNDER CRYOGENIC CONDITIONS (LIGHT AND DARK BLUE LINES WITH TRIANGLES), FROM THE TOP SURFACE TO THE BOTTOM OF THE VOLUME (Y DIRECTION). TWO SEGMENTATION TECHNIQUES WERE TESTED, SEGMENTATION BY THRESHOLDING IN LIGHT COLORS (AS FOR THE EMPTY MEMBRANE STUDY IN CHAPTER 3) AND SEGMENTATION BY THE WIZARD MODULE IN DARK COLORS.	203

FIGURE 5.3 : SEM CRYO OBSERVATION OF THE PES MEMBRANE SURFACE FOULED WITH LIPIDS AND PROTEINS. THE FOULING PATCHES HAVE BEEN HIGHLIGHTED IN RED. A HIGHER MAGNIFICATION VIEW OF THE RED SQUARE AREA IS SHOWN ON THE RIGHT SIDE (4B). THE MEMBRANE SURFACE IS INDICATED BY RED ARROWS.	206
FIGURE 5.4 : 3D RECONSTRUCTIONS OF PES MEMBRANES FOULED WITH (4A) LIPIDS, (4B) PROTEINS AND (4C) A MIX OF LIPIDS AND PROTEINS. THE DIFFERENT PHASES OF THE VOLUMES WERE SEGMENTED BY THE SW TECHNIQUE AND HIGHLIGHTED BY LIGHT GREY FOR THE BLOCKED PORE (IN FIGURE 5A ONLY), DARK BLUE FOR THE PORES, LIGHT BLUE FOR THE MEMBRANE AND RED FOR THE FOULING. THE ORIGINAL DATA STACK IS SHOWN IN GREY AND THE BLACK DOTTED LINE INDICATES THE MEMBRANE SURFACE.	206
FIGURE 5.5 : CALCULATION OF MEMBRANE RESISTANCE FROM WATER FLUX MEASUREMENTS BEFORE AND AFTER FILTRATION OF LIPIDS AND PROTEINS.	208
FIGURE 5.8 : SCHEMATIC OF THE DIFFERENT TYPES OF PORE CHARACTERISED IN MEMBRANES FOULED BY BIOMOLECULES.	215
FIGURE 5.9 : VISUALISATION OF PORES CONNECTED (IN PURPLE) TO THE SURFACE AND GOING THROUGH THE SELECTIVE LAYER AND THE MEMBRANE (OPEN PORES) OF THE PES MEMBRANE. OTHER PORES STARTING AT DIFFERENT DEPTHS FROM THE SURFACE ARE INDICATED BY DIFFERENT COLORS AS SHOWN IN THE SCALE. IN THE CASE OF THE FIGURE 9B, THE PURPLE AND DARK BLUE PORES ARE IDENTIFIED AS BEING CONNECTED TO THE MEMBRANE SURFACE. THIS IS DUE TO THE DIFFICULTY OF PLACING THE MEMBRANE SURFACE, AS IT HAS BEEN ALTERED BY FOULING (NO FLAT SURFACE).	216

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 : CLASSIFICATION DES MEMBRANES DE FILTRATION, D'APRES AIMAR ET DAUFIN (2004), BERK (2009) ET ZAOUK (2018) ⁶⁻¹¹	28
TABLEAU 1.2 : LES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES MEMBRANES, CLASSEES EN FONCTION DE LEUR RESOLUTION, AIRE DE LA SURFACE CARACTERISEE, LA POSSIBILITE DE FAIRE DE LA 3D ET LEUR COMPATIBILITE AVEC LES DIFFERENTS TYPES DE MEMBRANE DE FILTRATION POLYMERE. LES COUPLAGES POSSIBLES ENTRE LES TECHNIQUES AINSI QUE DES EXEMPLES D'ARTICLES METTANT EN APPLICATION CES TECHNIQUES SONT PRESENTES.	50
TABLEAU 2.3 : LES PARAMETRES OPTIMISES DU FAISCEAU D'ELECTRONS ET LE CALCUL DE LA FLUENCE ELECTRONIQUE POUR LES MEMBRANES DE FILTRATION POLYMERES (IMAGERIE MEB).....	119
TABLEAU 2.4 : LES TEMPERATURES DES EQUIPEMENTS DU SYSTEME CRYO QUORUM [®] UTILISES DANS CETTE ETUDE.	133
TABLEAU 3.1 : DATA ACQUISITION PARAMETERS USED FOR 3D FIB/SEM OF PES AND PAN MEMBRANES. ^A EXACT VALUES MIGHT DIFFER SLIGHTLY FROM ONE VOLUME TO ANOTHER. NOMINAL PORE SIZES ARE THOSE INITIALLY PROVIDED BY THE MANUFACTURERS.	155
TABLE 3.2: DATA ANALYSIS PARAMETERS USED FOR THE 3D RECONSTRUCTIONS OF THE FIB/SEM DATA OF PES AND PAN MEMBRANES. ^A THIS VALUE IS EXPLAINED BY THE FACT THAT ONE STACK WAS TOO SMALL TO ALLOW DEEPER ANALYSIS. NOMINAL PORE SIZES ARE THOSE INITIALLY PROVIDED BY THE MANUFACTURERS.	156
TABLE 4.1 : COMPARISON OF THE DIFFERENT STAINING AGENTS SELECTED AND TESTED IN THIS WORK, SHOWING THEIR ABILITY OR INABILITY TO STAIN SPECIFIC BIOMOLECULES OR POLYMER (X), ACCORDING TO THE LITERATURE (INDICATED BY A CITATION) AND TO THE EXPERIMENTS PERFORMED DURING THIS WORK (INDICATED BY: "[THIS WORK]"). THE CMR NATURE OF THE PRODUCT AS WELL AS THE POSSIBILITY OF DETECTION BY EDX USING THE SUPER X DETECTOR IN THE NANT' THEMIS WERE ALSO INDICATED.	181
TABLE 5.1 : DATA ACQUISITION PARAMETERS USED FOR CRYO 3D FIB/SEM OF THE PES MEMBRANES. ^A EXACT VALUES MIGHT DIFFER SLIGHTLY FROM ONE VOLUME TO ANOTHER. NOMINAL PORE SIZES ARE THOSE INITIALLY PROVIDED BY THE MANUFACTURERS.	200

LISTE DES ABBREVIATIONS

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
BSE	Back scatter electron, électrons rétrodiffusés
CCD	Charge coupled device
CMR	Cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction
EDX	Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy
FIB	Focused ion beam
HAADF	High Angle Annular Dark Field
HPF	High pressure freezing
$J_{H_2O\ i}$	Flux à l'eau mesuré avec la membrane propre ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)
$J_{H_2O\ f}$	Flux à l'eau mesuré avec la membrane colmatée ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)
ME	Microscopie électronique
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission
MF	Microfiltration
NF	Nanofiltration
OsO_4	Tetroxyde d'Osmium
PAN	Membrane polyacrylonitrile
PES	Membrane polyéthersulfone
PO	Porte échantillon ou objet
PTA	Acide phosphotungstique (Phosphotungstic acid)
PTM	Pression transmembranaire
QFS	Quick freeze substitution
RO	Reverse osmosis
ROI	Region of interest
RT	Room temperature
RuO_4	Tétoxyde de ruthénium
SE	Secondary electron (électron secondaire)

SL	Selective layer
S _L	Solution de lipides
S _{L-conc}	Solution de lipides concentrée
S _{LP}	Solution de lipides et de protéines
S _P	Solution de protéines
STA	Shine through artéfact
STEM	Scanning transmission electron microscopy
TA	Température ambiante
UF	Ultrafiltration

Liste des productions scientifiques

➤ Présentations de poster(s) : 6 posters pendant la thèse

-Le cryo-FIB-SEM-Raman de l'IMN, Nuit blanche des chercheurs, le 06/02/20, Nantes, Stereolux. Auteurs : H. Roberge, S. Ben Mhenni, N. Stephant, N. Gautier, M. Allart, P. Moreau

-[1er PRIX] : Caractérisation 2D et 3D de nanopores de membrane de filtration polymère par FIB/MEB, Poster pour le colloque RIME (Réseau d'imagerie en Microscopie Electronique, ancien RCCM), Grenoble, du 30/09 au 02/10/20. Auteurs : H. Roberge, P. Moreau, E.Couallier et P.Abellan.

-[1er PRIX] : Characterisation of selective layer and biomolecules fouling in polymeric membranes for microalgae filtration applications using 3D FIB/SEM, Microscopy Conference 2021 (MC2021), Vienna, Austria, 2021 [VISIO] Auteurs : H. Roberge, P. Moreau, E.Couallier et P.Abellan.

-Characterisation of selective layer and biomolecules fouling in polymeric membranes for microalgae filtration applications using 3D FIB/SEM, journée des doctorants de l'ED, Nantes 04/11/2022, France. Auteurs : H. Roberge, P. Moreau, E.Couallier et P.Abellan.

-Caractérisation par 3D cryo FIB/SEM de membranes de filtration polymères et de leur colmatage par des biomolécules, appliquée à la valorisation des microalgues. Auteurs : H. Roberge, P. Moreau, E.Couallier et P.Abellan. Colloque RIME (Réseau d'imagerie en Microscopie Electronique, ancien RCCM), Paris 01-03 juin 2022

- Caractérisation par cryo microscopie électronique de membranes de filtration PAN et PES et de leur colmatage par des biomolécules, application à la valorisation des microalgues. Auteurs : H. Roberge, P. Moreau, E.Couallier et P.Abellan. Congrès Mempro, Montpellier, 15-17 juin 2022.

➤ Communications à des colloques/congrès internationaux avec actes : 3 oraux pendant la thèse (M&M 2021, M&M2022 et Euromembrane 2021)

-[visio] Microscopy & Microanalysis 2021 (M&M) congrès européen Pittsburgh, Pennsylvanie, USA, 01-05 août 2021. “Characterization of selective layer and biomolecules fouling in polymeric membranes for microalgae filtration applications using 3D FIB/SEM” Auteurs : H. Roberge, P. Moreau, E. Couallier, P. Abellan

-[INVITED SPEAKER] Microscopy & Microanalysis 2022 (M&M) Portland, Oregon – USA. 31/07 au 04/08/2022, “3D Cryo-FIB/SEM for microalgae filtration applications: probing biomolecules buried inside porous polymeric media” Auteurs : H. Roberge, P. Moreau, E. Couallier, P. Abellan

-Euromembrane, “Characterization of the selective layer of PAN and PES polymeric filtration membranes using 3D FIB/SEM and flux calculation” 28/11 au 02/12/2021, Copenhagen, Danemark

➤ Publications pendant la thèse : 3 publications publiées pendant la thèse

[1er auteur], Determination of the key structural factors affecting permeability and selectivity of PAN and PES polymeric filtration membranes using 3D FIB/SEM, Journal of membrane science (JMS), 03/2022 Auteurs : H. Roberge, P. Moreau, E. Couallier, P. Abellan

[co-auteur], Charge Transport Limitations to the Power Performance of LiNi_{0.5}Mn_{0.3}Co_{0.2}O₂ Composite Electrodes with Carbon Nanotubes, Journal of The Electrochemical Society, 2021, Auteurs : S. J. Tambio^{a,b}, H. Roberge^a, J. Xionga, N. Besnard^c, M. Deschamps^b, N. Dupréa, and B. Lestrieza

[co-auteur], NaCl precleaning of microfiltration membranes fouled with oil-in-water emulsion: impact on the fouling structure, Separation and Purification Technology , 2022, auteurs : C. Rouquié, A. Szymczyk, M. Rabiller-Baudry, H. Roberge, P. Abellan, A. Riaublanc, M. Frappart, S. Álvarez-Blanco , E. Couallier

2 publications restent à soumettre.

Introduction générale

Les procédés de filtration membranaire se sont développés depuis les années 60. Ils permettent de séparer, de concentrer et de purifier différents composants d'un mélange complexe. Le rôle principal de la membrane est de permettre la perméation des composés plus petits tout en retenant les autres en raison de leur taille ou de leur charge. Les membranes sont constituées d'une fine couche sélective (couche à la surface de la membrane, en contact avec la solution à filtrer, qui assure la sélectivité de la membrane), déposée sur une structure macroporeuse permettant une perméabilité et une résistance mécanique élevées. Ces procédés ont déjà fait leur preuve dans différents domaines, comme l'agroalimentaire avec la stérilisation du lait, ou la purification de l'eau, mais aussi dans les domaines de la santé, de l'énergie. En outre, ces procédés sont intéressants car ils ne nécessitent pas de produits chimiques, ils ont une consommation énergétique relativement faible, leur mise en œuvre est simple, ils permettent de traiter de très grands volumes et ils sont facilement automatisables. C'est donc naturellement qu'ils sont étudiés pour le fractionnement de biomolécules extraites de microalgues depuis une vingtaine d'années, comme lors de précédents travaux de recherche du GEPEA. Notamment, il a été mis en évidence le potentiel des membranes organiques pour fractionner des molécules d'intérêt comme les protéines, les sucres et les lipides à partir de microalgues broyées : les lipides hydrophobes sont retenus par la membrane dans le rétentat alors qu'une fraction des protéines et des sucres solubles dans l'eau la traverse pour rejoindre le perméat.

Cependant, pendant la filtration, une accumulation de matière, appelée colmatage, se produit à la surface et dans le milieu poreux de la membrane. Ce phénomène, inéluctable en filtration membranaire, constitue le verrou principal de ce procédé quel que soit le produit traité. En effet, il peut être irréversible et entraîner une diminution du flux de perméat à travers la membrane et donc de la productivité du procédé. Il peut également modifier la sélectivité de la membrane. Bien qu'il soit le sujet de nombreux travaux dans la littérature, ce phénomène n'a pas encore été complètement élucidé par la communauté scientifique. De fait, c'est un phénomène multifactoriel, il peut être dû à des interactions physiques (topographie, rugosité de la surface, structure des pores...) ou chimiques entre la membrane et la solution, ou entre les molécules elles-mêmes. Cependant, il a été montré que les processus par lesquels le colmatage se produit dépendent de facteurs structuraux, tels que la distribution de la taille des pores de la couche sélective, la porosité de la membrane ou encore la tortuosité et la connectivité des pores.

Ainsi, une caractérisation fine des pores, et de l'organisation des biomolécules au sein du colmatage est la clé pour comprendre ce phénomène et à terme le réduire.

Bien qu'une telle caractérisation soit nécessaire pour résoudre ce défi technique, aucune méthode de caractérisation permettant de fournir une visualisation directe des détails structuraux et chimiques en 3D, avec une résolution nanométrique et en conservant l'environnement natif des membranes (pendant leur utilisation pour la filtration), n'a été montrée jusqu'à présent. Plusieurs méthodes de microscopie électronique, de spectroscopie et de préparation d'échantillons associées à des températures cryogéniques doivent être utilisées pour atteindre cet objectif. Les méthodes proposées et développées au cours de ce travail de thèse visent à répondre au manque de caractérisation existant actuellement dans l'étude du colmatage des membranes de filtration.

C'est dans ce contexte qu'une nouvelle collaboration a été initiée entre l'équipe BAM (Bioprocédés Appliqués aux Microalgues) du laboratoire GEPEA (GENie des Procédés Environnement – Agroalimentaire) et l'équipe PMN (Physique des Matériaux et Nanostructures) de l'IMN (Institut des Matériaux Jean Rouxel de Nantes), dans le cadre du projet NEXT Junior Talent e-BRIDGE, axé sur l'industrie du futur. Ce travail de thèse représente un travail interdisciplinaire dont le cœur est la microscopie électronique (IMN) et dont l'ambition est de mieux comprendre des questions clés pour les sciences des membranes (GEPEA). Il se situe donc à l'interface entre les deux disciplines et vise à mettre au point des méthodes originales pour caractériser ces milieux poreux constitués de matériaux sensibles (polymères et biomolécules) non seulement pour fournir une caractérisation détaillée des membranes de filtration et de la structure du colmatage, mais aussi pour étudier la relation entre la structure et les propriétés/fonctionnalités des membranes.

La microscopie électronique (ME) permet d'observer et d'analyser des membranes à des échelles différentes (du nanomètre à plusieurs centaines de micromètres) avec une résolution nanométrique. D'une part, le microscope électronique à balayage (MEB) est couramment utilisé pour une visualisation directe de la structure surfacique du matériau, il donne des images de haute qualité (taille de pixel de quelques nanomètres) avec un large champ de vision (plusieurs centaines de micromètres) pour des temps d'acquisition courts et une préparation d'échantillon rapide. Il est généralement utilisé pour l'imagerie de la surface ou des sections transversales des membranes. De plus, lorsqu'un MEB est couplé à un FIB (Focused ion beam), un faisceau ionique peut couper la matière observée par MEB sur quelques nanomètres d'épaisseur. Ainsi, en alternant coupe avec le FIB et imagerie par MEB, il devrait être possible de caractériser la

structure nanoporeuse 3D du matériau et, en définitive, de connaître la morphologie 3D des pores (taille, porosité, tortuosité...) avec une résolution cubique de quelques nanomètres, comme, par exemple, avec les travaux de Brickey et al (2021) sur des filtres à virus¹. De manière complémentaire, la microscopie électronique en transmission (MET) permet d'atteindre les détails nanométriques, comme montré sur des membranes d'osmose inverse propres². Cette technique serait particulièrement intéressante pour caractériser les plus petits pores de la couche sélective de la membrane, notamment, grâce à l'emploi du mode STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) qui permet d'atteindre des résolutions inférieures au nanomètre et d'analyser les structures les plus fines. En outre, lorsque la ME (MEB ou MET) est combinée à une analyse par spectroscopie EDX (Energy Dispersive X-rays), on peut simultanément obtenir des informations chimiques sur l'échantillon. Cela pourrait être utile pour localiser les différents composés impliqués dans le colmatage et les différencier du matériau membranaire. Enfin, lorsque ces techniques sont disponibles en conditions cryogéniques (l'échantillon refroidi et, observé à des températures entre -140 et -200 °C), il est possible d'observer des structures fragiles en limitant les dommages. Ainsi, les dommages sur l'échantillon sont minimisés et la structure native du matériau est conservée.

Cependant, l'utilisation de la ME pour caractériser, dans un premier temps, les membranes propres et, dans un second temps, les membranes colmatées, relève d'un véritable défi particulièrement au début de ce travail. En effet, du fait que les membranes polymères et les biomolécules constituant le colmatage sont **amorphes** et présentent **peu de contraste** ainsi qu'une **forte sensibilité au faisceau d'électrons**, l'acquisition des données est particulièrement difficile. L'acquisition de données 2D ou 3D de tels échantillons nécessite un contrôle rigoureux et une optimisation des paramètres expérimentaux. De surcroît, la reconstruction 3D de milieux poreux présente un problème commun et connu : **l'artéfact de « shine through »**, où le matériau des tranches ultérieures est imagé à travers les pores, ce qui entraîne une déformation des pores sur l'image (dans la direction de la coupe FIB). Enfin, concernant l'imagerie des membranes colmatées, d'autres challenges doivent être pris en compte. Du fait que les biomolécules contiennent les mêmes éléments légers que les polymères (carbone, oxygène, azote) et présentent un faible contraste, il est **difficile à l'image de les différencier** entre elles et du matériau polymère. La mise au point de **marquage spécifique** sur les biomolécules, en amont de leur observation au microscope, est alors nécessaire. Enfin, les **conditions cryogéniques** (ou les cryotechniques), très utiles pour limiter les dommages sur les échantillons fragiles, sont **difficiles à mettre en place**, car elles requièrent un niveau avancé d'équipement,

d'expertise, et une préparation d'échantillon rigoureuse pouvant inclure des biais. Elles n'ont d'ailleurs été décrites que récemment dans la littérature.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse présentent le développement et la mise au point de techniques de (cryo) microscopie électronique pour la caractérisation des membranes de filtration et de leur colmatage. Toutes les techniques de microscopie électronique sont disponibles à l'IMN (à l'exception de l'instrument de cryofixation des échantillons HPF, MRic Rennes) et les méthodes spécifiques aux membranes organiques sont établies et utilisées, pour la première fois dans notre laboratoire, au cours de ces travaux de thèse (excepté pour le (S)TEM).

Les principaux objectifs de ces travaux sont de :

- Caractériser en 3D les membranes propres par ME (d'abord à température ambiante et ensuite en conditions cryogéniques pour évaluer l'effet de la préparation des échantillons) afin de décrire la structure et la couche sélective des membranes, identifier les points structuraux clés influençant les performances de la membrane et son colmatage (taille des pores, porosité, tortuosités, etc.), le tout en évitant les artefacts et les dommages.

- Proposer de nouvelles méthodes utilisant la microscopie électronique et la spectroscopie EDX pour permettre la caractérisation d'une membrane colmatée directement, ou après marquage des biomolécules et pour caractériser l'interface membrane/colmatage : cela inclut la mise au point d'une technique de marquage par métaux lourds pour permettre l'identification et la différenciation des biomolécules du colmatage, l'utilisation de techniques comme le MEB-EDX pour caractériser le colmatage à la surface d'une membrane colmatée et la caractérisation de l'interface membrane/colmatage par STEM-HAADF en conservant l'aspect natif de l'échantillon.

- Caractériser les membranes colmatées en 2D puis 3D par cryo-ME : identifier et caractériser le colmatage externe et interne des membranes de filtration polymères. Comprendre les mécanismes clés impliqués dans la formation du colmatage.

Le travail présenté ici nécessite la filtration de mélanges de biomolécules stables, avec une composition et des propriétés (conductivité, pH, concentration...) maîtrisées et similaires. Ainsi, sur la base de précédents travaux du laboratoire GEPEA, des mélanges modèles ont été utilisés avec des compositions simplifiées (lipides et protéines) représentant des extraits de microalgues et mis au point précédemment.

Ce manuscrit est divisé en 5 chapitres. Le chapitre 1 est une synthèse bibliographique fournissant des informations contextuelles sur la filtration membranaire, le colmatage des membranes ainsi que la caractérisation des membranes et du colmatage par ME. Le chapitre 2 décrit le matériel et les méthodes utilisées pour cette étude, présente les techniques de microscopie et expose les développements méthodologiques mis en place pour répondre aux différents défis techniques. Les chapitres 3, 4 et 5 présentent les résultats, rédigés sous forme d'articles (un publié et deux en préparation). La figure 1 donne une vue d'ensemble de la stratégie mise en œuvre et des défis relevés pendant la thèse sur la caractérisation des membranes de filtration propres et colmatées.

Le chapitre 3 intitulé « Détermination des facteurs structuraux clés affectant la perméabilité et la sélectivité des membranes de filtration polymères PAN et PES en utilisant le 3D FIB/ MEB à température ambiante » présente la caractérisation des membranes propres par 3D FIB/MEB. Il s'agit d'une traduction de l'article publié dans Journal of Membrane Science (JMS) cette année (Roberge et al, 2022). L'objectif est d'identifier la couche sélective de la membrane et de caractériser les pores qui participent réellement à la filtration. En raison de la sensibilité de l'échantillon au faisceau d'électrons et de l'effet de l'artéfact de « Shine through » qui se produit sur ces milieux poreux, cette étude était un véritable défi. La possibilité de lier les résultats avec des modèles largement utilisés tels que l'équation de Hagen-Poiseuille a également été discutée.

Le chapitre 4 s'intitule « Nouvelles méthodes pour l'identification et la différenciation de biomolécules sur des membranes colmatées en utilisant la microscopie électronique conventionnelle ». Ainsi, l'identification du colmatage externe et l'obtention d'informations sur le colmatage interne par MEB-EDX, le marquage des biomolécules (lipides et protéines) en solution par des métaux lourds et l'étude de l'interface membrane/colmatage par STEM-HAADF à haute résolution sont présentés. Concernant la méthode de marquage, la différenciation des biomolécules en solution, par 2D MET et cryo-MEB, est démontrée et applicable dans différents domaines. Des essais de filtration frontale simples montrent l'intérêt de cette méthode pour caractériser les biomolécules au sein du colmatage.

Enfin, le chapitre 5 « Caractérisation par (cryo) ME de membranes PES colmatées par des biomolécules (lipides et protéines) » présente la caractérisation des membranes colmatées en filtration tangentielle par cryo 3D FIB/MEB. Il est à noter qu'une différenciation des biomolécules n'a pas été possible dans le chapitre 5, en raison de difficultés techniques. Pour ces travaux, les cryotechniques ont dû être initiées dans notre laboratoire. De plus, étant donné le caractère amorphe, le peu de contraste et la forte sensibilité des membranes polymères et des

biomolécules, un contrôle et une optimisation rigoureux des paramètres expérimentaux ont été nécessaires. Enfin, la mise en place et l'utilisation de protocoles de reconstruction adaptés nous ont permis d'accéder à l'organisation en trois dimensions du colmatage de la membrane. Grâce à ces nouvelles méthodes, différents types de colmatage (interne et externe) ont pu être mis en évidence. En outre, les mécanismes de formation ont été discutés, et l'impact du colmatage sur la structure et les performances de la membrane a été analysé.

À la fin du manuscrit, une conclusion générale est proposée, la stratégie de la thèse est rappelée, l'ensemble des méthodes innovantes mises au point et les résultats originaux obtenus sont résumés. Puis les perspectives qu'il reste à explorer sont envisagées : que ce soit pour l'application des méthodes développées afin d'avancer dans la caractérisation du colmatage des membranes par les biomolécules, ou pour le développement de nouvelles techniques originales permettant d'aller encore plus loin dans l'analyse du colmatage et de ses biomolécules dans leur état natif.

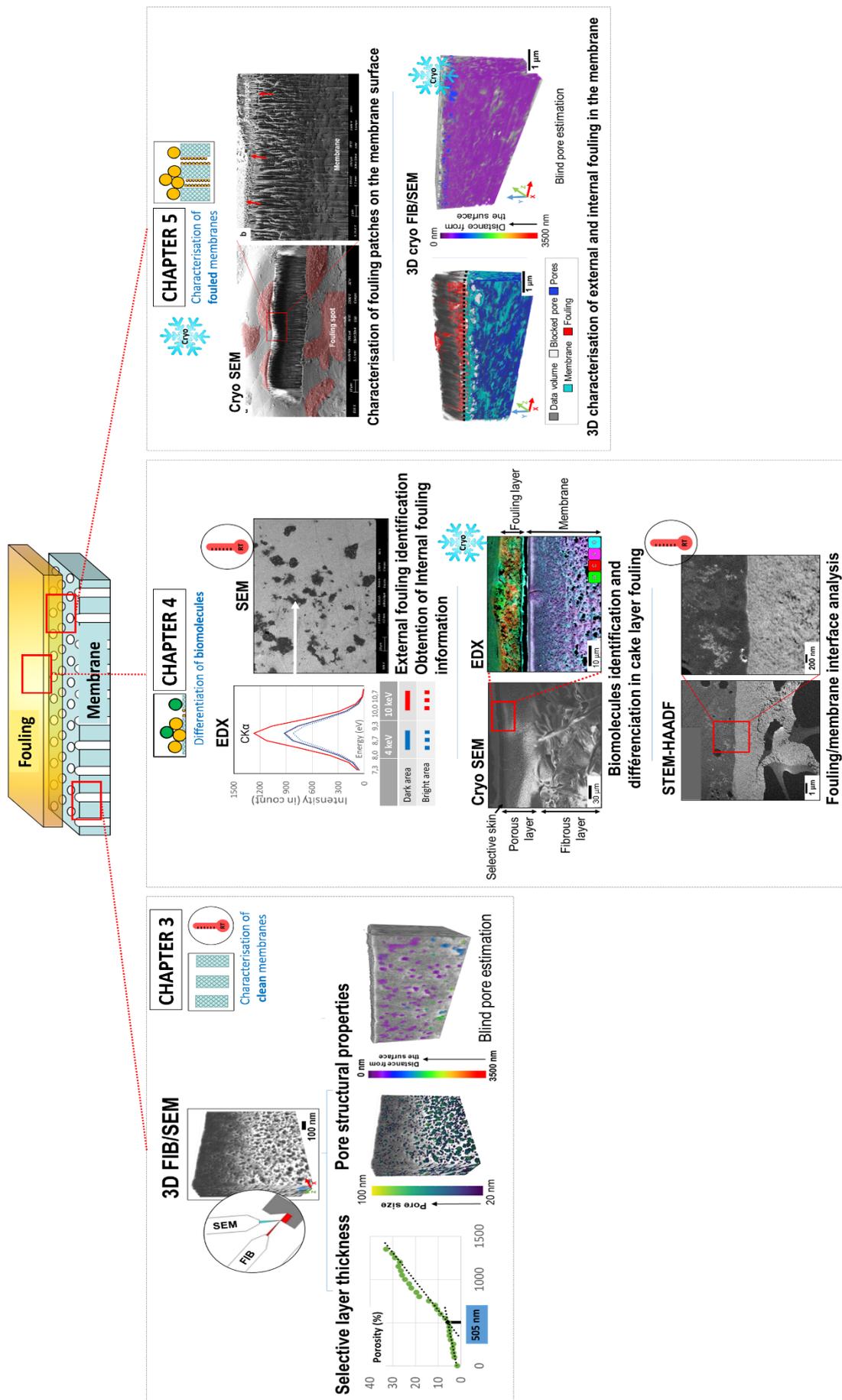


Figure 1 : Stratégie de ces travaux de thèse

Chapitre 1 : Etat de l'art, contexte général et scientifique :

1.1 Généralité sur la filtration membranaire et les membranes

1.1.1. Définition

La filtration membranaire consiste à utiliser des membranes poreuses organiques ou

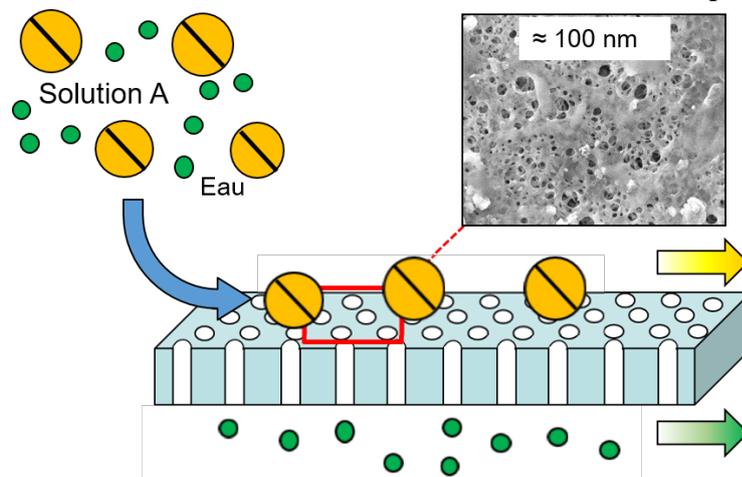


Figure 1.1 : Schéma de la filtration membranaire.

minérales pour extraire, concentrer ou séparer des composés d'un mélange complexe. Dans le cas des procédés baromembranaires, la membrane est une barrière sélective permettant de laisser passer ou de bloquer certains éléments, sous l'effet d'un gradient de pression. La sélectivité de la membrane se fonde essentiellement sur la taille des molécules (liée au poids moléculaire) ou la charge. La distribution de la taille des pores, leur structure et la composition chimique de la membrane jouent donc un rôle dans la rétention ou la transmission des composés³. En filtration tangentielle, la solution d'alimentation circule parallèlement à la membrane. Sous l'effet de la différence de pression entre l'amont et l'aval de la membrane (gradient de pression ΔP , ou pression transmembranaire (PTM)), une partie de la solution, appelée « perméat », passe au travers de la membrane tandis que l'autre, appelée « rétentat », est retenue⁴. La filtration se passe au sein d'un module de filtration, étanche, supportant la PTM et offrant une surface de filtration variable suivant la géométrie et la taille de l'installation. La figure 1.1 illustre ce procédé simplifié sous forme de schéma.

Plusieurs catégories de filtration baromembranaire existent et sont employées dans de nombreux domaines comme l'agroalimentaire (par exemple : la stérilisation du lait⁵) ou encore le traitement de l'eau⁴. Les membranes employées sont classées parmi 4 groupes en fonction de la taille des pores et de la PTM nécessaire à leur emploi : la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (reverse osmosis, RO). Différents matériaux et géométries sont employés pour la fabrication des membranes. Les différentes catégories, en fonction des paramètres fonctionnels (taille des pores ou seuil de coupure, pression et perméabilité) et du type d'application, sont présentées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Classification des membranes de filtration, d'après Aimar et Daufin (2004), Berk (2009) et Zaouk (2018)⁶⁻¹¹

Processes	Average pore size/retained compounds molar mass	Operation pressure (bar)	$L_{p_{H_2O}}$ (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)	Applications : retained products
Microfiltration	0,1-10 µm	0.5 – 1	300 à 1500	Bacteria, colloids, emulsions
Ultrafiltration	2-100 nm	1 – 5	50-100	Polymers, proteins, colloids
Nanofiltration	>350 Da	10 – 40	2.5-5	Organic molecules (pesticides, herbicides, etc.), multivalent ions
Reverse osmosis	-	30 - 80	0.5-1.5	Small molecules and salts

1.1.2. Les membranes polymères

1.1.2.1. Les matériaux :

Des polymères, comme la cellulose, le polyamide, le polyethersulfone (PES, (C₁₂H₈O₃S)_n), le polyacrylonitrile (PAN, CH₂-CHCN) ou le polyfluorure de vinylidène (PVDF), peuvent composer des membranes dites organiques (MO). Elles sont les plus employées du marché étant donné leur bas coût, leur compacité (grande surface dans un volume limité), et la disponibilité d'une large gamme de tailles de pores et de géométries (planes, tubulaires, spiralées et fibres creuses)¹⁰. Il existe aussi des membranes minérales constituées d'un support de céramique ou de carbone graphite sur lequel est déposée une couche filtrante d'oxydes de titane, de zirconium ou d'aluminium⁴. Bien qu'elles présentent des caractéristiques de résistance chimique et thermique plus importante que les membranes organiques (MO) (pH des solutions traitables de 0 à 14 contre 2 à 12 pour la plupart des MO, température maximum 300°C contre 50°C et une

grande compatibilité avec les solvants organiques, leur conférant une durée de vie plus importante), ces membranes occupent une plus grande surface pour une même surface filtrante et sont beaucoup plus chères. Les membranes organiques présentent des caractéristiques adaptées à la filtration de grand volume (exemple : traitement des eaux¹²) tandis que les membranes minérales sont plus couramment utilisées dans l'industrie agroalimentaire¹³, mais aussi pharmaceutique par exemple.

1.1.2.2 Les géométries

Il existe plusieurs géométries de membrane, en fonction de leur application. Par exemple, comme montré dans la figure 1.2, il existe des membranes planes (Fig 2a), tubulaires (Fig 2b), spiralées (Fig 2c) ou à fibres creuses (Fig 2d). Les membranes planes sont couramment utilisées dans les laboratoires via des modules de filtration car elles peuvent être découpées à la taille de ceux-ci. La forme tubulaire, très employée pour les membranes céramiques, permet de faire circuler des solutions d'alimentation à grande vitesse tangentielle ou de traiter des solutions visqueuses. Les modules spiralés sont constitués d'un tube perforé autour duquel plusieurs membranes s'enroulent (forme spiralée), séparées par des espaceurs permettant la circulation du perméat et du rétentat. En raison de leur conditionnement dense, ces modules sont adaptés à la filtration de solutions peu visqueuses. Enfin, les fibres creuses, à simple ou double peau (côté sélectif), sont constituées principalement de polymère. Elles sont compactes, peu coûteuses et adaptées aux fluides de faible viscosité.

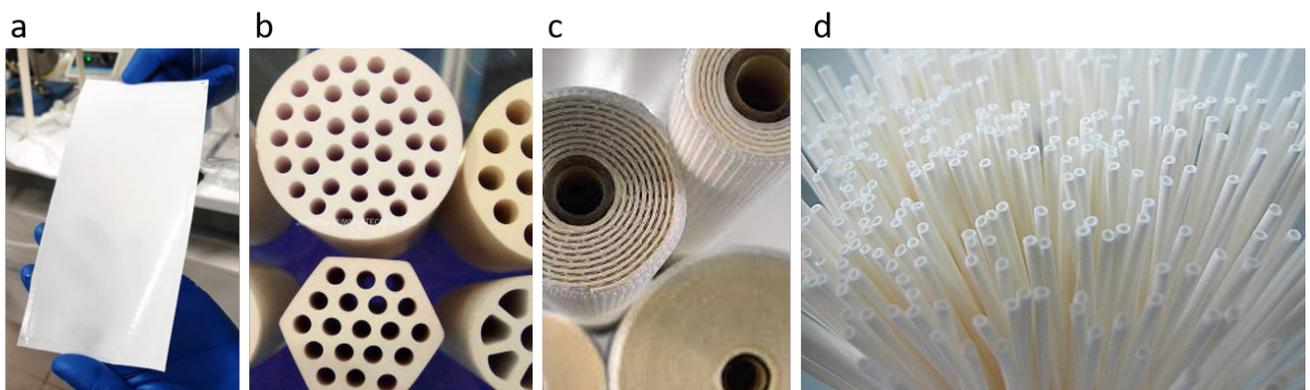


Figure 1.2 : Les différentes géométries des membranes de filtration (a) feuille plate, (b) tubulaire, (c) spirale et (d) fibre creuse.

1.1.2.3 La structure de la membrane

Les membranes peuvent présenter une ou plusieurs couches, plus ou moins complexes, assurant des propriétés de sélectivité, perméabilité et de résistance mécanique différente. On parle de membrane symétrique, asymétrique et composite¹⁴. Les membranes symétriques sont

composées d'une simple couche homogène d'un même matériau. Les membranes asymétriques sont composées d'un seul matériau, mais dont la structure change (par exemple : le passage de pore fin à des pores larges est le plus fréquent). Enfin, les membranes composites présentent des couches constituées de matériaux de natures différentes.

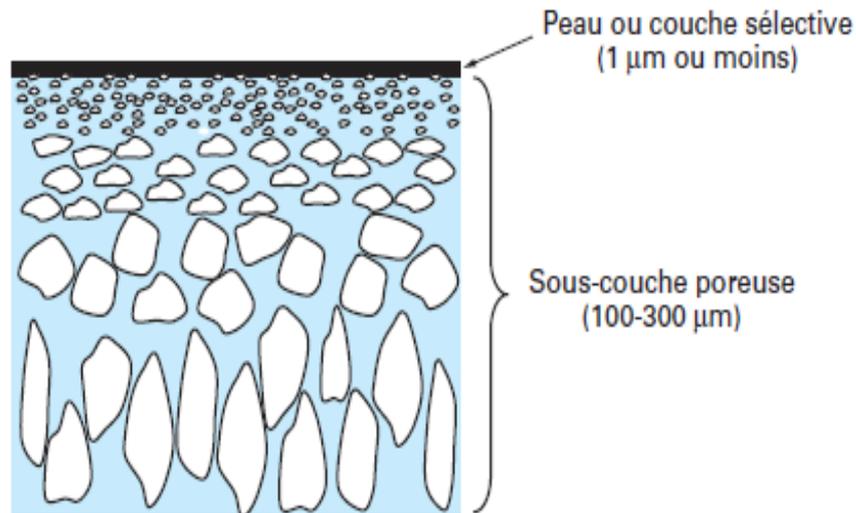


Figure 1.3 : Morphologie d'une membrane de filtration asymétrique d'après Remigy et Desclaux (2007)

La première couche de la membrane en contact avec le fluide à filtrer, illustrée en figure 1.3, est appelée couche sélective dans le cas des membranes de MF et UF. Elle peut se présenter comme une couche (épaisseur spécifique avec les pores les plus petits et proches de la surface de la membrane) ou bien une peau (couche fine comprenant seulement les pores connectés à la surface de la membrane)¹⁴⁻¹⁶ qui assure la sélectivité et la perméabilité de la membrane. Le terme de « couche active » quant à lui est préférentiellement utilisé dans le cas des membranes d'osmose inverse qui ne font pas l'objet de cette étude¹⁷.

1.1.3 Les différentes conditions hydrodynamiques de filtration

Il existe trois conditions hydrodynamiques de filtration principales, illustrées dans la figure 1.4 : la filtration frontale (dite « dead-end filtration »), tangentielle (dite « cross-flow filtration ») et dynamique (dit « shear-enhanced filtration »)⁶. La filtration frontale, où le fluide passe perpendiculairement à travers la membrane, a une seule entrée (alimentation et rétentat) ainsi qu'une sortie séparée (perméat). Elle donne lieu à la formation rapide d'un dépôt à la surface de la membrane et par conséquent à une diminution du flux. La filtration tangentielle

permet un écoulement de la solution à filtrer le long de la surface de la membrane (tangentiellement), ce qui limite l'accumulation de matière à la surface de la membrane et stabilise le flux ⁸. Enfin, la filtration dynamique consiste à faire bouger la membrane ou un disque à sa surface pendant la filtration. Le cisaillement est augmenté/amélioré, induisant la dispersion des solutés et la limitation du colmatage de la membrane.

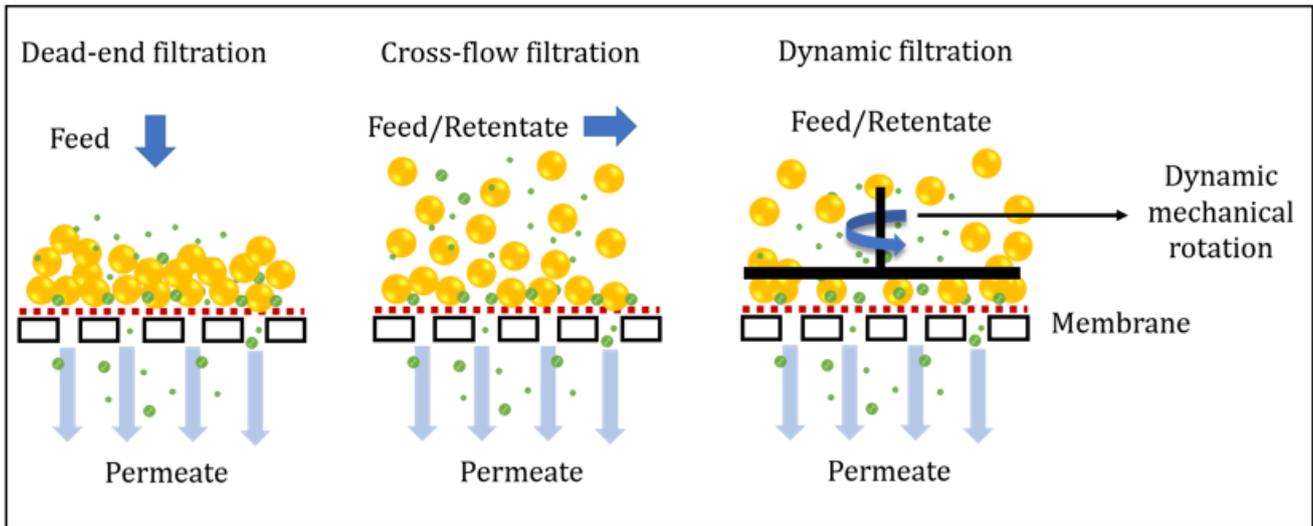


Figure 1.4 : Les procédés de filtration membranaire, d'après la thèse de Shuli Liu (2021) et les travaux de Berk (2009).

1.1.4 Les performances de la filtration

Les performances de la membrane sont décrites par plusieurs paramètres : sa perméabilité et sa sélectivité (les deux dépendants de la couche sélective, première couche de la membrane en contact avec le fluide à filtrer), qui dépendent du produit à filtrer, du matériau, mais aussi des conditions opératoires telles que la pression transmembranaire, la température et la vitesse tangentielle utilisées dans le module de filtration.

1.1.4.2 La perméabilité et la sélectivité

La **perméabilité** (L) est le débit volumique de perméat qui passe au travers de la membrane par unité de pression (Pa), de surface (m^2) et de temps (s). C'est ce qui définit la productivité de la membrane⁸. Elle est liée à la taille et à la densité des pores de la membrane ainsi qu'à l'épaisseur de sa couche sélective¹⁴. Elle est définie par l'équation :

$$(Eq.1) \quad L = J/\Delta P$$

Où J est le flux de perméat traversant la membrane par unité de surface (en $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$) et ΔP la pression transmembranaire (en bar).

Le flux, J , peut être mesuré à l'échelle du laboratoire et il peut également être estimé dès que les détails structurels de la couche sélective sont connus (taille des pores, densité, tortuosité et épaisseur), à l'aide de modèles simples largement appliqués, tels que l'équation de Hagen-Poiseuille (modèle H-P). Dans ce cas, on suppose un matériau homogène, où les pores sont des cylindres, identiques et complètement ouverts. Le modèle H-P définit le flux par l'équation :

$$(Eq. 2) \quad J = \frac{\varepsilon d^2}{32\tau} \times \frac{\Delta P}{\mu \cdot \delta y} = K \times \frac{\Delta P}{\mu \cdot \delta y}$$

Où δy est l'épaisseur de la couche sélective de la membrane (m), d le diamètre des pores (m), τ leur tortuosité (-), ΔP la pression transmembranaire (Pa), ε la porosité (-), et μ la viscosité (Pa · s). La perméabilité intrinsèque de la couche sélective, K (m^2), est définie par l'équation Eq. 3

$$(Eq.3) \quad K = \frac{\varepsilon d^2}{32\tau}$$

Ainsi, ce modèle ne tient pas compte de certaines limites, comme dans le cas de membranes asymétriques réelles présentant une morphologie complexe, où certains des pores peuvent être bloqués, ni du rôle du matériau polymère dans la mouillabilité de la membrane par l'eau.

La **sélectivité** est la capacité de la membrane à laisser passer ou à retenir un composé. En filtration membranaire avec des membranes poreuses (MF, UF, NF), la sélectivité de la membrane dépend du diamètre des pores à la surface de la couche sélective de la membrane et de l'affinité des biomolécules envers le polymère^{8,14}. Pour les seuils de coupure les plus faibles, la charge superficielle de la membrane intervient également.

1.1.4.3 La pression critique

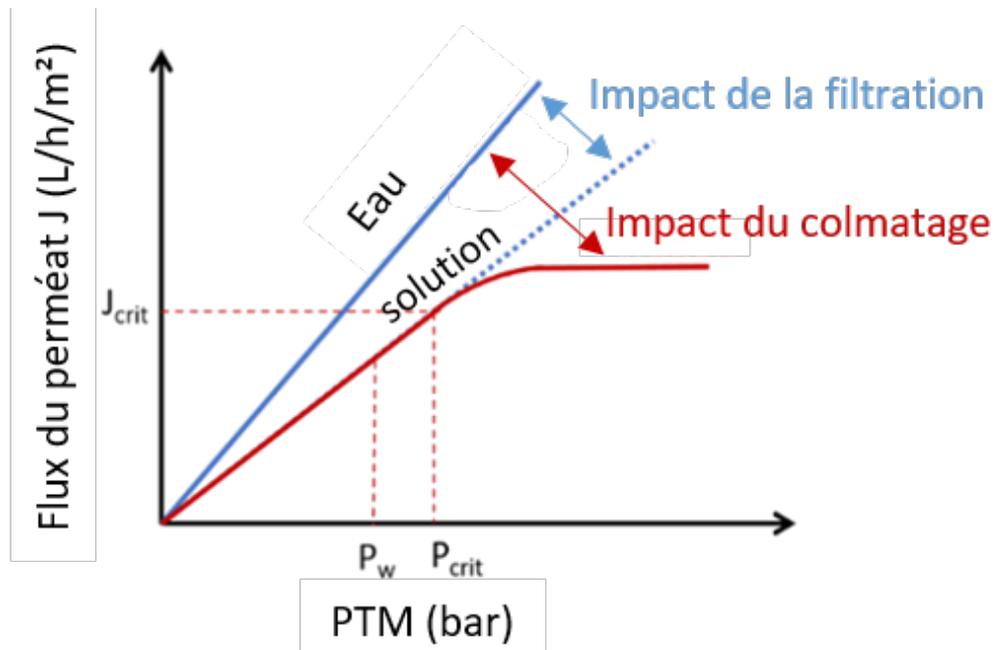


Figure 1.5 : Le flux de la membrane en fonction de la PTM pendant la filtration d'eau pure et de solution de matière en suspension. J_{crit} : flux critique ; P_{crit} : pression critique, P_w : pression de travail =90% de la pression critique. (d'après les travaux de thèse de Shuli Liu (2017-2021).

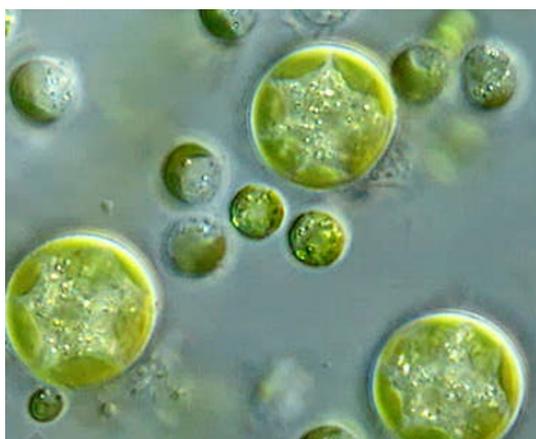
Dans le module de filtration, une pression transmembranaire est appliquée pour permettre à la solution filtrée de passer à travers la membrane. Le colmatage des pores de la membrane par accumulation de matière, et donc la diminution du flux peut être limité en utilisant une PTM en dessous d'un certain seuil, appelé pression critique¹⁸. La figure 1.5 présente le flux de perméat à travers une membrane en fonction de la PTM pour de l'eau et une solution contenant des composés retenus par la membrane. En dessous de la pression seuil (P_{crit}), le flux de perméat augmente linéairement avec la PTM, mais la pente (la perméabilité) est plus faible que celle de l'eau (colmatage modéré de la membrane), tandis qu'au-dessus de la pression critique, le flux n'augmente presque plus avec la pression (colmatage important). Dans les précédents travaux du GEPEA (Rouquié et al¹⁹ et Liu et al⁶), ainsi que dans cette étude, une pression de travail (90% de la pression critique) a été choisie afin de travailler dans des conditions optimales de filtration. Il est à noter que la pression critique dépend des propriétés du produit à filtrer (composition, interactions, etc.) et des propriétés du matériau (porosité, taille des pores, rugosité, nature du polymère et charge de surface). Elle a été déterminée lors de travaux précédents dans des conditions de filtration identiques à celles utilisées dans cette étude. Ainsi, les membranes caractérisées dans cette étude montrent les mêmes conditions de formation du colmatage que les études précédentes (structure, colmatage externe ou interne...).

1.2 Application : valorisation des microalgues

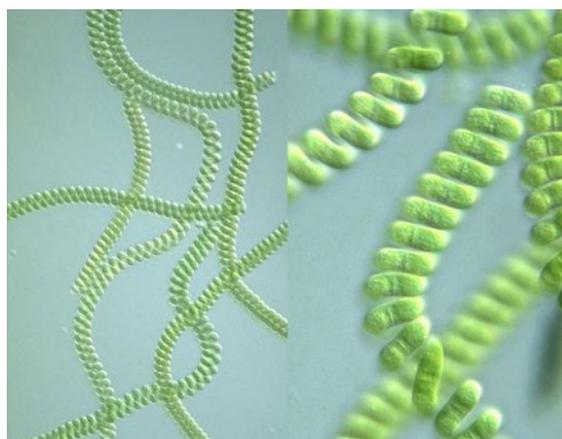
Il existe de nombreuses applications des procédés membranaires dans l'industrie. Au sein du laboratoire GEPEA, les procédés membranaires sont étudiés pour le fractionnement de biomolécules issues de microalgues. Cette application est présentée dans les paragraphes suivants.

1.2.1 Caractéristiques, production et enjeux

Les microalgues (voir figure 1.6) sont des micro-organismes unicellulaires, photosynthétiques (pouvant transformer le dioxyde de carbone en biomasse et en molécules d'intérêt)⁴ qui vivent et se développent dans les milieux aqueux (eau douce ou salée)^{6,20,21}. Bien qu'elles soient connues depuis des siècles par l'homme, la recherche et les biotechnologies utilisant ces micro-organismes ne s'y intéresseront que dans les années 50 à des fins agro-alimentaires²². Aujourd'hui, la production mondiale de microalgues est estimée à près de 15000 tonnes par an²³ avec des domaines d'application divers, comme l'énergie, l'alimentation, la pharmaceutique et la cosmétique.



chlorella vulgaris



spiruline

Figure 1.6 : Différentes variétés de microalgues, de gauche à droite : microalgues vertes, *chlorella vulgaris* riche en protéines et une cyanobactérie, la *spiruline*.

L'emploi et le développement de la recherche sur les microalgues sont expliqués par l'intérêt de leur composition. Une large diversité de molécules d'intérêt est présente en grande quantité et variable selon les espèces. On trouve notamment des protéines, des lipides, des acides aminés, des antioxydants, des polysaccharides (sucres), des vitamines ou encore des pigments²³⁻²⁵. Cette composition varie aussi selon les conditions de culture comme la température, la lumière ou la salinité de l'environnement²⁶. Grâce à cette composition riche, les

microalgues peuvent être directement consommées (par exemple en complément alimentaire), ou bien transformées pour d'autres applications (énergie, pharmaceutique...)²³.

Une grande productivité surfacique de biomasse (supérieure à celles des plantes terrestres) et la non-nécessité de sols fertiles confèrent aux microalgues un potentiel d'innovation important, sans concurrence avec l'agriculture. C'est le cas pour les nombreux marchés de niches en expansion, comme le domaine des cosmétiques et de la pharmacie, mais aussi de plus vastes marchés en rapport avec le contexte mondial : l'énergie et la nutrition²³. Par exemple, certaines microalgues sont capables de stocker jusqu'à 50% de leur poids sec en lipides²⁷. D'après Mata et al. (2010)²⁸, ces micro-organismes sont une source potentielle et prometteuse de biocarburants de 3e génération.

Depuis ces dernières années, les travaux de recherches se sont intensifiés au sujet de l'utilisation et de la valorisation des microalgues ainsi que de leurs composés, comme le montre la bibliométrie de la figure 1.7.

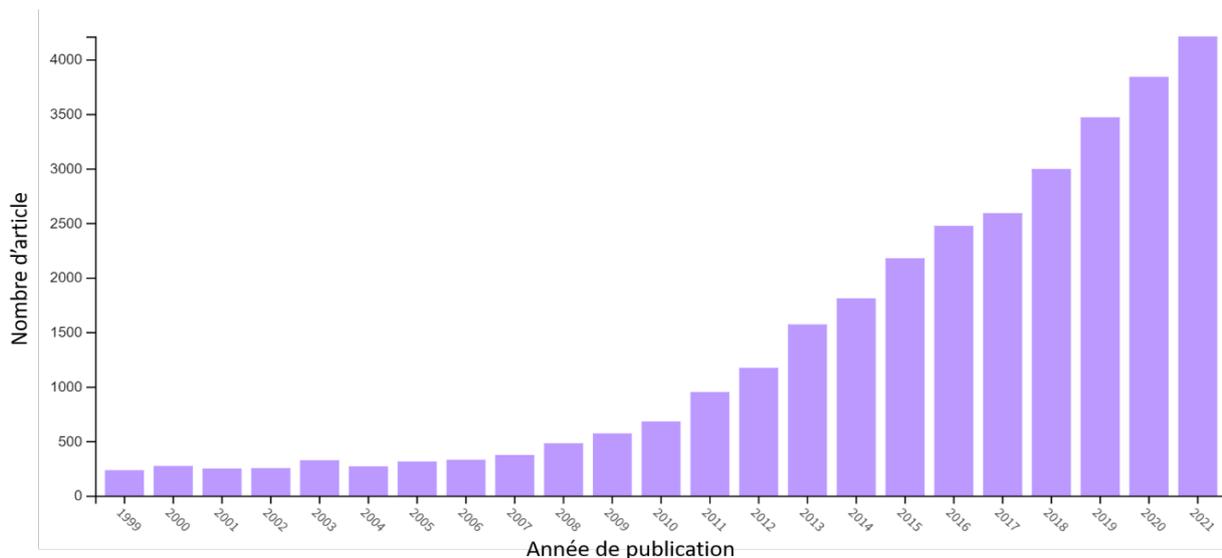


Figure 1.7 : Bibliométrie sur l'étude des microalgues (base de donnée "Web Of Science" WOS).

1.2.2 L'emploi des procédés de filtration membranaire pour la valorisation des microalgues

L'extraction des molécules d'intérêt provenant des microalgues, comme les lipides par exemple, nécessite plusieurs étapes : (1) la récolte et la concentration des microalgues, (2) La lyse des cellules pour libérer les molécules (par broyage par exemple) et (3) le fractionnement, qui permet de purifier et d'isoler les molécules cibles.^{4,6} L'ensemble de ces étapes, appelé bioraffinage, représente une cascade de procédés délicate à mettre en œuvre (coût, extraction

sans dommage, pureté des composés, etc.), particulièrement à l'échelle industrielle, malgré le fort potentiel des biomolécules issues de microalgues.

La filtration membranaire est un procédé qui a commencé à être appliqué au bioraffinage des microalgues dans les années 2000²⁹ et qui a pris de l'ampleur ces dernières années. Elle peut être utilisée pour les trois étapes sus-citées mais elle l'est particulièrement pour la récolte et la concentration des microalgues²⁹⁻³¹. Le fractionnement des biomolécules comme les lipides et les protéines par filtration membranaire s'est développé depuis quelques années seulement³². En effet, ces procédés délicats nécessitent des travaux d'approfondissement et d'optimisation.

Dans d'autres secteurs, la filtration membranaire a fait ses preuves pour le fractionnement de solution de protéines et de lipides provenant d'autres sources (par exemple : le traitement d'émulsion³³ et la purification d'huile végétale³⁴). C'est donc naturellement que ces procédés ont été appliqués pour le fractionnement des lipides et des protéines extraites de microalgues, à partir de microalgues broyées^{35,36}. Notamment, il a été mis en évidence le potentiel des membranes organiques pour isoler ces molécules d'intérêt (blocage des lipides et passage des protéines et des sucres) d'un mélange complexe ou de surnageant de broyat réel⁶. Parmi les différents types de membranes polymères intéressantes pour la valorisation des microalgues, nous pouvons citer les membranes d'UF en polyacrylonitrile (PAN) et les membranes de MF en polyéthersulfone (PES). En effet, ces deux types de membranes présentent un intérêt pour le fractionnement des lipides et des protéines³⁷⁻³⁹ extraits de microalgues. Elles sont disponibles dans le commerce et sont déjà largement utilisées pour d'autres applications. Les membranes en PAN sont bien adaptées à la filtration des lipides grâce à leurs propriétés hydrophiles³⁹ tandis que les membranes en PES sont largement utilisées pour le fractionnement des protéines⁴⁰. Elles font l'objet de cette étude.

1.2.3 La filtration de mélanges modèles complexes

1.2.3.1 Définition et intérêts

Pour évaluer les performances de la filtration membranaire pour la valorisation des microalgues, il faut une grande quantité de biomasse. Par exemple, dans le cas d'une étude sur *Chlorella vulgaris*, 1 litre d'extrait de microalgues concentré à filtrer est obtenu avec ≈ 20 L de culture réalisée pendant plusieurs semaines, sachant qu'elle présente des variabilités de composition⁶. L'accès à une grande quantité de biomasse de composition stable est donc très difficile. C'est pourquoi, lors des travaux de thèse précédents (Erika Clavijo Rivera (2014-

2017) et Shuli Liu (2017-2021)), des mélanges modèles avec des compositions simplifiées représentant des extraits de microalgues ont été mis au point afin d'approfondir l'étude du procédé membranaire. Ce sont des mélanges stables, avec une composition et des propriétés (conductivité, pH, concentration...) maîtrisées et reproductibles. Or, le travail présenté ici est soumis à des contraintes similaires : si l'on veut mettre en évidence le rôle de chaque composé dans le colmatage des membranes par des caractérisations fines, et réaliser des expériences comparables entre elles, il est indispensable de maîtriser la composition des mélanges filtrés. Les mélanges développés précédemment pourraient donc être utilisés pour permettre une meilleure compréhension de l'impact d'extraits de microalgues, particulièrement les lipides et les protéines, sur les performances de la filtration membranaire^{4,6,41}.

Dans cette partie, sont décrits les différents mélanges modèles de lipides (ii), protéines (iii) et mélanges de lipides et protéines (iv) utilisés dans cette étude. Les autres composants extraits des microalgues, comme les polysaccharides, pigments, sels..., ne sont pas étudiés dans le but de garder une approche simplifiée. Il est à noter que ces éléments devront être pris en compte en cas de caractérisation de mélanges réels.

1.2.3.2 Les lipides

Dans les microalgues étudiées, les lipides occupent plusieurs rôles comme le stockage d'énergie ou la structure de la membrane cellulaire. Ils peuvent être valorisés, par exemple, comme biocarburant pour remplacer les carburants actuels dérivés du pétrole²⁷, ou comme antioxydants (lipides polyinsaturés). Clavijo et al (2017)⁴¹, a caractérisé des extraits de microalgues utilisés pour la production de biocarburants. Ils contiennent deux types de famille de lipides : les lipides neutres (triglycérides) et les lipides polaires (glycolipides et phospholipides). Ces extraits peuvent être assimilés à une émulsion de lipides dans l'eau. Une émulsion est un mélange de deux liquides non miscibles (fines gouttelettes de l'un dans l'autre, ici gouttelettes d'huile dans de l'eau)⁴. L'émulsion est stable grâce à la présence d'émulsifiants ou de tensioactifs (ici les lipides polaires), qui stabilisent l'interface huile-eau des gouttelettes de lipides^{6,42}. Dans cette étude, une émulsion de lipides constituée d'un mélange d'huile végétale stabilisée avec de la lécithine de soja, dans une phase aqueuse de pH et de conductivité proche de celle d'un milieu de culture d'eau douce, est utilisée pour simuler les lipides extraits de microalgues lors de la filtration membranaire. Les huiles végétales apportent les lipides neutres et la lécithine (émulsifiant) les lipides polaires. Dans les travaux précédents, les conditions de conception de l'émulsion ont été choisies de façon à obtenir le même ordre de grandeur de taille des

gouttelettes de lipides (de 0,1 à 300 µm de diamètre), entre le mélange modèle et les extraits de microalgues et une stabilité dans le temps^{2,4,23}. Le travail présenté ici s'appuie sur ce mélange modèle pour la caractérisation des lipides et leur comportement lors de la filtration membranaire.

1.2.3.3 Les protéines

Deuxième famille de molécules cibles de cette étude, les protéines sont des macromolécules constituées d'un ensemble d'acides aminés assemblés en chaînes qui se replient pour former la structure secondaire, s'organisent en 3 dimensions (structure tertiaire) et forment des agrégats entre elles associées par des liaisons faibles (structures quaternaires). Elles contiennent des acides aminés essentiels, présentent des propriétés antioxydantes ou sont utiles à la régulation du diabète⁴³ et par conséquent présentent beaucoup d'applications possibles dans la pharmacie ou l'agroalimentaire^{12,24}. Ce sont des molécules complexes, qui évoluent dans le temps et en fonction des conditions environnementales (température, pH, concentration...) et elles forment des liaisons hydrogène, des agrégats, ainsi que différentes interactions avec les molécules environnantes^{44,45}.

Dans les précédents travaux, le mélange modèle de protéines a été formulé et caractérisé à partir de protéines de pois (hydratation d'une poudre sèche) dispersées dans une phase aqueuse de pH et de conductivité proche de celle d'un milieu de culture d'eau douce. Le produit à base de protéines de pois a été sélectionné en vue des proportions d'acides aminés similaires avec la microalgue étudiée (*Parachlorella kesselri*). Des protéines et des agrégats de tailles variables (10 nm à 10 µm) en solution sont obtenus. Les travaux présentés ici s'appuient sur ce mélange modèle pour la caractérisation des protéines et leur comportement lors de la filtration membranaire.

1.2.3.4 Interaction entre les lipides et les protéines

Dans les précédents travaux, pour se rapprocher des conditions réelles de filtration d'extraits de microalgues, un mélange modèle de lipides et de protéines a été proposé et caractérisé⁶. Préparés indépendamment, les mélanges modèles de lipides et de protéines ne présentent pas les mêmes organisations ni caractéristiques que lorsqu'ils sont mélangés dans la même solution. Les lipides seuls forment une émulsion. Les protéines seules forment pour partie des agrégats qui ne passent pas à travers la membrane, alors qu'une autre fraction soluble peut passer dans le perméat. Lorsque les protéines et les lipides sont en mélange, une forte réorganisation a lieu, en raison d'interactions entre les biomolécules, engendrant une modification de la suspension

à filtrer (taille des gouttelettes et des agrégats par exemple). Les performances de la filtration membranaire sont aussi différentes pour les trois mélanges modèles. La filtration de l'émulsion de lipides seuls présente un meilleur flux que lorsque des protéines sont ajoutées. Il a été conclu que la présence des protéines semble diminuer les performances de la filtration. On peut supposer par exemple qu'elles bouchent les pores de la membrane^{4,6} ou qu'elles impliquent une forte rétention des lipides à la surface de la membrane. Mais ces hypothèses n'ont pas pu être vérifiées jusqu'à présent. Ainsi, une meilleure compréhension des interactions entre les lipides et les protéines, ainsi que leur organisation à la surface et dans le milieu poreux est nécessaire pour comprendre le colmatage de la membrane. Des stratégies pour limiter le colmatage et améliorer les performances du procédé pourraient alors être proposées.

1.3 Le colmatage, principal verrou du procédé

1.3.1 Le colmatage des membranes

1.3.1.1 Définition et différents types de colmatage

Pendant la filtration de solution contenant les particules ou des molécules, une accumulation de matière à la surface de la membrane et à l'intérieur de ses pores se produit. Ce phénomène inéluctable de la filtration membranaire correspond au colmatage (ou « fouling »)⁴⁶. C'est le principal verrou de ce procédé du fait qu'il puisse être irréversible⁴⁷ et diminue le flux et donc la productivité du procédé. Bien que ce soit le sujet de nombreux travaux dans la littérature, ce phénomène n'a pas encore été complètement élucidé par la communauté scientifique^{46,48-51}.

C'est un phénomène multifactoriel et hétérogène spatialement et temporellement. Il peut être dû principalement à des interactions physiques (topographie, rugosité de la surface, structure des pores...⁵²) ou chimiques entre la membrane et la solution ou entre les molécules elles-mêmes³. Le colmatage de la membrane peut être externe (blocage total ou partiel des pores à la surface, organisation d'une couche externe poreuse appelée gâteau ou « cake »)⁵³ ou interne (réduction du diamètre des pores par accumulation de matière sur les bords par adsorption, ou blocage total ou partiel des pores par la matière). La figure 1.8 présente les différents types de colmatage. Enfin, le caractère réversible du colmatage est lié à la quantité de matière accumulée à la surface et à l'intérieur de la membrane et de la nature des interactions. S'il est réversible, un nettoyage à l'eau ou chimique peut être suffisant pour l'éliminer et retrouver les performances initiales de la membrane¹⁹. S'il est irréversible, la membrane a perdu ses caractéristiques de départ (taille de pores, porosité...etc.)⁴.

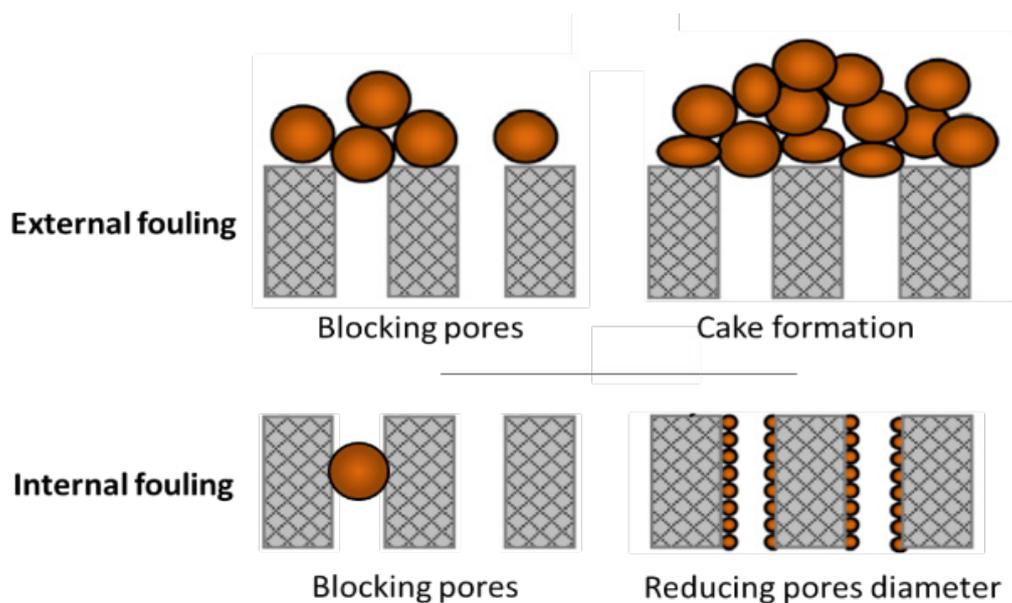


Figure 1.8 : les différents types de colmatage

1.3.1.2 Comprendre le colmatage des membranes

Différentes approches ont été menées pour comprendre et identifier les paramètres pouvant influencer le colmatage des membranes pendant la filtration. Comme résumé par Suwal et al (2015)⁴³, dans le cas de la filtration membranaire, le colmatage est dû à trois paramètres principaux : le choix de la membrane, les caractéristiques de la solution à filtrer et les conditions opératoires.

- rôle du matériau membranaire

Les processus par lesquels le colmatage se produit sont complexes et dépendent, concernant la membrane de filtration, de facteurs structuraux tels que la distribution de la taille des pores de la couche sélective¹⁹ (qui doit être suffisamment éloignée de la distribution de taille des biomolécules à filtrer), la porosité de la membrane ou encore la tortuosité et la connectivité des pores, comme cela a été prouvé pour le colmatage par des protéines dans les travaux de Ho et Zydny⁵⁴. De plus, il a été démontré⁵⁵, en particulier pour les membranes de MF⁵², que selon la surface spécifique (rapport de la superficie de la surface réelle de la membrane et de la quantité de matière de la membrane) et la structure des pores de la membrane (diamètre, porosité, tortuosité...), il est possible de réduire le colmatage et d'augmenter le flux. Ainsi, bien que la couche sélective soit responsable de l'efficacité du processus de filtration, la morphologie et les paramètres structuraux des pores (porosité, tortuosité, etc.) ont également un rôle à jouer.

Afin d'évaluer les performances de filtration à l'échelle microscopique, il faut prendre en compte seulement les pores traversant la membrane, réellement actifs lors de la filtration. Trois possibilités existent (illustrées en figure 1.9) : i) un pore relié à la surface de la membrane qui traverse le matériau (pore ouvert) ; ii) un pore relié à la surface, mais fermé à son extrémité (pore aveugle ou cul-de-sac) ; iii) un pore non relié à la surface de la membrane (pore fermé). Il convient de noter que les pores ouverts (i) participent au procédé de filtration tandis que les pores aveugles (ii) seront obstrués par des molécules et contribueront à accroître le colmatage. Les pores fermés (iii) ne participeront ni au procédé de filtration ni à l'augmentation du colmatage.

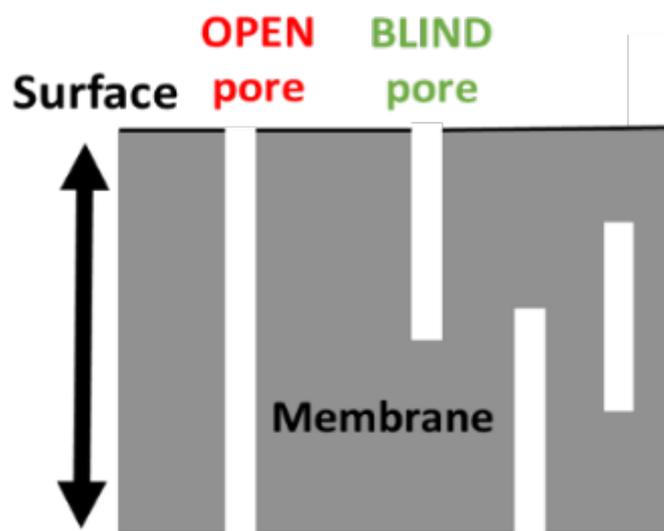


Figure 1.9 : Les différentes morphologies des pores connectés à la surface de la membrane de filtration.

La membrane de filtration présente également une rugosité spécifique à sa surface et il a été montré qu'elle influence l'accumulation des biomolécules⁵⁶ et donc la formation du colmatage à la surface de la membrane. Au-delà de la structure du matériau, la membrane présente une surface fonctionnalisée qui peut avoir des interactions d'attraction ou de répulsion avec les composés (mise en valeur par exemple par la mesure du potentiel zêta et donc de la charge de surface)^{57,58}. Ces interactions peuvent être de type électrostatique, mais aussi de type Van der Waals ou des liaisons hydrogène par exemple, entre les molécules et le matériau de la membrane⁴. La nature chimique de la membrane et son hydrophobicité jouent donc aussi un rôle dans le phénomène de colmatage^{40,59}.

- Les caractéristiques de la solution

Les différentes molécules d'un extrait de microalgues ou d'un mélange complexe peuvent interagir et augmenter le colmatage de la membrane. Plus spécifiquement, le pH, la charge et la taille des particules, la concentration ou la force ionique de la solution peuvent influencer le colmatage⁴³. Dans le cas de mélanges modèles de lipides et de protéines, une forte interaction a été observée³⁶ entre les deux biomolécules (agrégats...etc.), entraînant une augmentation du colmatage de la membrane et une baisse de sa perméabilité.

- Les conditions opératoires

Le colmatage des membranes, et notamment le fait que le colmatage soit interne ou externe, est dépendant des conditions opératoires de la filtration (pression, vitesse, type de filtration...etc.). Notamment, une PTM inférieure ou égale de la pression critique peut être utilisée pour limiter le colmatage des membranes^{4,6,58}. D'après Rouquié et al, 2020⁵⁸, une PTM basse (inférieure à la pression critique) favoriserait un colmatage externe tandis qu'une PTM haute (supérieure à la pression critique) favoriserait un colmatage interne pour les membranes PES de microfiltration. De plus, la filtration frontale implique la formation rapide d'un colmatage sous forme de gâteau à la surface de la membrane tandis que les filtrations tangentielles et dynamiques limitent sa formation (cake d'épaisseur moins importante) et stabilisent le flux^{4,6}. Cependant, elle favorise un possible colmatage interne⁵¹.

1.3.1.3 Conséquences et enjeux

Quels que soient le type de colmatage, les membranes et les mécanismes en cause, ce phénomène modifie les propriétés du matériau (diamètre de pores, porosité, état de surface, etc.) et augmente la résistance au passage du perméat, ce qui provoque une chute de la perméabilité, une modification de la sélectivité et donc des performances du procédé. La consommation d'énergie augmente ainsi que le coût et la fréquence de nettoyage et de remplacement de la membrane⁴³. Par exemple, dans le cadre du développement de procédés innovants de bioraffinage pour la valorisation des extraits de microalgues, le colmatage par les biomolécules peut limiter la récupération des composés d'intérêt dans le perméat et le rétentat, réduisant la possibilité d'une application à grande échelle.

De ce fait, le nombre de travaux de recherche pour caractériser et comprendre le colmatage des membranes ne cesse d'augmenter ces dernières années^{43,48,49,60}. Une meilleure connaissance du processus de colmatage permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués et, par la suite, de développer de nouvelles membranes et de mieux maîtriser les conditions opératoires pour une séparation efficace des molécules. Pour cela, l'élucidation de la relation structure-

performance de la membrane, une caractérisation détaillée des pores et de leur interaction avec les biomolécules, ainsi que la compréhension de l'organisation des biomolécules au sein du colmatage sont nécessaires.

1.2.4 La caractérisation du colmatage dans la littérature

1.2.4.1 Contexte, publication et intérêt pour la communauté

Le potentiel des technologies membranaires est limité par le colmatage des membranes. Par conséquent, une grande partie de la recherche sur les procédés de filtration se concentre sur sa caractérisation. Le nombre de travaux publiés n'a cessé d'augmenter, en particulier au cours des 7 dernières années. La figure 1.10 montre le nombre croissant de travaux publiés dans le domaine de la caractérisation du colmatage des membranes (extrait de Suwal et al⁴³, 2015).

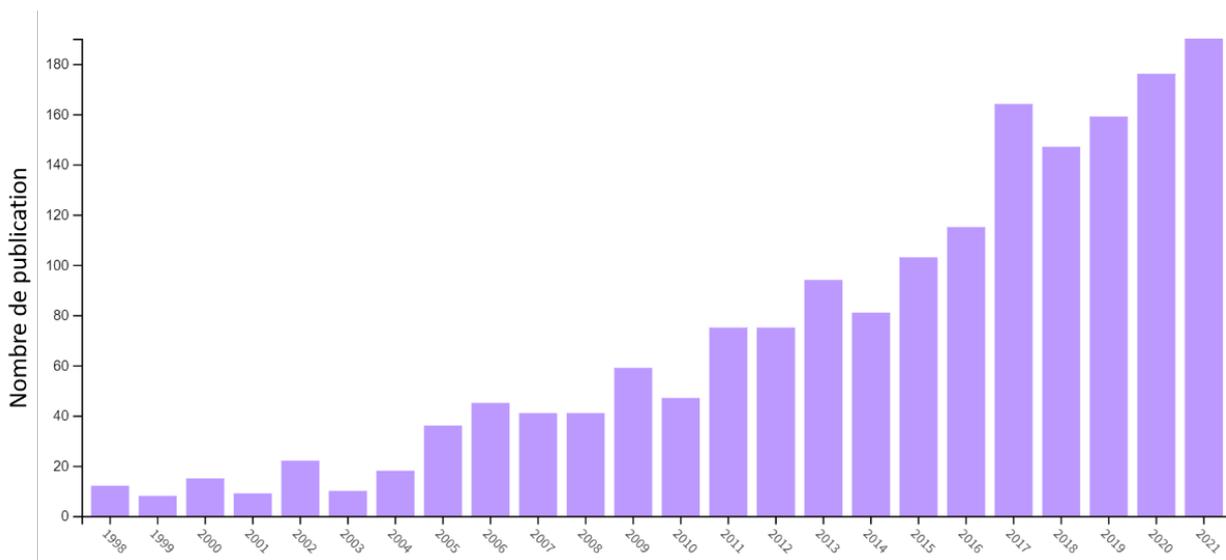


Figure 1.10 : Bibliométrie sur la caractérisation de l'encrassement des membranes. Moteur de recherche : Web of Science ; mots clés : protéine, membrane, encrassement, caractérisation.

Étant donné que différents type de colmatage peuvent avoir lieu simultanément (par exemple, la présence de colmatage interne et externe sur la même zone), que les molécules colmatantes présentes une petite taille et une grande sensibilité (au faisceau d'électrons par exemple) et, enfin, qu'une cinétique s'opère pendant la filtration membranaire^{43,49} (suite d'événements dans le temps), la caractérisation du colmatage des membranes de filtration est particulièrement difficile. Concernant le dernier point, il est à noter que le colmatage peut être caractérisé toujours au même instant, par exemple lorsqu'il est stable à la fin de la filtration, afin de limiter l'impact de la cinétique.

D'après Chen et al (2018)⁴⁹, beaucoup de techniques ont été proposées dans le but de comprendre la formation du colmatage externe, à la surface des membranes, pour expliquer et vérifier certaines théories, ou mettre au point des stratégies de contrôle du colmatage.

Pour analyser le colmatage des membranes de filtration, il existe des techniques de caractérisation directes (image ou analyse par spectrométrie) et indirectes (mesure indirecte de la taille des pores par porométrie). Bien que les techniques indirectes soient moins coûteuses et donnent des informations sur de grandes surfaces d'échantillon⁶¹, les techniques directes, telles que celles utilisées dans cette étude, procurent des mesures réelles et des détails morphologiques avec les résolutions les plus fines⁶². On trouve principalement dans la littérature les techniques d'imagerie telles que la microscopie (optique, confocal, MEB (microscopie électronique à balayage), AFM (microscopie à force atomique)), et la tomographie d'OCT (optical coherence tomography) ou encore les techniques de spectrométrie (infrarouge (IR), Raman, absorption UV, etc.).

1.2.4.2 Les techniques directes et classiques de caractérisation du colmatage dans la littérature

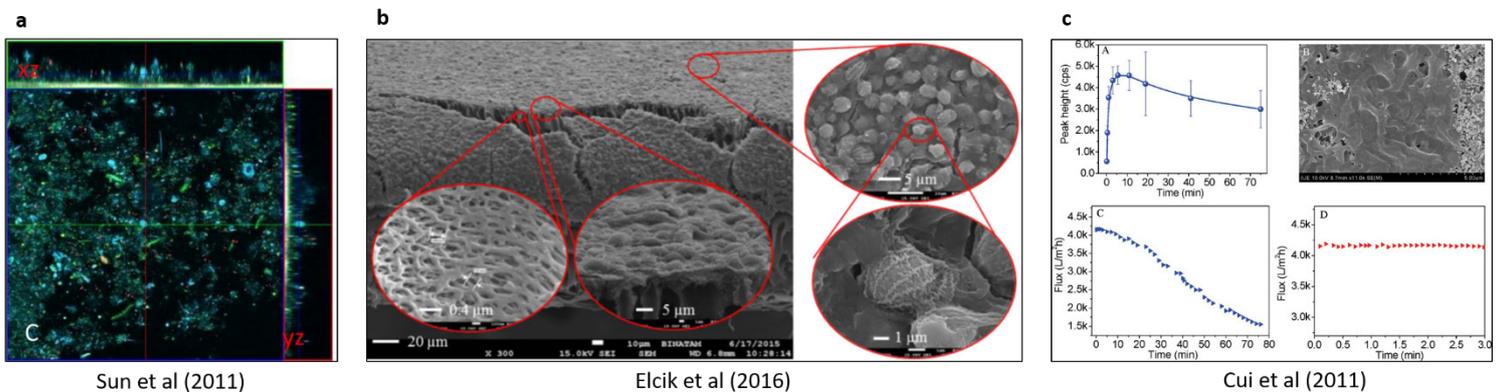


Figure 1.11 : Exemple des techniques directes et classiques de caractérisation du colmatage présentées dans la littérature.

La figure 1.11 regroupe plusieurs exemples de caractérisations décrites dans les sections suivantes. La figure 1.11a présente la caractérisation du biofilm à la surface d'une membrane (et dans les plans 2D XZ et YZ) par microscopie optique confocale d'après Sun et al (2011). La figure 1.11b présente des images MEB détaillées d'une membrane UP150 colmatée, d'après Elcik et al (2016). Enfin, dans la figure 1.11c, Cui et al (2011), utilise la technique de SERS (Surface-enhanced Raman scattering) pour diagnostiquer le colmatage de la membrane et retracer l'ensemble du processus. Avec, en (A) le tracé de l'intensité SERS en fonction du temps

de filtration. (B) Image MEB d'une membrane encrassée. (C) Courbe du flux pendant la filtration à une pression constante de 0,05 MPa. (D) Déclin du flux pendant les 3 premières minutes extraites de (C).

- **Caractérisation physique du colmatage : les techniques de microscopie et d'imagerie principales**

La microscopie optique est intéressante pour la caractérisation du colmatage car elle permet d'obtenir des images avec une résolution de l'ordre du micromètre et de couvrir des surfaces de quelques millimètres carrés⁴³. De plus, d'après Yu et al (2021)⁵³, la microscopie est possible in situ pour observer en direct le processus de dépôt de la matière à la surface de la membrane (pour les particules supérieures à 1 μm de diamètre). Et par conséquent, elle aide à la compréhension de la structuration et de la distribution spatiale du colmatage sous forme de cake à la surface de la membrane^{43,63,64}. Des résolutions légèrement meilleures (quelques centaines de nanomètres) peuvent être atteintes en utilisant un microscope confocal couplé à un laser (CSLM, confocal scanning laser microscopy). Il est équipé d'un diaphragme, le pinhole, qui permet de sélectionner la profondeur du plan imagé dans l'échantillon (profondeur maximum de 800 nm environ)⁶⁵ (montré dans la figure 1.11a). Dans la littérature, ce type de microscopie permet de mesurer l'épaisseur et l'évolution d'un gâteau à la surface de la membrane⁶⁶. Notamment, d'après Yu et al⁵³ (2021), il a été révélé, dans le cas de filtration frontale pour la récolte de microalgues, que le taux de dépôt des particules était plus important au début de la filtration (flux de perméat élevé). Il a été aussi montré que la formation du cake suivait un processus de croissance de type brownien (formation de graines de rivets, grappes, de monocouches et multicouches) et que les protéines ont une grande influence sur le déclin du flux du perméat. Malgré la limitation pour l'analyse en profondeur, Ferrando et al (2005)⁶⁵ mettent en évidence la localisation des protéines dans les premiers pores d'une membrane de MF par CSLM. Cependant, la microscopie optique (confocal ou non) est limitée par la traversée du module, l'opacité de la solution et la résolution de l'image.

D'autres types de microscopie comme le MEB (image de la surface obtenue suite à l'analyse de l'interaction d'un faisceau d'électrons avec l'échantillon) et l'AFM (image de la surface obtenue suite à l'interaction entre une pointe très fine (quelques nanomètres) et l'échantillon), apportent des informations à l'échelle nanométrique sur la microtopographie du colmatage grâce aux images à haute résolution qui sont obtenues^{43,50} (figure 1.11b). Le MEB nécessite une préparation de l'échantillon spécifique où la couche de colmatage peut être endommagée pendant le processus de séchage (plus de détails en section 4.b). L'AFM, tout comme le MEB,

permet d'étudier à la fois la structure de la membrane, son impact sur le colmatage (rugosité et diamètre des pores), et le colmatage externe lui-même (blocage des pores, analyse de la couche de colmatage, etc.). L'analyse peut être faite sur membrane hydratée ou sèche^{43,67,68}. Bégoin et al (2006)⁶⁹, constatent notamment par AFM une diminution significative du diamètre des pores et une augmentation de la rugosité pour les membranes UF lors de la filtration de protéines extraites du lactosérum. Cependant, ces techniques ne sont pas réalisables in situ et doivent être opérées en dehors du module de filtration. Elles sont limitées à la caractérisation du colmatage externe et non interne de la membrane (hormis en cross section 2D pour le MEB). Enfin, elles ne permettent pas, seules, d'obtenir des informations sur la chimie du colmatage.

D'autres approches, basées sur les techniques d'imagerie, ont été explorées dans la littérature : la tomographie par cohérence optique (OCT) fournit des informations en temps réel et non destructives sur le développement des couches d'encrassement, notamment en 3D^{49,53,70-72}. Dreszer et al. (2014)⁷¹, utilisent cette technique pour observer la compaction et le remplissage des pores, ainsi que la densification du biofilm formé lorsqu'on augmente le flux de perméat. Cependant, d'après l'auteur, les informations clés sur la formation du colmatage sont manquantes, l'OCT étant peu adaptée pour la caractérisation de petits objets et ne permettant pas la différenciation des molécules plus petites que 4 µm de diamètre au sein du colmatage.

- **Caractérisation chimique du colmatage : les techniques de spectroscopie principales**

Malgré certaines limitations, telles que le marquage (par exemple pour la fluorescence), la sensibilité (Raman) et le coût en temps, les méthodes spectroscopiques sont parmi les outils les plus efficaces pour caractériser la chimie de l'encrassement des membranes grâce au développement rapide de l'instrumentation spectroscopique et du traitement des données spectrales de ces dernières années⁴⁹.

La spectroscopie ultraviolet-visible (UV-vis) permet d'analyser les composés issus du colmatage après leur resolubilisation. Elle permet par exemple de détecter des signaux spécifiques et de révéler la composition chimique du colmatage membranaire⁴⁹. Cependant, les molécules qui ne se désorbent pas de la surface de la membrane ne sont pas analysées.

La spectroscopie infra-rouge (IR) peut offrir des informations sur les groupes fonctionnels des molécules contenues dans le colmatage⁷³⁻⁷⁵. Le traitement du signal permet d'analyser des bandes spécifiques (processus de FTIR, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier).

Dans le cas d'encrassement de membrane d'UF par du jus de canne à sucre, Saha et al (2007)⁷⁴, utilise la FTIR, couplée au MEB, pour identifier un composé dans les polysaccharides étant le principal responsable du colmatage et montre alors que le mécanisme dominant est la formation d'un cake. Le principal inconvénient de cette technique est la sensibilité de l'IR aux signaux de l'eau. Ils peuvent interférer avec les signaux du colmatage, les échantillons doivent donc être déshydratés⁴⁹. Il convient de noter que l'analyse FTIR, seule, permet de faire des hypothèses sur les mécanismes de colmatage¹⁵, mais elle ne permet pas d'identifier le mécanisme dominant lors de la formation du colmatage. Pour cela, cette technique doit être couplée à une autre, comme le MEB-EDX (montré dans les travaux de Rabiller-Baudry et al (2022)⁷⁶).

