

# La microscopie électronique à balayage environnementale : application à l'observation des tissus dentaires minéralisés

## RÉSUMÉ



Éric MORTIER

MCU-PH, département d'OC-Endodontie,  
Faculté d'odontologie de Nancy,  
96, avenue de Lattre de Tassigny,  
BP 50208,  
54004 Nancy cedex.

Stéphanie JAGER

Étudiante en TCEO 1,  
Faculté d'odontologie de Nancy,

David GERDOLLE

Chirurgien-dentiste, pratique privée,  
Montreux, Suisse.

Abdesselam DAHOUN

PU, Institut Jean Lamour, équipe SI2M,  
École des Mines de Nancy.



L'infiniment petit a de tout temps fasciné l'homme. Au XX<sup>e</sup> siècle, l'apparition de la microscopie électronique a engendré un bond en avant permettant l'observation à l'échelle du nanomètre. Depuis les années 1980, le développement de la microscopie électronique à balayage environnementale (MEBE) autorise l'observation d'échantillons à l'état naturel en s'affranchissant de toute préparation, potentielle source d'artefacts ou d'endommagement de l'échantillon. Pour l'odontologie, la MEBE est un outil extrêmement performant pour aller plus avant dans la compréhension des connaissances actuelles des tissus dentaires. Elle permet également, une fois ces données acquises, d'explorer les relations tissus dentaires/matériaux, paramètres fondamentaux de la dentisterie adhésive. Il s'agit donc aussi d'un magnifique outil pédagogique permettant d'objectiver des données théoriques parfois abstraites.

### Mots clés

- MEBE
- email
- dentine
- mordantage
- EDTA
- interface

AOS 2011;254:221-229  
DOI: 10.1051/aos/2011305  
© AEOS / EDP Sciences

## Introduction

> L'homme, de tout temps, a toujours été fasciné par l'infiniment lointain et l'infiniment petit. Cette curiosité l'a poussé à développer des instruments d'optique pour explorer ces domaines inconnus. Dès le XII<sup>e</sup> siècle avant Jésus-Christ, on rapporte des tailles de lentilles dans des cristaux de roche. Néron, que l'on suppose myope, aurait suivi des combats de gladiateurs au travers d'une émeraude concave polie. Au XII<sup>e</sup> siècle, Roger Bacon, moine franciscain anglais et maître de l'université d'Oxford, travaille sur le pouvoir grossissant des lentilles convexes. Peu à peu, l'usage de lunettes de correction de la vue s'étend. Mais c'est seulement à partir du XVI<sup>e</sup> siècle que l'on utilise ces lentilles dans un but scientifique. Plusieurs modèles de microscopes apparaissent à cette époque. Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), marchand drapier, met au point le premier microscope afin de compter les fils de ses tissus. Il se sert d'une lentille formée d'une minuscule bille de verre sertie dans une lame métallique et place son échantillon sur une pointe métallique, solidaire du support et qu'il déplace face à la lentille pour en explorer le contenu. Des grossissements jusqu'à 300 fois sont ainsi obtenus. Cela lui permit d'être le premier à décrire des bactéries – sans le savoir –, notamment celles de la cavité buccale par l'observation des dépôts entre ses dents : il les appellera « *levende dierkens* », animalcules vivants. C'est en 1757 qu'un opticien londonien, John Dollond, découvre le moyen de corriger les aberrations chromatiques liées à l'usage de plusieurs lentilles biconvexes, en utilisant un oculaire négatif constitué de deux lentilles

