

Utilisation de la microscopie acoustique pour l'étude des propriétés locales du bois : étude préliminaire de paramètres expérimentaux

Bruno Clair^{a,*}, Gilles Despau^b, Bernard Chanson^a et Bernard Thibaut^a

^aLaboratoire de Mécanique et de Génie Civil, Équipe Bois, CC 081, Université Montpellier II, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

^bLaboratoire d'Analyse des Interfaces et de Nanophysique, Équipe Microacoustique, Université Montpellier II, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

(Reçu le 9 juillet 1999 ; accepté le 20 décembre 1999)

Résumé – Pour comprendre le comportement macroscopique du bois, il est intéressant de connaître ses propriétés à l'échelle microscopique. Pour cela, diverses techniques d'imagerie nous donnent des informations sur la structure géométrique en deux ou trois dimensions, la composition chimique, la densité ainsi que la présence de réseaux cristallins et leurs orientations. Les propriétés mécaniques sont souvent estimées, soit par des essais sur fibre isolée, soit par modélisation à partir des données de rigidité des différents constituants pris hors contexte cellulaire. Aujourd'hui, seules les techniques de nano-indentation permettent une estimation des propriétés mécaniques locales *in situ*, en un nombre limité de point de mesure. La microscopie acoustique permet la caractérisation des rigidités au niveau local pour des matériaux à forte rigidité (métaux, verres, céramiques...). L'utilisation de cet outil pour des matériaux beaucoup moins rigides comme le bois, nécessite la mise au point d'une procédure expérimentale spécifique. Les essais réalisés sur un microscope acoustique en réflexion ont montré que pour des images à fort grossissement, l'utilisation de coupes minces ($\approx 5 \mu\text{m}$) après inclusion dans la résine avec respectivement l'eau ou une solution d'iodure de potassium comme liquide de couplage à 600 MHz ou à 1 GHz donnait des résultats permettant d'envisager une analyse des rigidités locales à partir des niveaux de gris de l'image acoustique.

microscopie acoustique / rigidité / microstructure / paroi cellulaire / bois

Abstract – Possible use of scanning acoustic microscopy to study local wood properties: Preliminary study of experimental conditions. To understand wood macroscopic behaviour, it is useful to know its properties at the microscopic level. For this, several imaging techniques can provide information about the geometrical structure in 2 or 3 dimensions, chemical composition, density, crystal lattice and crystal orientation. Wood mechanical properties are determined either by testing isolated fibre, or through modelling based on stiffness data of the various cell wall components obtained outside the cellular context. Only nanoindentations methods can be used to estimate *in situ* mechanical properties on a limited number of sites. On the other hand, this can be done on high stiffness materials (metals, glasses, ceramics...) by using acoustic microscopy. To apply this technique to wood, experimental procedure should be assessed. Trials on a scanning acoustic microscope show that for high resolution images, thin slices ($\approx 5 \mu\text{m}$) after resin inclusion with water or potassium iodure as coupling liquid respectively at 600 MHz or 1 GHz give good results giving way to quantitative measurement of cell wall stiffness by image analysis.

acoustic microscopy / stiffness / microstructure / cell wall / wood

* Correspondance et tirés à part
Tél. 04 67 14 34 83 ; Fax. 04 67 14 47 92 ; e-mail: clair@lmgc.univ-montp2.fr

1. INTRODUCTION

Afin de comprendre le comportement mécanique du bois, il est intéressant de pouvoir relier les propriétés microscopiques et macroscopiques. Les informations recueillies aux niveaux les plus fins servent alors de paramètres de référence pour une modélisation à l'échelle supérieure.

Les propriétés mécaniques du bois dépendent à la fois de l'organisation et de la composition des éléments constitutifs du tissu cellulaire. Une grande part des variations de propriétés peut déjà s'expliquer par la microstructure tubulaire, très anisotrope et à porosité très variable (10 à 90 %). Par contre certaines variations très fortes de propriétés mécano-physiques comme les déformations de maturation ou de séchage, le module spécifique... ne trouvent leur explication que dans la structure interne de la paroi cellulaire [7].

Divers types d'imagerie, tels que les microscopies photonique ou électronique, permettent de rendre compte de la structure géométrique 2D ou 3D à l'échelle du tissu ou de la cellule. Couplées à des techniques de coloration, d'analyse chimique par microsondes ou de marquage immunocytologique, elles permettent aussi d'avoir des informations sur la composition chimique des tissus ou des éléments de parois observés. Récemment, la nano-indentation a permis de donner une estimation des propriétés de la lamelle moyenne et de la paroi secondaire [10], mais cette méthode oblige à se contenter d'un nombre limité de point et ne permet pas une cartographie des rigidités. En revanche, elle permettrait localement un calibrage des rigidités.