La spectroscopie Raman ne nécessite pas de déshydratation de l'échantillon et fournit des informations structurelles vibratoires similaires et complémentaires aux spectres IR. C'est un outil peu invasif permettant de caractériser la nature du colmatage des membranes⁷⁷. Cui et al (2011)⁷⁸, couplent une cartographie Raman avec des images MEB pour caractériser le processus d'encrassement d'une membrane de MF PVDF provoqué par des protéines animales (albumine de sérum bovin BSA notamment), ainsi que le blocage des pores de la membrane (figure 1.11c). La faible sensibilité (efficacité quantique) du signal Raman reste la principale limitation de cette technique.

Enfin, la microscopie optique peut être couplée à la spectroscopie de fluorescence, où des molécules spécifiques au sein du colmatage sont marquées ou modifiées pour être fluorescentes. En comparaison avec les autres techniques de spectroscopie (appliquées jusqu'à présent uniquement pour l'étude du colmatage externe), celle-ci est adaptée à la caractérisation du colmatage externe et interne de la membrane. Elle apporte une grande sensibilité. Cela est dû à l'utilisation de laser (une seule longueur d'onde d'excitation) et de molécules fluorescentes spécifiques (répondant précisément à la longueur d'onde du laser), couplés à l'imagerie et l'analyse peut être envisagée dans le temps ou l'espace (différents plans de profondeur dans le cas d'un couplage avec un microscope confocal notamment). D'après Hao et al (2013)⁷⁹, qui a caractérisé des coupes de membranes capillaires, cette technique a permis de mettre en évidence que les protéines et les polysaccharides (BSA et alginate de sodium) issus du filtrat s'accumulent en premier « près de la surface externe de la membrane » avant de former une couche extérieure dans le cas d'une membrane de MF PES à fibre creuse (parfaitement visible sur le profil d'intensité tracé dans la direction de la profondeur de la membrane) (voir figure 1.12). De même pour Hughes et al.⁸⁰ (2006), des protéines marquées (BSA et ovalbumin) ont été identifiées par microscopie multiphoton (MPM, multiphoton microscopy) comme jouant un

rôle important dans le développement de l'encrassement de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane de MF. Cependant, cette technique reste limitée en résolution (limite de la diffraction de la lumière, 200 nm) et ne permet pas d'identifier des petits objets inférieurs à 1 μm de diamètre⁴⁹.

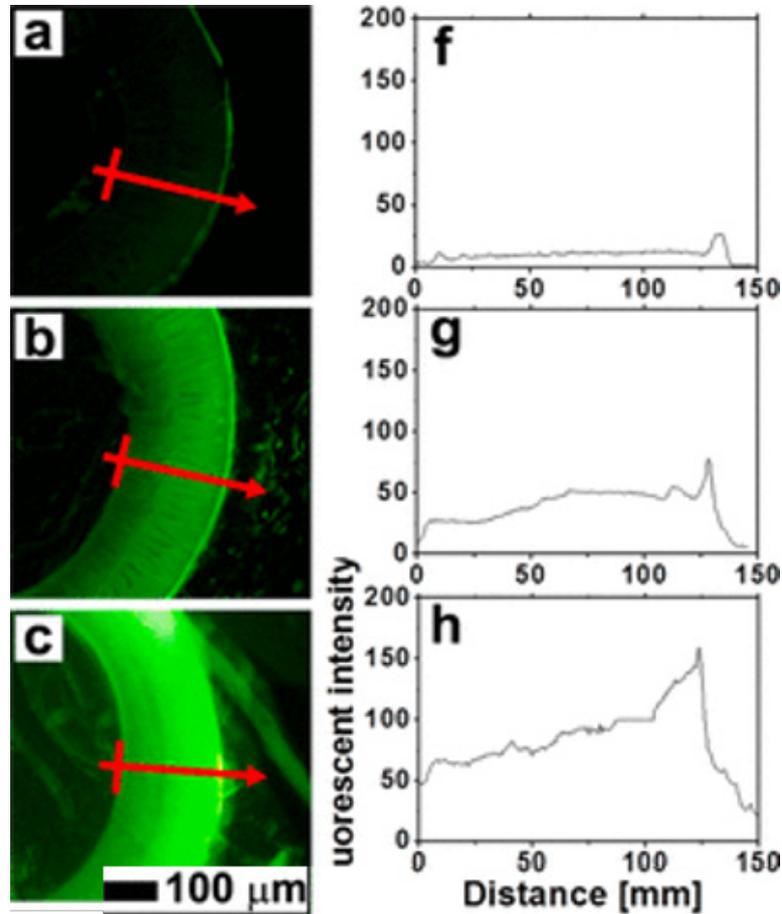


Figure 1.12 : Images au microscope à fluorescence de sections transversales des membranes de MF PES à fibre creuse (filtration sous pression externe). Les temps de filtration de 50 ppm de solution de rhodamine-SA étaient de 1 min (a, f), 10 min (b, g) et 30 min (c, h). La ligne rouge présente où est tracé le profil d'intensité de la fluorescence. D'après Hao et al (2013).

1.2.4.3 Conclusion

Le colmatage des membranes, en particulier produit par des espèces multiples, est un phénomène complexe et seulement partiellement expliqué dans la littérature. Les méthodes développées pour sa caractérisation et sa compréhension n'ont cessé de progresser ces dernières années. Les techniques de caractérisation décrites précédemment ont permis d'observer l'accumulation de matière lors du colmatage externe des membranes (microscopie électronique (meilleure résolution) ou photonique (in situ)) et de mieux connaître sa composition (spectroscopie). Cependant, la caractérisation de l'organisation en 3 dimensions des composés

au sein du colmatage externe, et plus encore comme colmatage interne, est moins explorée dans la littérature^{53,79}.

Une meilleure compréhension des mécanismes de colmatage des membranes par des mélanges complexes à l'échelle des pores devient essentielle. Cela inclut la différenciation des molécules et l'analyse de leur organisation à l'extérieur et à l'intérieur de la membrane de filtration (colmatage externe et interne). Par conséquent, il est essentiel de développer de nouvelles techniques qui permettent une discrimination précise de la composition des agents colmatants et de leurs distributions spatiales 3D. Il serait très utile de pouvoir caractériser la structure du colmatage des membranes sans le modifier par une préparation antérieure, mais plutôt en restant au plus près de l'organisation des composés qui s'est mise en place lors de la filtration d'un mélange complexe. Grâce à ces nouvelles méthodes, une meilleure compréhension du phénomène complexe qu'est le colmatage serait possible.

Le tableau 2 présente, pour la caractérisation des membranes de filtration et de leur colmatage, les techniques principales explorées dans la littérature et décrites succinctement dans cette partie. Parmi l'ensemble des méthodes, dans ce travail, le choix a été fait de nous focaliser sur la microscopie électronique. D'après le tableau 1.2, la microscopie électronique semble être le meilleur compromis entre la taille de l'échantillon à explorer et la résolution nécessaire pour l'imagerie des plus petits pores de la couche sélective de la membrane. De plus, elle est compatible avec l'analyse chimique via l'usage de la spectroscopie EDX. Enfin, les différentes techniques de ME sont disponibles, avec des appareils de pointe, au sein de l'IMN.

Dans les paragraphes qui suivent, seule la caractérisation des membranes par ME sera considérée. Le principe et les méthodes de ME seront détaillés dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

Méthode de caractérisation	Caractérisation physique : les techniques de microscopie et d'imagerie principales				Caractérisation chimique : les techniques de spectroscopie principales							
	Microscopie Optique (MO)	Confocal (CSLM)	Microscopie à balayage (MEB)	Microscopie à force atomique (AFM)	Tomographie par cohérence optique (OCT)	FIB/MEB	Microscopie électronique en transmission (MET)	spectroscopie ultraviolet-visible (UV)	La spectroscopie infra-rouge (IR)	La spectroscopie Raman	La spectroscopie de fluorescence couple à la MO	EDX, Energy Dispersive X-rays
Resolution (≈)	1 µm	200 nm	1 nm	> 1 nm	4 µm	1 nm	0,2 nm	-	-	-	-	-
Taille de la surface caractérisé (≈)	quelques mm ²	quelques mm ²	quelques mm ²	180x180 µm		plusieurs cm ²	quelques mm ²	-	-	-	-	-
3D	non	Oui (jusqu'à 800 nm en Z)	non	Non	Oui	Oui	Oui (limité) 100 nm en Z)	Non	Non	Non	Oui	Oui
Type de membrane compatible	MF (avec des objet > 1µm)	MF (avec des objet > 200 nm)	NF, UF et MF	NF, UF et MF	MF (avec des objet > 4µm)	NF, UF et MF	RO, NF, UF et MF	RO, NF, UF et MF	RO, NF, UF et MF	RO, NF, UF et MF	RO, NF, UF et MF	RO, NF, UF et MF
Couplage possible	fluorescence	fluorescence	EDX, Raman	EDX, Raman		EDX, Raman	EDX	MEB	CSLM, MO			MEB, MET
Référence utilisant la technique	[37][58][59]	[47][60][61]	[81][87][88][89][90]	[37][62][63][64]	[43][47][65][66]	[79][92][93]	[106][118][119][120][121][122]	[43]	[68][69][43][70]	[72][73]	[74][75]	[81][117][119][121]

Tableau 1.2 : les techniques de caractérisation des membranes, classées en fonction de leur résolution, aire de la surface caractérisée, la possibilité de faire de la 3D et leur compatibilité avec les différents types de membrane de filtration polymère. Les couplages possibles entre les techniques ainsi que des exemples d'articles mettant en application ces techniques sont présentés.

Le symbole (-) est employé pour les techniques de spectroscopie, où le terme de résolution spatiale ne peut être employé (c'est le cas seulement lorsqu'on fait des images, la résolution étant associée à la plus petite distance entre deux objets pour pouvoir les différencier).

1.4 Caractérisation des membranes de filtration par microscopie électronique

1.4.1 Contexte général de l'étude

Dans cette étude, nous nous intéressons particulièrement à la filtration de mélanges complexes, simulant des extraits de microalgues (lipides et protéines végétales), sur des membranes polymères organiques, et au phénomène de colmatage de celles-ci. Le colmatage représente une difficulté majeure pour le développement des procédés membranaires, il est donc nécessaire de mieux le comprendre et le décrire. Parmi les méthodes permettant de caractériser le colmatage, la microscopie électronique est très intéressante car elle permet de caractériser la structure des membranes utilisées, l'organisation des composés au sein du mélange complexe et le colmatage. Dans cette partie nous présentons les possibilités qu'offre la microscopie électronique pour à la caractérisation détaillée en 2D et en 3D de la structure de la membrane seule, en particulier des pores de la couche sélective, ainsi que ses limites.

La microscopie électronique (ME) permet d'observer et d'analyser la membrane à des échelles différentes (du nanomètre au millimètre) (voir le tableau 1.2). Le microscope électronique à balayage (MEB) permet une visualisation directe de la structure du matériau, il donne des images de haute qualité (taille de pixel de quelques nanomètres) avec un large champ de vision (plusieurs dizaines de micromètres) pour des temps d'acquisition courts et une préparation d'échantillon rapide. Il est généralement utilisé pour l'imagerie 2D de la surface ou de la section transversale de la membrane^{81,82}. La microscopie électronique en transmission (MET), de manière complémentaire, permet d'atteindre les détails nanométriques des pores de la membrane et est utilisée pour obtenir des images de haute résolution de sections transversales de membranes⁶².

Les pores, cependant, sont des structures 3D qui nécessitent des méthodes de caractérisation et de quantification 3D pour une description complète. L'analyse MEB d'images 2D de la surface des membranes présente des limites pour quantifier les pores qui participent réellement au processus de filtration, elle ne permet pas par exemple d'identifier les pores aveugles. Les techniques avancées de microscopie électronique en 2D comme le STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) ou en 3D comme le FIB/MEB (focused ion beam/ MEB) nous permettent, à présent, d'atteindre des résolutions inférieures au nanomètre⁸³ et d'obtenir des volumes 3D des structures les plus fines⁸⁴. De plus, lorsqu'elles sont combinées avec de la

spectroscopie (EDX, Energy Dispersive X-rays), on peut simultanément obtenir des informations chimiques.

Hormis pour l'étude en MEB de la surface 2D de membranes^{43,85,86}, la caractérisation des membranes polymère en ME, est peu développée par rapport aux nombreuses études et différents domaines exploitant les procédés membranaires⁸⁷. Cela peut s'expliquer par le défi que les techniques d'imagerie représentent⁸⁸. En effet, les membranes polymères sont amorphes, peu contrastées, présentent des pores nanométriques et une forte sensibilité au faisceau d'électrons.

Dans une première partie nous présenterons l'analyse des membranes par MEB en 2D et EDX, puis nous présenterons la caractérisation de membranes par couplage du MEB avec le FIB, enfin nous présenterons le MET.

1.4.2 Imagerie MEB et FIB

1.4.2.1 Préparation d'échantillon

La préparation des échantillons pour le MEB est relativement simple. Les échantillons doivent supporter le vide du microscope (il évite les interactions des électrons avec l'air), ainsi qu'être conducteurs et stables sous le faisceau des électrons pour procéder à leur observation. C'est pourquoi l'échantillon est déshydraté, s'il contient de l'eau, et métallisé d'une fine couche de platine ou de carbone (quelques nanomètres) pour rendre sa surface conductrice^{50,57}. Les échantillons sont enfin transférés dans la chambre MEB via un sas à pression contrôlée (plus de détail dans le chapitre 2). Lorsque cette préparation est appliquée aux membranes de filtration, elle peut avoir un fort impact sur la structure de la membrane : la déshydratation entraîne une modification de la structure des pores et la métallisation peut inclure un biais en remplissant partiellement les pores à la surface de la membrane^{89,90}.

Il est possible d'observer les membranes en surface, mais aussi en coupe transversale. Pour cela, le plus souvent, la membrane est congelée (cryofixée) dans de l'azote liquide (-180°C) et cassée ou coupée avec une lame de rasoir^{85,86} pour permettre l'observation de la tranche (l'intérieur de la membrane). Ici, cryofixer la membrane permet de limiter le biais de la modification de la morphologie dû à la préparation d'échantillon.

Enfin, dans le but de limiter les dommages, les effets de charges ainsi que la dérive de l'image, la membrane peut être préalablement contrastée à l'aide de métaux lourds (Osmium ou Ruthénium Tetroxyde par exemple)⁹¹.

1.4.2.2 Observation des membranes polymères par MEB et par MEB-EDX combiné, une pratique courante

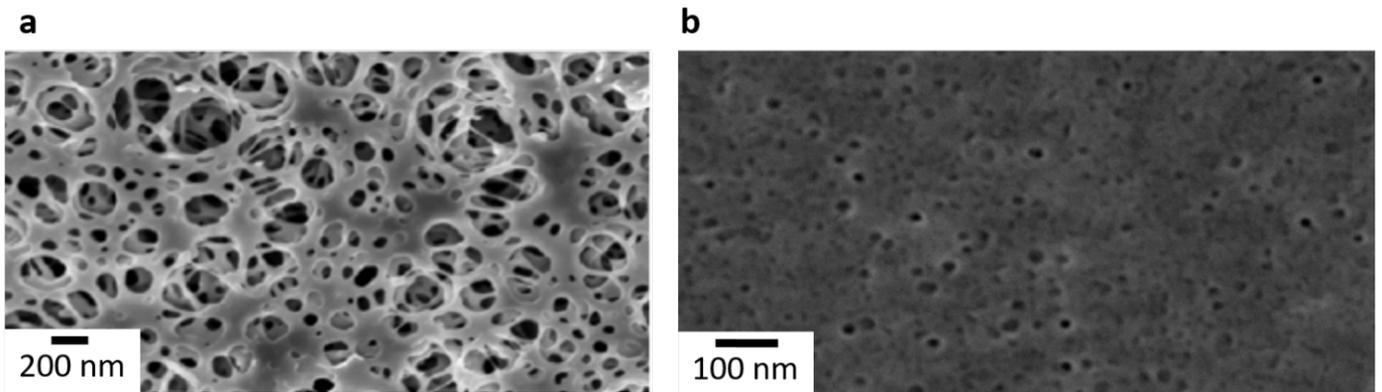


Figure 1.13 : Caractérisation au MEB de la surface de deux membranes en polyethersulfone avec un seuil de coupure annoncé de 0,1 μ m. (a) : membrane KOCH de microfiltration MFK-618) et (b) : membrane ORELIS de microfiltration FORM005FRAY. D'après Habibi et al, (2013).

Rapide et facile, l'analyse par MEB est devenue un outil très utilisé pour caractériser la morphologie de la membrane (surface et coupe transversale). En particulier, beaucoup d'études portent sur l'élaboration, la caractérisation et l'évaluation de la performance des membranes pour des applications spécifiques^{86,92-95} (voir un exemple avec la figure 1.13). Ainsi, le MEB est utilisé pour contrôler la qualité de la structure membranaire parmi d'autres techniques de caractérisation. Par exemple, Rahimpour et al⁸⁵ (2007) utilisent le MEB pour mettre en évidence les effets du CAP (cellulose acetate phthalate) sur la morphologie de membranes de MF en

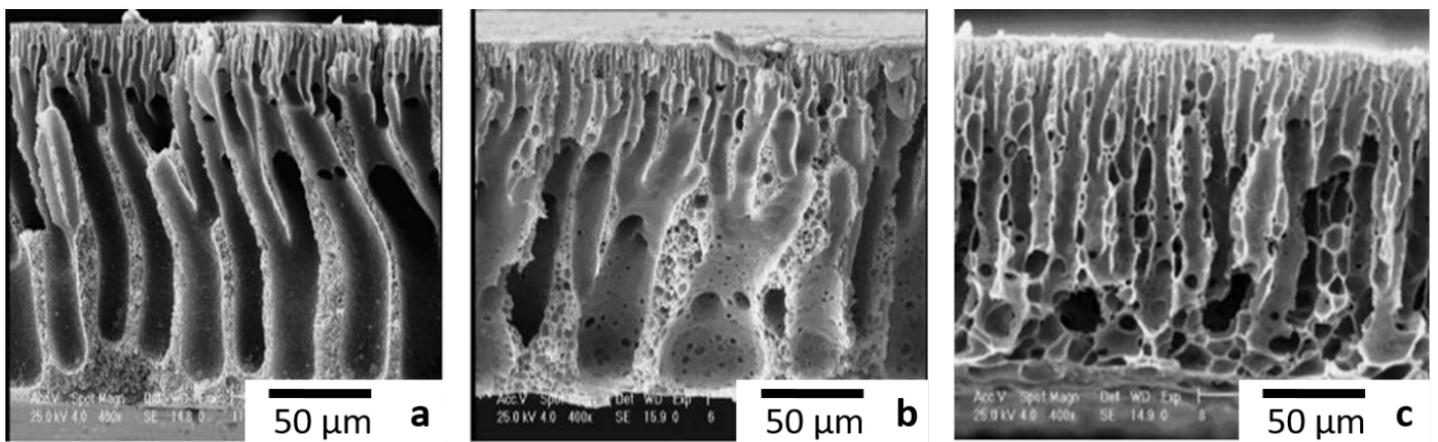


Figure 1.14 Coupe transversale de membrane PES avec différentes concentrations de CAP. Concentration PES/CAP (%) : (a) 100/0; (b) 90/10 ; (c) 70/30 d'après Rahimpour et al 2007

polyethersulfone. La figure 1.14 illustre ces travaux avec plusieurs images réalisées en MEB

sur des coupes transversales de membranes en PES pour plusieurs concentrations de CAP (cryofixation et coupe de la membrane).

La caractérisation de membranes polymères propres au MEB est une pratique courante, permettant l'étude morphologique (par exemple : estimation de la porosité), mais aussi chimique de l'échantillon. Buonomenna et al⁹³ (2006) utilisent les propriétés des électrons rétrodiffusés (plus de détail en chapitre 2) pour obtenir un contraste chimique des différents matériaux d'une membrane de MF PVDF mélangée à du titane. Ou encore, il est possible de coupler l'utilisation du MEB avec un détecteur EDX (Energy Dispersive X-rays) pour aller plus loin dans l'analyse chimique de l'échantillon. L'article de Kumar et al⁸⁶ (2016) s'appuie sur cette technique pour comparer les compositions chimiques de différents mélanges de polymères (membrane polysulfone avec différents additifs de bentonite à base de polyvinylpyrrolidone (PVP-g-bentonite)) et déterminer le plus efficace pour une application dans le traitement des eaux usées. Les concentrations en Magnésium (Mg), Aluminium (Al) et Silicium (Si) sont comparées par EDX pour contrôler la présence de bentonite sur les membranes (illustré en figure 1.15).

Bien que le MEB soit une pratique courante dans la caractérisation des membranes de filtration polymères, il ne permet pas, seul, d'observer les structures les plus fines en 3D. Depuis quelques années, des MEB de nouvelle génération ont été développés et couplés à une colonne FIB (focused ion beam), permettant d'imager un échantillon en 3D avec une résolution cubique de quelques nanomètres (taille et épaisseur du pixel de la même taille)^{96,97}.

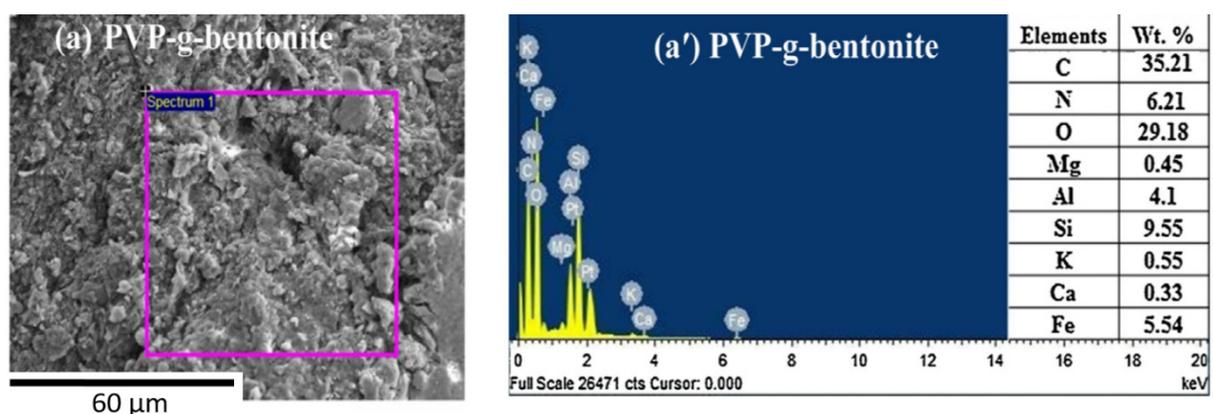


Figure 1.15 : Image de la surface de la membrane obtenue au MEB. Spectre EDX sur une zone de la membrane mélangée à de la bentonite. D'après Kumar et al, 2016

1.4.2.3 Utilisation du FIB/MEB

Le couplage d'un faisceau d'ions focalisés ou FIB (focused ion beam) et du MEB permet d'explorer un milieu poreux en 3D. Le FIB permet de creuser l'échantillon grâce à l'énergie des ions (généralement de gallium). L'intérieur de l'échantillon est alors visible et la surface dévoilée peut être imagée avec le faisceau des électrons du MEB. Pour obtenir un volume 3D, le FIB érafle une nouvelle couche de quelques nanomètres d'épaisseur, puis une image est prise au MEB et ainsi de suite. On peut reconstruire le volume en 3D à partir d'un empilement des images 2D (appelé « stack »). D'après Sundaramoorthi et al⁸⁴ (2016), le FIB/MEB est un bon compromis entre la tomographie à rayons X (résolution de plusieurs micromètres et un volume supérieur à $100 \mu\text{m}^3$) et la tomographie par MET (résolution inférieure au nanomètre et un volume de $5 \mu\text{m}^3$ avec une épaisseur d'échantillon de 100 nanomètres) pour la caractérisation de polymères poreux. Son utilisation permet d'obtenir une résolution nanométrique (jusqu'à 3-5 nm en voxel cubique) et un volume de quelques dizaines de micromètres cube. Le volume 3D permet alors de caractériser plusieurs paramètres d'intérêt de la structure, tels que la taille des pores, la porosité ou la connectivité^{83,84,91,97,98}.

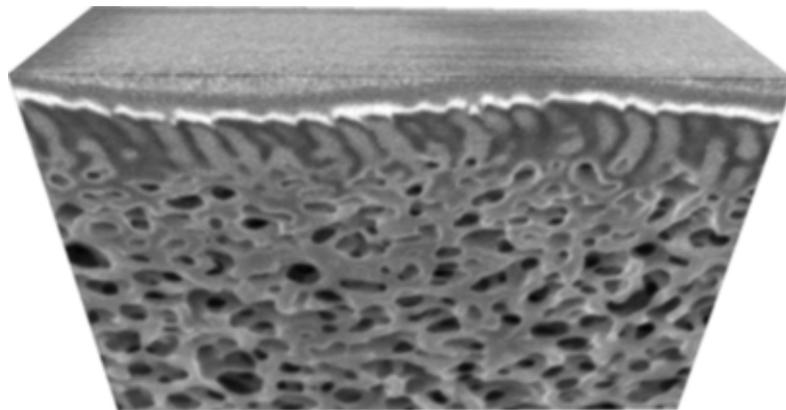


Figure 1.16 : Visualisation 3D d'un bloc de copolymère PS-b-P4VP d'après Sundaramoorthi et al 2016.

L'application du 3D FIB/MEB dans les matériaux polymères nanoporeux est maintenant en expansion, avec des exemples dans les piles à combustible à électrolyte polymère⁹⁶ ou les particules polymères poreuses⁹¹. En ce qui concerne les membranes de filtration, Kłosowski et al.⁸³ (2016) ont utilisé le 3D FIB/MEB sur des membranes d'osmose inverse (RO) pour permettre la caractérisation des propriétés structurelles clés. Prill et al⁹⁹ (2020) ont utilisé cette technique pour obtenir un support 3D d'une membrane céramique nanoporeuse pour la simulation de la perméabilité des fluides. Cependant, cette technique est encore rarement employée pour les membranes de filtration polymères de micro et d'ultrafiltration. Brickey et

al⁹⁷ (2021) ont récemment réalisé un volume 3D des filtres en polymère (application pour la filtration de virus). Cependant, leurs échantillons ne présentent pas la structure poreuse multicouche qui caractérise les membranes d’UF et de MF et leur méthode n’est pas adaptée pour identifier une éventuelle couche sélective. Les études caractérisant les copolymères à blocs^{84,98} restent les plus proches des membranes polymères d’UF ou de MF. Sundaramoorthi et al⁸⁴ (2016) ont été parmi les premiers à utiliser le 3D FIB/MEB sur des membranes poreuses en copolymère à blocs et à obtenir un volume montrant les différentes couches du matériau (figure 1.16). Cependant, l’utilisation d’une large épaisseur de coupe (50 nm) telle que réalisée dans ce travail n’est pas suffisante pour caractériser la structure des nanopores de la couche sélective des membranes d’UF ou de MF.

1.4.2.4 Défis techniques

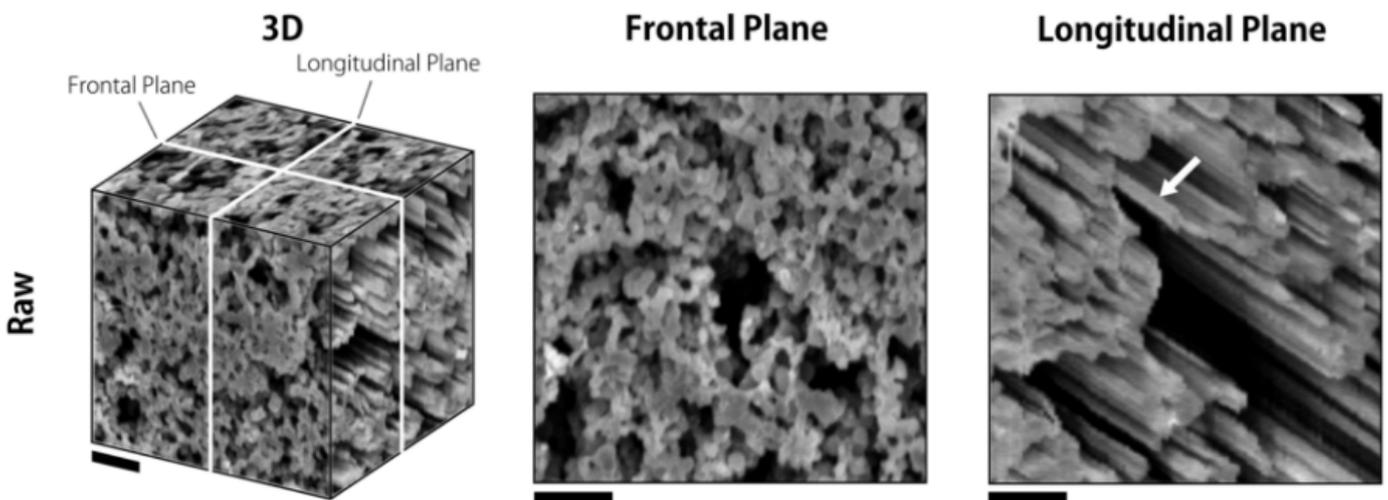


Figure 1.17 : Visualisation de l’artefact de brillance dans une pile à combustible. A gauche visualisation du volume 3D, au milieu, plan frontal XY et à droite plan longitudinal YZ. La flèche blanche indique l’elongation des pores dans le plan de coupe YZ. Les barres d’échelle sont de 300 μm . Extrait de Moroni et al, 2020.

L'utilisation du 3D FIB/MEB pour la caractérisation des membranes de filtration polymères présente un certain nombre de défis techniques importants, ce qui, en partie, explique le faible nombre de publications utilisant cette technique. Tout d'abord, les membranes polymères sont des matériaux amorphes présentant peu de contraste et une forte sensibilité aux faisceaux d'électrons et d'ions. Ainsi, sans préparation d'échantillon spécifique et contrôle des paramètres d'observation^{83,91}, leur imagerie peut être difficile. L'utilisation du FIB/MEB pour l'acquisition 3D de ces matériaux nécessite un contrôle rigoureux et une optimisation des paramètres expérimentaux tels que l'énergie du faisceau, le courant ou le temps passé par pixel (dwell time)

pour les deux types de faisceaux^{84,98} (les termes techniques seront définis de façon plus explicite dans la partie microscopie, dans le chapitre 2). Il est essentiel d'éviter d'endommager l'échantillon et les effets de charge qui entraînent une dérive (drift) de l'échantillon et une perte d'informations lors de la reconstruction des données. Afin d'étudier les copolymères à blocs, Nunes et al⁹⁸(2010), et Sundaramoorthi et al⁸⁴(2016), n'ont pu obtenir un volume 3D qu'après avoir adapté tous les paramètres du faisceau. Ces paramètres dépendent de la sensibilité du matériau et de la préparation de l'échantillon, ils doivent être optimisés pour chaque cas.

Un autre défi technique de l'étude de la structure 3D des membranes UF et MF est la présence de l'artéfact de brillance (Shine Through) dans les reconstructions 3D. Il s'agit d'un problème courant dans la reconstruction 3D des milieux poreux^{96,99,100}. Il est dû au fait que le matériau des tranches suivantes est imagé à travers les pores, ce qui entraîne une déformation du volume par élongation des pores dans la direction de la découpe FIB (montré figure 1.17). Deux solutions peuvent être envisagées : i) développer une technique de traitement d'images adaptée pour segmenter la surface interne du pore comme une zone homogène⁹⁶ ; ou ii) remplir les pores avec un substrat, comme de la résine, pour obtenir une image du bord des pores seulement^{96,101,102}. Dans le premier cas, un développement important en matière de programmation et de traitement des données est nécessaire. De plus, une perte d'information brute est possible. Dans le deuxième cas, le faible contraste entre la membrane polymère et la résine (les deux étant des matériaux polymères) peut rendre la segmentation des pores difficile.

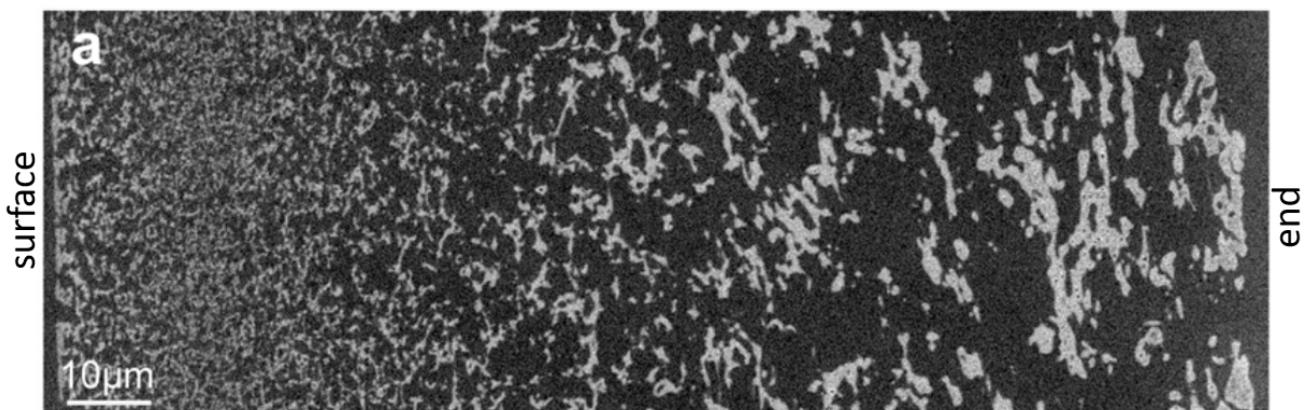


Figure 1.18 : Coupe transversale de la membrane DuraPES® après son inclusion en résine époxy.
D'après Reingruber et al (2011).

Néanmoins, l'inclusion de résine est déjà utilisée pour la caractérisation des membranes de filtration en polymère : Reingruber et al¹⁰² (2011), ont obtenu un contraste relativement bon et ont évité l'artéfact de brillance sur une membrane plane de MF PES (voir figure 1.18).

1.4.2.5 Traitement des données et reconstruction en 3D

Au-delà de la visualisation 3D du matériau et de sa structure multicouche, une analyse quantitative des pores est nécessaire pour obtenir une caractérisation complète de la membrane et faire le lien avec la perméabilité par exemple. Plusieurs étapes sont nécessaires pour permettre ce type d'analyse à partir d'un volume 3D. Le volume (empilement d'images 2D) doit en général être prétraité avec un alignement des images (retire le drift inhérent à l'acquisition des échantillons sensibles), un filtrage (retire les artéfacts) et un redimensionnement (évite le bruit et donne une bonne orientation du volume dans l'espace). Les objets d'intérêt doivent ensuite être segmentés. La segmentation est la sélection de pixels, à partir des coupes 2D, définissant l'aire d'un objet selon des critères spécifiques (morphologie, niveau de gris...etc.). L'objet, ici les pores de la membrane, peut alors être reconstruit en 3D dans l'espace et son volume mesuré^{84,97,98}. La segmentation peut être manuelle ou semi-automatique. Dans le premier cas, les objets sont contourés ou coloriés, image par image, manuellement. Malgré la précision de cette technique, elle est chronophage et fastidieuse, et aussi variable selon les utilisateurs et les volumes d'acquisition. Dans le deuxième cas, une partie de la sélection est entrée / choisie par l'utilisateur, suivie d'un processus ou calcul automatique. Par exemple, les niveaux de gris d'un objet d'intérêt sont sélectionnés manuellement sur l'histogramme d'une ou de plusieurs images avant d'être appliqués à tout le volume. C'est la technique la plus utilisée dans la littérature pour segmenter des milieux poreux^{84,96,103}. Il est aussi possible d'employer des algorithmes (machine learning) pour délimiter des objets selon des critères précis (morphologie, contraste...etc.) dans l'échantillon et l'appliquer pour tout le volume. Cette technique récente commence à être utilisée pour les milieux poreux^{104,105}, mais à notre connaissance, elle n'a pas encore été appliquée à des membranes polymères d'UF et de MF. Plus la segmentation est automatisée, plus le temps de traitement diminue (à condition d'avoir le matériel informatique adéquat), cependant, une perte d'information brute de l'image est possible et les logiciels employés sont généralement coûteux et difficiles à prendre en main.

Enfin, un post-traitement sur la segmentation du volume est nécessaire pour extraire des données telles que les diamètres (via mesure du diamètre de Feret ou épaisseur locale^{106,107}), les connexions ou encore les tortuosités des objets^{96,108}. Ces pratiques sont déjà utilisées pour la quantification d'échantillon poreux, comme sur des batteries lithium-ion¹⁰⁹, des piles à combustible⁹⁶ ou encore du charbon¹¹⁰. Comme expliqué précédemment, l'acquisition de volume 3D sur des membranes polymères est rare, voire inexistante, pour des membranes d'UF

et de MF. Des études ont été menées sur des blocs de copolymère, où la reconstruction 3D permet de mesurer le diamètre et le volume des pores, mais aussi leurs connexions à travers les différentes couches de l'échantillon^{84,98}. Sundaramoorthi et al⁸⁴ (2016) utilisent la segmentation semi-automatique pour analyser les pores d'un bloc de copolymère et obtiennent une cartographie complète de la porosité, de la connectivité et de la taille moyenne des pores dans

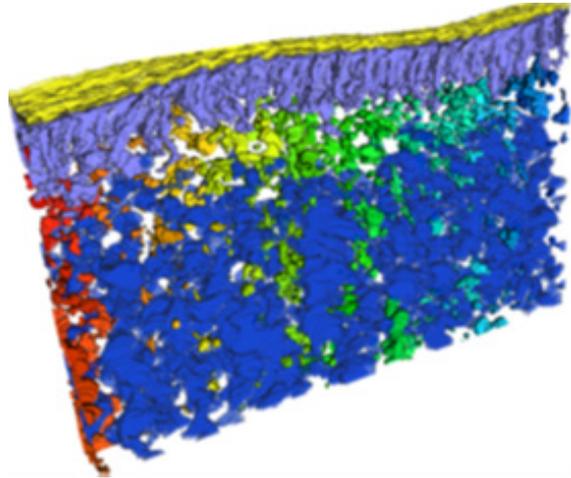


Figure 1.19 : Reconstruction 3D après segmentation des pores de la membrane, chaque couleur représente des régions de pores avec une inter-connectivité. Extrait de Sundaramoorthi et al, (2016).

différentes couches (figure 1.19). Cependant, la reconstruction des pores n'a pas permis d'analyser la morphologie des pores connectés à la surface du bloc polymère par exemple (pores aveugles et fermés).

1.4.3 Imagerie MET

1.4.3.1 Préparation classique des échantillons et coupe à l'ultramicrotome

La qualité et l'observation des détails nanométriques d'une image en microscopie électronique en transmission (MET) dépendent de la préparation spécifique et rigoureuse de l'échantillon. Du fait que l'échantillon doit être transparent aux électrons pour permettre son observation (son épaisseur doit être inférieure à environ. 100 nm), sa préparation est plus exigeante et souvent plus longue que celle pratiquée pour le MEB. Pour obtenir des tranches très fines de membranes polymères d'UF et de MF, constituées de matériaux mous, elles doivent être déshydratées, enrésinées et durcies avant d'être coupées^{102,111,112}. Souvent, le contraste naturel de l'échantillon n'est pas suffisant, certains auteurs utilisent des métaux lourds^{111,113}, comme Pacheco et al¹¹¹ (2010), pour contraster le polymère en amont de son

observation. Il est à noter que l'augmentation du nombre des étapes de préparation de l'échantillon va de pair avec celle du nombre de biais.

La coupe s'effectue à l'aide d'un ultramicrotome. Il fonctionne en déplaçant l'échantillon devant une lame de couteau en verre ou en diamant (plus de détails dans le chapitre 2). Les tranches sont placées sur une grille métallique ajourée, elle permet la manipulation et le déplacement des coupes sous le faisceau d'électrons. Cette technique permet d'obtenir des tranches d'une épaisseur fine (100 nm) et homogène, sans perturber la composition chimique de l'échantillon¹¹⁴. Cependant, l'ultramicrotome peut induire des déformations (pression sur la coupe) et d'après Quin et al, reste approximatif, de manière générale, en comparaison avec la préparation de lame fine par la technique de FIB lift-out. De plus, les étapes préalables de préparation peuvent affecter l'échantillon (modification et déformation de la structure des pores du polymère pendant la déshydratation ou l'enrésinement).

1.4.3.2 Préparation de lame MET avec la technique de FIB lift-out

Les capacités d'usinage du FIB sur la matière peuvent être utilisées pour préparer des échantillons destinés à l'observation en MET. En effet, le faisceau d'ions permet d'extraire des lames minces (ou lamelles) de l'échantillon, transparentes aux électrons, avec des dommages limités et avec une grande précision^{115,116} (plus de détails en chapitre 2). Cette technique de préparation, appelée « lift-out », permet de s'affranchir de l'enrésinement du matériau et de contrôler précisément l'épaisseur de la lamelle. La préparation d'une lame mince (lift-out) n'a été appliquée que récemment pour les polymères, le défi étant de les protéger des dommages liés au faisceau d'ions^{88,117,118}. Elle commence à être employée pour les membranes de filtration^{117,118}. Qi et al. (2018)¹¹⁸ l'utilise pour préparer des membranes d'osmose inverse, où la partie supérieure de la membrane reste analysable, malgré les dommages liés à la préparation (montré en figure 1.20). Qin et al (2015)¹¹⁷, affirment que la qualité des coupes transversales en FIB est supérieure à celle des coupes transversales obtenues par microtome sur une membrane d'UF en polysulfone. Il ajoute que les lamelles FIB sont plus représentatives de la microstructure des couches poreuses. Cependant, leur préparation dans des structures polymères poreuses nécessite des précautions particulières, comme l'optimisation des faisceaux et le maintien mécanique de la membrane. Les principales complications sont les dommages causés par la grande sensibilité du matériau aux faisceaux d'ions et d'électrons ainsi qu'une déformation due à la surface de charge¹¹⁷. D'après, Kim et al¹¹⁹⁻¹²¹ (2011), les dommages peuvent être limités avec des courants de faisceau inférieurs à 100 pA et un temps d'exposition

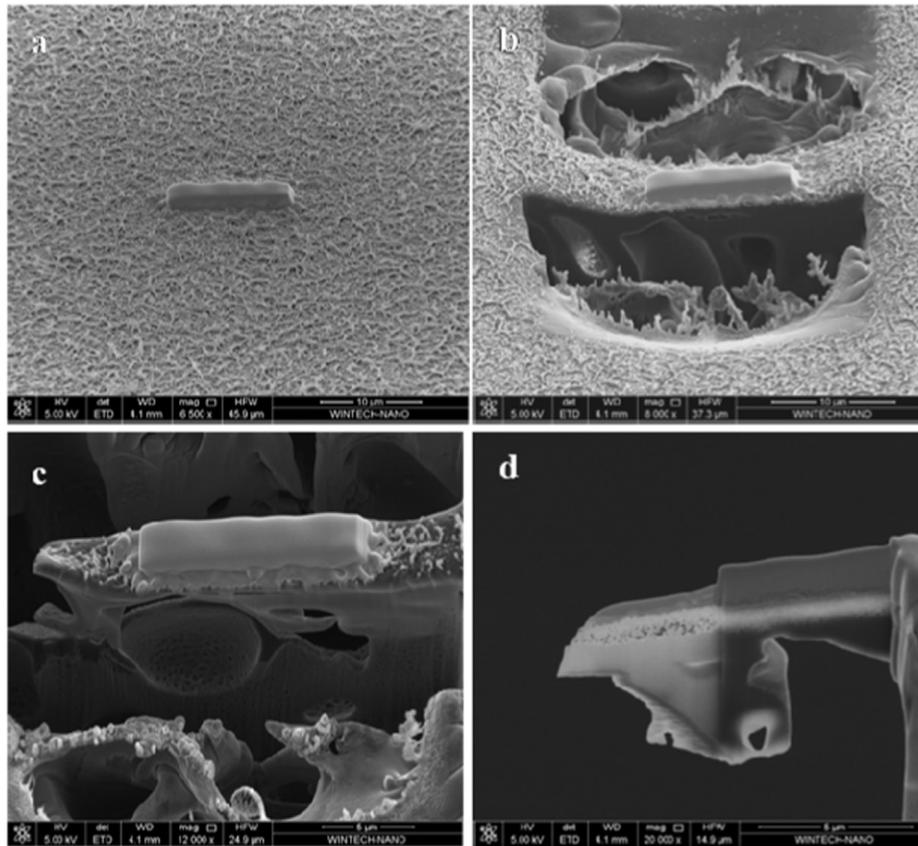


Figure 1.20 Préparation d'une lamelle dans une membrane d'osmose inverse : a) dépôt de platine b) et c) cross section d) lamelle transférée et affinée sur grille MET. D'après Qi et al (2018).

réduit (en μs). Enfin, en plus des difficultés liées à la sensibilité des polymères, cette technique présente des inconvénients en coût et en temps.

1.4.3.3 Observation des membranes polymères par MET

La microscopie électronique en transmission permet d'imager l'intérieur d'un échantillon avec une taille de pixel inférieure au nanomètre. Ainsi, les plus petits objets, comme les nanopores d'une membrane, peuvent être observés^{111,117}. Depuis quelques années, des MET avec correcteurs d'aberration sphérique pour les lentilles objectives (plus de détails en chapitre 2) se sont développés et aujourd'hui, des résolutions spatiales de moins d'un Angström sont courantes (en utilisant HRTEM, High-resolution transmission electron microscopy). Des modes d'imagerie et des techniques de spectroscopie peuvent être couplées au MET et donner des informations complémentaires lors de l'observation d'un échantillon. Notamment, le STEM (Scanning transmission electron microscopy), où un faisceau convergent balaye la surface de l'échantillon, permet d'obtenir des images contrastées en fonction de la composition chimique de l'objet observé en utilisant un détecteur HAADF (high-angle annular dark field), sous réserve que son épaisseur soit constante^{121,122}. Enfin, les techniques de spectroscopie comme

l'EDX, permettent de dessiner des cartes de la distribution des éléments chimiques de l'échantillon. L'EDX, couplé au MET, peut être combinée avec différents modes d'imagerie.

L'imagerie des membranes polymères en MET présente, comme pour le MEB, un challenge technique. En effet, les membranes sont des matériaux mous, amorphes, sensibles au faisceau et avec une densité homogène. Ainsi, les techniques s'appuyant sur l'aspect cristallographique d'un échantillon (par exemple : la diffraction) sont inaccessibles pour la caractérisation des

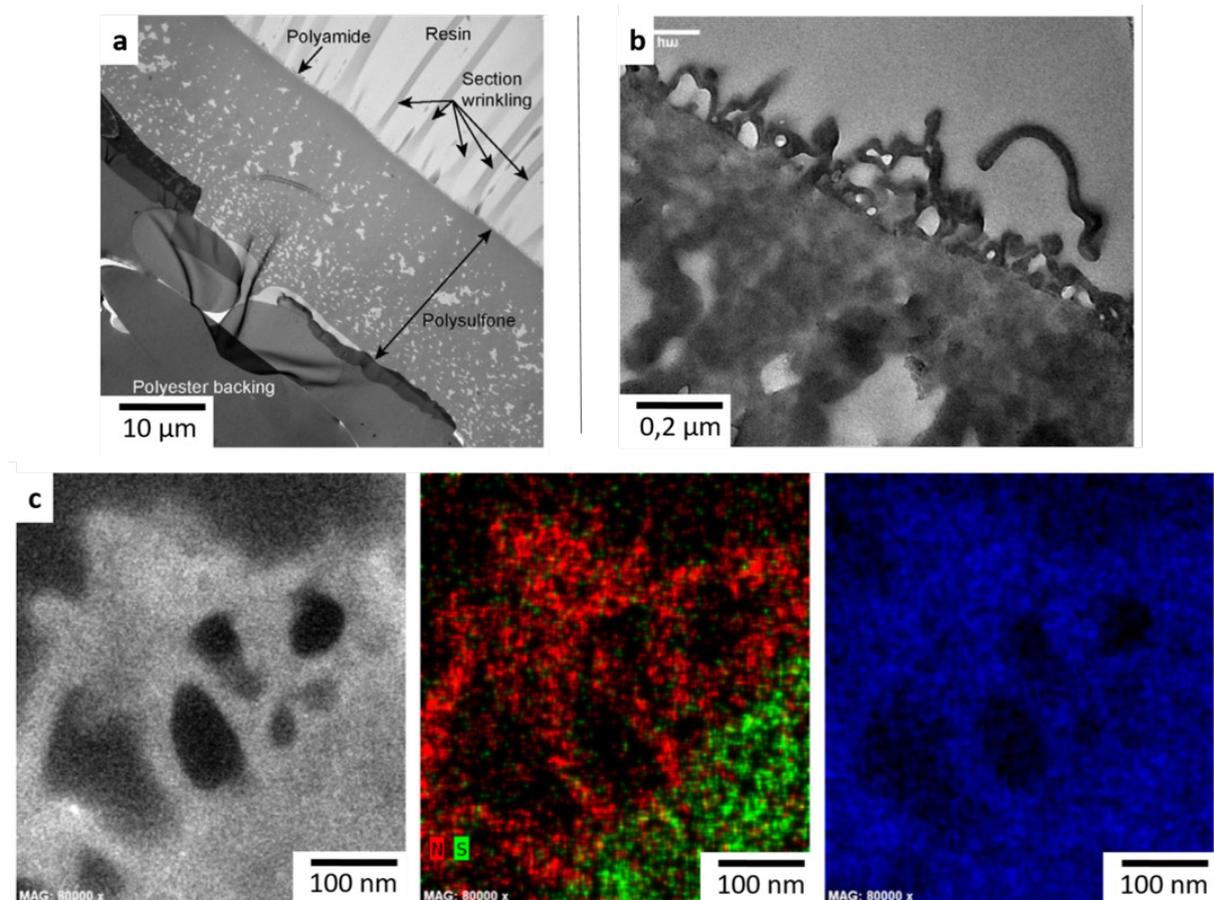


Figure 1.21 : Exemples de caractérisation de membrane d'osmose inverse par MET. (a) D'après Pacheco et al (2010), coupe transversale en MET classique d'une membrane d'osmose inverse ESPA3 après son inclusion en résine. (b) D'après Lin et al 2016 pour une membrane de RO SWC4+ en MET classique et (c) en STEM et cartographie EDX (le soufre en vert, l'azote en rouge et le carbone en bleu).

membranes polymères, elles ne font pas l'objet de cette étude. En revanche, les dommages liés à la sensibilité du matériau peuvent être évités, rendant l'imagerie des membranes possible. Pour ce faire, les paramètres du faisceau d'électrons, ainsi que différentes stratégies d'imagerie et de choix de détection, peuvent et doivent être optimisés.

Le MET est souvent utilisé en complémentarité du MEB pour la caractérisation des membranes de filtration polymères. Il permet de s'affranchir du problème de la profondeur de champ pour l'imagerie (imagerie des structures plus profondes dans les pores) et pour la

détection du signal en EDX (signal limité par l'épaisseur de la coupe inférieure à 100 nm). De plus, la résolution permet d'observer les plus petites structures de la membrane, comme dans la couche sélective. En conséquence, le MET est souvent employé pour caractériser des membranes d'osmose inverse (reverse osmosis, RO), du fait qu'elles contiennent les plus petites structures (inférieures au nanomètre)^{111,123-125}. Pacheco et al (2010)¹¹¹, montre que cette technique fournit des informations et un point de vue nouveau sur la nanostructure des membranes de RO. Il observe des sections transversales de membranes qui sont constituées d'une couche poreuse de polysulfone recouverte d'un film de polyamide à leur surface (figure 1.21). Les images résultantes capturent l'épaisseur, la morphologie et la densité de masse de l'ensemble de ce film. L'EDX est la technique de spectroscopie la plus présente dans la littérature pour la caractérisation de ce type de membrane, le film étant d'une nature chimique différente de celle de la couche poreuse^{122,124,126}. Par exemple, Lin et al¹²⁴ (2016), met en évidence des creux dans la couche polyamide d'une membrane d'osmose inverse en cartographiant l'azote, le soufre et le carbone en STEM-EDX (figure 1.21).

Néanmoins, en dépit du fait que la caractérisation des pores des membranes d'UF et de MF nécessite une résolution nanométrique (diamètre des pores pour les membranes d'UF et de MF respectivement : 10-100 nm ; 100 nm-10 μ m), le MET est rarement utilisé pour la caractérisation de ce type de membrane. La plupart des études employant le MET sur ce type de membrane le font en complément du MEB, pour contrôler la morphologie des membranes conçues par des laboratoires. Par exemple, Savva et al¹²⁶ (2014) emploient le HRTEM pour caractériser des membranes de MF PVP/PLLA et observer la répartition de nanoparticules Fe₃O₄ (dans ce cas, elles donnent des propriétés magnétiques à la membrane). Certaines études ont cependant utilisé le MET à d'autres fins, comme, par exemple, pour mesurer les propriétés structurales de la membrane^{103,105}. Notamment, Ziel et al¹¹⁹ (2008), calculent des profils de porosité à partir d'observation en MET de coupes d'une membrane PES de MF et met en évidence la couche sélective de la membrane ainsi que son degré d'asymétrie. Il est à noter que les mesures en MET, cependant, sont effectuées seulement sur une coupe parmi le volume de la membrane et ne sont pas nécessairement représentatives de l'ensemble de cette membrane.

1.4.4 Conclusion

La ME est un outil puissant qui s'est amélioré et démocratisé ces dernières années, notamment pour la caractérisation des membranes de filtration polymères, où le MEB est utilisé couramment pour observer la surface et le MET pour observer l'intérieur et les structures les plus fines. De nouvelles techniques de préparation, d'observation et d'analyse se sont

développées. Elles permettent de reconstruire la structure de la membrane en 3D avec une résolution nanométrique et d'imager les nanopores de la couche sélective. Néanmoins, malgré leur potentiel, elles sont peu explorées en comparaison du nombre d'études utilisant les procédés de filtration membranaire. En particulier, la caractérisation par ME des membranes de MF et d'UF polymère est moindre par rapport à celle des membranes de RO. Ce constat peut en partie s'expliquer par le challenge technique de l'emploi de la ME sur des membranes polymères (haute sensibilité, moins de contraste, artéfacts...etc.), mais aussi par son coût, sa disponibilité et le temps nécessaire pour réaliser une caractérisation complète. Dans le but de caractériser par ME les nanopores des membranes de MF et UF, de nouvelles stratégies doivent être développées, ce qui permettra, en définitive, d'élucider la relation structure-performance de la membrane, mais aussi, de comprendre leur interaction avec les molécules constituant le colmatage.

1.5 Caractérisation du colmatage des membranes par microscopie électronique

1.5.1 Contexte

Comme expliqué dans les parties précédentes, le colmatage est l'accumulation de matière à l'intérieur et à la surface de la membrane pendant la filtration, c'est le principal verrou de ce procédé. Malgré toutes les études entreprises pour le caractériser, il n'a pas été complètement décrit ni expliqué dans la littérature^{43,48,49,60}.

Les techniques de ME sont maintenant en expansion pour caractériser les membranes polymères d'UF et de MF. Le FIB/MEB permet de caractériser la structure nanoporeuse interne du matériau en 3D avec une résolution cubique de quelques nanomètres^{84,97}. De plus, l'utilisation de la spectroscopie EDX et de la microscopie MET permet d'obtenir des informations chimiques et structurelles supplémentaires avec une résolution spatiale élevée^{120,121,124}. Au-delà de la caractérisation de la membrane, il est essentiel d'avoir une meilleure compréhension du colmatage à l'échelle des pores (affinité entre les molécules, avec le polymère, organisation, etc.) ainsi que dans l'espace (3D). Malgré leur potentiel, ces techniques de ME sont encore peu appliquées à la caractérisation des membranes colmatées.

Pourtant, le FIB/MEB permettrait, comme pour la membrane seule^{84,97}, de caractériser en 3D le colmatage externe et interne après une filtration. Ainsi, différents comportements, comme la formation d'un cake (type brownien) observé en microscopie photonique par Yu et al⁵³ (2021),

pourraient être mis en évidence sans limitation de profondeur. Ou bien, le rôle initiateur des protéines dans le colmatage pourrait être observé avec une meilleure résolution que dans les travaux de Ferrando et al⁶⁵ (2005) et de Hughes et al⁸⁰ (2006). En plus de la visualisation, l'utilisation du 3D FIB/SEM pourrait permettre une quantification du colmatage. En outre, une comparaison de la structure des membranes vides puis colmatées permettrait de révéler les affinités structurelles du colmatage (colmatage influencé par la forme et la chimie du pore). Enfin, les pores colmatés de la couche sélective, le colmatage ainsi que les biomolécules elles-mêmes, peuvent être caractérisés en MET pour permettre une meilleure compréhension à l'échelle nanométrique^{119,127-129}.

Cependant, si l'on souhaite caractériser le colmatage des membranes polymère par de la matière organique comme des biomolécules (des protéines ou des lipides par exemple), des défis techniques supplémentaires s'ajoutent à ceux déjà existants pour la caractérisation des membranes d'UF et de MF par ME. En effet, les biomolécules sont, tout comme la membrane, sensibles aux faisceaux d'électrons et d'ions, amorphes, isolantes et présentent un faible contraste. Ainsi, la différenciation avec le matériau polymère et entre elles-mêmes semble difficile. Lors de l'observation au microscope, l'emploi de marquage spécifique sur les biomolécules, en amont de la filtration, pourrait permettre de les identifier.

Enfin, pour observer une membrane colmatée au plus près des conditions réelles de filtration, la préparation d'échantillon classique pour la ME (déshydratation) n'est pas envisageable (destruction de la structure du colmatage et des biomolécules^{89,130}). De nouvelles stratégies doivent être explorées, comme les cryotechniques (observation de l'échantillon congelé), qui sont compatibles avec le FIB/MEB et le MET. Cependant, ces techniques sont difficiles à mettre en place car elles requièrent un niveau avancé d'équipement, d'expertise, et le plus important, une préparation d'échantillon rigoureuse pouvant inclure malheureusement des biais. Enfin, elles n'ont été décrites que récemment dans la littérature¹³¹⁻¹³³.

1.5.2 Marquage des biomolécules dans la littérature

1.5.2.1 Intérêt

Comme expliqué dans les parties précédentes, la caractérisation du colmatage de membranes d'UF et MF en polymères par des mélanges modèles de biomolécules, ici des protéines et des lipides d'origine végétale, fait l'objet de cette thèse. Ces mélanges ont été conçus lors de travaux de thèse précédents au laboratoire GEPEA^{6,41}. Chaque mélange a des propriétés et des

compositions distinctes (voir chapitre 2). Généralement, les lipides se rassemblent en gouttelettes sphériques stables^{6,42} tandis que les protéines se présentent sous forme d'agrégats ou de molécules solubles dans les phases liquides^{6,134,135}. Cependant, les suspensions contenant les lipides et protéines qui sont étudiées ici possèdent un faible contraste et une forte sensibilité au faisceau d'électrons^{127,136}. En effet elles sont constituées d'éléments légers comme le carbone, l'azote, l'oxygène ou l'hydrogène et sont transparentes aux électrons. Ensemble, ces biomolécules ont de nombreuses interactions physiques et chimiques^{6,134,135}. Selon Linder et al¹³⁴ (2009) et Stradner et al¹³⁵ (2004), les protéines (dans leur cas, des protéines actives en surface de champignons filamenteux et des protéines (lysozyme) de blanc d'œuf de poule, respectivement) peuvent se regrouper en monocouches et en agrégats dans les phases aqueuses. En présence de lipides, les protéines peuvent s'organiser en couches intermédiaires à l'interface entre l'huile et l'eau. Les gouttelettes lipidiques sont alors enrobées de protéines et stabilisées par la combinaison de la répulsion électrostatique et sphérique (évite la coagulation et la coalescence des gouttelettes)¹³⁷. Lors des précédents travaux de thèse de Liu et al⁶ (2021), ce phénomène a été constaté sur les mélanges modèles de cette étude.

Les biomolécules (lipides et protéines) et les membranes polymères sont généralement constituées des mêmes atomes (par exemple de C, N ...). Il peut être donc difficile de différencier la membrane d'un pore colmaté par des biomolécules en MEB (le contraste d'une image MEB est expliqué avec plus de détail dans le chapitre 2). Par conséquent, le traitement des images de ME (et notamment la segmentation des images) peut être délicat. Ferrando et al⁶⁵ (2005), ainsi que Hughes et al⁸⁰ (2006) ont montré que les protéines avaient un rôle premier dans la formation du colmatage. Sans différenciation, il est impossible de montrer ce phénomène en ME. Ainsi, dans le but de caractériser la formation du colmatage sur et dans des membranes d'UF et de MF, une différenciation des molécules est nécessaire. Le marquage des lipides et des protéines permettrait de rehausser le contraste général du colmatage, mais aussi de localiser et de différencier les biomolécules. In fine, le contraste des biomolécules permettrait de comprendre l'architecture du colmatage à la surface et à l'intérieur de la membrane. Deux stratégies sont possibles : le marquage aux métaux lourds et l'immunomarquage.

1.5.2.2 Identification des biomolécules par immunomarquage

L'immuno-marquage est utilisé depuis longtemps pour faire de l'imagerie fonctionnelle¹³⁸⁻¹⁴⁰. C'est-à-dire qu'il est adéquat pour localiser spécifiquement des molécules dans un milieu, comme une cellule^{141,142}. Brièvement, il consiste à cibler un antigène (macromolécule synthétique ou naturelle) avec un premier anticorps « A » qui le reconnaît. Un second anticorps « B » (lui-même anti-A), couplé à une bille d'or, se fixe au premier et révèle précisément sa localisation (figure 1.22). Ainsi, une molécule d'intérêt peut être localisée au sein d'une matrice¹⁴³. Plusieurs techniques de préparation sont possibles, elles peuvent être séparées en trois catégories : l'immunomarquage d'un objet, (i) à l'intérieur, (ii) à l'extérieur et (iii) avant ou après l'enrésinement, d'une matrice ou d'une cellule.

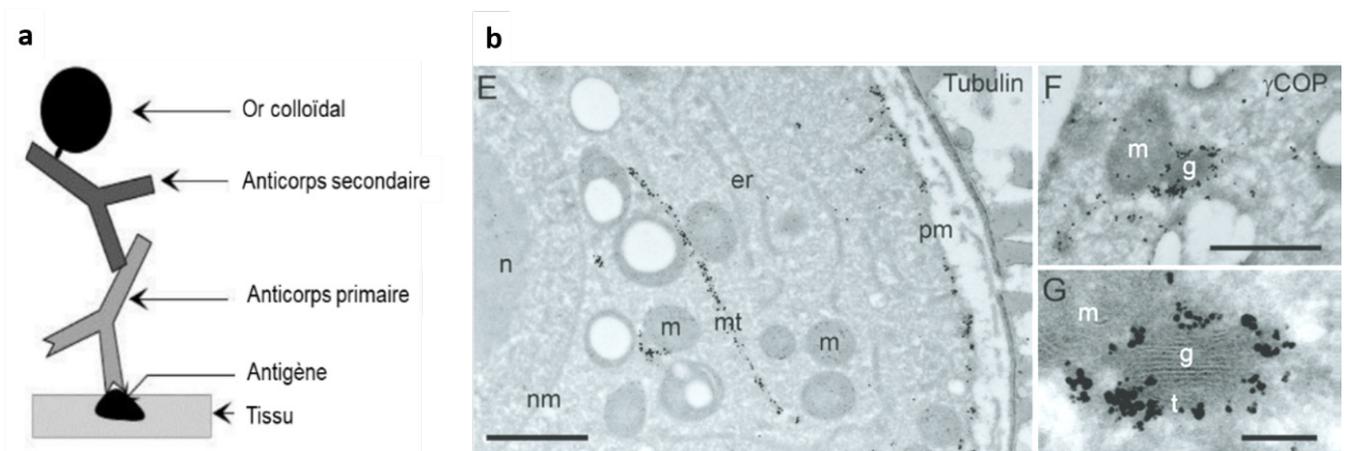


Figure 1.22 : Principe de l'immuno-marquage en ME avec billes d'or. (a) schéma du principe d'immuno-marquage. (b) Exemples de marquage avec des billes d'or sur une cellule d'un grain de pollen d'après Ripper et al, 2008.

L'immunomarquage d'un objet à l'intérieur d'une matrice ou d'une cellule présente l'inconvénient d'endommager l'ultrastructure. Cette technique requiert l'utilisation de détergents pour permettre la pénétration interne des anticorps, ainsi qu'un saturateur de site (souvent de la BSA, sérum d'albumine bovin) pour éviter les faux positifs^{134,136}. De ce fait, elle n'est pas adaptée à la localisation des biomolécules au sein du colmatage des membranes. Elle aurait un impact considérable sur la structure, ce qui mènerait à la perte des conditions natives de l'échantillon lors de son observation. Ensuite, bien que l'immunomarquage d'un objet à l'extérieur d'une matrice ou d'une cellule (ici des lipides et des protéines de mélanges modèles) permet de garder l'aspect hydraté et natif de l'objet, celui-ci doit être modifié¹⁴³. Ainsi, le comportement natif des objets marqués pendant la filtration et la formation d'un colmatage n'est pas garanti. Enfin, l'immunomarquage avant ou après enrésinement n'est pas compatible pour observer du colmatage sur des membranes hydratées. De plus, il nécessite l'utilisation de

fixateurs doux pour préserver les épitopes, ce qui endommage l'ultrastructure, en plus des effets de la déshydratation et de l'inclusion en résine^{139,143}.

Au-delà de ces aspects, bien que cette technique soit compatible avec l'utilisation des conditions cryogéniques¹⁴², l'immunomarquage est une technique rigoureuse, difficile à prendre en main, coûteuse, et chronophage. De surcroît, elle ne permet pas de rehausser le contraste et l'ajout de contrastant en complément est souvent nécessaire¹⁴¹. C'est pourquoi l'immunomarquage n'est pas le candidat idéal pour réaliser notre étude et différencier les biomolécules du colmatage des membranes de filtration. Cependant, pour une meilleure spécificité, dans le futur, sur des mélanges réels extraits de microalgues (et après les résultats obtenus dans ce travail de thèse et présentés au chapitre 4), il pourrait être envisagé.

1.5.2.3 Identification des biomolécules par ajout de contrastant à base de métaux lourds

Contraster un objet (aussi appelé « coloration ») pour l'observer en ME est une pratique très courante^{144,145}. En effet, les objets faisant peu d'interaction avec le faisceau d'électrons ne donnent pas un bon contraste à l'image, ce qui rend difficile leur observation¹¹⁴. Une des solutions est d'augmenter le signal et donc le nombre d'interactions (les signaux résultent de l'interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon), et par conséquent le contraste, avec l'ajout de métaux lourds (appelé contrastant) pendant la préparation de l'échantillon¹⁴⁶ (plus un atome est lourd, plus il va renvoyer du signal lors de son interaction avec le faisceau). Cependant, une utilisation à d'autres fins est possible. Les propriétés sélectives de plusieurs contrastants peuvent être utilisées pour cibler, marquer, une molécule ou une liaison d'intérêt. Par exemple, Sato et al¹⁴⁷ (2019), utilisent et comparent plusieurs contrastants à base de métaux lourds, comme l'acétate d'uranyle ou l'osmium tetroxyde, pour le marquage et l'identification de protéines, d'acides nucléiques et de lipides au sein d'un tissu animal.

La majorité des contrastants populaires en ME est utilisée pour rehausser le contraste général de l'échantillon, par conséquent, ils ne sont pas spécifiques dans leur action. Cependant, certaines réactions, impliquant des métaux lourds, sont spécifiques à un certain degré et dans des conditions contrôlées¹⁴⁴. Par exemple, il a été rapporté par Monneron et Bernhard¹⁴⁸ (1969) que l'acétate d'uranyle, dans des conditions de coloration très strictes, différencie l'ARN de l'ADN. Les matériaux biologiques, comme les lipides et les protéines de cette étude, possèdent des sites ou structures spécifiques qui favorisent les liaisons chimiques avec des métaux lourds^{127,145,149}. Ce n'est pas le cas des polymères, qui ne possèdent pas de tels sites, le

rehaussement général du contraste est possible par absorption de métaux lourds, mais sans spécificités^{113,145}.

Ainsi, outre le fait de rehausser le contraste général des biomolécules¹⁴⁴, et donc du colmatage, le marquage par métaux lourds pourrait permettre d'identifier les biomolécules dans un mélange modèle. De surcroît, il est moins invasif que l'immunomarquage et peut être pratiqué en amont de la filtration sur les biomolécules. Enfin, il est facile à mettre en place, rapide, accessible et inclut peu d'étapes et moins de biais. Pour toutes ces raisons, il semble être le meilleur candidat pour l'identification des biomolécules dans le colmatage des membranes de filtration (sous réserve de concevoir le meilleur couple contrastant/site à contraster).

1.5.3 L'usage des cryotechniques pour l'exploration du colmatage en conditions natives.

1.5.3.1 Intérêt / contexte

Les cryotechniques consistent à congeler un échantillon (cryofixation), le préparer et l'observer à basse température. Elles ont été initiées et développées par les travaux de Dubochet et al¹⁵⁰ depuis les années 80. En plus de limiter les dommages liés à la sensibilité de l'échantillon au faisceau d'électrons, la congélation permet de s'affranchir des effets de la déshydratation et d'observer l'échantillon au plus près des conditions natives. Exemple d'illustration : la figure 1.23a montre les effets de la déshydratation sur un échantillon biologique hydraté. C'est une pratique qui commence à être largement utilisée en biologie (observation de cellule, tissus ou échantillon présentant beaucoup d'artéfacts dus à la déshydratation)¹⁵¹. Elle commence à être appliquée aux matériaux (alternative pour l'imagerie des matériaux sensibles, comme les matériaux organiques¹⁵²). Elle peut être adaptée pour les microscopes à balayage comme ceux en transmission et pour les matériaux épais comme les solutions en suspension¹⁵³. Ainsi, les

cryotechniques semblent adaptées à l'observation des biomolécules et du colmatage des membranes de filtration polymères.

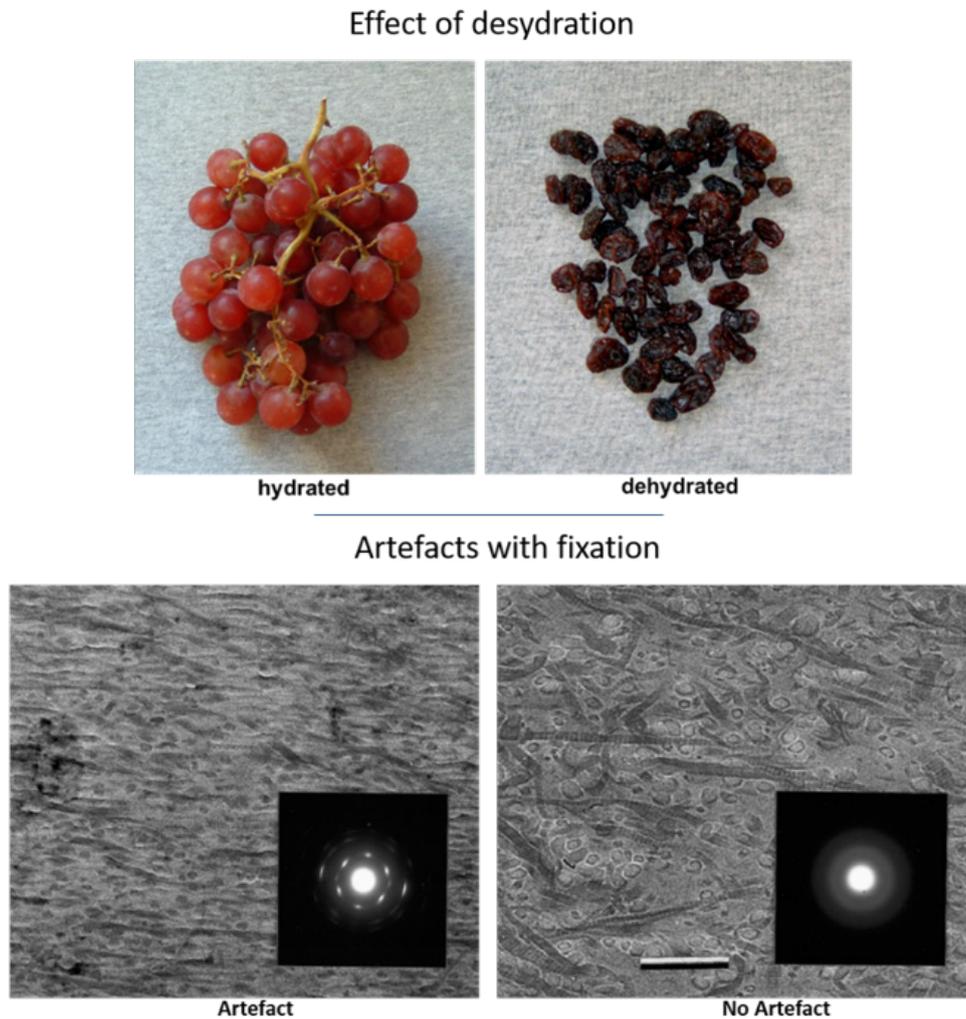


Figure 1.23 : (a) Effet de la déshydratation sur la structure et la morphologie d'une grappe de raisin. (b) Artefact possible pouvant invalider les résultats suite à la cryofixation. D'après la présentation de Paul Verkade, Cryo EM Course Nottingham, September 2021

Cependant, ces techniques sont difficiles à mettre en œuvre. Pour causes, elles demandent des équipements spécifiques, de l'investissement en coût et en temps, de l'expertise pour la préparation, le déroulement de l'expérience et l'interprétation des données¹⁵⁴. L'usage des cryotechniques pour les échantillons biologiques, et particulièrement pour le FIB/MEB, n'a été décrit que récemment dans la littérature et il est difficile de faire des comparaisons avec des études déjà existantes. En particulier, dans la caractérisation de matériaux (membranes) et de biomolécules (lipides et protéines de mélanges modèles) ensemble. Enfin, la cryofixation de l'échantillon, l'étape clé de ce procédé, doit être rigoureuse pour prévenir des artefacts pouvant invalider les résultats (figure 1.23b)^{155,156}.

1.5.3.2 Cryofixation des échantillons

Plusieurs techniques existent pour cryofixer des échantillons, elles permettent d'atteindre des qualités de fixation différente. Bien que la cryofixation permette de préserver l'échantillon plus durablement que les techniques de fixation dites « classiques » (ci-dessus), la cryofixation peut entraîner, avec la formation de glace cristalline, la dégradation de la structure interne de l'échantillon. Il s'agit de la formation de cristaux de glace hexagonaux (glace cristalline) lors de la congélation lente d'un échantillon hydraté (par exemple, dans un congélateur). Pour des échantillons biologiques, comme des cellules, la formation des cristaux provoque un stress hydraulique ainsi qu'une pression osmotique à travers l'échantillon, avec pour conséquences, des dommages irréversibles qui sont observés et qui ne permettent pas la caractérisation de l'échantillon dans son état natif¹³³.

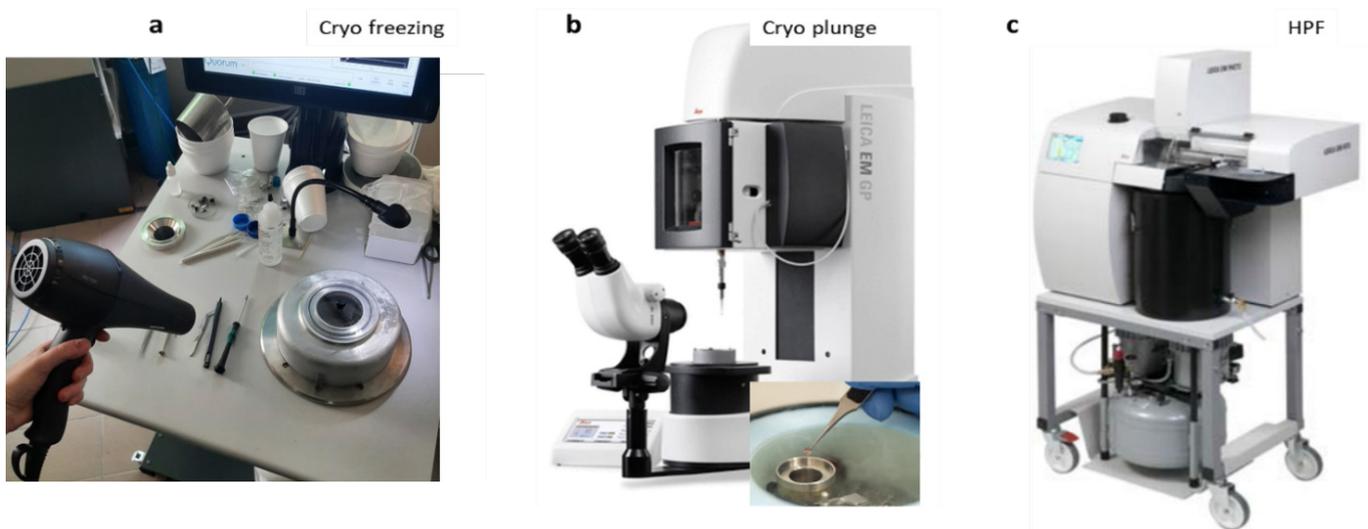


Figure 1.24 : Les différentes techniques de cryofixation : a : par freezing ou cryo-freezing, b : par cryo-plunge et c : par HPF

Pour pallier cela, la formation de glace amorphe est nécessaire (augmentation du rendement de refroidissement ou de la vitesse de congélation de l'échantillon (> 100.000 K/s)). Elle présente peu ou nullement de cristaux et préserve les structures internes^{154,157}. Quand l'eau est congelée à grande vitesse, les molécules ne peuvent s'organiser en état cristallin et sont instantanément immobilisées, c'est ce qu'on appelle l'état « vitrifié » de l'eau¹³³. Si on maintient la température de l'échantillon en dessous de -137°C , l'état vitrifié de l'échantillon est maintenu. Sinon, la formation de glace cubique (jusqu'à -115°C) puis hexagonale se produira^{157,158}. Ces changements d'état sont irréversibles, il est impossible de revenir à l'état vitrifié en refroidissant un échantillon présentant des cristaux cubiques ou hexagonaux. Pour les échantillons hydratés, atteindre l'état vitrifié dépend du coefficient thermique de

l'échantillon lui-même. C'est-à-dire la capacité d'un matériau à transférer la chaleur à travers lui-même, elle dépend de ses capacités à conduire et à accumuler la chaleur¹⁵⁶. Par conséquent, le type et la taille de l'échantillon influencent directement le choix de la technique la plus adaptée pour obtenir l'état vitrifié. Les trois principales techniques de cryofixation sont par « freezing » ou « cryo-freezing », cryo-plunge et HPF (« High Pressure Freezing » ou congélation à haute pression), la figure 1.24 illustre les machines utilisées pour chacune d'entre-elles.

- Cryofixation par « freezing » dans l'azote pâteux (« slushed nitrogen »)

Une des possibilités est de fixer l'échantillon (entier) à un support métallique conducteur et de le plonger dans l'azote pâteux (plus froid que l'azote liquide ; -210°C contre -196°C). Il est obtenu à partir d'azote liquide (LN2) mis sous vide pendant quelques minutes. Cette technique permet d'éviter l'effet « Leidenfrost » (formation d'une couche gazeuse entre l'azote et la surface chaude de l'échantillon et de son support), qui diminue beaucoup la conductivité thermique et donc la qualité de la cryofixation¹⁵⁹. Cependant, du fait de la vitesse limitée de refroidissement, l'état vitrifié est obtenu sur les parties de l'échantillon en contact avec le support, et sur une profondeur de quelques micromètres seulement (≈ 1 à $10\ \mu\text{m}$ de profondeur)¹⁶⁰. Cet état est variable d'un échantillon à l'autre en fonction de sa nature, sa densité et son épaisseur. Par exemple, Essani et al¹⁶¹ (2022) mesurent sur des hydrogels cryofixés par freezing, une vitrification jusqu'à $20\ \mu\text{m}$ de profondeur. Pour le reste de l'échantillon, la formation de glace cristalline est inévitable, endommageant la structure de celui-ci. Après sa congélation, l'échantillon peut être transféré à froid dans le microscope pour son observation.

- Cryofixation par plunge-freezing dans de l'éthane liquide

Le plunge-freezing est utilisé pour congeler des molécules ou des petits objets en suspension dans l'eau. Les petits objets (comme des biomolécules) peuvent être suspendus dans une fine couche d'eau ($< 100\ \text{nm}$) et déposés sur une grille de support MET. La grille est alors plongée dans un réservoir d'éthane liquide ($-180\ ^{\circ}\text{C}$). En plus de ne pas subir l'effet Leidenfrost, l'éthane liquide a un meilleur rendement de refroidissement que l'azote liquide¹⁵³. Il permet d'obtenir l'état vitrifié aussi bien pour une solution de molécules en suspension que pour des échantillons épais jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres^{156,161}. Après la cryofixation, les échantillons sont conservés dans du LN2 ou directement observés en cryo-MET.

- Cryofixation par HPF (High Pressure Freezing) :

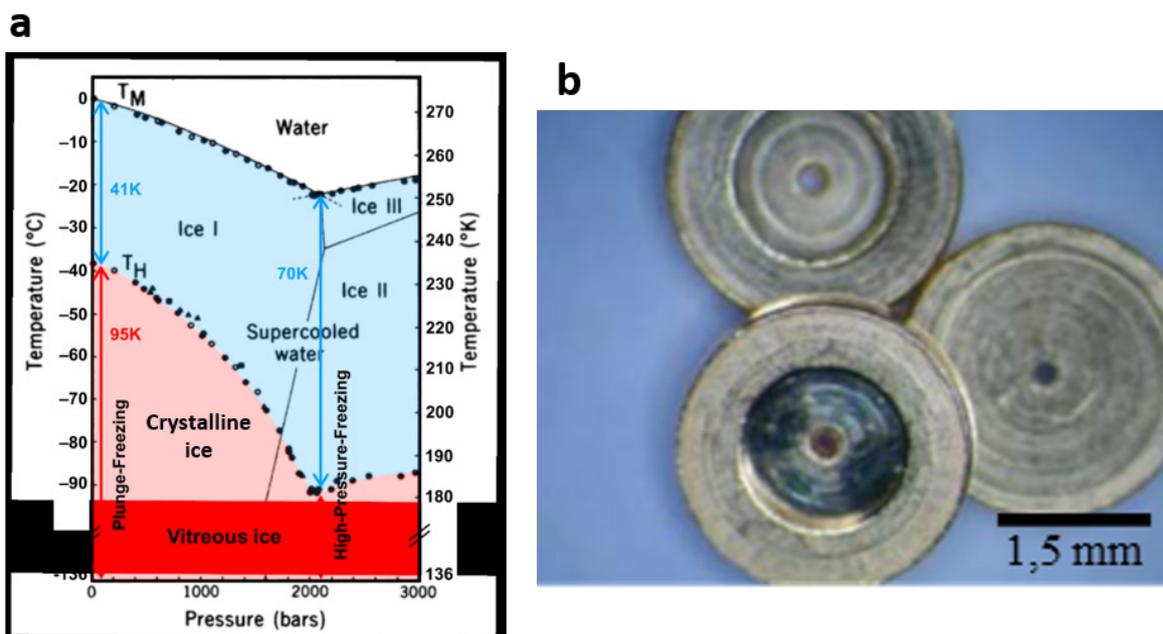


Figure 1.25 : a : Diagramme de phase de l'eau, d'après la thèse de Félix J B Bäuerlein. b : support, « carrier » pour les échantillons HPF

La plupart des échantillons sont trop épais pour être cryofixés en entier et de manière homogène par plunge freezing. La technique de congélation par HPF est celle qui possède la vitesse de refroidissement la plus rapide. Elle permet d'obtenir l'état vitrifié de l'échantillon sur 200 à 600 μm d'épaisseur^{133,162,163}. L'utilisation de produits chimiques additionnels, appelés « cryoprotectant », permet d'éviter des artefacts de congélation supplémentaires (gradient de congélation ou cristallisation de l'échantillon par exemple¹⁵⁶). Le procédé s'appuie sur le diagramme de phase de l'eau (figure 1.25a), où, à une pression de 2045 bar, elle congèle à -90°C (limite de la formation de la glace vitreuse) au lieu de -40°C. Par conséquent, dans ces conditions, sans passer par la phase de glace cristalline, l'échantillon est directement vitrifié¹⁶³. Il est confiné dans un support HPF appelé « carrier » (figure 1.25b) et placé à 2045 bar dans une chambre pressurisée. L'échantillon est refroidi à une vitesse de 18 000 K/s par des tirs d'azote (à 2050 bar). Après la cryofixation, les échantillons (dans les carriers) peuvent être conservés dans de l'azote liquide, être observés directement (cryo-MEB) ou bien préparés à froid pour faire du cryo-MET (freeze substitution). Il est à noter que les échantillons doivent être observés le plus rapidement possible pour garantir leur préservation.

1.5.3.3 Préparation des échantillons HPF pour le cryo-MET

Dans le cas des échantillons HPF, il est possible de les observer directement (par cryo-MEB) ou bien de les préparer pour être observés en cryo-MET. En effet, les conditions d'observation

en cryo-MET, en addition du maintien des basses températures, sont les mêmes qu'en MET classique (expliqué ci-dessus). Il en est de même pour les contraintes de préparation de l'échantillon, son épaisseur doit être inférieure à 100 nm. Deux possibilités : soit l'échantillon est déshydraté, enrésiné et coupé à froid, c'est ce que l'on appelle la « freeze-substitution », soit l'échantillon est observé au cryo-FIB/MEB et une lamelle est extraite à froid (cryo lift-out).

Dans le premier cas, l'usage d'une station ou d'un automate de substitution, maintenant toutes les étapes à froid, et d'un cryo-ultramicrotome sont nécessaires¹⁶⁴. Les effets de la fixation chimique et de la déshydratation sont évités. L'échantillon est fixé par la congélation et la glace est remplacée, à froid, par un solvant^{164,165} (les températures utilisées sont assez basses pour éviter la formation de glace par dévitrification, tout en étant supérieures au point de fusion du solvant). Il est à noter que chaque étape est complexifiée par le maintien des basses températures et intègre plus de biais qu'aux mêmes étapes à température ambiante. En outre, cette technique est longue et demande des équipements supplémentaires. Dans le but de pallier cela, McDonald et al.¹⁶⁵ (2011) ont publié une technique permettant d'effectuer la freeze substitution en 3 heures ou moins (elle est appelée la QFS, quick freeze substitution). C'est un procédé qui permet de remplacer la glace par de l'acétone tout en remontant la température de l'échantillon à température ambiante. In fine, cette technique permet d'avoir des effets positifs de la cryofixation et les avantages de la manipulation à température ambiante.

Dans le deuxième cas, une lamelle peut être extraite de l'échantillon et affinée à froid. Pour cela, il faut avoir accès à un cryoFIB, équipé d'une platine et d'un nanomanipulateur cryo, il permet de faire des lamelles à basse température¹⁶⁶. Lorsque la lamelle est fixée sur une grille MET, un système de transfert à froid doit être mis en place pour transférer l'échantillon dans le cryoMET et enfin, procéder à son observation. C'est une technique décrite récemment dans la littérature¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Le nombre important d'étapes et d'équipements nécessaires, ainsi que sa difficulté d'exécution, font de cette technique un sujet actuellement discuté par la communauté scientifique¹⁶⁷. Il est à noter, un tel équipement et une telle expertise ne sont pas disponibles, pour l'instant, dans nos laboratoires.

1.5.4 La caractérisation du colmatage des membranes par ME dans la littérature

1.5.4.1 Intérêt / contexte

En vue des exigences techniques nécessaires pour analyser le colmatage par ME, au plus près des conditions réelles de filtration (décrites précédemment), il existe très peu d'études rapportant une telle caractérisation. De surcroît, la différenciation des molécules en cryo-ME n'a pas été rapportée, à notre connaissance, en ce qui concerne l'étude du colmatage.

De fait, la plupart des études rapportant une caractérisation du colmatage des membranes par ME n'utilisent pas les cryotechniques^{57,76,123}. Les auteurs observent le colmatage avec des artefacts dus à la déshydratation, ce qui les éloigne des conditions réelles de filtration. En outre, la sensibilité des molécules du colmatage rend l'imagerie très difficile (effets de charge, dommages, drifts...etc.), ce qui explique le faible, voire inexistant nombre de publications à ce propos.

1.5.4.2 Caractérisation du colmatage des membranes par cryo-MEB ou cryo-MET

Dans la littérature, plusieurs études utilisent les cryotechniques pour limiter les dommages sur l'échantillon pour assurer une bonne conservation du matériau. C'est notamment le cas pour Brickey et al⁹⁷ (2021), ils observent une membrane de polymère à froid dans le but de préserver et de limiter les dommages. De plus, comme expliqué auparavant, beaucoup d'auteurs cryofixent la membrane étudiée dans l'azote liquide avant de la casser et de l'observer sur la tranche^{85,86}. Il est à noter que malgré l'utilisation des cryotechniques pour la caractérisation des membranes propres, il n'existe que peu d'étude concernant la caractérisation des membranes colmatées.