plan-convexes. Depuis cette époque, le microscope optique est similaire à ceux que nous utilisons encore aujourd'hui, même si de nombreuses améliorations, tant d'un point de vue optique que mécanique, ont contribué à son perfectionnement. Vers la moitié du XX<sup>e</sup> siècle, une technologie majeure va bouleverser le monde de la microscopie : le microscope électronique. Dès le début du XX<sup>e</sup> siècle, la technologie du vide, les tubes électroniques ainsi que la mécanique ondulatoire connaissent un essor considérable et vont être à l'origine de la réalisation de ce microscope. Comme dans la microscopie optique, un faisceau pour éclairer l'échantillon à analyser est utilisé. Si le microscope optique utilise les photons de la lumière (l'échelle d'observation est alors de l'ordre du micromètre), le microscope électronique, lui, utilise un faisceau d'électrons (l'échelle d'observation atteint alors le nanomètre). On peut obtenir des grossissements allant actuellement jusqu'à 400 000 fois la taille initiale de l'échantillon. L'invention du microscope électronique est due à Ernst Ruska qui a utilisé une bobine « concentratrice » et un condenseur sphérique électrostatique obtenant ainsi en 1930 la première image en optique électronique d'un objet. Il dépose le brevet pour le microscope électronique en mars 1932. La microscopie électronique à transmission est la forme « originale » de la microscopie électronique, elle utilise un faisceau d'électrons à haute tension pour constituer une image ; le faisceau d'électrons « porte l'image ». Les progrès dans ce domaine ont permis d'aboutir à la microscopie électronique à balayage (MEB).

## Microscopie électronique à balayage

Lorsqu'un électron du faisceau atteint la surface de l'échantillon, il interagit avec les électrons des atomes rencontrés. En résultent des électrons secondaires, des électrons rétrodiffusés, une émission de rayons X, des électrons Auger, etc. Le nombre de particules réémises varie en fonction de la topographie, de la composition et de la texture de la surface observée. C'est l'analyse de ces particules par différents détecteurs qui permet de reconstituer une image de la surface. Le principe de base de la microscopie électronique à balayage est qu'un faisceau très fin d'électrons, monocinétique, balaie la surface d'un échantillon où se produisent des interactions détectées par un capteur qui contrôle la brillance d'un oscilloscope cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau d'électrons. Les électrons sont produits par effet thermoélectronique à

partir d'un filament de tungstène ou de lanthanum hexaboride (LaB6) porté à haute température. Afin que les électrons soient canalisés, des bobines magnétiques sont utilisées : densité, contrôle du balayage de l'échantillon, conicité du faisceau sont ainsi maîtrisés. Afin d'éviter l'oxydation de la source et le freinage ainsi que la déviation des électrons, la colonne du microscope est maintenue sous vide (de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  Pa). L'interaction électron-matière conduit à la surface de l'échantillon à des effets d'accumulation de charges : elles sont évacuées vers la masse si l'échantillon est conducteur. Une métallisation à l'or ou au carbone sur la pièce à observer est en revanche nécessaire pour éviter l'accumulation des charges qui déforme le faisceau électronique si l'échantillon est un isolant, comme c'est le cas pour les tissus dentaires.

## Microscopie électronique à balayage environnementale

Apparue dans les années 1980, la microscopie électronique à balayage environnementale (MEBE) a ouvert de nouvelles possibilités : en effet, ici, la microstructure des échantillons peut être observée dans leur état naturel sans traitement de déshydratation ou de métallisation préalable. Pour cela, le principe de détection des électrons est différent de la MEB classique. Un gradient dégressif du vide dans la colonne depuis le canon jusqu'à la chambre, obtenu par un système de pompage différentiel, est maintenu et permet d'atteindre des pressions allant jusqu'à 15 Torr (2 000 Pa)

dans la chambre d'observation. Dans cette chambre, les molécules de gaz percutées par les électrons jouent le rôle d'amplificateur du signal jusqu'au détecteur d'électrons secondaires en phase gazeuse (GSED : *Gaseous Secondary Electron Detector*) qui est utilisé en lieu et place du système de détection conventionnel de la MEB classique. Cette détection d'électrons secondaires autorise l'observation topographique, éventuellement dynamique de l'échantillon. L'imagerie en contraste chimique par détection des électrons rétrodiffusés ou des cartographies élémentaires (sur

1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) par détection des rayons X sont également possibles.

Autrement dit, en MEBE, l'observation d'échantillons non préparés dont la structure et la teneur en eau ont été préservées est possible

dans des conditions de température, de gaz, d'humidité ou encore de pression diverses.

Dès lors, on perçoit l'intérêt que peut représenter cette technique si on l'applique à l'observation des tissus dentaires [1].