Quelques études rapportent la pratique de cryofracture pour l'analyse du colmatage interne et externe de la membrane^{57,169}. James et al.¹⁶⁹ (2003) confirment, avec cette méthode, le rôle important des interactions protéines-polymères et protéines-protéines dans l'encrassement initial des membranes de MF et d'UF. Ils montrent la formation d'une couche de gel légèrement compressible, qui se densifie au fur et à mesure de la filtration à la surface de la membrane et qui entraîne la stabilisation du flux. Cependant, les observations sont effectuées à température ambiante et les changements brusques de température biaisent la caractérisation du colmatage.

En outre, un seul plan 2D de la membrane est observé, ce qui n'est pas représentatif de la membrane. Pour la réalisation de l'observation, il faut casser la membrane dans une zone d'intérêt et sans endommager les structures internes. Une autre étude, récente, de Huang et al¹⁷⁰ (2019), montre l'observation en cryo-MEB de membranes de MF PES colmatées avec une émulsion huile/eau couplée à des nanoparticules magnétiques (voir figure 1.26). Les membranes ont été préparées par freezing dans l'azote pâteux. L'observation du colmatage au plus près des conditions réelles leur permet de déduire le couplage le plus approprié pour augmenter la performance des membranes et limiter la formation d'un gâteau à leur surface. Cependant, aucune autre étude similaire n'a été rapportée sur la caractérisation du colmatage par cryo-ME, à notre connaissance. En outre, la cryofixation par HPF sur des membranes de filtration n'a pas été rapportée dans la littérature.

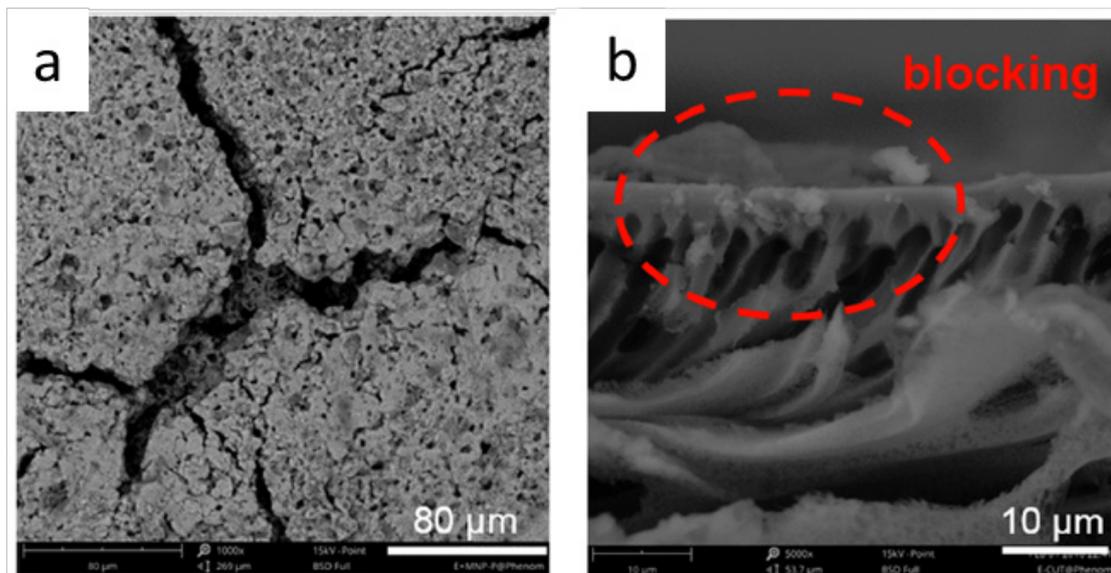


Figure 1.26 : Membrane de MF PES en conditions cryogéniques : formation d'un gâteau à la surface de la membrane colmatée. Vue de la surface (a) et vue en cross section (b). Le cercle rouge indique une zone de colmatage à la surface de la membrane. D'après Huang et al (2019)

Concernant la caractérisation de biomolécules (ici celles constituant le colmatage) par cryo-ME, elle est déjà développée et couramment utilisée dans le domaine de la biologie^{132,171-173}. En effet, c'est une technique qui permet d'observer, sans dégrader, la structure fine des biomolécules. Il existe dans la littérature de nombreux exemples en cryo-ME avec une préparation par cryo-plunge (pour leur observation par cryo-MET) ou freezing (pour leur observation par cryo-MEB) comme, par exemple, pour des protéines^{171,172}, des lipides¹⁷⁴, des ribosomes¹⁷⁵ ou encore des vésicules¹⁷⁶.

1.5.4.3 Caractérisation du colmatage en ME classique

La plupart des études rapportant une caractérisation du colmatage par ME n'utilisent pas les cryotechniques. Il est alors possible de faire des cryo fractures (expliqué précédemment) ou bien d'observer le colmatage avec les artéfacts de la déshydratation. En vue des difficultés pour imager des molécules et du polymère en ME, Shin et al. (2017) rapportent être les premiers à montrer des images de pores colmatés en STEM-HAADF pour des membranes de RO. La plupart des pores de la couche active sont saturés par le foulant, constitué de copolymères en solution. Cependant, les biomolécules sont plus difficiles à observer en ME classique, du fait qu'elles doivent subir une préparation particulière, altérant leur structure de manière irréversible (voir le chapitre 2).

Il existe l'option de l'usage d'un MEB environnemental (ESEM, ou, plus généralement, le MEB à pression variable). Il permet d'observer des échantillons avec un vide faible et il est employé pour l'observation directe de spécimens hydratés^{177,178}. Wang et al.¹⁷⁷ (2011) utilisent la congélation à l'azote liquide couplée à l'observation par ESEM (où l'échantillon est observé à -25°C) pour examiner la forme et la structure du colmatage interne et externe dans une membrane de bioréacteur. Les images ESEM ont montré la formation d'un gâteau très poreux et perméable avec une structure de type éponge. La couche formée s'est avérée contenir une fine (<10 µm) couche de gel sous le corps principal du gâteau, qui est en grande partie responsable du colmatage. Cependant, le grandissement maximal possible en ESEM est restreint et peut conduire à une perte de détails de l'échantillon. Ainsi, d'après l'auteur, la plupart des images ESEM du colmatage sur la surface de la membrane sont plutôt floues (en raison des basses pressions utilisées pendant l'imagerie). L'autre problème pour l'ESEM est la déshydratation de l'échantillon, elle est résultante de l'évaporation de l'eau à température ambiante dans la chambre à basse pression du MEB.

Enfin, les techniques de spectroscopie, comme l'EDX, peuvent être couplées au MEB ou au MET pour obtenir, en plus de la visualisation, des informations chimiques du colmatage⁴⁹. Quelques études rapportent l'utilisation de l'EDX couplée au MEB pour caractériser le colmatage de surface (voir la section 4.3.1 du chapitre 4). Par exemple, Rabiller-Baudry et al.⁷⁶ (2002), utilisent l'EDX couplé au MEB pour mettre en évidence l'absorption de tous les composants du lait analysé (protéines, lactose, sels) sur une membrane de MF PES. Cependant, comme expliqué précédemment, l'observation se déroule à température ambiante avec les

artéfacts de la déshydratation. De plus, aucune étude de caractérisation par EDX du colmatage interne par des biomolécules n'a été rapportée.

1.5.5 Conclusion sur la caractérisation du colmatage par ME

La caractérisation du colmatage des membranes est indispensable pour comprendre et à terme, diminuer le colmatage des membranes de filtration polymères. L'emploi de la ME pour caractériser la structure du colmatage externe et interne, pour différencier les molécules et pour comprendre leurs rôles dans ce procédé semble pertinent. Seulement, cela nécessite le développement de techniques adaptées, comme, dans un premier temps, le marquage des biomolécules, ce qui permettra leur différenciation. Et dans un deuxième temps, l'imagerie en 2D et en 3D des membranes colmatées par ces biomolécules. En outre, la cryofixation est indispensable pour une caractérisation dans l'état le plus proche des conditions réelles de filtration. Enfin, les biomolécules elles-mêmes peuvent être caractérisées en suspension par cryo-MET, ce qui donnerait des informations spécifiques sur la structure et la chimie de ces particules.

Cependant, une telle caractérisation est un véritable défi. D'une part, la sensibilité de la membrane et des biomolécules ainsi que leurs faibles contrastes requièrent le développement de stratégies et de protocoles spécifiques. D'autre part, les techniques de pointe à mettre en place, comme les cryotechniques, demandent des équipements et une expertise spécifique. Enfin, aucune étude comparable n'a été décrite dans la littérature.

1.6 Objectifs de recherche :

Afin de répondre aux objectifs de la thèse qui sont décrits dans l'introduction et sur la base de l'étude bibliographique présentée dans ce chapitre, la stratégie retenue lors des travaux présentés dans les prochains chapitres est la suivante :

- Mettre au point une technique de ME permettant de caractériser la membrane propre, avec pour objectif d'en décrire la structure et la couche sélective, en évitant les artéfacts et les dommages.
- Caractériser les points structuraux clés influençant la performance de la membrane (taille des pores, porosité, tortuosités...) et son colmatage (pores en culs-de-sac)
- Mettre au point une technique de marquage par métaux lourds pour l'identification et la différenciation des biomolécules (elle doit fonctionner

à température ambiante et en conditions cryogéniques, pour le MEB et le MET).

- Mettre au point les cryotechniques couplées à la ME pour permettre la caractérisation d'une membrane colmatée par des biomolécules marquées.
- Identifier et caractériser le colmatage externe et interne des membranes de filtration polymères par des mélanges modèles contenant des lipides et/ou des protéines.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes : Procédés de filtration membranaire et développements méthodologiques en (cryo) microscopie électronique.

2.1 Introduction

Un des prérequis essentiels à ces travaux de thèse a été la mise au point des techniques de microscopie électronique (ME) aux températures ambiantes et cryogéniques pour la caractérisation de membranes de filtration propres puis colmatées. L'optimisation d'un protocole de contraste pour différencier les différentes biomolécules du colmatage a également été nécessaire. Le développement méthodologique en ME est, par conséquent, au cœur de ces travaux de thèse.

Le but de ce chapitre est d'explorer le matériel et les méthodes de la partie expérimentale de ces travaux, de décrire les différents dispositifs et appareils utilisés dans les deux domaines scientifiques (filtration membranaire et microscopie électronique) et de montrer le développement méthodologique mis en place, ainsi que les défis relevés pendant ces trois années. L'ensemble des méthodes et techniques utilisées et développées pour caractériser les membranes propres, les membranes colmatées et les biomolécules sont montrées dans la figure 2.

Ce chapitre est constitué de trois parties. La première partie décrira la préparation des membranes, des solutions et les protocoles de filtration. La deuxième partie décrira les principes généraux de la microscopie électronique et des techniques de spectroscopie associées, ainsi que leur application pour la caractérisation de solutions de biomolécules et de membranes propres et enrésinées. Les défis relevés seront également présentés dans cette partie. Enfin, dans une troisième partie, l'emploi des conditions cryogéniques pour la caractérisation des membranes colmatées et les défis associés seront présentés.

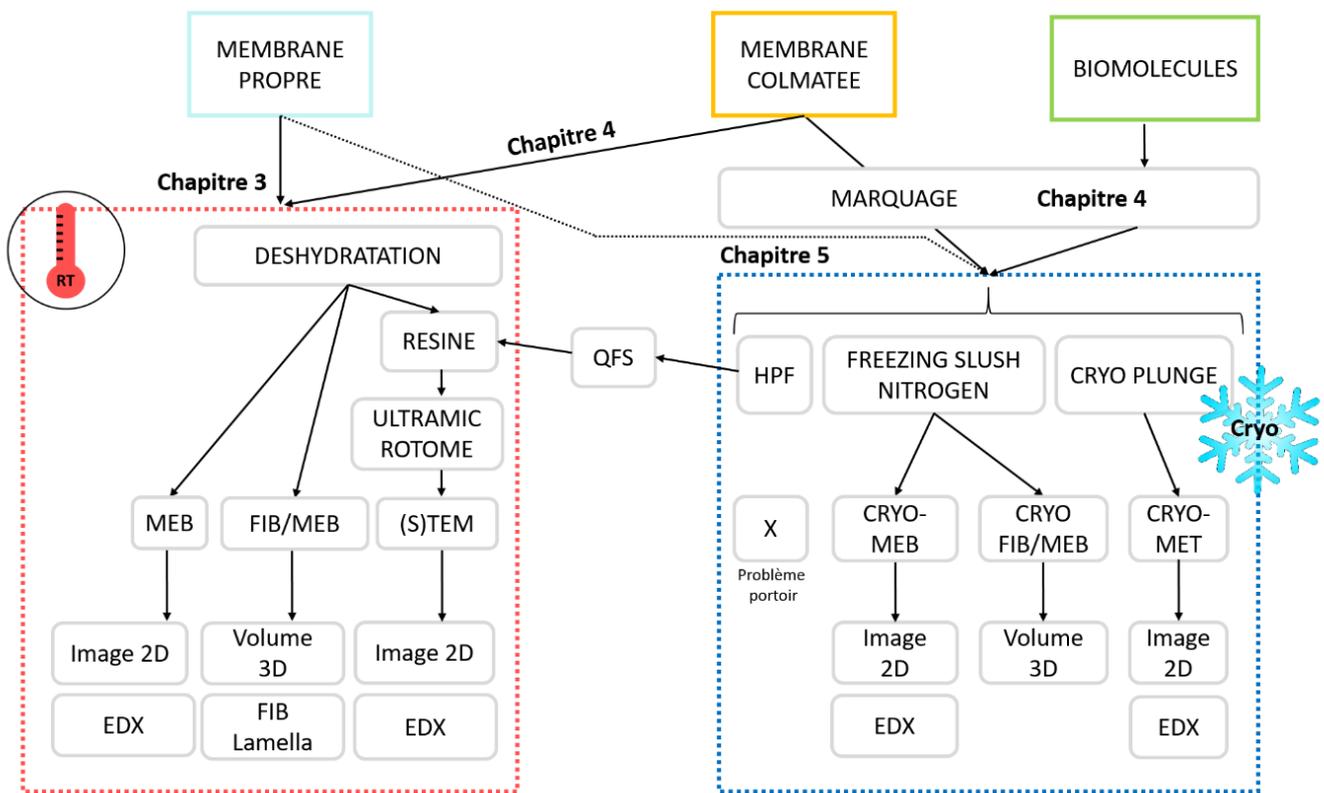


figure 2 : Les techniques et méthodes utilisés pendant ces travaux de thèse.

2.2 Partie 1 : Les expériences de filtration

2.2.1 Matériel

2.2.1.1 Les membranes utilisées dans cette étude

Pour ces travaux, deux membranes planes de filtration commerciales ont été étudiées : une membrane de microfiltration en polyéthersulfone (PES), avec un diamètre nominal des pores à la surface de 100 nm (MFK618, Koch membrane systems, USA) et une membrane d'ultrafiltration en polyacrylonitrile (PAN) (Orelis, France) avec un seuil de coupure de 500 kDa (diamètre nominal des pores à la surface de 30 nm). La figure 2.1 illustre leurs morphologies asymétriques, elles sont constituées d'une fine couche sélective déposée sur une structure macroporeuse et une couche fibreuse (elle assure la résistance mécanique). Il est à noter que la couche sélective ne peut pas, en réalité, être observée à de faible grandissement comme dans la figure 2.1. Ainsi les flèches noires indiquent seulement sa localisation approximative (c'est-à-dire à la surface de la membrane). La PES et la PAN font environ 300 μm et 150 μm d'épaisseur respectivement. Les membranes sont reçues et conservées dans du

glycérol sous forme de feuilles de 40 x 40 cm. Elles doivent être nettoyées et découpées pour s'adapter à la configuration du module de filtration.

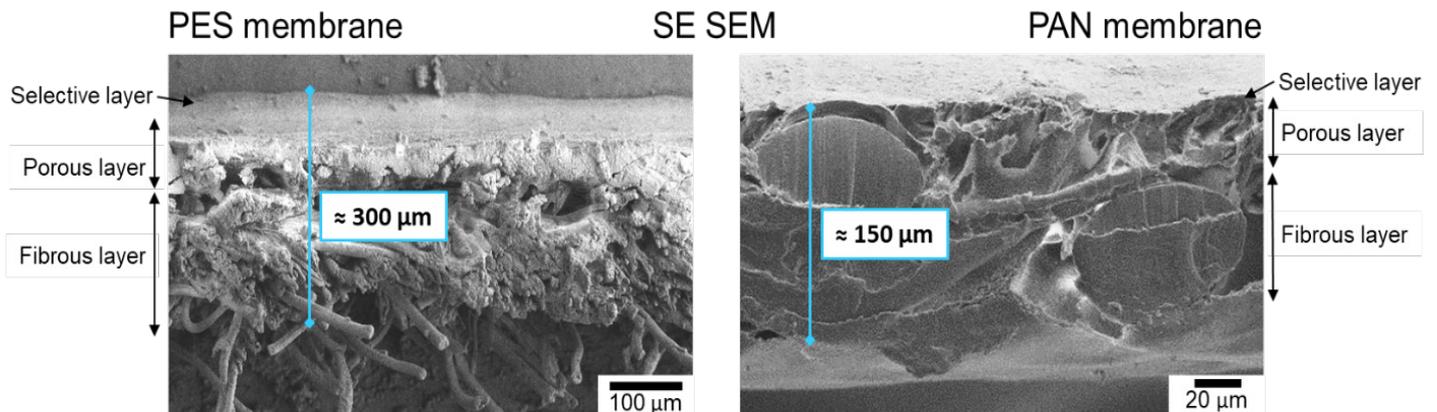


Figure 2.1 : Morphologie des membranes polymères de filtration PES et PAN. Observation par MEB de la tranche des membranes.

2.2.1.2 Les mélanges modèles

Les mélanges modèles de lipides et de protéines ont été conçus, optimisés et utilisés dans les précédents travaux de thèse de Shuli Liu¹⁷⁹ (2021) et de Erika Clavijo Rivera¹⁸⁰ (2017). Cette étude s'appuie sur ces travaux pour la caractérisation du colmatage des membranes de filtration par les biomolécules. Comme expliqué précédemment, le choix des produits et de leur proportion est basé sur les caractéristiques d'un extrait réel de microalgues.

Un mélange d'huiles végétales a été utilisé¹⁸¹ pour représenter les lipides neutres présents dans un mélange réel (46% de triacylglycérides, 44% d'autres lipides neutres). La lécithine de soja (VWR, USA) a été choisie comme émulsifiant et pour représenter la fraction des lipides polaires (6% de glycolipides et 4% de phospholipides). Des protéines solubles extraites d'un produit à base de protéines de pois biologiques (ANASTOR, France) ont ensuite été utilisées pour représenter les protéines présentes dans un mélange réel¹⁷⁹.

2.2.1.3 Les modules de filtration

Dans cette étude, deux systèmes de filtration ont été utilisés : un système de filtration tangentielle, le Rayflow100® fabriqué par Orelis (France) et un système de filtration frontale, la cellule Amicon® (Millipore, USA).

Le système de filtration tangentielle est un module de type filtre-presse qui permet l'installation en série ou en parallèle de deux membranes planes prédécoupées avec une surface de filtration de 130 cm² chacune, de chaque côté du collecteur de perméat. Pour ces travaux, les deux côtés ont été utilisés pour filtrer simultanément une même solution au travers d'une membrane PAN et une membrane PES. Les perméats correspondant à chaque membrane ont été collectés séparément. La figure 2.2 montre la configuration du module. Une plaque chauffante avec un thermostat et un agitateur magnétique permettent d'homogénéiser la solution filtrée ainsi que le maintien de sa température constante. La circulation du liquide (volume de travail 1 litre minimum) est assurée par une pompe péristaltique (Cole-Parmer Masterflex). Deux capteurs de pression ont été installés en amont et en aval du module (P_i et P_s sur le schéma de la figure 2.2b) afin de calculer la pression moyenne côté rétentat et d'en déduire la pression transmembranaire (PTM) (la sortie perméat étant à pression atmosphérique). La PTM est acquise automatiquement et suivie en direct par ordinateur. Le flux de perméat est mesuré à l'aide d'une balance RADWAG WLC6/A2 et calculé par le logiciel Labview.

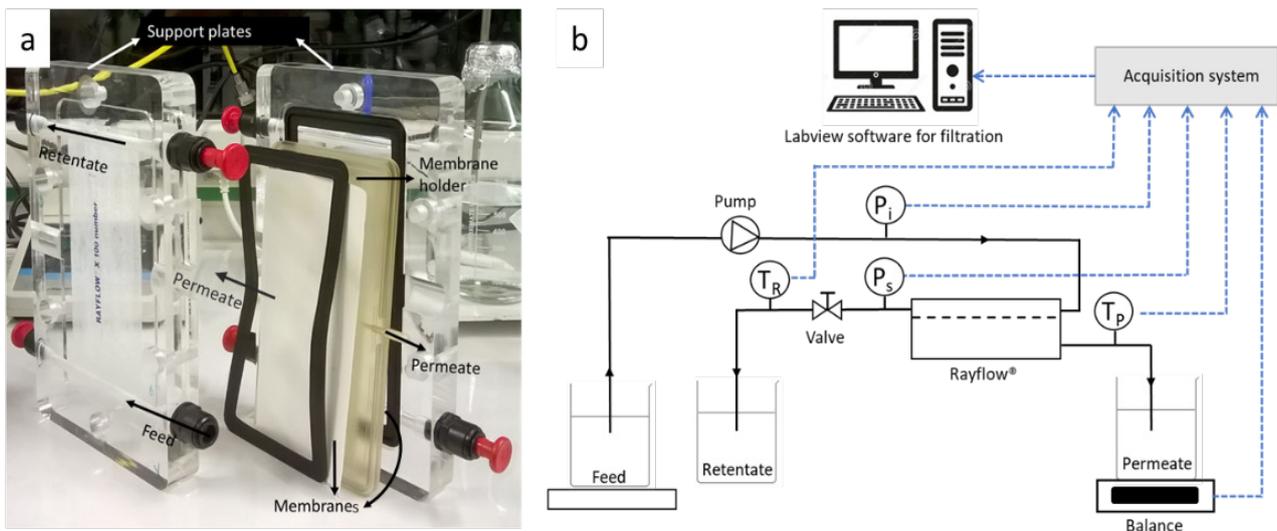


Figure 2.2 : Module de filtration tangentielle : (a) le module Rayflow® démonté pour voir les différents éléments (les plaques supports dans lesquelles circule le rétentat, le collecteur de perméat sur lequel les membranes sont positionnées et maintenues par des joints), (b) Schéma du fonctionnement du module.

Le pilote de filtration frontale se présente en cellule avec un volume de travail maximum de 400 mL (voir la figure 2.3). Il a été utilisé, en raison de sa simplicité de mise en œuvre et des faibles quantités de solution nécessaires, dans le cas d'expériences rapides. La pression d'entrée dépend de l'air comprimé injecté à l'entrée de la cellule (contrôlé par une vanne combinée à un manomètre). La surface de filtration de la membrane est de 42 cm². Un agitateur magnétique positionné à la surface de la membrane minimise la sédimentation. Le suivi de la filtration est

effectué par le même système (balance, ordinateur... etc.) que pour le module de filtration tangentielle.

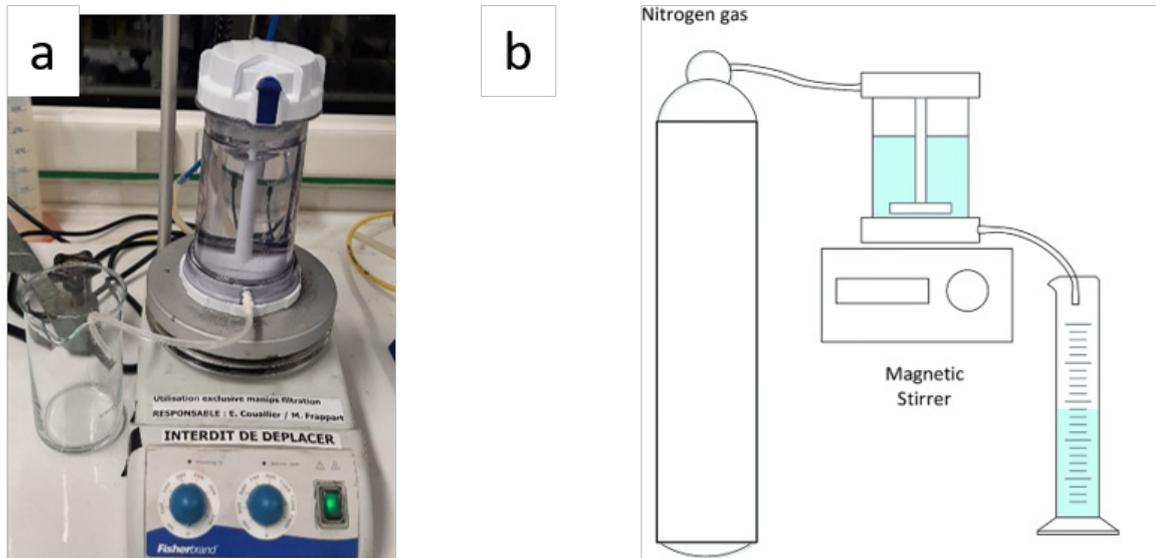


Figure 2.3 : (a) La cellule de filtration frontale dynamique Amicon®. (b) Schéma du fonctionnement de la cellule.

2.2.2 Conditionnement des membranes

Les membranes PAN et PES ont été fournies conservées dans du glycérol afin de maintenir leurs propriétés structurales et chimiques et d'éviter les risques de dégradation pendant leur stockage. Les membranes sont stockées dans leur emballage d'origine au réfrigérateur à 4 °C (après réception et avant utilisation). Dans cette étude, avant la filtration, les membranes sont nettoyées (ce qui permet d'enlever le glycérol) et conditionnées (ce qui permet d'obtenir la perméabilité à l'eau requise pour la filtration) en suivant la procédure initialement rapportée par Rouquié et al¹⁸² (2020). Les membranes neuves subissent un nettoyage équivalent de ceux réalisés sur des membranes colmatées par des biomolécules afin que leurs propriétés (état de surface, ouverture des pores) soient les plus proches possibles entre-elles. De l'eau de javel à pH10 est classiquement utilisée à la fois pour donner aux membranes ses propriétés initiales, pour désinfecter les membranes et pour retrouver la perméabilité initiale. Les solutions basiques de tensioactifs telles que l'Ultrasil 110 (Ecolab, USA) sont utilisées pour éliminer le colmatage par des lipides et des protéines.

Pour commencer, les membranes sont découpées en fonction du module de filtration utilisé (18 x 8,7 cm pour le Rayflow® et disque de 7,6 cm de diamètre pour la cellule Amicon®), puis, trempées toute une nuit dans une eau ultrapure, rincées à l'éthanol et nettoyées à l'eau ultrapure.

Elles sont ensuite installées en série dans le module de filtration tangentielle ou bien individuellement dans la cellule de filtration frontale. Les membranes sont ensuite nettoyées dans le module. Elles sont rincées avec de l'eau ultrapure en circuit ouvert (le rétentat est jeté) à 0,5 bar pendant 30 minutes. Puis, elles sont nettoyées avec une solution alcaline contenant de l'eau de Javel (0,1 % et pH10-11) à 30°C pendant 30 minutes en circuit fermé (recyclage du rétentat vers l'alimentation), la moitié du temps sans pression et l'autre moitié à 0,5 bar. Après un rinçage à l'eau ultrapure en circuit ouvert pendant 5 minutes, les membranes sont nettoyées avec une solution d'Ultrasil 110 (Ecolab, USA) à 2% pendant 30 min à 45 °C (également mi-temps sans pression et autre mi-temps à 0,5 bar). Enfin, elles sont rincées à l'eau ultrapure, en circuit ouvert pendant 5 minutes, puis circuit fermé pendant 30 minutes à 0,5 bar, en changeant l'eau toutes les 10 minutes. Après le nettoyage, les membranes sont compactées à une PTM de 1 bar jusqu'à ce que le flux de perméat soit stabilisé (entre 4 et 6 heures). Les valeurs de flux à l'eau ont été mesurées systématiquement. À ce moment, pour les expériences de caractérisation des membranes propres, les membranes sont extraites du module et conservées dans une boîte hermétique contenant de l'eau ultrapure à 4°C (l'eau doit être changée toutes les semaines). Il est à noter que la caractérisation par ME doit avoir lieu le plus rapidement possible sur les membranes propres et fraîches (conservation maximum de 3 mois avec les conditions sus-citées).

La perméabilité (L) à l'eau de la membrane est mesurée et servira de référence pour la membrane propre. Elle correspond à la quantité de liquide traversant la membrane par unité de surface et en fonction du temps, divisé par la pression transmembranaire ΔP ($L=J/\Delta P$). Pour la calculer, la PTM est progressivement augmentée jusqu'à 1 bar (0,25 bar à chaque étape) puis diminuée jusqu'au minimum. À chaque étape, le débit de perméat est mesuré après sa stabilisation. Comme les valeurs de surface (taille de la membrane) et de temps sont connues, une courbe du flux en fonction de la pression peut être tracée. La perméabilité est la pente de cette courbe. Il convient de noter que cette perméabilité est calculée avant (membrane propre) et après (membrane colmatée) chaque expérience de filtration. Deux lots de membranes PES différents ont été utilisés et ont présenté des perméabilités à l'eau différentes. Elles étaient de 200-250 et 70 $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \text{ bar}^{-1}$ pour les membranes PES et PAN respectivement pour le chapitre 3, et de 36 à 57 $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \text{ bar}^{-1}$ pour les membranes PES dans les autres chapitres. Ces différences de valeurs ont été confirmées dans d'autres études réalisées au laboratoire avec les mêmes références.

2.2.2.2 Préparation des mélanges modèles de lipides et de protéines

Dans cette étude, trois solutions de mélanges modèles sont étudiées : une solution de lipides (S_L), une solution de protéines (S_P) et une solution de lipides et de protéines mélangés (S_{LP}) (voir figure 2.4c).

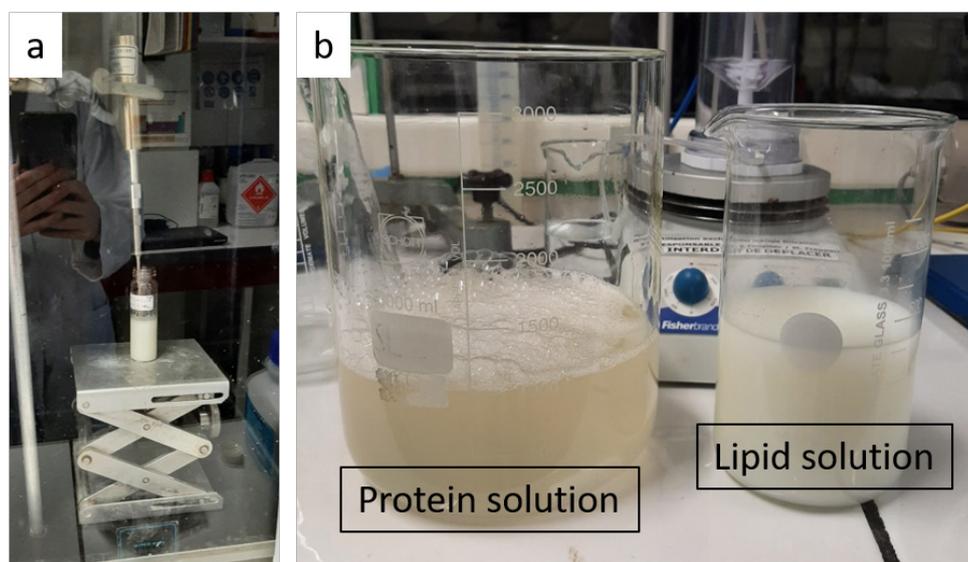


Figure 2.4 : Préparation des solutions de mélanges modèles. (a) homogénéisation de la solution concentrée de lipides par sonde ultrasonique et (b), S_P et S_L préparées.

Pour la préparation de la S_P , des protéines de pois sont dans un premier temps hydratées en les solubilisant dans un tampon phosphate (pH 7,4, conductivité $790 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), à une concentration de 12,5 g/L. La solution est gardée sous agitation continue à 700 rpm pendant 24 heures à température ambiante, ce qui permet l'extraction des protéines solubles. Ensuite, les protéines solubles sont séparées et récupérées par centrifugation à 12 000 g pendant 15 minutes. La concentration en protéines est ajustée jusqu'à 1 g/L par dilution dans un tampon phosphate.

Pour la préparation de la S_L , une phase lipidique concentrée est préparée pour simplifier la préparation du mélange modèle. 2,6g de lipides polaires (lécithine) et 17,4g d'huiles végétales (voir figure 2.4a) sont mélangés et homogénéisés à l'aide d'une sonde à ultrasons (VCX130 PB Vibra-Cell™, Sonics, USA) à 65% d'amplitude pendant 6 min jusqu'à ce que tous les lipides soient complètement dispersés (2 fois 3 minutes de traitement avec 5 minutes de pause entre les deux phases) (voir figure 2.4b). La solution concentrée est diluée à une concentration de 2 g/L dans un tampon phosphate (pH 7,4, conductivité $790 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Puis elle est pré-émulsifiée par le rotor-stator T25 (T25 Digital ULTRA-TURRAX®, IKA®, Allemagne) à 10 000 rpm pendant 2 min. Enfin, la S_L est émulsifiée avec un rotor-stator continu T18 (T18 Digital

ULTRA-TURRAX®, IKA®, Allemagne) à 19 000 rpm pendant 30 min à température ambiante.

Enfin, pour la préparation de la S_{LP} , la solution concentrée de lipide est diluée à une concentration de 2 g/L dans la S_P . S'en suivront ensuite les mêmes étapes de pré et émulsification que pour la préparation de la S_L seule.

Dans le cas du marquage des lipides et des protéines, les solutions S_L et S_P sont préparées séparément puis mélangées avant de procéder à une émulsification finale (avec des concentrations adaptées pour obtenir une concentration finale des produits de 1 g/L et 2 g/L pour les protéines et les lipides respectivement)

La taille des objets en suspension (gouttelettes d'huiles, agrégats éventuels) est contrôlée par granulométrie (Mastersizer 3000, Malvern Panalytical, UK). La S_L et la S_P sont stables pendant 48 heures (suivi par granulométrie de la variation de la taille des particules dans le temps). Cependant, la S_{LP} est stable seulement 5 heures. Dans cette étude, les expériences de filtration sont effectuées immédiatement après la préparation des solutions de mélanges modèles. Dans le but de faciliter la ME, le marquage des biomolécules des solutions a été réalisé, le protocole est précisé dans la section 2.2.4.

2.2.3 Filtration des biomolécules

Les solutions de mélanges modèles S_L , S_P ou S_{LP} (après marquage aux métaux lourds ou non, voir la sous-section suivante) sont filtrées sur les membranes de filtration PES et PAN. La filtration par la cellule Amicon® a été utilisée pour les tests rapides avec des petits volumes afin de comparer les conditions expérimentales de marquage (par exemple, plusieurs concentrations de contrastant). Il est à noter que les deux modules de filtration ont été utilisés pour les résultats du chapitre 4. Tandis que le module Ray-flow® a été utilisé pour comparer le colmatage de différentes solutions de mélanges modèles sur les membranes PAN et PES monté en même temps en série (chapitre 5). Ceci, permettant d'avoir des conditions de filtration et de colmatage comme décrites dans les précédentes études du laboratoire GEPEA.

Le but de ces travaux étant la caractérisation du colmatage dans des conditions proches des travaux précédents¹⁷⁹, la pression utilisée lors des filtrations a été choisie proche de la pression critique ($\approx 0,45$ bar). Les solutions de mélanges modèles sont filtrées jusqu'à diminution et stabilisation du flux (entre 3 et 6 h), ce qui prouve la présence de colmatage (par exemple, voir

la figure 2.5 pour la membrane PAN). Pour la cellule Amicon®, une agitation de 300 tr/min a été utilisée. Et pour le module Rayflow®, une vitesse tangentielle de 1 m/s a été utilisée.

Enfin, après la filtration, les membranes sont nettoyées à l'eau pour éliminer la solution résiduelle de la veine liquide et garder uniquement le colmatage dû à l'accumulation de matière sur la membrane et leur perméabilité à l'eau est mesurée. Le module est ensuite démonté et les membranes colmatées sont extraites. Elles sont conservées dans une boîte hermétique à 4°C avec un fond d'eau (pour garder l'humidité, mais sans immerger la couche de colmatage, ce qui pourrait la déplacer ou l'endommager), l'eau doit être changée toutes les semaines. Il est à noter que les observations par ME doivent avoir lieu le plus rapidement possible pour les membranes colmatées et fraîches (conservation maximale de 1 mois et demi / 2 mois avec les conditions sus-citées).

Le module de filtration doit être remonté pour être nettoyé à l'eau et à l'aide d'une solution d'Ultrasil 110 à 2% pendant 20 min à 45 °C. Dans le cas de la filtration de biomolécules marquées, l'eau doit être évacuée dans des bidons spéciaux.

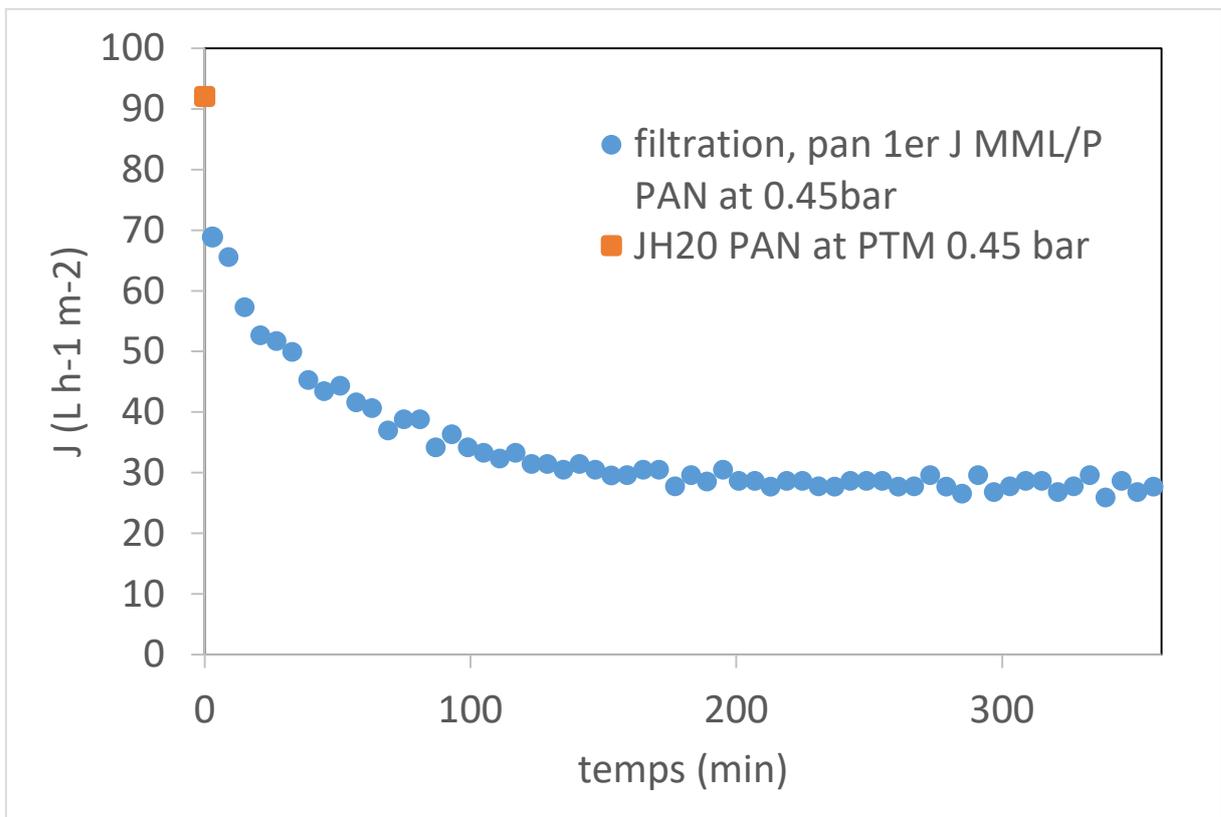


Figure 2.5 : Exemple de suivi du flux de filtration de biomolécule (lipides et protéine MML/P) par une membrane PAN. Le point orange montre le flux calculé à l'eau avant la filtration (JH2O).

2.2.4 Marquage des biomolécules pour la MET

2.2.4.2 Problématique

Comme expliqué précédemment, les biomolécules dans des mélanges modèles doivent être différenciées entre eux lors de la caractérisation du colmatage par ME (lipides et protéines). Le marquage doit avoir lieu avant la filtration pour permettre au colmatage de se former dans des conditions réelles avec les biomolécules marquées. La stratégie du marquage des protéines et des lipides par métaux lourds a été choisie pour ce travail. Les produits utilisés doivent respecter certains critères : A) ils doivent présenter une affinité la plus spécifique possible pour les deux, ou au moins pour l'une des molécules and B) ils ne doivent pas être CMR (cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction), ce qui évite également la contamination des modules de filtration communs. En outre, il est préférable que le marquage soit efficace, non seulement pour améliorer le contraste de l'imagerie, mais aussi pour permettre sa détection et donc sa caractérisation par EDX. En d'autres termes, il est nécessaire que les signaux caractéristiques puissent être détectés en étant supérieurs au seuil de détection des détecteurs EDX des microscopes électroniques de notre laboratoire. Dans ce but, plusieurs contrastants ont été sélectionnés à partir de la littérature et testés : l'Uranyless®, le tétr oxyde d'osmium (OsO_4), le tétr oxyde de ruthénium (RuO_4) et l'acide phosphotungstique (Phosphotungstic acid ou PTA). D'abord, les essais ont été faits sur les biomolécules seules, puis mélangées. Enfin, échantillons marqués ont été analysés en MET puis en cryoMEB.

2.2.4.3 Test et confirmation du meilleur contrastant par MET

Une petite quantité de solution de biomolécules en suspension est isolée dans un tube Eppendorf® (1,5 mL). En se basant sur des protocoles de contraste similaires¹⁴⁴, le contrastant est dilué à 1% dans la solution de biomolécules. La solution marquée est gardée sous agitation 20 minutes. Pendant ce temps, des grilles de MET pleines (Carbon Film, 400 mesh) sont rendues hydrophiles (pour faciliter le dépôt d'une solution d'épaisseur minimale) à l'aide d'un plasma cleaner (Fischione Instruments, modèle 1070) avec un gaz d'Argon pur pendant 5 minutes et avec une puissance de 30% et un débit de gaz de 30 sccm. La propriété hydrophile des grilles se conserve entre 30 minutes et 1 h. À la fin des 20 minutes, une goutte de solution est déposée sur une grille pendant 5 minutes. Le surplus est ensuite enlevé par contact avec un papier Whatman® (la goutte s'aplanit, entraînant la dépose des particules en suspension sur la

grille) et la grille est stockée dans une boîte d'échantillons (ce qui lui permet de sécher). Les grilles sont préparées au minimum en doublon et au moins 4 h avant leurs observations en MET pour être certain qu'elles contiennent le moins possible d'eau.

2.2.4.4 Contraste des solutions de mélanges modèles par Uranyless® et PTA

Suite au choix du contrastant adapté, plusieurs concentrations ont été testées (0,5, 1 et 2%) sur S_L et S_P et la concentration à 1% a été retenue pour la caractérisation des biomolécules en ME. Les solutions S_P et S_L sont marquées séparément et mélangées pour obtenir la S_{LP} (il faut tenir compte du respect des concentrations des biomolécules). Pour 2L de solution de S_P ou de S_L , 20 mL de contrastant sont ajoutés dans la solution. La solution marquée est laissée sous agitation 20 minutes. Afin d'enlever les produits de marquage en excès, la S_L est ensuite laissée sans agitation 15 minutes. Ainsi, l'Uranyless® en surplus va remonter à la surface et peut être retiré de la solution finale de lipides. Pour la S_P , la séparation des produits de marquage en excès était moins évidente et une stratégie différente a dû être mise en place : la solution est centrifugée 5 minutes à 5000 g et la phase de PTA peut être retirée (culot). En raison des petites quantités utilisées, cette étape n'était pas possible lors du test sus-cité des contrastants pour le MET. Elle permet cependant de limiter les faux positifs (identification des marqueurs sans présence de biomolécules lors des analyses par ME). Après leur contraste, les solutions sont de nouveau homogénéisées par agitation. Il est à noter que la taille des particules était du même ordre de grandeur avant et après le marquage lors de leur contrôle par granulométrie (Mastersizer 3000, Malvern Panalytical, UK).

2.3 Partie 2 : La Microscopie électronique

Historiquement, le premier microscope électronique a été conçu par les ingénieurs allemands Ernst Ruska et Max Knoll en 1931 à la suite des théories de Louis de Broglie. La ME a été développée pour pallier la résolution limitée (300 nanomètres) des images en microscopie optique. Celle-ci est imposée par la longueur d'onde de la lumière visible. L'utilisation d'électrons permet de contourner ce phénomène puisque, après accélération, leur vitesse permet d'obtenir des longueurs d'onde beaucoup plus courtes (à 300 kV, $\lambda = 1,97$ pm). Il est donc possible d'atteindre des résolutions beaucoup plus petites (aujourd'hui en picomètres¹⁸³) et des grossissements de qualité beaucoup plus importants. Aujourd'hui la ME constitue un des outils les plus puissants et polyvalents pour la caractérisation des matériaux. Les équipements n'ont cessé de se développer ainsi que de se complexifier, elle est utilisée dans de nombreux domaines comme la biologie, la médecine ou les matériaux. Toutes ces

techniques, jusqu'à l'année 2016, sont expliquées et montrées en détail dans le livre de Williams et Carter¹⁸⁴ (2016). Pour ces travaux, différentes techniques de ME ou de spectroscopie sont exploitées et adaptées pour la caractérisation de membranes polymères colmatées avec des biomolécules, ces échantillons sont donc à mi-chemin entre la biologie et la science des matériaux. Cette partie donnera une présentation générale des principes physiques et des instruments, et détaillera l'utilisation du FIB/MEB et du MET pour cette étude. Puisque l'échantillon de cette étude est amorphe, seules les techniques compatibles avec cette condition seront présentées.

2.3.1 Principes généraux de fonctionnement

2.3.1.1 Interaction électron-matière

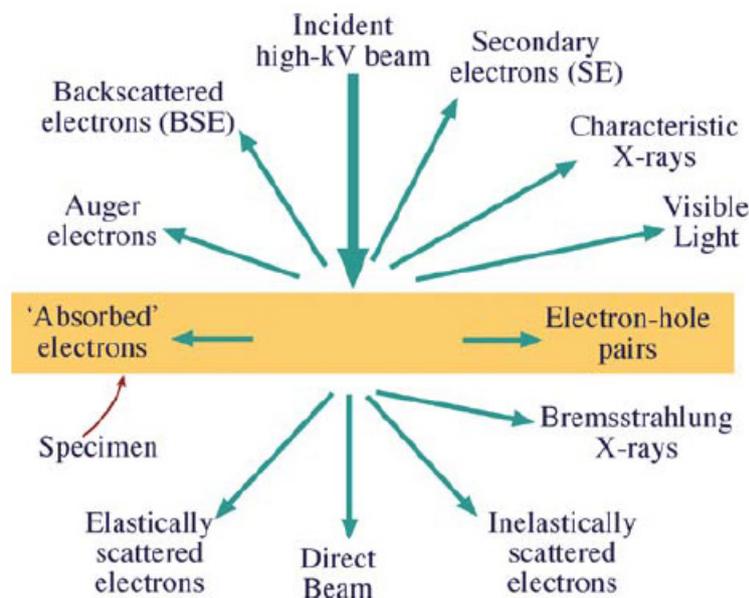


Figure 2.6: Signaux générés lorsqu'un faisceau d'électrons de haute énergie interagit avec un spécimen mince. La plupart de ces signaux peuvent être détectés dans différents types de ME. Les directions indiquées pour chaque signal ne représentent pas toujours la direction physique du signal mais indiquent, de manière relative, là où il est détecté. (Williams et Carter, Chapitre 1, Transmission Electron Microscopy, 2009)

L'imagerie par ME est due aux interactions entre un faisceau d'électrons et un échantillon. Les électrons sont un type de rayonnement ionisant, capable d'éliminer les électrons étroitement liés au noyau en transférant une partie de son énergie aux différents atomes de l'échantillon. Ils entraînent ainsi des cascades d'événements. Lorsque des électrons interagissent avec la matière (échantillon), une large gamme de signaux secondaires est produite (voir figure 2.6). Chaque signal contient des informations différentes sur la même zone de l'échantillon et peut être exploité sous forme d'images ou de spectres analytiques. Ces signaux secondaires peuvent être divisés en deux grandes parties : les signaux renvoyés depuis la surface de l'échantillon (une

grande partie du faisceau est réfléchi dans le cas un échantillon épais) et les signaux provenant de l'intérieur de l'échantillon (une grande partie du faisceau traverse un échantillon très fin). Les signaux réfléchis sont associés au microscope électronique à balayage (MEB) qui permet d'observer la topographie de surface d'un échantillon et les signaux transmis sont associés au microscope électronique en transmission (MET) qui permet d'imager l'intérieur d'un échantillon.

2.3.1.2 Principes de fonctionnement du MET

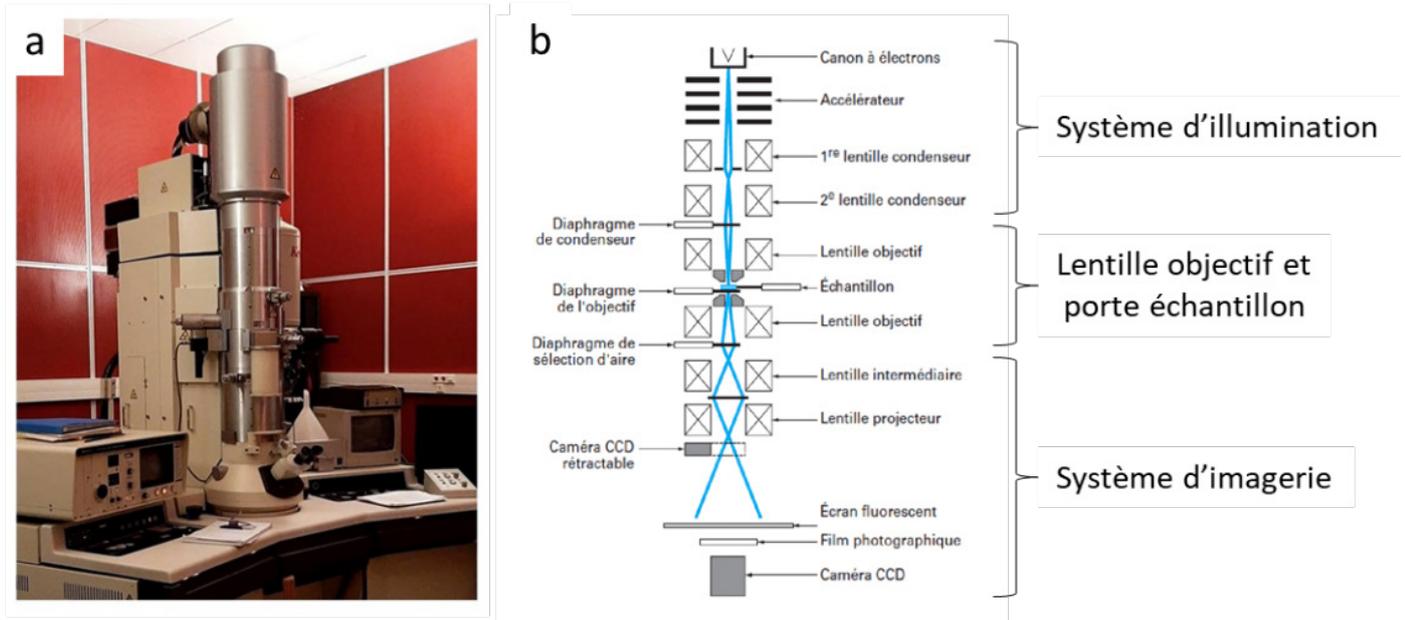


Figure 2.7 : Principe de fonctionnement d'un MET. (a) Photo d'un MET classique, ici H-9000 NAR d'Hitachi (1995) (IMN Nantes), (b) schéma de fonctionnement classique d'un MET avec les différentes parties qui le constituent. Modifié d'après les travaux de thèse de El Amin Kouadri Boudjelthia (2012).

Le MET utilise les signaux transmis pour construire des images, ici nous nous intéressons aux électrons transmis, diffusés élastiquement et inélastiquement pour les modes MET et STEM et aux rayons X émis pour la spectroscopie EDX. Un MET est constitué de trois parties : le système d'illumination, la colonne avec les lentilles électromagnétiques ainsi que le porte échantillon, et le système de détection (voir figure 2.7). Le microscope lui-même est maintenu sous un vide poussé (10^{-5} Pa dans la colonne avec le PO et 10^{-7} Pa pour le canon) pour éviter les contaminations et limiter les interactions du faisceau d'électrons avec l'air.

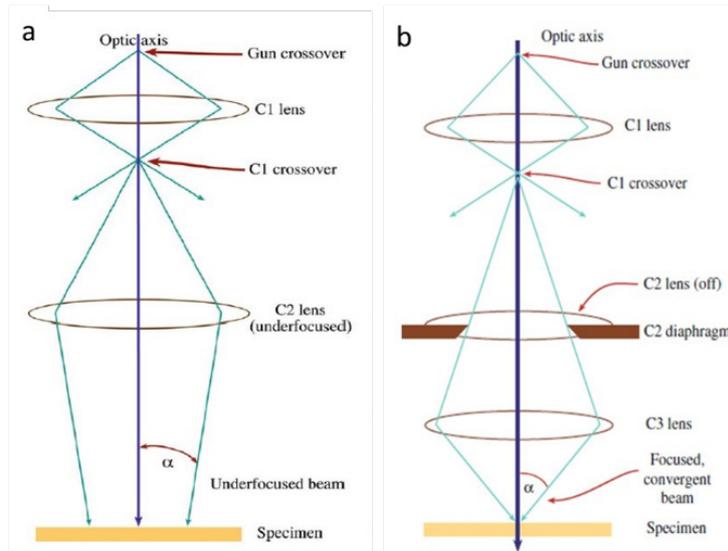


Figure 2.8 : les deux modes d'imagerie. (a) Le mode MET en faisceau parallèle et (b), le mode STEM en faisceau convergent. D'après William and Carter (2008).

Le système d'illumination contient la source d'électrons et les lentilles du condenseur. Les électrons sont produits par un canon à électrons et il en existe plusieurs types (canon basé sur l'émission thermoïonique avec filaments de tungstène ou pointe LaB6, la source Schottky à émission de champ Schottky (field emission guns) ou encore les canons à cathode froide Cold-FEG). Dans le cas de notre microscope (ici Themis Z voir section 2.3.3), le canon est de type FEG (Schottky X-FEG) et est constitué d'une pointe en tungstène (la cathode) et d'une anode qui fournissent la tension nécessaire à l'extraction des électrons. Ils sont ensuite accélérés entre 60/80 et 300 kV par une seconde anode. Le système de lentilles condenseur va collecter les électrons et les orienter en faisceau. Puis, celui-ci est dirigé vers la colonne et l'échantillon. On peut observer l'échantillon avec un faisceau parallèle qui éclaire une grande surface, alors le contraste est obtenu par transparence, c'est le mode d'imagerie MET. Ou bien, les lentilles concentrent le faisceau en un point appelé « sonde ». Elle balaye l'échantillon et la résolution de l'image dépend directement de la taille de la sonde. Dans le cas de l'utilisation d'un détecteur HAADF et de l'analyse d'un échantillon d'épaisseur homogène, le contraste obtenu est relatif à la chimie de l'échantillon, c'est le mode STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) (voir figure 2.8).

La colonne, où le faisceau interagit avec l'échantillon, contient les lentilles objectifs, diaphragme et porte échantillon ou objet (PO) (voir figure 2.9a). L'échantillon est préparé sur une grille de support ajourée (souvent en cuivre) puis placé au milieu de la colonne, sur le chemin des électrons, par le PO. Ce dernier peut être décliné en plusieurs formes, selon les

techniques utilisées (spectroscopie, tomographie... etc.) ou la condition de l'échantillon (conditions cryogéniques) (voir figure 2.9c).

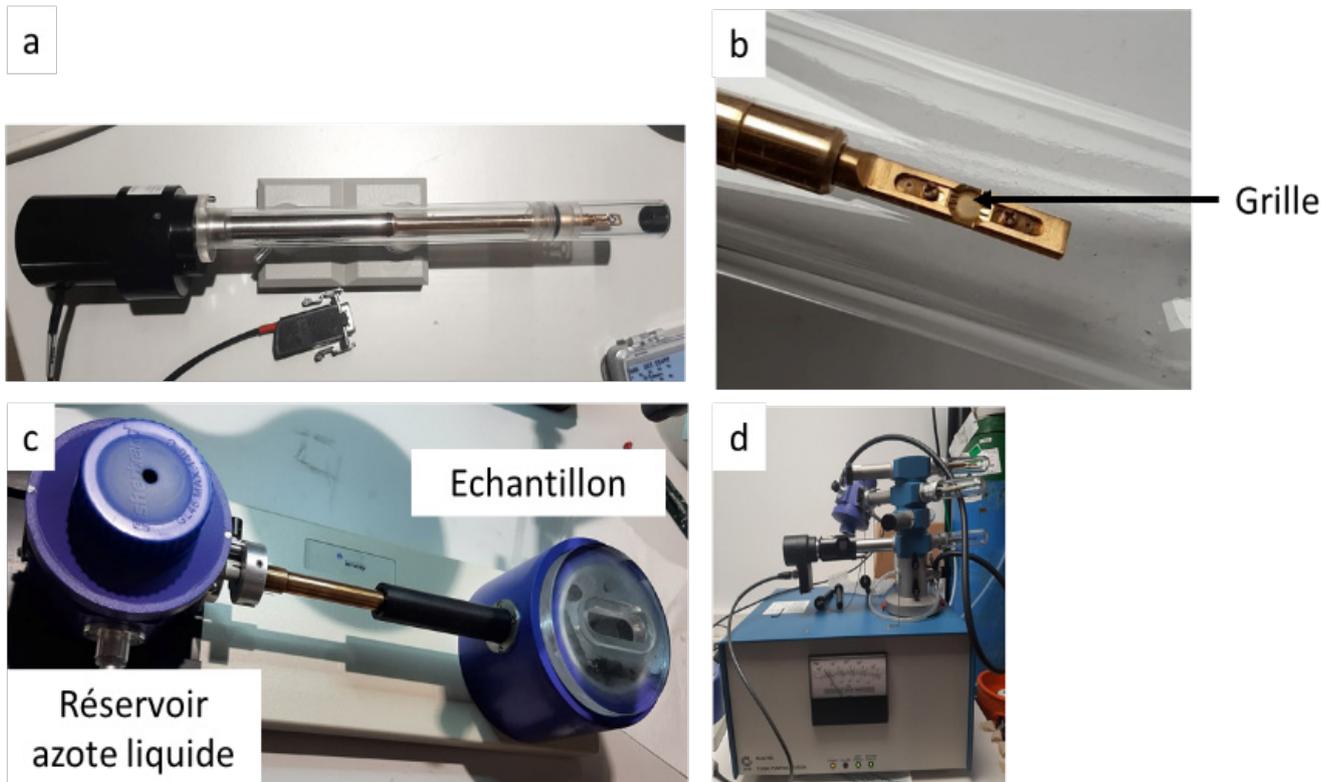


Figure 2.9 : Le porte échantillon ou porte objet (PO) (IMN Nantes), (a) un PO double tilt classique, (b) zoom et emplacement de la grille, (c) PO adapté aux échantillons cryo et (d) station de stockage sous vide des PO.

Enfin, les électrons transmis traversent les lentilles du système d'imagerie. Leur rôle est de focaliser l'image obtenue par la lentille objectif sur un écran de visualisation ou un ordinateur via un détecteur, une caméra CCD (charge coupled device) ou à détection d'électrons directs (type K2). Différents détecteurs d'électrons sont disponibles, en fonction du mode d'imagerie employé et il appartient à l'utilisateur de choisir celui qui convient le mieux pour l'acquisition, en fonction de l'information disponible et de la sensibilité de l'échantillon.

2.3.1.2 Principe de fonctionnement du MEB

Le MEB est en partie composé des mêmes équipements que le MET. Un système de lentilles focalise le faisceau d'électrons sur l'échantillon comme en STEM. Cependant, à la différence du MET, des bobines de balayage sont utilisées pour balayer le faisceau le long de la surface de l'échantillon. L'échantillon (épais) est placé dans une chambre sous vide (10^{-6} Pa) à la fin de la colonne (voir figure 2.10). Les signaux secondaires émis depuis la surface peuvent être analysés. Pour cela, des détecteurs ou spectromètres sont placés dans la chambre ou dans la colonne du microscope (ce qui améliore le contraste car ils présentent un rendement meilleur

et suppriment une partie des ombrages). L'interaction des électrons avec la matière se produit dans un volume d'excitation sous la surface de l'échantillon (ce volume est appelé « poire d'interaction », voir figure 2.11a). La profondeur de ce volume dépend de la composition de l'échantillon et de l'énergie et de l'angle du faisceau incident. Deux phénomènes de diffusion sont principalement observés en MEB, les électrons secondaires (« Secondary electrons », SEs) et les électrons rétrodiffusés (« Back scattered electrons », BSEs) (figure 2.11).

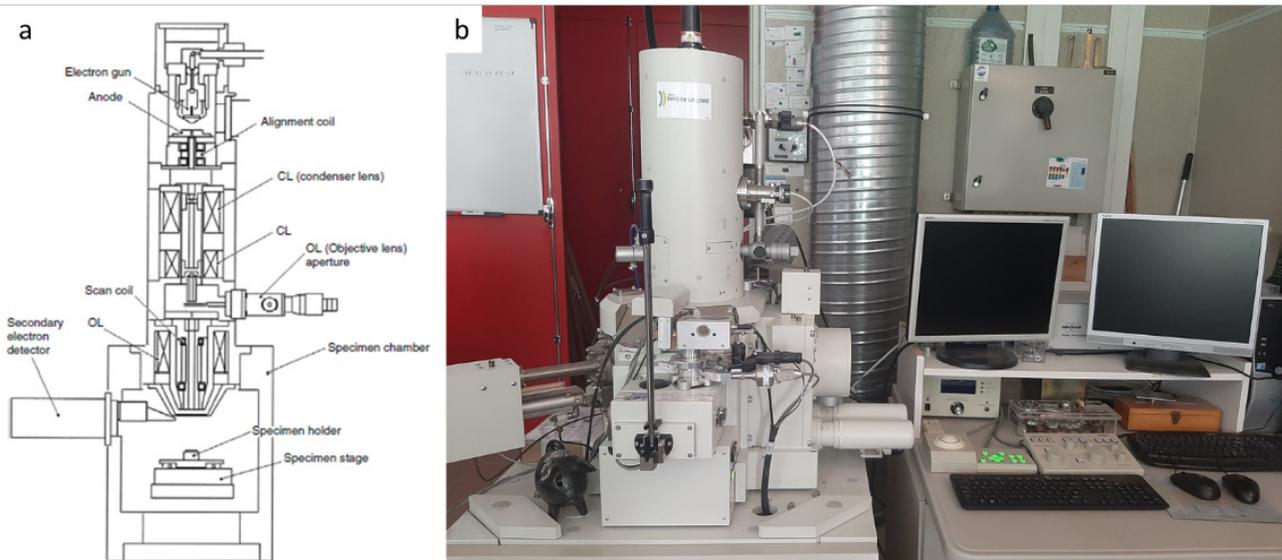


Figure 2.10 : Principes de fonctionnement d'un MEB, (a) schéma de fonctionnement classique d'un MEB (d'après Tursunov et al, 2015) et (b) Photo d'un MEB, ici le JEOL 7600 (2009) (IMN Nantes)

En MEB, les SE sont les plus utilisés pour former des images. Ils permettent de visualiser le relief de l'échantillon et de montrer sa topographie (par exemple, la texture ou la rugosité de la surface). Ils proviennent d'interactions peu profondes dans la matière, où le faisceau primaire entre en contact avec un électron des atomes de l'échantillon. Le surplus d'énergie suite à cette collision entraîne une éjection de l'électron, qui peut alors devenir un électron secondaire (figure 2.11b), on parle alors de diffusion inélastique (avec perte d'énergie).

A contrario, les BSE, sont des électrons incidents (provenant du faisceau d'électrons primaire) qui sont très peu absorbés par la matière, ils possèdent une grande énergie et viennent de profondeur plus importante que les SE. Ces électrons proviennent d'interactions avec les noyaux des atomes de l'échantillon, la collision entraîne un changement complet de direction de l'électron incident vers la surface (figure 2.11c). Il conserve une grande énergie, on parle de diffusion élastique. Entre 10 et 50 % des électrons du faisceau primaire sont rétrodiffusés. Les éléments lourds (numéro atomique important) rétrodiffusent beaucoup plus d'électrons que les éléments légers. Ainsi, un contraste chimique est obtenu à l'image (plus l'image est claire, plus l'objet est composé d'éléments lourds).

En plus des SE et des BSE, des rayons X sont émis lors de l'interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon. Il existe d'autres signaux qui peuvent être utilisés pour former les images de cathodoluminescence, courant électronique local...), mais nous nous limiterons ici aux trois cités précédemment.

Les méthodes de microscopie électronique permettent donc de caractériser une surface (MEB) ou une fine lamelle d'un matériau (MET/STEM). Mais seules elles ne permettent pas de caractériser le volume de l'échantillon, en dehors de la technique par tomographie MET. Cependant, elle est applicable seulement sur de petits volumes (limité à 2–5 μm en X et Y et 100 nm en Z). Or si l'on veut comprendre la structure et le colmatage des milieux poreux tels que les membranes, l'acquisition de volumes plus importants (plusieurs dizaines de micromètres dans les trois directions) doit être considérée. C'est pourquoi des outils complémentaires, comme le FIB/MEB, ont été envisagés.

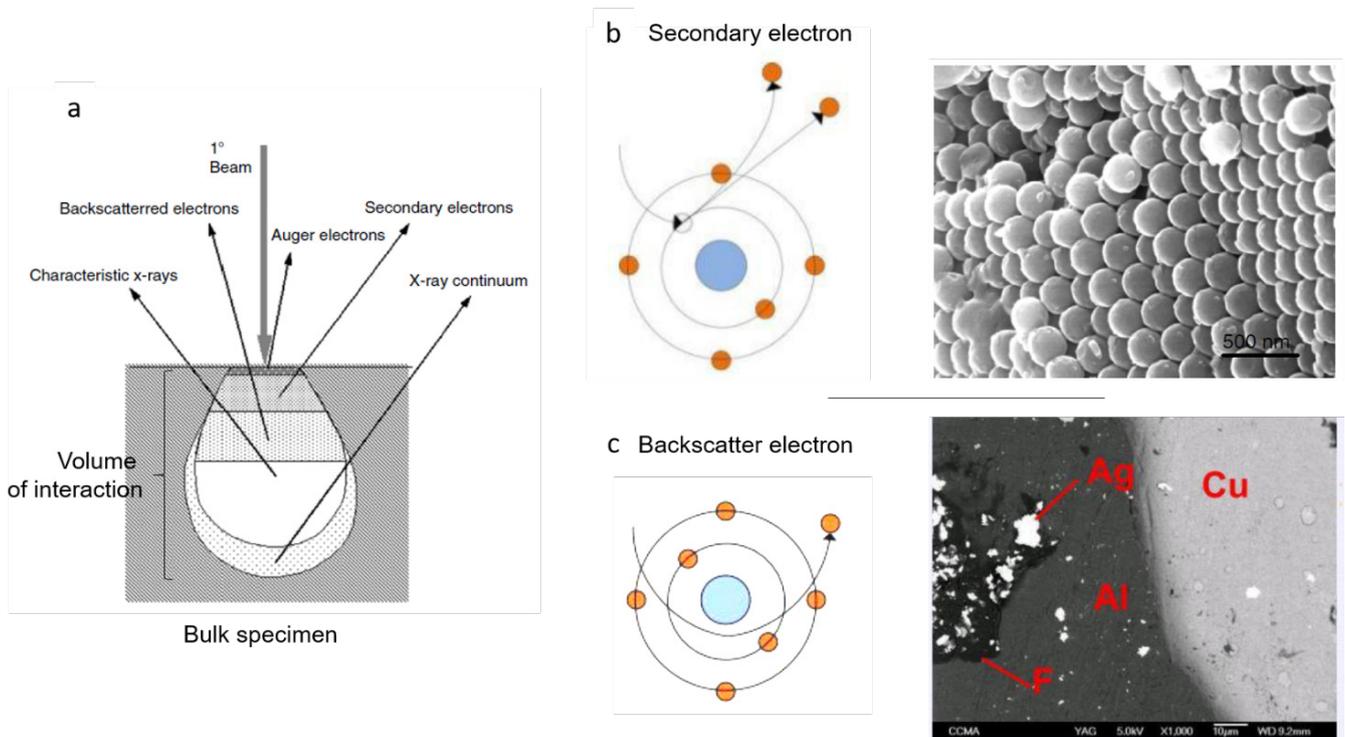


Figure 2.11 :Interaction électron-matière pour le MEB. (a) Signaux résultants de la collision entre le faisceau d'électron et l'échantillon, un schéma de la poire d'interaction résultante est montrée avec la profondeur relative des différents signaux obtenus dans un microscope MEB. (b) Diffusion inélastique des électrons secondaires, ils permettent d'informer sur la topographie de l'échantillon. (c) Diffusion élastique des électrons rétrodiffusés, ils permettent d'informer sur la nature chimique de l'échantillon.

2.3.1.3 Principe du FIB (focused ion beam ou sonde ionique focalisée) couplé au MEB

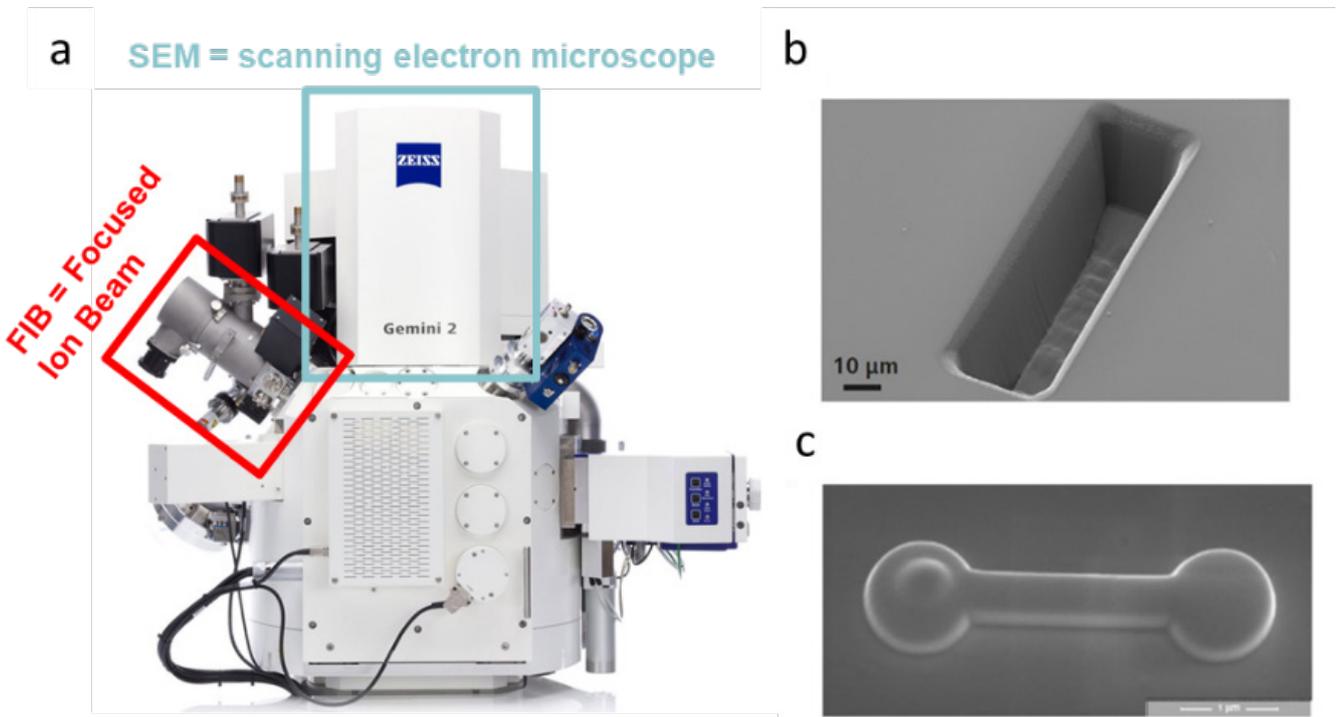


Figure 2.12 : Principe du FIB/MEB. (a), Positionnement des colonnes électronique et ionique dans le FIB/MEB. (b), Usinage de la matière et (c) dépôt de platine, avec une résolution nanométrique. D'après la brochure de Zeiss (ZEISS Crossbeam Family, Version 3.0, 2018)

Le FIB est composé d'une colonne ionique insérée dans la chambre du MEB. Elle est inclinée de 54° par rapport à la colonne électronique pour permettre un point de coïncidence des deux faisceaux, à une hauteur précise dans la chambre. Ainsi, il est possible de travailler sur un point identique de l'échantillon pour les deux faisceaux. On parle de microscope FIB/SEM ou double faisceau (électrons et ions) (voir figure 2.12). Un canon ionique produit un faisceau d'ions (généralement du gallium) qui est convergé par des lentilles sur l'échantillon. La grande énergie des ions permet de couper, graver ou encore usiner un échantillon à des résolutions nanométriques (figure 2.12b). Il permet aussi, avec l'apport de gaz, de déposer de la matière à la surface d'un échantillon (exemple : dépôt de protection en platine) (figure 2.12c). Enfin, des SE et des BSE sont produits à la suite de l'interaction entre le faisceau d'ions et l'échantillon, ce qui permet l'acquisition d'image. Les applications principales du FIB/MEB sont la préparation d'échantillon pour le MET, le fraisage de la matière pour la production de données et l'acquisition de volumes pouvant être reconstruits en 3D et, enfin, la lithographie (création de nanostructures sur une surface ; un exemple est montré dans la Figure 2.12c).

2.3.2 Utilisation du FIB/MEB

2.3.2.1 Le FIB/MEB de l'IMN

Le FIB/MEB Crossbeam 550L de la compagnie Zeiss a été utilisé pour ces travaux. Il est composé d'une colonne MEB Gemini field emission (FE-MEB) et d'une colonne FIB Capella inclinée à -54° (par rapport à l'axe de la colonne MEB et donc la verticale, voir figure 2.13). L'échantillon est incliné à -54° , lui aussi, mais par rapport à l'axe horizontal pour être face à l'échantillon avec sa surface perpendiculaire à l'axe du FIB. Il est ainsi positionné pour permettre, en même temps, son usinage par le FIB et son observation par le MEB (figure 2.13). Des ions de gallium (dans notre cas, mais d'autres FIB ont des sources d'Hélium ou de Neon par exemple) sont produits et accélérés par la colonne FIB. En fonction du courant appliqué, les ions Ga^+ peuvent être utilisés pour déposer ou éroder de la matière. Pour éroder la matière, des courants entre 3 et 30 nA sont utilisés pour creuser des sections transversales (cross section). Des courants plus faibles (entre 50 pA et 1,5 nA) sont utilisés pour polir la surface.

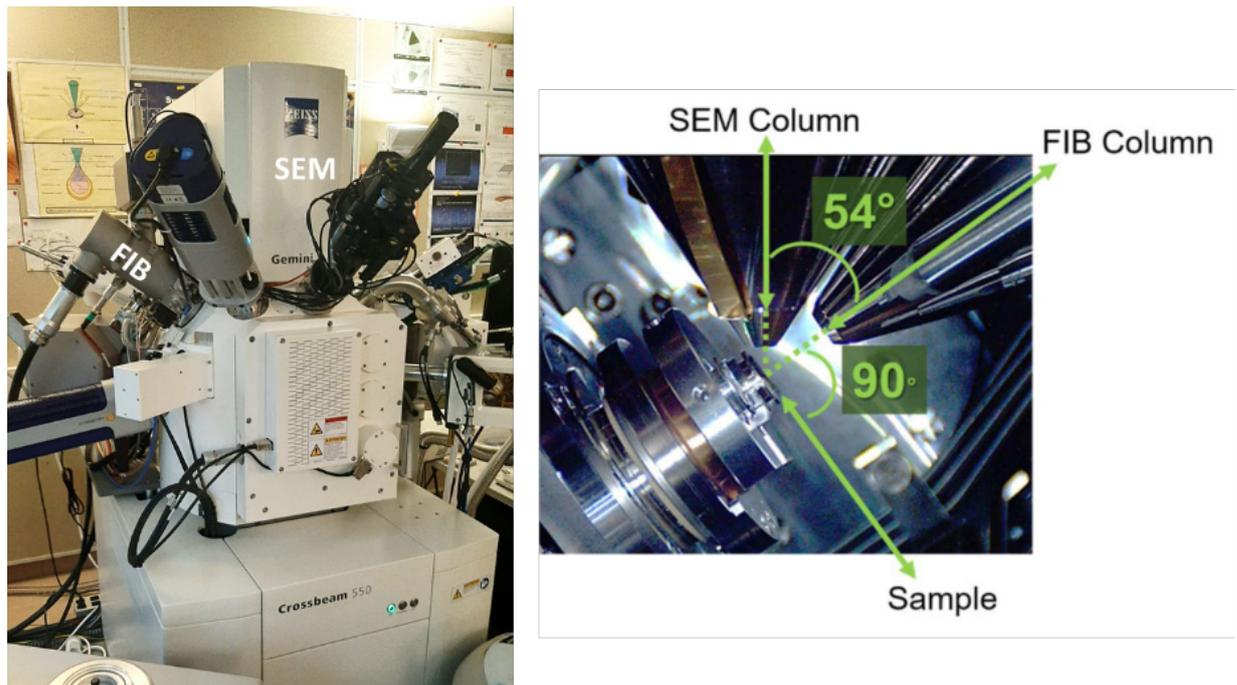


Figure 2.13 : Le CrossBeam 550L Zeiss de l'IMN. Vue de l'extérieur (à gauche) et vue de l'intérieur (à droite).

L'insertion de systèmes d'injection de gaz (GIS) dans la chambre permet le dépôt de gaz à la surface de l'échantillon. Le gaz, généralement un composé organométallique, est adsorbé sur la surface de l'échantillon. Ce précurseur est ensuite frappé par le faisceau d'ions de gallium, qui le décompose en rompant ses liaisons. Les impuretés organiques volatiles sont libérées et

éliminées par le système à vide du FIB. Le métal recherché, par exemple le platine, est suffisamment lourd pour rester déposé à la surface, créant ainsi une fine pellicule qui peut servir de conducteur électrique. Ainsi, l'interaction de ce gaz avec le faisceau d'ions permet de déposer environ $1\mu\text{m}$ d'épaisseur de platine pour un dépôt de $10\times 10\mu\text{m}$ et un temps de dépôt de 10 minutes. Dans ce cas, des courants faibles (entre 50 pA et 1,5 nA) sont utilisés. Des GIS de carbone et de platine sont disponibles dans le FIB/MEB de l'IMN. Il est à noter que le dépôt de platine est aussi possible avec le faisceau d'électrons, mais avec un rendement beaucoup

FIB/SEM at room temperature

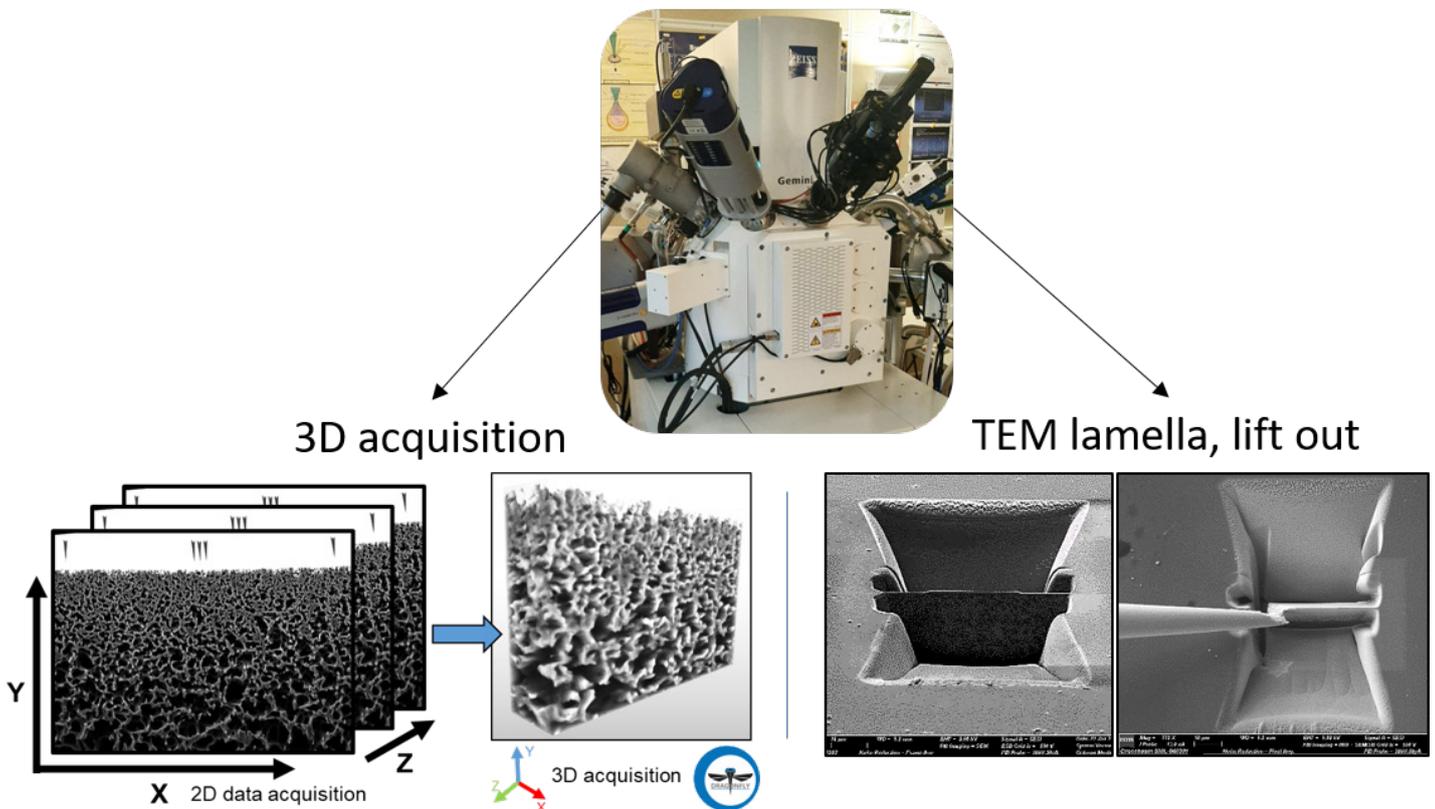


Figure 2.14 : Les application du FIB/MEB à température ambiante utilisées dans cette étude.

moins important (dépôt de 100 nm d'épaisseur pour les mêmes conditions que sus-citées).

Quant à la colonne d'électrons, elle est utilisée pour produire des images comme dans un MEB classique, ainsi que des spectres EDX. Le détecteur Ultim Max couplé au logiciel AZtecLive® est dédié à cet effet. Le MEB peut être utilisé pour visualiser les étapes d'érosion ou de dépôt via le FIB. Ainsi, la double capacité d'observation et d'usinage de la matière a été principalement utilisée ici pour acquérir des volumes 3D (alternance d'érosion de couche fine et d'images dans le matériau) et extraire des lamelles MET (découpe et affinage d'une partie du matériau jusqu'à ce qu'il devienne électron-transparent) (figure 2.14). Dans les prochaines

sections, la préparation de l'échantillon, l'acquisition de volumes 3D et la préparation de lamelle MET seront présentées. Particulièrement, la préparation de l'échantillon, l'acquisition et la reconstruction d'un volume 3D seront détaillées.

2.3.2.2 Préparation des échantillons à température ambiante

Comme expliqué dans le chapitre 1, les échantillons doivent subir une préparation spécifique pour être analysés au FIB/MEB. Dans cette étude, plusieurs échantillons de membranes propres ont été étudiés à température ambiante au FIB/MEB. Dans un premier temps, une partie des membranes propres étudiées ont été contrastées pour augmenter la qualité des images. Le tétr oxyde de ruthénium (RuO_4) a été utilisé comme contrastant pour les membranes PES, en s'appuyant sur les travaux de Trent et al.¹⁸⁵ (1984), tandis que l'acide phosphotungstique (PTA) a été choisi comme contrastant pour les membranes PAN, en raison de son affinité avec les groupes nitriles¹⁸⁶. Les membranes sont immergées dans une solution diluée de contrastant (1%) pendant 1 h, puis rincées. Puis, les membranes propres étudiées à température ambiante (TA) ont dû être déshydratées pendant quelques jours dans une étuve à 35-40°C jusqu'à ce que leur masse devienne constante. Enfin, une partie des échantillons de membrane propre a subi une étape supplémentaire, consistant à enrésiner les membranes dans une résine acrylique (LR White Resin, LFG distribution, France), avant d'être polymérisées à 60°C pendant 48h. Il est à noter que toutes les membranes non colmatées, enrésinées ou non sont appelées dans cette étude "membranes propres". Pour finir, elles ont été fixées sur un support MEB (appelé « plot ») et métallisées par évaporation de fil de carbone (CED 030 Carbon Thread Evaporation Device - BALTEC), ce qui conduit à une couche de carbone d'environ 25 nm d'épaisseur.

2.3.2.3 3D FIB/MEB

➤ Paramètres expérimentaux et préparation des membranes polymères pour le 3D FIB/MEB

Dans le cas de 3D FIB/MEB, l'utilisation du double faisceau nous permet de découper de fines tranches ou coupes de matériau dans un volume sélectionné, tout en prenant des images de la surface de chaque tranche (plan X, Y). Cela permet de former une pile d'images 2D acquises le long de l'axe Z (voir figure 2.15). Dans ce travail, nous avons réalisé pour la première fois des coupes de 5-10nm d'épaisseur dans des membranes polymères UF et MF (voir section 1.4.2 du chapitre 1). Pour obtenir ces données, la surface de l'échantillon doit être

préparée pour l'acquisition 3D. En raison de la grande sensibilité de la surface de la membrane au faisceau d'électrons, une première couche protectrice de platine, générée grâce au faisceau d'électrons, a été déposée. Les étapes suivantes ont suivi la procédure standard de Zeiss apprise pendant la thèse : une deuxième couche de Pt plus épaisse ($\approx 1 \mu\text{m}$ d'épaisseur) a été déposée à l'aide du faisceau d'ions. Pour un rendement de dépôt optimisé, le courant du faisceau est choisi entre 300 et 700 pA pour une surface de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Cela suit la règle apprise lors de la formation de Zeiss, où le courant utilisé doit être compris entre 2 et 6 pA par μm^2 de surface de dépôt. Afin d'automatiser l'acquisition 3D, un motif constitué d'un ensemble de lignes a été gravé dans le dernier dépôt de platine. Puis, il est recouvert d'un dépôt de carbone et d'un troisième dépôt de platine. Le contraste élevé entre le carbone et le platine permet le bon

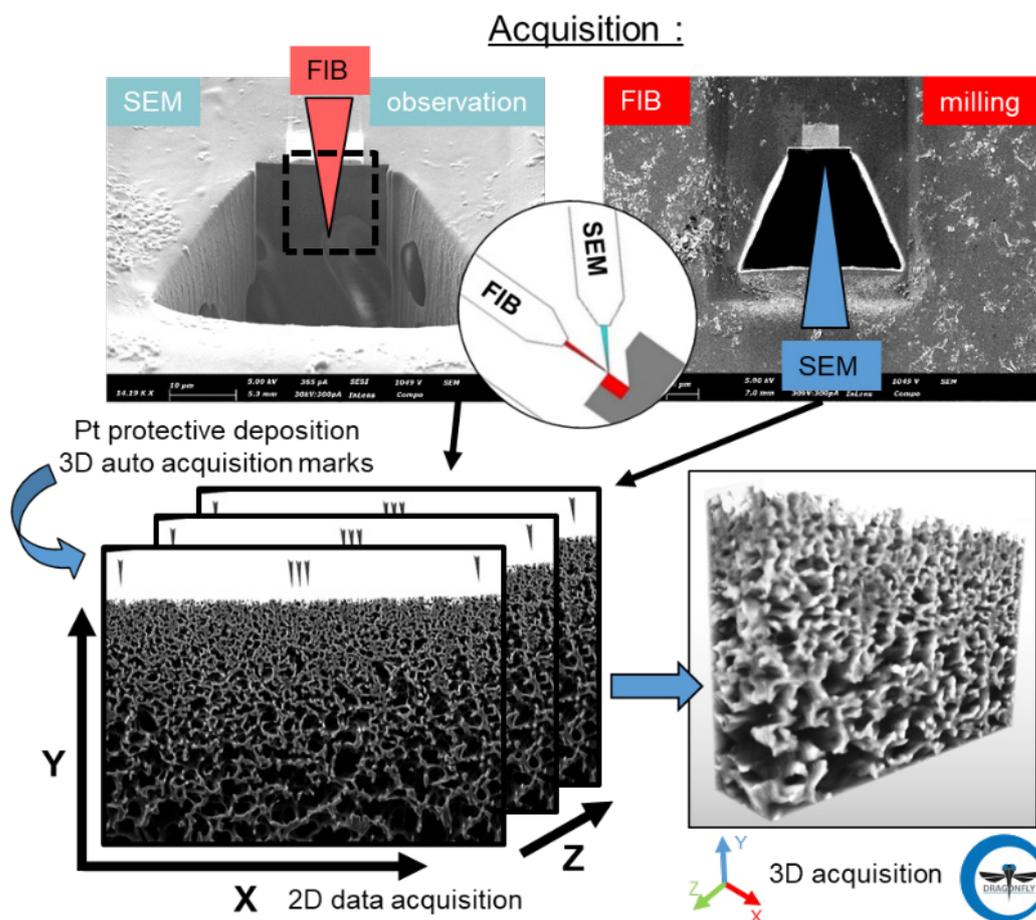


Figure 2.15 : Procédures pour l'acquisition de données 2D et la reconstruction de volume 3D pour la membrane PES par FIB/MEB.

fonctionnement de l'autofocus/autostigmatisme (système Atlas AutoTune) et du suivi de l'acquisition (épaisseur des coupes) et de la dérive Z (système Atlas 3D tracking).