## Application à l'observation des tissus dentaires

Depuis le milieu des années 1990, la MEBE a retenu l'attention de nombreux chercheurs en odontologie. L'étude des tissus dentaires avant et après divers traitements [2-5], l'étude des régions interfaciales tissus dentaires/matériaux [6-9], l'étude de l'efficacité de certains instruments d'hygiène [10] ou encore l'étude de différents matériaux [11] ont bénéficié de cette technique récente permettant d'éviter les écueils de la préparation d'échantillons en MEB conventionnelle.

Nous nous proposons de montrer ici quelques images obtenues en MEBE (**fig. 1 a à d**) avec pour but d'objectiver quelques données fondamentales de l'odontologie, sachant qu'une belle image vaut parfois mieux qu'un long discours.

Sont présentées successivement :

- une zone d'émail avant et après mordantage (**fig. 2 a et b**) ;
- une zone de dentine avant et après mordantage (**fig. 3 a et b**) ;

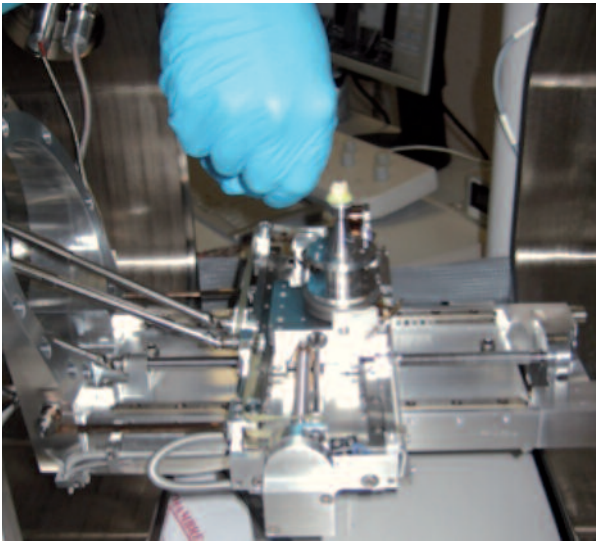


Fig. 1 a Le microscope électronique à balayage environnemental de l'École des Mines de Nancy : un FEI Quanta 600 F®.



Fig. 1 b Plusieurs échantillons ont été préparés et placés sur des porte-échantillons. Il s'agit de dents extraites depuis moins de 2 mois, conservées dans de la chloramine T à 0,5 %.