Enfin, une découpe de forme trapézoïde, appelée aussi « voie de garage » est creusée à un fort courant (30 nA), jusqu'au dépôt de Pt pour dégager la zone d'intérêt. La hauteur du

trapèze de la cross section doit correspondre à au moins une fois et demie la profondeur de fraisage souhaitée. Ainsi, pour une profondeur de 10 μm , une cross section d'une hauteur de 15 μm doit être creusée. Enfin, la surface d'intérêt est polie avec un faible courant (700 pA), avant de procéder à l'acquisition. Toutes ces étapes sont définies dans le logiciel d'acquisition d'images 3D de ZEISS (Atlas, version 5.3.3.9).

➤ Acquisition des images au 3D FIB/MEB à température ambiante

Des acquisitions 3D par FIB/MEB ont été réalisées sur les membranes propres PES et PAN avec et sans enrésinement (durée : entre 12 et 48h). Des volumes entre $5 \times 5 \times 5 \mu\text{m}^3$ et $30 \times 30 \times 30 \mu\text{m}^3$ ont été acquis avec une taille de voxel cubique (valeur égale pour X, Y et la largeur de la tranche Z) de 5 nm pour les membranes PAN et de 10 nm pour les membranes PES. Selon le théorème de Shannon¹⁸⁷, dans une image, un objet est détectable s'il a une taille supérieure à au moins deux fois la taille minimale du pixel de cette image. Et donc, au moins 2 pixels sont nécessaires pour qu'un pore de la membrane soit détecté. Il est à noter que, pour cette étude, la taille moyenne des pores est au moins six fois supérieure à la taille de voxel choisie (selon le diamètre nominal fourni par les fabricants, soit 30 et 100 nm pour la PAN et la PES respectivement).

Étant données les difficultés d'imagerie des polymères par les faisceaux d'ions et d'électrons identifiées dans la littérature^{11,12}, une grande partie de ce travail a été consacrée à la recherche et à l'optimisation des principaux paramètres des faisceaux d'électrons et d'ions. Cet aspect est développé dans la section 2.3.5 de cette partie. Des images MEB d'électrons secondaires (SE) et d'électrons rétrodiffusés (BSE) ont été obtenues avec un faisceau primaire de 2-5 keV et des courants de 200-1000 pA. Les coupes dans le matériau ont été obtenues avec des courants de 300 ou 700 pA et une énergie de 30 keV pour le faisceau d'ions.

➤ Reconstruction 3D

Le logiciel Dragonfly, dédié au traitement et à l'analyse d'images, a été développé et commercialisé par Object Research Systems Inc, Montréal Canada¹⁸⁸. Il a été utilisé pour reconstruire et analyser les différents stacks d'images de ce travail. Il permet de couvrir l'ensemble des étapes nécessaires à la reconstruction et valorisation des volumes 3D, comme le traitement des images (rognage, alignement des images, application de filtres...), la segmentation et la quantification d'objets multiéchelle dans un volume 3D.

- Prétraitement du stack

Lors de l'acquisition de stack d'images, l'image peut se décaler spatialement dans le temps (drift ou dérive), notamment à cause de l'effet de charge (perturbation de l'image suite à une accumulation de charges à la surface d'un échantillon isolant). Ce phénomène, inévitable lors de l'acquisition 3D d'échantillons sensibles, doit être corrigé prioritairement avant d'exploiter un volume. En effet, si le stack n'est pas aligné, on peut observer une déformation du volume (voir figure 2.16a). Elle peut, dans certains cas, mener à une interprétation incorrecte de la forme réelle d'un objet. L'exemple le plus connu est l'effet « concombre-banane » ou la forme réelle incurvée d'une banane peut être reconstruite en forme linéaire, comme un concombre, si les images ne sont pas alignées¹⁸⁹. Ici, les images sont alignées les unes par rapport aux autres afin de limiter les éventuelles dérives ou erreurs lors de l'acquisition (en tenant compte des marques gravées à la surface du volume), le module "Slice Registration" a été utilisé à cet effet.

De plus, des étapes supplémentaires de prétraitement sont parfois nécessaires : par exemple, le rognage du volume, l'application de filtres ou d'opérations mathématiques (binning), habituellement réalisés pour limiter les variations locales du contraste des images dues au drift ou à la perte de focalisation. Un prétraitement est aussi réalisé pour limiter l'artéfact de curtaining, qui se présente comme des lignes verticales sur la coupe de l'échantillon (voir figure 2.16b). Il est dû au faisceau d'ions qui creuse la matière dans cette direction de manière non homogène, et peut être diminué avec le dépôt d'une couche épaisse de platine à la surface de l'échantillon, mais aussi, a posteriori avec un filtre en traitement d'images.

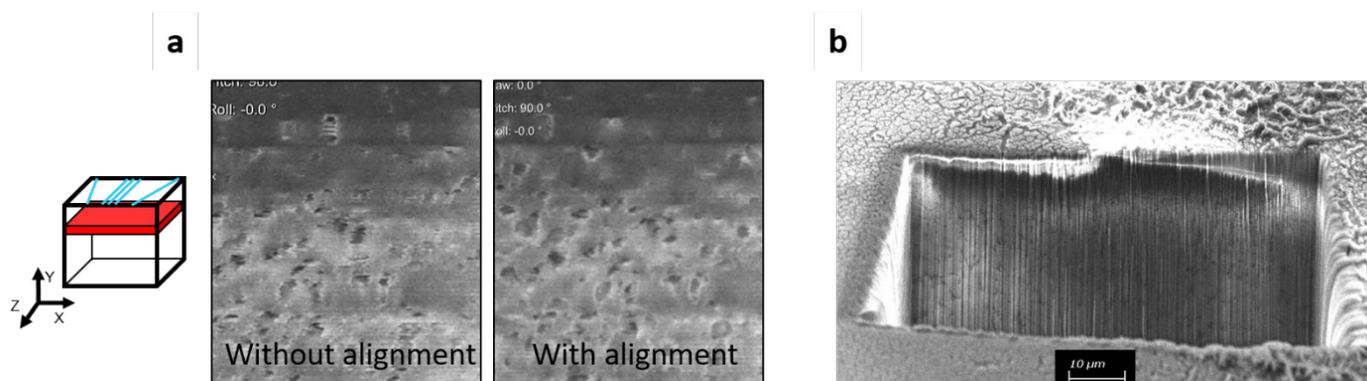


Figure 2.16 : Les différents artéfacts obtenus en 3D FIB/MEB. (a) Déformation du volume dans le plan XZ (vue du dessus du volume) dû au manque d'alignement du stack. (b) L'artéfact de curtaining (lignes verticales).

- Choix de la méthode de segmentation

Afin de délimiter, par exemple, les pores et la membrane propre (polymère), il est nécessaire de segmenter chaque image. Deux techniques de segmentation ont été utilisées pour ces

travaux, (i) la segmentation par sélection de niveaux de gris (thresholding) ou (ii) la segmentation semi-automatique par machine learning (voir figure 2.17).

La technique (i) correspond à la sélection d'une fenêtre de niveau de gris dans l'histogramme de l'image par rapport à l'objet d'intérêt, par exemple les pores de la membrane. Cette technique est adaptée pour la différenciation de 2 phases contrastées. Elle fonctionne également bien avec plus de phases à différencier, dès lors que ces dernières présentent un contraste élevé entre elles (pics importants sur l'histogramme) et qui ne varie pas pendant l'acquisition. Dans cette étude, elle a été employée, avec succès, pour l'analyse des membranes propres, où seulement deux phases sont analysées : la structure de la membrane (de couleur claire) et les pores (de couleur foncée) (voir figure 2.17a). Cependant, lors de nos travaux, cette technique de seuillage n'a pas pu être appliquée aux données présentant 3 phases ou plus à segmenter (membranes colmatées et analysées dans des conditions cryogéniques).

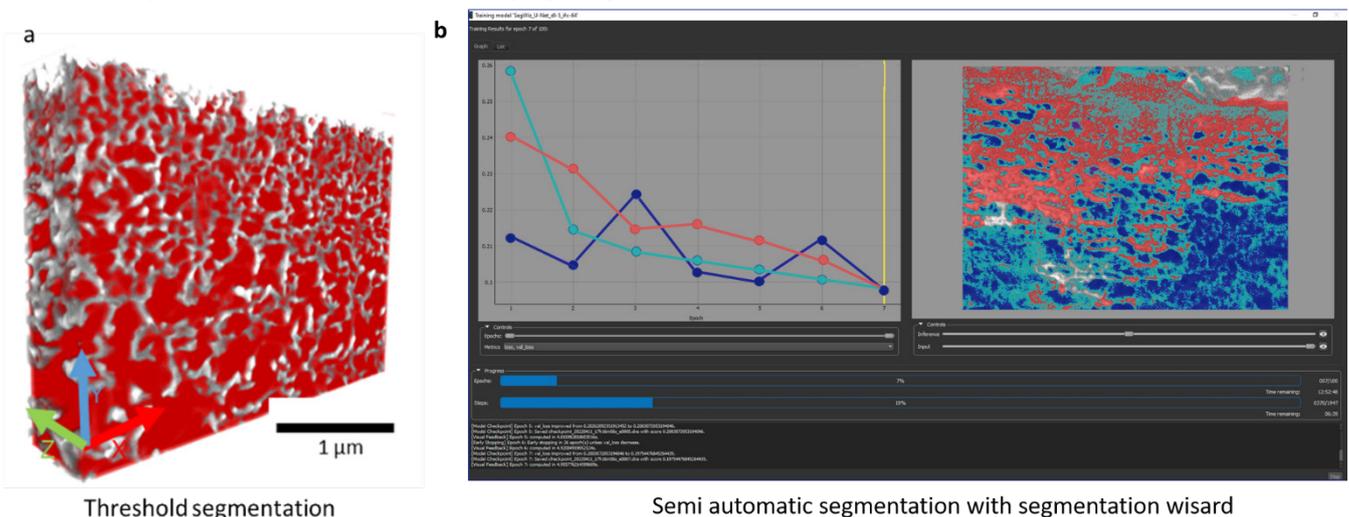


Figure 2.17 : Résultats des deux techniques de segmentation utilisées pour cette étude : (a) la technique de sélection de gris (threshold), ici pour segmenter les pores de la membrane PES. Et (b), la méthode semi-automatique avec segmentation Wisard, ici trois phases, les pores (bleu foncé), le colmatage (rouge) et la membrane PES (cyan).

Dans ce travail, la technique de segmentation semi-automatique (ii) est utilisée dans le cas de trois phases ou plus à différencier. C'est par exemple le cas des membranes colmatées et cryogénisées, où la structure de la membrane, l'eau qui remplit les pores et les biomolécules du colmatage forment trois phases différentes. Dans cet exemple, le contraste est moindre entre ces phases, ce qui rend la segmentation (i) difficile, voire impossible à mettre en place. La segmentation par machine learning est alors effectuée via le module « segmentation wisard » du logiciel Dragonfly. Plusieurs coupes 2D dans le stack sont utilisées comme références, où des régions d'intérêts (ROI) sont sélectionnées manuellement (par exemple : pore, structure ou eau). Ensuite, un algorithme fait des propositions de segmentations automatiques, en

correspondance avec ces ROI, jusqu'à convergence et obtention de la meilleure segmentation (voir figure 2.17b). Puis, après validation, l'algorithme est appliqué au volume. L'ensemble de ces étapes demande du temps. Pour un volume de $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$, avec une résolution de 10 nm^3 et 3 phases à différencier, il faut compter au moins 10 h de traitement (temps d'apprentissage) et 3 à 4 h d'application au volume (après l'apprentissage). Après la segmentation, en accord avec le théorème de Shannon, un filtre est appliqué pour éliminer tous les objets d'une taille inférieure à 3 voxels.

- Quantification et extraction des paramètres d'intérêts

L'analyse des volumes segmentés peut fournir un ensemble de caractéristiques de la membrane et de son colmatage, à savoir la taille des objets (pores ou biomolécules) ou leur volume (par exemple : la porosité volumique ou le volume du colmatage externe). Pour les pores de la membrane, la tortuosité et la connectivité peuvent aussi être extraites (voir figure 2.18).

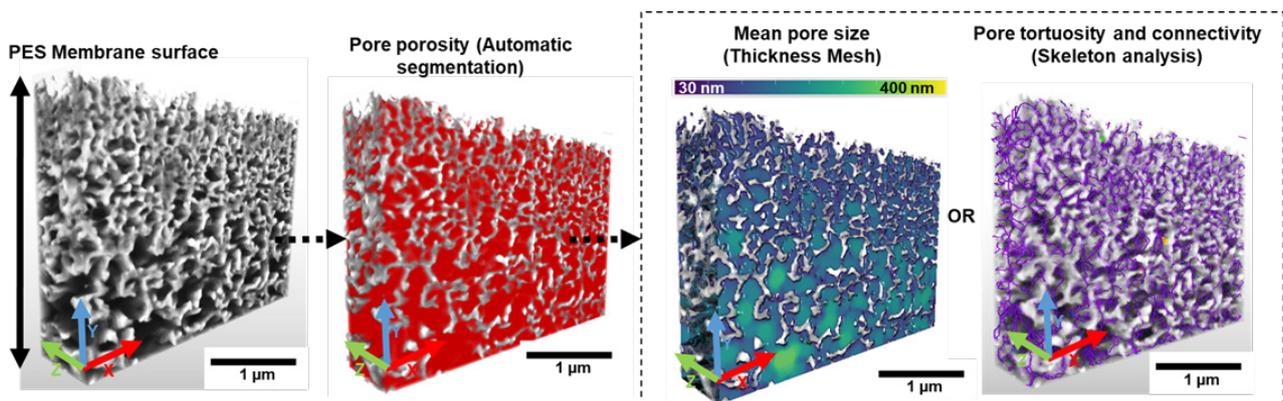


Figure 2.18 : Illustrations des principales étapes de l'analyse 3D dans le cas de la membrane PES. Les pores ont été segmentés par niveaux de gris. Une analyse quantitative de la porosité volumique, de la taille moyenne des pores, de la tortuosité et de la connectivité des pores ont été calculés à partir de la segmentation.

Une analyse de la membrane est possible en fonction de la profondeur. Pour cela, chaque volume analysé est divisé en couches de volume parallèles à la surface de la membrane, le long de l'axe Y (plus de détails dans le chapitre 3). Chaque couche chevauche la suivante de 50%, de sorte que l'analyse couvre la totalité de la structure de la membrane. Les couches ont chacune une épaisseur de 100 et 300 nm et les mesures sont séparées respectivement de 50 et 150 nm pour les membranes PAN et PES respectivement (cela permet une quantification lissée en fonction de la profondeur). L'épaisseur des couches a été choisie de manière à ce qu'elle soit au

moins 3 fois supérieure à la taille nominale des pores (taille fournie par le fabricant, $100\text{ nm} \geq 3 \times 30\text{ nm}$ pour la PAN et $300\text{ nm} \geq 3 \times 100\text{ nm}$ pour la PES).

Ensuite, sur la base du volume de segmentation, le diamètre moyen des objets est calculé avec le module « thickness mesh » (épaisseur locale en 3D)¹⁵. Ce calcul s'appuie sur la mesure du diamètre de la plus grande sphère qui s'insère dans l'objet, par exemple un pore reconstruit

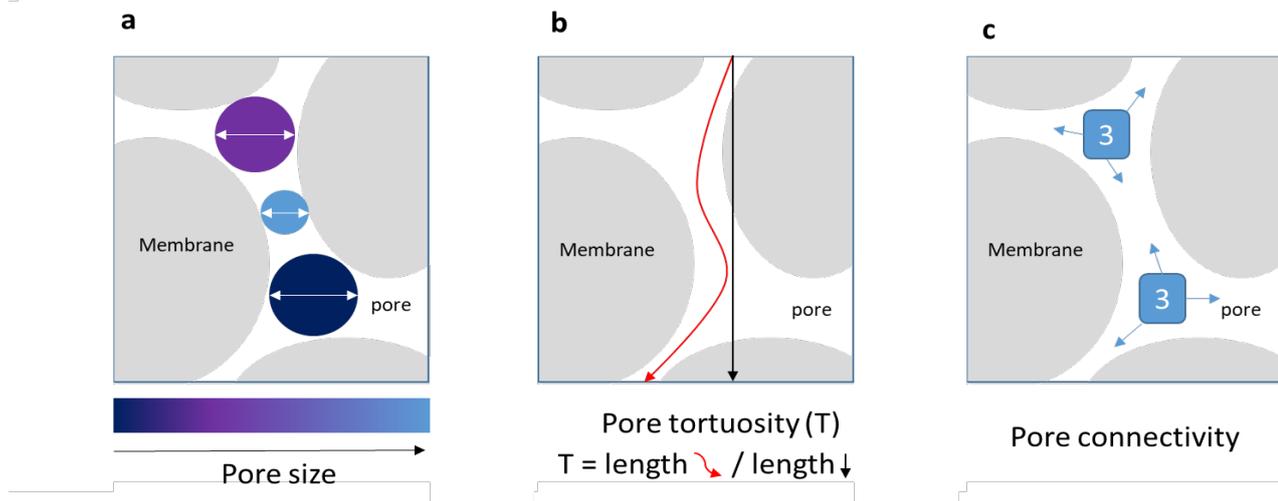


Figure 2.19 : Les outils de calcul de taille, de tortuosité et de connectivité des pores. (a) taille des pores selon le procédé de « thickness mesh », (b) la tortuosité d'un pore et (c) la connectivité d'un pore.

en 3D (voir figure 2.19a). Spécifiquement pour les pores de la membrane, la tortuosité, c'est-à-dire le rapport entre la longueur du pore et la distance entre ses extrémités (la distance rectiligne entre le début et la fin de l'objet) et la connectivité sont également extraites du volume segmenté via le module « skeleton analysis » (processus de squelettisation)¹⁶ (voir figure 2.19b et 2.19c). Concernant l'estimation des pores aveugles, la position Y (l'axe Y, correspondant à la profondeur à partir de la surface de la membrane) pour chaque pore est identifiée en utilisant le module « multi-ROI analysis » basé sur la segmentation des pores. Ainsi, les pores connectés à la surface et leur position en profondeur (Y) sont identifiés et triés.

2.3.2.4 Préparation de lamelles MET par FIB lift-out

La préparation de lamelles MET est l'une des applications du FIB. C'est l'un des multiples moyens de préparer un échantillon pour son observation en MET. Le « FIB-lift out » est une technique particulièrement adaptée et utilisée pour la préparation d'échantillons durs et peu sensibles aux faisceaux d'ions et d'électrons. Elle est beaucoup plus fiable et précise que la technique classique de préparation à l'ultramicrotome¹⁹⁰. Cependant, elle est chronophage et difficile à prendre en main, en particulier pour les échantillons sensibles comme les membranes

en polymères, ce qui explique le peu de publication trouvé à ce sujet (voir chapitre 1). La procédure vise à obtenir un échantillon mince et transparent aux électrons (son épaisseur doit être approximativement inférieure à 100 nm), plus la lamelle est fine, plus la procédure est difficile.

➤ Préparation de lamelles à température ambiante

Ces expériences ont été réalisées sur des membranes propres et sèches. Dans un premier temps, il est indispensable de protéger la surface de la membrane. En suivant le système décrit précédemment, des dépôts de platine avec le faisceau d'électrons (≈ 100 nm d'épaisseur) et avec le faisceau d'ions (4×20 μm avec ≈ 1 μm d'épaisseur) sont produits (voir figure 2.20a). Ils permettent de protéger la lamelle pendant les phases de fraisage et de polissage¹⁹¹. En effet, la forme du faisceau d'ions (comme une courbe gaussienne) implique une interaction pas tout à fait perpendiculaire avec la paroi de l'échantillon. Ainsi, la couche de protection de Pt permet une interaction plus homogène entre le faisceau et l'échantillon (la couche de Pt absorbe une partie du faisceau).

Ensuite, deux sections transversales de forme trapézoïde sont découpées dans la matière à l'aide d'un courant élevé (30 nA), de part et d'autre du dépôt de platine (voir figure 2.20b). Les surfaces de la lamelle sont ensuite polies à l'aide d'un courant plus faible (≈ 700 pA), jusqu'à obtenir une lamelle d'environ 1 μm d'épaisseur. Pendant cette étape, l'échantillon est légèrement incliné pour palier à l'effet de la forme gaussienne du faisceau. Cela permet de polir les faces de la lamelle le plus parallèlement possible. La taille des cross sections est directement liée à la profondeur du fraisage et donc à la hauteur finale de la lamelle. Dans ce travail, des lamelles avec une hauteur de 10 μm ont été produites.

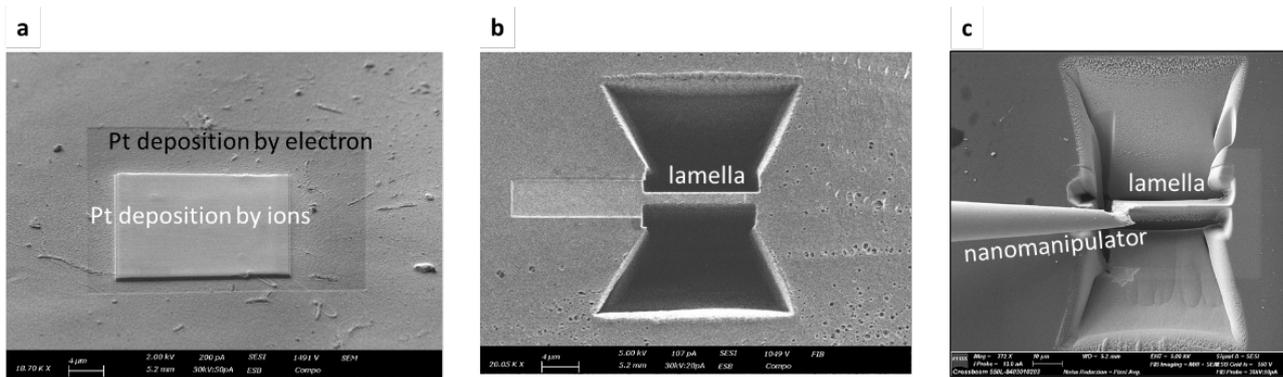


Figure 2.20 : La procédure de préparation d'une lamelle MET au FIB/MEB. (a) Dépôts électroniques et ioniques de platine. (b) Découpe de sections transversales trapézoïdales de part et d'autre du dépôt. Et (c), extraction de la lamelle avec le nanomanipulateur.

➤ Extraction et affinement de la lamelle

La lamelle est extraite à l'aide d'un nanomanipulateur (voir figure 2.20c) et fixée à une grille MET adaptée. Dans ces travaux, les lamelles produites ont été fixées à l'aide d'une soudure en Pt d'un seul côté, sur une paroi rectiligne de la grille MET (voir figure 2.21a). Il est à noter que certaines difficultés ont été rencontrées en utilisant cette méthode d'attachement. La lamelle est très instable, surtout pendant l'étape d'amincissement et elle peut facilement se tordre ou se briser pendant le transfert au MET (figure 2.21c).

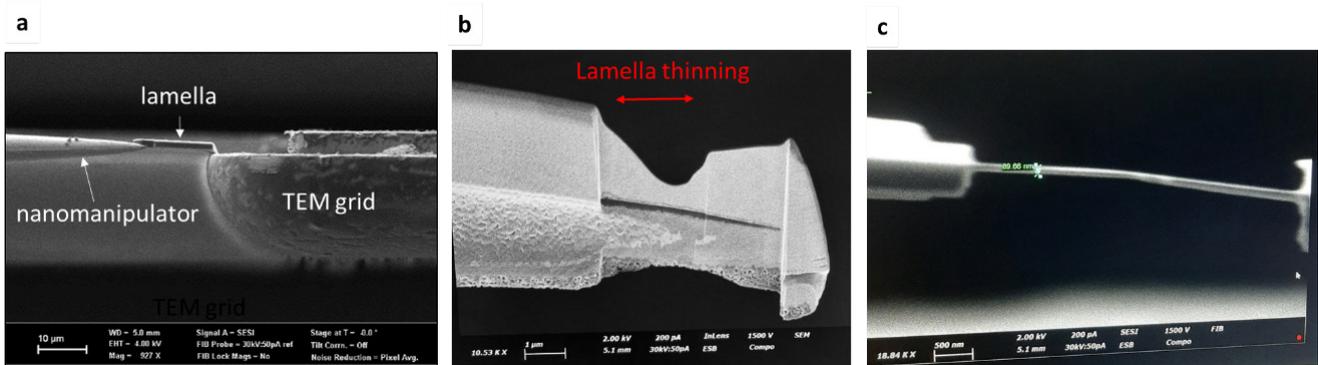


Figure 2.21 : Procédure d'amincissement de la lamelle MET. (a) la lamelle est fixée à une grille MET sur un côté rectiligne. (b) Une partie de la lamelle est amincie (flèche rouge). Et (c), la lamelle est fragilisée par l'amincissement, ce qui implique ici une déformation.

Enfin, on peut procéder à l'amincissement, cette étape consiste à réduire progressivement l'épaisseur de la lamelle de 1 μm à 100 nm par polissage fin (figure 2.21b). Pendant cette opération, l'échantillon est incliné de 54° afin d'être perpendiculaire à l'axe du FIB et il est tourné de 180° pour polir une face après l'autre. Du fait de la possibilité de perdre ou d'endommager très rapidement la lamelle, cette étape est la plus délicate de cette procédure et elle est particulièrement difficile pour les matériaux mous et poreux comme les membranes de filtration. Comme la membrane est moins dure et plus sensible que la couche de platine, elle

va s'affiner plus vite que celui-ci. Il est donc important d'adapter l'inclinaison de l'échantillon par rapport au faisceau, mais également le courant de ce dernier. Des courants de 20 à 100 pA ont été utilisés dans cette étude pour mener à bien l'amincissement des lamelles membranes de filtration. Malgré ces précautions, il est difficile d'obtenir une épaisseur homogène dans toute la lamelle. De plus, les pores vides de la membrane peuvent rendre la lamelle instable (pendant le fraisage, mais aussi durant son observation au MET) et peu conductrice lors de son observation.

2.3.3 Utilisation du MET

2.3.3.1 Les MET de l'IMN

Les deux microscopes en transmission ont été utilisés pour cette thèse : le Nant'Themis et le HNAR 9000. Le premier est un microscope très récent et doté des dernières technologies, il a servi pour l'analyse des membranes propres (à température ambiante) et colmatées (en conditions cryogéniques). Tandis que le deuxième, le plus ancien, a servi pour l'élaboration et le contrôle des protocoles de préparation d'échantillons ou de contraste des biomolécules. Les deux microscopes vont être brièvement présentés dans cette section.

➤ Le Nant'Themis

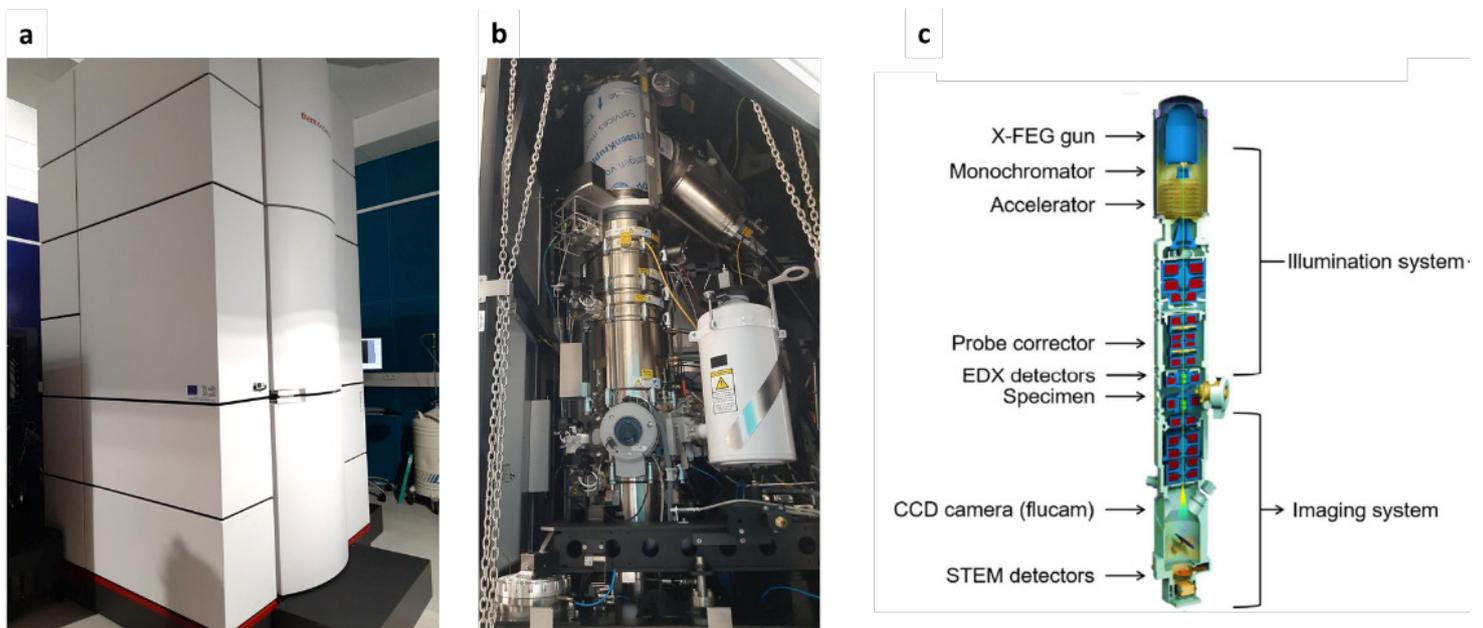


Figure 2.22 : Le Nant'themis de l'IMN. (a), Vue de l'extérieur avec le caisson permettant de garder des conditions environnementales stables et protégeant le microscope. (b), Vue de l'intérieur du caisson. Et (c), schéma de l'intérieur du microscope et de ces différentes parties.

Il s'agit d'un Themis-Z G3 avec correcteur de sonde de Thermo Fisher (voir figure 2.22). Il est équipé d'un canon d'électrons Schottky X-FEG et d'un monochromateur, il a été acquis dans le cadre de l'action CIMEN (Centre Interdisciplinaire de Microscopie de Nantes) en décembre 2018. Sept porte-objets sont disponibles à l'IMN pour des usages différents. Dans cette étude, le porte-objet double tilt a été utilisé pour l'analyse des échantillons (membranes et biomolécules) à température ambiante (imagerie et spectroscopie EDX). Le porte-objet cryo (Fischione) a été utilisé pour l'analyse des biomolécules en suspension. Les modes d'imagerie MET et STEM sont utilisés dans cette étude. Le microscope est équipé de nombreux détecteurs, mais aussi de caméras (caméra OneView et caméra hyper sensible de type K2 à détection directe des électrons, Gatan K2 Summit). Enfin, la couronne de détecteurs EDX, « SuperX » permet des analyses chimiques et l'acquisition de cartographies sur les membranes polymères (plus de détails en section d de cette partie). C'est le microscope en transmission principal de cette étude. Dans les sections suivantes, la préparation de l'échantillon et les modalités d'observation seront décrites pour ce microscope.

➤ Le HNAR9000

Ce microscope est montré sur la figure 2.7 de ce chapitre. Il s'agit d'un H-9000 NAR de Hitachi, acquis en 1996 par l'IMN. Il est utilisé pour caractériser les échantillons en imagerie conventionnelle. Il est équipé d'une lentille objectif à haute résolution (résolution point-point : $\approx 0,2$ nm) et d'une caméra pour l'imagerie. Dans cette étude, il a été utilisé pour le contrôle des grilles et la mise au point des protocoles, tels que la préparation des membranes et le contraste des lipides et des protéines par métaux lourds.

2.3.3.2 Préparation des échantillons à température ambiante

La procédure de préparation des biomolécules pour l'observation MET est expliquée dans la section c.ii de la partie 1. Cette section va présenter la préparation des membranes de filtration pour le MET.

Pour augmenter le contraste, certaines membranes ont été contrastées en amont de leur observation au MET. De la même manière que précédemment (préparation d'échantillons pour le MEB, voir la section b.ii de cette partie), le RuO₄ a été utilisé pour contraster les membranes PES et le PTA pour contraster les membranes PAN. Puis, les membranes sont déshydratées, enrésinées dans une résine acrylique (LR White Resin, LFG distribution, France) et polymérisées à 60°C pendant 48h. Après leur durcissement, elles sont coupées à

l'ultramicrotome (Leica UC7/FC7) à l'aide d'un couteau de diamant ultrafin (Diatome), avec une épaisseur de coupe de ≈ 80 nm (voir figure 2.23). Enfin, les coupes sont récupérées dans le réservoir du couteau et placées sur une grille de support MET Lacey Carbon Film (LC325-Cu 300 mesh). Les grilles sont préparées au minimum en doublon (en cas d'incident, de casse ou de manque d'échantillon sur la grille) et au moins 4 h avant leurs observations en MET pour être certain qu'elles ne contiennent plus d'eau.

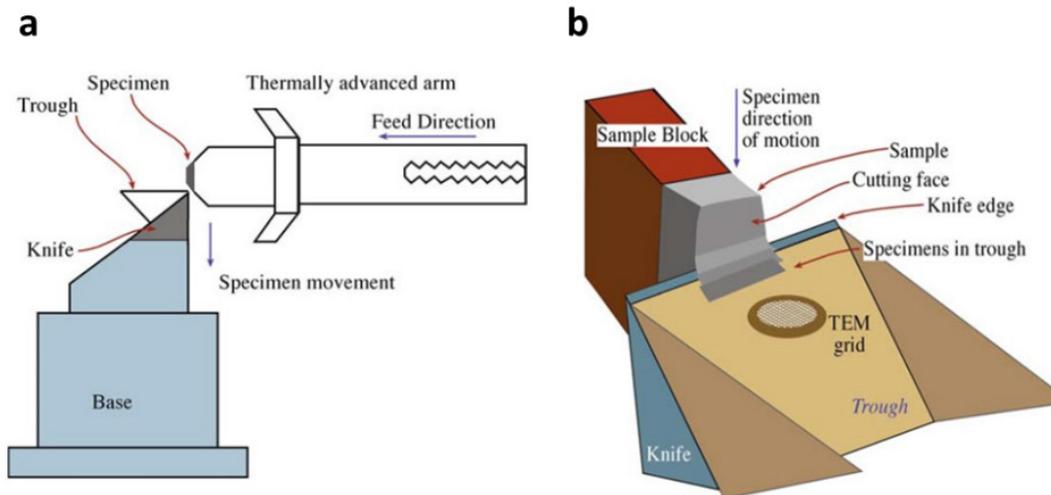


Figure 2.23 : schéma du fonctionnement d'un ultramicrotome a) vue de profil b) vue du dessus avec récupération des coupes sur une grille MET. Williams et Carter, Chapitre 10, Transmission Electron Microscopy, 2009

2.3.3.3 Acquisition en (S)TEM

➤ Acquisition en MET

Le mode MET correspond à l'imagerie de l'échantillon avec un faisceau parallèle. Autrement dit, une grande surface de l'échantillon est traversée par le faisceau et le contraste est obtenu par transparence. Ce mode permet d'observer les échantillons de manière générale, mais aussi à de hautes résolutions (une résolution de 0,2 nm est obtenue après alignement du faisceau). Il a été utilisé pour analyser les membranes de filtration et les biomolécules en suspension. En tenant compte de la sensibilité de l'échantillon, un faisceau avec des courants entre 2 et 4 nA et une énergie de 300 keV ont été utilisés pour imager les biomolécules et les membranes à température ambiante. Les caméras OneView et K2 couplées au logiciel Digital Micrograph® ont été utilisées à cet effet.

➤ Acquisition en STEM

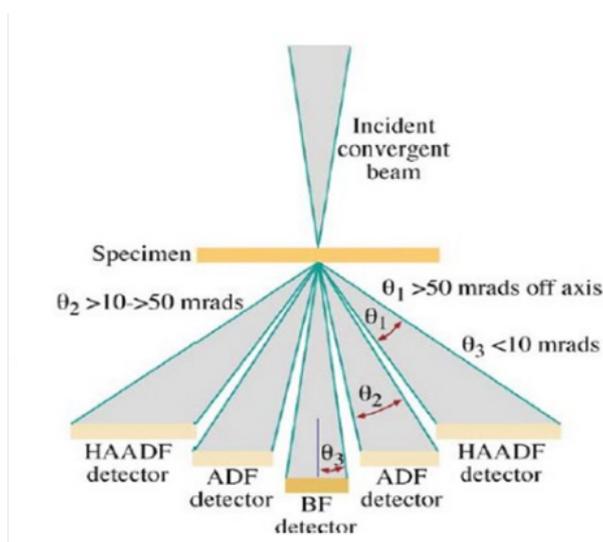


Figure 2.24 : Les différents détecteurs STEM (le faisceau incident étant focalisé sur l'échantillon). ADF (Annular Dark Field) , BF (Bright Field) et HAADF (High Angle Annular Dark Field) (Z contrast). D'après William and Carter (2009)

Le mode STEM correspond à l'imagerie de l'échantillon avec un faisceau focalisé en un point et balayé sur l'échantillon. La résolution de l'image dépend directement de la taille de ce point, ici 60 pm de résolution sont obtenus après l'alignement du faisceau (au Themis Z). Ce mode a été utilisé pour des zones plus petites de l'échantillon, comme la couche sélective de la membrane. Dans cette étude, le mode STEM est utilisé pour caractériser les membranes et les biomolécules. Un courant de faisceau de ≈ 65 pA et une énergie de 300 keV ont été utilisés pour les imager à température ambiante (avec un dwell time (temps passé par pixel) de 20 μ s et une taille de pixel de 5 nm). Enfin, parmi les détecteurs existants, l'HAADF (High Angle Annular Dark Field) (voir figure 2.24) est utilisé pour ces travaux, il permet d'observer, pour une épaisseur d'échantillon homogène, un contraste chimique sur l'image (en fonction du numéro atomique Z). Le logiciel Velox® est utilisé pour l'acquisition des images.

2.3.4 Spectroscopie EDX : utilisation en MET et en MEB

Comme expliqué brièvement dans l'introduction de cette partie, les signaux secondaires provenant des interactions entre les électrons et l'échantillon, comme les rayons X, peuvent être exploités par différentes techniques de spectroscopie. Ainsi, il est possible d'obtenir des informations chimiques sur l'échantillon. La technique de spectroscopie utilisant les rayons X en MEB et en MET est présentée dans cette section.

2.3.4.1 Principe général de l'EDX (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy)

Lorsque la matière est exposée à un faisceau d'électrons, les électrons de ces atomes peuvent être expulsés des couches électroniques. Les « trous » laissés par les électrons créent une cascade de transitions d'électrons des couches électroniques supérieures. Chaque transition se traduit par l'émission d'un électron Auger ou d'un rayon X (voir figure 2.25a). La radiation émise a une énergie caractéristique, elle est égale à la différence d'énergie entre les deux couches électroniques impliquées dans la transition de l'électron. Comme chaque atome possède des couches avec une énergie caractéristique, la mesure de l'énergie du photon X émis permet d'identifier la nature de l'atome émetteur. C'est sur ce principe que repose la spectroscopie de rayons X, cette technique peut être couplée à l'imagerie en MEB et en MET. Ainsi, en plus des informations structurales et morphologiques (images), des informations chimiques (EDX) peuvent être apportées sur l'échantillon.

Pour faire l'analyse, on utilise un « X-ray energy-dispersive spectrometer » ou XEDS. Il est composé principalement de trois parties : le détecteur, la partie traitement électronique et l'ordinateur. Le détecteur XEDS est placé au plus près de l'échantillon dans la colonne du microscope (MEB ou MET). Le signal énergétique est détecté puis affiché sous forme de spectre (des pics indiquant spécifiquement la présence d'un élément) ou une image de composition (une carte révélant la présence d'un élément sur l'image) (voir figure 2.25b et 2.25c). Aujourd'hui, il est possible, avec le développement de nouveaux outils (sources FEG, détecteurs avec une collecte plus élevée, correction de la dérive, nouveaux logiciels, correcteurs d'aberrations...), de créer plusieurs cartes EDX (plusieurs éléments, une carte ou couleur par élément) en quelques minutes. Enfin, une procédure peut être utilisée pour convertir les informations en données quantitatives (distribution des éléments dans le spécimen). Pour aller plus loin, il existe des routines informatiques utilisant la déconvolution du signal, elles permettent l'identification et la différenciation de certains pics du spectre.

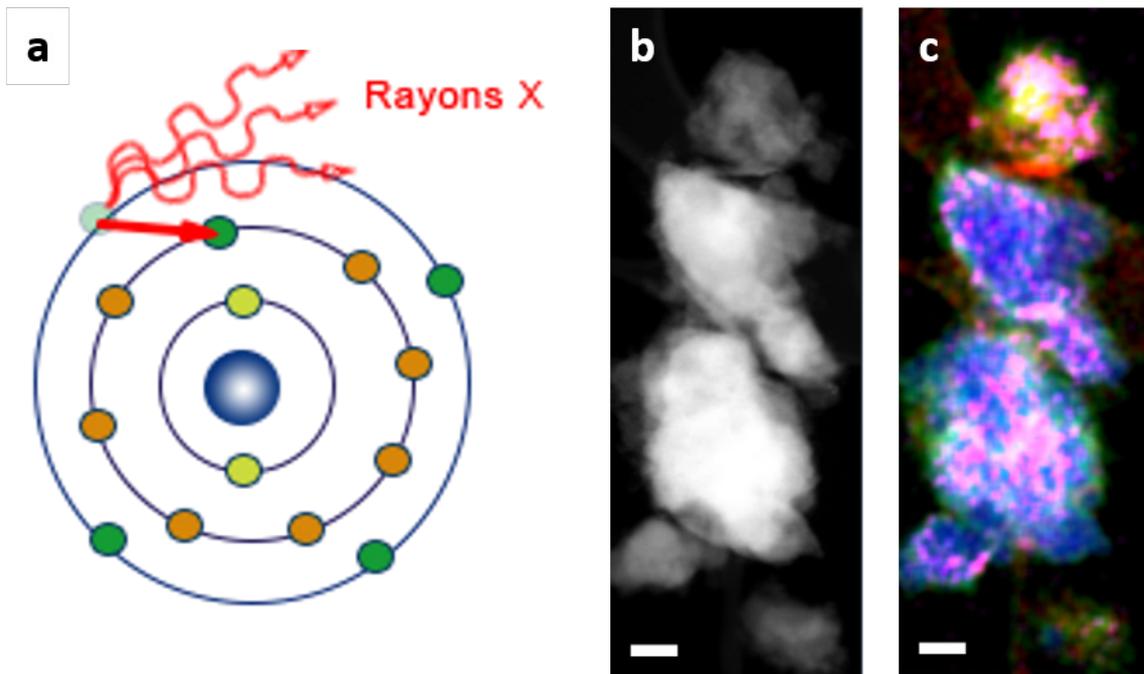


Figure 2.25 : a) Émission de rayons X suite à l'interaction avec le faisceau d'électrons. b) Image en STEM-HAADF d'un agrégat de particule de silicium, liant et sei c) La cartographie EDX révèle la nature de l'agrégat, avec du silicium (bleu), oxygène (vert), zinc (violet). La barre d'échelle est de 100 nm. D'après la thèse de Lucas Huet (2022, Themis Z de l'IMN)

L'analyse EDX peut être limitée par la sensibilité des détecteurs pour les éléments légers (faible numéro atomique Z) ou faiblement présents. Mais aussi, les artefacts dus à la détection ou au traitement peuvent altérer ou rendre inexploitable un signal. De plus, il faut tenir compte du fait que le signal vient d'une profondeur importante dans l'échantillon (voir le volume d'interaction figure 2.11a). Ce qui impose une résolution spatiale de moins bonne qualité, en particulier en MEB où les échantillons sont épais ou entiers (en MET la profondeur du volume est limitée à la faible épaisseur du spécimen, < 100 nm). Il est à noter que plus l'énergie du faisceau incident est grande, plus le volume d'interaction est grand, et donc, les signaux résultant viennent également d'une profondeur plus importante. Par conséquent, il est possible de faire des analyses avec des profondeurs relativement différentes dans l'échantillon.

2.3.4.2 La spectroscopie EDX dans le MEB et le MET

➤ Le détecteur EDX dans le Nant'Themis

Le détecteur EDX dans le Nant'Themis (système Super X, Thermo Fischer Scientific) a une configuration spécifique qui consiste en quatre détecteurs EDX (SDDs (silicon drift detectors)), situés au-dessus du porte-échantillon (voir figure 2.26). Cette couronne de détecteurs permet une meilleure collecte des rayons X. Par exemple, lors de l'analyse d'un échantillon proche des parois de la grille, une partie de l'échantillon est dans l'ombre du détecteur. Dans ce cas, un

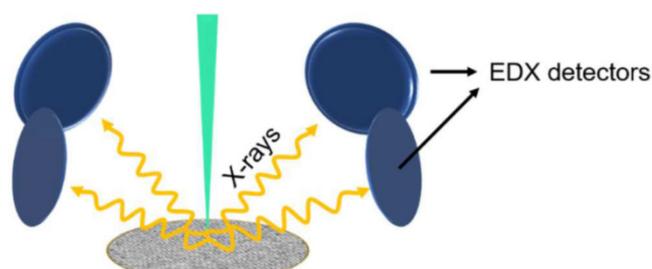


Figure 2.26 : Disposition des détecteurs EDX dans le Nant'Themis, schéma extrait des travaux de thèse de Angelica Laurita (2022)

autre détecteur, placé à un angle différent, peut prendre le relais et compenser le manque de signal. Il est aussi possible de sélectionner seulement certains détecteurs, par exemple dans le cas d'un signal faible ou erroné (contamination de Cu venant d'un barreau de la grille par exemple). On peut ainsi se concentrer uniquement sur les données réelles.

Pour réaliser des cartographies EDX, il faut utiliser le mode d'imagerie STEM, dans lequel, pour chaque position de l'échantillon scanné par la sonde, un spectre EDX est obtenu. C'est systématiquement le cas dans cette étude. L'ensemble des spectres sont traités à l'aide du logiciel Velox®.

➤ Détecteur EDX dans le FIB/MEB 550L

Le FIB/MEB de l'IMN est équipé d'un détecteur Ultim Max (Oxford ®) couplé au logiciel AZtecLive®. Le détecteur peut être inséré et rétracté lorsque l'utilisateur le souhaite, en positions MEB ou FIB (incliné à 54°). Cette configuration avec un seul détecteur permet de s'approcher au plus près de l'échantillon. Cependant, cela implique aussi un angle mort de détection dans les reliefs de l'échantillon ou les cross sections (voir figure 2.27).

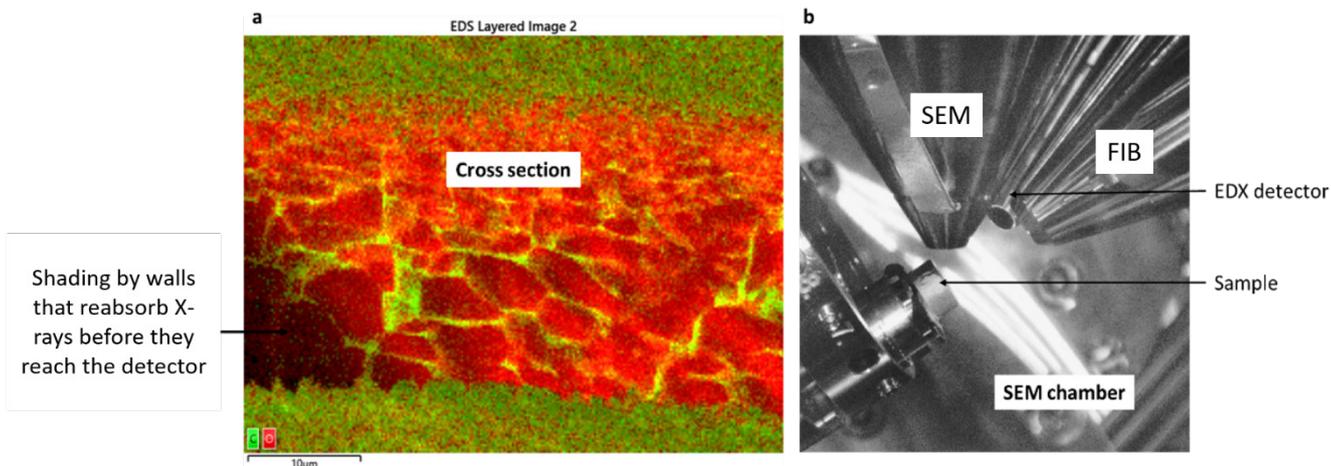


Figure 2.27 : (a) Cartographie EDX d'une cross section, la zone sombre correspond à l'angle mort de détection du détecteur. (b) Positionnement du détecteur EDX dans la chambre MEB à un angle fixe.

➤ Acquisition et traitement des données

Concernant le MET (en mode STEM), un faisceau de 300 keV d'énergie est utilisé, avec des courants entre 60 et 100 pA. L'acquisition de cartes EDX est produite pour une taille d'image entre 256x256 et 1026x1026 pixels, avec un dwell time (temps passé par pixel) entre 1 et 100 µs (entre 70 et 250 passages). Le dwell-time doit être réduit au minimum pour limiter les dommages sur la membrane (en tenant compte des autres paramètres). La taille de pixel choisie varie entre 2 et 50 nm dans ces travaux. Il est à noter que l'utilisateur adapte les paramètres pour chaque expérimentation, selon la nature et la taille de la zone à analyser.

Pour le MEB, un faisceau avec une énergie entre 10 et 15 keV est utilisé. Pour être dans les meilleures conditions, la règle impose une énergie du faisceau incident au moins 2,7 fois supérieure à l'énergie de la première raie d'excitation de l'élément recherché¹⁹². Par exemple, pour le soufre (S) la première raie d'excitation (α) a une énergie de 2.3 keV. Pour le détecter, le faisceau d'électrons incident doit avoir une énergie d'au moins 6,2 keV soit 7 keV. Des cartographies entre 512x512 et 2048x2048 pixels ont été réalisées avec des courants de faisceau entre 200 et 900 pA, un dwell time de $\approx 1\mu\text{s}$ et pendant 20 minutes environ.

Pour les deux types de microscopie, toute acquisition de spectre ou de carte EDX s'accompagne par un traitement des données. En effet, il est nécessaire de retirer le bruit de fond des spectres et d'identifier les signaux les plus fins. Enfin, des transformations peuvent être appliquées telles que la normalisation ou le binning (rassemblement de plusieurs petits pixels en un seul grand pixel). Cela entraîne une perte de résolution spatiale, mais aussi une

augmentation du signal spectrale et en conséquence, une différenciation plus nette des éléments. Dans cette étude, l'EDX est principalement utilisée pour identifier ou confirmer la présence ou non d'un élément. Cependant, dans le chapitre 4, l'EDX est utilisé pour faire une semi-quantification du carbone présent dans une membrane colmatée en fonction de la profondeur (plus de détail dans le chapitre 4).

2.3.5 Défis et développements méthodologiques

La ME à température ambiante a été réalisée sur des membranes propres et sèches pour caractériser le milieu poreux avant colmatage, en particulier la couche sélective des membranes. Comme expliqué dans le chapitre 1, les membranes de filtration polymères poreuses PAN et PES sont des échantillons sensibles et difficiles à caractériser en ME. Ceci explique le faible nombre de publications à ce sujet. Le premier objectif de cette thèse a été de mettre au point des protocoles et des techniques adaptés, indispensables pour permettre la caractérisation par ME de ces échantillons. Plusieurs défis ont été relevés pendant cette étude. La section suivante décrira l'optimisation de la dose (pour limiter les dommages causés par les faisceaux d'électrons et d'ions sur la membrane pendant l'acquisition) et la méthodologie de préparation d'échantillon pour protéger la membrane des faisceaux, et ses conséquences (par exemple l'impact du dépôt de Pt sur l'état de la couche sélective de la membrane) et enfin l'évaluation de l'impact du shine-through artefact sur la reconstruction 3D des volumes de membranes (déformations et allongement des pores).

2.3.5.1 Sensibilité de la membrane polymère aux faisceaux d'ions et d'électrons :

La sensibilité des membranes aux faisceaux d'ions et d'électrons a été un des premiers défis à relever dans cette étude. En effet, en l'absence d'optimisation, la membrane subit des dommages importants, elle se déforme, se place ou subit une perte de masse importante sous le faisceau (voir en figure 2.28). Pour le faisceau d'électrons, des doses mesurées reçues par l'échantillon, aussi appelées la fluence, peuvent être fournies et associées avec les dommages de la membrane. Dans cette section, la définition de cette mesure sera donnée, ainsi que l'approche méthodologique pour limiter la dose et optimiser les paramètres des faisceaux d'électrons et d'ions. Du fait que ces difficultés ont principalement été rencontrées au FIB/MEB à température ambiante, la méthodologie sera décrite seulement pour cet appareil et sous ces conditions.

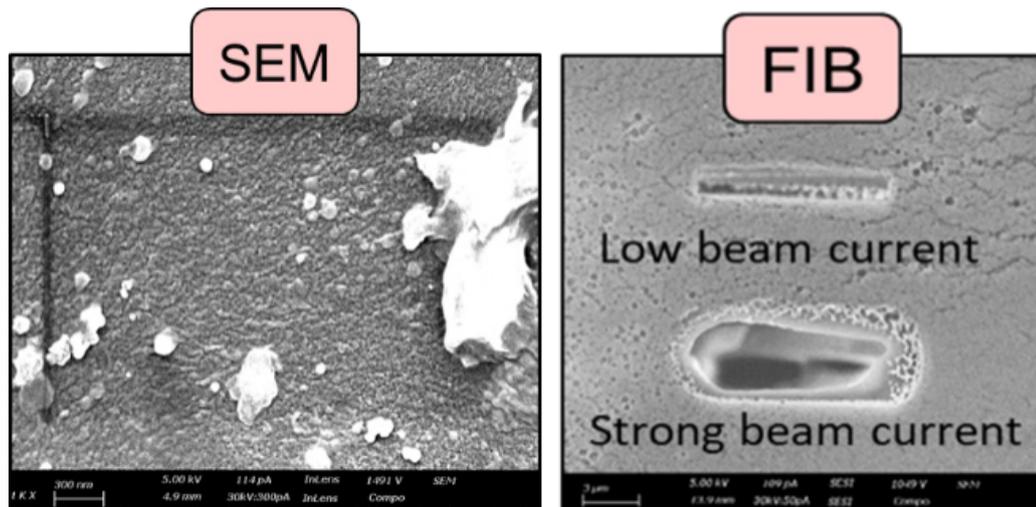


Figure 2.28 : Impact des faisceaux d'électrons (à gauche) et d'ions (à droite) sur la surface d'une membrane de filtration polymère.

➤ Le faisceau d'électrons : optimisation des paramètres et calcul de la dose ou fluence électronique

En microscopie électronique, la dose d'électrons pour laquelle une perte spécifique de données est subie, en raison des dommages causés par le faisceau, peut être rapportée pour garantir la reproductibilité des futures expériences (en maintenant les valeurs de dose en dessous de ces valeurs rapportées). Pour cela, le nombre d'électrons primaires nécessaires pour produire des dommages observables sur l'échantillon (taches, déformations... etc.) est estimé par unité de surface (en e^-/nm^2). Bien que la plupart des manuscrits appellent cette quantité "dose électronique", le terme technique est "fluence électronique". Pour le mode d'imagerie MEB, le calcul de la fluence électronique (d , en e^-/nm^2) utilise les paramètres du faisceau tels que le courant du faisceau, le temps par pixel (dwell time) et le grandissement (en rapport avec la taille des pixels) selon la formule¹⁹³ :

$$(Eq 4) \quad d = \frac{i \cdot t}{eA}$$

Où i , est le courant du faisceau (A), t , est le dwell time (s), A , est l'aire de la surface irradiée, que nous estimons être la taille de pixel (nm^2) et e , est la charge élémentaire (C). Dans de nombreux cas, A est également donné comme la taille de la sonde (quelques nm de diamètre dans ce travail) au lieu de la taille du pixel.

Pour évaluer et anticiper les dommages sur la membrane, de nombreux tests ont été effectués sur les membranes en faisant varier les paramètres de la fluence électronique. Ces tests ont conduit à un compromis entre la qualité de l'image et les dommages observés. La figure 2.29 montre les tests effectués pour mesurer l'impact du courant du faisceau sur une membrane PES. Ces tests ont été répétés avec les autres paramètres, jusqu'à leur optimisation. Les paramètres utilisés lors de cette thèse (après optimisation), ainsi que la dose ou fluence électronique correspondante, sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 2.3 : Les paramètres optimisés du faisceau d'électrons et le calcul de la fluence électronique pour les membranes de filtration polymères (imagerie MEB)

Calcul de la fluence électronique pour les membranes de filtration polymères (imagerie MEB)				
	PAN vide	PAN enrésinée	PES vide	PES enrésinée
Taille de pixel	5 nm	5 nm	10 nm	10 nm
Champ de vision	98,4 μm^2	13,2 μm^2	17,9 μm^2	17,9 μm^2
Taille de l'image	1984 x 1984 pixels	2624 x 2624 pixels	1792 x 1792 pixels	2240 x 2240 pixels
Dwell time	4 μs	8 μs	9,8 μs	10 μs
Courant du faisceau	200 pA	1000 pA	200 pA	600 pA
Fluence calculée	2 e-/Å ² (à 2 keV)	20 e-/Å ² (à 2 keV)	1,2 e-/Å ² . (2 keV)	3,7 e-/Å ² . (5 keV)

La fluence électronique a été calculée pour chaque type d'échantillon (membrane PAN ou PES, enrésinée ou non), en utilisant la taille du pixel pour estimer la zone irradiée comme indiqué ci-dessus. Les valeurs obtenues sont comparées aux fluences électroniques critiques, rapportées par Egerton et al¹⁹⁴, pour éviter les dommages sur les polymères correspondants. Il convient de noter que les fluences électroniques obtenues pour les quatre conditions du tableau 1 sont en dessous de ces seuils critiques. Nous notons également que pour les deux membranes, la fluence électronique requise pour imager les échantillons propres est inférieure à la fluence électronique requise pour imager les échantillons enrésinés. Cette observation pourrait être due à la perte de contraste des échantillons enrésinés, où une résine (un autre polymère) a été utilisée pour remplir les pores des membranes (des paramètres d'imagerie plus élevés sont alors nécessaires pour augmenter la qualité de l'image et son contraste, ce qui favorise la différenciation des pores et du polymère ; les images sont dans le chapitre 3). Enfin, la fluence électronique requise pour acquérir nos données en 3D FIB/MEB était plus élevée pour les membranes PAN que pour les membranes PES. Ceci est très probablement dû à la différence

de résolution entre les deux membranes (5nm de résolution pour la PAN et 10nm pour la PES, voir l'équation 1).

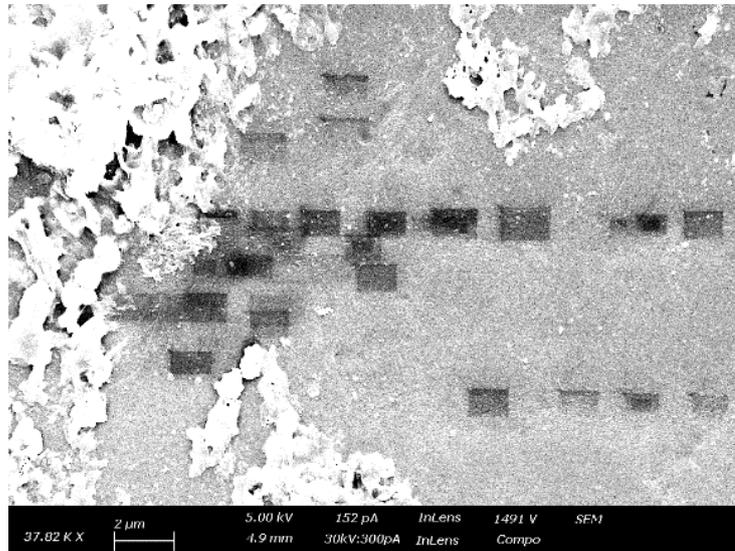


Figure 2.29 : test de différents courants du faisceau d'électrons avec le même grandissement (taille de pixel) et les mêmes temps d'exposition sur la membranes PES.

➤ Le faisceau d'ions : optimisation des paramètres

Comme expliqué précédemment, les polymères sont bien connus pour leur sensibilité, particulièrement lors de leur fraisage avec un faisceau d'ions. Une grande partie de ce travail a donc été consacrée à la recherche et à l'optimisation des principaux paramètres du faisceau d'ions, à savoir, comme pour le faisceau d'électrons, l'énergie, le courant et le dwell time. À titre d'exemple, la procédure définie pour optimiser le courant du faisceau d'ions est présentée dans cette section.

La procédure expérimentale pour trouver et optimiser les paramètres, ici le courant du faisceau, est présentée pour un dépôt de Pt (une couche de 500 nm d'épaisseur) (figure 2.30a) et pour le fraisage d'une cross section (profondeur de 500 nm) (figure 2.30b). Les images MEB sont obtenues après dépôt de platine ou fraisage d'une cross section avec des courants trop faibles (i), bons (ii) et trop élevés (iii). Les valeurs de courant sont choisies en fonction de l'appareil et de la taille de la zone traitée. Le dépôt et la cross section dans la membrane sont schématisés par des diagrammes dans le plan YZ. Les valeurs optimales de densité de courant ($\approx 2-6 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$) donnent un dépôt de platine homogène et épais. Des valeurs de densité de courant trop faibles ($\leq 2 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$) et trop élevées ($\geq 6 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$) produisent un trou dans le matériau au lieu d'un dépôt. Pour le fraisage, un courant optimal de 700 pA produit une cross section homogène en profondeur, avec des bords droits et sans dommage pour la membrane.

Des valeurs de courant trop faibles (300 pA) et trop élevées (1,5 nA) produisent un fraisage inhomogène.

Il convient de noter que d'autres paramètres, par exemple l'énergie du faisceau ou le dwell time, ont été également testés, adaptés et combinés. Le tout en fonction de la sensibilité de la membrane et, dans certains cas, en fonction du temps d'acquisition.

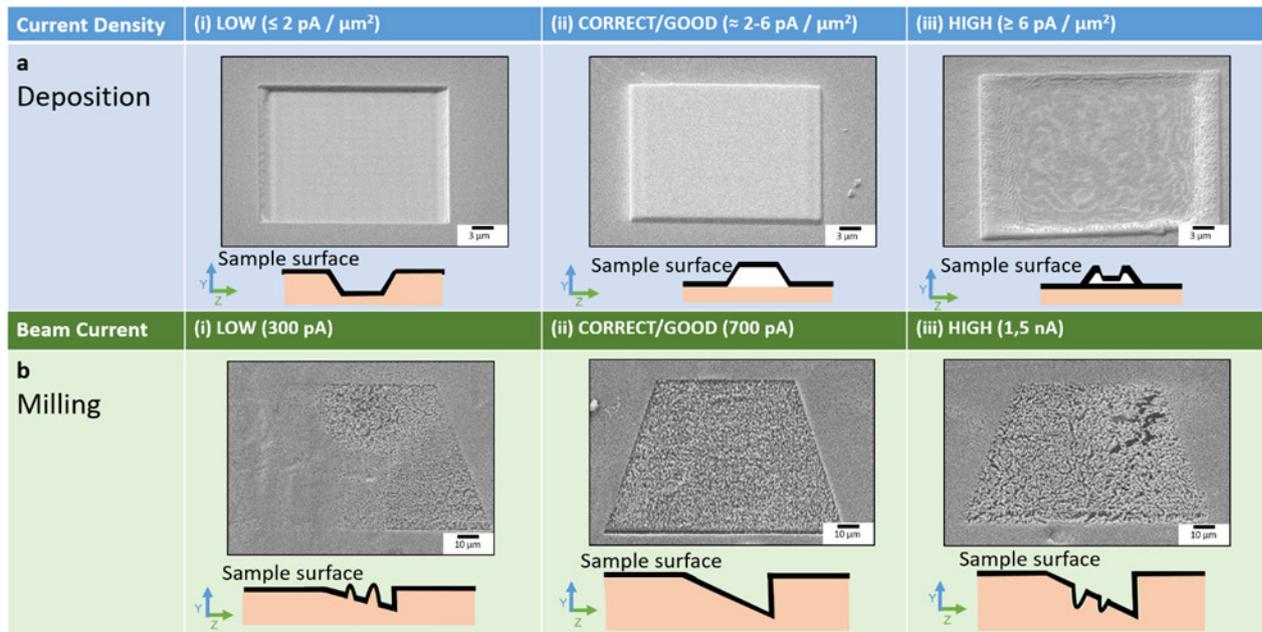


Figure 2.30 Observations empiriques pour obtenir (a) un dépôt correct de platine et (b) une cross section homogène sans dommage, en faisant varier les valeurs du courant du faisceau d'ions (pA). Les images sont obtenues par MEB après fraisage ou dépôt de platine, avec des courants trop faibles (i), optimaux (ii) et trop élevés (iii). Des schémas des dépôts ou des cross sections obtenus sur les membranes sont présentés dans le plan YZ.

2.3.5.2 Impact du dépôt de platine sur la surface des membranes

➤ Principe

Lors de la préparation de la membrane pour faire une acquisition 3D FIB/MEB, un dépôt de platine est effectué pour protéger le matériau (voir section 2.3.2). Même à faible courant, le faisceau d'ions Ga^+ peut éroder la surface du matériau pendant le dépôt de Pt. C'est pourquoi le dépôt de Pt par le faisceau d'électrons est essentiel avant de procéder au dépôt ionique. Cependant, le rendement très faible de cette technique ne permet pas de déposer des épaisseurs de platine importantes dans des délais raisonnables. De plus, les membranes de filtration polymères PAN et PES possèdent à leur surface la partie de l'échantillon la plus importante : la couche sélective. En effet, comme expliqué dans le chapitre 1, les performances de la

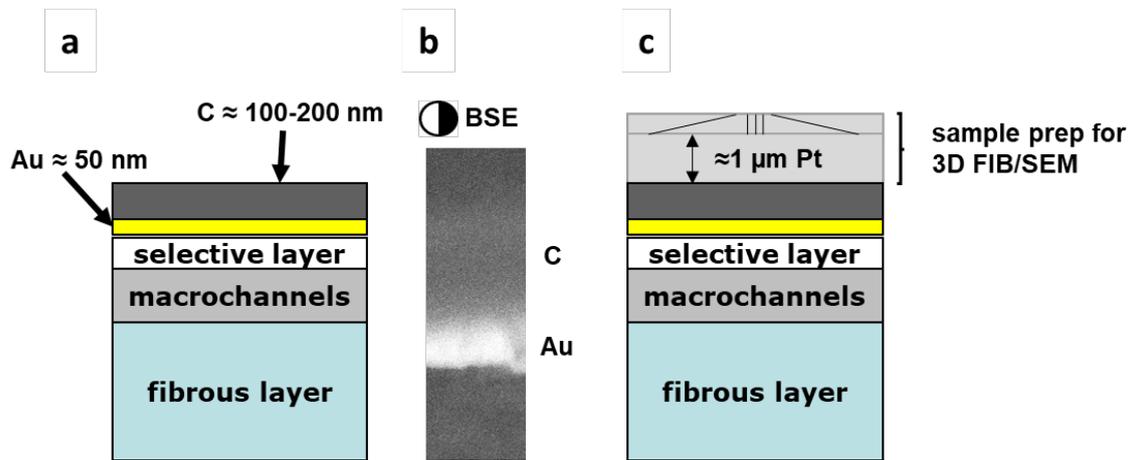


Figure 2.31 : Le protocole mis en place pour évaluer l'impact de la préparation des membrane pour le 3D FIB/MEB (dépôts de platine). (a) Une couche d'or est déposée par plasma, suivie d'une couche de carbone à la surface de la membrane. (b) Contraste de la membrane, de l'or et du carbone en BSE (c) La couche de carbone est recouverte par un dépôt de platine (préparation 3D FIB/SEM).

membrane (sélectivité et perméabilité) dépendent de cette couche. Par conséquent, les premiers pores de cette couche et donc de la membrane doivent être impérativement protégés. Lors de ces travaux de thèse, il a rapidement été question de mesurer l'impact de la préparation des échantillons au 3D FIB/MEB (dépôts de platine) sur la couche sélective de la membrane. Cette section décrit la méthode mise en place pour évaluer un tel impact.

➤ Méthode mise en place pour évaluer l'impact de la préparation des échantillons au 3D FIB/MEB (dépôts de platine) sur la surface des membranes polymères

La stratégie mise en place pour évaluer l'impact de la préparation des échantillons pour le 3D FIB/MEB a été de produire un repère stable et visible sur la surface de la membrane, en amont de la préparation. Pour cela, nous avons métallisé au platine la membrane comme lors de la préparation classique d'un échantillon afin pour la rendre conductrice (quelques nanomètres d'épaisseur). Puis, nous avons décidé de pulvériser une fine couche d'or (≈ 50 nm) à la surface de la membrane par plasma (voir figure 2.31). Puis, de recouvrir l'or d'une couche un peu plus épaisse de carbone ($\approx 100-200$ nm) (par sublimation d'un filament de carbone chauffé). Cette technique permet de déposer l'or avec une interaction minimale avec la membrane. De plus, il est très visible avec le détecteur à électrons BSE en MEB. La couche de carbone permet de renforcer ce contraste puisque l'or apparaît clair et le carbone sombre à la surface de la membrane (voir figure 2.31b). Enfin, la préparation habituelle d'un échantillon pour le 3D FIB/MEB, avec dépôt électronique et ionique de platine, a été effectuée dans le MEB sur ces membranes métallisées (voir figure 2.31c).

Les membranes PAN et PES ont été observées en MEB, après fraisage d'une cross section, d'une part pour contrôler le dépôt de l'or (témoin) (voir figure 2.32a) et d'autre part observer l'impact de la préparation 3D FIB/MEB sur les couches de carbone/or (voir figure 2.32b). D'après ces observations, aucun impact visible n'est observé sur la surface de la membrane d'une part, après le dépôt des couches d'or et de carbone et d'autre part, après la préparation de l'échantillon pour un volume 3D (dépôt de platine, marques, etc.) Ainsi, il a été constaté que les dépôts de platine n'endommageaient pas les surfaces de carbone/or. Nous en avons déduit qu'il en était de même pour les membranes de filtration. Il est à noter que ce résultat a été observé pour les deux types de membranes (montré sur la figure 2.32 pour la PES et non montré pour la PAN).

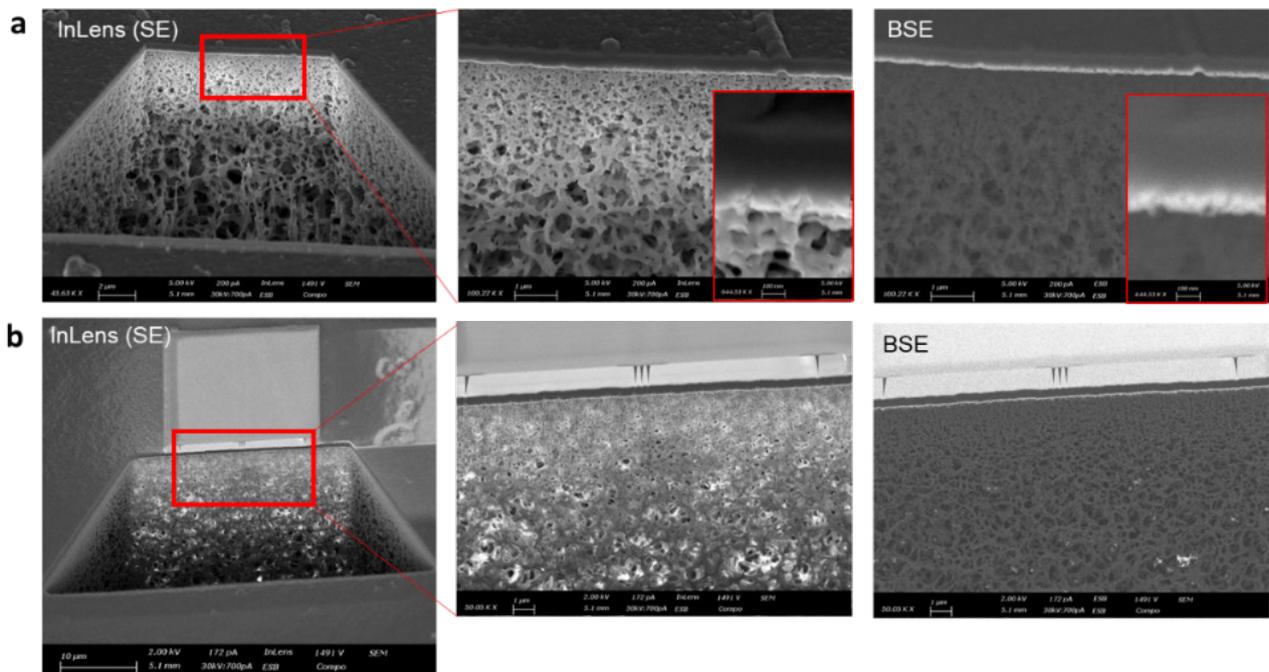


Figure 2.32 : Observation de l'impact sur la surface de la membrane PES de la préparation pour le 3D/FIB/MEB. (a) Cross section de la membrane après dépôt d'une couche d'or et d'une couche de carbone, les détecteurs InLens et BSE sont utilisés. (b) Cross section après les dépôts de platine et observation de l'impact de ces dépôts sur les couches de carbone et d'or.

2.3.5.3 Le « Shine through » artéfact, un artéfact connu pour l'imagerie 3D des matériaux poreux

➤ Principe

Comme expliqué dans le chapitre 1, le « Shine through » est un artéfact connu dans la littérature pour l'imagerie des matériaux poreux en 3D. Il se manifeste par l'allongement des

pores dans la direction de fraisage Z. Dès l'obtention des premiers volumes de membrane propres au 3D FIB/MEB, il a été question de trouver le moyen d'évaluer l'impact de cet artéfact sur la reconstruction 3D, et donc la quantification des pores dans les membranes de filtration. Afin d'évaluer l'effet de cet artéfact, des volumes de 3D FIB/MEB de membranes enrésinées, où les pores sont remplis de résine (ne devraient pas être impactés par l'artéfact) et des membranes propres et sans résine (devraient subir les effets de l'artéfact) ont été analysées pour les deux types de membranes (PAN et PES). La taille des pores et la porosité dans les plans frontaux (XY) et transversaux (YZ), ont été calculées et comparées pour les membranes propres et enrésinées. Autrement dit, avec l'effet de l'allongement des pores ou non. La section suivante décrit les résultats obtenus.

➤ Évaluation de l'impact du Shine through artéfact et choix de la méthode de quantification

La figure 2.33 présente les plans XY et YZ des volumes reconstruits en 3D pour une membrane de filtration PES vide (Fig. 33a) et enrésinée (Fig. 33b). Les images ont été acquises en utilisant simultanément les détecteurs SE (Inlens) et SESI (électrons secondaires, ions secondaires). Dans la figure 2.33a, le plan YZ reconstruit montre l'allongement des pores (indiqué par des flèches rouges) dans la direction Z ce qui est caractéristique du shine-through. Dans le cas de la membrane enrésinée (Figure 2.33b), l'élongation n'est plus présente dans le plan YZ. Cependant, le contraste de l'image est clairement diminué. Ceci était attendu puisque les membranes et la résine sont toutes les deux constituées de matériaux à base de polymères. La perte de contraste entraîne une segmentation plus difficile, ce phénomène est encore plus prononcé avec les membranes PAN (montrées dans le chapitre 3).

Comme l'artéfact se produit le long de la direction Z (direction du fraisage), on s'attend à un allongement des pores, avec potentiellement une augmentation de leur taille et de la porosité le long de l'axe YZ dans les volumes de membranes vides. La procédure de quantification choisie peut fortement influencer la mesure des différents paramètres structuraux de la membrane. C'est pourquoi deux techniques de quantification pour mesurer la taille des pores ont été utilisées (voir figure 2.33c). Après segmentation, la taille des pores est mesurée par la méthode de l'épaisseur locale (local thickness, LT) (utilisant les cercles les plus grands possibles pouvant être contenus dans l'objet étudié), cette méthode est l'équivalent 2D de la quantification 3D présentée ci-dessus (voir section 2.3.2 de cette partie). Mais aussi, en utilisant la technique la plus couramment utilisée pour quantifier la taille des pores en 2D, c'est-à-dire

par des mesures du diamètre de Feret¹⁰⁶. Les valeurs de porosité pour les deux plans sont également indiquées (obtenues avec la segmentation).

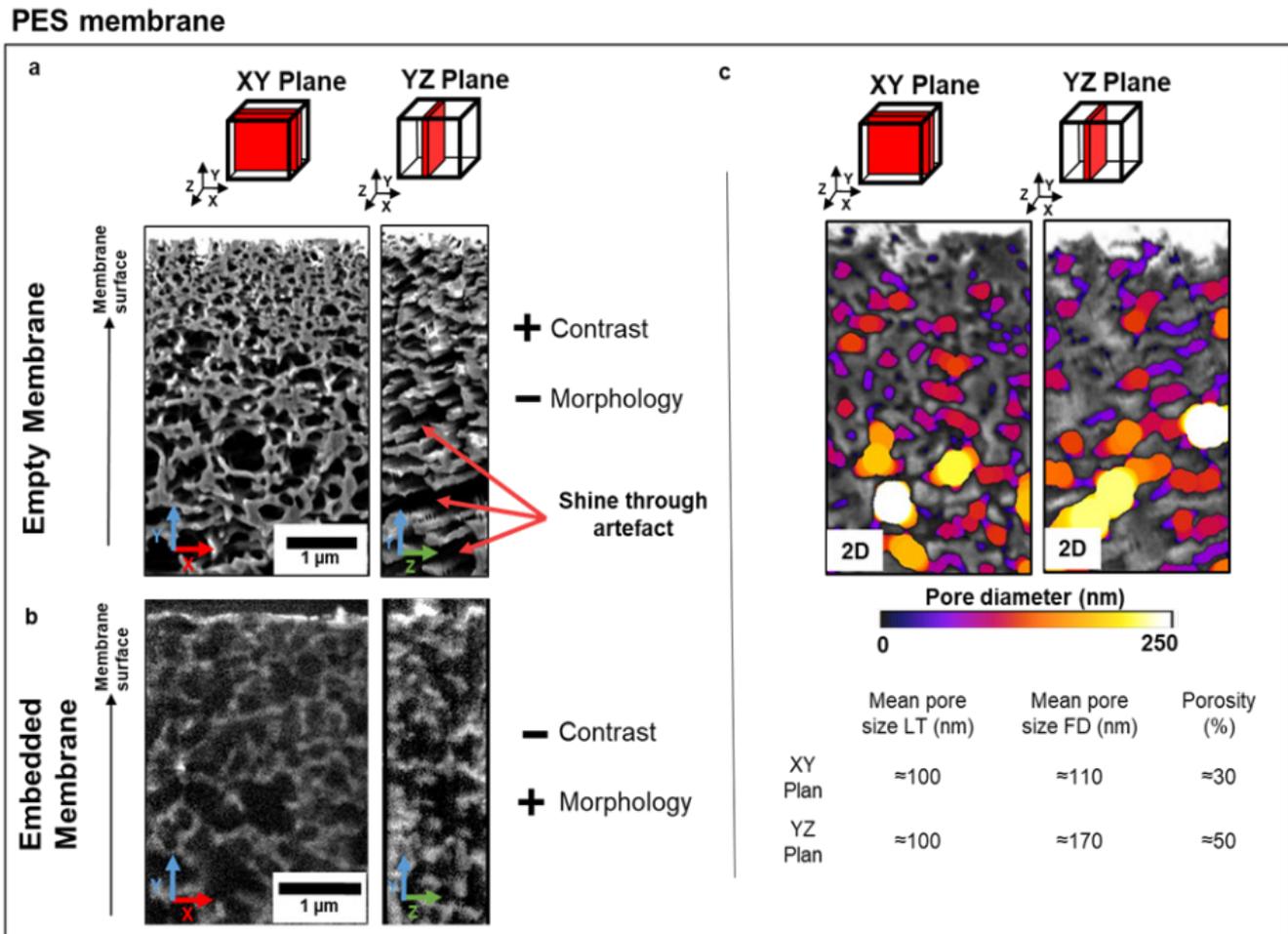


Figure 2.33 : Illustration et impact de l'artéfact "shine through" dans la membrane polymère PES vide et enrésinée. a) La membrane vide présente un bon contraste mais aussi des problèmes de morphologie dus à l'allongement des pores dans la direction Z (indiqué par les flèches rouges). b) La membrane intégrée présente un contraste plus faible mais une morphologie plus proche de la réalité. c) Quantifications des pores en 2D (zones colorées) pour les plans XY et YZ de la membrane PES vide (par local thickness avec des cercles en 2D). Le tableau indique la taille moyenne des pores, par mesure de l'épaisseur locale (LT) et du diamètre moyen de Feret (FD). La porosité est extraite de la segmentation 2D sur les deux plans. Figure extraite de Roberge et al, Journal of membrane science, 2022.

Les mesures avec le diamètre de Feret conduisent à une surestimation de la taille des pores dans le plan YZ par rapport au plan XY. Tandis que les mesures avec l'épaisseur locale ont donné des valeurs similaires entre les deux plans XY et YZ. Par conséquent, en utilisant la technique de local thickness pour la quantification de la taille moyenne des pores, un impact mineur de l'artéfact de shine-through est démontré. Ce résultat confirme le choix de cette technique pour l'analyse des données 3D FIB/MEB. Ces résultats ont été confirmés pour la membrane PAN propre (non montré).

En revanche, l'artéfact conduit à une surestimation de la porosité (voir figure 2.33c). Cette augmentation est cependant constante pour une taille de pores (plus les pores sont grands, plus la porosité est grande) ; la taille des pores augmente de façon continue avec la profondeur dans les matériaux étudiés. Ainsi, si une modification de la structure conduit à une augmentation discontinue de la porosité, sa mise en évidence restera possible même en présence de l'artéfact de shine through.

2.4 Partie 3 : La cryo-microscopie électronique

2.4.1 Principe général

La cryo-microscopie électronique (cryo-ME) a été développée dans les années 80 pour la caractérisation des échantillons biologiques ou particulièrement sensibles aux techniques de préparation classique à la ME. En bref, il s'agit de réaliser des analyses de microscopie électronique à des températures cryogéniques. Les cryotechniques dans la cryo-ME englobent la préparation ou cryofixation de l'échantillon, son stockage, son transfert dans le microscope et son observation, le tout en maintenant des températures basses (inférieur à -140°C , pour maintenir la condition vitreuse de l'eau contenue dans l'échantillon). Cette technique est de plus en plus employée dans la caractérisation des matériaux. Dans cette étude, la mise au point, l'usage et l'optimisation des cryotechniques se sont révélés être essentiels pour la caractérisation du colmatage des membranes en ME. En effet, le colmatage par des composés organiques tels que les protéines ou les lipides est très sensible au faisceau d'électrons et aux processus de déshydratation. Cependant, comme expliqué précédemment, ces techniques sont difficiles à mettre en œuvre et présentent souvent un véritable défi. Ceci explique, au moins en partie, le peu de publications à ce sujet. Pendant cette thèse, les cryotechniques ont dû être initiées au sein de notre laboratoire (système cryo arrivé fin 2019) et des protocoles adaptés pour les membranes de filtration colmatées ont été développés.

Dans cette partie, les techniques de cryofixation utilisées dans cette étude seront décrites, ainsi que la mise au point de protocoles adaptés et les défis relevés permettant in fine, la caractérisation des membranes de filtration PES et PAN colmatées de biomolécules (lipides et protéines issues de mélanges modèles).

2.4.2 La cryofixation

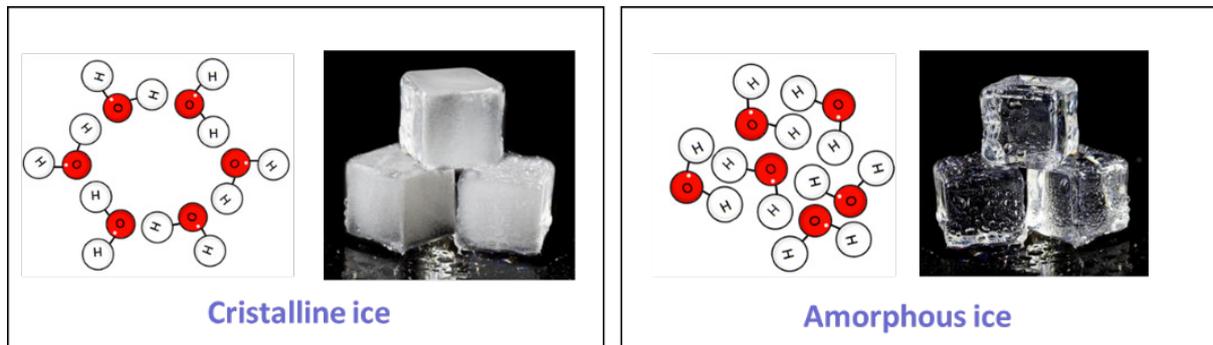


Figure 2.34 : Différences entre la glace cristalline (à gauche) et la glace vitreuse (à droite) d'un point de vue moléculaire et d'un point de vue imagé.

Comme expliqué précédemment, la cryofixation permet de s'affranchir des effets de la déshydratation et d'observer les échantillons au plus près de leur état hydraté à température ambiante. Dans des conditions classiques de congélation (congélation lente), l'eau forme des cristaux dont le volume est supérieur au volume de l'eau à l'état liquide. Cela peut provoquer, par exemple, une forte déformation des objets. Elle produit également une forte diffusion des électrons incidents pendant l'observation, ce qui introduit des artefacts d'imagerie supplémentaires (drift, charge...). Pour éviter la déformation des objets due à la formation de cristaux, il est nécessaire de vitrifier l'échantillon. Dans ce cas, l'eau reste à l'état amorphe tout en étant solide (voir figure 2.34). Les conditions nécessaires pour vitrifier l'eau sont indiquées dans la figure 1.25 du chapitre 1. Dans cette étude, pour la caractérisation des membranes colmatées et des biomolécules, les techniques de freezing, cryo-plunge et HPF ont été utilisées pour cryofixer les membranes. Cette section décrira les modalités et les protocoles utilisés à cet effet.

2.4.2.1 Cryofixation des biomolécules par cryo-plunge

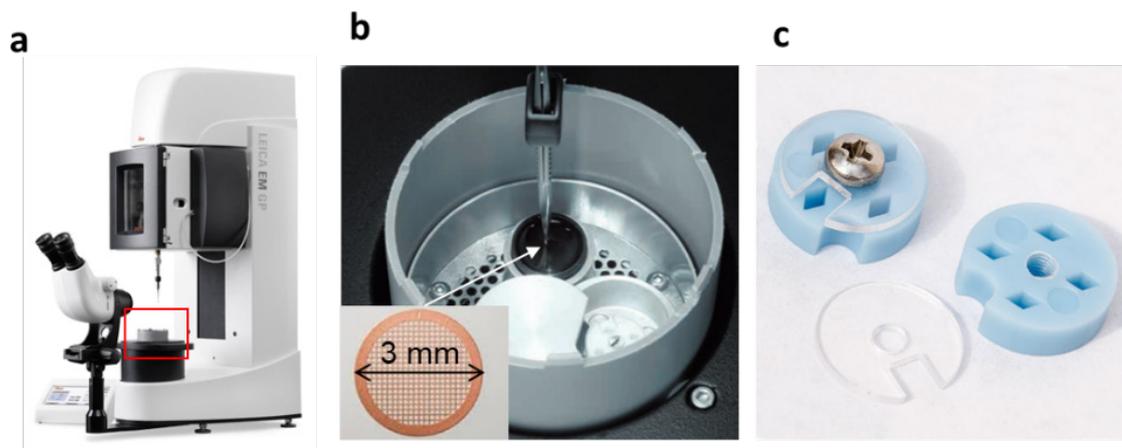


Figure 2.35 : Cryofixation des biomolécules en suspension par cryo-plunge. (a) Le modèle de l'appareil utilisé dans cette étude. (b) Zoom sur le réservoir d'éthane liquide (carré rouge, de la photo (a)), la grille, placée au bout de la pince est plongée à l'intérieur. (c) Boîtes de conservation et transport des grilles MET après leur cryofixation.

Dans cette étude, la congélation par cryo-plunge est utilisée pour la cryofixation des biomolécules en suspension, dans le but de les observer au cryo-MET (voir figure 2.35). Pour cela, l'appareil EMGP2 (Leica) de la plateforme BIBS (Bioresources : Imaging, Biochemistry, and Structure) du laboratoire INRAE (site de Nantes) a été utilisé. En amont, les grilles (quantifoil, R1.2/1.3) sont passées au plasma cleaner, de la même manière que lors de la préparation des biomolécules pour leur observation en MET (expliqué un peu plus haut dans la partie 2). Ensuite, une goutte (1 μL) de solution est placée sur la grille. Cette dernière est elle-même tenue par la pince du cryo-plunge, dans une enceinte contrôlée en humidité et en température. La goutte de solution est absorbée partiellement par un coton (2.5 s), laissant une mince épaisseur de liquide sur la grille (c'est l'étape de « blotting »). Elle est plongée dans de l'éthane liquide, puis elle est placée dans un réservoir d'azote liquide pour la conserver à température très basse (voir figure 2.35b). À partir de ce moment, la grille doit rester en permanence au froid (minimum $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dans le cas contraire, la formation de cristaux rendra l'observation impossible. Enfin, les échantillons sont transférés dans des boîtes adaptées (voir figure 2.35c), placées elles-mêmes dans des boîtes de stockage spécifique contenant de l'azote liquide appelées « puck » (plus de détail en section iv). Elles peuvent être conservées de cette façon jusqu'à leur observation au Nant'Themis.

2.4.2.2 Cryofixation des biomolécules et des membranes par freezing

Dans ces travaux, cette technique est utilisée pour la congélation des membranes propres et colmatées, mais aussi des biomolécules en solution. Les échantillons sont ensuite observés

au cryo-FIB/MEB. Généralement, les échantillons sont congelés et observés immédiatement après.

Pour les biomolécules, quelles que soient les solutions (lipides, protéine ou mélange des deux), la solution a été cryofixée par freezing en utilisant la méthode de fracture avec un rivet de laiton. Pour cela, une goutte de solution (quelques microlitres), préalablement homogénéisée (par vortex par exemple), est placée sur un support (plot) de cryo-MEB adapté, puis le rivet (voir figure 2.36a) est placé sur la goutte de manière à former un ménisque (aplatissement de la goutte en couche fine). Le tout est plongé dans l'azote pâteux. Lorsque l'échantillon est stable sous l'azote (plus de formation de bulle de gaz), le plot peut être placé dans le portoir de cryo-EM et fixé avec un tournevis adapté (le portoir doit être préalablement placé dans le réservoir à azote). Il est à noter que tous les instruments utilisés dans l'azote doivent être séchés avant d'être utilisés (pour enlever toutes les traces d'eau et éviter la formation de cristaux) et éviter d'être sortis et rentrés plusieurs fois de l'azote. L'échantillon est transféré dans un sas sous vide au bout d'une canne de transfert (voir section suivante) puis dans le sas pressurisé du microscope.

Toutes ces étapes se déroulent en conservant la température en dessous de -140°C ce qui permet de conserver l'état vitrifié. Enfin, dans le sas, le rivet peut être retiré avec le couteau ou la lame de rasoir présent à l'intérieur du sas (voir figure 2.36b). Cette technique permet d'obtenir la vitrification de la solution sur les bords du rivet (conduction importante et épaisseur fine de l'échantillon sur les bords). Pour avoir une meilleure visualisation des biomolécules, la glace de surface peut être sublimée dans le sas (1 min et 30 sec à -105°C , plus de détails dans la section suivante). Enfin, l'échantillon est métallisé dans le sas avec du Pt (quelques nanomètres pour le rendre conducteur), avant d'être transféré sur la platine cryo dans le FIB/MEB.

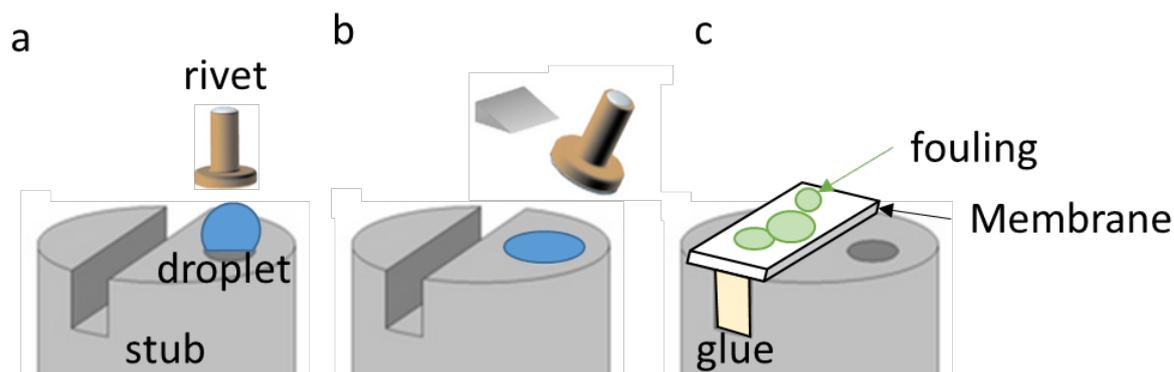


Figure 2.36 : Préparation des échantillon pour la cryo-fixation par freezing dans l'azote pâteux. (a) une goutte de solution est écrasée par un rivet pour obtenir un ménisque plat. (b) après la cryofixation, le rivet est retiré à l'aide d'un couteau dans le sas du microscope. (c) préparation d'une membrane colmatée pour la cryofixation.

Pour la membrane colmatée (peu importe la composition du colmatage), elle est coupée et collée sur le plot à l'aide d'une colle adaptée pour l'azote (TissuePlus®, Scigen®). La face colmatée est maintenue vers le haut (voir figure 2.36 c) pour permettre son observation. Il est nécessaire de retirer une partie de l'eau en surface avec un coton absorbant, pour éviter la formation d'une couche épaisse d'eau au-dessus de la membrane. Cette étape est nécessaire, d'une part car la vitrification par freezing ne fonctionne que sur les premiers micromètres et d'autre part, une couche épaisse d'eau compromettra l'acquisition 3D de la membrane située plus en profondeur (profondeur maximum de 50-60 μm ; au-delà de 20 μm , on a une perte de qualité et des temps de préparation/acquisition plus longs). Enfin, elle est cryofixée dans l'azote pâteux, transférée dans le sas (de la même manière que les biomolécules) et métallisée au Pt avant d'être placée sur la platine cryo à l'intérieur du cryo-FIB/MEB.

2.4.2.3 Cryofixation des biomolécules et des membranes par HPF

Enfin, dans cette étude, les membranes propres et colmatées, ainsi que les solutions de biomolécules ont également été cryofixées par HPF (High Pressure Freezing). Pour cela, nous avons collaboré avec la plateforme de microscopie de Rennes, le MRic (Microscopy Rennes Imaging Center), possédant le modèle d'HPF EM PACT 2 (Leica) (voir figure 2.37a). Les expériences se sont déroulées dans les délais les plus courts possibles pour nous permettre d'avoir des échantillons frais. Sur la même semaine, les échantillons (solutions et membranes colmatées) sont préparés au GEPEA (Saint-Nazaire) et cryofixés à l'HPF (Rennes). Ils sont ensuite stockés dans l'azote liquide jusqu'à leur observation au cryo-FIB/MEB (plus de détail ci-dessous) ou leur préparation pour le MET (QFS).

Pour la cryofixation des biomolécules (quels que soient les mélanges modèles), environ 15 μL de la solution fraîche est placée, après son homogénéisation, dans un support appelé « carrier » (voir figure 2.37c) (Leica Microsystems, ref.16706898). L'échantillon, qu'il soit liquide ou solide, doit être confiné dans ce type de support conducteur en or. Pour permettre la cryofixation, l'échantillon doit avoir la même forme et la même hauteur que le carrier (ici 200 μm de hauteur pour un diamètre de 1,5 mm, voir figure 2.37d). Dans le cas contraire, si l'échantillon dépasse la hauteur des bords (trop épais), il ne sera pas cryofixé correctement (par exemple, il sera éjecté du carrier à cause de la pression). S'il est trop petit, l'espace d'air restant doit être comblé par un liquide cryoprotectant (par exemple du Dextran®). Sinon, l'air mis sous pression pourrait endommager irréversiblement l'échantillon (voir figure 2.37e). Dans le cas des biomolécules, la quantité de liquide est calculée pour correspondre à la hauteur des bords du carrier. Il est ensuite inséré dans l'appareil HPF et est cryofixé à -196°C et 2045 bar par des « tirs » d'azote gazeux. La qualité de la cryofixation est contrôlée avec les courbes de pression et de température qui s'affichent en direct sur l'appareil. À partir de ce moment, les échantillons (moulés dans leurs carriers) doivent être maintenus au froid dans l'azote liquide jusqu'à leur observation au FIB/MEB ou leur préparation pour le MET par QFS (voir section 2.4.4). Ils sont conservés dans les mêmes boîtes et « puck » que pour les échantillons préparés au cryo-plunge (voir ci-dessus).

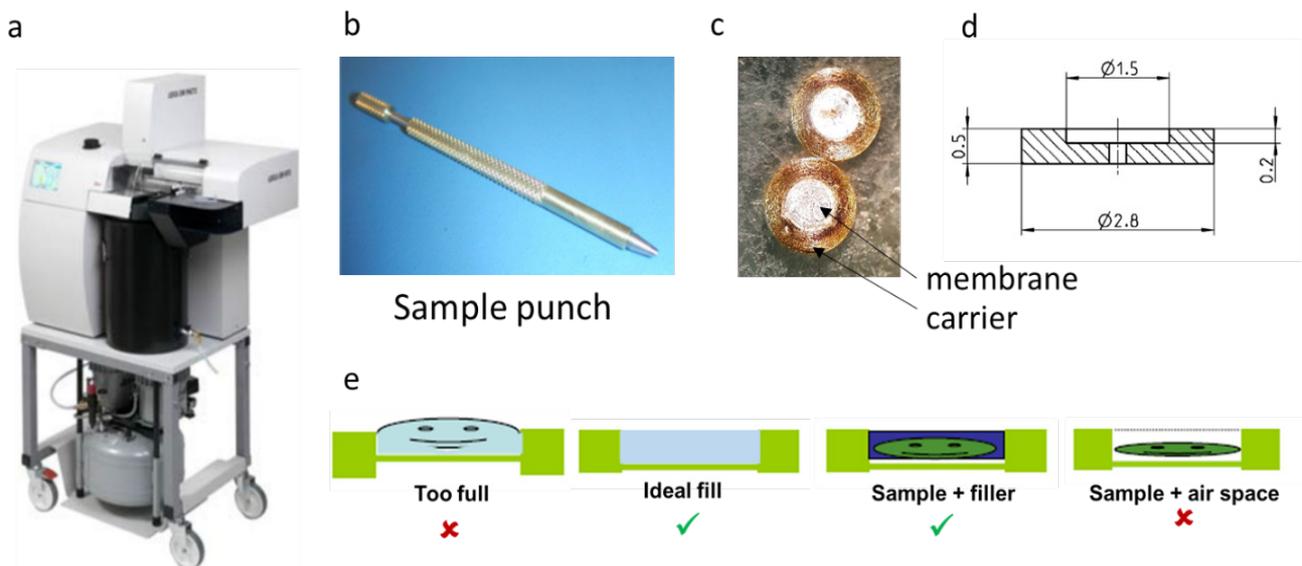


Figure 2.37 : Cryofixation par HPF. (a) Le modèle d'HPF EM PACT2 utilisé dans cette étude. (b) le puncher utilisé pour couper les membranes à la taille des carriers. (c) Carrier avec la membrane découpée. (d) Dimension d'un carrier et (e), modalités de remplissage du carrier pour une cryofixation optimale.

Pour les membranes de filtration colmatées, elles doivent être coupées à la taille du carrier (1,5 mm de diamètre) à l'aide d'un poinçon adapté (puncher 1.5, Leica Microsystems, réf.16706892) (voir figure 2.37b) et placées dans le carrier, la face colmatée vers le haut (voir figure 2.37c). Du fait que les deux types de membranes caractérisées dans cette étude n'ont pas la même épaisseur ($\approx 200 \mu\text{m}$ pour la PES et $\approx 150 \mu\text{m}$ pour la PAN), la PES peut être placée telle quelle dans le carrier (son épaisseur, $200 \mu\text{m}$, correspond à la hauteur des bords du carrier) tandis que la PAN est recouverte de Dextran® (Sigma, réf. 31389) ou d'eau ultrapure jusqu'à hauteur des bords. Ensuite, pour les deux types de membranes, la cryofixation est similaire à celle des biomolécules. Les échantillons sont ensuite transportés et conservés dans l'azote liquide.

2.4.2.4 Transport et stockage des échantillons

Contrairement à la cryofixation par freezing dans l'azote pâteux, où les échantillons sont observés directement après leur préparation, les cryofixations par plonge freezing et HPF dans ce travail sont réalisées à distance (physique et temporelle) de l'observation de l'échantillon au microscope. Il faut donc conserver les échantillons au froid pendant leur transport et leur stockage. Dans cette étude, les grilles et carriers sont conservés dans les boîtes adaptées présentées ci-dessus (Cryo Grid Box, SubAngstrom, réf. GBV01), chaque boîte peut être placée dans un « puck » (Uniquely Colored Puck, SubAngstrom, réf. GSP02), et le tout est conservé dans l'azote liquide, à l'intérieur de réservoirs adaptés (deward) de transport et de stockage (voir figure 2.38). Pour les transferts (deward -> microscope ou microscope -> deward), les boîtes contenant les échantillons et les pucks sont maintenus et manipulés avec des pinces et des gants de protection sous l'azote liquide (le kit Grid Storage Accessory Pack de SubAngstrom (réf. GSAX) a été utilisé dans cette étude). Il est à noter que plus le nombre de transferts augmente, plus il y a de risques de cristalliser l'échantillon. De plus, il est recommandé de ne pas conserver trop longtemps les échantillons dans l'azote liquide.

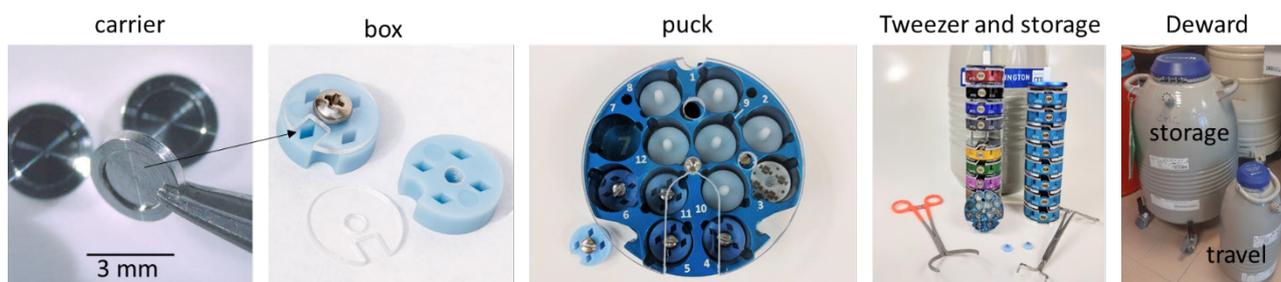


Figure 2.38 : Conditionnement des échantillon cryofixés pour leur voyage et stockage à froid (-196°C).

2.4.3 Cryo FIB/MEB

Lorsque l'échantillon est cryofixé (ici par freezing ou HPF), il est prêt pour être transféré et observé au cryo-FIB/MEB. Dans cette étude, les biomolécules et les membranes (propres et colmatées) ont été caractérisées par cryo-MEB et 3D cryo-FIB/MEB (pour les membranes seulement). Le système cryo utilisé dans cette étude, le transfert de l'échantillon, ainsi que les modalités d'observation et d'acquisition au cryo (FIB) MEB seront présentés dans cette section.

2.4.3.1 Le système cryo Quorum® et la préparation finale de l'échantillon

➤ Le système Quorum®

Tableau 2.4 : Les températures des équipements du système cryo Quorum® utilisés dans cette étude.

	Prep chamber stage	Anticontaminator Prep chamber	CryoSEM stage	Anticontaminator cryoSEM chamber
Temperature	-140°C	-175°C	-140°C	-175°C

Le FIB/MEB de l'IMN est rattaché à un système de préparation cryogénique Quorum® PP3010 refroidi à l'azote sous forme gazeuse dans le but de fonctionner dans des conditions cryogéniques. Le système de cryopréparation comprend une station de travail pour la cryofixation des échantillons et un cryo-sas de transfert pressurisé attaché au microscope. Une photo du système complet, ainsi qu'un schéma simplifié est présenté dans la figure 2.39 (a et c, respectivement). Pour assurer le bon fonctionnement de notre système, des réservoirs à azote liquide de 196 L (production d'azote gazeux, EURO-CYL180/4) et 60 L (deward, Haier) sont remplis en amont et le système de tuyaux est lui-même mis sous vide au moins 4 h avant son utilisation. La platine cryo doit être installée au préalable dans la chambre du MEB (ce qui permet de mettre la chambre sous vide, 10^{-6} Pa environ) (voir figure 2.39b). Puis les tuyaux sont rincés pendant 1 h au débit maximum (5 L/s) avec de l'azote gazeux sous une pression minimum de 2 bar. Enfin, le système peut être refroidi aux températures souhaitées (≈ 30 min) avant de commencer les expérimentations. Un système d'anti-contaminateurs est placé au-dessus des platines du cryo-sas et de la chambre MEB. Refroidir l'anti-contaminateur à une température plus basse que la platine cryo permet d'absorber les particules gazeuses en surplus et de purifier l'environnement (empêche la condensation des particules et des substances

volatiles sur l'échantillon). Toutes les températures de travail des équipements du système cryo sont présentées dans le tableau 2.

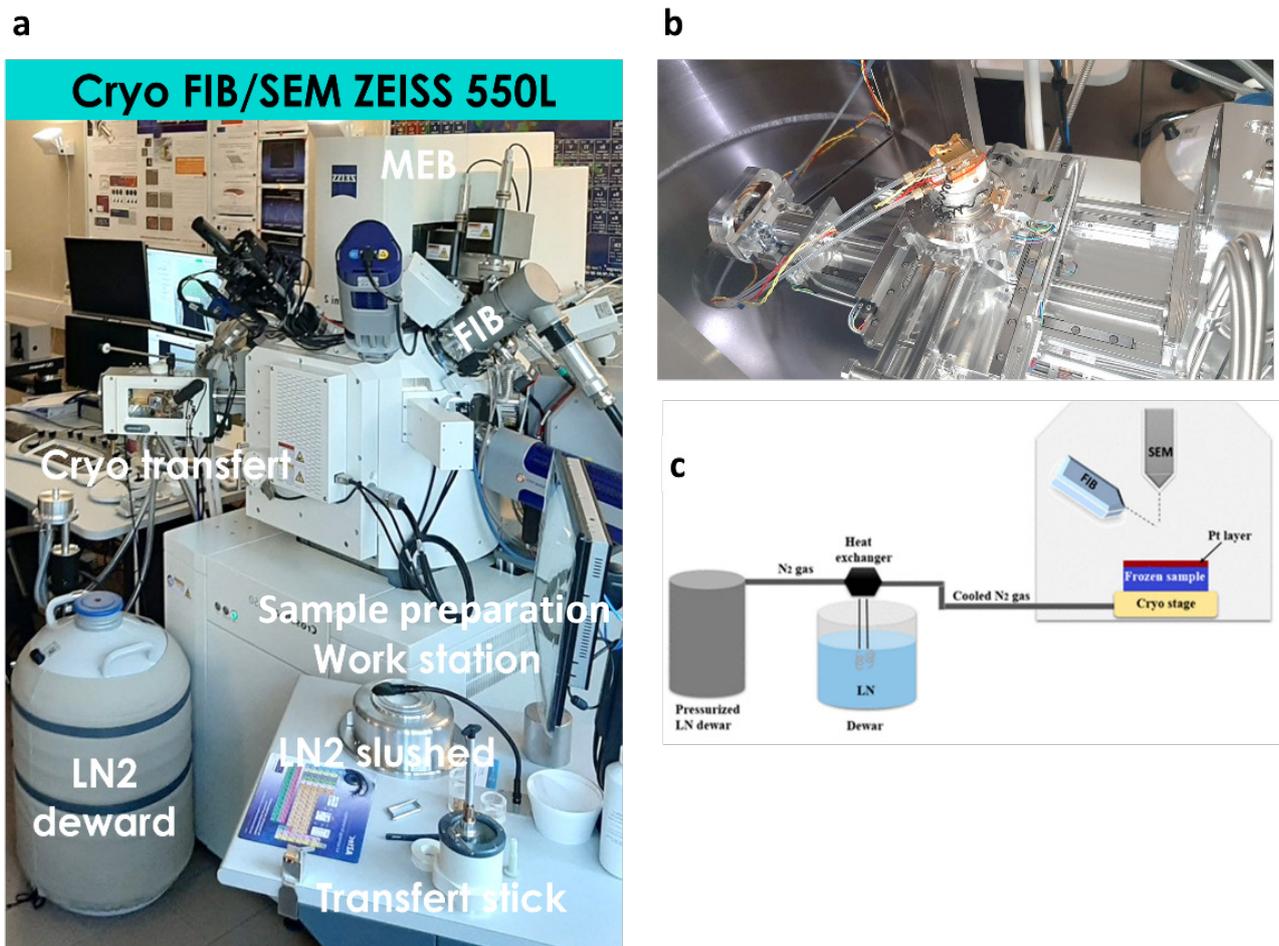


Figure 2.39 : Le système cryo Quorum® rattaché au FIB/MEB de l'IMN. (a) Vue d'ensemble du système avec tous les équipements comme la station de travail, le cryo-sas et un des deward de refroidissement. (b) Installation de la platine cryo dans la chambre MEB. (c) Schéma simplifié du système de refroidissement du microscope.

➤ Transfert de l'échantillon

Les échantillons sont dans un premier temps préparés (freezing) ou transférés (HPF) dans la station de travail de préparation de l'échantillon et installés sur un support cryo (portoir) pour permettre leur manipulation en condition cryogénique (voir figure 2.40a). Plusieurs formes de portoir sont disponibles dans notre laboratoire, ce qui permet de répondre à des demandes spécifiques (voir figure 2.40d). Dans cette étude, le portoir équipé de vis (qui permet de fixer un plot sous l'azote liquide) a principalement été utilisé pour la caractérisation des biomolécules et des membranes (voir figure 2.40e). Pour les membranes (propres et colmatées), le portoir

avec un étau a permis leur observation sur la tranche (après une cassure par un couteau ou une lame de rasoir présent dans le sas) (montré sur la figure 2.41a et 2.41b).

Les échantillons sont ensuite transférés depuis la station de travail jusque sur la platine du cryo-sas de transfert. Il consiste en une longue canne de transfert (stick) avec un sas à son extrémité (voir figure 2.40b). L'échantillon est maintenu sous vide dans le sas de la canne pendant son transfert. Il est ensuite inséré à l'intérieur du cryo-sas du microscope (-140°C) (voir figure 2.40c), où il va subir les dernières étapes de préparation pour permettre son observation en cryoMEB.

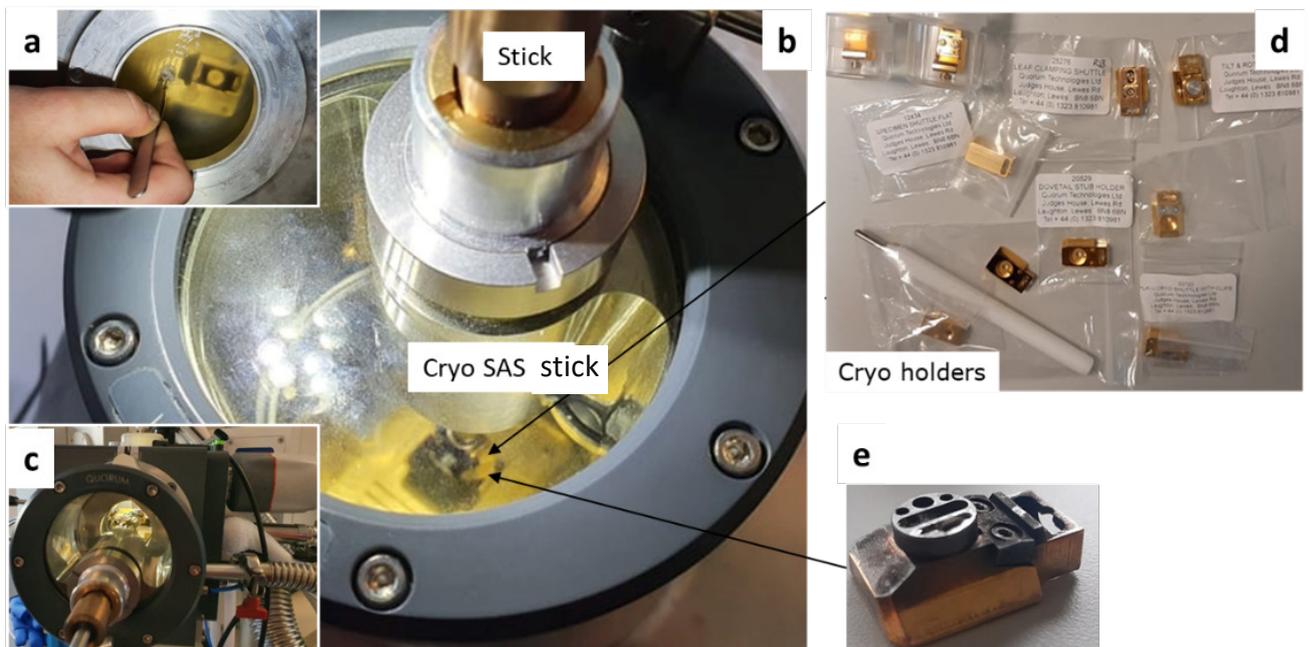


Figure 2.40 : Préparation et transfert d'un échantillon cryo depuis la station de travail, ici avec une cryofixation par azote pâteux. (a) cryofixation, (b) transfert dans le sas de la canne et (c) transfert dans le cryo-sas du cryoMEB. (d) Les différents portoirs disponibles à l'IMN et (e), le portoir utilisé principalement dans cette étude.

➤ Préparation de l'échantillon dans le cryo-sas de transfert

Plusieurs étapes de préparations supplémentaires sont possibles dans le cryo-sas de transfert, comme la sublimation, la fracture ou la métallisation au Pt de l'échantillon. La sublimation consiste à faire évaporer la glace surfacique de l'échantillon (passage de l'état solide à gazeux de l'eau sous certaines conditions de température et de pression). Il n'est pas recommandé de faire cette étape sur les échantillons poreux hydratés (cela vide les pores de l'eau qu'ils contiennent). De plus, pour des acquisitions 3D, elle pourrait créer un gradient à l'intérieur de l'échantillon. Elle a donc été exclue pour la caractérisation des membranes en cryo-MEB et FIB. La fracture consiste à casser l'échantillon (sur un bord par exemple) avec

une lame de rasoir ou un couteau (monté sur un axe pivotant) (voir figure 2.41a et 2.41b). Enfin, comme à température ambiante, un revêtement par pulvérisation d'une couche de Pt sur la surface de l'échantillon permet d'assurer la conductivité électrique et de réduire les effets de charge pendant l'imagerie MEB (voir figure 2.41c).

Après ces dernières étapes de préparation, l'échantillon peut être transféré dans la chambre du MEB, sur une platine froide (-140°C) (voir figure 2.41d et 2.41e). De là, il peut être observé comme en MEB classique. Cependant, la rotation de la platine est limitée ($\approx 40^\circ$ maximum), pour éviter une cassure des tuyaux d'azote (ils permettent de refroidir la platine). Il est à noter que toutes ces étapes se déroulent à basse température et qu'il est primordial de conserver la chaîne du froid tout le long de la préparation et de l'observation de l'échantillon (températures entre -175°C et -140°C). Après son observation, l'échantillon peut faire le chemin inverse et être conservé à froid dans un dewar de stockage.

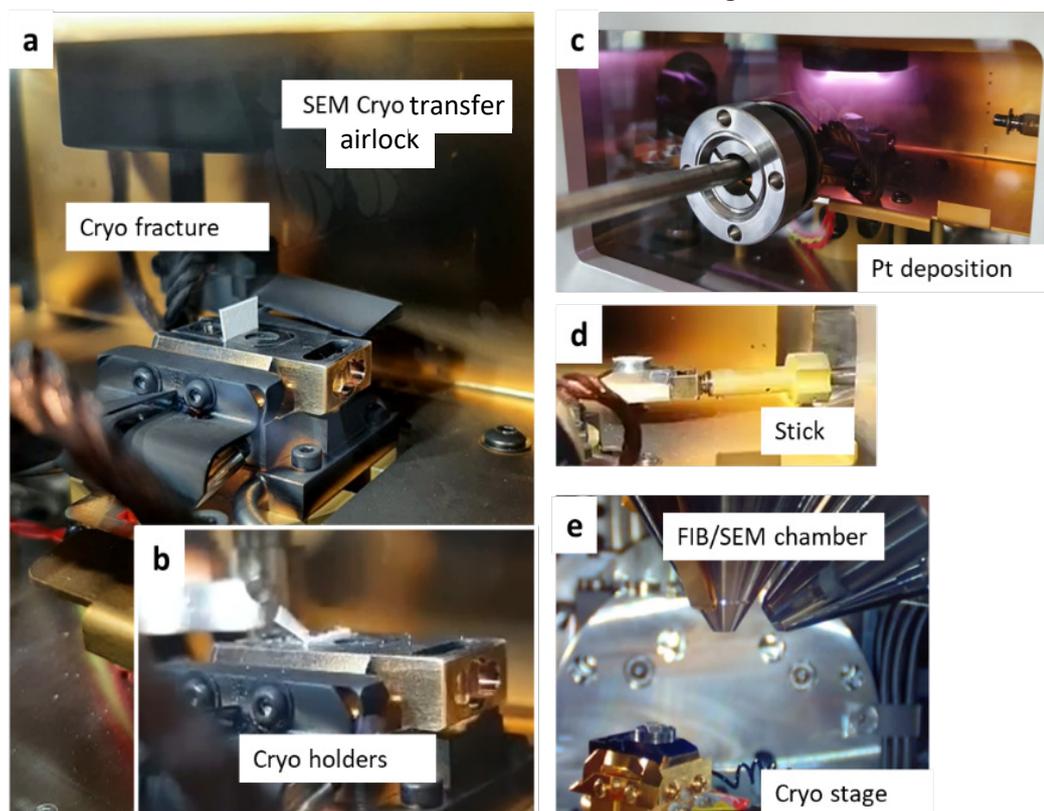


Figure 2.41 : Etapes supplémentaires de la préparation des échantillons dans le cryo-sas. (a) et (b), cryo-fracture d'une membrane avec le holder en étai à l'aide du couteau du cryo-sas. (c), métallisation au platine. (d) et (e), transfert dans le cryo-sas et dans la chambre du cryoMEB via la canne de transfert.

2.4.3.2 Acquisition 3D avec le cryo-FIB/MEB

Dans cette étude, les biomolécules ont été observées en cryo-MEB et les membranes (propres et colmatées) en cryo-MEB et 3D cryo-FIB/MEB. Il est à noter que pour le cryo-MEB les

paramètres d'observation sont les mêmes que pour des acquisitions à température ambiante. Cependant, l'usage du FIB est différent en conditions cryogéniques (plus de détails dans la section 2.4.3). En particulier, l'acquisition de volume 3D en cryo-FIB/MEB demande une préparation d'échantillon et des paramètres d'acquisition spécifiques.

➤ Préparation de l'échantillon

La première étape lors de l'observation des membranes (propres ou colmatées) est de repérer une zone d'intérêt (spot de colmatage par exemple) et de procéder à sa préparation pour une acquisition 3D (comme en FIB/MEB à température ambiante). Pour cela, une couche protectrice de platine (quelques micromètres d'épaisseur) est déposée à la surface de la membrane par ouverture de la vanne du GIS Pt pendant 1 minute à une distance de travail de ≈ 5.5 mm. Il est à noter que les conditions de dépôt sont différentes en conditions cryogéniques et que tous les paramètres ont dû être adaptés (voir section e). Le composé de platine-matière organique est déposé par condensation sur la surface (très froide). Ensuite la couche est purifiée pour obtenir une couche de Pt métallique en balayant la zone avec le faisceau d'électrons (5 keV et 500 pA), pendant quelques minutes. Une cross section est creusée par le FIB pour découvrir l'intérieur de la membrane (30 keV et 30 nA). Puis la surface est polie avec un courant plus faible (1,5 nA). La préparation finale pour une membrane PES ainsi que le principe d'acquisition de traitement des données sont montrés en figure 2.42.

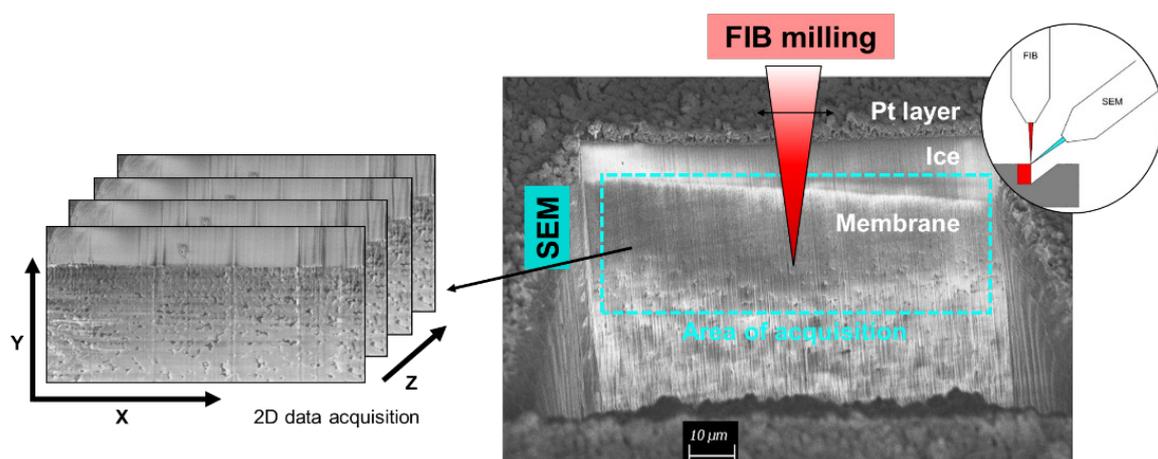


Figure 2.42 : Acquisition 3D au cryo FIB/MEB et traitement des données (après la préparation de la membrane PES).

➤ Acquisition des images et traitement des données

L'acquisition d'images 2D pour former un volume 3D est similaire à celle à température ambiante. Cependant, bien que l'acquisition soit automatisée, elle n'est pas contrôlée (au niveau

du focus et de l'épaisseur des coupes) par un logiciel dédié (les marques d'alignement nécessaires à l'acquisition automatique ne peuvent pas être réalisées en conditions cryogéniques, car le dépôt de carbone n'est pas possible). Ici, le logiciel smartFIB (Zeiss), également utilisé pour les manipulations classiques du FIB (hors 3D, puisque le logiciel Atlas5 est utilisé à TA pour contrôler et automatiser les acquisitions par 3D FIB/MEB), est employé avec un mode séquentiel, ce qui permet d'alterner les images MEB et les coupes FIB automatiquement. Aucun contrôle n'est possible pendant l'acquisition pour corriger une dérive ou une perte de focus par exemple. Cela peut être contraignant pour les longues acquisitions pendant la nuit ou le week-end. De plus, il est possible que l'épaisseur des coupes ne soit pas régulière, ce qui peut entraîner des problèmes lors de la reconstruction du volume.

Des acquisitions 3D par FIB/MEB ont été réalisées sur les membranes colmatées PES pour les trois mélanges modèles étudiés. Des volumes entre $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$ et $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$ ont été acquis avec une taille de voxel cubique de 10 à 20 nm. Une partie de ces travaux a été, de même qu'à température ambiante, de trouver les paramètres d'acquisition et de reconstruction optimaux. Cet aspect est développé dans la section e de cette partie. Pour le traitement des données, le logiciel Dragonfly® a été utilisé pour la visualisation, la segmentation et la quantification du colmatage dans les volumes de membranes PES colmatées. La segmentation semi-automatique par machine learning a été appliquée dans ce cas (où nous avons au moins 3 phases à différencier). Le module « segmentation wisard » a été utilisé à cet effet (plus de détail dans la partie 2). Il faut compter au moins 10 h de traitement pour obtenir une segmentation satisfaisante.

➤ Maintien de conditions stables

Les acquisitions au 3D FIB/MEB peuvent durer plusieurs jours, c'est pourquoi il est important de conserver les conditions cryogéniques sur cette durée. Dans le cas contraire, cela entraînerait la perte de l'état vitrifié pendant l'acquisition et par conséquent une perte d'information. Pour cela, il est important, par exemple, de bien remplir les réservoirs d'azote, de surveiller la pression de sortie de l'azote, mais aussi de rincer les tuyaux au moins 1 h lors de la mise en route du système. De nombreux essais et ajustement nous ont permis d'étendre la durée des conditions cryogénique de 1 à 4 jours. Cet aspect est développé dans la section e de cette partie.

2.4.4 Cryo MET et QFS pour les échantillons HPF

Dans cette étude, l'analyse des biomolécules en suspension, fixées par cryo-plunge, est effectuée en conditions cryogéniques via un porte-objet (PO) MET adapté. En effet, le Nant'Themis est un microscope non dédié aux conditions cryogéniques. Néanmoins, il est possible d'imager des échantillons à froid avec un PO spécifique (il contient notamment un réservoir de LN2) et des protocoles adaptés. Le PO cryo utilisé dans cette étude, le transfert de l'échantillon, ainsi que les modalités d'observations et d'acquisitions au cryo MET seront présentées dans cette section. Pour les échantillons préparés par HPF, il est possible de les observer au MET après leur avoir fait une QFS (quick freeze substitution), comme expliqué dans le chapitre 1. La procédure sera détaillée dans cette section.

2.4.3.1 Observation des biomolécules par cryo-MET

Le porte échantillon 2550 de la marque Fischione, ainsi que la station de transfert de la même marque ont été utilisés dans cette étude (voir figure 2.43). L'échantillon doit être transféré à froid depuis le deward de stockage vers la station de transfert puis dans le PO cryo. Ces derniers doivent être préalablement refroidis à -180°C en amont du transfert. Pour maintenir cette température, le PO possède un réservoir d'azote liquide (voir figure 2.43c). De plus, il dispose à son extrémité d'une languette amovible, ce qui permet de protéger l'échantillon pendant son insertion dans la colonne du microscope (transfert entre la station et le microscope)

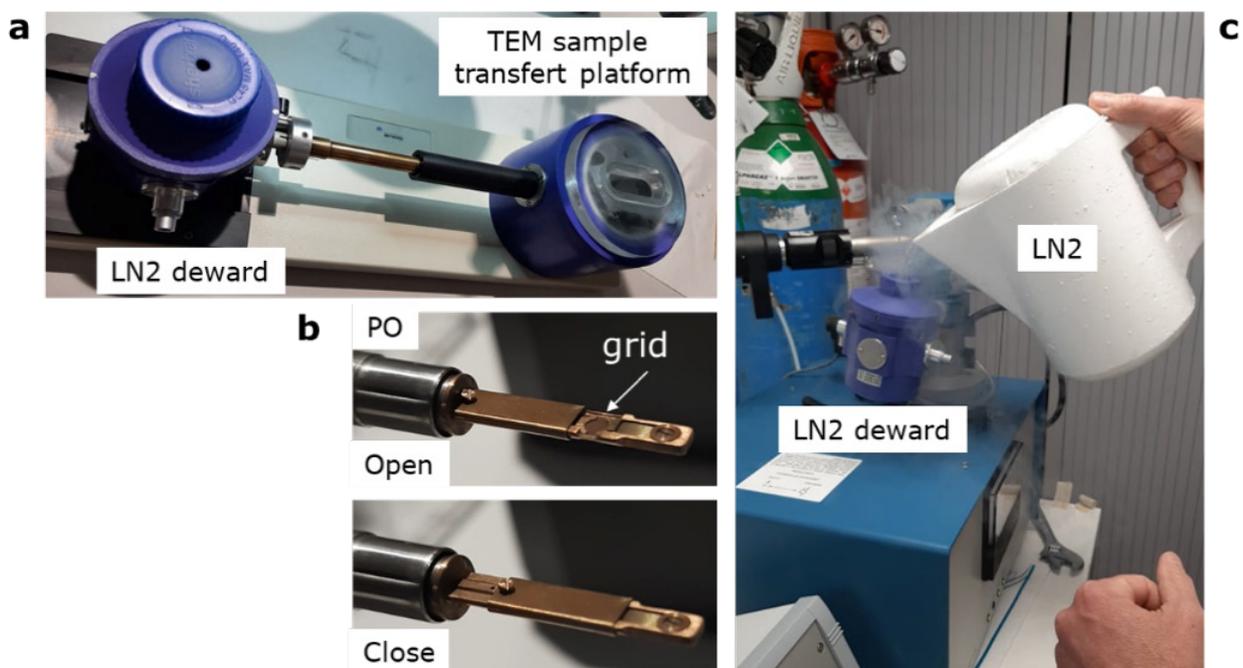


Figure 2.43 : Le porte-objet utilisé dans cette étude, avec la station de transfert (a), la languette amovible pour protéger l'échantillon (b) et (c) le remplissage du réservoir à LN2.

(voir figure 2.43b). Il est à noter que tous les outils utilisés pour le transfert de l'échantillon (pince, tournevis... etc.) et la station de transfert doivent être séchés et réchauffés en amont pour éviter les traces d'eau et donc la formation de cristaux. Dans les meilleures conditions, du fait que le microscope ne soit pas adapté aux conditions cryo (pas de piège à froid et donc la condensation de l'eau a lieu rapidement sur l'échantillon), les échantillons peuvent, au mieux, être observés quelques heures en conditions cryogéniques avant la formation de contamination (cristaux).

Des mélanges modèles de lipides et de protéines ont été observés en cryo-MET et STEM. Une tension du faisceau incident de 300 keV a été utilisée pour les deux modes d'imagerie afin de limiter le nombre de diffusion dans l'échantillon et donc son réchauffement. Dans le même but, des courants entre 2 et 4 nA ont été utilisés pour le MET et entre 40 et 60 pA pour le STEM. Pour réduire au maximum l'impact du faisceau tout en ayant une bonne qualité d'image, la caméra K2 a été utilisée pour les acquisitions en MET.

2.4.3.2 Analyse des échantillons HPF par QFS et observation au MET classique

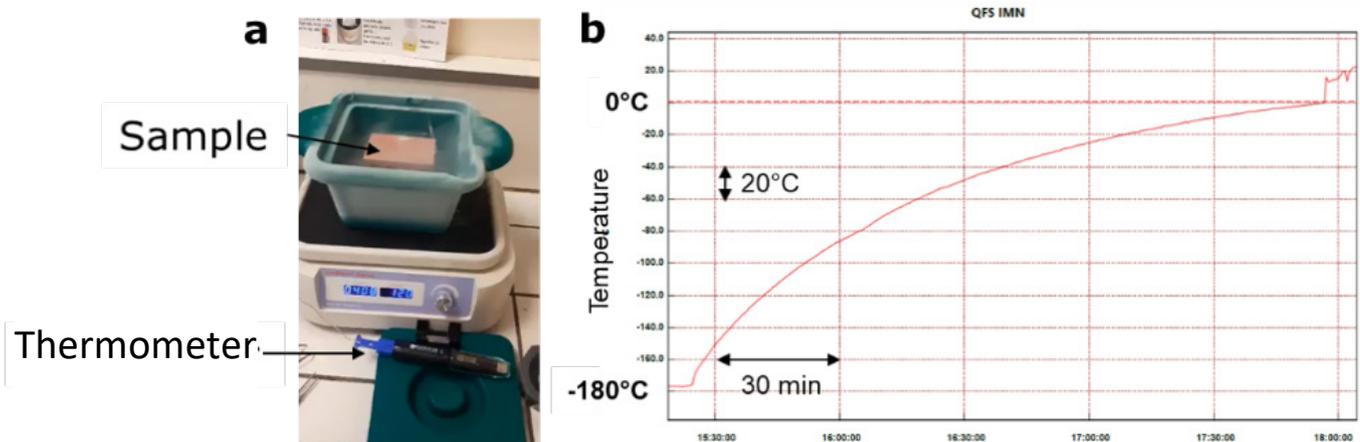


Figure 2.44 : Kit de QFS avec (a), le kit avec l'échantillon et le thermomètre et (b) le suivi dans le temps de la température.

Comme expliqué dans le chapitre 1, l'analyse des échantillons HPF en MET classique est possible, s'ils sont préparés par QFS (Quick Freeze Substitution). Dans ce but, le kit utilisé par McDonald¹⁹⁵ a été acquis par notre laboratoire (EMS, ref. 34500) (voir figure 2.44a). Le principe consiste à remplacer l'eau congelée (substituée) par un solvant organique liquide (acétone) à basse température (-80 et -90°C) tout en réchauffant doucement l'échantillon jusqu'à température ambiante (≈ 3 h). Cela permet d'éviter la formation perturbatrice de glace par dévitrification tout en restant au-dessus du point de fusion du solvant. La qualité de la QFS peut

être contrôlée via les courbes de température obtenues à l'aide d'un thermomètre (relié à un ordinateur avec un suivi dans le temps) (voir figure 2.44b). Lorsque la température de l'échantillon est au-dessus de 0°C, il est enrésiné et coupé à l'ultramicrotome de la même manière que précédemment. Cette technique permet notamment un compromis entre la conservation de l'aspect natif de l'échantillon (cryofixation) et la facilité d'observation en ME à température ambiante. En outre, c'est également une alternative à la technique d'extraction par cryo lift out pour la préparation d'échantillons MET de membranes colmatées, qui peut s'avérer extrêmement difficile (voir chapitre 4).

Les membranes PAN et PES colmatées avec un mélange de lipides et de protéines ont été préparées par QSF et observées en MET et STEM à température ambiante. Les conditions d'imagerie sont les mêmes que celles utilisées pour l'analyse des membranes enrésinées (voir partie 2).

2.4.5 Défis techniques et développements méthodologiques

Dans le but de conserver l'aspect natif du colmatage et d'éviter les effets de la déshydratation (préparation classique pour la ME à température ambiante), il est nécessaire d'utiliser des conditions cryogéniques. La congélation de l'échantillon permet aussi de diminuer les effets néfastes du faisceau d'ions et d'électrons. Le système cryogénique a été installé au début de ce projet et plusieurs défis ont dû être relevés, tels que la mise en place de cette technique, le développement de protocoles spécifiques pour la cryofixation et l'optimisation de l'acquisition, dans le but de caractériser les membranes colmatées. Ces défis et développements méthodologiques sont décrits dans les sections suivantes.

2.4.5.1 Mise en place et développement du cryo-FIB/MEB à l'IMN

Le système cryo Quorum® est arrivé en 2019 et a été opérationnel en 2021. Il est à noter que l'utilisation de ce type d'équipement et les techniques cryogéniques en général sont une nouveauté pour l'IMN. Les spécificités de l'emploi du FIB à froid, ainsi que l'optimisation et le maintien des conditions cryogéniques stables dans le temps seront décrites dans cette section.

➤ Spécificités et emplois du FIB à froid

Que ce soit pour le dépôt de platine ou le forage de l'échantillon, en comparaison avec l'usage à température ambiante, l'emploi du FIB présente de nombreuses différences en conditions cryogéniques.

- Le dépôt de platine

Le dépôt de platine est la première étape pour la protection et la préparation des échantillons lors d'une acquisition en FIB/MEB. L'utilisation du GIS est différente dans des conditions cryogéniques. En effet, le rendement et les conditions de dépôt sont différents. Le gaz de Pt, mélangé avec de la matière organique, congèle par condensation directement à la surface de l'échantillon. Cela entraîne un dépôt sur une grande surface (jusqu'à plusieurs mm²) avec

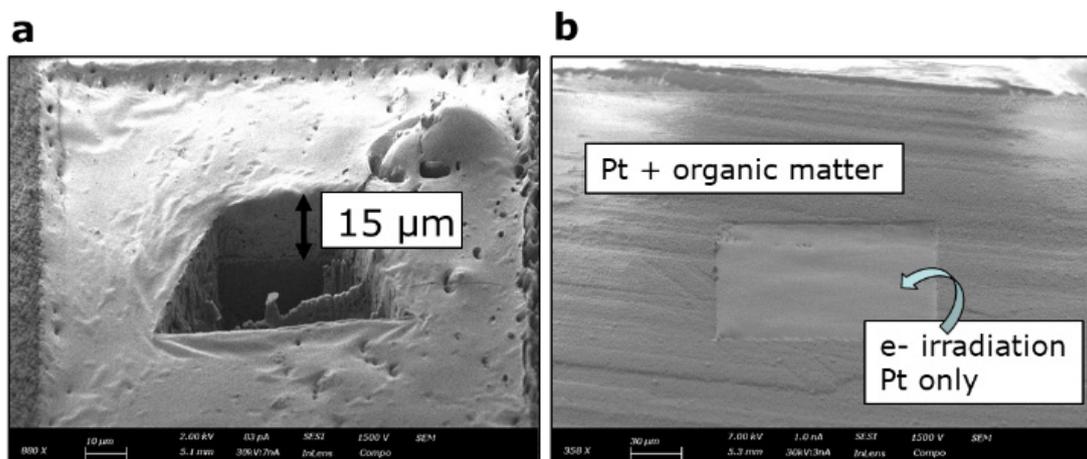


Figure 2.45 : Dépôt de platine à la surface d'un échantillon en conditions cryogéniques. (a) Important dépôt de platine obtenu en quelques minutes (15μm d'épaisseur). (b) Purification du dépôt de platine par irradiation électronique.

plusieurs micromètres d'épaisseur en très peu de temps. La figure 2.45a montre un dépôt de platine épais ($\approx 15 \mu\text{m}$), il a été obtenu en quelques minutes seulement. Pour optimiser le dépôt, il faut diminuer la température du GIS et augmenter la distance de travail entre le GIS et l'échantillon. Enfin, à l'aide du faisceau d'électrons (voir figure 2.45b), il faut purifier le platine en le dissociant de la matière organique. Après de nombreux tests sur les membranes colmatées, il en a été déduit qu'une température de GIS de $\approx 30^\circ\text{C}$, une distance de travail de 5,5 mm et un temps de dépôt de 1 minute permettaient d'obtenir un dépôt d'environ $2 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Un faisceau d'électrons (5 keV, 500 pA) irradie ensuite la zone jusqu'à ce que le dépôt soit homogène en contraste à l'image (lors de l'irradiation, la zone s'éclaircit au fur et à mesure de la purification, ce qui démontre les modifications à l'intérieur du dépôt).

- Le fraisage de l'échantillon, dit « Milling »

Pour creuser des cross sections dans la matière, le même principe est appliqué entre les conditions classiques et les conditions cryogéniques. Cependant, comme la nature du matériau change avec la congélation, les paramètres utilisés doivent à nouveau être optimisés. La glace présente dans l'échantillon le rend dur et difficile à couper. C'est particulièrement le cas pour les membranes (effet de mur, bord flou et artéfact de curtaining) (voir figure 2.46a) alors qu'elles sont très faciles à couper à température ambiante (bord droit et net des cross section). C'est pourquoi il est généralement nécessaire d'utiliser des courants plus forts pour une cross section à froid. Ainsi, après de nombreux tests, des courants de 1,5 à 3 nA ont été utilisés pour polir la surface et acquérir des volumes 3D de membranes de filtration colmatées (contrairement à 300 à 700 pA à température ambiante). Enfin, on observe souvent une couche d'eau (de glace) à la surface des membranes (voir figure 2.46b). Comme expliqué précédemment, retirer une partie de cette eau avant la cryofixation (en l'absorbant avec un papier filtre) permet de limiter l'épaisseur de la couche. Lors de la mise au point des paramètres de fraisage, il faut prendre en considération l'augmentation de la profondeur de la cross section et le changement d'interface entre l'eau et la membrane colmatée.

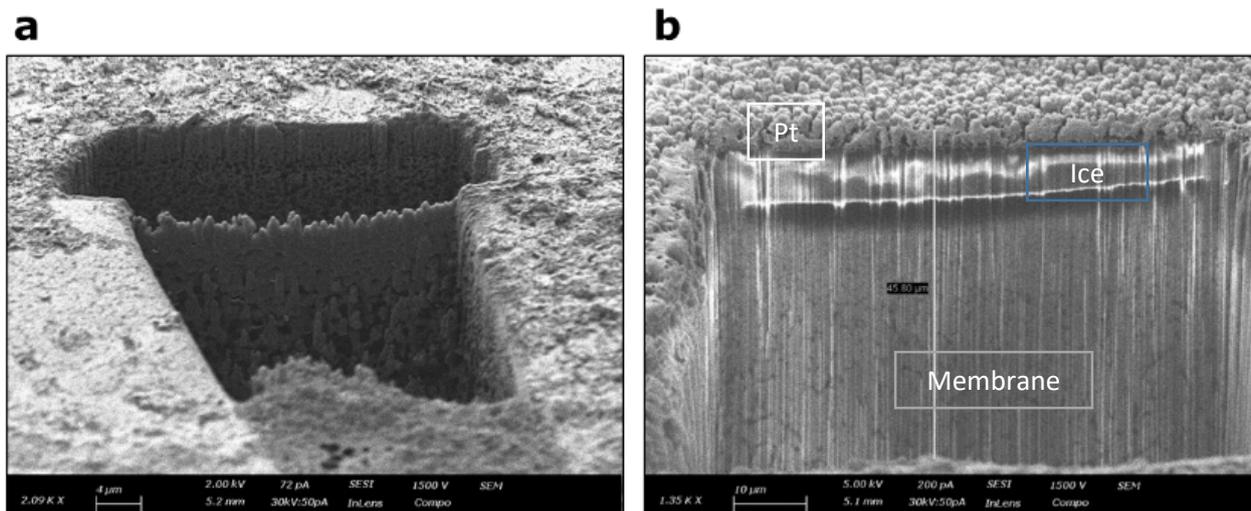


Figure 2.46 : Cross section de membrane en condition cryogénique. (a) cross section avec des paramètres non optimisés, on note la présence d'un effet de mur, de bords flous et de l'artéfact de curtaining. (b) cross section après optimisation des paramètres du FIB. Même après le blotting, une couche mince d'eau est présente sur la surface de la membrane.

➤ Optimisation et maintien des conditions stables

• Étendre les conditions cryogéniques de 1 à 4 jours

Lors des premières expériences au cryo-FIB/MEB, plusieurs problèmes ont dû être solutionnés pour observer l'échantillon plus de 24 h à basse température. Notamment, l'obstruction des tuyaux d'azote liquide avec des cristaux, la stabilité et l'alignement de la platine ou encore le débit, la pression et le volume des réservoirs d'azote ont dû être optimisés. Dans le cas contraire, l'appareil se réchauffe subitement, ce qui entraîne des dégâts irréversibles sur l'échantillon. Ainsi, il est nécessaire d'allonger la durée des conditions cryogéniques pour permettre des acquisitions de volume 3D. Concernant la platine cryo, si elle présente une souplesse (jeu mécanique des pièces), même légère, cela empêche le transfert des échantillons dans la chambre MEB. De plus, dans certains cas, l'échantillon (avec le portoir) peut tomber lors du transfert, alors il faut réchauffer l'appareil (4 à 5 h minimum) et ouvrir la chambre pour récupérer le portoir.

Pour pallier cela, un nouveau réservoir d'azote a été acquis (passage de 60 L à 196 L d'azote liquide) et les connecteurs de la bouteille ont été isolés (à l'aide de mastic), ils sont contrôlés au début de chaque session (figure 2.47a). La pression de la bouteille a été ajustée à 2 bar minimum. Un manque de pression a pour conséquence d'entraîner un réchauffage de l'appareil. Dans le cas de la formation d'un bouchon dans les tuyaux d'azote, deux stratégies ont été adoptées : un rinçage des tuyaux plus long en début de session (1 h au lieu de 20 minutes) et le montage d'une vanne sur le tuyau d'alimentation. Cette vanne permet d'isoler le tuyau de l'air lorsque la bouteille n'est pas branchée (le jour de la livraison d'azote par exemple). Les molécules d'eau présentes dans l'air peuvent former des cristaux dans le tuyau et, in fine, l'obstruer. Avec la mise en place de ces optimisations, les problèmes dus à ce phénomène comme le réchauffage de l'instrument (induit par la circulation réduite d'azote) ont été réduits et même supprimés. Enfin, concernant la platine cryo, il a fallu aligner sa position et parfois la démonter pour la placer correctement sur son support et éviter un désalignement et du jeu mécanique.

- Optimisation de la préparation de l'échantillon

Pour une observation qualitative de l'échantillon, il doit être préparé et transféré correctement dans le cryo-MEB. Plusieurs stratégies ont été mises en place dans le but d'optimiser ces pratiques (figure 2.47). Tout d'abord, tous les outils en contact avec le LN2 doivent être réchauffés et séchés pour enlever toutes les molécules d'eau (formation à terme de cristaux contaminants) (figure 2.47b). Il est ensuite judicieux de filtrer le LN2 avant de remplir la station de travail (cryofixation), d'une part pour filtrer certains gros cristaux déjà présents et d'autre part pour retirer les éventuelles poussières présentes dans les dewar de stockage. Avant de cryofixer une membrane hydratée, la couche d'eau à la surface doit être réduite au minimum pour éviter la formation d'une couche épaisse de glace. En s'inspirant des protocoles de blotting du cryo plunge, un blotting de 2 à 3 secondes est effectué sur un seul côté de la membrane. Cela permet de créer un gradient d'épaisseur de l'eau sur la membrane (couche fine à épaisse d'eau le long de la largeur de la membrane) et de facilement repérer les régions à analyser (figure 2.47c). Enfin, l'échantillon peut être transféré dans le cryo-sas du MEB, il est important de

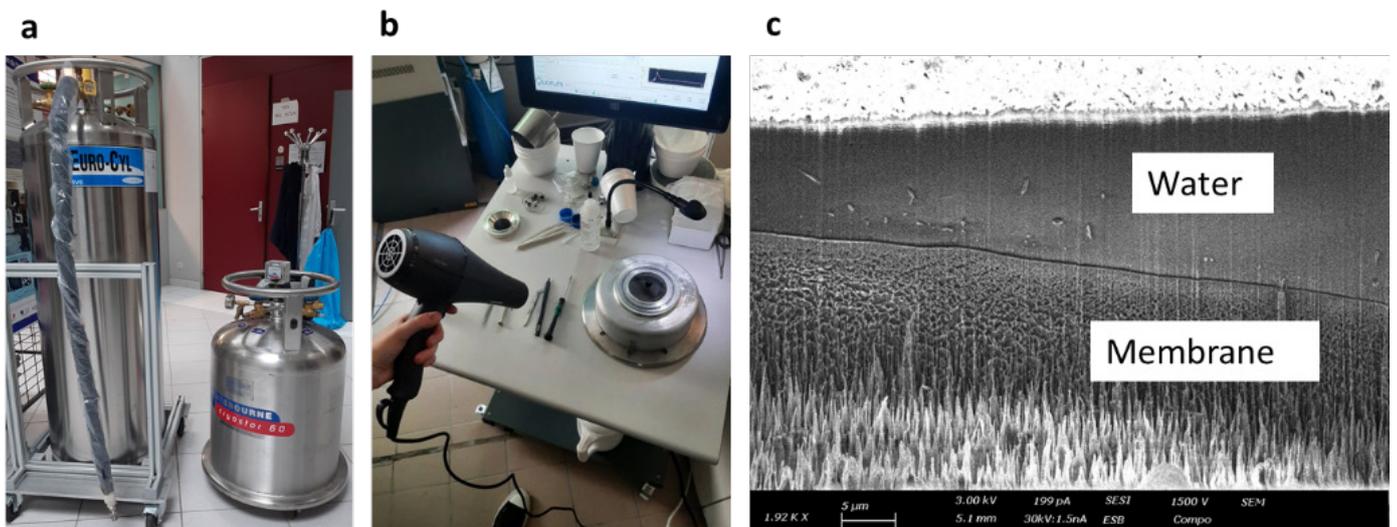


Figure 2.47 : Stratégies mises en place pour l'optimisation de l'usage des conditions cryogéniques. (a) passage d'une bouteille de 60 L (à droite) à une bouteille de 196 L (à gauche) d'azote liquide. (b) Réchauffage des outils et de la station de travail avec un sèche-cheveux en début de séance. (c) Effet de gradient de la couche d'eau (de plus fine (gauche) à plus épaisse (droite)) obtenue après le blotting.

vérifier avec attention les joints et la température de la platine du sas pour assurer un transfert rapide et efficace. Il est à noter que l'échantillon doit rester le moins longtemps possible dans le sas de la canne de transfert.

2.4.5.2 Choix de la meilleure technique de cryofixation

Comme expliqué dans le chapitre 1, il existe plusieurs techniques de cryofixation pour les échantillons. Dans cette étude, le freezing dans l'azote pâteux et l'HPF ont été utilisés pour cryofixer les membranes de filtration, mais aussi des biomolécules issues de mélanges modèles. Le freezing, utilisé comme première approche, est pertinent pour l'étude de la surface de l'échantillon (les premiers micromètres de la profondeur sont vitrifiés¹⁶¹). Pour aller plus loin et vitrifier la totalité de la membrane par HPF, nous avons collaboré avec la plateforme de microscopie de Rennes (MRic, Microscopy Rennes Imaging Center). Une partie des échantillons cryofixés par HPF ont été préparés par QFS pour les observer au MET. Pour leur caractérisation au cryo-FIB/MEB, des conditions particulières d'observation sont nécessaires. Néanmoins, notre microscope n'a été équipé que récemment de la disposition requise pour pratiquer l'observation des échantillons HPF. Ainsi, pendant cette thèse, il a fallu trouver un moyen d'analyser ces échantillons. Dans cette section, les conditions nécessaires à l'observation ainsi que la mise en place de solutions alternatives seront présentées.

➤ Conditions nécessaires pour l'observation des échantillons HPF au cryo-FIB/MEB de l'IMN

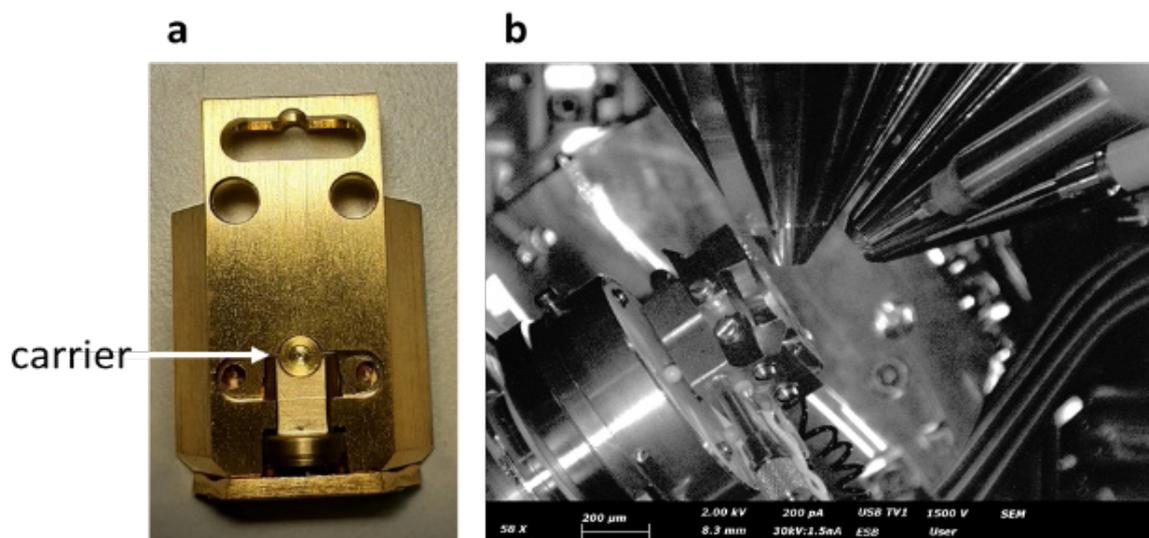


Figure 2.48 : Conditions requises pour analyser les échantillons HPF au cryo FIB/MEB. (a) Holder spécifique pouvant contenir un carrier. (b) Position du portoir avant l'ajustement par le constructeur. Ici, le portoir risque de toucher la colonne alors que la distance de travail est de 8,3 au lieu de 5,1 mm.

Les échantillons HPF doivent être transférés à froid dans la station de travail Quorum puis sur un portoir spécifique (voir figure 2.48a), ce dernier a été disponible en mars et opérationnel en juillet/août 2022 à l'IMN. Dans la configuration actuelle du FIB/MEB, au point de coïncidence

des faisceaux (distance de travail 5,1 mm), le portoir touche la colonne (voir figure 2.48b). Récemment, l'intervention du constructeur pour changer la position d'une pièce nous a permis d'accéder à ce point de coïncidence sans avoir de collision. Pour permettre l'observation des échantillons HPF dans les délais de la thèse, un plot standard a été adapté et utilisé comme solution temporaire.

1. Conception d'un plot customisé

Nous avons entrepris de fabriquer un plot personnalisé, où un échantillon HPF peut être transféré et placé au point de coïncidence, avec une hauteur adaptée pour ne pas risquer une collision avec la colonne (figure 2.49a). Il doit être conducteur et pouvoir supporter les conditions cryogéniques. Nous nous sommes appuyés sur les travaux de Payre et al, (2018)²⁵. Un plot en laiton, voir le plan sur la figure 2.49, a été conçu dans notre atelier. Un carrier peut être coincé à l'intérieur du plot tout en restant à la surface de celui-ci. Le carrier est alors bloqué par une vis en alliage, elle peut être manipulée sous l'azote et permet de fixer l'échantillon. Enfin, le plot peut être monté sur un portoir standard et transféré dans le cryo-MEB de la même

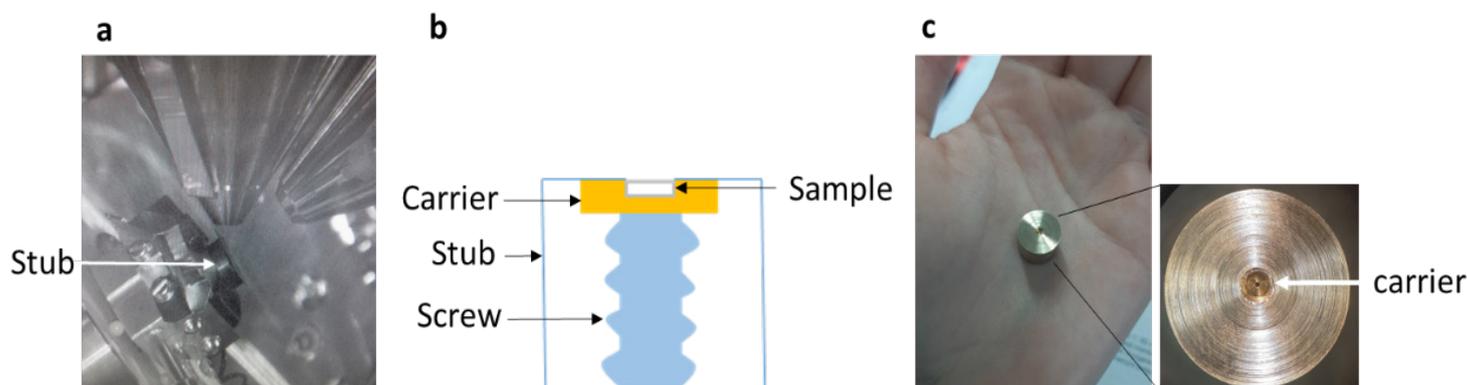


Figure 2.49 : Conception d'un plot customisé pour analyser les échantillons HPF. (a) Placement du plot par rapport à la colonne MEB, le point de coïncidence est atteint sans collision (distance de travail de 5,1 mm). (b) Plan de profil du plot customisé. (c) Image du plot avec un zoom où on peut apercevoir la position du carrier.

manière que vue précédemment. Plusieurs essais ont été effectués sur la membrane PES colmatée, le plot permet l'observation de l'échantillon en MEB et en FIB (au point de coïncidence des faisceaux) avec succès. Cependant, un réchauffement local est observé sur les échantillons. Il se manifeste par l'évaporation de l'eau dans les pores lors de l'observation. Un manque de conductivité, sans doute venant de la vis, est suggéré. Une optimisation (changement de vis ou ajout d'aluminium pour combler les vides entre la vis et le plot par exemple) serait alors nécessaire. Du fait qu'une solution permanente a récemment été mise en place (récepteur

du portoir HPF et configuration adaptée du cryo-MEB), l'optimisation de ce travail n'a pas été réalisée.

2.4.5.3 Sensibilité de la membrane polymère et des biomolécules en condition cryogénique

Malgré le fait que les biomolécules et les membranes hydratées présentent une résistance plus importante à l'impact des faisceaux d'ions et d'électrons lorsqu'elles sont congelées, elles restent tout de même des échantillons sensibles. Ainsi, il est nécessaire d'adapter les conditions d'imagerie en MEB et de fraisage en FIB. En particulier, il est possible d'engendrer le réchauffement local de l'eau (la glace) contenue dans les pores de la membrane. Cela se manifeste par l'observation des pores remplis d'eau puis vides après plusieurs balayages des faisceaux d'ions ou d'électrons. Pour les biomolécules, elles peuvent bouger sous le faisceau ou bien présenter rapidement des dommages importants.

L'effet « FIB-induced heating » est décrit dans la littérature au sujet de l'impact du faisceau d'ions sur les matériaux congelés¹³³. Un échauffement de l'échantillon peut être observé à la surface de celui-ci. Ces effets sont proportionnels à la puissance du courant et à l'énergie du faisceau employé. Cependant, il est nécessaire d'utiliser des courants plus élevés du faisceau pour couper la membrane congelée (voir la section 2.4.5.1 de cette partie). Dans ce travail, les paramètres idéaux ont dû être cherchés et optimisés pour trouver un compromis entre la qualité de la coupe, l'impact et les dommages du faisceau d'ions.

Pour le faisceau d'électrons, de même qu'à température ambiante, la dose en dessous de laquelle aucun dommage n'est observé peut être déterminée. C'est en suivant le même type de démarche qu'à TA (variation du courant, de l'énergie et du dwell time jusqu'à convergence), que les paramètres du faisceau d'électrons ont été ajustés pour l'imagerie des membranes de filtration congelées.

2.5 Conclusions

- Des mélanges modèles de lipides et de protéines ont été préparés et utilisés dans cette étude. Un protocole spécifique de marquage par métaux lourds a été mis au point pour différencier les biomolécules lorsqu'elles sont mélangées. Les membranes de filtration polymères PAN et PES ont été préparées et pour certaines colmatées à l'aide de ces mélanges modèles marqués.

- La caractérisation des membranes par ME à température ambiante a nécessité le développement de protocoles spécifiques en tenant compte de la sensibilité de l'échantillon et en préservant sa surface. Des protocoles dédiés d'acquisition et de reconstruction de volumes 3D FIB/MEB ont été établis pour la première fois dans notre laboratoire. Le MET et le STEM ont été utilisés pour obtenir les détails nanométriques de la structure de la membrane. La spectroscopie EDX a permis d'identifier les composants de la membrane.
- La sensibilité de la membrane polymère aux faisceaux d'électrons et d'ions, l'artéfact de shine through sur les volumes 3D de matériaux poreux ou encore l'impact d'un dépôt de platine à la surface de la membrane (sur la couche sélective de la membrane) ont été les principaux défis techniques relevés pendant cette étude.
- La caractérisation des membranes de filtration colmatées et des biomolécules a nécessité le développement et l'optimisation des cryotechniques au sein de notre laboratoire. Des protocoles dédiés de cryofixation, acquisition et reconstruction au 3D FIB/MEB des membranes de filtration ont été développés. Le cryo-MET a été employé pour l'imagerie des biomolécules. La spectroscopie EDX a permis d'identifier la membrane et son colmatage (couplé aux cryo-MEB et MET), ainsi que de différencier les biomolécules marquées par métaux lourds. Une partie des échantillons de membrane a été observée au MET et STEM, après QFS, afin de proposer une alternative au cryo lift-out et pour obtenir des détails nanométriques.
- La mise en place et le développement des cryo techniques pour le FIB/MEB de l'IMN (incluant une optimisation de la durée d'utilisation en conditions cryo), le choix de la technique de cryofixation (incluant la fabrication d'un plot customisé) et le développement de protocoles adaptés pour le forage et l'imagerie des membranes colmatées ont été les principaux défis techniques relevés, pour la cryo ME, dans ma thèse.

Dans les chapitres suivants, les résultats obtenus grâce aux méthodes développées sont présentés : dans le chapitre 3 les membranes propres sont caractérisées à température ambiante, dans le chapitre 4, des membranes colmatées sont caractérisées à température ambiante, la méthode mise au point pour marquer les biomolécules par métaux lourds et les différencier est présentée et, dans le chapitre 5 les membranes colmatées sont caractérisées en conditions cryogéniques.

Chapitre 3 : Détermination des facteurs structuraux clés affectant la perméabilité et la sélectivité des membranes de filtration polymères PAN et PES en utilisant le 3D FIB/ MEB à température ambiante

3.1 Introduction

La littérature présentée dans le chapitre 1 rapporte le besoin de caractériser les membranes polymères de filtration avec des techniques permettant l'élucidation de la relation structure-performance de la membrane et une caractérisation détaillée de la morphologie des pores. Notamment, la caractérisation de la couche sélective et l'identification des blind pores sont essentielles pour une compréhension détaillée du procédé de colmatage. À notre connaissance, aucune caractérisation expérimentale à l'échelle du nm de la couche sélective et de sa structure poreuse 3D n'a été rapportée pour les membranes MF ou UF. L'objectif de ce chapitre est de présenter la méthode de 3D FIB/MEB mise en place et les résultats obtenus lors de la caractérisation de la structure des membranes de filtration polymère à température ambiante. Ces résultats ont été valorisés au travers d'une publication dans Journal of Membrane Science (JMS, juillet 2022, sélectionné article du mois par l'éditeur et IF de 10,53 en 2022). Les membranes d'UF PAN et de MF PES sont observées propres (vides) puis enrésinée (dans le but d'évaluer le *shine-through* artéfact, les résultats sont présentés dans le chapitre 2).

La sélectivité d'une membrane dépend du diamètre des pores à la surface de la couche sélective de la membrane et de l'affinité des biomolécules envers le polymère. La perméabilité, L , de la membrane est le flux J de liquide traversant la membrane par unité de surface de la membrane, divisé par la pression transmembranaire ΔP ($L=J/\Delta P$). Le flux, J , peut être mesuré à l'échelle du laboratoire et il peut également être estimé dès que les détails structurels de la couche sélective sont connus (taille des pores, densité, tortuosité et épaisseur), selon la loi des milieux poreux de Hagen-Poiseuille (modèle H-P, équation 1) ^{1,2}.

$$(Eq. 1) \quad J = \frac{\varepsilon d^2}{32\tau} \times \frac{\Delta P}{\mu \cdot \delta y} = K \times \frac{\Delta P}{\mu \cdot \delta y}$$

Où δy est l'épaisseur de la couche sélective de la membrane (m), d le diamètre des pores (m), τ la tortuosité (-), ΔP la pression transmembranaire (Pa), ϵ la porosité (-), et μ la viscosité (Pa · s).

La perméabilité intrinsèque de la couche sélective, K (m²), est définie par l'équation 2 :

$$(Eq. 2) \quad K = \frac{\epsilon d^2}{32\tau}$$

La perméabilité du solvant (l'eau dans ce cas) à travers la membrane peut être déterminée à l'aide de modèles simples largement appliqués, tels que l'équation de Hagen-Poiseuille (modèle H-P), en supposant un matériau homogène où les pores sont des cylindres parfaits, identiques et complètement débloqués. Ce modèle échoue dans le cas de membranes asymétriques réelles, où certains des pores peuvent être bloqués, connectés de manière compliquée ou présenter une morphologie complexe. Selon Mostaghimi et al¹⁹⁹ et Song et al²⁰⁰, le modèle H-P peut fortement surestimer la perméabilité par un facteur de 10 ou plus, en particulier pour les milieux poreux plus hétérogènes. Le modèle H-P considère un écoulement convectif à travers les pores, mais il ne prend pas en compte plusieurs questions^{201,202} : l'interaction entre le solvant et la membrane à travers la tension de surface, la mouillabilité (elle peut avoir un impact sur la pression capillaire), la polarité de la membrane et du solvant (elle peut induire la formation de couches de molécules de solvant et une réduction du rayon effectif des pores), les propriétés du fluide dans les micro ou nanopores (viscosité effective) et la différence possible avec l'écoulement laminaire classique due à différentes conditions de glissement aux limites. D'après la littérature, des modèles plus complexes sont en cours de développement. L'entrée de ces modèles plus détaillés nécessite des informations précises à l'échelle nanométrique, qui n'étaient pas disponibles jusqu'à présent. Les résultats des caractérisations 3D à haute résolution pourraient servir de telles entrées^{197,198}.

En général, les matériaux polymères poreux utilisés comme membranes de filtration sont caractérisés par des mesures indirectes à grande échelle de leurs pores, par exemple par porosimétrie²⁰³. La microscopie électronique à balayage (MEB) permet une visualisation directe de la structure du matériau et est généralement utilisée pour l'imagerie 2D en surface ou en coupe transversale (voir chapitre 1). Les pores, cependant, sont des structures 3D et

nécessitent des méthodes de caractérisation et de quantification 3D pour une description complète. De plus, l'analyse MEB des images 2D présente des limites pour quantifier le nombre de pores qui participent réellement au processus de filtration, car une estimation quantitative des blind pores nécessite des données 3D.

Les expériences sur les matériaux nanoporeux, lorsqu'ils sont caractérisés en 3D à l'aide d'un MEB couplé à un faisceau d'ions focalisé (FIB), permettent une résolution fine (jusqu'à 3-5 nm en taille de voxel cubique)¹ avec un champ de vision de quelques micromètres (voir le chapitre 2). L'application du FIB/MEB 3D dans les matériaux polymères nanoporeux est maintenant en expansion, avec des exemples dans les piles à combustible à électrolyte polymère²⁰⁴ ou les particules polymères poreuses¹⁸⁶. En ce qui concerne les membranes de filtration, Kłosowski et al.¹²¹ ont utilisé la technique FIB/MEB 3D sur des membranes d'osmose inverse (RO) pour permettre la caractérisation des propriétés structurelles clés. Prill et al.²⁰⁵ ont utilisé cette technique sur une membrane minérale nanoporeuse ZrO_2 Al_2O_3 comme support d'image 3D pour la simulation de la perméabilité des fluides. Cependant, cette technique est encore rarement employée pour les membranes de filtration polymères MF et UF. Brickey et al.¹ ont très récemment réalisé une acquisition de 3D FIB-MEB sur des membranes (avec une application pour filtration de virus). Leurs échantillons ne présentent cependant pas la structure poreuse en couches qui caractérise les membranes UF et MF et leur méthode n'est pas orientée et adaptée pour identifier une éventuelle couche sélective. Les études caractérisant les copolymères à blocs^{204,206} restent les plus proches des échantillons de membranes polymères UF et MF. Sundaramoorthi et al.²⁰⁶ ont été parmi les premiers à utiliser le 3D FIB/MEB sur des membranes poreuses en copolymère à bloc et à obtenir une cartographie complète de la porosité, de la connectivité et de la taille moyenne des pores dans différentes couches. Cependant, les auteurs explorent un échantillon de copolymère à bloc qui, en raison de sa fragilité, ne peut pas être utilisé comme une membrane commerciale d'UF et de MF à feuille plate²⁰⁷. De plus, l'utilisation d'une tranche de grande épaisseur (50 nm) n'est pas suffisante pour caractériser la structure poreuse des couches sélectives des membranes de filtration PAN ou PES.

L'utilisation du 3D FIB/MEB pour la caractérisation des membranes de MF et d'UF présente un certain nombre de défis techniques importants. Tout d'abord, les membranes polymères sont des matériaux amorphes présentant peu de contraste et une forte sensibilité aux faisceaux d'électrons et d'ions, ce qui rend l'imagerie de l'échantillon difficile (plus de détails dans les chapitres précédents). L'utilisation du FIB/MEB pour l'acquisition 3D de tels matériaux

nécessite un contrôle et une optimisation rigoureux des paramètres expérimentaux (montré dans le chapitre 2). Il est en effet essentiel d'éviter d'endommager l'échantillon et les effets de charge qui entraînent une dérive continue de l'échantillon et une perte d'informations lors de la reconstruction des données. Ces paramètres dépendent du matériau et de la préparation de l'échantillon et doivent être optimisés et rapportés pour chaque cas spécifique. En ce sens, les membranes de filtration PAN et PES ne font pas exception et leur étude par FIB/MEB nécessite une attention et un contrôle supplémentaires des paramètres expérimentaux pour éviter d'endommager et de charger l'échantillon.

Dans cette étude, la couche sélective des membranes de filtration PES et PAN est caractérisée. Une distinction entre la "couche sélective" et la "peau sélective", basée sur l'analyse de la structure des pores en fonction de la profondeur, est effectuée. De plus, une quantification des pores de surface ouverts et aveugles (blind pores) est montrée. L'extraction d'information 3D permet, au cours de la même expérience, la quantification de plusieurs paramètres d'intérêt tels que la taille des pores, la porosité et la connectivité. La quantification des pores en 3D, en intégrant la troisième direction de l'objet, réduit l'erreur de mesure et évite une estimation à partir d'une image 2D (ex. coupe transversale 2D, porosimétrie). Les conditions opératoires pour analyser les membranes sans les endommager ont été trouvées et tous les paramètres du microscope permettant de réaliser ces expériences sont fournis (tout en préservant une résolution de 5-10 nm pour la caractérisation des plus petits pores). Cette haute résolution offre la possibilité de produire des informations qui peuvent directement alimenter des modèles détaillés de colmatage, de perméabilité et de sélectivité des membranes de filtration.

3.2 Matériel & Méthodes

3.2.1 Conditionnement des membranes de filtration PAN et PES

Deux types de membranes de filtration commerciales à feuille plane ont été analysés : une membrane de microfiltration en polyéthersulfone (PES) avec un diamètre de pore nominal moyen de 0,1 μm (Koch membrane systems, USA) et une membrane d'ultrafiltration en polyacrylonitrile (PAN) (Orelis, France) avec une coupure de poids moléculaire de 500 kDa (diamètre de pore moyen nominal de 30 nm).

Toutes les membranes de filtration ont été conditionnées avant leur caractérisation, selon la procédure initialement rapportée par Rouquié et al¹⁸² pour le nettoyage et le compactage des

membranes à l'échelle pilote : à l'aide d'un module de filtration à flux transversal (Rayflow X100, Orelis-Novasep, France), les membranes ont été nettoyées avec une solution alcaline contenant de l'eau de Javel (pH10-11) suivie d'une solution Ultrasil 100 (procédure rapportée dans le chapitre 2). Elles ont été soigneusement rincées avec de l'eau adoucie à des étapes intermédiaires et finalement rincées avec de l'eau ultrapure. Ils ont été compactés à 1 bar jusqu'à l'obtention d'un flux stable. Les valeurs de flux étaient de 200-250 et 70 L · h⁻¹ · m⁻² à 1 bar de pression transmembranaire pour les membranes PES et PAN, respectivement, et sont en bon accord avec les valeurs attendues données par les fabricants.

3.2.2 Préparation des membranes pour la microscopie électronique

La procédure de préparation des membranes est présentée dans la section 2.b.ii du chapitre 2. Deux groupes d'échantillons ont été étudiés, les "membranes enrésinées" et les "membranes vides". Le premier groupe étant destiné à l'évaluation du « shine through » artéfact, les résultats sont présentés dans le chapitre 2.

3.2.3 Acquisition de données 3D FIB/MEB

L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du FIB/MEB ZEISS Cross Beam 550 L de l'IMN assisté du logiciel Atlas 5 ZEISS (voir la procédure détaillée dans le chapitre 2).

Les acquisitions de données 3D FIB/MEB ont été réalisées sur des membranes PES et PAN avec (membranes enrésinées) et sans (membranes vides) inclusion en résine. Les données ont été acquises avec les conditions expérimentales indiquées dans le tableau 3.1. La résolution du voxel des volumes 3D a été définie comme étant cubique (valeur égale pour X, Y et la largeur de la tranche Z) et avec une taille de côté de 5 nm pour les membranes PAN et 10 nm pour les membranes PES. Selon le théorème de Shannon¹⁸⁷, un objet détectable doit avoir une taille supérieure à au moins deux fois la taille minimale du pixel et donc, au moins 2 pixels sont nécessaires pour qu'un pore soit détecté. Il faut noter que dans ce cas, pour la segmentation des pores avec les tailles de voxels données ci-dessus, la taille moyenne des pores est au moins six fois supérieure à la taille des pixels. L'objet ciblé a été défini comme la taille nominale des pores telle que fournie par les fabricants (30 et 100 nm pour PAN et PES, respectivement). Deux acquisitions de volumes de différentes zones à l'intérieur des membranes, par condition de préparation (échantillons vides ou incorporés) et par type de membrane étudiée (PES et PAN) ont été réalisées. Ainsi, un total de 8 volumes a été acquis.

Tableau 3.1 : Data acquisition parameters used for 3D FIB/SEM of PES and PAN membranes. ^aExact values might differ slightly from one volume to another. Nominal pore sizes are those initially provided by the manufacturers.

	PAN membrane (nominal pore size: 30 nm)	PES membrane (nominal pore size: 100 nm)
3D FIB/SEM acquisitions of <i>empty samples</i>	2	2
3D FIB/SEM acquisitions of <i>embedded samples</i>	2	2
3D volume size^a	10x5x5 μm^3	15x15x15 μm^3
Cubic voxel resolution	5 nm	10 nm
Energy and current of SEM observation	2 keV 200 pA	2 keV 200 pA
Electron fluence of <i>empty sample</i>	2 e-/Å ²	1.2 e-/Å ²
Electron fluence of <i>embedded sample</i>	20 e-/Å ²	3.7 e-/Å ²
Field of view, dwell time and line average of SEM observation	10 μm 4 μs 1	19 μm 15 μs 2
Energy and current of FIB milling	30 keV 300-700pA	
Acquisition time	24-48h	

Les polymères sont bien connus pour entraîner des difficultés d'imagerie et de fraisage⁸⁸. Une grande partie de ce travail a donc été consacrée à la recherche et à l'optimisation des paramètres principaux (voir les paramètres finaux utilisés dans le tableau 1). À titre d'exemple, la procédure définie pour optimiser le courant du faisceau d'ions a été présentée dans le chapitre 2.

Les paramètres du MEB ont été définis pour minimiser la dérive (effets de charge) tout en conservant une qualité d'image raisonnable pour les analyses ultérieures. Les images MEB d'électrons secondaires (SE) et d'électrons rétrodiffusés (BSE) ont été obtenues en utilisant des électrons primaires de 2-5 keV et des courants de faisceau entre 200 et 1000 pA, selon le matériau et la résolution spatiale visée. Il convient de noter que la fluence électronique (électron par unité de surface ; historiquement appelée dose électronique dans la communauté de la microscopie électronique) utilisée pour les membranes PAN vide (2 e-/Å² pour atteindre une résolution de 5 nm) et PES vide (1,2 e-/Å² pour une résolution de 10 nm) est inférieure aux fluences électroniques critiques rapportées pour différents polymères²⁰⁸.

3.2.4 Reconstruction 3D et analyse

Table 3.2: Data analysis parameters used for the 3D reconstructions of the FIB/SEM data of PES and PAN membranes. ^athis value is explained by the fact that one stack was too small to allow deeper analysis. Nominal pore sizes are those initially provided by the manufacturers.

	PAN membrane (nominal pore size: 30 nm)	PES membrane (nominal pore size: 100 nm)
Analysed volume^a	2x1x1 μm	4x3x2 μm
Number of analysed layers (in the depth or the Y direction) per triplicate	18 ^a -28	20
Thickness of a layer	100 nm	300 nm
Space between layer measurements	50 nm	150 nm

Le logiciel Dragonfly, dédié au traitement et à l'analyse d'images scientifiques telles que la transformation, la segmentation et la quantification d'objets multi-échelles dans une image 2D ou un volume 3D, a été développé et commercialisé par Object Research Systems Inc, Montréal Canada¹⁸⁸. Il a été utilisé pour prétraiter, aligner, segmenter et analyser les différents stacks d'images. La procédure de reconstruction des volumes est présentée dans le chapitre 2. Les étapes principales sont présentées dans la figure 3.1. Après avoir acquis les 8 grands volumes, trois volumes plus petits (de tailles identiques) proches de la surface (appelés triplicats) ont été extraits de chacun d'eux. Les triplicats ont été analysés en utilisant les paramètres présentés dans le tableau 2. Cette procédure nous a permis : (i) d'éviter les étapes de prétraitement (filtres, binning...) habituellement réalisées pour tenir compte des variations locales du contraste des images dues à la dérive, à la perte de focalisation ou aux artéfacts, afin de limiter la perte d'information, (ii) de mieux tenir compte des variations locales de rugosité de surface. En effet, des volumes d'analyse plus petits nous ont permis de maintenir une rugosité de surface aussi faible que possible et ainsi, de faire une assignation plus précise du "plan de

surface" (valeur zéro) pour cette analyse en profondeur. Enfin, (iii) fournir une estimation de l'homogénéité des résultats à cette échelle donnée.