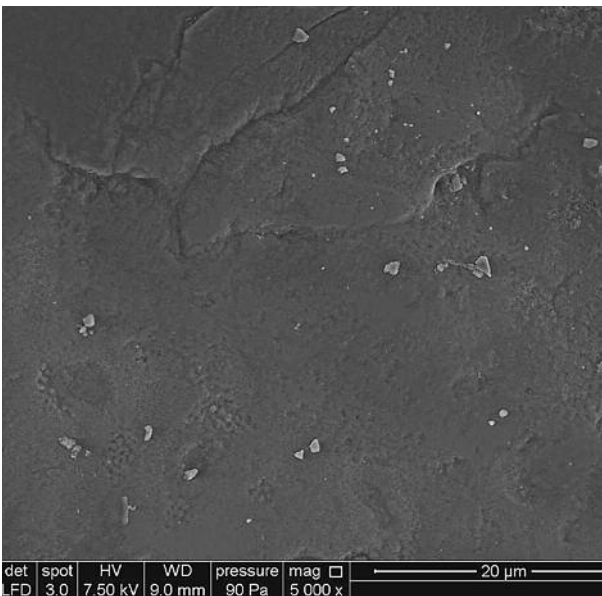




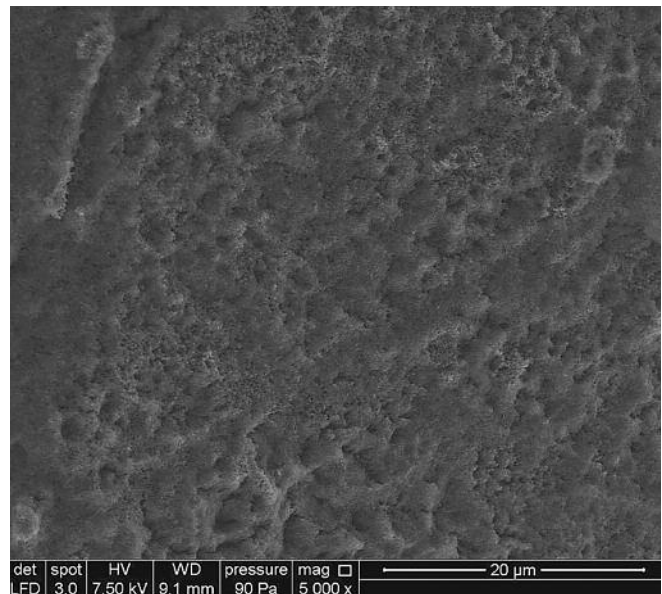
**Fig. 1 c** L'échantillon est placé sur la platine du microscope, son positionnement est reproductible, c'est-à-dire qu'après observation l'échantillon peut être sorti du microscope, subir un traitement et être replacé à l'identique ; ainsi exactement la même zone de l'échantillon pourra être analysée et comparée aux premières images obtenues.



**Fig. 1 d** Au cours des phases de pompage, un contrôle caméra interne du positionnement de l'échantillon dans le microscope est possible.

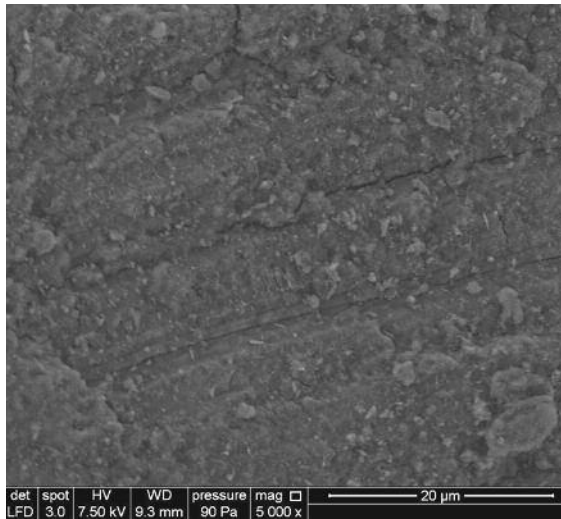


**Fig. 2 a** Émail d'une face vestibulaire de molaire mandibulaire, sans aucune préparation, grossissement x 5 000 ; on note l'aspect relativement lisse de la surface.

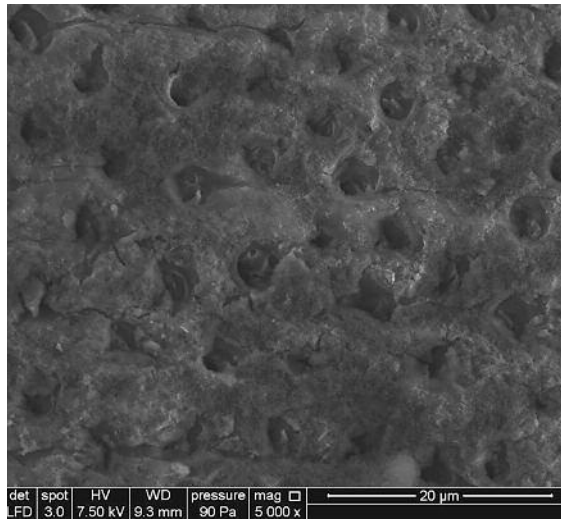


**Fig. 2 b** Exactement la même zone de la face vestibulaire qu'en figure 2 a est présentée ici après un traitement de 30 secondes à l'acide orthophosphorique à 34,5 % (Vocacid®, Voco), grossissement x 5 000 ; l'attaque acide a engendré une altération de la surface permettant d'augmenter la surface développée de 10 à 20 fois, ces micro-rétentions autoriseront l'adhérence mécanique par micro-clavetage des restaurations adhésives, il s'agit là du pilier du collage en dentisterie adhésive décrit pour la première fois par Buonocore en 1955.

- une zone de dentine radriculaire traitée à l'EDTA (**fig. 4**) ;
- l'organisation prismatique de l'émail (**fig. 5**) ;
- la trame organique de la dentine (**fig. 6**) ;
- l'interface dentine/résine composite dans une obturation (**fig. 7 a et b**) ;
- la structure microscopique de deux résines composites micro-hybrides (**fig. 8 a et b**).

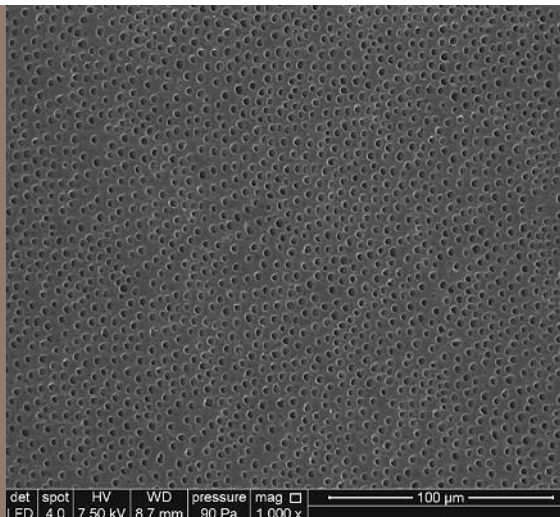


**Fig. 3 a** Une cavité occlusale mettant à découvert la dentine a été réalisée à l'aide d'une fraise cylindrique diamantée bague verte (grains de 125 µm) ; la dentine exposée n'a subi aucune préparation. À grossissement x 5 000, on note les traits de coupe de la fraise, la dentine est recouverte de boues de fraisage (*smear layer*), les tubulis dentinaires n'apparaissent pas ; on comprend que dans de telles conditions, un collage efficace ne saurait être réalisé.

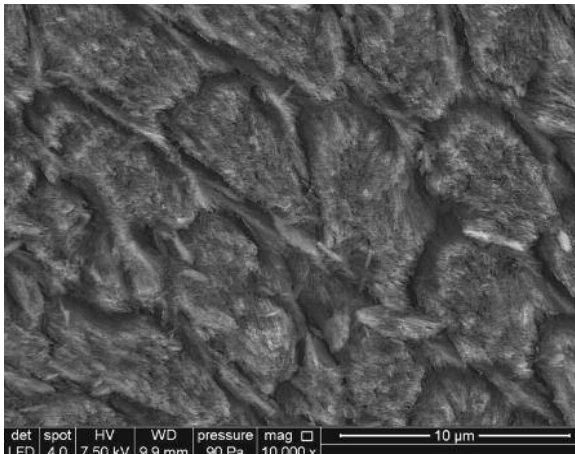


**Fig. 3 b** Exactement la même zone de dentine qu'en figure 3 a est présentée ici en grossissement x 5 000 après un conditionnement tissulaire de 15 s à l'acide orthophosphorique à 34,5 % (Vocid<sup>®</sup>, Voco) ; la boue dentinaire (*smear layer*) est supprimée, les tubulis dentinaires apparaissent ; ce conditionnement autorisera la pénétration de l'adhésif au cours d'un collage donnant ainsi naissance à la couche hybride.

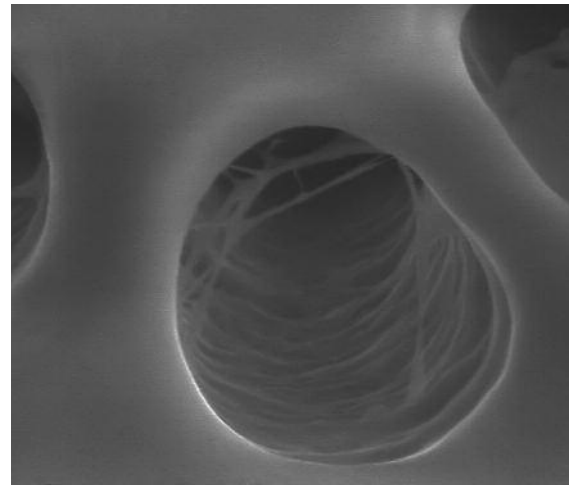
**Fig. 4** Une zone de dentine radriculaire de molaire mandibulaire à grossissement x 1 000 est présentée ici après un traitement à l'EDTA à 15 % en solution (Salvizol<sup>®</sup>, Pierre Roland) durant 5 min ; l'effet chélatant de l'EDTA permet l'obtention d'une dentine parfaitement nette, débarrassée de l'enduit pariétal lié à la préparation mécanique du système canalaire ; l'irrigation à l'aide d'un solvant minéral est une étape indispensable en fin de traitement canalaire avant un dernier rinçage au NaClO si l'on veut assurer une obturation canalaire tridimensionnelle tout en en promouvant son étanchéité.