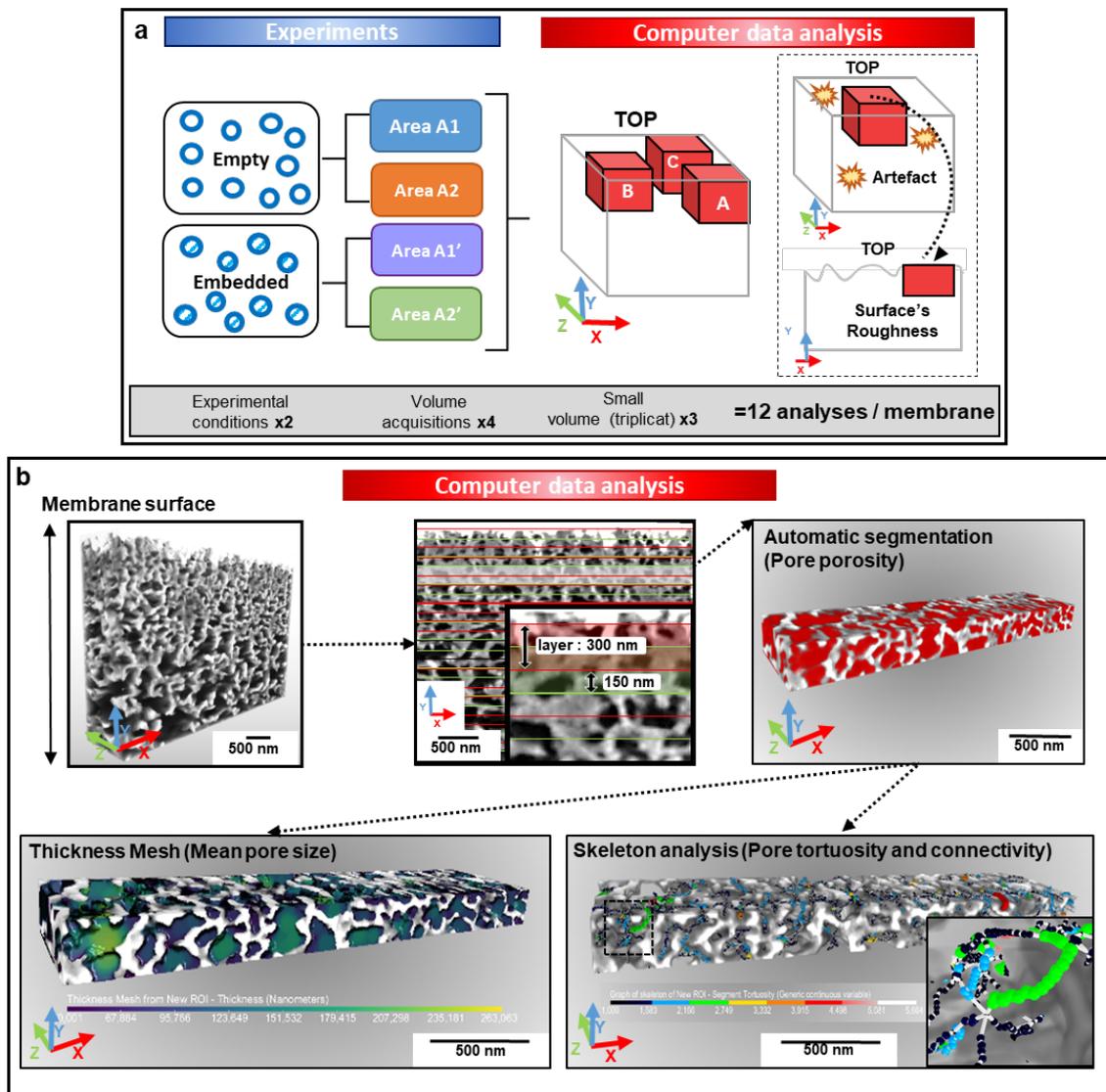


Figure 3.1: Illustration of the main 3D analysis steps in the PES membrane as an example. (a) Procedure used in this study to analyse membranes in 3D. For each membrane reference (PAN or PES), two experimental conditions, empty (without resin, blue empty pores) and embedded (with resin, blue filled pores) membranes were studied. For each experimental condition, two different volumes were acquired. In each 3D data acquisition, three 3D smaller volumes (triplicates) were defined and analyzed using the Dragonfly® software. (b) analysis of an extracted volume of PES membrane. The extracted volume was divided in layers parallel to the membrane surface. Each layer has a thickness of 300 nm and the distance separating the layers was set to 150 nm. For each layer, pores were segmented in order to extract their volume, the mean pore size, the tortuosity and the connectivity.

L'analyse des triplicats (voir partie droite de la Fig. 1a) a fourni un ensemble de caractéristiques de la membrane, à savoir, la taille des pores, la porosité volumique, la tortuosité des pores et la connectivité, en fonction de la profondeur. Concernant l'estimation des pores aveugles, la position Y (la direction de la profondeur depuis la surface de la membrane) de

chaque pore a été identifiée en utilisant l'analyse multi-ROI basée sur la segmentation des pores. Ainsi, les pores connectés à la surface ainsi que leur position Y ont été identifiés et triés en fonction de leur position Y initiale et finale.

3.3 Résultats :

3.3.1 Visualisation 3D des membranes PAN et PES

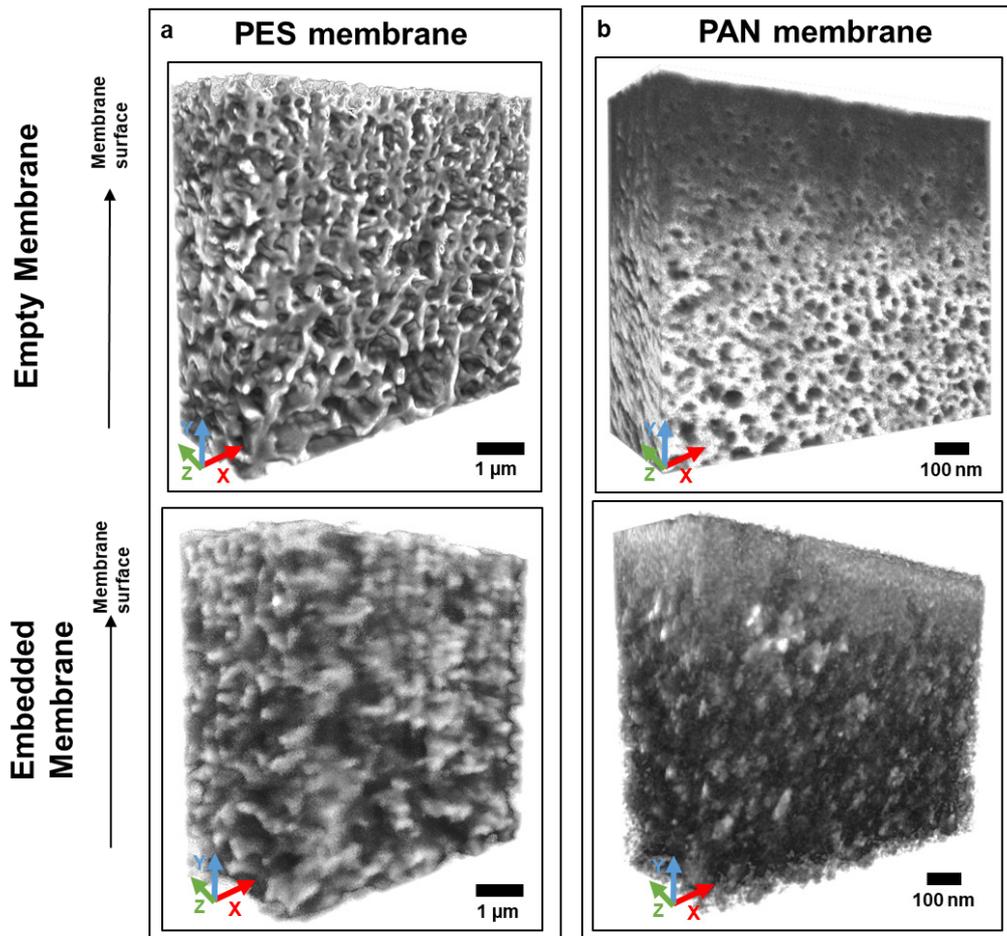


Figure 3.2: 3D visualization of (a) PAN and (b) PES membranes, respectively, with 5 nm and 10 nm resolutions. Volumes obtained by 3D FIB/SEM for empty (upper images) and embedded (lower images) membranes using the SESI detector.

La figure 3.2 montre des volumes 3D de membranes PES et PAN acquis par FIB/MEB. Les deux membranes sont présentées pour des conditions vides et enrésinées. Dans la figure 3.2a, la membrane PES offre un contraste élevé et uniforme depuis la surface jusqu'au fond du volume de la membrane. Ce n'est pas le cas pour la membrane PAN (figure 3.2b), où une grande variation de contraste le long de l'axe Y (l'axe de la profondeur) est observée. Comme expliqué précédemment, le contraste des membranes enrésinées est beaucoup plus faible que celui des

membranes vides. Cela a conduit à une segmentation des pores plus difficile, en particulier pour la membrane PAN. Ces considérations qualitatives expliquent pourquoi les barres d'erreur présentées dans la section suivante montrent une forte variabilité d'ampleur. La quantification des pores des membranes PAN et PES enrésinées révèle des valeurs plus élevées de taille de pores et de la porosité par rapport à celles des membranes vides (montré dans la section suivante). Par conséquent, en accord avec l'évaluation du « shine through » artéfact présenté dans le chapitre 2, il a été décidé de baser cette étude sur les membranes vides (pour les deux types), tout en gardant les membranes enrésinées comme des données supplémentaires utiles en cas de comparaison.

3.3.2 Détermination de l'épaisseur de la couche sélective de la membrane PAN

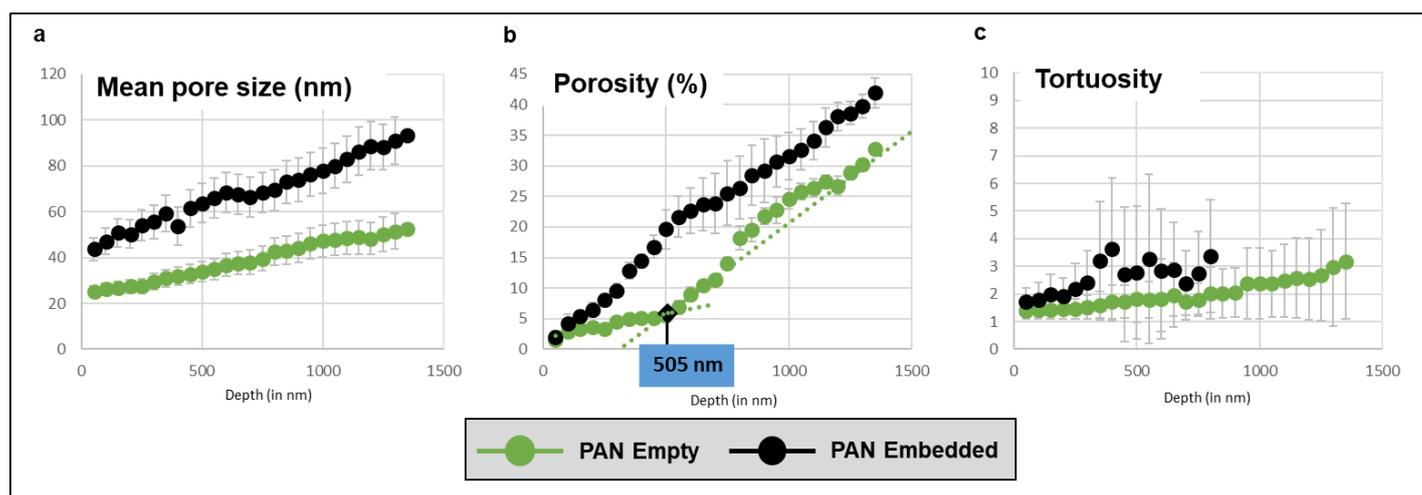


Figure 3.3: 3D quantification of pore structural properties for the PAN membranes (empty in green, embedded in black) from the top surface to the bottom of the volume (Y direction). Mean pore size (3a), porosity (3b) and tortuosity (3c) of pores are presented according to the depth.

Pour la membrane PAN, dans la Figure 3.3, la taille moyenne des pores (3a), la porosité (3b) et la tortuosité (3c) des pores sont présentées pour des membranes PAN vides (points verts) et enrésinées (points noirs), de la surface de la membrane à une profondeur de 1400 nm. Les valeurs présentées sont la moyenne de 6 volumes analysés (deux séries de triplicats ; voir les détails de la quantification dans la section « Matériel et Méthodes »). Les barres d'erreur tiennent compte de l'écart-type (voir les valeurs individuelles mesurées pour chaque paramètre dans les l'annexe 1). Une vue schématique de la structure supposée des pores de la membrane PAN, en fonction de la profondeur, est présentée dans la figure 3.4b. Il faut souligner que ces mesures ont montré une grande répétabilité (voir l'annexe 1 pour les valeurs individuelles mesurées sur les six volumes différents analysés pour la membrane PAN).

D'après les observations faites sur la membrane PAN vide, le diamètre des pores et la tortuosité augmentent lentement et régulièrement de la surface de la membrane jusqu'au milieu poreux. En ce qui concerne la porosité, elle est plutôt stable de la surface jusqu'à environ 505 nm (Fig. 3b.), avant qu'une augmentation monotone et plus rapide ne se produise. La porosité est directement liée à la taille et au nombre de pores. Puisque la taille des pores ne montre pas un changement de pente similaire, ces observations indiquent une forte augmentation du nombre de pores à partir d'une profondeur d'environ 505nm. Ces observations révèlent une région proche de la surface constituée d'un nombre épars de pores avec une augmentation limitée de leur diamètre (25-35nm), suivie d'une région avec un nombre plus élevé de pores. Globalement, deux régions distinctes sont mises en évidence, avec des gammes de diamètres de pores distincts : une couche sélective est identifiée dont l'épaisseur peut être estimée à 505 nm.

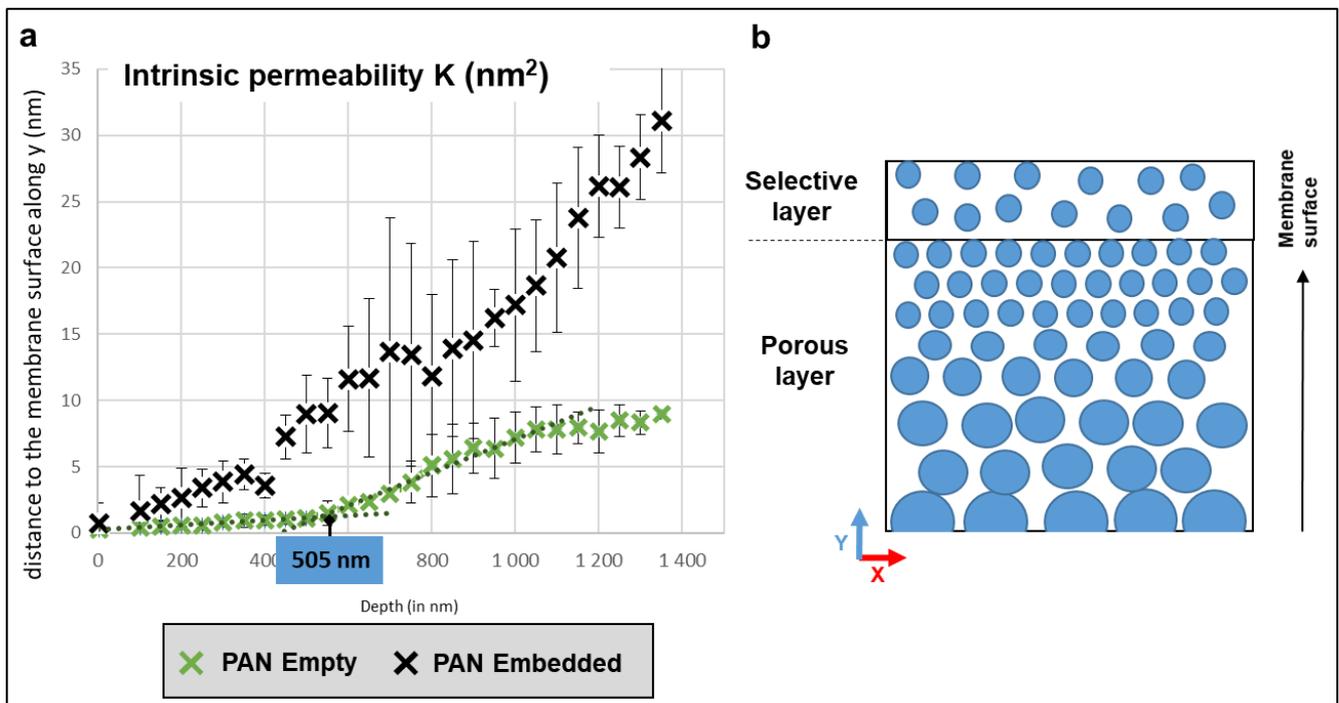


Figure 3.4: a: Quantification of the intrinsic permeability (depending on mean the pore size, the porosity and the tortuosity) of the PAN membrane between the top surface and the end of the volume (Y direction). b: Illustration of the morphology of the membrane, including the selective layer thickness of 505 nm highlighted in the pore quantification.

La couche sélective détermine la perméabilité intrinsèque d'une membrane. Grâce aux mesures de la taille des pores (d), de la porosité (ϵ) et de la tortuosité (τ), et en utilisant le modèle H-P, la perméabilité intrinsèque calculée K peut être estimée et tracée (figure 3.4a). Le calcul a été effectué pour les membranes PAN vides (croix vertes) et enrésinées (croix noires). Les valeurs de perméabilité intrinsèque ont été obtenues après avoir fait la moyenne de la

perméabilité intrinsèque de 6 volumes analysés par échantillon et les barres d'erreur tiennent compte de l'écart-type. Elle suit la même évolution que la porosité : minimale et stable entre la surface et 505 nm de profondeur, avant une augmentation de manière régulière et monotone. Ces résultats sur la porosité et la perméabilité intrinsèque calculées confirment la présence d'une couche sélective et son épaisseur de 505 nm comme représentées sur la vue schématique de la figure 3.4.

La transition entre les deux régimes de porosité n'est pas aussi claire pour la membrane PAN enrésinée. Il est à noter que la quantification n'est pas aussi cohérente que pour la membrane vide (voir les figures A1 et A2 de l'annexe 1 pour une comparaison entre les différents volumes analysés). Le processus délicat d'inclusion en résine explique la dispersion des résultats observés pour les membranes enrésinées, avec une transition plus douce entre les deux régions. Comme déjà mentionné, des mesures macroscopiques par microscopie optique ont été réalisées et sont cohérentes avec l'hypothèse d'un effet de gonflement dû au processus d'enrésinement (voir le tableau A1 dans l'annexe 2). Même si les deux protocoles de préparation des échantillons, basés sur la déshydratation ou l'inclusion dans la résine, ont certainement un effet sur les paramètres structuraux des membranes, les mesures macroscopiques effectuées suggèrent que l'inclusion dans la résine modifie davantage la taille des pores par rapport aux membranes hydratées. On observe une expansion globale des pores lorsque la résine remplit la membrane. La façon dont cette expansion affecte les pores de la membrane pour les différentes profondeurs considérées reste cependant inconnue.

3.3.3 Détermination de l'épaisseur de la couche sélective pour les membranes PES

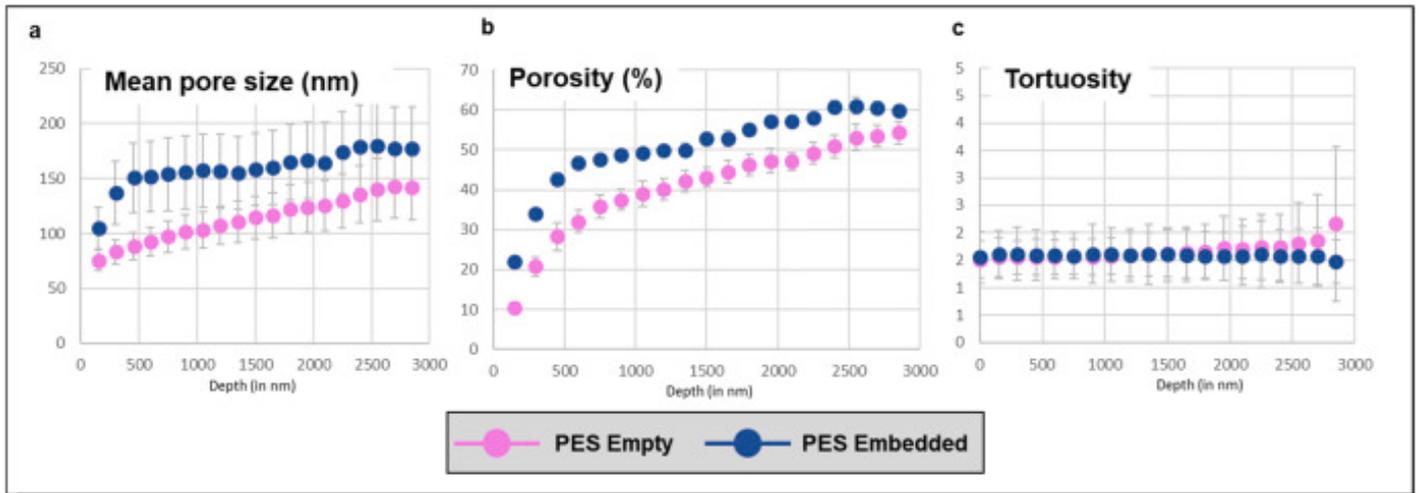


Figure 3.5 : Quantification of pore structural properties of the PES membrane from the top surface to the bottom of the volume (Y direction). Mean pore size (5a), porosity (5b) and tortuosity (5c) of pores are presented as a function of the depth.

La même procédure a été appliquée pour la détermination de l'épaisseur de la couche sélective de la membrane PES. Tout d'abord, comme pour la membrane PAN, les valeurs (voir dans l'annexe 1) montrent des variations relativement faibles d'une zone analysée à l'autre. Ces mesures montrent un certain degré d'homogénéité de la membrane (dans les directions Y et Z) et attestent la fiabilité des conclusions. Dans la figure 3.5, la taille moyenne des pores (3.5a), la porosité (3.5b) et la tortuosité des pores (3.5c) sont présentées pour des membranes PES vides (points roses) et enrésinées (points bleus) depuis la surface de la membrane jusqu'à une profondeur de 3000 nm. Les valeurs moyennes ont été obtenues pour 6 volumes analysés par échantillon (voir dans l'annexe 1). Pour les membranes PES vides, des augmentations régulières de la tortuosité et de la taille moyenne des pores ont été observées sans changement important de la pente. En suivant les mêmes considérations que celles décrites pour les membranes PAN, la perméabilité intrinsèque moyenne pour les membranes vides (croix roses) et enrésinées (croix bleues) en fonction de la profondeur a été calculée en utilisant le modèle H-P pour les membranes vides et enrésinées, en fonction de la profondeur (voir figure 3.6a). Elle présente une augmentation régulière sans aucun changement de pente important. Les minimas de la porosité (figure 3.5b) et de la perméabilité K (figure 3.6a) sont localisés à ou près de la surface de la membrane PES. Une forte augmentation de la perméabilité près de la surface ou une augmentation régulière en fonction de la profondeur indique une couche sélective très fine. Au

minimum, elle doit être plus petite que la distance entre deux couches d'analyse successives, c'est-à-dire 150 nm (dans la direction Y). Dans la littérature, ce cas est en fait souvent appelé une peau sélective^{182,198}. Une vue schématique de la structure de la membrane proposée est présentée à la figure 3.6b. Cette étude quantitative détaillée des volumes 3D est confirmée, pour les deux types de membranes, par la visualisation qualitative des sections transversales respectives (figure 3.7).

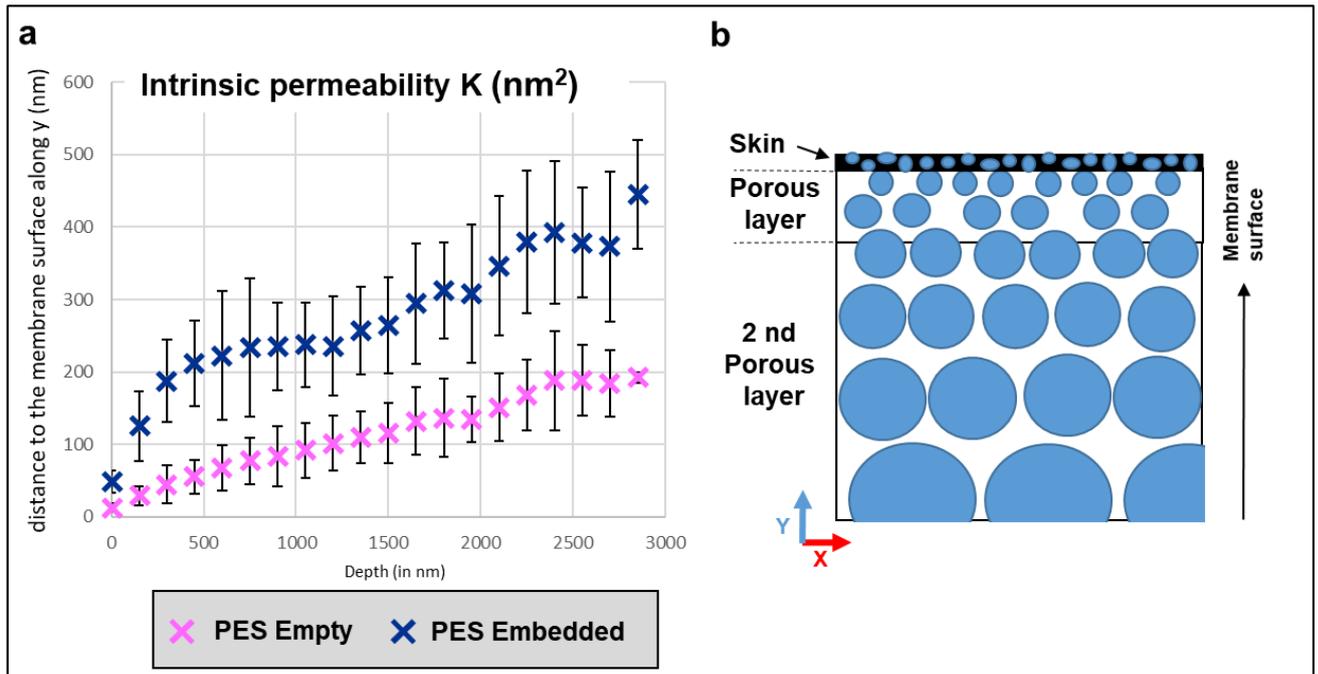


Figure 3.6 : (a) Intrinsic permeability (depending on the mean pore size, the porosity and the tortuosity) of the PES membrane from the top surface to the end of the volume (Y direction). (b) Schematic cross-sectional view of the membrane morphology.

Dans la figure 3.7, deux vues de coupes transversales d'une membrane PAN (figure 3.7a) et d'une membrane PES (figure 3.7b) sont présentées. Dans le cas de la membrane PAN (figure 3.7a), des tailles de pores plus petites et un nombre de pores plus faible peuvent être observés près de la surface. De plus, un contraste sombre apparaît près de la surface. Cependant, l'épaisseur exacte de la couche doit être extraite d'une analyse quantitative 3D minutieuse, comme présenté au-dessus. Nous avons ajouté une ligne en pointillé pour illustrer la limite de la couche sélective (SL) estimée via l'analyse 3D des données FIB/SEM, afin d'illustrer le fait qu'une simple observation à l'œil nu de la variation de contraste dans les images SE n'est pas suffisante pour identifier la SL de la membrane. Dans le cas de la membrane PES (figure 3.7b), on peut supposer une région mince de l'ordre de grandeur de la dimension des pores, elle est montrée par les flèches bleues (sélective skin, SS). Un traitement d'image plus poussé ou des techniques d'enrésinement améliorées pourraient donner une meilleure caractérisation de la

peau sélective²⁰⁹. Cependant, nous pensons que notre analyse quantitative des volumes reconstruits en 3D donne une image plus complète de ces matériaux poreux complexes.

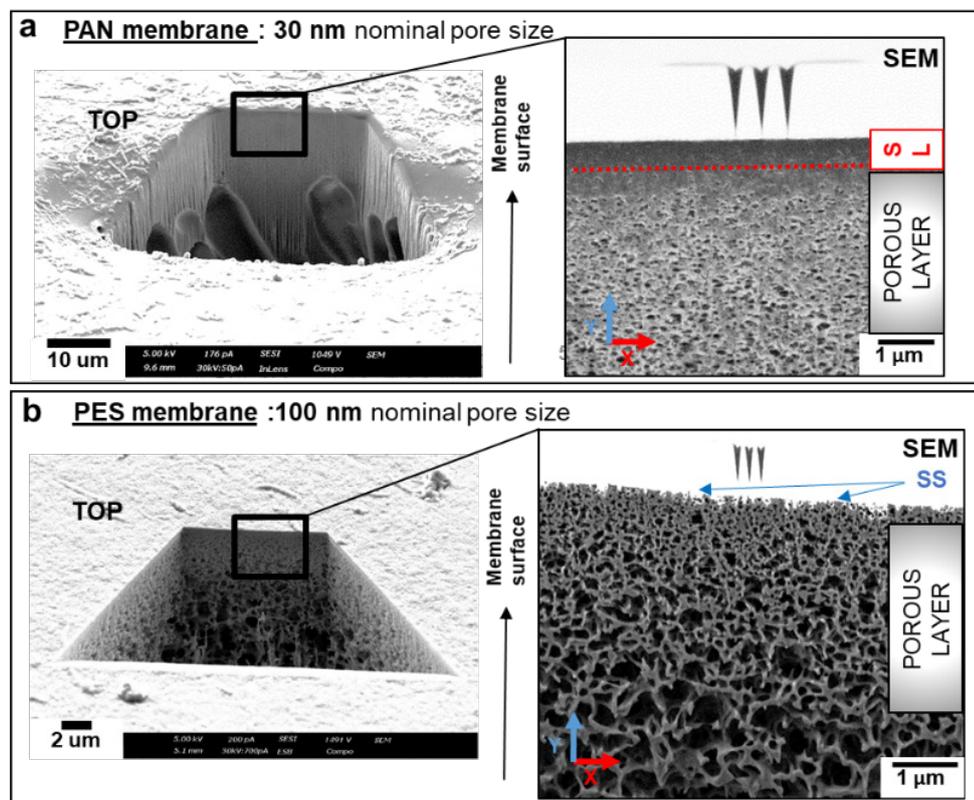


Figure 3.7 : 2D cross sections obtained by FIB and observed by SEM. (a) cross section of the PAN membrane with a magnified view on the XY plane. The membrane morphology is presented with the selective layer (SL)(red dotted line) deposited on a porous layer. (b)cross section of the PES membrane with a magnified view on the XY plane. The membrane morphology is presented with the selective skin (SS)(blue arrows) deposited on a porous layer.

Ainsi, deux structures de membranes très différentes ont été identifiées : une couche sélective de ≈ 500 nm pour la membrane PAN et une peau sélective pour la membrane PES, correspondant à une épaisseur comprise entre 60 nm (taille moyenne estimée des pores) et 150 nm (l'épaisseur minimale d'analyse de la profondeur).

Afin de vérifier la cohérence de ces résultats avec des mesures macroscopiques, des calculs de flux ont été effectués à l'aide de la quantification 3D et comparés aux données expérimentales (voir l'annexe 3). Il y a quelques considérations importantes à prendre en compte lors d'une telle comparaison. Tout d'abord, il faut mentionner que les calculs de flux dans les membranes présentent généralement une grande variabilité, inhérente au matériau, qui a été signalée par d'autres auteurs^{35,95,210}. De plus, il faut rappeler que la loi de Hagen-Poiseuille n'est pas basée sur une description des membranes à l'échelle nanométrique et ne prend pas en compte l'impact de l'interaction entre le matériau membranaire et le solvant^{201,202}. En particulier, la mouillabilité

ou l'hydrophobie de la membrane (les membranes PAN sont souvent plus hydrophiles que les membranes PES) peuvent également jouer un rôle sur le débit mesuré^{211,212}. Dans l'annexe 3, les mesures de flux à grande échelle sont comparées à celles calculées pour les membranes PAN et PES (vides et enrésinées) en utilisant la loi de Hagen-Poiseuille pour une viscosité de l'eau à 20 °C et une pression transmembranaire de 1 bar (tableaux A2 et A3 de l'annexe 3). Pour des membranes vides, le modèle H-P surestime la perméabilité d'un facteur 7 pour la membrane PAN (flux mesuré : $70 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, flux calculé : $535 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) et d'un facteur 50 pour la membrane PES (flux mesuré : $250 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, flux calculé : $13\,500 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$). Cette différence correspond à celle notée dans la littérature²⁰⁰. Une divergence encore plus importante a été trouvée pour les membranes enrésinées. Il est suggéré ici que le modèle utilisé et/ou les paramètres microscopiques expérimentaux ne sont pas suffisants pour décrire le flux à travers les couches sélectives. Des facteurs tels que l'hydrophobicité du polymère ou la chimie locale, qui peuvent également influencer le flux, devraient être pris en compte. Cependant, la description microscopique des milieux poreux de ce manuscrit donne accès aux données nécessaires pour le développement de modèles plus élaborés.

3.3.4 Estimation des pores aveugles et limites de l'analyse 2D MEB des tailles et du nombre de pores

Dans la figure 3.8, les observations MEB à la surface des membranes PAN (figure 3.8a) et PES (figure 3.8b) sont montrées suivies par la quantification de la taille de leurs pores et de leur porosité. Les images ont été obtenues par MEB après déshydratation et métallisation de l'échantillon. Une énergie de faisceau de 5 keV et un courant de 150-300 pA ont été utilisés. Dix images par membrane ont été acquises avec une résolution de 1,5 nm pour la membrane PAN et une résolution de 15 nm pour la membrane PES. Une transformation de binning a été appliquée aux images originales pour obtenir une taille de pixel de 5 nm, similaire à celle utilisée dans la quantification 3D pour la membrane PAN. Avant la segmentation des pores, un filtre a été appliqué pour supprimer tous les objets inférieurs à 3 pixels, la valeur minimale pour quantifier un objet de manière fiable. Enfin, afin de comparer cette étude avec la quantification 3D, sur la base de la surface segmentée pour les pores, le diamètre moyen des pores a été estimé, défini comme le diamètre du plus grand cercle qui s'inscrit dans le pore 2D en utilisant le plugin " épaisseur locale " du logiciel Fiji. Nous notons que nous avons utilisé la technique de l'épaisseur locale (« thickness mesh ») qui est appliquée à nos données 3D FIB/SEM.

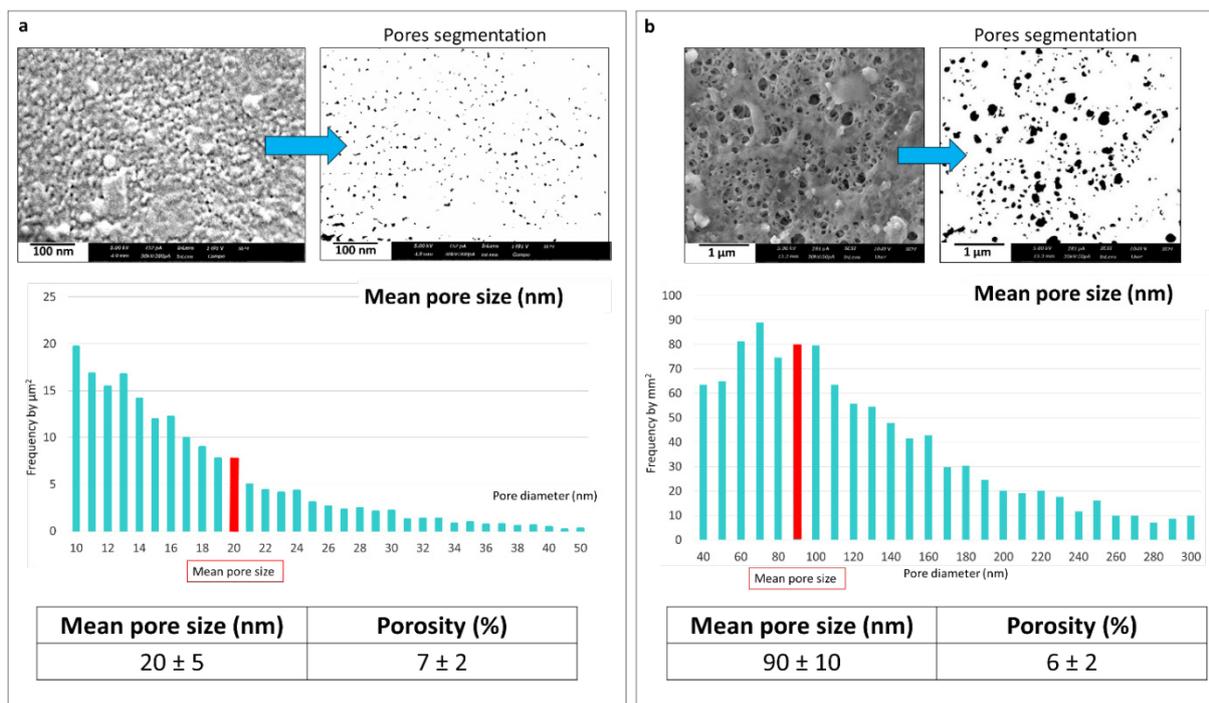


Figure 3.8 : Visualization of the PAN (8a) and the PES membrane (8b) surfaces by SEM followed by 2D segmentation and pore size (by local thickness) and 2D porosity quantification.

La quantification de la taille des pores, révélée par MEB, donne des diamètres de pores moyens de 20 nm et 90 nm pour les membranes PAN et PES (figure 3.8). Les porosités des surfaces associées correspondent à 7% et 6%, respectivement. Ces résultats sont proches de ceux obtenus près de la surface membranaire lors de la quantification des pores en 3D (figures 3.3 et 3.5). Les différences pourraient s'expliquer par la métallisation de platine, nécessaire pour l'observation des échantillons isolants, qui pourrait avoir un impact notable sur l'analyse de surface. La quantification des pores en 2D avec le MEB est beaucoup plus répandue et prend moins de temps⁸⁷ que la méthode de quantification des pores en 3D, mais cette dernière fournit toute une gamme de nouvelles informations.

Dans cette partie, les reconstructions 3D et la quantification des pores ont été utilisées pour analyser l'efficacité des pores dans le processus de filtration, en estimant la quantité de pores de surface permettant un écoulement au travers de la couche ou la peau sélective (pores ouverts). La figure 3.9 présente des visualisations 3D des pores connectés à la surface traversant la couche ou la peau sélective dans les membranes PAN et PES. Les pores connectés à la surface sont représentés en couleur violette. 99% des pores à la surface de la membrane PES traversent la peau sélective (60-100 nm d'épaisseur), alors que seulement 75% des pores à la surface de la membrane PAN le font avec la couche sélective (505 nm d'épaisseur).

De cette analyse, il a été conclu que la quantification 2D des pores de la surface par MEB a fourni une bonne estimation de la densité des pores (efficace pendant le processus de filtration) pour la membrane PES. Les images MEB de la surface de la PAN, cependant, incluraient $\approx 25\%$ de pores en cul-de-sac (« dead-end » pore) et donc, le nombre total de pores serait une surestimation de ceux qui sont actifs pendant le processus de filtration. C'est un résultat important dans la perspective d'une meilleure compréhension de la perméabilité de la membrane puis du colmatage puisque la morphologie réelle des pores de la membrane (pores ouverts ou « dead-end ») peut avoir un impact sur ce processus. Ainsi, la densité des pores de la surface n'est pas un paramètre suffisant, surtout ici dans le cas de la membrane PAN. Afin de relier correctement le flux des membranes obtenu à partir de mesures microscopiques aux valeurs macroscopiques, la quantité de pores aveugles devrait probablement être incluse dans toute description théorique du flux des membranes.

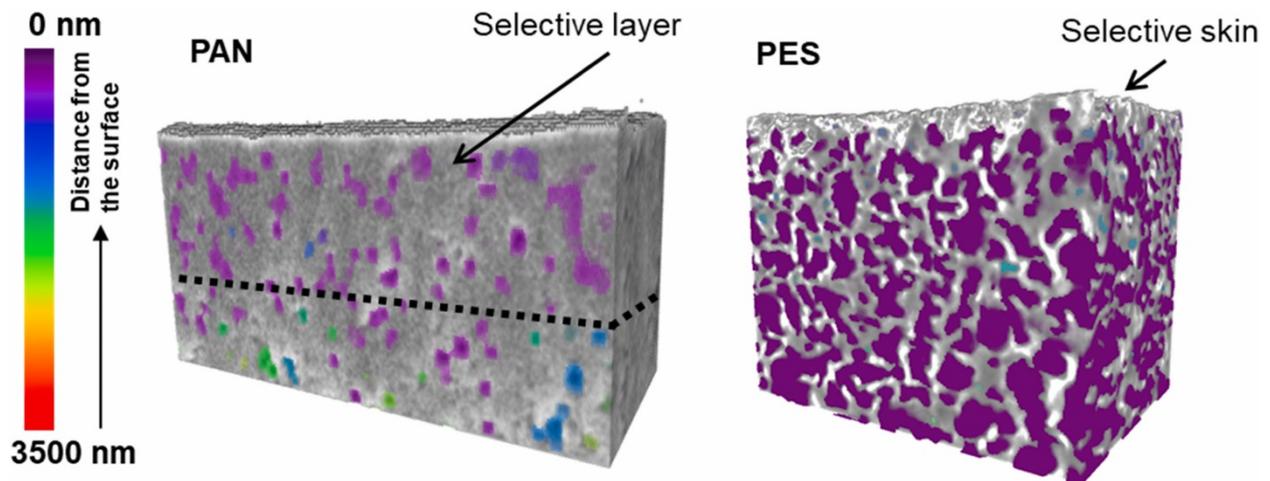


Figure 3.9 : Visualisation of pores connected (in purple) to the surface and going through either the selective layer or skin (open pores) of PAN and PES, respectively. Other pores starting at different depths of the membrane are indicated by different colors as shown in the scale.

3.4 Conclusion

Une approche nouvelle et détaillée pour la caractérisation des membranes polymères poreuses d'UF et de MF par 3D FIB/MEB est présentée. Cette étude était un défi en raison de la sensibilité de l'échantillon au faisceau d'électrons et de l'effet de l'artéfact de « Shine through » qui se produit sur ces milieux poreux. Cependant, la qualité et la cohérence des reconstructions 3D des membranes PAN et PES ont démontré que, malgré le défi, la sensibilité au faisceau d'électrons de ces membranes à base de polymères a été surmontée. La préparation des échantillons (séchés et vides ou inclus en résine) a été discutée afin d'estimer son impact sur la mesure des propriétés structurales de la membrane (porosité, diamètre des pores,

épaisseur de la couche sélective). L'analyse des membranes vides a été retenue, car les effets de l'artéfact de « Shine through » étaient limités, et que l'enrésinement a conduit au gonflement de la membrane. Les couches sélectives des membranes d'ultrafiltration PAN et de microfiltration PES ont été identifiées. La membrane PAN présente une couche sélective de 505 nm avec une taille de pore de 30 nm tandis que la membrane PES dispose d'une peau sélective avec une taille de pore de 60-100 nm. En outre, la quantification de la taille moyenne des pores à la surface de la membrane par 3D (FIB/MEB) et par 2D MEB était cohérente. Enfin, sur la base des reconstructions 3D, le pourcentage de pores aveugles (moins de 1% pour le PES et 25% pour le PAN) a été estimé, révélant que la quantification par MEB était adaptée à la caractérisation de la membrane PES alors qu'elle surestimerait les pores fonctionnels pour la membrane PAN. Ce travail a fourni des données précieuses sur la structure interne de la membrane, qui sont des données cruciales pour l'élaboration de modèles de perméation. Cette étude des membranes vierges était une condition préalable avant de pouvoir entreprendre l'étude des membranes colmatées par FIB/MEB. Un autre défi sera la préservation des biomolécules, pendant l'acquisition des données, dans les pores de la membrane ou à l'interface cake/surface du polymère. De nouvelles procédures utilisant des températures cryogéniques pendant l'acquisition 3D FIB/MEB doivent être développées pour y parvenir et seront présentées dans le chapitre 5. Avant cela, le développement de plusieurs techniques est nécessaire et présenté dans le chapitre 4.

Chapitre 4 : Nouvelles méthodes pour l'identification et la différenciation de biomolécules colmatées en utilisant la microscopie électronique conventionnelle

4.1 Introduction

Le colmatage est un problème récurrent en filtration membranaire et la littérature présentée dans le chapitre 1 rapporte le manque de technique de visualisation fine de ce phénomène à l'échelle de la couche sélective et des pores de la membrane. Par ailleurs, le besoin de développement de stratégies et de protocoles spécifiques pour caractériser les biomolécules accumulées sur et dans la membrane de filtration est mis en évidence.

Dans le chapitre 3, nous avons montré l'intérêt de la ME à température ambiante (TA) pour caractériser les membranes propres. Dans ce chapitre, dans un premier temps, les possibilités offertes par la microscopie électronique à balayage à TA pour caractériser des membranes colmatées seront explorées. Dans un deuxième temps, certaines méthodes en conditions cryogéniques seront introduites pour faciliter l'observation du colmatage.

Parmi les méthodes de caractérisation présentées dans le chapitre 1, l'utilisation du MEB à température ambiante (TA) est largement répandue pour l'exploration de la surface de la membrane. En effet, il permet d'observer rapidement une grande surface avec une résolution nanométrique. Ces mêmes avantages peuvent être appliqués pour l'identification et la localisation du colmatage à la surface de la membrane¹⁷⁰. En revanche, il ne permet pas, seul, d'explorer ou d'évaluer le colmatage interne de la membrane, sauf en certains points à l'aide d'une coupe transversale 2D, obtenue après cassure de la membrane, avec le risque de sélectionner une zone peu représentative ou peu colmatée. **Dans la section 4.3.1** de ce chapitre, nous proposons une étude MEB de la surface de l'échantillon en utilisant des détecteurs différents et l'analyse EDX pour permettre : (i) d'identifier les zones de colmatage à la surface de la membrane, (ii) de recueillir des informations non seulement sur le colmatage externe de la surface, mais aussi sur le colmatage interne. Cette méthode pourrait être une première étape pour la sélection d'une zone d'intérêt avant d'aller, par la suite, faire une étude plus approfondie.

Un des défis majeurs dans la réalisation d'une caractérisation de membranes colmatées est la différenciation des biomolécules mélangées au sein du colmatage, entre elles et avec la membrane. En effet, les biomolécules présentent un faible contraste en ME, des tailles très variables allant de très petites à relativement grandes (entre 10 nm et 100 µm de diamètre), et de fortes interactions (réorganisation des lipides et des protéines en amas ou agrégats). Dans les travaux précédents³⁵, de fortes interactions entre les lipides et les protéines d'un même mélange modèle ont été suggérées, mais pas directement observées. Du fait que les protéines peuvent se présenter sous plusieurs formes (filaments, mais aussi agrégats...), elles peuvent être confondues avec les lipides (forme de sphère et de même taille). En ME, les objets faisant peu d'interaction avec le faisceau d'électrons ne donnent pas un bon contraste à l'image, ce qui rend difficile leur observation²¹³. Une des solutions est d'augmenter le signal et par conséquent le contraste, avec l'ajout de contrastants. Comme expliqué dans le chapitre 1, l'immunomarquage d'un objet à l'intérieur d'une matrice ou d'une cellule présente l'inconvénient d'endommager l'ultrastructure et n'est pas adaptée à la localisation des biomolécules au sein du colmatage des membranes. En outre, les protocoles classiques d'immunomarquage s'effectuent avant ou après l'enrésinement de l'échantillon, ce qui n'est pas compatible avec la caractérisation de membranes colmatées hydratées. Ainsi, un contraste par métaux lourds a été envisagé. Il pourrait permettre de rehausser le contraste général du colmatage en ME, mais aussi d'identifier les différentes biomolécules dans un mélange modèle. De surcroît, il est moins invasif que l'immunomarquage et peut être pratiqué en amont de la filtration sur les biomolécules. Enfin, il est facile à mettre en place, rapide, accessible, compatible avec les cryotechniques et inclut peu d'étapes et moins de biais.

La majorité des contrastants populaires en ME sont utilisés pour rehausser le contraste général de l'échantillon, mais sans spécificité avec les différents composants de l'échantillon. Cependant, comme expliqué dans le chapitre 1, il est possible d'utiliser les métaux lourds pour marquer spécifiquement les différents composants d'un échantillon^{4,5}. Ainsi, les lipides et les protéines de cette étude peuvent être contrastés avec des métaux lourds. Ce qui n'est pas le cas de la membrane polymère, qui ne présente pas de sites ou structures spécifiques favorisant de telles liaisons chimiques^{6,7}. Leur contraste général peut être rehaussé par l'absorption de métaux lourds, mais sans spécificités²¹⁴. **Dans la section 2** de ce chapitre, une méthode est proposée pour distinguer les différentes biomolécules au sein du colmatage des membranes, en appliquant un contraste par métaux lourds. Cette méthode est compatible avec l'utilisation des

conditions cryogéniques qui permettraient une analyse plus détaillée des échantillons par 3D FIB/MEB.

Lorsqu'on décrit le colmatage, il peut former un gâteau au-dessus de la membrane, ou pénétrer dans les pores. L'interface entre le colmatage et la membrane est donc une zone particulièrement importante, mais délicate à observer étant donné l'échelle considérée (celle des pores). L'accès aux différentes interfaces (colmatage / membrane), avec une très haute résolution (c'est-à-dire avec leur analyse en imagerie (S)TEM) et tout en conservant la structure native de l'échantillon est **le troisième défi relevé dans ce chapitre**. Une des solutions serait d'utiliser la technique de « cryo lift-out » (extraction d'une lamelle dans un échantillon congelé par cryo-FIB) pour préparer l'échantillon et l'observer en cryo-MET. Cependant, cette technique est encore en développement pour de nombreux échantillons et est très difficile à mettre en place²¹⁵. Une méthode alternative doit être mise en place, permettant d'observer à température ambiante des membranes colmatées en MET tout en limitant la déformation due à un séchage de l'échantillon ou à la découpe d'une lamelle observable. Pour pallier ce problème, la technique de QFS (quick freeze substitution, développée par McDonald et al²¹⁶) en combinaison avec la congélation HPF (high pressure freezing) a été adaptée, cette fois pour observer des membranes UF PAN. Une résine de très faible viscosité est nécessaire pour atteindre l'intérieur des pores, en particulier pour la membrane PAN qui présente les pores les plus petits (par rapport à la membrane PES). Cette méthode de caractérisation permet d'étudier les échantillons avec les capacités du (S)TEM et à terme de coupler l'observation aux différentes techniques de spectroscopie disponibles dans le MET, et ainsi, permettre une analyse de haute résolution à température ambiante.

4.2 Matériel & Méthodes

4.2.1 Préparation des solutions de biomolécules

Comme expliqué dans le chapitre 1, l'utilisation de mélanges modèles, plus stables et présentant une composition et des propriétés (conductivité, pH, concentration...) similaires aux mélanges réels, nous permet de reproduire le comportement d'extraits de microalgues pendant la filtration membranaire^{2,11}. Dans cette étude, des solutions de lipides (S_L), de protéines (S_P) et de lipides et protéines mélangés (S_{LP}) ont été utilisées. Les protocoles de préparation de mélanges modèles de biomolécules sont issus des travaux de thèse de Shuli Liu (2021) et sont décrits dans la section 2.2.3 du chapitre 2.

Dans le cas des travaux réalisés en collaboration avec Camille Rouquié présentés dans la section 4.3.1, des émulsions de lipides (S_{L-conc}) ont été préparées pour colmater les membranes. Le protocole est détaillé dans l'article de Clavijo et al²¹⁷ (2020). La composition est similaire à celle de la solution de lipides utilisée dans nos travaux (S_L), mais les lipides sont dix fois plus concentrés.

Le marquage des biomolécules a été testé dans la partie 2.2.4 du chapitre 2 et les mélanges de biomolécules marquées ont été caractérisés par MET et cryo-MEB.

4.2.2 Conditionnement des membranes, filtration membranaire et stockage

Les membranes de microfiltration polymère PES (polyethersulfone, diamètre nominal des pores : 100 nm à la surface) et d'ultrafiltration PAN (polyacrylonitrile, diamètre nominal des pores : 30 nm à la surface) ont été utilisées dans cette étude. Elles ont été conditionnées en amont de leur caractérisation, en suivant la procédure décrite dans la section 2.2.2 du chapitre 2.

Dans le cas des travaux réalisés en collaboration avec Camille Rouquié et présentés dans la section 4.3.1, la solution de lipides (S_{L-conc}) a été filtrée sur une membrane PES, à l'aide du module de filtration tangentielle Rayflow®. La filtration a été stoppée lorsque le flux de perméat, après une diminution progressive, s'est stabilisé (entre 3 et 6 h de filtration), ce qui démontre la formation de colmatage de structure stable. Après la filtration, la membrane a été rincée à l'eau. La même procédure a été appliquée à la membrane PAN, présenté dans la section 4.3.3 pour une solution S_{LP} marquée.

Enfin, dans le cas de la membrane PES colmatée par des biomolécules marquées (présenté en section 4.3.2), une solution S_{LP} marquée a été filtrée à l'aide de la cellule Amicon®. La filtration a été stoppée lorsque le flux de perméat s'est stabilisé (entre 3 et 6 h de filtration), ce qui a démontré la formation de colmatage. Après la filtration, la membrane est rincée à l'eau et conservée dans une boîte hermétique à 4 °C avec un fond d'eau. Il est à noter que les observations par ME doivent avoir lieu le plus rapidement possible pour analyser une membrane colmatée la plus fraîche possible (risque de contamination par des microorganismes ou d'assèchement de la membrane et de son colmatage avec le temps). Les détails de la procédure, ainsi que les modalités de stockage des membranes sont expliqués dans la section 2.4 du chapitre 2.

4.2.3 Préparation des membranes pour la ME

4.2.3.1 Préparation des membranes PES pour le MEB à température ambiante.

Dans la première partie de l'étude, les échantillons fournis par Camille Rouquié ont été déshydratés et métallisés selon la procédure décrite dans la section 2.3.2 du chapitre 2. Deux groupes d'échantillons ont été étudiés, les membranes propres et les membranes colmatées avec la S_{L-conc}

4.2.3.2 Préparation des membranes PES pour le MEB en conditions cryogéniques.

La membrane PES colmatée dans la cellule Amicon® par des biomolécules marquées a été cryofixée par freezing dans de l'azote pâteux. Puis, elle a été coupée à l'aide d'un couteau dans le sas du MEB et métallisée par une fine couche de platine afin de la rendre conductrice. Enfin, elle a été transférée à froid dans la chambre du MEB pour procéder à son observation.

4.2.3.3 Préparation des membranes PAN pour le (S)TEM à température ambiante.

La membrane PAN colmatée par des biomolécules marquées a été préparée avec la méthode QFS, couplée à la cryofixation HPF (EMPACT2, MRic de Rennes). L'eau à l'intérieur de la membrane a été substituée par de l'acétone à basse température (-80 et -90 °C), ce qui permet, notamment, de conserver la structure native des molécules marquées et de la membrane (plus de détail dans le chapitre 2). Cette procédure de préparation de l'échantillon, en raison de la difficulté d'extraire des lamelles cryo au cryo-FIB, est très intéressante comme alternative au

« cryo lift out » pour l'observation de membranes colmatées par MET. En effet, le « cryo lift-out » n'est pas encore disponible dans notre laboratoire et requiert un savoir-faire et des équipements spécifiques. Cette technique a été décrite que très récemment dans la littérature²¹⁵. Concernant la procédure de préparation (HPF+QFS), elle a été appliquée pour la première fois à des membranes colmatées lors de nos travaux.

Pour se faire, un poinçon adapté à la taille du support carrier HPF (diamètre de 1,5 mm) a été utilisé pour couper parfaitement la membrane et un cryoprotectant (dextran®) a été utilisé lors de la cryofixation par HPF. Puis, l'eau contenue dans la membrane colmatée congelée est substituée par de l'acétone à basse température (-80 et -90 °C) en s'appuyant sur les étapes du protocole de QFS décrit par McDonald²¹⁶ en 2011. Enfin, nous avons décidé d'utiliser de la résine acrylique LRwhite, qui est moins visqueuse que les résines habituellement utilisées avec ce type de préparation (résine de type spurr par exemple) qui pénètre plus facilement dans les plus petits pores de la membrane. Par ailleurs, elle a déjà été testée et validée pour l'enrésinement des membranes propres dans le chapitre 3.

4.2.4 Caractérisation par (cryo) microscopie électronique et EDX

4.2.4.1 Caractérisation par MET et EDX à température ambiante

La préparation des échantillons (S_L , S_P et S_{LP}) pour leur observation en MET est décrite dans la section 2.2.2.2 du chapitre 2. Dans un premier temps, les échantillons ont été explorés au H-9000 NAR puis dans un second temps au Nant'Themis. Le premier, plus facile à prendre en main et disponible, a permis de mettre au point et de tester les différents protocoles de contraste. Le deuxième, plus performant, a permis d'obtenir des images STEM avec de meilleures résolutions et de procéder à une analyse EDX adaptée pour la détection de faibles signaux (les microscopes sont détaillés dans la section 2.3.1 du chapitre 2).

Dans les deux cas, l'imagerie MET a été produite avec un faisceau d'électrons incident possédant une énergie de 300 keV et un courant d'environ 8 μ A pour le H-9000NAR (courant mesure sur la cathode) et 4 nA pour le Nant'Themis (courant mesure sur l'écran avec un faisceau étalé). L'imagerie STEM a été acquise à l'aide d'un détecteur HAADF et d'un faisceau incident convergeant avec une énergie de 300 keV et un courant de 65 picoA. Enfin, des cartographies EDX de 512x512 et 1024x1024 ont été acquises avec un dwell time de 10 μ s (entre 70 et 250 passages) et une taille de pixel de 5 à 10 nm. Le logiciel Velox® (version 3.5.0.952) a été utilisé pour traiter les données.

4.2.4.2 Étude du colmatage à température ambiante par MEB-EDX

Les images MEB ont été obtenues en utilisant une tension de 5 keV et un courant de faisceau de ≈ 600 pA. L'imagerie a été réalisée à l'aide de trois détecteurs différents : un détecteur SESI (détecteur d'ions secondaires et d'électrons secondaires) et un détecteur InLens (lentille d'immersion), tous deux utilisés pour détecter les électrons secondaires (SE), ainsi qu'un BSD (détecteur d'électrons rétrodiffusés) pour la détection des électrons rétrodiffusés (BSE). Le détecteur InLens collecte généralement les SE avec une plus grande efficacité et fournit ainsi des images avec un contraste plus élevé que le détecteur SESI^{218,219}. Ces différences, dans la collecte des électrons, ont été utilisées pour distinguer la présence de lipides à la surface des membranes. De plus, le détecteur BSD a fourni des informations supplémentaires en présentant à l'image un contraste chimique de l'échantillon.

L'analyse par EDX a été réalisée à l'aide du spectromètre à dispersion d'énergie ULTIM MAX Large Area SDD de la compagnie Oxford, placé sur le MEB et assisté par le logiciel AztecLive. Les zones analysées par EDX à la surface de la membrane présentaient des images MEB SE et BSE avec un contraste cohérent avec la présence ou l'absence de lipides. L'analyse EDX a été réalisée sur chaque zone d'intérêt (avec le même point d'incidence) en utilisant des énergies de 4, 7 et 10 keV du faisceau d'électrons incident et ≈ 600 pA de courant pendant 50 s d'acquisition. Les spectres résultants ont été tracés en utilisant l'échelle logarithmique, après la normalisation des énergies et des intensités (en les divisant par le produit du courant du faisceau (en nA) et du temps d'acquisition (en secondes) ($0,6 \text{ nA} * 50 \text{ s} = 30$)).

4.2.4.3 Caractérisation par cryo-MEB

Le dual FIB/MEB Zeiss Crossbeam 550, à l'aide du système cryo Quorum® attaché, a été utilisé à cet effet. Les images ont été obtenues avec un détecteur SESI (10 keV, 1000 pA) et une taille de pixel comprise entre 10 et 100 nm. Concernant l'analyse EDX, une énergie du faisceau incident de 7 ou 15 keV, un courant d'environ 1 nA et un dwell time (temps de passage par pixel) de 100 μs ont été utilisés. Il est à noter que l'énergie a été choisie en fonction de l'élément à détecter, la règle étant que l'énergie du faisceau incident doit être au moins 2,7 fois supérieure à l'énergie de la raie d'émission visée¹⁹². Ici, la tension de 15 keV a été choisie pour l'analyse des solutions S_L et S_{LP} , qui contiennent du Lanthane (La, présent dans l'Uranyless®, raie d'émission α à 4,6 keV), et celle de 7 keV pour l'analyse de la S_P qui contient du tungstène uniquement (W, présent dans le PTA, raie d'excitation α à 1,7 keV).

4.3 Résultat

4.3.1 Identification de colmatage de surface et interne par MEB/EDX

Dans cette partie, une méthode d'identification des zones de colmatage externe par MEB, en utilisant le contraste généré par différents détecteurs (SE : SESI et Inlens, BSE), est proposée pour une membrane PES colmatée de lipides. Une caractérisation rapide du colmatage interne et externe par MEB-EDX a également été réalisée. Cette méthode a été utilisée (et valorisée dans l'article « NaCl precleaning of microfiltration membranes fouled with oil-in-water emulsions: Impact on fouling dislodgment » par Rouquié, [...], Roberge et al, (2022)) pour comparer les différentes conditions de nettoyage des membranes colmatées (non montré ici). Notamment, elle nous a permis de mesurer la quantité relative de carbone (associé ici à des biomolécules colmatées) à l'intérieur des échantillons.

La figure 4.1 (i) montre des images MEB de la surface d'une membrane propre et d'une membrane colmatée avec une émulsion d'huile (lipides) (membrane B) acquises à température ambiante après déshydratation des échantillons. Les images ont été obtenues en utilisant le détecteur Inlens à faible grandissement. Le contraste des images InLens a été comparé aux images obtenues à l'aide du détecteur SESI (Inlens et SESI étant des détecteurs d'électrons secondaires) et aux images BSE (électrons rétrodiffusés) (images de la membrane B à fort grandissement, 'B high-mag'). Par rapport aux images SESI, le détecteur InLens fournit des images d'échantillons non préalablement marqués²¹⁸ à plus haute résolution et à plus fort contraste, en particulier avec de faibles tensions et de petites distances de travail²¹⁹, comme celles utilisées dans ce travail (voir la section Matériel et Méthodes de ce chapitre).

Notamment, des taches sombres sont observées sur les images InLens de la surface de la membrane B en (i). Les mêmes taches n'ont pas été observées sur la membrane de référence et sont donc cohérentes avec la présence de lipides sur la surface de la membrane colmatée. De plus, ces zones plus sombres sont également visibles en utilisant le détecteur BSD (détecteur d'électrons rétrodiffusés) (Fig. 4.1(i), B high-mag), mais sont absentes dans les images SESI. Un tel contraste est cohérent avec la présence de dépôts de matériaux formés par des éléments légers sur la surface, comme le colmatage des lipides. Suivant cette interprétation, le colmatage a été révélé par des taches, ou patchs sombres, par le détecteur InLens, à la surface de la membrane.

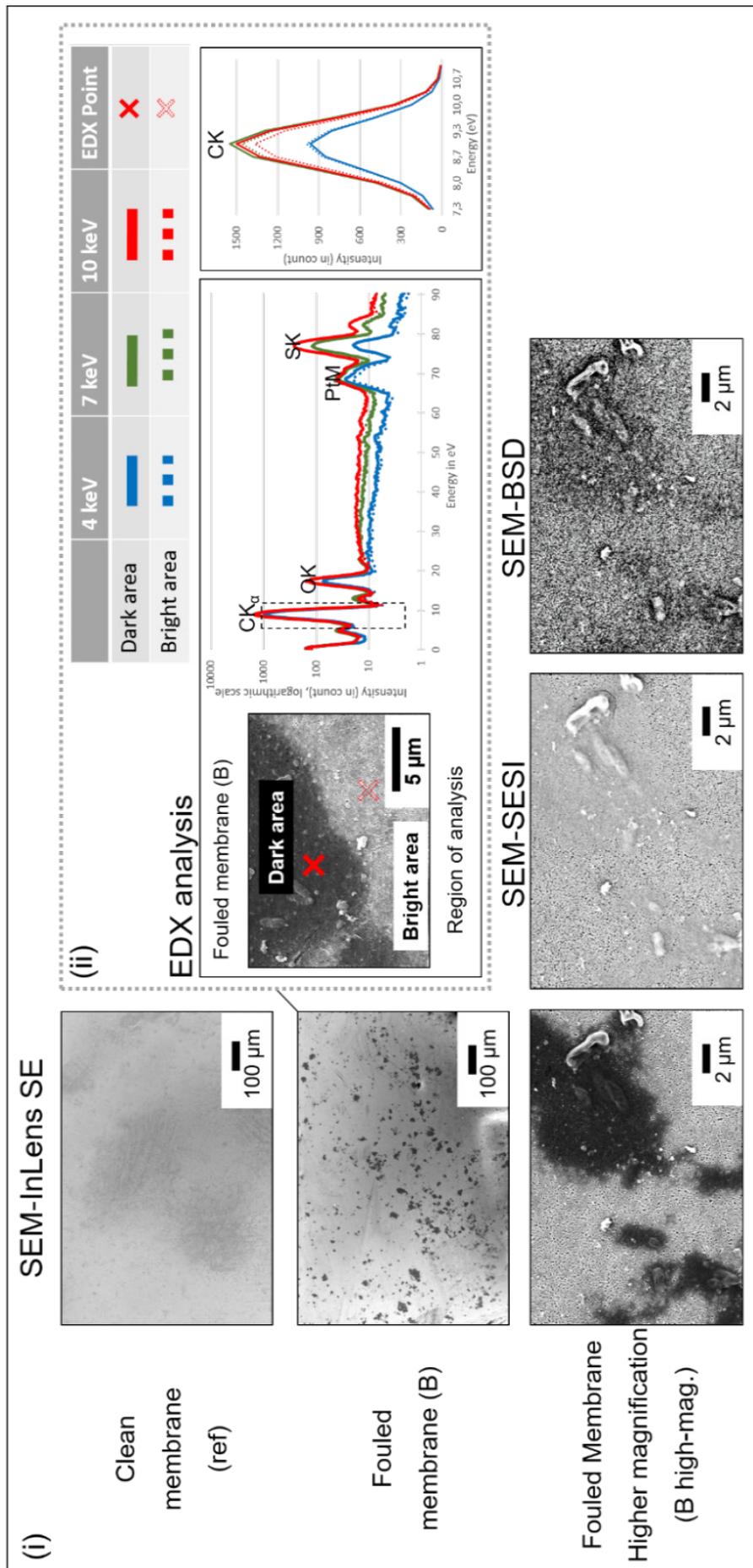


Figure 4.1 : EM observations and EDX analysis of clean and fouled (B) membrane surfaces. (i): InLens SE images surface information on the distribution of lipid fouling at specific points on the surface of the B-membrane. Images at higher magnification, $M = 5\,000\times$, (B high-mag) show a comparison of the contrast observed from an area displaying the darker contrast, consistent to the lipid fouling in SEM images with the InLens SE detector and two more detectors for SE (SESI) and BSE (BSD). (ii): EDX analysis of dark (solid line) and bright (dotted line) areas by focusing the electron beam at an incident point (signaled by a X in the region of analysis pictures) and collecting the X-rays emitted. Spectra were acquired with 4, 7 and 10 keV of energy and $\approx 600\text{ pA}$ of current during 50 s of acquisition. Enlarged view of the carbon K α intensity peaks indicated with a dotted rectangle in the full EDX spectra are also shown. This figure is modified from Rouquié, [...], Roberge et al, Separation and Purification Technology (2022).

Ce dépôt hétérogène (formation de patch) n'est pas un film homogène tel qu'on aurait pu le supposer lors de la filtration d'une émulsion concentrée.

Afin d'étudier la composition chimique des dépôts et d'obtenir des informations non seulement de la surface des membranes, mais aussi de l'intérieur des membranes, une analyse EDX a été réalisée.

La figure 4.1 (ii) présente les spectres EDX réalisés sur une zone sombre (lignes pleines) et une zone claire (lignes pointillées) identifiées sur les images InLens de la membrane colmatée (B). Les spectres ont été acquis à 4 keV (lignes bleues), 7 keV (lignes vertes) et 10 keV (lignes rouges). Pour cette analyse, le faisceau d'électrons a été focalisé sur un point incident de la surface de la membrane (signalé par un X sur l'image de l'insert) et les rayons X émis ont été collectés. Les spectres montrent les intensités caractéristiques du carbone (énergie de la raie CK), de l'oxygène (énergie de la raie OK), du soufre (énergie de la raie SK) et du platine (énergie de la raie PtM) recueillies sur la plage d'énergie 0-90 eV. Du fait que l'EDX est moins efficace sur les éléments légers, ces derniers peuvent être détectés quand leur concentration est relativement élevée et que leurs intensités ne se superposent pas à des pics plus forts provenant d'autres espèces chimiques. Notamment, le phosphore (P), présent en faible concentration dans les phospholipides, est tombé en dessous de la sensibilité de notre détecteur. L'analyse EDX révèle que les zones sombres et claires à la surface de la membrane B présentent une détection similaire des éléments légers (pic de carbone, d'oxygène et de soufre). Ces éléments font partie de la membrane PES. Les lipides contiennent également du C et de l'O. Afin d'étudier les variations locales de la teneur en carbone (qui peut être directement liée à la présence de lipides) à la surface et à l'intérieur de la membrane, les intensités relatives du pic CK mesurées à 4 keV, 7 keV et 10 keV sur les des zones claires et sombres de la membrane B, ont été comparées entre elles.

La figure 4.1 (ii) montre une vue agrandie de la plage d'énergie 7,3-10,7 eV, comprenant l'intensité caractéristique $CK\alpha$ pour la membrane colmatée de lipides B. La profondeur à laquelle les rayons X analysés ont leur origine dans la membrane est proportionnelle à l'énergie du faisceau d'électrons incidents (plus l'énergie du faisceau est élevée, plus le spectre est produit par des rayons X provenant d'une zone profonde dans l'échantillon^{16,17}). Ici, nous avons comparé les spectres EDX à 4 keV (rayons X provenant de zones proches de la surface de la membrane) avec les spectres à 7 keV et 10 keV, où l'information proviendrait de zones plus profondes à l'intérieur de la membrane.

Tout d'abord, en comparant l'intensité des pics CK de la zone claire et de la zone sombre, la Fig. 1 (ii) indique que moins de carbone est détecté dans la zone claire que dans la zone sombre. Cela confirme le lien entre le colmatage de lipides et les zones sombres (patch observé sur les images InLens). La différence entre zones claires et zones sombres est aussi observée aux plus fortes intensités de faisceaux, donc en profondeur. Ces observations sont cohérentes avec la présence d'un dépôt à la surface de la membrane (riche en carbone et visible sous forme de patches sombres sur les images InLens), mais aussi avec la présence d'un colmatage, riche en C, à l'intérieur de la membrane et à différentes profondeurs dans les zones sombres.

Ainsi, l'analyse MEB couplée à l'EDX confirme la présence de colmatage de lipides sous forme de patches (dépôt hétérogène) à la surface et à l'intérieur de la membrane. Cependant ces analyses suscitent également des questions : peut-on différencier les biomolécules entre elles si l'on filtre cette fois un mélange de protéines et de lipides ? Est-ce que le dépôt sous forme de patches est dû au séchage de l'échantillon avant analyse ? À quelle profondeur descend le colmatage ? Quel est son impact sur la structure du milieu poreux et donc sur les performances de la filtration ? Une partie de ces questions seront abordées dans les parties suivantes, puis dans le chapitre 5 grâce à l'étude de volumes 3D par FIB/MEB couplé aux conditions cryogéniques.

4.3.2 Différenciation des lipides et des protéines dans le colmatage des membranes à l'aide de techniques de marquage des métaux lourds et de cryo- MEB

Dans cette partie, la mise au point d'une technique de marquage par métaux lourds est présentée pour l'identification et la différenciation des biomolécules (lipides et protéines) qui constituent le colmatage des membranes. Le choix des contrastants les plus adaptés, le protocole et l'optimisation de cette technique sont détaillés. Un rehaussement général du contraste des biomolécules et du colmatage, par rapport à la membrane de filtration polymère, a été accompli. Les deux types de biomolécules marquées sont observés seuls puis à la surface d'une membrane de MF PES colmatée. Pour la première fois d'après nos connaissances, le marquage permet de différencier les lipides et les protéines au MET et au cryo-MEB, non seulement au sein d'un mélange, mais aussi au sein du colmatage d'une membrane. Cette technique offre donc la possibilité de contraster nos échantillons et peut être appliquée dans de nombreux domaines,

non seulement pour l'imagerie MET mais aussi pour l'imagerie MEB, avec les conditions cryogéniques ou non.

4.3.2.1 Identification et sélections des contrastants

L'uranium et le plomb sont les contrastants les plus utilisés en microscopie électronique. Les techniques considérées comme standard pour le marquage des échantillons en ME utilisent l'acétate d'uranyle (UA) et le citrate de plomb. Cependant, l'UA est désormais indisponible à la vente en raison de sa nature radioactive (rayonnement α) et le citrate de plomb est souvent utilisé dans un deuxième temps, pour rehausser le contraste d'un premier contrastant. Pour pallier cela, des composants comme l'Uranyless® (pour remplacer l'UA, contenant du Lanthane La) ont été créés. Des composants d'autres familles (comme l'Osmium, le Ruthénium et l'acide phosphotungstique PTA,) étaient déjà disponibles sur le marché et connus pour avoir des affinités avec les matériaux biologiques¹⁴⁴.

Dans cette étude, l'OsO₄, le RuO₄, l'Uranyless® ainsi que le PTA ont été testés pour contraster les biomolécules en microscopie électronique. Les observations des biomolécules marquées ont été réalisées par STEM/EDX après dépôt et séchage de l'échantillon sur une grille de MET. La démarche suivie pour déterminer le meilleur contrastant est présentée dans la section 2.2.4 du chapitre 2. Après plusieurs tests (0,5, 1 et 2%) sur S_L et S_P, la concentration de 1% de contrastant a été retenue pour le marquage des biomolécules en ME (section 2.2.4 du chapitre 2).

Table 4.1 : Comparison of the different staining agents selected and tested in this work, showing their ability or inability to stain specific biomolecules or polymer (X), according to the literature (indicated by a citation) and to the experiments performed during this work (indicated by: "[this work]"). The CMR nature of the product as well as the possibility of detection by EDX using the Super X detector in the Nant'Themis were also indicated.

Staining		Uranyless® (with La)	Osmium tetroxide (OsO ₄)	Ruthenium tetroxide (RuO ₄)	phosphotungstic acid (PTA) (with W)
Membrane	PES	X ¹⁴⁵	✓ ²¹⁴	✓ ²¹⁴	X ¹⁴⁵
	PAN	X ¹⁴⁵	X ²¹⁴	X ²¹⁴	✓ ²²²
Biomolécules	Lipid	✓ ¹²⁷ ; [this work]	✓ ¹⁴⁴ ; X [this work]	✓ ¹⁴⁴ ; X [this work]	X ^{127,147}
	Protein	✓ ^{147,214} ; [this work]	X ¹⁴⁴	X ¹⁴⁴	✓ ^{144,149} ; [this work]

	CMR ^a	No	Yes	Yes	No
	EDX (TEM)	Yes (La, Gd)	Yes (Os)	Yes (Ru)	Yes (W)

a: Carcinogenic, Mutagenic or Toxic to Reproduction.

Dans le tableau 4.1 sont présentés les différents candidats envisagés pour contraster les biomolécules. On y résume les résultats trouvés dans la littérature et dans ce travail (présenté ci-dessous). Les différents contrastants ont été comparés en fonction de leur capacité à contraster les lipides, les protéines, mais aussi les polymères PAN et PES, qui sont les constituants des membranes de filtration. Le but était d'obtenir le marquage le plus spécifique possible. La nature CMR des contrastants, et leur capacité à être détectés en spectroscopie EDX ont également été prises en compte.

Bien que l'Osmium (OsO_4) et le Ruthénium Tetroxyde (RuO_4) aient été envisagés pour contraster les lipides au début de ces travaux (d'après Hayat et al, 1975¹⁴⁴), les résultats préliminaires ont mis en évidence une dégradation des biomolécules lors de leur marquage avec ces composés (montré dans la figure 4.2a). De plus, leur caractère CMR aurait compliqué les expérimentations, incluant la mise en place d'un traitement particulier des déchets et des outils. Ainsi, le OsO_4 et le RuO_4 ont été écartés.

Concernant l'Uranyless®, il est communément utilisé en ME pour contraster les échantillons biologiques et par conséquent il est compatible avec les biomolécules utilisées dans cette étude (lipides et protéines). Cette compatibilité a été vérifiée, avec succès, pour les deux types de biomolécules. Cependant, bien qu'il permette de rehausser le contraste général des biomolécules, un deuxième contrastant est nécessaire pour différencier les lipides des protéines. Enfin, le Phosphotungstic acid (PTA) est décrit dans la littérature pour cibler spécifiquement les protéines et non les lipides. Après vérification de cette propriété, le PTA a été choisi pour contraster les protéines et l'Uranyless® pour contraster les lipides (surlignés en gris dans le tableau 1). Il convient de noter que ces deux contrastants sont faciles d'emploi, bon marché, détectables en spectroscopie EDX et non CMR.

Étant donné les propriétés sélectives du PTA (voir tableau 1), il a été envisagé de l'utiliser directement dans une solution S_{LP} , contenant les biomolécules déjà mélangées, pour marquer uniquement les protéines (montré dans la figure 4.2 b). Malheureusement, les agrégats sont déjà formés par les interactions entre les lipides et les protéines, et le PTA, qui cible les protéines, se fixe autour de l'ensemble et ne permet pas de différencier les biomolécules au sein de ces agrégats. Il permet néanmoins un rehaussement général du contraste des biomolécules.

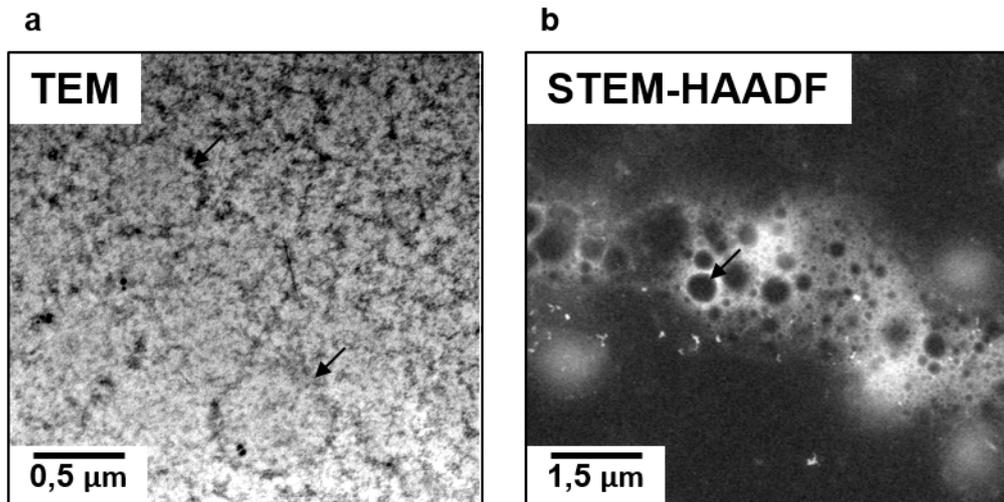


Figure 4.2 : The different tests that failed during the development of the staining protocol. Note : contrast are inverted in the case of STEM-HAADF images (staining appear bright instead of dark in TEM imaging). (a) staining of lipids with OsO_4 , resulting in degradation of the biomolecules. And (b), staining of proteins with PTA in a solution containing lipids and proteins. PTA appears in clear and seems to attach to the protein-containing areas around the lipids. In both cases, the lipids are indicated with black arrows.

4.3.2.2 Rehaussement du contraste d'image pour l'imagerie MET

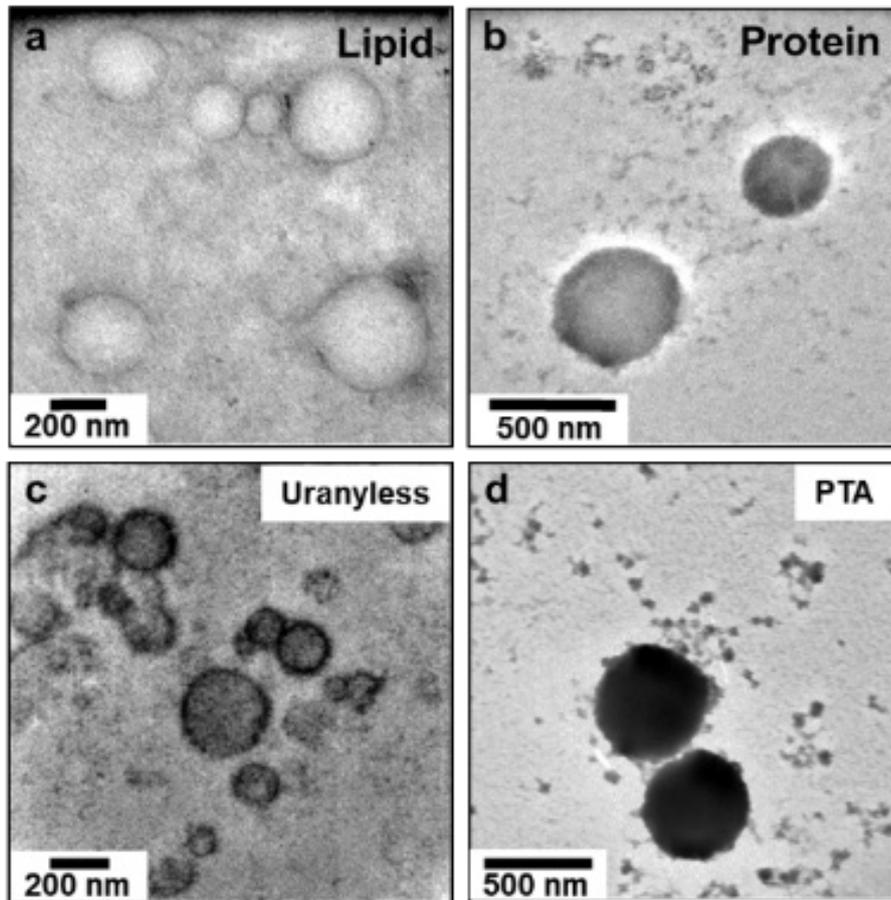


Figure 4.3 : Images MET de lipides (à gauche) et de protéines (à droite) sans (1a et 1b) et avec (1c et 1d) l'ajout de contrastant, ici de l'Uranyless® pour les lipides et du PTA pour les protéines.

La figure 4.3 montre des images de lipides (à gauche) et de protéines (à droite) avant et après leur contraste avec respectivement de l'Uranyless® et du PTA. Les images ont été obtenues par MET. Dans la figure 4.3c, les lipides présentent un contraste plus important qu'en figure 4.3a. De même, la figure 4.3d présente des protéines plus contrastées que la figure 4.3 b. Plus généralement, en comparant les images sans et avec contrastant, dans le deuxième cas, un rehaussement global du contraste, ainsi qu'une meilleure distinction des biomolécules sont constatés. Ainsi, en accord avec les objectifs décrits précédemment, l'usage de l'Uranyless pour contraster les lipides et du PTA pour contraster les protéines (séparément) est validé en imagerie MET.

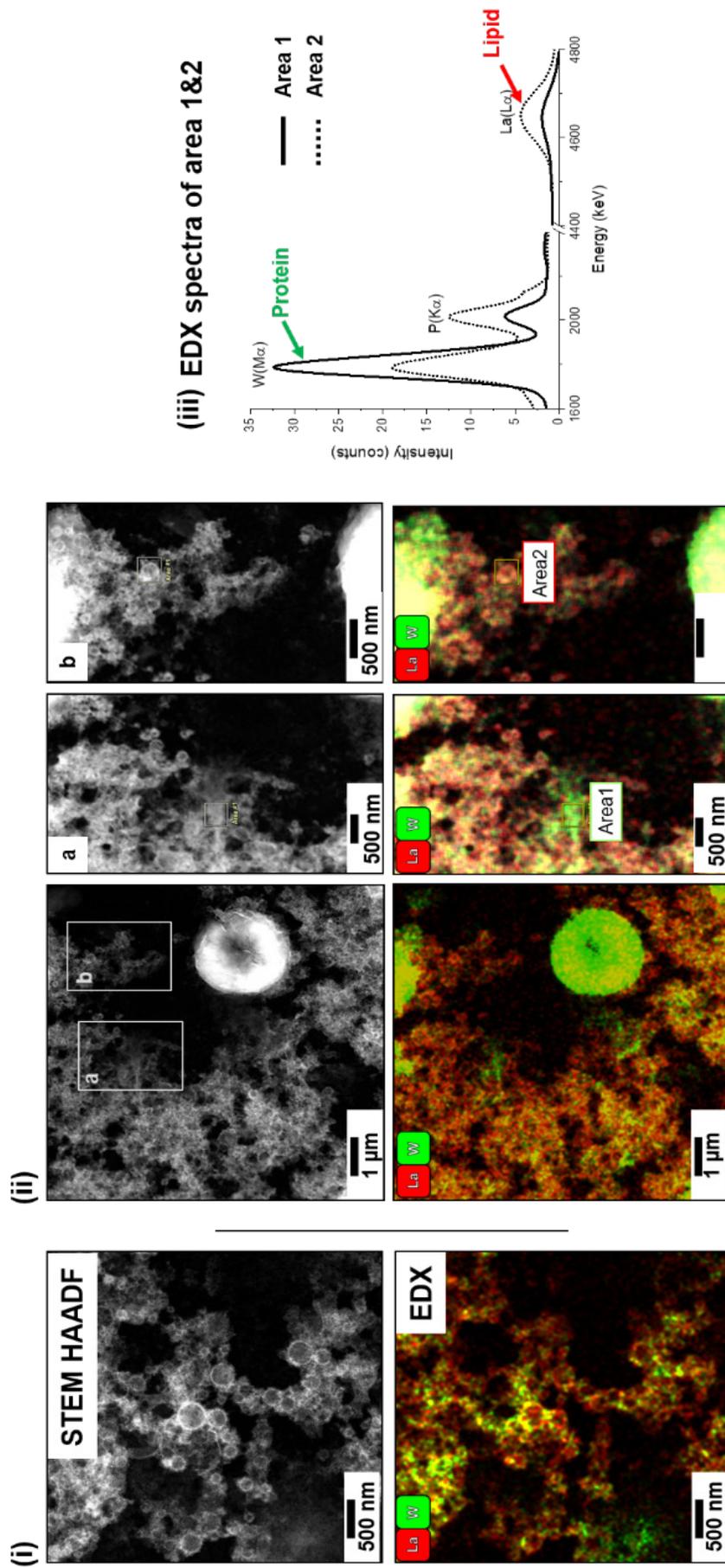


Figure 4.4 : Image STEM HAADF (i) et analyse EDX (ii et iii) d'une solution mélange de lipides et de protéines marqués.

4.3.2.3 Identification des lipides et des protéines mélangées par HAADF STEM et EDX

Dans cette sous-section, la technique d'imagerie STEM HAADF a été utilisée, car, comme mentionné précédemment, elle a la particularité d'afficher des images avec un contraste lié en partie à la nature chimique de l'échantillon. Ainsi, pour une épaisseur d'échantillon homogène, plus les éléments qui composent l'objet imagé ont un numéro atomique Z élevé, plus ils apparaissent clairs à l'image (le champ étant sombre). Dans le cas des biomolécules marquées avec des métaux lourds, un contraste général important est observé.