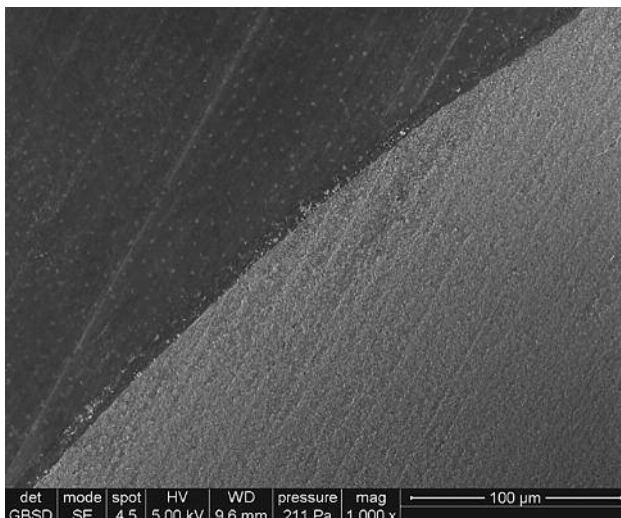




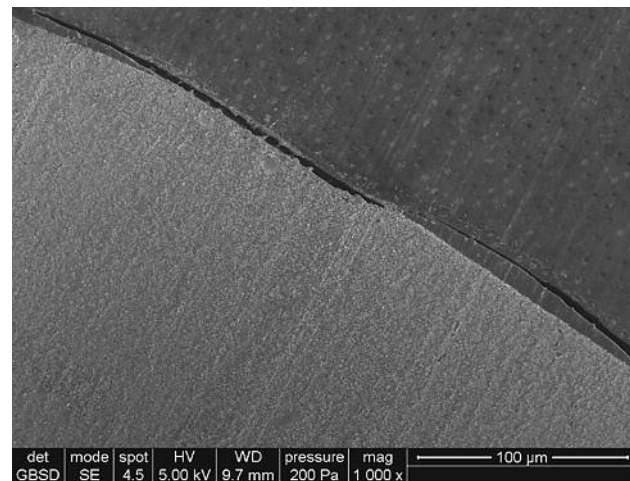
**Fig. 5** Une zone d'émail de molaire mandibulaire à grossissement x 10 000 est présentée ici après un traitement à l'acide citrique (pH 1,1) visant à décalcifier superficiellement le tissu ; on note bien l'organisation prismatique de l'émail, les prismes étant ici sectionnés perpendiculairement avec leur forme dite en trou de serrure ; chaque prisme étant constitué d'un empilement de monocristaux d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .



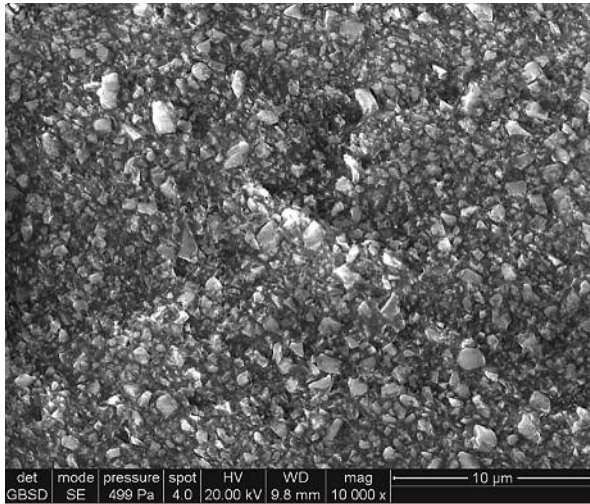
**Fig. 6** Vue sur l'intérieur d'un tubuli dentinaire en grossissement x 40 000 appartenant à une surface traitée à l'acide citrique (pH 1,1) durant 5 min ; la déminéralisation partielle laisse apparaître la trame organique de la dentine (fibrilles de collagène).



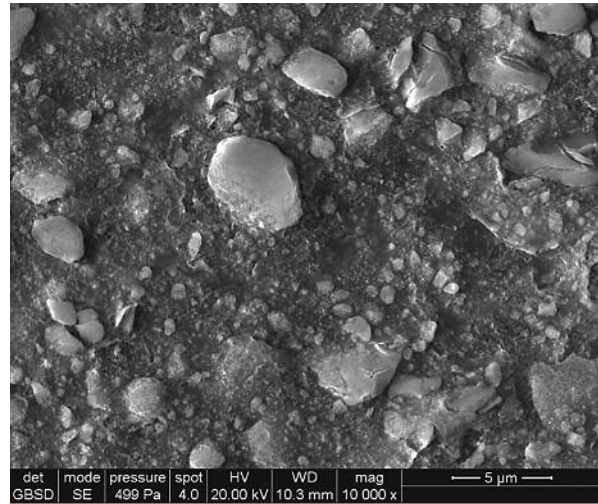
**Fig. 7 a** Une cavité de classe V a été réalisée en face vestibulaire d'une 3<sup>e</sup> molaire mandibulaire selon le protocole ISO 10405 puis obturée à l'aide d'une résine composite micro-hybride ormozer (Admira<sup>®</sup>, Voco), l'interface dentine/matériau est observée à un grossissement x 1 000 ; on distingue aisément la couche d'adhésif (Admira bond<sup>®</sup>, Voco), aucune solution de continuité n'est visible.



**Fig. 7 b** Une autre zone de l'interface du même échantillon que figure 7 a est présentée ici. La génération de contraintes liées à la contraction de prise du matériau collé au cours de sa photopolymérisation a engendré une décohésion du matériau, une rupture au sein de la couche adhésive et même des microfissures du substrat dentinaire ; l'établissement de liaisons covalentes C-C lors de la formation du réseau polymère plus courtes que les liaisons électrostatiques de Van der Waals initialement présentes entre les monomères et l'emprisonnement du matériau entre les parois inextensibles de la cavité sont à l'origine de ce phénomène délétère pour l'étanchéité de l'obturation ; cet endommagement interfacial inhérent à la technique (rétention par collage) et au type de matériau (matériau à base de résine) reste un des problèmes majeurs de la dentisterie adhésive.



**Fig. 8 a** Un échantillon de résine micro-hybride ormoocer (Admira®, Voco) simplement extrudé de la seringue et photopolymérisé est présenté ici à un grossissement x 10 000 ; une résine composite est constituée d'une phase organique (matrice résineuse), d'une phase dispersée (charges) et d'un agent de couplage (silane) liant ces deux dernières ; on voit parfaitement ici les charges organo-minérales (verre Ba-Al-B-silicate pour 90 % d'environ 0,7 µm et structure organo-inorganique avec une charpente SiO<sub>2</sub> et des monomères greffés pour 10 %) représentant 56 % du volume du composite.



**Fig. 8 b** Un échantillon de résine micro-hybride fluide (Filtek Flow®, 3M Espe) simplement extrudé de la seringue et photopolymérisé est présenté ici à un grossissement x 10 000 ; les charges représentent 47 % du volume du composite, il s'agit de particules de ZrSiO<sub>4</sub> de 0,01 à 6 µm, en moyenne de 1,5 µm ; on note bien le profil différent des charges ici en comparaison à la figure 8 a ; rappelons que les charges ont dans une résine composite un rôle fondamental puisqu'elles sont responsables de ses qualités mécaniques, de ses qualités optiques et de son aptitude au polissage.