La figure 4.4(i) montre deux régions d'un même échantillon, un mélange de lipides et de protéines préalablement marqués, respectivement à l'Uranyless® contenant du Lanthane (La) et au PTA contenant du Tungstène (W). Les images a et b sont des agrandissements des zones limitées par un rectangle gris. Les images ont été obtenues en STEM avec un détecteur HAADF (plus de détails dans la partie 2 du chapitre 2). D'un point de vue général, les objets observés présentent un contraste important. La majorité d'entre eux sont de forme circulaire. Parmi ces derniers, une grande partie présente des contours contrastés avec une taille comprise entre quelques nanomètres et quelques centaines de nanomètres de diamètre. Au vu des précédents résultats, ces sphères avec les contours marqués pourraient être des lipides. On observe également d'autres objets, soit, de forme sphérique avec un contraste homogène, soit, sous forme de filament, disposé autour des sphères (supposé être des lipides ici). Ces objets (sphères homogènes et fibres) présentent une taille comprise entre quelques nanomètres à quelques micromètres de diamètre ou largeur. Ces objets pourraient être associés à des protéines. Un certain contraste chimique est présent grâce aux différents marqueurs utilisés et on observe des différences de taille et de morphologie. Cependant, étant donné les fortes interactions présentes dans les mélanges complexes rapportées dans la littérature^{19,20}, il est très difficile d'identifier de façon sûre les biomolécules contenues dans chaque objet en se basant uniquement sur le contraste. Dans le but de les séparer, une analyse EDX a été réalisée.

La figure 4.4 (ii) présente une superposition de cartographies EDX obtenues pour les zones imagées en STEM (figure 4.4 (i)) avec le Lanthane (La) en rouge et le Tungstène (W) en vert. Ces éléments sont présents, respectivement, dans l'Uranyless® (utilisé pour marquer les lipides) et le PTA (marquage des protéines) (voir tableau 1).

D'un point de vue général, des zones contenant des sphères avec le contour contrasté sont marquées en rouge (La), en cohérence avec la présence de lipides (visible sur l'image à gauche

et le zoom b). Cependant, des zones vertes (W), supposées être des protéines, sont aussi observées sur et autour des lipides. Des zones exclusivement vertes sont également observées, comme le globule en bas à droite de la deuxième image ou le zoom b, et sont cohérentes avec la présence de protéines. Il est à noter que certaines régions deviennent jaunes, témoignant de la présence de lipides et de protéines dans la même zone. Ainsi, ces résultats sont en adéquation avec les observations précédentes et mettent en évidence l'interaction complexe entre les lipides et les protéines. En considérant le marquage par métaux lourds fiables, l'analyse des régions révèle la position des lipides (en rouge) et des protéines (en vert) dans l'image. Néanmoins, en vue des fortes interactions entre les biomolécules (mélange du rouge et du vert), des spectres EDX ont été acquis dans des régions spécifiques.

La figure 4.4iii présente le spectre EDX extrait de l'analyse de la zone 1 (Area 1, une zone riche en protéines marquées au PTA, en vert) et de la zone 2 (Area 2, une gouttelette de lipides marquée à l'Uranylless®, en rouge). L'énergie d'un pic (axe des abscisses) est spécifique pour chaque élément et l'intensité de chaque pic (axe des ordonnées) est liée à la quantité de l'élément présente dans la zone étudiée (plus de détails en chapitre 2). Dans la zone 1, riche en protéines, un pic de W avec une intensité importante est observé et la présence d'un pic de La d'intensité moindre est relevée. Tandis que dans la zone 2, riche en lipides, on observe également un pic W, mais avec une intensité moins importante que dans la zone 1 et un pic de La avec une intensité plus élevée. La présence du pic de W dans la zone de lipide témoigne de l'existence de protéines dans la même région, et confirme les interactions entre les biomolécules.

Ainsi, en accord avec les observations précédentes, le marquage par métaux lourds permet de rehausser le contraste général des biomolécules et de différencier des groupements d'objets, supposément des lipides et des protéines, selon leurs morphologies, contraste et taille en STEM. Puis, par cartographie EDX, on observe la répartition des métaux lourds et par conséquent une différenciation entre les lipides et les protéines est possible. Enfin, l'analyse d'une zone précise avec l'acquisition d'un spectre EDX permet, en cas de doute, de confirmer la présence des marqueurs spécifiques des biomolécules observées.

Une fois les marqueurs des biomolécules identifiés, il convient de vérifier si cette observation est possible au sein du colmatage des membranes.

4.3.2.4 Identification des lipides et des protéines sur une membrane colmatée par MEB et EDX en conditions cryogéniques

Dans cette partie, une membrane PES colmatée par un mélange modèle de biomolécules marquées dans la cellule Amicon® est caractérisée. L'objectif est de réaliser une observation en MEB/EDX pour permettre de différencier les biomolécules. Pour que la structure du colmatage soit la plus proche possible de la structure réelle, il est alors nécessaire de mettre en place les conditions cryogéniques.

La figure 4.5 présente des images de section transverse d'une membrane de filtration PES colmatée avec une solution de biomolécules marquées. Les images ont été obtenues par imagerie MEB (SE) en conditions cryogéniques (partie haute de la figure) et par analyse EDX (partie basse de la figure). Les rectangles rouges identifient les zones agrandies à droite de la figure. Pour les images de cryoMEB, la membrane colmatée a été fracturée, après sa congélation, à l'aide d'un couteau monté sur pivot dans le sas cryo du MEB afin d'observer l'intérieur du milieu poreux. Ainsi, les différentes couches de la membrane sont visibles. Notamment, une couche de biomolécules de quelques micromètres d'épaisseur est observée au-

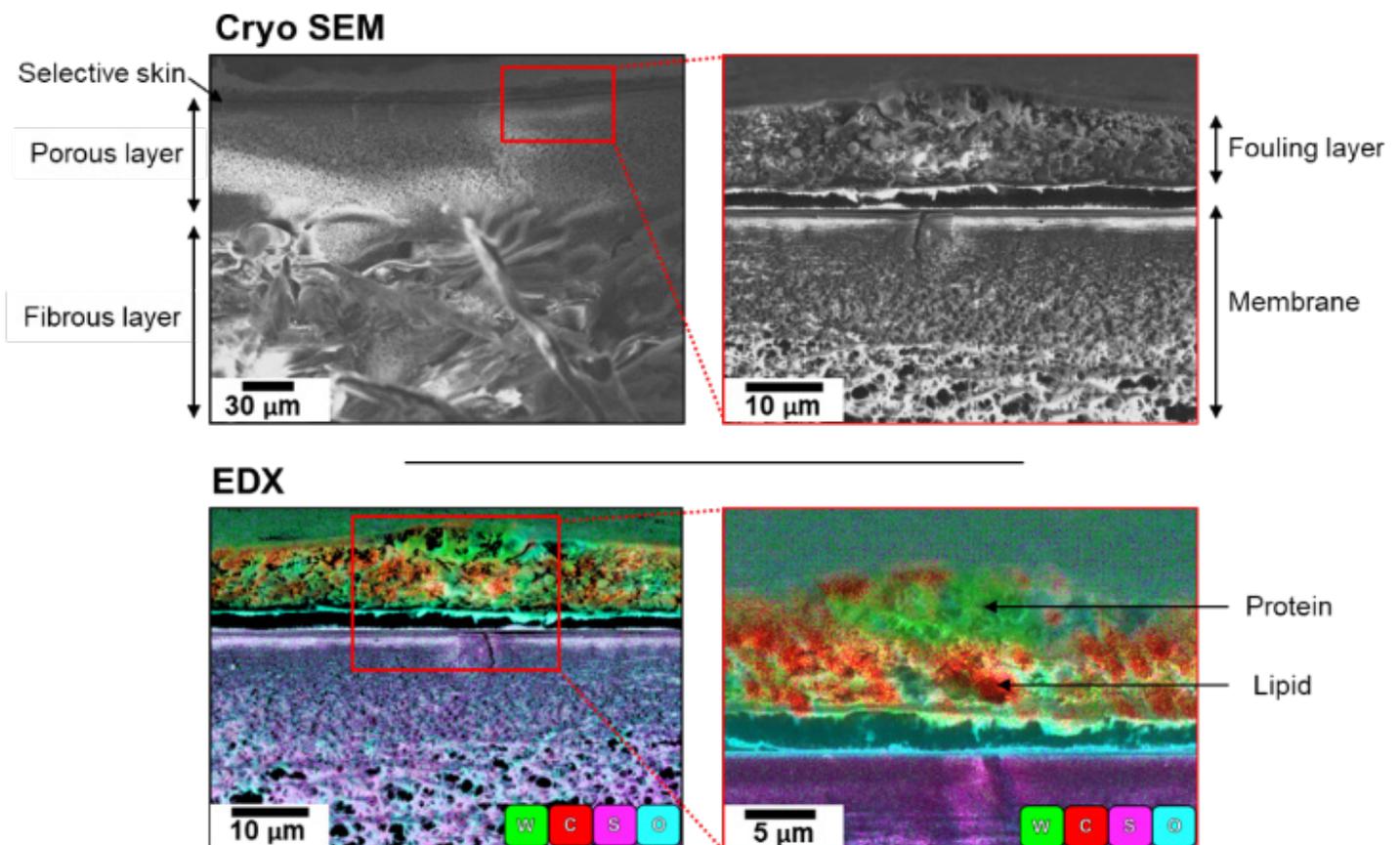


Figure 4.5 : Image au cryo-MEB et analyse EDX de cross section d'une membrane PES colmatées avec des biomolécules marquées. Remarque : le C est en rouge sur cette image (contre La en rouge sur la figure 4.4).

dessus de la couche sélective. On observe ici un colmatage externe qui peut être décrit comme un « gâteau » de biomolécules²²³. En cohérence avec les observations précédentes, il est difficile de différencier, grâce aux images de cryo-MEB (SESI) seulement, les lipides et les protéines dans cette couche de colmatage. Nous notons qu'il en est de même pour les images acquises avec les détecteurs InLens et BSE (non montré).

La partie basse de la figure 4.5 montre une superposition de cartographies EDX avec le tungstène (W) en vert, le carbone (C) en rouge, le soufre (S) en rose et l'oxygène (O) en bleu. Il est à noter que la présence homogène d'oxygène dans l'image est due aux conditions cryogéniques (présence de glace et donc d'eau partout). Concernant le soufre, il s'agit de l'un des éléments qui composent la membrane PES et il n'est que peu présent dans les biomolécules. Ainsi, la délimitation de la membrane dans l'espace est possible grâce au signal du soufre. L'analyse révèle la position des protéines (en vert). Cependant le Lanthane (La), le marqueur des lipides, n'a pas pu être détecté. Cela semble être dû à sa concentration trop faible (il passe ainsi en dessous de la sensibilité du détecteur EDX utilisé dans le MEB) ou à l'orientation de l'échantillon dans la chambre MEB.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, la sensibilité du détecteur a été évaluée en analysant, avec le MEB, la grille MET présentée dans la figure 4.4. Le Lanthane n'a pas été détecté par le détecteur EDX du MEB sur cette grille contrairement aux analyses MET précédentes. Par conséquent, bien que l'Uranyless® soit pertinent pour la différenciation des biomolécules au MET, la configuration d'analyse MEB ne le permet pas.

Cependant, les lipides peuvent être cartographiés sans marquage en utilisant le signal du C (en rouge) sur la cartographie EDX. En effet, la figure 4.5 révèle la présence d'un signal de carbone, de manière complémentaire à celui des protéines, dans le gâteau de colmatage formé à la surface de la membrane. Ainsi, en sachant que les lipides sont majoritairement constitués de C, nous proposons d'identifier les gouttelettes de lipides parmi les biomolécules de la couche de colmatage, grâce au pic de carbone acquis lors de l'analyse EDX.

On observe donc ici un colmatage en surface, qui contient des protéines et des lipides que l'on peut observer dans toute l'épaisseur du colmatage. Les protéines semblent être présentes autour des globules, mais aussi dans des zones plus concentrées. On observe également un espace entre le gâteau et la membrane, qui semble constitué d'eau. Il est possible que les premiers essais de cryogénéisation d'échantillon aient provoqué un décollement. Une étude plus approfondie de l'interface serait complémentaire.

4.3.2.5 Compatibilité entre la méthode de marquage et les différents modules de filtration

Pour une raison que l'on ignore, la technique de marquage présentée ici n'a pas fonctionné avec le module de filtration tangentielle. C'est pourquoi une attention particulière doit être portée ici sur la compatibilité entre la technique de marquage par métaux lourds des biomolécules et l'utilisation des modules de filtration.

Les analyses MEB-EDX des membranes colmatées au sein du module de filtration tangentielle par des biomolécules marquées révèlent une absence du pic de W, et ce, pour les trois solutions (S_L , S_P et S_{LP}). Dans le but de comprendre ces résultats, un test a été réalisé. Lors de la filtration d'une solution S_{LP} marquée (l'Uranyless® et PTA) au travers d'une membrane de MF PES et en utilisant le module de filtration tangentielle, nous avons réalisé plusieurs prélèvements dans le rétentat, avant, pendant et après la filtration. Ces échantillons de solution ont ensuite été congelés et analysés en cryo-MEB-EDX. Concernant la solution prélevée avant la filtration, un pic de W est présent sur l'analyse EDX. Le PTA est donc observé sur les protéines de la solution, comme dans la figure 4.5 de cette étude. Néanmoins, le pic de W diminue en intensité et disparaît lors de l'analyse des solutions prélevées respectivement pendant et à la fin de la filtration. La différenciation des biomolécules devient alors impossible avec l'analyse MEB-EDX. Ainsi, ces résultats nous permettent de conclure sur l'incompatibilité du module tangentielle de filtration avec la technique de marquage présentée dans ce chapitre.

Malgré ces difficultés, le couplage entre marquage des biomolécules et l'usage du cryo-MEB/EDX donne des résultats très encourageants pour la caractérisation des membranes colmatées. Ces travaux pourront être approfondis dans le cadre de projets futurs.

4.3.3 Accès à l'interface colmatage/membrane à haute résolution par STEM-HAADF et HPF suivi de QFS

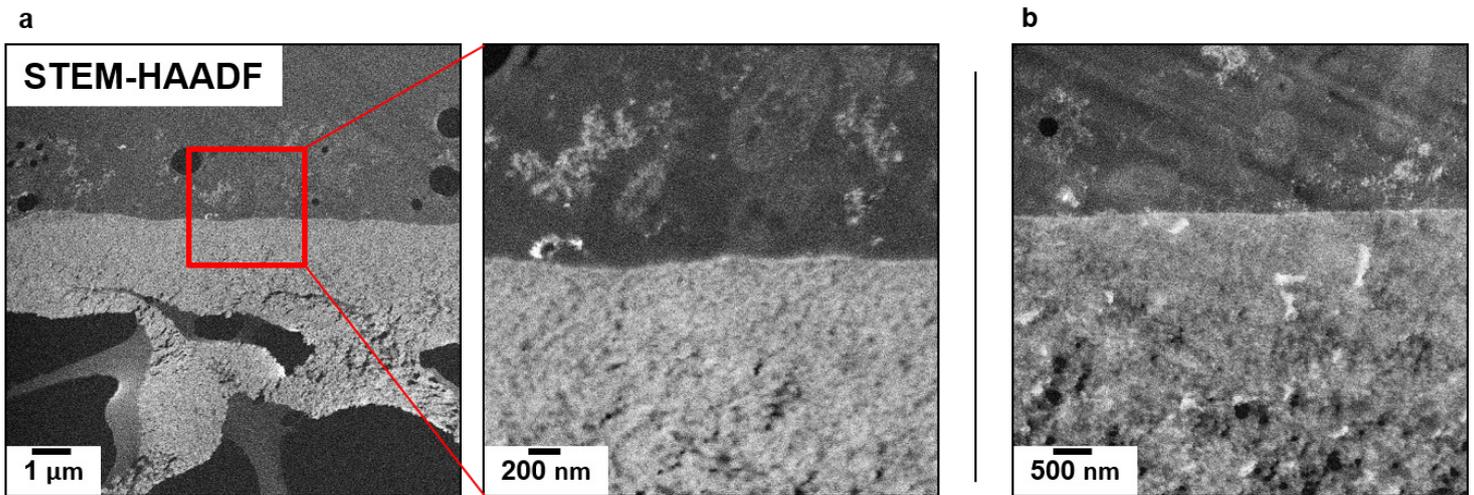


Figure 4.6 : Coupes transversales d'une membrane PAN colmatées avec des lipides et des protéines marquée (module Ray-flow®). La membrane a été préparée par QFS après une cryofixation par HPF et elle est observée en STEM HAADF. (a) Vue d'ensemble de la coupe et zoom sur la zone montrée par le rectangle rouge. (b) Surface de la membrane, dans une région différente de (a).

Dans cette partie une méthode utilisant la substitution rapide à froid (QFS) en combinaison avec la congélation à haute pression (HPF) pour préparer les membranes colmatées est testée avec cette fois la membrane PAN. Elle nous permet d'accéder à la caractérisation par (S)TEM à haute résolution de l'interface entre la membrane et le colmatage. En outre, cette méthode propose une alternative plus simple au « cryo lift-out » suivie de l'imagerie par cryo-MET.

La figure 4.6 montre des images STEM HAADF de la membrane PAN colmatée avec des lipides et des protéines marqués (Uranyless® et du PTA) et en utilisant le module de filtration tangentielle. Les images ont été obtenues sur une coupe enrésinée de la membrane PAN colmatée, après sa cryofixation par HPF et sa préparation par QFS (plus de détail dans la section 2.4.4 du chapitre 2).

Dans la figure 4.6a, une vue d'ensemble d'une section de la membrane PAN est présentée, le rectangle rouge identifie la zone agrandie à droite de la figure. Une autre zone de la surface de la membrane est présentée en figure 4.6 b. Un ensemble d'objets, en ce cas des biomolécules, est observé sur la surface (quelques micromètres d'épaisseur). Bien que l'on puisse distinguer les détails de la structure de différentes biomolécules, celles-ci sont peu contrastées. D'après le contraste, le marquage n'est pas réparti de manière homogène, avec des zones présentant une

concentration plus élevée, en particulier à l'intérieur des échantillons. Nous notons également une distribution hétérogène des molécules faisant partie du gâteau à la surface de la membrane.

Par cette analyse, on voit le colmatage à l'interface avec la membrane, sans décollement, contrairement à la partie précédente. Ces premiers essais sont riches de perspectives. La méthode de substitution est très intéressante pour obtenir des échantillons enrésinés et compatibles avec une analyse à température ambiante, sans destruction de la structure. Cependant l'analyse EDX n'a pas pu être réalisée sur ces échantillons et il reste à valider la compatibilité avec le marquage des biomolécules pour les identifier au sein du colmatage sur des lames de MET.

4.4 Conclusion

En conclusion, plusieurs techniques de ME ont été présentées dans le but de caractériser le colmatage des membranes de filtration. Dans un premier temps, une étude MEB-EDX de la surface d'une membrane colmatée nous a permis de mettre en évidence les zones de colmatage sous forme de patch (dépôt hétérogène) grâce au contraste de l'image (colmatage externe). En outre, des informations qualitatives sur le colmatage interne de la membrane ont été obtenues par spectroscopie EDX.

Dans un deuxième temps, une technique de marquage des lipides et des protéines avec, respectivement, de l'Uranyless® et du PTA, a été développée. Cette technique, primordiale pour pallier le faible contraste des biomolécules, permet de les différencier au sein du colmatage des membranes de filtration. La technique de marquage par métaux lourds, développée dans cette étude, nous permet de :

- Rehausser le contraste général des biomolécules en imageries MET et MEB.
- Différencier les lipides et les protéines seuls, puis mélangés en solution, en imagerie MET et spectrométrie EDX.
- Et, pour la première fois, de différencier les lipides et les protéines accumulées à la surface d'une membrane de filtration, en cryo-MEB et spectrométrie EDX.

Malgré le fait que le Lanthane passe en dessous des limites de détection du MEB utilisé, il est tout à fait possible de le détecter avec un appareil adapté (ce qui a été le cas lors de l'analyse avec notre MET). Si on souhaite aller plus loin et connaître, par exemple, la distribution spatiale des différents types de biomolécules dans le colmatage, une acquisition 3D par FIB/MEB

couplée à la spectrométrie EDX et aux conditions cryogéniques permettrait d'obtenir davantage d'informations. Cette technique pourrait être explorée dans le futur, mais ce n'est pas disponible, pour l'instant, à l'IMN.

Notons que des méthodes de marquage appropriées doivent être développées pour chaque application (pour des solutions et des modules de filtration spécifiques). Même si une technique de marquage apparaît initialement compatible avec la solution ciblée (avant la filtration), les résultats décrits ici montrent qu'une partie importante du développement nécessite de faire des tests de compatibilité entre la technique de marquage proposée et le procédé étudié.

Enfin, bien que son utilisation soit limitée ici, la possibilité d'étudier la méthode de QFS combinée à la préparation d'échantillons HPF a été démontrée, pour la première fois d'après nos connaissances, dans le but de préparer une membrane colmatée. Cela ouvre la possibilité d'étudier en détail l'interface entre les biomolécules et les membranes en utilisant la microscopie (S)TEM à haute résolution en combinaison avec les techniques de spectroscopie associées (EDX et EELS) et les techniques employant de faibles doses.

Dans le chapitre 5, les membranes colmatées dans le pilote de filtration tangentielle sont caractérisées cette fois en FIB/MEB en conditions cryogéniques pour obtenir des représentations en 3D du colmatage par les différentes biomolécules. L'analyse EDX, dont l'intérêt a été démontré ici, n'a pas été réalisable, pour le moment, avec le cryo-FIB/MEB utilisé. D'autres techniques pour identifier le colmatage ont donc dû être mises au point. La différenciation entre lipides et protéines n'a pas été possible. Mais l'analyse des volumes donne accès à des résultats très intéressants.

Chapitre 5 : Caractérisation par (cryo) EM de membranes PES colmatées par des biomolécules (lipides et protéines)

5.1 Introduction

La littérature présentée dans le chapitre 1 (section 1.2.4) rapporte le besoin de caractériser le colmatage des membranes polymères de filtration, afin d'accéder à une meilleure compréhension de ce phénomène. Notamment, une caractérisation en 3 dimensions du colmatage (externe et interne) ainsi que la structure des pores est essentielle pour identifier les différents mécanismes impliqués dans sa formation. De plus, une observation du colmatage dans son état natif, au plus près des conditions réelles de filtration, permettrait de caractériser sa structure sans la modifier par une préparation antérieure (par exemple : déshydratation pour MEB classique). À notre connaissance, aucune caractérisation 3D à l'échelle nanométrique n'a été rapportée pour le colmatage interne et externe des membranes de MF. L'objectif de ce chapitre est de présenter la méthode de cryo 3D FIB/MEB mise en place et les résultats obtenus lors de la caractérisation de la structure du colmatage de membranes de MF polymères. Les membranes de MF PES sont observées propres (vides) puis colmatées avec des solutions de lipides et de protéines.

Comme expliqué dans le chapitre 1 (section 1.3.1), le colmatage est un phénomène multifactoriel et hétérogène spatialement et temporellement, qui n'a pas été encore tout à fait compris par la communauté scientifique²²⁴⁻²²⁶. Dans les travaux présentés ici, la ME est employée pour caractériser la structure du colmatage et identifier les mécanismes impliqués et mis en place lors de la filtration de mélanges modèles. Comme, par exemple, la formation d'un gâteau à la surface de la membrane²²³, le blocage^{15,227} ou la réduction²²⁸ du diamètre des pores à l'intérieur de la membrane. Etant donné que les lipides²²⁴, et les protéines^{54,229,230} sont des biomolécules complexes, assez différentes et qui interagissent entre elles, elles peuvent générer également différents types de colmatage. Pour réaliser une caractérisation de ceux-ci par ME dans l'état le plus proche des conditions réelles de filtration, l'usage des cryotechniques est requis. Pour les raisons expliquées dans le chapitre 1 (section 1.5.3), cela relève du défi.

Après avoir répertorié les techniques les plus communément utilisées pour caractériser le colmatage des membranes (présenté dans le tableau 1.2 du chapitre 1), le 3D cryo FIB/MEB a

été envisagé pour répondre à nos objectifs. En effet, d'une part l'usage des cryotechniques rend possible, dans son état natif, l'observation de la structure du colmatage après la filtration des biomolécules. D'autre part, le FIB/MEB nous permet d'obtenir une reconstruction 3D avec une échelle nanométrique, qui est nécessaire pour caractériser les pores et le colmatage de la membrane. Cependant, les membranes polymères, tout comme les biomolécules, sont des matériaux amorphes présentant peu de contraste et une forte sensibilité aux faisceaux d'électrons. Ainsi, comme dans le chapitre 3, un contrôle et une optimisation rigoureux des paramètres expérimentaux ont été nécessaires (plus de détails dans le chapitre 2 section 2.3.5). Enfin, l'utilisation de protocoles de reconstruction adaptés nous donne la possibilité d'accéder à l'organisation en trois dimensions du colmatage interne et externe de la membrane. En accord avec la démarche présentée dans le chapitre 3, la quantification 3D des propriétés structurales des pores pourrait nous permettre d'évaluer l'effet du colmatage sur la structure de la membrane et donc sur ses performances.

Dans ce chapitre, le colmatage interne et externe des membranes, généré lors de la filtration de biomolécules en solution (lipides et protéines), a été caractérisé par ME. Les membranes PES et PAN ont subi une préparation similaire, mais pour des raisons de temps, nous avons choisi de nous concentrer sur la caractérisation d'une seule. La membrane PES, qui possède des pores plus gros et plus faciles à imager en ME que la membrane PAN, a été choisie. De plus, un contraste plus net entre la membrane et les pores est observé sur la membrane PES, ce qui facilite la segmentation, en particulier en cas de phases multiples. Enfin, le choix d'un matériau moins isolant que le PAN favorise la stabilité de l'acquisition des données.

La filtration tangentielle est la plus utilisée pour la valorisation des microalgues, car elle permet de limiter la formation de colmatage (écoulement de la solution à filtrer le long de la surface de la membrane, ce qui limite l'accumulation de matière à la surface de la membrane et stabilise le flux)⁸ et de traiter de grandes quantités de volume par unité de surface⁶. Cependant, dans le cas de la filtration tangentielle avec le module Rayflow®, le marquage des biomolécules ayant pour but de distinguer les lipides et les protéines, n'a pas pu être mis en évidence par MEB-EDX (comme cela était attendu d'après les résultats présentés avec la cellule Amicon®). Ainsi, la méthode de marquage présentée dans le chapitre 4 est incompatible avec l'usage du module tangentiel. En outre, l'analyse EDX, dont l'intérêt a été démontré dans le chapitre 4, n'est pas réalisable, avec le cryo FIB/MEB utilisé dans cette étude. Pour ces raisons, dans ce chapitre, le colmatage formé avec le module de filtration tangentielle est plutôt étudié comme

une seule phase, indépendamment du fait qu'il s'agisse de lipides, de protéines ou d'un mélange des deux.

Dans un premier temps, l'intérêt des conditions cryogéniques, par le biais de l'évaluation de l'impact de la déshydratation sur les membranes (techniques d'usage pour le MEB classique), ainsi que le choix de la technique de segmentation la plus adaptée seront discutés. Enfin, pour la première fois d'après nos connaissances, une caractérisation 3D à l'échelle nanométrique du colmatage externe et interne de membranes colmatées par des lipides, des protéines et un mélange des deux biomolécules sera présentée.

Cette technique nous permet, d'une part, de mettre en évidence les différents mécanismes de colmatage qui se sont mis en place lors de la filtration de biomolécules, par exemple : la formation d'un « gâteau », le blocage de pores ou la réduction du diamètre de ceux-ci. D'autre part, cette technique permet de vérifier l'intégrité de la membrane, en particulier la couche sélective. Enfin, une quantification des pores participant réellement à la filtration et des propriétés du milieu poreux (diamètre des pores, porosité, etc.) a été utilisée pour mettre en évidence l'impact indirect du colmatage sur les performances de la filtration membranaire (par exemple : identification des pores bouchés ne participant plus à la filtration).

Cette technique offre la possibilité de caractériser le colmatage des membranes de MF polymères, mais pourrait aussi être appliquée pour d'autres types de membranes de filtration. De plus ces volumes 3D de haute résolution offrent un nouveau point de vue, et des données précieuses qui pourraient être utilisées pour modéliser le colmatage et prédire les performances du procédé de filtration (perméabilité et sélectivité des membranes).

5.2 Matériel & Méthodes

5.2.1 Conditionnement des membranes de filtration PES, préparation des mélanges modèles et filtration membranaire

5.2.1.1 Conditionnement des membranes de filtration PES

Dans cette étude, plusieurs coupons de membrane plane de microfiltration en polyethersulfone (PES), avec un diamètre de pore moyen nominal de 0,1 μm (Koch membrane systems, USA), ont été analysés. Tous les coupons ont été conditionnés (nettoyés et compactés) avant la filtration et leur caractérisation, selon la procédure initialement rapportée par Rouquié

et al¹⁸² et expliquée dans le chapitre 2 de ces travaux. Avant la filtration, le flux à l'eau est mesuré pour la membrane propre à différentes PTM afin de déterminer la perméabilité à l'eau. Elle était de 36-57 L. h⁻¹ m⁻² bar⁻¹ pour les coupons étudiés ici. Pour toutes les étapes, le module de filtration tangentielle (Rayflow X100, Orelis-Novasep, France) a été utilisé.

5.2.1.2 Préparation des solutions de lipides et protéines

Dans les parties suivantes, des solutions de lipides (S_L), de protéines (S_P) et de lipides et protéines mélangés (S_{LP}) ont été préparées et utilisées. Les protocoles de préparation des solutions de biomolécules sont issus des travaux de thèse de Shuli Liu (2021) et sont décrits dans la section 2.2.2.2 du chapitre 2.

5.2.1.3 Filtration membranaire

Les différentes solutions de lipides et de protéines (S_L, S_P et S_{LP}) ont été filtrées sur différents coupons de membrane PES, à l'aide du module de filtration tangentielle Rayflow X100. La filtration a été stoppée lorsque le flux de perméat, après une diminution progressive, s'est stabilisé (entre 3 et 6 h de filtration), ce qui démontre la formation de colmatage de structure stable. Après la filtration, la membrane a été rincée à l'eau. Les flux à l'eau ont été mesurés sur les membranes colmatées. Pour évaluer l'impact du colmatage, le modèle des résistances en série est utilisé. Les résistances de la membrane (R_{membrane}) et du colmatage (R_{colmatage}) ont été calculées à partir des flux à l'eau mesurés avec la membrane propre J_{H20i} et avec les membranes colmatées J_{H20f}, en suivant les équations suivantes :

$$(1) \quad J_{H20f} = \frac{PTM}{\mu(R_{membrane} + R_{colmatage})}$$

$$(2) \quad R_{membrane} = \frac{PTM}{\mu * J_{H20i}}$$

$$(3) \quad R_{colmatage} = \frac{PTM}{\mu * J_{H20f}} - R_{membrane}$$

Où la PTM est égale à la pression utilisée lors de la filtration (0,45 bar), la viscosité du perméat (μ) est égale à celle de l'eau (0.82x10⁻³ Pa.s), J_{H20i} et J_{H20f} sont les valeurs de flux à l'eau avant

et après le colmatage des membranes (en $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$). Les valeurs de perméabilités à l'eau obtenues après filtration sont comprises entre 24 et 37 $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \cdot bar^{-1}$.

5.2.2 Préparation des membranes pour le cryo-FIB/MEB

Avant leur cryofixation, les membranes propres et colmatées (par les solutions S_L , S_P et S_{LP}) ont été conservées dans des boîtes hermétiques à 4 °C avec un fond d'eau. Des prélèvements réalisés sur chaque coupon ont été cryofixés par HPF (protocole décrit dans le chapitre 2). Malheureusement, ces échantillons n'ont pas pu être caractérisés par ME, en raison de problèmes rencontrés avec le portoir d'échantillon spécifique (section 2.4.5 du chapitre 2). Pour pallier ces difficultés, une seconde méthode de cryofixation a été mise en œuvre. Les membranes ont été cryofixées dans de l'azote pâteux avec la technique de freezing, puis transférées dans la chambre du MEB (en conservant la chaîne du froid). Les détails de la procédure sont expliqués dans la section 2.4.2 du chapitre 2. Quatre groupes d'échantillons ont été étudiés, les membranes propres et les membranes colmatées avec la S_L , la S_P et la S_{LP} . Il est à noter que la cryofixation des échantillons a eu lieu le plus rapidement possible pour permettre une analyse de qualité des membranes.

5.2.3 Acquisition de données par 3D cryo-FIB/MEB

L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du FIB/MEB ZEISS Cross Beam 550 L de l'IMN assisté du logiciel SmartSEM ZEISS (voir la procédure détaillée dans le chapitre 2). Le système de préparation cryogénique Quorum® PP3010 a été utilisé pour la partie cryo FIB/MEB.

Les acquisitions de données cryo 3D FIB/MEB ont été réalisées sur des membranes PES propres et colmatées par les solutions S_L , S_P et S_{LP} . Les données ont été acquises avec les paramètres indiqués dans le tableau 1 (voir les détails de la procédure dans la section 2.4.3 du chapitre 2). Une acquisition de volumes par condition de préparation (membranes propres et colmatées) a été réalisée. Ainsi, 4 volumes ont été analysés. Il est à noter que les volumes de membranes colmatées ont été acquis dans des régions choisies contenant une couche de colmatage importante et évidente.

Table 5.1 : Data acquisition parameters used for cryo 3D FIB/SEM of the PES membranes. ^aExact values might differ slightly from one volume to another. Nominal pore sizes are those initially provided by the manufacturers.

	PES membrane (nominal pore size: 100 nm)
3D FIB/SEM acquisitions of <i>clean samples</i>	1
3D FIB/SEM acquisitions of lipid <i>fouled samples</i>	3 (lipids, proteins, both)
3D volume size ^a	15x15x15 μm^3
Cubic voxel resolution	10 nm
Energy and current of SEM observation	2 keV 200 pA
Energy and current of FIB milling	30 keV 1,5 nA
Acquisition time	24-48h

5.2.4 Reconstruction 3D et analyse

En suivant la procédure expliquée dans les chapitres 2 et 3, le logiciel Dragonfly® a été utilisé pour prétraiter, aligner, segmenter et analyser les différents stacks d'images. La procédure de reconstruction des volumes est présentée dans le chapitre 2 et comporte les mêmes étapes que dans la figure 3.1 du chapitre 3. Mais, une approche différente a été adoptée pour l'étape de segmentation. En effet, en conditions cryogéniques :

- les phases à segmenter sont plus nombreuses (3 phases minimum pour les membranes colmatées : pores remplis d'eau, membrane et colmatage ; contre seulement 2 pour les membranes vides : pores vides et membrane)

- les différences de contraste sont moins importantes (dans le cas des membranes colmatées observées en conditions cryogéniques, tout l'échantillon contient de l'eau qui présente un niveau de gris moyen, ce qui lisse le contraste de l'image).

La segmentation est donc plus difficile pour les volumes de membranes colmatées. Ainsi, une approche tenant compte de la morphologie et de la variation de contraste d'un objet a dû être mise en place pour segmenter les volumes de membranes colmatées.

À cet effet, l'outil segmentation Wisard®, dans le logiciel Dragonfly®, a été utilisé. Tout d'abord, une première segmentation manuelle est effectuée sur quelques coupes 2D. Puis

le logiciel propose la meilleure segmentation possible (avec des modèles de segmentation par « machine learning »^{231,232}). Après validation par l'utilisateur, cette première segmentation est utilisée comme donnée d'entrée pour le modèle U-net. D'après la littérature, il s'agit d'une forme d'intelligence artificielle, permettant de segmenter précisément une image, et qui fait partie des techniques de « deep learning »²³³, elle-même incluse dans une sous-famille de « machine learning »²³⁴. Ce dernier est paramétré pour segmenter le volume selon la morphologie, les bords et le contraste des objets. Ici, il faut compter environ 12 h pour que le modèle s'entraîne et converge vers une segmentation adaptée. Enfin, après validation visuelle, la segmentation peut être appliquée à tout le volume (entre 2 et 4 heures).

Dans chaque grand volume acquis par FIB-MEB, trois volumes plus petits, de tailles identiques et proches de la surface (appelés triplicats) ont été extraits. Ils sont définis avec les mêmes paramètres et modalités que ceux présentés dans la section « Matériel et Méthodes » du chapitre 3. L'analyse des triplicats a permis de déterminer la taille des pores et la porosité volumique en fonction de la profondeur, et d'identifier les pores aveugles en fonction de leur position Y (voir les détails méthodologiques dans le chapitre 3). Pour ces derniers, seuls les pores remplis d'eau ont été pris en compte, comme expliqué dans les résultats (section 5.3.4).

5.3 Résultats

5.3.1 Intérêts des conditions cryogéniques pour l'analyse des membranes de filtration

Même si les avantages de l'utilisation des conditions cryogéniques sont bien connus pour étudier les biomolécules, nous allons montrer que travailler dans ces conditions permet, même pour l'étude de membranes polymères propres, de se rapprocher des conditions réelles de filtration de la membrane.

5.3.1.1 Visualisations 2D et 3D de la membrane PES

La figure 5.1 montre les plans 2D (XY et YZ) et les reconstructions 3D de membranes PES obtenues par 3D FIB/MEB à température ambiante (TA, ou Room temperature RT) (figure 5.1a) et en conditions cryogéniques (cryo) (figure 5.1 b). Pour cette dernière, le contraste des images a volontairement été inversé pour permettre une comparaison plus facile avec les images de la membrane à TA. Nous notons que pour les conditions à TA, les pores présentent un

contraste plus sombre et la membrane un contraste plus clair, tandis que dans le cas d'une membrane remplie d'eau (comme dans les données obtenues à des températures cryogéniques), les pores apparaissent plus clairs que la membrane en raison de la présence d'eau. Par conséquent, lorsque le contraste des données obtenues en conditions cryogéniques est inversé, le contraste clair correspond à la membrane et le contraste foncé aux pores (comme les images à TA). Les images de la figure 1a montrent des pores vides et allongés dans le plan YZ (ce qui est caractéristique du shine-through artéfact, voir le chapitre 2) tandis que les images de la figure 5.1 b montrent des pores remplis d'eau et sans élongation dans le plan YZ. Cela était attendu puisque l'eau emprisonnée dans les pores de la membrane hydratée se transforme en glace après la cryofixation. De plus, le fait d'imager les pores et la membrane sur le même plan évite l'imagerie des plans plus profonds au travers des pores et donc, supprime l'artéfact de shine-through.

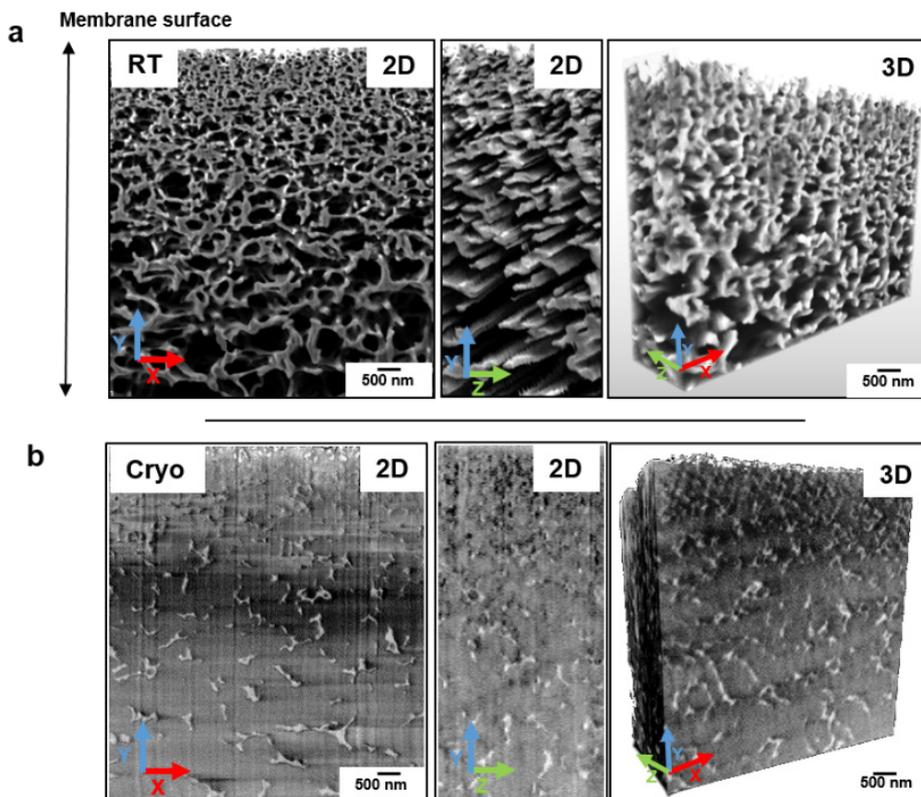


Figure 5.1 : 2D (XY and YZ planes) and 3D visualisation of the PES membrane. Volumes were obtained by 3D FIB/SEM for a clean membrane at room temperature (RT) (upper images) and under cryogenic conditions (lower images, contrast was inverted to allow better comparison with RT images) using the SESI detector.

Plus généralement, en comparant les images de la membrane à TA et en cryo, un meilleur respect de la morphologie de la membrane est observé en conditions cryogéniques. En effet, comme expliqué précédemment, l'observation des membranes à TA nécessite une déshydratation de l'échantillon, ce qui implique un impact important sur la structure de la

membrane²³⁵, comme la rétractation du milieu poreux. Si les conditions de cryofixation permettant la vitrification de l'eau sont bien respectées, ce qui évite la formation de cristaux et l'augmentation du volume de la glace, alors les pores observés conservent leurs dimensions natives.

5.3.1.2 Impact de la déshydratation sur la structure de la membrane PES et choix de la technique de segmentation

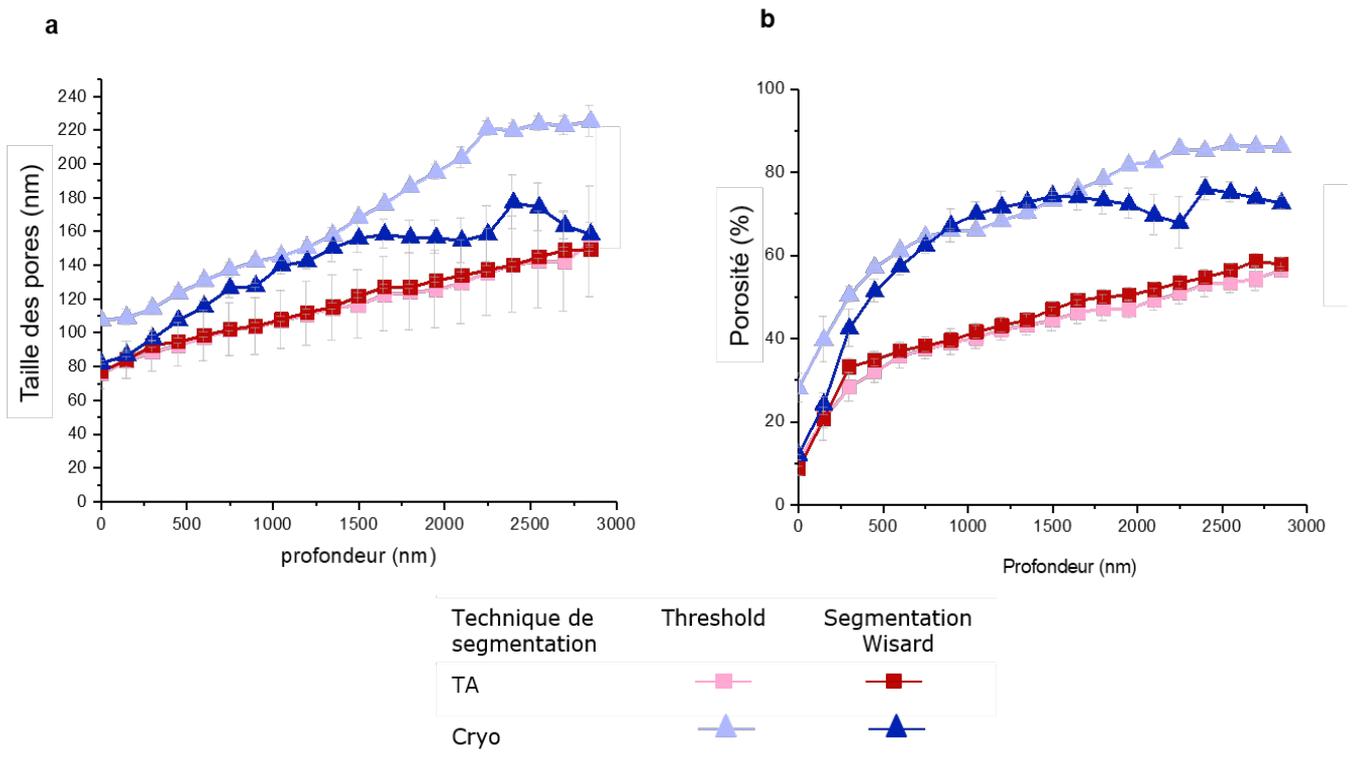


Figure 5.2 : 3D quantification of mean pore size (2a) and porosity (2b) for the PES membrane at room temperature (pink and red lines with squares) and under cryogenic conditions (light and dark blue lines with triangles), from the top surface to the bottom of the volume (Y direction). Two segmentation techniques were tested, segmentation by thresholding in light colors (as for the empty membrane study in chapter 3) and segmentation by the wizard module in dark colors.

Dans le chapitre 3, la segmentation des pores et de la membrane a été réalisée avec succès par une sélection par seuillage ou " threshold " (ST). Cette méthode, qui a fourni des résultats fiables pour ce groupe de données, n'est pas applicable pour l'analyse des membranes colmatées, où, 3 à 4 phases différentes sont segmentées (voir ci-dessous). Dans ce chapitre, une méthode alternative est utilisée et une comparaison avec la technique ST est présentée pour la segmentation de deux phases sur des membranes propres. L'intérêt de cette sous-section est donc double : d'une part, comparer les deux méthodes et d'autre part, évaluer l'effet de la déshydratation sur les membranes PES.

Dans la figure 5.2, le diamètre moyen des pores (2a) et la porosité du matériau (2 b) de la surface jusqu'à une profondeur de 3000 nm sont présentés pour deux coupes de membrane PES propres observés à température ambiante (point rectangulaire) et en conditions cryogéniques (points triangulaires). Les résultats sont présentés pour deux techniques de segmentation, d'une part, celle par seuillage ou « threshold » (ST) (en couleurs claires), qui est la technique utilisée pour l'étude de la membrane vide dans le chapitre 3, et d'autre part, celle par le module de « segmentation wisard » (qui offre beaucoup plus d'options et ici appelé « SW ») en couleurs sombres (plus de détails dans la partie Matériel et Méthodes). Les valeurs présentées sont la moyenne de 3 volumes analysés (triplicat dans un grand volume, voir les détails dans la partie Matériel et Méthodes). Les barres d'erreur tiennent compte de l'écart-type.

Concernant les membranes caractérisées à TA, de manière similaire pour les deux techniques de segmentation, la taille des pores augmente lentement et régulièrement, tandis que la porosité augmente rapidement puis doucement depuis la surface de la membrane jusqu'au support poreux. Les mêmes résultats sont obtenus, quelle que soit la technique de segmentation utilisée (taille des pores et porosité). Ces deux techniques fournissent donc des résultats équivalents. La technique ST de segmentation utilisée précédemment (chapitre 3) pour quantifier les membranes propres est plus rapide et permet efficacement d'analyser des volumes avec deux phases (pore en noir et membrane en blanc), elle est donc, dans ce cas, tout à fait pertinente.

Concernant les membranes caractérisées en conditions cryogéniques, pour les deux techniques de segmentation, la taille des pores augmente lentement et régulièrement, tandis que la porosité augmente rapidement puis doucement en fonction de la profondeur. Les mêmes tendances de courbes sont observées pour les deux techniques de segmentation, cependant, les pores de la membrane apparaissent légèrement plus grands et la porosité plus élevée pour la technique de ST (110 nm à la surface, porosité de 28%) par rapport à celle de SW (80 nm à la surface, porosité de 10%). À partir de 1500 nm, pour la technique SW, la variabilité des données est plus grande (barre d'erreur). C'est probablement dû à une dérive par rapport aux paramètres initialement choisis en fonction de la morphologie de la surface de la membrane (voir la section Matériel et Méthodes). En effet, le contraste aux abords de la surface de la membrane diffère de celui plus en profondeur ce qui peut impliquer une dérive dans la segmentation. D'après ces observations, les deux techniques de segmentation donnent des résultats relativement proches pour caractériser les couches proches de la surface (évolution générale de la taille des pores et porosité).

Si l'on compare les deux conditions d'analyse (TA et cryo), les mêmes tendances sont observées pour le diamètre des pores et la porosité. Mais la taille moyenne des pores est généralement plus grande pour la membrane analysée en cryo par rapport à la membrane analysée à TA, tout comme la porosité. Ces observations montrent que la déshydratation de la membrane PES entraîne une réduction de la taille de ses pores et donc de la porosité. Globalement, les conditions cryogéniques nous permettent d'observer une morphologie plus respectueuse de l'état natif de la membrane. Cette technique semble la plus pertinente pour la caractérisation, à terme, de membranes colmatées, tout en minimisant les dommages sur les polymères et les biomolécules.

Enfin, si l'on cherche à déterminer uniquement les caractéristiques de la couche sélective, comme cela a été fait dans le chapitre 3, on peut constater que les résultats en conditions cryogéniques avec la technique de segmentation SW sont proches des résultats à TA avec la technique ST : présence d'une peau, avec des pores de diamètres de 80 nm et une porosité de 10%. Il semblerait que la structure et la délimitation dans l'espace de la couche sélective ne sont pas fortement altérées par la déshydratation de la membrane. Ainsi, la couche sélective est quantifiable, à TA et en conditions cryogéniques.

La technique de SW donne des résultats satisfaisants avec 2 phases, comparables à la méthode ST, même si le traitement des données est plus long. En outre elle permet de caractériser plusieurs phases, ce qui est indispensable pour caractériser le colmatage des membranes. Par conséquent, elle a été sélectionnée pour caractériser les membranes colmatées en conditions cryogéniques dont les résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

5.3.2 Caractérisation du colmatage de la membrane PES par cryo-

MEB

La figure 5.3a présente une image obtenue par cryo-MEB de la surface d'une membrane PES colmatée avec des lipides et des protéines. L'image a été obtenue avec le détecteur SESI et après avoir cryofixé et coupé la membrane avec le FIB (cross section). La figure 5.3 b montre un agrandissement de la zone interne de la membrane dévoilée par la cross section (agrandissement du carré rouge), la délimitation de la surface de la membrane est montrée par les flèches rouges. Des patches, peu contrastés, sont observés au-dessus de la surface de la membrane avec le détecteur SESI (surlignés en rouge sur l'image). De plus, lorsqu'on observe l'intérieur, par le biais de la cross section, le patch apparaît épais et semble impacter la surface de la membrane (léger affaissement). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus

précédemment à TA : ces patchs confirment la présence d'un colmatage externe et hétérogène à la surface de la membrane. Il est à noter que ces patchs ont été observés à la surface de membranes colmatées avec des solutions S_L , S_P et S_{LP} .

La caractérisation 3D par cryo FIB/MEB des membranes colmatées par différentes solutions de biomolécules est présentée dans les prochaines sections.

Cryo SEM

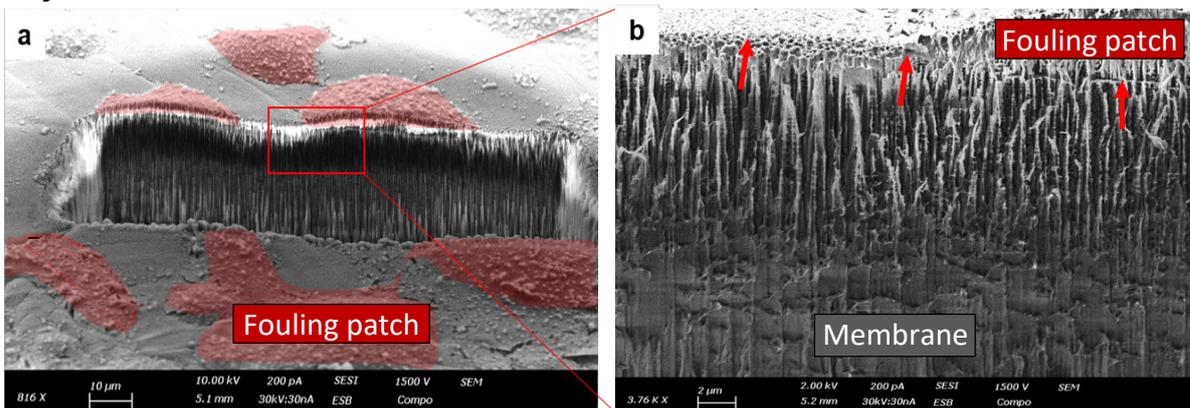


Figure 5.3 : SEM cryo observation of the PES membrane surface fouled with lipids and proteins. The fouling patches have been highlighted in red. A higher magnification view of the red square area is shown on the right side (4b). The membrane surface is indicated by red arrows.

5.3.3 Caractérisation du colmatage de la membrane PES par 3D cryo FIB/MEB

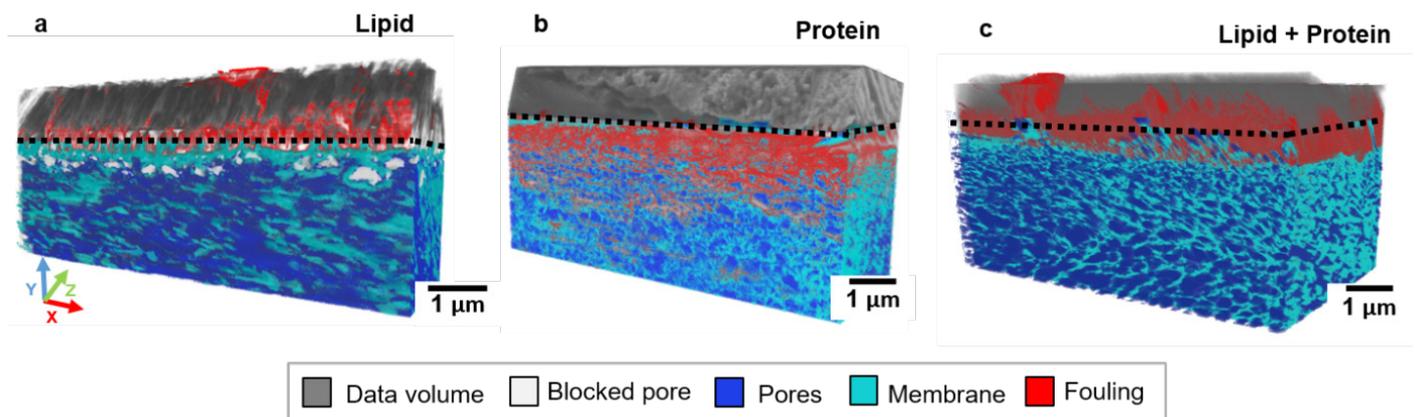


Figure 5.4 : 3D reconstructions of PES membranes fouled with (4a) lipids, (4b) proteins and (4c) a mix of lipids and proteins. The different phases of the volumes were segmented by the SW technique and highlighted by light grey for the blocked pore (in figure 5a only), dark blue for the pores, light blue for the membrane and red for the fouling. The original data stack is shown in grey and the black dotted line indicates the membrane surface.

L'objectif de cette partie est de vérifier si les outils de cryo FIB/SEM permettent de caractériser le colmatage, de valider si celui-ci est présent en surface uniquement ou en profondeur, comme

évoqué précédemment, et enfin d'estimer l'impact du colmatage sur l'état du milieu poreux et évaluer les conséquences sur les performances de filtration.

- Observation du colmatage et comparaison avec les données macroscopiques obtenues lors de la filtration

La figure 5.4 montre des volumes 3D de membranes PES colmatées avec des lipides (figure 5.4a), des protéines (figure 5.4 b) et un mélange de protéines et de lipides (figure 5.4c). Les trois volumes ont été acquis par 3D FIB/MEB en conditions cryogéniques et reconstruits avec le logiciel Dragonfly®. Il est à noter que ces volumes ont été acquis dans des zones de « patches », où un colmatage important est évident (et ceux, pour les membranes colmatées avec des lipides, des protéines, ou un mélange des deux biomolécules). Les différentes phases, telles que les pores bloqués, les pores remplis d'eau, le matériau polymère et le colmatage, ont été respectivement segmentées en gris clair, bleu foncé, bleu clair et rouge dans les volumes à l'aide de la technique SW (un exemple est montré dans la figure 2.17 du chapitre 2). Le gris foncé au-dessus de l'échantillon représente la glace.

Dans la figure 5.4, on voit que le colmatage généré lors de la filtration, et restant après un simple rinçage à l'eau, est très différent selon le mélange modèle étudié. En effet, dans la **figure 5.4a concernant la filtration de SL**, un colmatage hétérogène est observé dans le patch principalement sur la surface de la membrane sous forme d'une couche de 2 μm d'épaisseur en moyenne. Un ensemble de pores vides (bloqués et remplis d'air) est situé en dessous de la surface de la membrane (indiqué par la ligne noire en pointillés), jusqu'à 350 nm de profondeur environ. Cela n'est pas le cas pour les figures 5.4 b et 5.4c (S_P et S_{LP}) où seulement trois phases ont été segmentées (pore rempli d'eau, membrane et colmatage). On a donc bien observé des patches comme dans les travaux précédents, mais on ne constate pas de colmatage interne avec les lipides dans ces expériences contrairement aux résultats obtenus précédemment avec des émulsions plus concentrées (voir section 4.3.1 du chapitre 4). Les conditions expérimentales n'étant pas identiques (concentration en lipides et PTM), la comparaison reste limitée.

Dans le cas de la filtration de **protéines (figure 4.5 b)**, le colmatage est, cette fois-ci, majoritairement situé à l'intérieur de la membrane, en dessous de la surface sur en moyenne 2 μm de profondeur. Enfin, dans le cas de la filtration du mélange de **lipides et de protéines (figure 4.5c)** une situation intermédiaire semble se présenter, avec la présence de colmatage au-dessus et en dessous de la surface membranaire (sur environ 400 nm de profondeur et d'épaisseur). D'après ces observations, la formation d'un colmatage externe semble

prépondérante lors de la filtration de lipides, et, pareillement, la formation de colmatage interne semble majoritaire lors de la filtration de protéines. La filtration d'un mélange de lipides et de protéines entraîne la formation d'un colmatage externe et interne sur et dans la membrane. Ainsi, la nature des biomolécules filtrées influence la nature et la répartition spatiale du colmatage au sein des membranes.

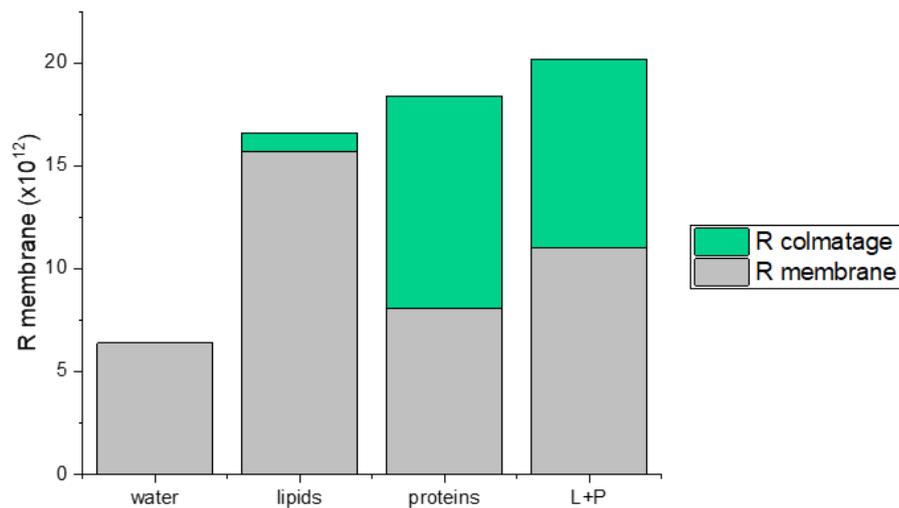


Figure 5.5 : Calculation of membrane resistance from water flux measurements before and after filtration of lipids and proteins.

Le figure 5.5 présente les résultats des calculs de la résistance de la membrane et du colmatage à partir de la mesure de flux à l'eau (0,45 bar) avant et après la filtration de différentes solutions de lipides et de protéines (voir les détails sur calcul dans la partie Matériel et Méthodes, équations 2 et 3). Ce calcul nous permet d'une part d'illustrer la variabilité du matériau membranaire^{227,236}. D'autre part, elle permet de mettre en évidence la résistance au passage de l'eau due au colmatage : la résistance due au colmatage par les lipides représente seulement 4% de la résistance totale ($R_{\text{membrane}}+R_{\text{colmatage}}$), tandis que celles dues aux protéines et au mélange (lipides et protéines) représentent respectivement 56% et 45% de la résistance totale. Ainsi, lors de la filtration des solutions contenant uniquement des protéines, ou des lipides et des protéines, le colmatage est beaucoup plus important.

Il est à noter que, bien que les taux de rétention n'aient pas été analysés ici, des expériences similaires, avec les mêmes solutions et la même référence de membrane, ont été réalisées lors de travaux précédents par Camille Rouquié (données acquises en interne), dont voici les résultats : les lipides sont totalement retenus par la membrane (à une PTM inférieure à la PTM critique) et, lors de la filtration de protéines, 57% d'entre elles sont retenues et 43% passent

dans le perméat. Dans le cas de la filtration de mélanges modèles (lipides et protéines), la rétention des protéines augmente à 78%, mettant en évidence l'impact de la présence de lipides sur la rétention des protéines.

Si l'on rassemble toutes ces informations, des hypothèses peuvent donc être proposées. Tout d'abord, lors de la filtration de la solution de lipides S_L , tous les lipides sont retenus à la surface de la membrane et forment un dépôt non homogène assez perméable et générant une résistance au passage du liquide de 4% seulement. Lors de la filtration de protéines S_P , 43% d'entre elles traversent la membrane et 57% sont retenues, dont une quantité non négligeable à l'intérieur du matériau membranaire, engendrant une chute de la perméabilité (R colmatage de 56%). Lors de la filtration du mélange S_{PL} , les lipides sont retenus et retiennent probablement une partie des protéines avec eux, augmentant ainsi leur taux de rétention et limitant la proportion rentrant dans le matériau et pouvant passer dans le perméat ou générer un colmatage (Rcolmatage un peu plus faible : 45%).

Afin de valider ou non ces hypothèses et d'aller plus loin dans l'analyse de l'impact du colmatage des membranes par ces solutions de biomolécules, une quantification 3D des paramètres structuraux a été réalisée et notamment, sur la couche sélective.

- Analyse quantitative du colmatage

La figure 5.6 présente la taille moyenne des pores et la porosité de membranes PES propres

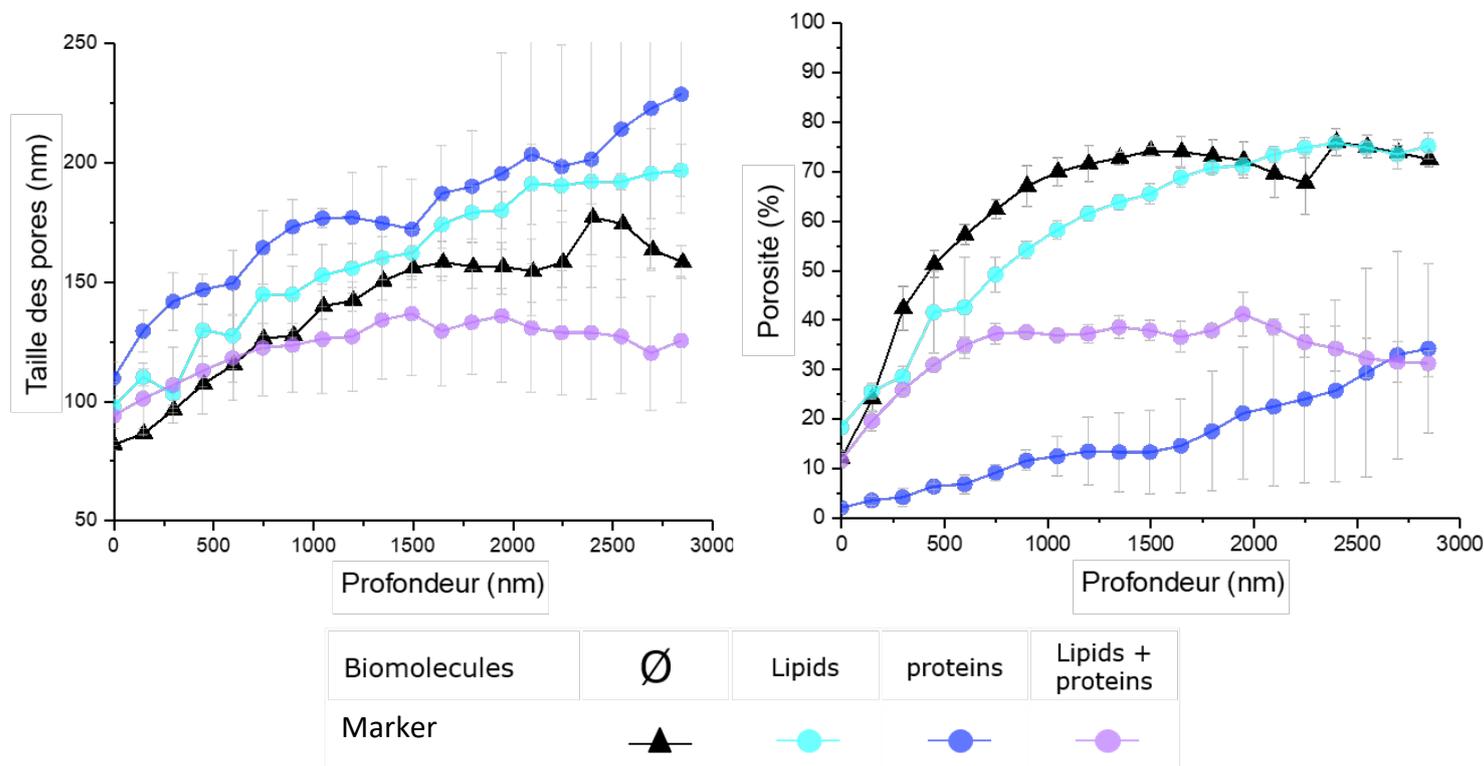
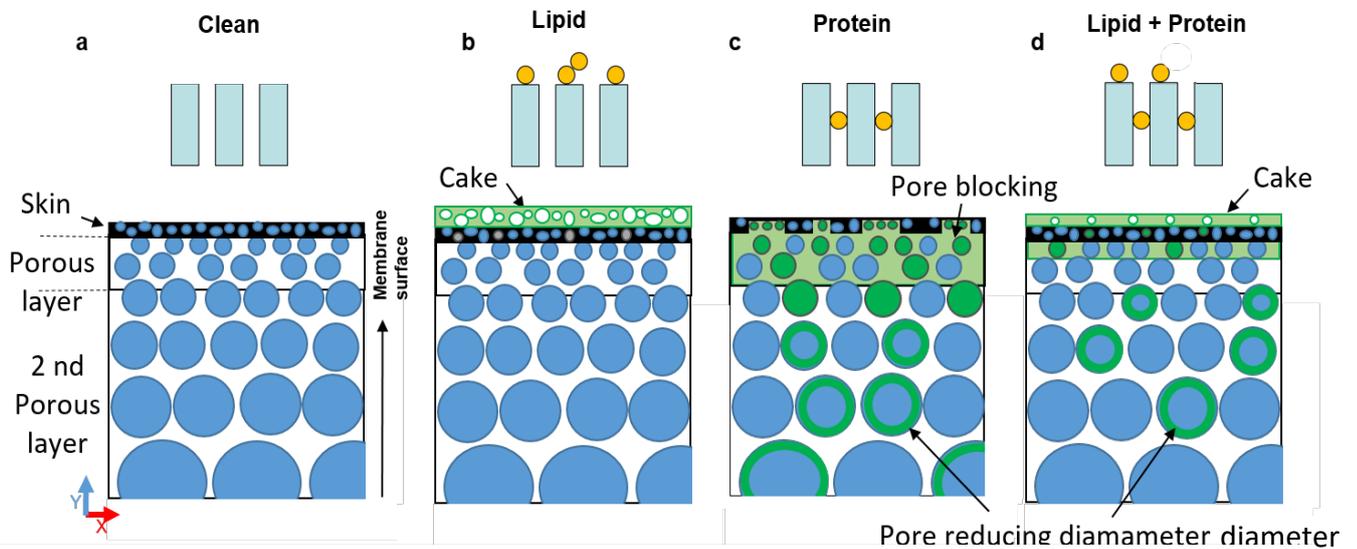


Figure 5.6 : 3D quantifications of pore structural properties for the PES membrane clean (black triangles), fouled with lipids (light blue points), proteins (purple points) and lipid and protein mixed (pink points) from the top surface to the bottom of the volume (Y direction). Mean pore size (5.6a) and porosity (5.6b) of pores according to the depth are presented.

(triangles noirs) et colmatées avec des lipides (points cyan), des protéines (points violets) et un mélange de lipides et de protéines (points roses), depuis la surface de la membrane, jusqu'à 3000 nm de profondeur. Les éventuels dépôts au-dessus du matériau membranaire ne sont pas pris en compte ici. Les valeurs présentées sont la moyenne sur 3 volumes analysés (triplicat dans un grand volume, voir les détails de la quantification dans la section Matériel et Méthodes), les barres d'erreur tiennent compte de l'écart-type. Des schémas de la structure des pores et du colmatage sont proposés dans la figure 5.7 pour les membranes PES propres et colmatées (avec des lipides, des protéines et un mélange des deux), en fonction de la profondeur. Ensuite, les résultats de la figure 5.6 et la structure des différents cas proposés dans la figure 5.7 seront

décrits en détail. La figure 5.7a représente schématiquement la structure d'une membrane propre, telle que proposée au chapitre 3 (figure 3.6) où la couche sélective est une peau.



Fouling

Thickness	↑ 2 μm	-	↑ 400 nm
	-	↓ 2 μm	↓ 400 nm
Porosity	45%	-	15%

Membrane structure

Surface porosity	12%	18%	3%	10%
Open pore	99%	99,5%	90%	98%
Fouled pore	-	-	55%	8%
Blocked pore	-	↓ 350 nm / 17%	-	-

Figure 5.7 : Schematic illustration of a cross-sectional view showing the morphology of the membrane clean (5.7a) and fouled with lipid (5.7b) proteins (5.7c) and lipids and proteins mixed (5.7d). The selective skin is represented by a thick black line, the fouling is in green and the different behavior observed in fouling are shown by the arrows. Tables below present the different quantitative data for fouling and membrane structure and for each sample type.

Identification d'une couche de gâteau à la surface de la membrane PES lors de la filtration de lipides (colmatage externe) :

Pour la membrane PES colmatée avec des lipides, le diamètre des pores augmente lentement et régulièrement, de la même manière que pour les pores de la membrane propre, depuis la surface de la membrane jusqu'au milieu poreux interne. En ce qui concerne la porosité, de même, elle présente une tendance similaire à celle quantifiée pour la membrane propre, avec une augmentation régulière sans changement de pente important. Puisque la taille des pores et la porosité sont similaires pour les membranes propres et colmatées de lipides, ces observations

indiquent que la structure de la membrane ne semble pas affectée par le colmatage lipidique. De même, en s'appuyant sur la technique décrite dans le chapitre 3 pour la détermination de l'épaisseur de la couche sélective de la membrane, ces observations confirment la présence d'une peau sélective inaltérée.

Ainsi, ces observations sont pertinentes avec la formation d'un colmatage externe et peu impactant, laissant passer le liquide au travers de la membrane. Une analyse de la couche externe de colmatage a été également réalisée. Cette couche est constituée de biomolécules, représentées en rouge (figure 5.4), et présente également des zones remplies d'air (représentées en gris foncé dans la figure 5.4). Si l'on considère cette couche comme un milieu poreux, elle présente une porosité de 45% (mesuré sur l'ensemble du volume de la couche). Dans la littérature, un tel phénomène est souvent appelé « cake » ou « gâteau », il est défini comme une couche poreuse et homogène qui laisse passer l'eau au travers de la membrane, mais impliquant le blocage ou « pore blocking » de certains pores de la surface de la membrane et une résistance spécifique^{228,237}. Il est à noter que la présence de pores vides, proche de la surface, pourrait être expliquée par un tel phénomène. Après avoir bloqué rapidement l'entrée d'un pore avec des lipides, il est possible que l'eau restant à l'intérieur de celui-ci ait été aspirée lors de l'écoulement de l'eau à travers les autres pores à proximité. Par conséquent, nous pouvons conclure que la filtration de lipides implique la formation d'un colmatage externe sous forme de cake poreux, impactant faiblement la structure de la membrane et permettant d'isoler les lipides à sa surface. Une vue schématique du colmatage lipidique et de la structure de la membrane est proposée en figure 5.7 b.

Identification de pores bloqués (« pore blocking ») et réduits en taille (« pore reducing diameter ») à l'intérieur de la membrane PES lors de la filtration de protéines (colmatage interne) :

Selon la figure 5.6, pour la filtration de protéines, le diamètre moyen des pores de la membrane colmatée est supérieur à celui des pores de la membrane propre, il augmente régulièrement en fonction de la profondeur. En revanche, la porosité de la membrane colmatée est beaucoup plus faible que celle de la membrane propre, et même si elle augmente régulièrement, elle est inférieure à 3 % à la surface et reste inférieure à 10% jusqu'à environ 800 nm de profondeur. La taille moyenne des pores ne change donc pas, mais la porosité diminue de façon drastique. Cela peut s'expliquer par une diminution importante du nombre de pores. Ceci est confirmé par la présence de pores bouchés, remplis par des biomolécules, sur plusieurs micromètres de profondeur. En outre, en considérant la mesure globale des pores de la membrane, la membrane

colmatée de protéines présente moins de petits (< 150 nm) ou de grands (>300 nm) pores, par rapport aux membranes colmatées avec d'autres mélanges modèles (les mesures ont été réalisées pendant la quantification et ne sont pas montrées ici). Si le colmatage bouche un grand nombre de petits pores et ne laisse disponible qu'une fraction de pores de diamètre moyen, cela peut expliquer une taille moyenne de pore plus élevée que celle de la membrane propre.

Ainsi, ces observations sont pertinentes avec une accumulation des protéines à l'intérieur des pores de la membrane, particulièrement sur la couche sélective (présentant les plus petits pores), mais aussi en profondeur, par le fait d'une accumulation de matière (réduisant la taille des pores les plus grands). Le tout faisant diminuer sévèrement la porosité de la membrane. Dans la littérature ces phénomènes se nomment respectivement le « pore blocking » (pore bloqué par de la matière)¹⁵ et « pore reducing diameter » (réduction de la taille du diamètre des pores, notamment par accumulation de matière)²²⁸. Ces observations sont cohérentes avec les calculs de résistance et de rétention présentés ci-dessus. Ainsi, ces résultats nous permettent de conclure sur la présence d'un colmatage interne fort induit par la filtration de protéines, conduisant à un blocage des pores les plus petits, proches de la surface de la membrane (jusqu'à quelques micromètres de profondeur), et à une réduction du diamètre des pores les plus grands, plus profondément dans le milieu poreux. Nous avons pu estimer qu'environ 55% des pores sont colmatés sur les trois premiers micromètres à partir de la surface de la membrane (il s'agit d'un ratio entre les volumes des pores de la membrane colmatée et de la membrane propre). Pour illustrer ces propos, un schéma de la structure de la membrane colmatée par des protéines est proposé dans la figure 5.7c. La zone verte près de la couche sélective correspond à la zone où on observe un fort colmatage interne d'après la figure 5.4.b.

Identification d'une part, d'un gâteau à la surface de la membrane et d'autre part, de pores bloqués à l'intérieur de la membrane PES, lors de la filtration de lipides et de protéines (colmatage externe et interne) :

Dans le cas de la membrane colmatée par un mélange de lipides et de protéines, dans la figure 5.6, le diamètre moyen des pores augmente lentement et régulièrement, de manière similaire à la membrane propre, jusqu'à 1500 nm de profondeur. Il est légèrement supérieur à celui de la membrane propre dans les premières couches près de la surface, puis il se stabilise dans le milieu poreux avec des valeurs inférieures à celle de la membrane propre. Concernant la porosité, elle reste proche de celle de la membrane propre (10-20%) quantifiée près de la surface, elle augmente ensuite, mais de façon plus faible jusqu'à environ 800 nm de profondeur avant de se stabiliser. Elle reste entre 30 et 35%. En suivant les interprétations des paragraphes

précédents, ces observations sont cohérentes avec la présence d'un colmatage interne. Cependant, une couche à la surface de la membrane a été observée dans la figure 5.4 (en rouge) et caractérisée. Elle est moins épaisse (≈ 400 nm), mais plus dense (porosité mesurée à 15 % sur le volume total du gâteau) que dans le cas de la filtration de lipides uniquement, démontre l'existence d'un colmatage externe de structure différente. Ces résultats sont cohérents avec la résistance du colmatage mesuré précédemment. Étant donné que le taux de rétention des protéines augmente, on peut supposer que celles-ci participent à la formation d'un gâteau moins perméable en surface de la membrane. Enfin, la tendance de la courbe de la porosité proche de la surface laisse à penser qu'il n'y a pas d'impact majeur sur la structure de la couche sélective, hormis le bouchage d'une fraction des petits pores, mais n'impactant pas fortement la porosité.

Ainsi, ces résultats nous permettent de conclure que lors de la filtration d'un mélange de lipides et de protéines par une membrane PES, un gâteau mince et dense (lipides et protéines mélangés) se forme à la surface de la membrane (colmatage externe). Du fait de la présence des protéines qui bouchent et réduisent le diamètre des pores, un colmatage interne se produit. Seule une partie des protéines est retenue à la surface, notamment par le colmatage externe. En conséquence, la formation de colmatage interne plus modéré que lors de la filtration de protéines seules. Une vue schématique du colmatage et de la structure de la membrane est proposée en figure 5.7d.

5.3.4 Estimation des pores aveugles, « internally blocked pore », et impact indirect du colmatage sur la filtration membranaire.

Dans cette section, les reconstructions 3D et la quantification des pores ont été utilisées pour analyser l'impact du colmatage sur la filtration membranaire au-delà des pores qui sont directement bouchés/colmatés. En d'autres termes, nous voulons quantifier les pores qui, bien que remplis d'eau (non remplis de biomolécules), connectés à la surface et traversant la couche sélective, ne participent pas réellement à la filtration du fait qu'ils sont bloqués par le colmatage en profondeur et deviennent alors des pores aveugles (comme les « blind pore » du chapitre 1 section 1.3.2.1). Plusieurs types de pores sont considérés (voir figure 5.8) :

- (i) les pores ouverts (open pores), remplis d'eau, connectés à la surface et traversant la couche sélective et le milieu poreux ; ils sont actifs pendant de la filtration.
- (ii) les pores bloqués (blocked pores) et vides de biomolécules, remplis d'air dans le cas de la filtration des lipides ; ils sont inactifs pendant la filtration.

(iii) les pores colmatés (fouled pores), remplis et par des biomolécules ; ils sont inactifs pendant la filtration.

(iv) les pores indirectement bloqués, remplis d'eau et traversant la couche sélective, mais étant bloqués en profondeur par du colmatage ; ils sont inactifs pendant la filtration. Le terme de « internally blocked pore » sera employé dans cette section.

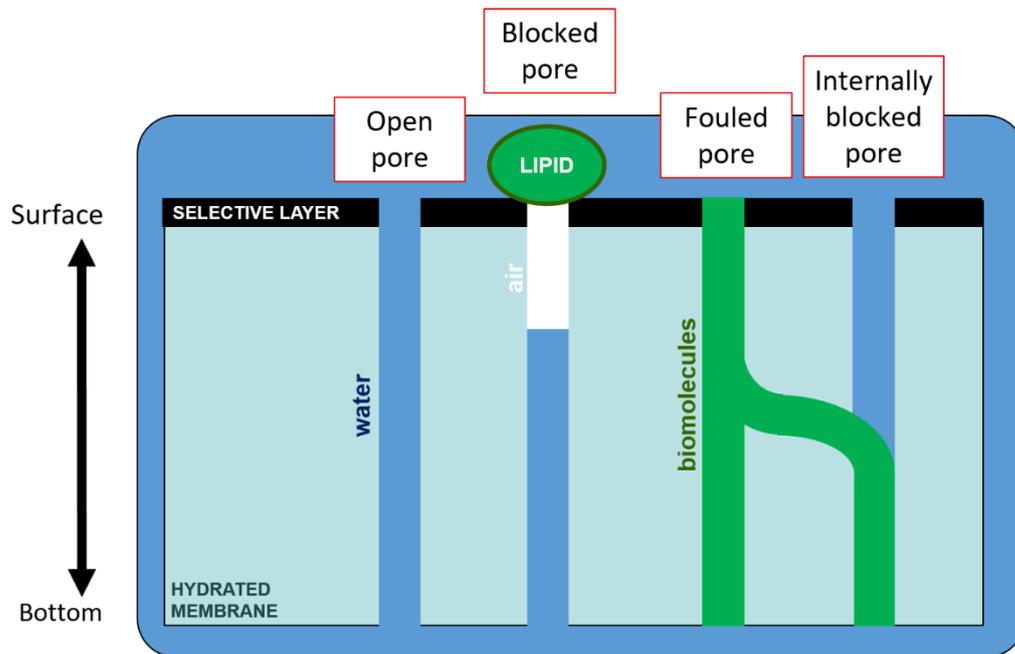


Figure 5.8 : Schematic of the different types of pore characterised in membranes fouled by biomolecules. La figure 5.8 présente les différents types de pores en s'inspirant des figures 1.8 et 1.9 du chapitre 1.

Dans cette analyse, seuls les pores ouverts et les pores indirectement bloqués en profondeur (tous les deux remplis d'eau et connectés à la surface) sont considérés. Comme le montre le chapitre 3, plus de 99% des pores des membranes PES propres traversent la couche sélective et la membrane entière, ce qui signifie qu'il y avait moins de 1% de "dead-end pores" dans les membranes PES propres avant le colmatage. Compte tenu de ces résultats et du fait que de nombreux "dead-end pores" parmi ce pourcentage déjà faible seront maintenant soit des "blocked pores" (en particulier dans le cas de colmatage par des lipides), soit des "fouled pores" (dans le cas de colmatage par des protéines, mais aussi des mélanges de lipides et de protéines), tous les pores qui sont connectés à la surface et ne traversent pas la membrane seront quantifiés comme des "internally blocked pore". On note que les pores qui ne contiennent plus d'eau, mais uniquement des biomolécules (fouled pores) ou de l'air d'après la méthode SW (blocked pores in Figure 5.8) n'ont pas été pris en compte puisqu'ils n'ont pas été segmentés comme des

"pores" lors de l'analyse de nos reconstructions 3D. En effet, en vue de leur contraste, ils ont été segmentés comme une phase distincte. La figure 5.9 présente des volumes reconstruits en 3D de membranes colmatées avec des lipides (5.9a), des protéines (5.9 b) et un mélange de protéines et de lipides (5.9c). Les pores connectés à la surface de la membrane sont représentés en violet. Dans le cas de la figure 5.9 b, les pores en violet et bleu sont considérés connectés à la surface de la membrane. Cette différence de couleur est due à la difficulté de localiser la couche sélective de la membrane en présence du colmatage.

Après la filtration de lipides, de protéines ou d'un mélange des deux biomolécules, respectivement 99,5%, 90% et 98% des pores remplis d'eau sont réellement reliés à la surface

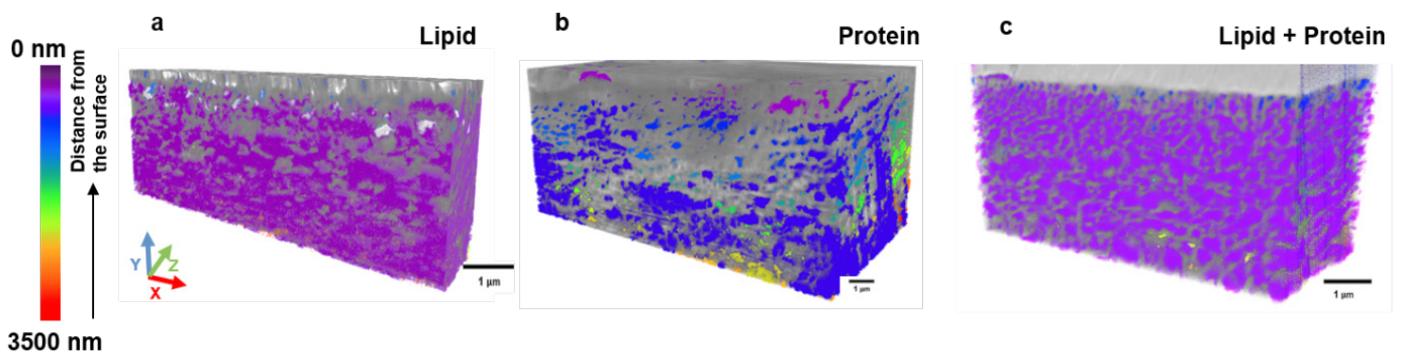


Figure 5.9 : Visualisation of pores connected (in purple) to the surface and going through the selective layer and the membrane (open pores) of the PES membrane. Other pores starting at different depths from the surface are indicated by different colors as shown in the scale. In the case of the figure 9b, the purple and dark blue pores are identified as being connected to the membrane surface. This is due to the difficulty of placing the membrane surface, as it has been altered by fouling (no flat surface).

et participent réellement à la filtration contre 99% pour la membrane propre (voir les résultats dans le chapitre 3). Du fait que les valeurs sont quasiment identiques pour les membranes propres et les membranes colmatées de lipides (figure 5.9a), cette analyse est en accord avec les résultats précédents où il est montré que la filtration de lipide conduit à un colmatage externe sous forme de gâteau, avec une faible résistance due au colmatage. Notons cependant que dans le cas de la filtration de lipides, les pores bloqués décrits dans la section précédente, montrés dans la figure 5.8 et représentés en blanc dans la figure 5.4, sont dominants dans la figure 5.9a (représentés en blanc également et quantifiés à 17% du volume total des pores de la membrane).

Dans le cas de la filtration de protéines (S_P), on voit qu'une partie du volume est représentée en gris (surtout dans le cas de la figure 9 b). Cela correspond au matériau polymère, mais aussi aux pores qui sont remplis de biomolécules et qui n'ont pas été segmentés comme des pores remplis d'eau. Une fraction importante des pores de la membrane propre est donc remplie de biomolécules et le colmatage peut également avoir lieu en profondeur. Les pores

colmatés (fouled pores) ont été estimés à 55% du volume total de pores. Parmi les pores non colmatés entièrement, connectés à la surface et remplis d'eau (et ainsi supposé être des pores ouverts et actifs puisqu'il traverse la peau sélective), 10% d'entre eux sont, par la suite, bloqués à l'intérieur du milieu poreux. Par conséquent, ils ne peuvent participer au procédé de filtration (en plus des pores colmatés). Dans le cas de la filtration du mélange de lipides et de protéines, les pores colmatés (fouled pores) ont été estimés à 8 % du volume total de pores. Parmi les pores remplis d'eau, 2% d'entre eux sont, bloqués à l'intérieur du milieu poreux.

C'est un résultat important dans la perspective d'une meilleure compréhension du colmatage, puisque ce dernier peut avoir un impact indirect sur le blocage en profondeur des pores apparemment ouverts et en fonction du mélange complexe filtré.

5.4 Conclusion

Nous présentons une nouvelle approche pour la caractérisation du colmatage induit par la filtration de biomolécules (lipides et protéines) au travers d'une membrane de filtration polymère, par cryo 3D FIB/MEB. L'impact de la préparation de l'échantillon, comme la déshydratation nécessaire pour une observation à température ambiante ou la cryofixation pour une observation en conditions cryogéniques, a été discuté en vue d'estimer leur impact sur les propriétés structurelles des membranes propres (porosité, diamètre des pores, épaisseur de la couche sélective). L'usage des cryotechniques, déjà connu pour permettre de préserver l'état natif des matériaux biologiques (comme les lipides et les protéines qui constituent le colmatage), nous permet de supprimer l'artéfact de « shine through » et de quantifier la morphologie de la membrane dans un état natif. Des membranes PES colmatées avec des lipides, des protéines et un mélange de lipides et de protéines ont été caractérisées par 3D cryo FIB/MEB et leur impact sur la structure du milieu poreux quantifié (taille de pore et porosité). Le colmatage des membranes se présente sous la forme d'un dépôt hétérogène constitué de patches présents à la surface de la membrane. Lors de la filtration de lipides, ceux-ci sont totalement retenus et forment des patches constituant un gâteau à la surface de la membrane, impactant faiblement la perméabilité. Cependant, lors de la filtration de protéines, une fraction des biomolécules traverse la membrane et une autre forme un colmatage interne, bouchant une partie des pores de la membrane et impactant fortement la perméabilité. Dans le cas de membranes colmatées par des mélanges des deux biomolécules, un colmatage externe et interne se produit, avec la formation d'un gâteau plus mince et dense. D'autres phénomènes, comme la réduction de la taille des pores ou leur blocage ont lieu. Cependant, du fait de la présence du gâteau retenant une partie des protéines à la surface, un impact plus modéré est constaté sur la

perméabilité de la membrane. Enfin, en se basant sur les reconstructions 3D, les pores colmatés, bloqués à la surface de la membrane par des lipides et bloqués indirectement dans le milieu poreux par du colmatage interne ont été quantifiés, leur analyse confirme ces résultats. En particulier, dans le cas de la filtration de protéines seules, 55% des pores sont totalement bouchés et 10 % des pores remplis d'eau et traversant la couche sélective deviennent des « internally blocked pores » et ne participent pas réellement à la filtration, démontrant l'impact important du colmatage interne.

Ce travail a permis d'obtenir des données précieuses sur la structure externe et interne du colmatage des membranes. De telles données peuvent, par exemple, contribuer à l'élaboration de modèles de perméation ou de colmatage. En première approche, elles pourraient, par exemple, être utilisées pour appliquer le modèle de Hagen-Poiseuille étudié dans le chapitre 3, afin de mettre en évidence de façon qualitative l'impact des modifications du milieu poreux sur la perméabilité (en connaissance des limites de ce modèle). En perspectives, une étude comparative pourrait être présentée pour la membrane PAN, qui est plus fragile et possède des pores plus petits. Un autre défi serait de différencier les molécules au sein du colmatage (lipides et protéines) et, par la suite, d'un extrait de broyat réel d'extrait de microalgues par exemple. De nouvelles procédures doivent être développées, couplant le marquage des biomolécules (par métaux lourds ou immunomarquage), et les défis associés, dépassés pour y parvenir. Enfin, des techniques poussées comme la préparation d'une lamelle en conditions cryogéniques (cryo lift-out) nous permettraient d'analyser le colmatage et les interactions entre ses biomolécules, avec les résolutions disponibles au (S)TEM (≈ 60 pm).

Conclusion générale et perspectives

Ce travail a été réalisé dans le contexte de la valorisation des microalgues par filtration membranaire. Le but était de développer et de mettre au point des techniques de (cryo) microscopie électronique pour étudier des membranes polymères et leur colmatage par des biomolécules (lipides, protéines). Les principaux objectifs de ces travaux de thèse étaient de :

- Caractériser les membranes propres par ME en 3D : décrire la structure et la couche sélective des membranes, identifier les points structuraux clés influençant la performance de la membrane et son colmatage (taille des pores, porosité, tortuosité, etc.), le tout en évitant les artefacts et les dommages.

- Proposer de nouvelles méthodes utilisant la microscopie électronique et la spectroscopie EDX pour permettre la caractérisation d'une membrane colmatée directement, ou après marquage des biomolécules et pour caractériser l'interface membrane/colmatage.

- Caractériser les membranes colmatées par cryo ME en 3D : identifier et caractériser le colmatage externe et interne des membranes de filtration polymères. Comprendre les mécanismes clés impliqués dans la formation du colmatage.

Afin de répondre à ces objectifs, plusieurs défis ont dû être relevés. Premièrement, du fait de leur sensibilité (pour les membranes polymères propres et colmatées), l'utilisation de la ME pour l'acquisition de données 2D ou 3D de tels échantillons nécessite un contrôle rigoureux et une optimisation des paramètres expérimentaux. Deuxièmement, la reconstruction 3D de milieux poreux est soumise à l'artéfact de « shine through », entraînant une déformation des pores de la membrane lors de la reconstruction du volume en 3D. Troisièmement, concernant l'imagerie des membranes colmatées, les zones d'intérêt (colmatées) doivent d'abord être identifiées dans les images MEB et la différenciation des biomolécules avec le matériau polymère et entre elles nécessite l'emploi d'un marquage spécifique, en amont de leur observation en ME. Enfin, les conditions cryogéniques, qui n'ont été décrites que récemment dans la littérature, sont difficiles à mettre en place et ont dû être initiées dans notre laboratoire.

Dans le chapitre 1, une étude bibliographique présente les méthodes existantes de caractérisation des membranes par microscopie électronique, et les techniques qui méritent d'être explorées pour caractériser les membranes propres et colmatées. Dans le chapitre 2, le matériel de pointe auquel nous avons eu accès et les méthodes spécifiques qui ont été

développées sont présentées de façon détaillée. Ensuite les résultats obtenus grâce à ces méthodes innovantes sont présentés sous forme d'articles et séparés en trois parties. Dans le chapitre 3, nous décrivons la morphologie des membranes propres d'UF PAN et de MF PES par le biais d'une caractérisation par 3D FIB/MEB à température ambiante. Dans le chapitre 4, nous proposons de nouvelles méthodes basées sur la microscopie électronique "conventionnelle" pour caractériser le colmatage des membranes. Enfin, dans le chapitre 5, la caractérisation des membranes colmatées par cryo 3D FIB/MEB a été réalisée et différents types de colmatage (interne et externe) ont été analysés.

Les principaux résultats de ce travail seront résumés dans cette dernière partie, suivis de quelques recommandations et perspectives pour les travaux futurs de caractérisation du colmatage des membranes de filtration.

Dans la première partie des résultats, la caractérisation de la membrane propre et de sa structure, pouvant impacter le colmatage des membranes, a été le sujet de nos recherches. Nous avons présenté une nouvelle approche pour caractériser des membranes polymères poreuses d'UF et de MF par 3D FIB/MEB. Des volumes 3D avec des résolutions cubiques nanométriques (5 et 10 nm respectivement pour la PAN et la PES) ont été acquis en utilisant des conditions de faible dose. L'effet de l'artéfact de « shine through » a été évalué, en comparant les reconstructions 3D de membranes vides et de membranes enrésinées. Une méthode de quantification qui minimise cet artéfact pour la quantification de la taille des pores a également été proposée. Nous avons identifié une couche et une peau sélective de, respectivement, 505 nm et 60-100 nm d'épaisseur pour les membranes d'ultrafiltration PAN et de microfiltration PES. Enfin, sur la base des reconstructions 3D, le pourcentage de pores aveugles (moins de 1% pour le PES et 25% pour le PAN) a été estimé. Nous avons ainsi révélé que la quantification 2D par MEB des pores surfaciques était inadaptée dans le cas de la membrane PAN, où une surestimation des pores réellement fonctionnels a lieu. En revanche, ceci n'est pas le cas pour la membrane PES.

Dans un second temps, de nouvelles méthodes basées sur la ME conventionnelle ont été proposées pour étudier des membranes colmatées à température ambiante. Dans ce but, le MEB-EDX a été utilisé pour identifier le colmatage externe et obtenir des informations sur le colmatage interne d'une membrane. Ainsi, la mise en évidence d'un colmatage externe hétérogène a été possible, mais a également suscité de nouvelles questions (nous orientant vers l'usage des conditions cryogéniques dans le chapitre 5). Ensuite, un protocole de marquage des biomolécules par métaux lourds a été présenté, nous permettant, pour la première fois d'après

nos connaissances, de différencier les lipides et les protéines mélangés en solution et accumulés à la surface d'une membrane de filtration par cryo-MEB. Malgré le fait que nous n'ayons pas pu appliquer cette technique pour caractériser le colmatage formé lors de la filtration tangentielle, cette technique est indépendamment fonctionnelle et peut être potentiellement appliquée dans d'autres domaines. Enfin, une technique alternative à la préparation de lamelle en conditions cryogéniques par cryo « lift-out » (qui est particulièrement difficile et que très récemment appliquée) est présentée pour l'analyse des membranes colmatées. Bien qu'elle soit peu explorée dans cette étude, elle offre des perspectives intéressantes pour explorer l'interface colmatage/membrane avec une haute résolution en (S)TEM.

Finalement, nous avons présenté une nouvelle technique de caractérisation du colmatage des membranes de MF PES par 3D cryo FIB/MEB. Cette dernière nous permet de nous affranchir de l'artéfact de « shine through » tout en permettant l'observation du colmatage dans son état natif, au plus près des conditions réelles de filtration. Nous avons montré, notamment, que le colmatage se présente sous la forme d'un dépôt hétérogène à la surface de la membrane et que des phénomènes différents se produisent lors de la filtration de lipides ou de protéines. Lors de la filtration de lipides, une couche poreuse de type gâteau se forme à la surface de la membrane (colmatage externe), tandis que pour la filtration de protéines, un colmatage interne se forme avec une réduction et un blocage des pores. Dans le premier cas, un faible impact est montré sur la perméabilité de la membrane. A contrario, un fort impact est mis en évidence lors de la filtration de protéines. En présence des deux biomolécules, un colmatage externe et interne se produit et, du fait des interactions entre protéines et lipides, un gâteau plus dense se forme, la rétention des protéines à la surface de la membrane augmente. Par ailleurs, un impact moindre est constaté sur la perméabilité de la membrane. Enfin, en se basant sur les reconstructions 3D, les pores participant réellement à la filtration (non bouchés ou bloqués) ont été quantifiés et, lors de la filtration de protéines, 10 % des pores supposés actifs ne participent pas réellement à la filtration. Il s'avère qu'ils sont bloqués par du colmatage interne dans le milieu poreux.

Ce travail nous a fourni des données précieuses d'une part sur la structure interne de la membrane et d'autre part, sur la structure externe et interne du colmatage des membranes. De telles données peuvent, par exemple, contribuer à l'élaboration de modèles de perméation ou de prédiction/simulation du colmatage. Une étude approfondie du colmatage dans différentes conditions opératoires et avec différents matériaux pourrait amener à une meilleure compréhension et aider à proposer des stratégies pour la conduite de procédés ou l'élaboration future de membranes de filtration de nouvelle génération, pour limiter le colmatage et améliorer

les performances : la perméabilité, la sélectivité, mais aussi plus tard, la nettoyabilité des membranes.

Dans les futurs travaux, nous pensons qu'une telle caractérisation pourrait être appliquée à la membrane d'UF PAN, en prenant en compte sa fragilité et la petite taille de ses pores, mais aussi, à d'autres types de membranes de filtration. Un moyen d'améliorer la caractérisation serait, à l'aide d'un marquage, de différencier les biomolécules au sein du colmatage lors de l'acquisition des données en 3D, comme, par exemple, distinguer les lipides et les protéines dans un mélange modèle et, plus tard, dans un extrait réel de microalgues. De nouvelles procédures utilisant le 3D cryo FIB/MEB couplée à la spectroscopie EDX seraient idéales, à condition de relever les défis techniques associés. En effet, les profondeurs de champ de l'EDX (poire d'interaction) sont beaucoup plus grandes que l'épaisseur d'une coupe FIB. Ainsi, une grande partie des signaux qui sont reconstruits et interprétés ne vient pas de l'image observée (faux positif). De plus, l'acquisition de cartographies, en plus des problématiques de stockage des données et de pertes de stabilité de l'acquisition dus à la multi-modalité de l'appareil, endommage la membrane et son colmatage (temps d'exposition très long et par conséquent augmentation de la dose). Des protocoles dédiés doivent être développés.

D'autre part, une étude plus approfondie est nécessaire pour comprendre pourquoi le contraste des biomolécules par métaux lourds ne fonctionne pas avec le module de filtration tangentielle. En effet, ce module est le plus représentatif des procédés utilisés pour la valorisation des microalgues et la formation du colmatage peut y être différente que lors de l'utilisation de la filtration frontale. Une incompatibilité avec les matériaux du pilote est à envisager. L'utilisation d'un nouveau protocole ou d'un type de marquage différent, comme l'immunomarquage pourrait, par exemple, être une solution à envisager.

Enfin, ce travail ouvre des possibilités vers d'autres améliorations : avec l'acquisition d'un portoir adapté pour les échantillons préparés par HPF opérationnel, une comparaison deviendra possible entre les échantillons cryofixés par freezing dans l'azote pâteux et par HPF. Cela pourrait nous permettre de mettre en évidence les artéfacts dus à la cryofixation. Ainsi l'intérêt de l'HPF, dans le cas de la caractérisation des membranes colmatées, pourrait être discuté. En outre, l'usage de techniques poussées, comme la préparation d'une lamelle en conditions cryogéniques (cryo lift-out) dans une membrane colmatée, nous permettrait d'analyser le colmatage par cryo (S)TEM, tout en conservant son état natif. L'organisation des biomolécules du colmatage, ainsi que leur relation avec le matériau polymère et entre elles-mêmes pourraient

alors être explorées avec les techniques avancées d'imagerie et de spectroscopie (EDX, EELS...).

Une autre possibilité est d'exploiter les échantillons avec la méthode de « quick freeze substitution, QFS ». Cette technique permet d'observer les échantillons à température ambiante avec une préparation conservant la structure native de l'échantillon (cryofixation). Dans les deux cas, les hautes résolutions du (S)TEM pourraient nous permettre (comme avec l'observation d'une cryo lamelle expliquée ci-dessus) de mieux comprendre la structure du colmatage. Pour finir, nous remarquons que puisque la QFS nécessite l'enrésinement des échantillons, des techniques d'immunomarquage peuvent ensuite être envisagées dans le but de différencier les biomolécules du colmatage directement sur les coupes de membrane colmatées et enrésinées.

Toutes les techniques développées au cours de cette thèse ouvrent donc des perspectives riches pour la caractérisation de membranes et ainsi améliorer les performances des procédés membranaires qui sont très développés dans les domaines de la valorisation des bioressources. Elles pourront aussi servir de base dans d'autres domaines de recherche impliquant l'étude de matériaux sensibles avec une structure 3D poreuse et un besoin d'informations chimiques et structurales à haute résolution. À titre d'exemple, dans le cas de la combinaison HPF et QFS, les protocoles initiaux proposés dans cette thèse sont maintenant appliqués par d'autres chercheurs de l'IMN pour accéder aux interfaces enfouies dans les tissus osseux ou les biomatériaux.

Bibliographie

1. Brickey, KP, Zydney AL, Gomez ED. FIB-SEM tomography reveals the nanoscale 3D morphology of virus removal filters. *J Membr Sci*. Published online August 21, 2021:119766. doi:10.1016/j.memsci.2021.119766
2. Pacheco F, Sougrat R, Reinhard M, Leckie JO, Pinnau I. 3D visualization of the internal nanostructure of polyamide thin films in RO membranes. *J Membr Sci*. 2016;501:33-44. doi:10.1016/j.memsci.2015.10.061
3. AIMAR P, BACCHIN P, MAUREL A. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : mécanismes de transfert. Ref : TIP452WEB - "Opérations unitaires. Génie de la réaction chimique." Published February 10, 2010. Accessed April 2, 2021. <https://www-techniques-ingenieur-fr.budistant.univ-nantes.fr/base-documentaire/42331210-operations-unitaires-techniques-separatives-sur-membranes/download/j2789/filtration-membranaire-oi-nf-uf-mft.html>
4. Couallier E. Filtration membranaire de composés organiques en phase aqueuse, HDR Université de Nantes, Avril 2019, <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-02345764>.
5. Hooper RJ, Paterson WR, Wilson DI. Comparison of Whey Protein Model Fouling for Studying Cleaning of Milk Fouling Deposits. *Food Bioprod Process*. 2006;84(4):329-337. doi:10.1205/fbp06028
6. Liu S. *Fractionnement de Biomolécules Issues de Microalgues Par Filtration Membranaire : Impact Du Milieu Complexe Sur Les Performances Du Procédé*. These de doctorat. Nantes; 2021. Accessed May 30, 2022. <http://www.theses.fr/2021NANT4016>
7. Eykamp W. Chapter 1 Microfiltration and ultrafiltration. In: Noble RD, Stern SA, eds. *Membrane Science and Technology*. Vol 2. Membrane Separations Technology. Elsevier; 1995:1-43. doi:10.1016/S0927-5193(06)80003-3
8. Aimar P, BACCHIN P, MAUREL A. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : perméabilité et sélectivité. Ref TIP452WEB - *Opérations Unit Génie Réaction Chim*. Published online August 10, 2010. Accessed January 25, 2021. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/operations-unitaires-techniques-separatives-sur-membranes-42331210/filtration-membranaire-oi-nf-uf-mft-j2790/>
9. Pierre AIMAR, Georges DAUFIN. Séparations par membrane dans l'industrie alimentaire. *Techniques de l'Ingénieur*, 2004. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/operations-unitaires-et-process-de-fabrication-de-produits-alimentaires-42430210/separations-par-membrane-dans-l-industrie-alimentaire-f3250/>
10. Berk Z. Chapter 10 - Membrane processes. In: Berk Z, ed. *Food Process Engineering and Technology*. Food Science and Technology. Academic Press; 2009:233-257. doi:10.1016/B978-0-12-373660-4.00010-7
11. Zaouk L. *Récupération d'exopolymères Issus de Surnageants de Culture de Porphyridium Cruentum Par Techniques Membranaires : Étude de La Filtrabilité Des Solutions Sur Une Membrane Organique et Caractérisation Du Colmatage*. These de doctorat. Nantes; 2018. Accessed December 15, 2022. <https://www.theses.fr/2018NANT4068>
12. Teuling E, Wierenga PA, Schrama JW, Gruppen H. Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. *J Agric Food Chem*. 2017;65(36):7989-8002. doi:10.1021/acs.jafc.7b01788
13. Ben Amar R, Gupta B b., Jaffrin M y. Apple Juice Clarification using Mineral Membranes: Fouling Control by Backwashing and Pulsating Flow. *J Food Sci*. 1990;55(6):1620-1625. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb03585.x
14. REMIGY JC, DESCLAUX S. Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. Ref : TIP598WEB - "Médicaments et produits pharmaceutiques." Published March 10, 2007. Accessed February 5, 2021. <https://www-techniques-ingenieur-fr.budistant.univ->

nantes.fr/base-documentaire/42665210-production-des-medicaments-industrialisation/download/j2791/filtration-membranaire-oi-nf-uf.html

15. Habibi S, Rabiller-Baudry M, Lopes F, et al. New insights into the structure of membrane fouling by biomolecules using comparison with isotherms and ATR-FTIR local quantification. *Environ Technol.* 2020;0(0):1-18. doi:10.1080/09593330.2020.1783370
16. Le Hir M. *Caractérisation Du Colmatage Des Membranes d'ultrafiltration de Production d'eau Potable Par Des Nanoparticules Fluorescentes*. These de doctorat. Aix-Marseille; 2017. Accessed September 5, 2022. <http://www.theses.fr/2017AIXM0647>
17. Warsinger D, Chakraborty S, Tow E, et al. A review of polymeric membranes and processes for potable water reuse. *Prog Polym Sci.* 2018;81. doi:10.1016/j.progpolymsci.2018.01.004
18. Bacchin P, Aimar P, Field RW. Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. *J Membr Sci.* 2006;281(1):42-69. doi:10.1016/j.memsci.2006.04.014
19. Rouquié C, Szymczyk A, Rabiller-Baudry M, et al. NaCl precleaning of microfiltration membranes fouled with oil-in-water emulsions: Impact on fouling dislodgment. *Sep Purif Technol.* 2022;285:120353.
20. Legrand J. Les microalgues : pour quoi faire ? *Colloq Chim Chang Clim*. Published online November 18, 2015:15.
21. Bonnefond H, Combe C, Cadoret JP, Sciandra A, Bernard O. Potentiel des microalgues. In: Baumberger S, ed. *Chimie Verte et Industries Agroalimentaires - Vers Une Bioéconomie Durable*. Lavoisier; 2020. Accessed September 1, 2022. <https://hal.inria.fr/hal-02421830>
22. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng.* 2006;101(2):87-96. doi:10.1263/jbb.101.87
23. Bonnefond H, Combe C, Cadoret JP, Sciandra A, Bernard O. Potentiel des microalgues, Chimie verte et industries agroalimentaires - Vers une bioéconomie durable, février 2020, <https://hal.inria.fr/hal-02421830>.
24. Becker EW. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv.* 2007;25(2):207-210. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002
25. Guil-Guerrero JL, Navarro-Juárez R, López-Martínez JC, Campra-Madrid P, Reboloso-Fuentes M. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *J Food Eng.* 2004;65(4):511-517. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.02.014
26. Abo-Shady AM, Mohamed YA, Lasheen T. Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biol Plant.* 1993;35(4):629-632. doi:10.1007/BF02928041
27. Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy.* 2011;88(10):3402-3410. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.014
28. Mata TM, Martins AA, Caetano NidiaS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010;14(1):217-232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
29. Rossignol N, Vandanjon L, Jaouen P, Quéméneur F. Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. *Aquac Eng.* 1999;20(3):191-208. doi:10.1016/S0144-8609(99)00018-7
30. Frappart M, Massé A, Jaffrin MY, Pruvost J, Jaouen P. Influence of hydrodynamics in tangential and dynamic ultrafiltration systems for microalgae separation. *Desalination.* 2011;265(1):279-283. doi:10.1016/j.desal.2010.07.061
31. Zhang X, Hu Q, Sommerfeld M, Puruhito E, Chen Y. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. *Bioresour Technol.* 2010;101(14):5297-5304. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.007
32. Lorente E, Hapońska M, Clavero E, Torras C, Salvadó J. Microalgae fractionation using steam explosion, dynamic and tangential cross-flow membrane filtration. *Bioresour Technol.* 2017;237:3-10. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.129
33. Sanches S, Fraga MC, Silva NA, Nunes P, Crespo JG, Pereira VJ. Pilot scale nanofiltration treatment of olive mill wastewater: a technical and economical evaluation. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24(4):3506-3518. doi:10.1007/s11356-016-8083-1

34. Li L, Ding L, Tu Z, Wan Y, Clause D, Lanoisellé JL. Recovery of linseed oil dispersed within an oil-in-water emulsion using hydrophilic membrane by rotating disk filtration system. *J Membr Sci.* 2009;342(1):70-79. doi:10.1016/j.memsci.2009.06.023
35. Liu S, Gifuni I, Mear H, Frappart M, Couallier E. Recovery of soluble proteins from *Chlorella vulgaris* by bead-milling and microfiltration: Impact of the concentration and the physicochemical conditions during the cell disruption on the whole process. *Process Biochem.* 2021;108:34-47. doi:10.1016/j.procbio.2021.05.021
36. Liu S, Rouquié C, Lavenant L, Frappart M, Couallier E. Coupling bead-milling and microfiltration for the recovery of lipids and proteins from *Parachlorella kessleri*: Impact of the cell disruption conditions on the separation performances. *Sep Purif Technol.* 2022;287:120570. doi:10.1016/j.seppur.2022.120570
37. Clavijo Rivera E, Villafaña-López L, Liu S, et al. Cross-flow filtration for the recovery of lipids from microalgae aqueous extracts: Membrane selection and performances. *Process Biochem.* 2020;89:199-207. doi:10.1016/j.procbio.2019.10.016
38. Villafaña-López L, Clavijo Rivera E, Liu S, Couallier E, Frappart M. Shear-enhanced membrane filtration of model and real microalgae extracts for lipids recovery in biorefinery context. *Bioresour Technol.* 2019;288:121539. doi:10.1016/j.biortech.2019.121539
39. Liu S, Gifuni I, Mear H, Frappart M, Couallier E. Recovery of soluble proteins from *Chlorella vulgaris* by bead-milling and microfiltration: Impact of the concentration and the physicochemical conditions during the cell disruption on the whole process. *Process Biochem.* 2021;108:34-47. doi:10.1016/j.procbio.2021.05.021
40. Kourde-Hanafi Y, Loulergue P, Szymczyk A, et al. Influence of PVP content on degradation of PES/PVP membranes: Insights from characterization of membranes with controlled composition. *J Membr Sci.* 2017;533:261-269. doi:10.1016/j.memsci.2017.03.050
41. Clavijo Rivera E. *Etude Physicochimique Du Comportement d'une Solution Synthétique d'un Broyat de Microalgues et de La Séparation Par Procédés Membranaires Des Lipides Qu'il Contient.* These de doctorat. Nantes; 2017. Accessed May 30, 2022. <https://www.theses.fr/2017NANT4099>
42. Gennes PG de, Brochard-Wyart F. *Gouttes, bulles, perles et ondes.* Humensis; 2015.
43. Suwal S, Doyen A, Bazinet L. Characterization of protein, peptide and amino acid fouling on ion-exchange and filtration membranes: Review of current and recently developed methods. *J Membr Sci.* 2015;496:267-283. doi:10.1016/j.memsci.2015.08.056
44. Ge J, Lei J, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(7):428-432. doi:10.1038/nnano.2012.80
45. Hoffmann H, Reger M. Emulsions with unique properties from proteins as emulsifiers. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;205:94-104. doi:10.1016/j.cis.2013.08.007
46. Elcik H, Cakmakci M, Ozkaya B. The fouling effects of microalgal cells on crossflow membrane filtration. *J Membr Sci.* 2016;499:116-125. doi:10.1016/j.memsci.2015.10.043
47. Qu F, Liang H, Zhou J, et al. Ultrafiltration membrane fouling caused by extracellular organic matter (EOM) from *Microcystis aeruginosa*: Effects of membrane pore size and surface hydrophobicity. *J Membr Sci.* 2014;449:58-66. doi:10.1016/j.memsci.2013.07.070
48. Tummons E, Han Q, Tanudjaja HJ, Hejase CA, Chew JW, Tarabara VV. Membrane fouling by emulsified oil: A review. *Sep Purif Technol.* 2020;248:116919. doi:10.1016/j.seppur.2020.116919
49. Chen W, Qian C, Zhou KG, Yu HQ. Molecular Spectroscopic Characterization of Membrane Fouling: A Critical Review. *Chem.* 2018;4(7):1492-1509. doi:10.1016/j.chempr.2018.03.011
50. Elcik H, Cakmakci M, Ozkaya B. The fouling effects of microalgal cells on crossflow membrane filtration. *J Membr Sci.* 2016;499:116-125. doi:10.1016/j.memsci.2015.10.043
51. Villafaña-López L, Clavijo Rivera E, Liu S, Couallier E, Frappart M. Shear-enhanced membrane filtration of model and real microalgae extracts for lipids recovery in biorefinery context. *Bioresour Technol.* 2019;288:121539. doi:10.1016/j.biortech.2019.121539
52. Ulbricht M, Schuster O, Ansoorge W, Ruetering M, Steiger P. Influence of the strongly anisotropic cross-section morphology of a novel polyethersulfone microfiltration membrane on filtration performance. *Sep Purif Technol.* 2007;57(1):63-73. doi:10.1016/j.seppur.2007.02.012

53. Yu Z, Chu H, Zhang W, et al. Multi-dimensional in-depth dissection the algae-related membrane fouling in heterotrophic microalgae harvesting: Deposition dynamics, algae cake formation, and interaction force analysis. *J Membr Sci.* 2021;635:119501. doi:10.1016/j.memsci.2021.119501
54. Ho CC, Zydney AL. Effect of membrane morphology on the initial rate of protein fouling during microfiltration. *J Membr Sci.* 1999;155(2):261-275. doi:10.1016/S0376-7388(98)00324-X
55. Ulbricht M. Advanced functional polymer membranes. *Polymer.* 2006;47(7):2217-2262. doi:10.1016/j.polymer.2006.01.084
56. Vrijenhoek EM, Hong S, Elimelech M. Influence of membrane surface properties on initial rate of colloidal fouling of reverse osmosis and nanofiltration membranes. *J Membr Sci.* 2001;188(1):115-128. doi:10.1016/S0376-7388(01)00376-3
57. Marbelia L, Mulier M, Vandamme D, Muylaert K, Szymczyk A, Vankelecom IFJ. Polyacrylonitrile membranes for microalgae filtration: Influence of porosity, surface charge and microalgae species on membrane fouling. *Algal Res.* 2016;19:128-137. doi:10.1016/j.algal.2016.08.004
58. Rouquié C, Liu S, Rabiller-Baudry M, et al. Electrokinetic leakage as a tool to probe internal fouling in MF and UF membranes. *J Membr Sci.* 2020;599:117707. doi:10.1016/j.memsci.2019.117707
59. Liu F, Abed MRM, Li K. Hydrophilic modification of P(VDF-co-CTFE) porous membranes. *Chem Eng Sci.* 2011;66(1):27-35. doi:10.1016/j.ces.2010.09.026
60. Rudolph G, Virtanen T, Ferrando M, Güell C, Lipnizki F, Kallioinen M. A review of in situ real-time monitoring techniques for membrane fouling in the biotechnology, biorefinery and food sectors. *J Membr Sci.* 2019;588:117221. doi:10.1016/j.memsci.2019.117221
61. Tanis-Kanbur MB, Peinador RI, Calvo JI, Hernández A, Chew JW. Porosimetric membrane characterization techniques: A review. *J Membr Sci.* 2021;619:118750. doi:10.1016/j.memsci.2020.118750
62. Johnson DJ, Oatley-Radcliffe DL, Hilal N. State of the art review on membrane surface characterisation: Visualisation, verification and quantification of membrane properties. *Desalination.* 2018;434:12-36. doi:10.1016/j.desal.2017.03.023
63. Kang ST, Subramani A, Hoek EMV, Deshusses MA, Matsumoto MR. Direct observation of biofouling in cross-flow microfiltration: mechanisms of deposition and release. *J Membr Sci.* 2004;244(1):151-165. doi:10.1016/j.memsci.2004.07.011
64. Li H, Fane AG, Coster HGL, Vigneswaran S. Direct observation of particle deposition on the membrane surface during crossflow microfiltration. *J Membr Sci.* 1998;149(1):83-97. doi:10.1016/S0376-7388(98)00181-1
65. Ferrando M, Růžek A, Zator M, López F, Güell C. An approach to membrane fouling characterization by confocal scanning laser microscopy. *J Membr Sci.* 2005;250(1):283-293. doi:10.1016/j.memsci.2004.10.043
66. Sun C, Fiksdal L, Hanssen-Bauer A, Rye MB, Leiknes T. Characterization of membrane biofouling at different operating conditions (flux) in drinking water treatment using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and image analysis. *J Membr Sci.* 2011;382(1):194-201. doi:10.1016/j.memsci.2011.08.010
67. Lee N, Amy G, Croué JP, Buisson H. Morphological analyses of natural organic matter (NOM) fouling of low-pressure membranes (MF/UF). *J Membr Sci.* 2005;261(1):7-16. doi:10.1016/j.memsci.2005.02.039
68. Abdul Wahab Mohammad, Nidal Hilal, Lim YP, Indok Nurul Hasyimah Mohd Amin, Rafeqah Raslan. Atomic force microscopy as a tool for asymmetric polymeric membrane characterization. *Sains Malays.* 2011;40(3):237-244.
69. Bégoïn L, Rabiller-Baudry M, Chaufer B, Hautbois MC, Doneva T. Ageing of PES industrial spiral-wound membranes in acid whey ultrafiltration. *Desalination.* 2006;192(1):25-39. doi:10.1016/j.desal.2005.10.009

70. Trinh TA, Li W, Han Q, Liu X, Fane AG, Chew JW. Analyzing external and internal membrane fouling by oil emulsions via 3D optical coherence tomography. *J Membr Sci.* 2018;548:632-640. doi:10.1016/j.memsci.2017.10.043
71. Dreszer C, Wexler AD, Drusová S, et al. In-situ biofilm characterization in membrane systems using Optical Coherence Tomography: Formation, structure, detachment and impact of flux change. *Water Res.* 2014;67:243-254. doi:10.1016/j.watres.2014.09.006
72. Fortunato L, Qamar A, Wang Y, Jeong S, Leiknes T. In-situ assessment of biofilm formation in submerged membrane system using optical coherence tomography and computational fluid dynamics. *J Membr Sci.* 2017;521:84-94. doi:10.1016/j.memsci.2016.09.004
73. Xiao F, Xiao P, Zhang WJ, Wang DS. Identification of key factors affecting the organic fouling on low-pressure ultrafiltration membranes. *J Membr Sci.* 2013;447:144-152. doi:10.1016/j.memsci.2013.07.040
74. Saha NK, Balakrishnan M, Ulbricht M. Sugarcane juice ultrafiltration: FTIR and SEM analysis of polysaccharide fouling. *J Membr Sci.* 2007;306(1):287-297. doi:10.1016/j.memsci.2007.09.006
75. Benavente L, Coetsier C, Venault A, et al. FTIR mapping as a simple and powerful approach to study membrane coating and fouling. *J Membr Sci.* 2016;520:477-489. doi:10.1016/j.memsci.2016.07.061
76. Rabiller-Baudry M, Le Maux M, Chaufer B, Begoin L. Characterisation of cleaned and fouled membrane by ATR—FTIR and EDX analysis coupled with SEM: application to UF of skimmed milk with a PES membrane. *Desalination.* 2002;146(1):123-128. doi:10.1016/S0011-9164(02)00503-9
77. Ivleva NP, Kubryk P, Niessner R. Raman microspectroscopy, surface-enhanced Raman scattering microspectroscopy, and stable-isotope Raman microspectroscopy for biofilm characterization. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(18):4353-4375. doi:10.1007/s00216-017-0303-0
78. Cui L, Yao M, Ren B, Zhang KS. Sensitive and Versatile Detection of the Fouling Process and Fouling Propensity of Proteins on Polyvinylidene Fluoride Membranes via Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal Chem.* 2011;83(5):1709-1716. doi:10.1021/ac102891g
79. Hao Y, Liang C, Ishigami T, Matsuyama H, Maruyama T. Direct Visualization of Fouling Inside a Hollow-Fiber Ultrafiltration Membrane Caused by Sodium Alginate. *Ind Eng Chem Res.* 2013;52(46):16375-16383. doi:10.1021/ie4026117
80. Hughes DJ, Cui Z, Field RW, Tirlapur UK. In Situ Three-Dimensional Characterization of Membrane Fouling by Protein Suspensions Using Multiphoton Microscopy. *Langmuir.* 2006;22(14):6266-6272. doi:10.1021/la053388q
81. Zou L, Gusnawan P, Zhang G, Yu J. Study of the effective thickness of the water-intrudable hydrophilic layer in dual-layer hydrophilic-hydrophobic hollow fiber membranes for direct contact membrane distillation. *J Membr Sci.* 2020;615:118552. doi:10.1016/j.memsci.2020.118552
82. Korzhova E, Déon S, Koubaa Z, Fievet P, Lopatin D, Baranov O. Modification of commercial UF membranes by electrospray deposition of polymers for tailoring physicochemical properties and enhancing filtration performances. *J Membr Sci.* 2020;598:117805. doi:10.1016/j.memsci.2019.117805
83. Kłosowski MM, McGilvery CM, Li Y, et al. Micro-to nano-scale characterisation of polyamide structures of the SW30HR RO membrane using advanced electron microscopy and stain tracers. *J Membr Sci.* 2016;520:465-476. doi:10.1016/j.memsci.2016.07.063
84. Sundaramoorthi G, Hadwiger M, Ben-Romdhane M, Behzad AR, Madhavan P, Nunes SP. 3D Membrane Imaging and Porosity Visualization. *Ind Eng Chem Res.* 2016;55(12):3689-3695. doi:10.1021/acs.iecr.6b00387
85. Rahimpour A, Madaeni SS. Polyethersulfone (PES)/cellulose acetate phthalate (CAP) blend ultrafiltration membranes: Preparation, morphology, performance and antifouling properties. *J Membr Sci.* 2007;305(1):299-312. doi:10.1016/j.memsci.2007.08.030
86. Kumar S, Mandal A, Guria C. Synthesis, characterization and performance studies of polysulfone and polysulfone/polymer-grafted bentonite based ultrafiltration membranes for the efficient separation of oil field oily wastewater. *Process Saf Environ Prot.* 2016;102:214-228. doi:10.1016/j.psep.2016.03.011

87. Johnson DJ, Oatley-Radcliffe DL, Hilal N. State of the art review on membrane surface characterisation: Visualisation, verification and quantification of membrane properties. *Desalination*. 2018;434:12-36. doi:10.1016/j.desal.2017.03.023
88. Kuei B, Aplan MP, Litofsky JH, Gomez ED. New opportunities in transmission electron microscopy of polymers. *Mater Sci Eng R Rep*. 2020;139:100516. doi:10.1016/j.mser.2019.100516
89. Mollenhauer HH. Artifacts caused by dehydration and epoxy embedding in transmission electron microscopy. *Microsc Res Tech*. 1993;26(6):496-512. doi:10.1002/jemt.1070260604
90. Faith D, Horsfield CJ, Nazarov W. Characterization of pore size of trimethylol propane triacrylate (TMPTA) polymer foam by pulsed sputter coating and SEM analysis. *J Mater Sci*. 2006;41(13):3973-3977. doi:10.1007/s10853-006-7572-x
91. Alvarez J, Saudino G, Musteata V, et al. 3D Analysis of Ordered Porous Polymeric Particles using Complementary Electron Microscopy Methods. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-019-50338-2
92. Chisca S, Musteata VE, Sougrat R, Behzad AR, Nunes SP. Artificial 3D hierarchical and isotropic porous polymeric materials. *Sci Adv*. 2018;4(5):eaat0713. doi:10.1126/sciadv.aat0713
93. Buonomenna MG, Drioli E, Bertoncello R, et al. Ti(IV)/trialkanolamine catalytic polymeric membranes: Preparation, characterization, and use in oxygen transfer reactions. *J Catal*. 2006;238(1):221-231. doi:10.1016/j.jcat.2005.11.044
94. Ma XH, Xu ZL, Liu Y, Sun D. Preparation and characterization of PFSA–PVA–SiO₂/PVA/PAN difunctional hollow fiber composite membranes. *J Membr Sci*. 2010;360(1):315-322. doi:10.1016/j.memsci.2010.05.031
95. Kumar R, Isloor AM, Ismail AF, Matsuura T. Performance improvement of polysulfone ultrafiltration membrane using N-succinyl chitosan as additive. *Desalination*. 2013;318:1-8. doi:10.1016/j.desal.2013.03.003
96. Terao T, Inoue G, Kawase M, et al. Development of novel three-dimensional reconstruction method for porous media for polymer electrolyte fuel cells using focused ion beam-scanning electron microscope tomography. *J Power Sources*. 2017;347:108-113. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.02.050
97. Brickey, KP, Zydney AL, Gomez ED. FIB-SEM tomography reveals the nanoscale 3D morphology of virus removal filters. *J Membr Sci*. Published online August 21, 2021:119766. doi:10.1016/j.memsci.2021.119766
98. Nunes SP, Sougrat R, Hooghan B, et al. Ultraporous Films with Uniform Nanochannels by Block Copolymer Micelles Assembly. *Macromolecules*. 2010;43(19):8079-8085. doi:10.1021/ma101531k
99. Prill T, Redenbach C, Roldan D, et al. Simulating permeabilities based on 3D image data of a layered nano-porous membrane. *Int J Solids Struct*. 2020;184:3-13. doi:10.1016/j.ijsolstr.2019.04.010
100. Moroni R, Thiele S. FIB/SEM tomography segmentation by optical flow estimation. *Ultramicroscopy*. 2020;219:113090. doi:10.1016/j.ultramic.2020.113090
101. Iwai H, Shikazono N, Matsui T, et al. Quantification of SOFC anode microstructure based on dual beam FIB-SEM technique. *J Power Sources*. 2010;195(4):955-961. doi:10.1016/j.jpowsour.2009.09.005
102. Reingruber H, Zankel A, Mayrhofer C, Poelt P. Quantitative characterization of microfiltration membranes by 3D reconstruction. *J Membr Sci*. 2011;372(1):66-74. doi:10.1016/j.memsci.2011.01.037
103. Ostadi H, Rama P, Liu Y, Chen R, Zhang XX, Jiang K. 3D reconstruction of a gas diffusion layer and a microporous layer. *J Membr Sci*. 2010;351(1):69-74. doi:10.1016/j.memsci.2010.01.031
104. Čalkovský M, Müller E, Meffert M, et al. Comparison of segmentation algorithms for FIB-SEM tomography of porous polymers: Importance of image contrast for machine learning segmentation. *Mater Charact*. 2021;171:110806. doi:10.1016/j.matchar.2020.110806
105. Gobert C, Kudzal A, Sietins J, Mock C, Sun J, McWilliams B. Porosity segmentation in X-ray computed tomography scans of metal additively manufactured specimens with machine learning. *Addit Manuf*. 2020;36:101460. doi:10.1016/j.addma.2020.101460

106. Latief FDE. Analysis and Visualization of 2D and 3D Grain and Pore Size of Fontainebleau Sandstone Using Digital Rock Physics. *J Phys Conf Ser.* 2016;739:012047. doi:10.1088/1742-6596/739/1/012047
107. Lanterne C, Gueorguieva S, Desbarats P. LOCAL THICKNESS COMPUTATION IN 3D MESHES AND 3D PRINTABILITY ASSESSMENT. In: ; 2016:287-292. Accessed February 8, 2021. <http://www.iadisportal.org/digital-library/local-thickness-computation-in-3d-meshes-and-3d-printability-assessment>
108. Khromov D, Mestetskiy L. 3d skeletonization as an optimization problem. *Proc 24th Can Conf Comput Geom CCCG 2012*. Published online January 1, 2012:259-264.
109. Cadiou F. *Étude de l'impact de La Microstructure Sur Les Propriétés Effectives Électriques Des Batteries Lithium-Ion*. These de doctorat. Lyon; 2019. Accessed June 22, 2022. <http://www.theses.fr/2019LYSEI108>
110. Zhang K, Wang S, Wang L, et al. 3D visualization of tectonic coal microstructure and quantitative characterization on topological connectivity of pore-fracture networks by Micro-CT. *J Pet Sci Eng.* 2022;208:109675. doi:10.1016/j.petrol.2021.109675
111. Pacheco FA, Pinnau I, Reinhard M, Leckie JO. Characterization of isolated polyamide thin films of RO and NF membranes using novel TEM techniques. *J Membr Sci.* 2010;358(1):51-59. doi:10.1016/j.memsci.2010.04.032
112. Ziel R, Haus A, Tulke A. Quantification of the pore size distribution (porosity profiles) in microfiltration membranes by SEM, TEM and computer image analysis. *J Membr Sci.* 2008;323(2):241-246. doi:10.1016/j.memsci.2008.05.057
113. Trent JS. Ruthenium tetroxide staining of polymers: new preparative methods for electron microscopy. *Macromolecules.* 1984;17(12):2930-2931. doi:10.1021/ma00142a087
114. CARTER BA, Williams DB, Carter CB, Williams DB. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science. Diffraction. II*. Springer Science & Business Media; 1996.
115. Corazza M, Simonsen SB, Gnaegi H, Thydén KTS, Krebs FC, Gevorgyan SA. Comparison of ultramicrotomy and focused-ion-beam for the preparation of TEM and STEM cross section of organic solar cells. *Appl Surf Sci.* 2016;389:462-468. doi:10.1016/j.apsusc.2016.07.096
116. White H, Pu Y, Rafailovich M, et al. Focused ion beam/lift-out transmission electron microscopy cross sections of block copolymer films ordered on silicon substrates. *Polymer.* 2001;42(4):1613-1619. doi:10.1016/S0032-3861(00)00503-6
117. Qin L, Mergos IA, Verweij H. Obtaining accurate cross-section images of supported polymeric and inorganic membrane structures. *J Membr Sci.* 2015;476:194-199. doi:10.1016/j.memsci.2014.11.027
118. Qi S, Fang W, Siti W, Widjajanti W, Hu X, Wang R. Polymersomes-based high-performance reverse osmosis membrane for desalination. *J Membr Sci.* 2018;555:177-184. doi:10.1016/j.memsci.2018.03.052
119. Ziel R, Haus A, Tulke A. Quantification of the pore size distribution (porosity profiles) in microfiltration membranes by SEM, TEM and computer image analysis. *J Membr Sci.* 2008;323(2):241-246. doi:10.1016/j.memsci.2008.05.057
120. Pacheco FA, Pinnau I, Reinhard M, Leckie JO. Characterization of isolated polyamide thin films of RO and NF membranes using novel TEM techniques. *J Membr Sci.* 2010;358(1):51-59. doi:10.1016/j.memsci.2010.04.032
121. Kłosowski MM, McGilvery CM, Li Y, et al. Micro-to nano-scale characterisation of polyamide structures of the SW30HR RO membrane using advanced electron microscopy and stain tracers. *J Membr Sci.* 2016;520:465-476. doi:10.1016/j.memsci.2016.07.063
122. Van Goethem C, Verbeke R, Pfanmöller M, et al. The role of MOFs in Thin-Film Nanocomposite (TFN) membranes. *J Membr Sci.* 2018;563:938-948. doi:10.1016/j.memsci.2018.06.040
123. Shin C, Jiang X, Ko W, Balsara NP. Effect of pore penetration on transport through supported membranes studied by electron microscopy and pervaporation. *J Membr Sci.* 2017;542:18-23. doi:10.1016/j.memsci.2017.07.052

124. Lin L, Lopez R, Ramon GZ, Coronell O. Investigating the void structure of the polyamide active layers of thin-film composite membranes. *J Membr Sci*. 2016;497:365-376. doi:10.1016/j.memsci.2015.09.020
125. Li Y, Kłosowski MM, McGilvery CM, Porter AE, Livingston AG, Cabral JT. Probing flow activity in polyamide layer of reverse osmosis membrane with nanoparticle tracers. *J Membr Sci*. 2017;534:9-17. doi:10.1016/j.memsci.2017.04.005
126. Savva I, Constantinou D, Marinica O, Vasile E, Vekas L, Krasia-Christoforou T. Fabrication and characterization of superparamagnetic poly(vinyl pyrrolidone)/poly(L-lactide)/Fe₃O₄ electrospun membranes. *J Magn Magn Mater*. 2014;352:30-35. doi:10.1016/j.jmmm.2013.10.005
127. Liu J, Wu H, Huang C, et al. Optimized Negative-Staining Protocol for Lipid-Protein Interactions Investigated by Electron Microscopy. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;2003:163-173. doi:10.1007/978-1-4939-9512-7_8
128. Vežočník V, Rebolj K, Sitar S, et al. Size fractionation and size characterization of nanoemulsions of lipid droplets and large unilamellar lipid vesicles by asymmetric-flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering and dynamic light scattering. *J Chromatogr A*. 2015;1418:185-191. doi:10.1016/j.chroma.2015.09.048
129. Singh AP, Wi SG, Chung GC, Kim YS, Kang H. The micromorphology and protein characterization of rubber particles in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis* and *Hevea brasiliensis*. *J Exp Bot*. 2003;54(384):985-992. doi:10.1093/jxb/erg107
130. Gusnard D, Kirschner RH. Cell and organelle shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: effects of fixation, dehydration and critical point drying. *J Microsc*. 1977;110(1):51-57. doi:10.1111/j.1365-2818.1977.tb00012.x
131. Aston R, Sewell K, Klein T, Lawrie G, Grøndahl L. Evaluation of the impact of freezing preparation techniques on the characterisation of alginate hydrogels by cryo-SEM. *Eur Polym J*. 2016;82:1-15. doi:10.1016/j.eurpolymj.2016.06.025
132. Danev R, Yanagisawa H, Kikkawa M. Cryo-Electron Microscopy Methodology: Current Aspects and Future Directions. *Trends Biochem Sci*. 2019;44(10):837-848. doi:10.1016/j.tibs.2019.04.008
133. HAYLES MF, DE WINTER DAM. An introduction to cryo-FIB-SEM cross-sectioning of frozen, hydrated Life Science samples. *J Microsc*. 2021;281(2):138-156. doi:10.1111/jmi.12951
134. Linder MB. Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2009;5(14):356-363. doi:10.1016/j.cocis.2009.04.001
135. Stradner A, Sedgwick H, Cardinaux F, Poon WCK, Egelhaaf SU, Schurtenberger P. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature*. 2004;432(7016):492-495. doi:10.1038/nature03109
136. Frank J. *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State*. Oxford University Press; 2006.
137. Damodaran S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *J Food Sci*. 2005;70(3):R54-R66. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x
138. Sarraf CE. Immunolabeling for electron microscopy. *Methods Mol Med*. 2000;40:439-452. doi:10.1385/1-59259-076-4:439
139. Beesley JE. Immunolabelling and electron microscopy in cytochemistry. *Curr Opin Immunol*. 1989;2(6):927-931. doi:10.1016/0952-7915(89)90180-5
140. Carrassi A, Zambon JJ, Vogel G. A new method of bacterial identification using gold immunolabelling and scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol*. 1990;35:S177-S180. doi:10.1016/0003-9969(90)90152-Z
141. Marion J, Trichet M. L'identification de molécules et structures en Microscopie Electronique en Transmission octobre 2018, <https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02870140>
142. Ripper D, Schwarz H, Stierhof YD. Cryo-section immunolabelling of difficult to preserve specimens: advantages of cryofixation, freeze-substitution and rehydration. *Biol Cell*. 2008;100(2):109-123. doi:10.1042/BC20070106
143. Giepmans BNG. Bridging fluorescence microscopy and electron microscopy. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(2):211. doi:10.1007/s00418-008-0460-5

144. Hayat MA. *Positive Staining for Electron Microscopy*. Van Nostrand Reinhold Company; 1975.
145. Gloaguen JM. Intérêt des techniques de marquage pour les observations M.E des matériaux polymères. Published online October 8, 2010.
146. Hayat, Principles and Techniques of Electron Microscopy | Biological imaging. Cambridge University Press, 2001,
https://www.academia.edu/26538014/Hayat_MA_2000_Principles_and_techniques_of_electron_microscopy_biological_applications_4th_edn_543pp_Cambridge_Cambridge_University_Press_65_har_dback_
147. Sato C, Yamazawa T, Ohtani A, et al. Primary cultured neuronal networks and type 2 diabetes model mouse fatty liver tissues in aqueous liquid observed by atmospheric SEM (ASEM): Staining preferences of metal solutions. *Micron*. 2019;118:9-21. doi:10.1016/j.micron.2018.11.005
148. Monneron A, Bernhard W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res*. 1969;27(3):266-288. doi:10.1016/S0022-5320(69)80017-1
149. Rames M, Yu Y, Ren G. Optimized negative staining: a high-throughput protocol for examining small and asymmetric protein structure by electron microscopy. *J Vis Exp JoVE*. 2014;(90):e51087. doi:10.3791/51087
150. Knapek E, Dubochet J. Beam damage to organic material is considerably reduced in cryo-electron microscopy. *J Mol Biol*. 1980;141(2):147-161. doi:10.1016/0022-2836(80)90382-4
151. Thompson RF, Walker M, Siebert CA, Muench SP, Ranson NA. An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology. *Methods*. 2016;100:3-15. doi:10.1016/j.ymeth.2016.02.017
152. Franken LE, Boekema EJ, Stuart MCA. Transmission Electron Microscopy as a Tool for the Characterization of Soft Materials: Application and Interpretation. *Adv Sci*. 2017;4(5):1600476. doi:<https://doi.org/10.1002/advs.201600476>
153. Mielanczyk L, Matysiak N, Michalski M, Buldak R, Wojnicz R. Closer to the native state. Critical evaluation of cryo-techniques for Transmission Electron Microscopy: preparation of biological samples. *Folia Histochem Cytobiol*. 2014;52(1):1-17. doi:10.5603/FHC.2014.0001
154. Dubochet J, Al-Amoudi A, Bouchet-Marquis C, Eltsov M, Zuber B. CEMOVIS; cryo-electron microscopy of vitreous sections. In: Cavalier A, Spehner D, Humbel BM, eds. *Dubochet, J.; Al-Amoudi, A.; Bouchet-Marquis, C.; Eltsov, M.; Zuber, Benoît (2008). CEMOVIS; Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections. In: Cavalier, Annie; Spehner, Danièle; Humbel, Bruno M. (Éds.) Handbook of Cryo-Preparation Methods for Electron Microscopy. Methods in Visualization. CRC Press. CRC Press; 2008.* Accessed July 2, 2022. <https://boris.unibe.ch/89302/>
155. Chang JJ, McDowall AW, Lepault J, Freeman R, Walter CA, Dubochet J. Freezing, sectioning and observation artefacts of frozen hydrated sections for electron microscopy. *J Microsc*. 1983;132(1):109-123. doi:10.1111/j.1365-2818.1983.tb04714.x
156. Verkade P. An introduction to Cryo fixation (and a bit more). Presented at: 2021; Cryo EM Course Nottingham, September 2021.
157. Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, et al. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*. 1988;21(2):129-228. doi:10.1017/S0033583500004297
158. Marko JR, Jasek M. Sonar detection and measurements of ice in a freezing river I: Methods and data characteristics. *Cold Reg Sci Technol*. 2010;63(3):121-134. doi:10.1016/j.coldregions.2010.05.005
159. Umrath W. Cooling bath for rapid freezing in electron microscopy. *J Microsc*. 1974;101(1):103-105. doi:10.1111/j.1365-2818.1974.tb03871.x
160. Efthymiou C, Williams MAK, McGrath KM. Revealing the structure of high-water content biopolymer networks: Diminishing freezing artefacts in cryo-SEM images. *Food Hydrocoll*. 2017;73:203-212. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.06.040
161. Essani M, Mevellec JY, Charbonnier B, et al. Application of a Cryo-FIB-SEM- μ Raman Instrument to Probe the Depth of Vitreous Ice in a Frozen Sample. *Anal Chem*. 2022;94(23):8120-8125. doi:10.1021/acs.analchem.2c00245

162. Dahl R, Staehelin LA. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: Theory and practice. *J Electron Microscop Tech.* 1989;13(3):165-174. doi:10.1002/jemt.1060130305
163. Moor H. Theory and Practice of High Pressure Freezing. In: Steinbrecht RA, Zierold K, eds. *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy.* Springer; 1987:175-191. doi:10.1007/978-3-642-72815-0_8
164. Sosinsky GE, Crum J, Jones YZ, et al. The combination of chemical fixation procedures with high pressure freezing and freeze substitution preserves highly labile tissue ultrastructure for electron tomography applications. *J Struct Biol.* 2008;161(3):359-371. doi:10.1016/j.jsb.2007.09.002
165. McDONALD KL, Webb RI. Freeze substitution in 3 hours or less. *J Microsc.* 2011;243(3):227-233. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03526.x
166. Mahamid J, Schampers R, Persoon H, Hyman AA, Baumeister W, Plitzko JM. A focused ion beam milling and lift-out approach for site-specific preparation of frozen-hydrated lamellas from multicellular organisms. *J Struct Biol.* 2015;192(2):262-269. doi:10.1016/j.jsb.2015.07.012
167. Parmenter CD, Nizamudeen ZA. Cryo-FIB-lift-out: practically impossible to practical reality. *J Microsc.* 2021;281(2):157-174. doi:https://doi.org/10.1111/jmi.12953
168. Medeiros JM, Böck D, Weiss GL, Kooger R, Wepf RA, Pilhofer M. Robust workflow and instrumentation for cryo-focused ion beam milling of samples for electron cryotomography. *Ultramicroscopy.* 2018;190:1-11. doi:10.1016/j.ultramic.2018.04.002
169. James BJ, Jing Y, Dong Chen X. Membrane fouling during filtration of milk—a microstructural study. *J Food Eng.* 2003;60(4):431-437. doi:10.1016/S0260-8774(03)00066-9
170. Huang X, Zhang J, Peng K, et al. Functional magnetic nanoparticles for enhancing ultrafiltration of waste cutting emulsions by significantly increasing flux and reducing membrane fouling. *J Membr Sci.* 2019;573:73-84. doi:10.1016/j.memsci.2018.11.074
171. Sgro GG, Costa TRD. Cryo-EM Grid Preparation of Membrane Protein Samples for Single Particle Analysis. *Front Mol Biosci.* 2018;5. doi:10.3389/fmolb.2018.00074
172. Spehner D, Steyer AM, Bertinetti L, et al. Cryo-FIB-SEM as a promising tool for localizing proteins in 3D. *J Struct Biol.* 2020;211(1):107528. doi:10.1016/j.jsb.2020.107528
173. Frederik PM, Stuart MC, Bomans PH, Busing WM, Burger KN, Verkleij AJ. Perspective and limitations of cryo-electron microscopy. From model systems to biological specimens. *J Microsc.* 1991;161(Pt 2):253-262. doi:10.1111/j.1365-2818.1991.tb03088.x
174. Sui X, Arlt H, Brock KP, et al. Cryo-electron microscopy structure of the lipid droplet-formation protein seipin. *J Cell Biol.* 2018;217(12):4080-4091. doi:10.1083/jcb.201809067
175. Mitra K, Frank J. RIBOSOME DYNAMICS: Insights from Atomic Structure Modeling into Cryo-Electron Microscopy Maps. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2006;35(1):299-317. doi:10.1146/annurev.biophys.35.040405.101950
176. Linares R. *Caractérisation, quantification et isolation de vésicules extracellulaires du plasma sanguin à l'aide de nanoparticules d'or ou magnétiques conjuguées à des protéines.* phdthesis. Université de Bordeaux; 2016. Accessed July 4, 2022. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01483569>
177. Wang X mao, Sun F yun, Li X yan. Investigation of the role of biopolymer clusters in MBR membrane fouling using flash freezing and environmental scanning electron microscopy. *Chemosphere.* 2011;85(7):1154-1159. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.08.038
178. Bell EA, Holloway RW, Cath TY. Evaluation of forward osmosis membrane performance and fouling during long-term osmotic membrane bioreactor study. *J Membr Sci.* 2016;517:1-13. doi:10.1016/j.memsci.2016.06.014
179. Liu S. *Fractionnement de Biomolécules Issues de Microalgues Par Filtration Membranaire : Impact Du Milieu Complexe Sur Les Performances Du Procédé.* These de doctorat. Nantes; 2021. Accessed May 30, 2022. <http://www.theses.fr/2021NANT4016>
180. Clavijo Rivera E. *Etude Physicochimique Du Comportement d'une Solution Synthétique d'un Broyat de Microalgues et de La Séparation Par Procédés Membranaires Des Lipides Qu'il Contient.* These de doctorat. Nantes; 2017. Accessed May 30, 2022. <https://www.theses.fr/2017NANT4099>

181. Clavijo Rivera E, Montalescot V, Viau M, et al. Mechanical cell disruption of *Parachlorella kessleri* microalgae: Impact on lipid fraction composition. *Bioresour Technol.* 2018;256:77-85. doi:10.1016/j.biortech.2018.01.148
182. Rouquié C, Liu S, Rabiller-Baudry M, et al. Electrokinetic leakage as a tool to probe internal fouling in MF and UF membranes. *J Membr Sci.* 2020;599:117707. doi:10.1016/j.memsci.2019.117707
183. Morishita S, Ishikawa R, Kohno Y, Sawada H, Shibata N, Ikuhara Y. Attainment of 40.5 pm spatial resolution using 300 kV scanning transmission electron microscope equipped with fifth-order aberration corrector. *Microscopy.* 2018;67(1):46-50. doi:10.1093/jmicro/dfx122
184. Carter CB, Williams DB. *Transmission Electron Microscopy: Diffraction, Imaging, and Spectrometry.* Springer; 2016.
185. Trent JS, Scheinbeim JI, Couchman PR. Ruthenium tetroxide staining of polymers for electron microscopy. *Macromolecules.* 1983;16(4):589-598. doi:10.1021/ma00238a021
186. Chen W, Zhu M, Song S, Sun B, Chen Y, Adler HJP. Morphological Characterization of PMMA/PAN Composite Particles in Nano to Submicro Size. *Macromol Mater Eng.* 2005;290(7):669-674. doi:https://doi.org/10.1002/mame.200400291
187. Por E, van Kooten M, Sarkovic V. Nyquist–Shannon sampling theorem, May 2019.
188. Dragonfly | 3D Visualization and Analysis Solutions for Scientific and Industrial Data | ORS. Published October 7, 2021. Accessed October 7, 2021. <https://www.theobjects.com/index.html>
189. Cantoni M, Holzer L. Advances in 3D focused ion beam tomography. *MRS Bull.* 2014;39(4):354-360. doi:10.1557/mrs.2014.54
190. Corazza M, Simonsen SB, Gnaegi H, Thydén KTS, Krebs FC, Gevorgyan SA. Comparison of ultramicrotomy and focused-ion-beam for the preparation of TEM and STEM cross section of organic solar cells. *Appl Surf Sci.* 2016;389:462-468. doi:10.1016/j.apsusc.2016.07.096
191. Mahamid J, Schampers R, Persoon H, Hyman AA, Baumeister W, Plitzko JM. A focused ion beam milling and lift-out approach for site-specific preparation of frozen-hydrated lamellas from multicellular organisms. *J Struct Biol.* 2015;192(2):262-269. doi:10.1016/j.jsb.2015.07.012
192. Ruste J. Chapitre XI Spectrométrie EDS et WDS : traitement des spectres, 2013.
193. Abellan P, J. Woehl T, R. Parent L, D. Browning N, E. Evans J, Arslan I. Factors influencing quantitative liquid (scanning) transmission electron microscopy. *Chem Commun.* 2014;50(38):4873-4880. doi:10.1039/C3CC48479C
194. Egerton RF. Radiation damage to organic and inorganic specimens in the TEM. *Micron.* 2019;119:72-87. doi:10.1016/j.micron.2019.01.005
195. McDONALD KL, Webb RI. Freeze substitution in 3 hours or less. *J Microsc.* 2011;243(3):227-233. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03526.x
196. Payre B, Gontier E, Jarray A, et al. A new HPF specimen carrier adapter for the use of high-pressure freezing with cryoscanning electron microscope: two applications: stearic acid organization in a hydroxypropyl methylcellulose matrix and mice myocardium. *J Microsc.* 2018;271(3):255-265. doi:10.1111/jmi.12713
197. REMIGY JC, DESCLAUX S. Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. Ref : TIP598WEB - "Médicaments et produits pharmaceutiques." Published March 10, 2007. Accessed February 5, 2021. <https://www-techniques-ingenieur-fr.budistant.univ-nantes.fr/base-documentaire/42665210-production-des-medicaments-industrialisation/download/j2791/filtration-membranaire-oi-nf-uf.html>
198. AIMAR P, BACCHIN P, MAUREL A. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : perméabilité et sélectivité. Ref : TIP452WEB - "Opérations unitaires. Génie de la réaction chimique." Published August 10, 2010. Accessed February 10, 2021. <https://www-techniques-ingenieur-fr.budistant.univ-nantes.fr/base-documentaire/42331210-operations-unitaires-techniques-separatives-sur-membranes/download/j2790/filtration-membranaire-oi-nf-uf-mft.html>
199. Mostaghimi P, Blunt MJ, Bijeljic B. Computations of Absolute Permeability on Micro-CT Images. *Math Geosci.* 2013;45(1):103-125. doi:10.1007/s11004-012-9431-4

200. Song S, Rong L, Dong K, Liu X, Le-Clech P, Shen Y. Pore-scale numerical study of intrinsic permeability for fluid flow through asymmetric ceramic microfiltration membranes. *J Membr Sci.* 2022;642:119920. doi:10.1016/j.memsci.2021.119920
201. Marchetti P, Butté A, Livingston AG. An improved phenomenological model for prediction of solvent permeation through ceramic NF and UF membranes. *J Membr Sci.* 2012;415-416:444-458. doi:10.1016/j.memsci.2012.05.030
202. Chen X, Yao G. An improved model for permeability estimation in low permeable porous media based on fractal geometry and modified Hagen-Poiseuille flow. *Fuel.* 2017;210:748-757. doi:10.1016/j.fuel.2017.08.101
203. Tanis-Kanbur MB, Peinador RI, Calvo JI, Hernández A, Chew JW. Porosimetric membrane characterization techniques: A review. *J Membr Sci.* 2021;619:118750. doi:10.1016/j.memsci.2020.118750
204. Nunes SP, Sougrat R, Hooghan B, et al. Ultraporous Films with Uniform Nanochannels by Block Copolymer Micelles Assembly. *Macromolecules.* 2010;43(19):8079-8085. doi:10.1021/ma101531k
205. Prill T, Redenbach C, Roldan D, et al. Simulating permeabilities based on 3D image data of a layered nano-porous membrane. *Int J Solids Struct.* 2020;184:3-13. doi:10.1016/j.ijsolstr.2019.04.010
206. Sundaramoorthi G, Hadwiger M, Ben-Romdhane M, Behzad AR, Madhavan P, Nunes SP. 3D Membrane Imaging and Porosity Visualization. *Ind Eng Chem Res.* 2016;55(12):3689-3695. doi:10.1021/acs.iecr.6b00387
207. Savart T. *Conception et Réalisation de Fibres Creuses Industrielles d'ultrafiltration En Poly(Fluorure de Vinylidène) (PvDF) Contenant Des Copolymères à Blocs.* phd. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2013. Accessed October 6, 2021. <http://thesesups.ups-tlse.fr/2331/>
208. Egerton RF. Radiation damage to organic and inorganic specimens in the TEM. *Micron.* 2019;119:72-87. doi:10.1016/j.micron.2019.01.005
209. Abellan P, J. Woehl T, R. Parent L, D. Browning N, E. Evans J, Arslan I. Factors influencing quantitative liquid (scanning) transmission electron microscopy. *Chem Commun.* 2014;50(38):4873-4880. doi:10.1039/C3CC48479C
210. Ulbricht M. Advanced functional polymer membranes. *Polymer.* 2006;47(7):2217-2262. doi:10.1016/j.polymer.2006.01.084
211. Ge J, Jin Q, Zong D, Yu J, Ding B. Biomimetic Multilayer Nanofibrous Membranes with Elaborated Superwettability for Effective Purification of Emulsified Oily Wastewater. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(18):16183-16192. doi:10.1021/acsami.8b01952
212. Liu F, Abed MRM, Li K. Hydrophilic modification of P(VDF-co-CTFE) porous membranes. *Chem Eng Sci.* 2011;66(1):27-35. doi:10.1016/j.ces.2010.09.026
213. Williams DB, Carter CB. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science.* 2. ed. Springer; 2009.
214. Trent JS, Scheinbeim JI, Couchman PR. Ruthenium tetroxide staining of polymers for electron microscopy. *Macromolecules.* 1983;16(4):589-598. doi:10.1021/ma00238a021
215. Parmenter CD, Nizamudeen ZA. Cryo-FIB-lift-out: practically impossible to practical reality. *J Microsc.* 2021;281(2):157-174. doi:https://doi.org/10.1111/jmi.12953
216. McDONALD KL, Webb RI. Freeze substitution in 3 hours or less. *J Microsc.* 2011;243(3):227-233. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03526.x
217. Clavijo Rivera E, Villafaña-López L, Liu S, et al. Cross-flow filtration for the recovery of lipids from microalgae aqueous extracts: Membrane selection and performances. *Process Biochem.* 2020;89:199-207. doi:10.1016/j.procbio.2019.10.016
218. Griffin BJ. A comparison of conventional Everhart-Thornley style and in-lens secondary electron detectors—a further variable in scanning electron microscopy. *Scanning.* 2011;33(3):162-173. doi:https://doi.org/10.1002/sca.20255

219. Kumagai K, Sekiguchi T. Sharing of secondary electrons by in-lens and out-lens detector in low-voltage scanning electron microscope equipped with immersion lens. *Ultramicroscopy*. 2009;109(4):368-372. doi:10.1016/j.ultramic.2009.01.005
220. Essani M, Brackx E, Excoffier E. A method for the correction of size effects in microparticles using a peak-to-background approach in electron-probe microanalysis. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*. 2020;169:105880. doi:10.1016/j.sab.2020.105880
221. Green M, Cosslett VE. The Efficiency of Production of Characteristic X-radiation in Thick Targets of a Pure Element. *Proc Phys Soc*. 1961;78(6):1206-1214. doi:10.1088/0370-1328/78/6/315
222. Chen W, Zhu M, Song S, Sun B, Chen Y, Adler HJP. Morphological Characterization of PMMA/PAN Composite Particles in Nano to Submicro Size. *Macromol Mater Eng*. 2005;290(7):669-674. doi:https://doi.org/10.1002/mame.200400291
223. Yu Z, Chu H, Zhang W, et al. Multi-dimensional in-depth dissection the algae-related membrane fouling in heterotrophic microalgae harvesting: Deposition dynamics, algae cake formation, and interaction force analysis. *J Membr Sci*. 2021;635:119501. doi:10.1016/j.memsci.2021.119501
224. Tummons E, Han Q, Tanudjaja HJ, Hejase CA, Chew JW, Tarabara VV. Membrane fouling by emulsified oil: A review. *Sep Purif Technol*. 2020;248:116919. doi:10.1016/j.seppur.2020.116919
225. Chen W, Qian C, Zhou KG, Yu HQ. Molecular Spectroscopic Characterization of Membrane Fouling: A Critical Review. *Chem*. 2018;4(7):1492-1509. doi:10.1016/j.chempr.2018.03.011
226. Rudolph G, Virtanen T, Ferrando M, Güell C, Lipnizki F, Kallioinen M. A review of in situ real-time monitoring techniques for membrane fouling in the biotechnology, biorefinery and food sectors. *J Membr Sci*. 2019;588:117221. doi:10.1016/j.memsci.2019.117221
227. Elcik H, Cakmakci M, Ozkaya B. The fouling effects of microalgal cells on crossflow membrane filtration. *J Membr Sci*. 2016;499:116-125. doi:10.1016/j.memsci.2015.10.043
228. Duclos-Orsello C, Li W, Ho CC. A three mechanism model to describe fouling of microfiltration membranes. *J Membr Sci*. 2006;280(1):856-866. doi:10.1016/j.memsci.2006.03.005
229. Suwal S, Doyen A, Bazinet L. Characterization of protein, peptide and amino acid fouling on ion-exchange and filtration membranes: Review of current and recently developed methods. *J Membr Sci*. 2015;496:267-283. doi:10.1016/j.memsci.2015.08.056
230. Cui L, Yao M, Ren B, Zhang KS. Sensitive and Versatile Detection of the Fouling Process and Fouling Propensity of Proteins on Polyvinylidene Fluoride Membranes via Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal Chem*. 2011;83(5):1709-1716. doi:10.1021/ac102891g
231. Rodellar J, Alférez S, Acevedo A, Molina A, Merino A. Image processing and machine learning in the morphological analysis of blood cells. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(S1):46-53. doi:10.1111/ijlh.12818
232. Breiman L. Random Forests. *Mach Learn*. 2001;45(1):5-32. doi:10.1023/A:1010933404324
233. Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. In: Navab N, Hornegger J, Wells WM, Frangi AF, eds. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*. Lecture Notes in Computer Science. Springer International Publishing; 2015:234-241. doi:10.1007/978-3-319-24574-4_28
234. Moradi S, Oghli MG, Alizadehasl A, et al. MFP-Unet: A novel deep learning based approach for left ventricle segmentation in echocardiography. *Phys Med*. 2019;67:58-69. doi:10.1016/j.ejmp.2019.10.001
235. Mollenhauer HH. Artifacts caused by dehydration and epoxy embedding in transmission electron microscopy. *Microsc Res Tech*. 1993;26(6):496-512. doi:10.1002/jemt.1070260604
236. Rouquié C, Szymczyk A, Rabiller-Baudry M, et al. NaCl precleaning of microfiltration membranes fouled with oil-in-water emulsions: Impact on fouling dislodgment. *Sep Purif Technol*. 2022;285:120353.
237. Chen V, Fane AG, Madaeni S, Wenten IG. Particle deposition during membrane filtration of colloids: transition between concentration polarization and cake formation. *J Membr Sci*. 1997;125(1):109-122. doi:10.1016/S0376-7388(96)00187-1

ANNEXE

A. Annexe du chapitre 3

➤ 3D quantification by FIB/SEM

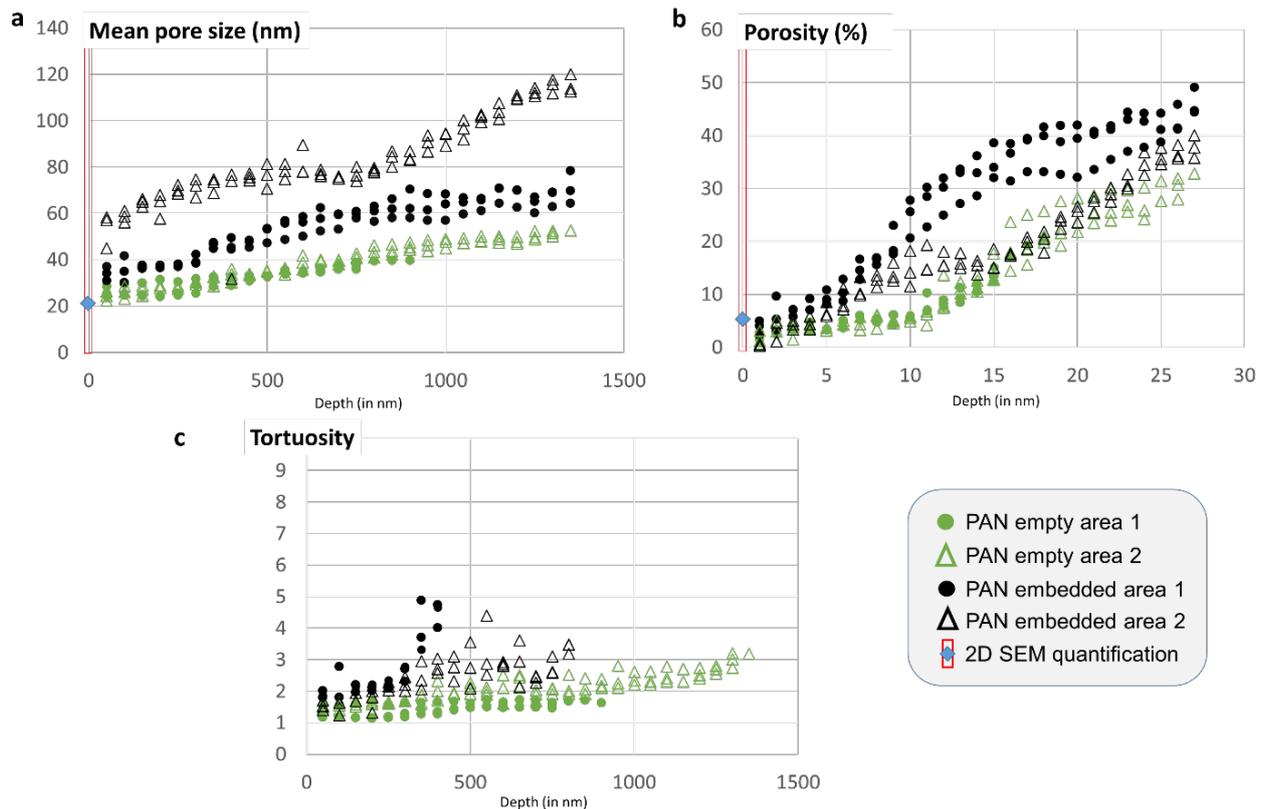


Figure A1: Quantification of pore structural properties for the PAN membrane, as a function of depth (Y direction). (a) Mean pore size, (b) porosity and (c) tortuosity of pores for all volumes (triplicate) for empty (green point, circle for area 1 and triangle for area 2) and embedded (black point, circle for area 1 and triangle for area 2) membranes. The 2D SEM quantification for the membrane surface is represented by a blue point.

In Figure A1, the complete set of data for the PAN membrane quantification of pore properties is presented. The graph extends from the top surface to the end of the volume (in the Y direction). The mean pore size (Figure A1a), porosity (Figure A1b) and tortuosity (Figure A1c) as a function of depth for all volumes (triplicate) for empty (green point) and embedded (black point) membranes are presented. There is a significant dispersion of results for the embedded membranes compared to the relatively similar results for the empty membranes. These variations explain the magnitude of error bars shown in figure 3 of the main manuscript.

For the embedded membranes, some of the data are clearly out of bounds with respect to the others, but the data remain comparable within the same analysis area. This dependence on the observation area for the embedded PAN membranes (which is not observed for empty membranes) is most likely related to the much lower contrast between pores (resin) and membrane, which has a strong impact on the segmentation of and thus quantification from 3D reconstructed volumes.

In the figure A2 the complete results of the quantification of pore properties for the PES

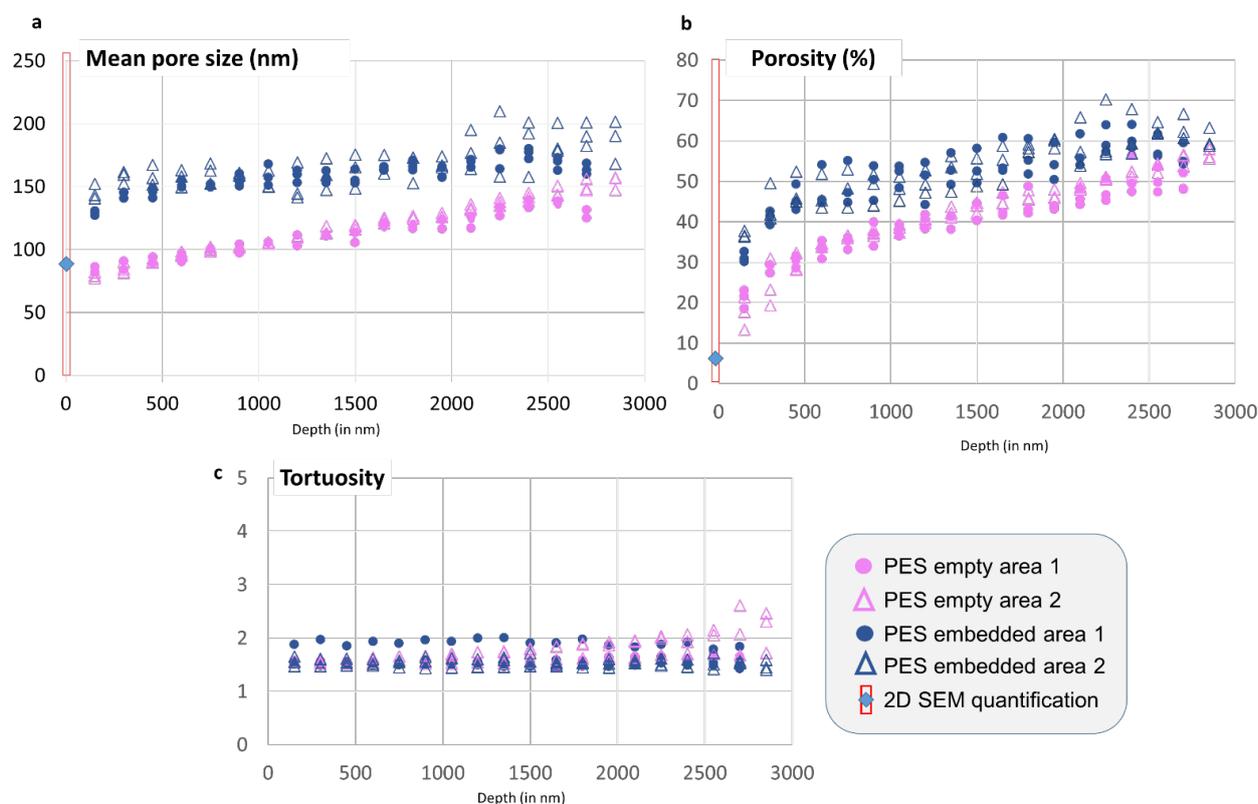


Figure A2: Quantification of pore structural properties for the PES membrane, as a function of depth (Y direction). (a) Mean pore size, (b) porosity and (c) tortuosity of pores for all volumes (triplicate) for empty (blue points, circle for area 1 and triangle for area 2) and embedded (pink points, circle for area 1 and triangle for area 2) membranes. The 2D SEM quantification for the membrane surface is represented by a blue point.

membrane are presented. The graph extends from the top surface to the end of the volume (in the Y direction). The mean pore size (figure A2a), porosity (figure A2b) and tortuosity (figure A2c) as a function of depth for all volumes (triplicate) for empty (green points) and embedded (black points) membranes are presented. The dispersion of the results for the embedded membrane is larger than that for the empty membrane, but still much smaller than that observed for the embedded PAN membrane. These curves were used to calculate the magnitude of error bars presented in the figure 5 and the averaged curves presented in the main manuscript. It can be seen that quantifications are significantly different when empty and embedded conditions

are compared, as for the PAN membrane. Nevertheless, they are very coherent with one another when different analysis areas are considered. This observation is related to an easier segmentation for PES than for PAN.

➤ Averaged macroscopic membrane thickness measurements

Table A1: Macroscopic measurements of the membrane thickness by light microscopy for the PAN and the PES membranes in hydrated, dehydrated and embedded *(dehydrated and resin filled/embedded) conditions. Values were obtained after averaging the individual measurements at different areas of the membrane (between 5 to 10 individual measures taken for each condition and membrane type).

Averaged membrane thickness by light microscopy (μm)		
	PAN	PES
Hydrated	115 \pm 20	180 \pm 20
Dehydrated	120 \pm 7	130 \pm 20
Embedded*	130 \pm 8	260 \pm 40

In table A1, the results of averaging a series of macroscopic measurements of the thickness of the PAN and PES membranes in hydrated, dehydrated and embedded conditions are presented. An inverted microscope (Olympus, GX51 inverted microscope, objective x100) was used to obtain these data. As shown in our averaged measurements, the thickness of hydrated and dehydrated membranes for PAN membranes remained similar (within the error range), while a small increase in thickness was observed for embedded membranes. For the case of PES membranes, a decrease on thickness with dehydration was observed, while a large increase was measured for embedded samples. We note that a factor of 2 increase is observed between embedded and dehydrated (empty) PES samples. According to this result, an increase of the membrane thickness could occur during or upon the embedding process of the membranes. It should be noted that it is not possible to draw definitive conclusions from this type of experiment, as most of the thickness value measured macroscopically comes from the contribution of the macrochannels and/or the fibrous layer.

➤ Calculation of membrane fluxes from microscopic data

Table A2: Structural properties (i) and flux values (ii) for the empty and embedded PAN membranes. Mean pore size, porosity and tortuosity obtained after averaging the quantification over the 0-505 nm range (Fig. 5.). Flux values obtained by macroscale measurement and by calculations by applying Hagen-Poiseuille's law for water at 20°C at TMP 1bar.

	Empty membrane	Embedded membrane
Mean porosity (%)	4 ± 2	10 ± 1.4
Mean pore diameter (nm)	30 ± 0.5	54 ± 7
Mean tortuosity	1.5 ± 0.1	2.4 ± 1.4
Selective layer thickness (nm)	505 ± 2.5	
(ii) Flux calculations for the PAN membrane (20°C, 1 bar)		
By Hagen-Poiseuille's law	535 L · h⁻¹ · m⁻²	2600 L · h⁻¹ · m⁻²
Macroscale measurement	70 L · h⁻¹ · m⁻²	

Table A2. gathers the measured structural properties and compares the macroscale flux measurements with those calculated for empty and embedded membranes using the Hagen-Poiseuille law for a water viscosity at 20°C and a transmembrane pressure of 1 bar. Values of structural properties are obtained after averaging quantification in the 0-505 nm range, corresponding to the identified selective layer. Uncertainties based on standard deviation are given for the mean pore size, the porosity and the tortuosity. Here, the water flux calculated after the membrane characterization with FIB/SEM is equal to 535 L · h⁻¹ · m⁻², whereas the water flux measured in the pilot with the same membrane (before membrane drying and FIB/SEM analysis) was 70 L · h⁻¹ · m⁻². Measurements from previous works on different coupons of the same membrane reference gave fluxes of 60 - 240 L · h⁻¹ · m⁻² after membrane conditioning. For empty conditions, the H-P model overestimated the permeability by a factor of 7 for the PAN membrane. An even larger discrepancy was found for the embedded membranes.

Table A3: Structural properties (i) and flux values (ii) for the empty PES membrane. Mean pore size, porosity and tortuosity obtained after averaging the quantification at the surface (skin, i. e. 100 nm) (Fig. S5.). Flux values by macroscale measurement and by calculations by applying Hagen-Poiseuille's law.

(i) Measured structural properties and of the PES membrane		
	<u>Empty</u> membrane	Embedded membrane
<u>Mean porosity</u> (%)	5 ± 2	22 ± 2
<u>Mean pore diameter</u> (nm)	60 ± 7	105 ± 20
<u>Mean tortuosity</u>	1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.5
<u>Selective layer thickness</u> (nm)	60-100	
(ii) Flux calculation of PES membrane		
By Hagen-Poiseuille <u>law</u>	13 500 L · h ⁻¹ · m ⁻²	170 000 L · h ⁻¹ · m ⁻²
By <u>macroscale measurement</u>	200 - 250 L · h ⁻¹ · m ⁻²	

The same comparison was performed on the empty PES membrane (figure A2 and table A3) thanks to the data presented in the figure 5 of the chapter 3 and the water flux measured in the pilot, where a flux of 250 L · h⁻¹ · m⁻² was obtained. Previous works also presented different fluxes calculation on different coupons (values of 200-250 L h⁻¹ · m⁻² were obtained). Since the thickness of a “skin” is rather difficult to determine (only an upper value is known), the calculation was performed for both the mean pore sizes provided by the supplier (≈100 nm) and that measured by the 3D FIB/SEM quantification (≈60 nm). Other values of structural properties are obtained after quantification achieved on surface pores. For water viscosity at 20°C and a transmembrane pressure of 1 bar, a mean flux range of 13 500 L · h⁻¹ · m⁻² was obtained for the empty PES membrane. The H-P model overestimated the permeability by a factor of 50 for the PES membrane. Here is suggested that either the formula used (Eq. 1) and/or experimental microscopic parameters are not sufficient and that factors such as the polymer hydrophobicity or the local chemistry that may also influence the flux must be taken into account. Anyway, the microscopic description of the porous media gives access to data needed for more elaborated models.

Titre : Développement de méthodes de microscopie électronique pour la caractérisation des membranes organiques et des mécanismes clés de la filtration des biomolécules.

Mots clés : Membrane polymère, microscopie électronique, FIB/MEB, reconstruction 3D, conditions cryogéniques

Résumé : Les procédés de filtration membranaire permettent de concentrer, séparer et purifier les composants d'un mélange complexe en phase liquide. Récemment, les procédés de filtration membranaire ont été adaptés à la valorisation des microalgues, où la filtration utilisant des membranes polymères nanoporeuses est utilisée pour séparer et concentrer les lipides et les protéines des extraits aqueux de microalgues broyées. Les biomolécules récupérées peuvent être utilisées dans l'industrie pharmaceutique, les cosmétiques, les compléments alimentaires ou l'industrie des biocarburants comme le biodiesel. Cependant, au cours de la filtration, l'accumulation indésirable de biomolécules à la surface et dans les pores de la membrane, appelée colmatage, entrave les performances des membranes et constitue la principale limitation du procédé de filtration. Une caractérisation détaillée de la structure des pores et de l'organisation des biomolécules sur et dans la membrane est essentielle pour comprendre puis aider à minimiser son colmatage. Pour répondre à ce besoin, plusieurs techniques de microscopie électronique ont été explorées et développées pour la première fois.

Le 3D FIB/MEB nous a permis d'obtenir les paramètres structuraux 3D de deux membranes (PES et PAN) et ainsi mettre en évidence une couche sélective. Grâce à l'utilisation de conditions cryogéniques (cryo-FIB/MEB), nous avons caractérisé les membranes hydratées et celles colmatées après filtration, tout en minimisant les dommages sur les polymères, les biomolécules et leur organisation. Ainsi, les lipides et les protéines ont été localisés au sein de la structure native du matériau. Pour mener à bien ces caractérisations, une méthode de rehaussement de contraste des deux classes de biomolécules, un moyen de les distinguer dans des mélanges complexes, ainsi que des protocoles de reconstruction 3D adaptés à ces matériaux et interfaces à faible contraste ont été développés. Les différents défis techniques rencontrés à température ambiante ou en conditions cryogéniques sont discutés. Ce travail ouvre une nouvelle voie d'obtention de données structurales quantitatives, utiles à la fois pour comprendre les mécanismes de colmatage, pour aider à la conception de nouvelles membranes de filtration, mais aussi pour alimenter des modèles prédictifs construits à partir de l'échelle nanométrique.

Title: Development of electron microscopy approaches for the characterisation of organic membranes and key mechanisms of biomolecule filtration.

Keywords: Polymer membrane, electron microscopy, FIB/SEM, 3D reconstruction, cryogenic conditions

Abstract: Membrane filtration processes are used to concentrate, separate and purify the components of a complex mixture in the liquid phase. Recently, membrane filtration processes have been adapted to the valorisation of microalgae, where filtration using nanoporous polymer membranes is used to separate and recover lipids and proteins from the aqueous extracts of ground microalgae. The recovered biomolecules can be used in the pharmaceutical industry, cosmetics, food complements or the biofuel industry such as biodiesel. However, during filtration, unwanted accumulation of biomolecules on the surface and in the pores of the membrane, called fouling, hampers the membrane performance and is the main limitation of the filtration process. Detailed characterisation of the pore structure and organisation of biomolecules on and in the membrane is essential to understand and then help minimise fouling.

The 3D FIB/MEB allowed us to obtain the 3D structural parameters of two membranes (PES and PAN) and thus highlight a selective layer. Using cryogenic conditions (cryo-FIB/MEB), we examined hydrated and fouled membranes after filtration, while minimising damage to polymers, the biomolecules and their organization. In this way, lipids and proteins were located within the native structure of the material. In this way, a contrast enhancement method for these two classes of biomolecules, a means of distinguishing them in complex mixtures, as well as 3D reconstruction protocols adapted to these low contrast materials and interfaces were developed. The different technical challenges encountered at room temperature or cryogenic temperature are discussed. This work opens a new way of obtaining quantitative structural data, useful both for understanding fouling mechanisms, to help design new filtration membranes, but also to feed predictive models built from the nanoscale.