## Conclusion

La microscopie électronique à balayage environnementale apparaît donc comme une technique désormais maîtrisée et relativement simple même si elle implique bien évidemment une rigueur de procédure. Elle présente d'immenses avantages par opposition à la microscopie électronique à balayage conventionnelle : en effet l'absence de traitement de l'échantillon offre la possibilité d'observer les tissus originaux d'une part bien sûr, mais surtout, d'autre part, comme nous l'avons présenté **figures 2 a à 3 b**, d'observer très exactement la même zone de l'échantillon après lui avoir fait subir un traitement. Pour l'odon-

tologie, la MEBE est donc un outil extrêmement performant pour aller plus avant dans la compréhension des connaissances actuelles des tissus dentaires, des relations tissus dentaires/biomatériaux particulièrement dans le domaine de la dentisterie adhésive, avenir de notre odontologie conservatrice. Il s'agit aussi pour les étudiants et les praticiens d'un magnifique outil pédagogique permettant d'objectiver des données théoriques parfois difficiles à cerner ou à imaginer telles que l'effet du mordantage ou de l'EDTA ou encore de la nature composite de nos résines d'obturation par exemple. ■



# Bibliographie

1. Prack ER.  
**An introduction to process visualization capabilities and considerations in the environmental scanning electron microscope (ESEM).**  
Microsc Res Tech 1993;25:487-92.
2. Cowan AJ, Wilson NH, Wilson MA, Watts DC.  
**The application of ESEM in dental materials research.**  
J Dent 1996;24(5):375-7.
3. Wang Y, Yao X.  
**Morphological/chemical imaging of demineralized dentin layer in its natural, wet state.**  
Dent Mater 2010;26(5):433-42.
4. De Wet FA, Van der Vyver PJ, Eick JD, Dusevich VM.  
**Environmental scanning electron microscopy of hydrated conditioned/etched dentine.**  
SADJ 2000;55:603-9.
5. Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC.  
**Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effects on root dentin.**  
J Endod 2008;34(2):181-5.
6. Al-Assaf K, Chakmakchi M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Eliades G.  
**Interfacial characteristics of adhesive luting resins and composites with dentine.**  
Dent Mater 2007;23(7):829-39.
7. Eick JD, Dusevich VM, de Wet FA, van der Vyver PJ.  
**Resin-infiltrated-dentin. A FE-ESEM microscopy investigation.**  
SADJ 2004;59(8):317,319,321-2.
8. Idriss S, Habib C, Abduljabbar T, Omar R.  
**Marginal adaptation of class II resin composite restorations using incremental and bulk placement techniques: an ESEM study.**  
J Oral Rehabil 2003;30(10):1000-7.
9. Mortier E.  
**Etude des endommagements de restaurations dentaires polymérisées.**  
Thèse Doct. Nancy : Univ H Poincaré, 2009.
10. Zammitti S, Habib C, Kugel G.  
**Use of environmental scanning electron microscopy to evaluate dental stain removal.**  
J Clin Dent 1997;8(1 Spec N°):20-5.
11. Gandolfi MG, Van Landuyt K, Taddei P, Modena E, Van Meerbeek B, Prati C.  
**Environmental scanning electron microscopy connected with energy dispersive x-ray analysis and Raman techniques to study ProRoot mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements in wet conditions and in real time.**  
J Endod 2010;36:851-7.

## SUMMARY

### Using environmental scanning electron microscopy in observation of mineralized dental tissues

Eric MORTIER,  
Stéphanie JAGER,  
David GERDOLLE,  
Abdesselam DAHOUN

#### Keywords

- ESEM
- enamel
- dentin
- etching
- EDTA
- interface

The infinitely small has always fascinated man. In the twentieth century, the invention of electron microscopy allowed a leap forward for analysing the nanoscale. In the eighties, the development of environmental scanning electron microscopy (ESEM) has allowed observation of samples in their natural state, with no need of any preparation, which is a potential source of artifacts or damage to the sample. In dentistry, the environmental scanning electron microscopy is an extremely powerful tool to go deeper into current knowledge of dental tissues. This knowledge also explores relationships between tooth and biomaterials, which are the fundamentals of adhesive dentistry. Thus, this technology represents a wonderful educational tool to objectify theoretical data.