La microscopie acoustique a permis d'obtenir des informations sur le comportement élastique à l'échelle locale pour des matériaux à forte rigidité (métaux, céramiques, composites...). Les applications à des matériaux plus complaisants et moins homogènes comme les tissus d'origine biologique sont plus rares [3] et n'ont pas été développées pour la caractérisation mécanique. Une première étude à basse fréquence sur le bois [5] avait montré l'intérêt de poursuivre sur cette voie et la nécessité de monter en fréquence. De nombreux problèmes restent à résoudre tant dans la préparation de l'échantillon que dans les techniques et les paramètres de l'imagerie acoustique pour des applications au matériau bois.

Le premier objectif est d'obtenir des images à fort grossissement permettant à la fois une bonne définition et un contraste suffisant, lié aux variations locales de propriétés du bois, pour réaliser des études quantitatives par analyse d'image.

1.1. Rappels sommaires sur la microscopie acoustique

Dans un microscope acoustique, les ultrasons sondent la cohésion de la matière et sont influencés par les propriétés mécaniques (densité, rigidité, viscosité...) en chaque point du matériau. Les variations de ces propriétés affectent l'amplitude et la phase des ondes ultrasonores du faisceau incident.

L'onde ultrasonore est produite par conversion d'un signal électrique en signal acoustique au moyen d'un transducteur piézo-électrique (cristal d'oxyde de zinc par exemple). Ce cristal vibre à la fréquence du signal électrique auquel il est soumis (de 1 MHz à 2 GHz). Plus la fréquence est élevée plus la longueur d'onde est courte et donc meilleure est la résolution¹. Les impulsions ultrasonores se propagent ensuite jusqu'à la lentille dans un barreau de saphir, puis de la lentille à l'objet, la propagation est établie par immersion de l'objet dans un fluide couplant (eau, mercure, alcool...). Le rôle du liquide de couplage est capital; de lui dépendent la résolution, la pénétration, et la nature des matériaux qui pourront être observés.

Le faisceau incident d'ultrasons, focalisé par la lentille dans le plan objet, repart de l'échantillon par réflexion et par transmission (*figure 1*). Pour cette étude, l'appareillage utilisé permettait la capture des ondes réfléchies (microscope acoustique en mode réflexion). Dans ce mode, on obtient une image acoustique par balayage suivant le plan xy parallèle à la surface de l'échantillon à une distance z donnée.

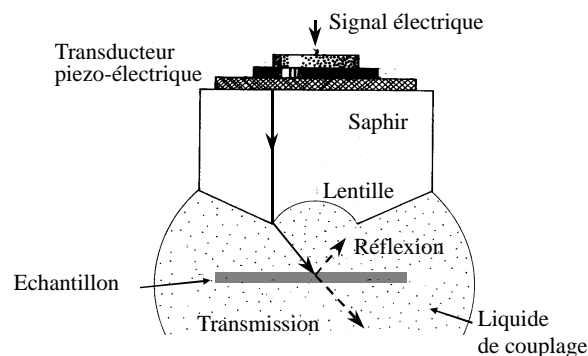


Figure 1. Schéma de principe du microscope acoustique.

¹ En effet, la résolution latérale du microscope est donnée par la relation : $R = 0,61 \lambda / \sin \theta$ où $\lambda = c / f$; c est la vitesse de l'onde dans le milieu considéré (dans l'eau, $c = 1500 \text{ m.s}^{-1}$), f la fréquence de l'onde et θ l'angle d'ouverture de la lentille du microscope. À titre d'ordre de grandeur, pour une ouverture $\theta = 50^\circ$ en utilisant l'eau comme liquide de couplage on obtient à 15 MHz une résolution latérale de $80 \mu\text{m}$ et à 600 MHz une résolution latérale de $2 \mu\text{m}$.

Une des particularités de la microscopie acoustique en réflexion est qu'elle permet de détecter des structures ou des singularités à l'intérieur du matériau. Ce type d'imagerie nécessite des matériaux d'épaisseur supérieure à la longueur d'onde d'investigation.

Lorsque le faisceau acoustique se focalise à une profondeur donnée dans l'échantillon, l'onde réfléchie suit le même chemin que l'onde incidente avant d'être récupérée par le transducteur piézo-électrique. Un système électronique permet de ne sélectionner que les ondes s'étant propagées durant un temps donc une distance correspondant à la profondeur choisie.

L'onde réfléchie et l'onde incidente sont ensuite comparées pour donner l'image en ce point. La zone choisie est dessinée point par point par déplacement de l'échantillon sur une table xy motorisée (précision du positionnement à 0,1 µm).

Pour obtenir des images de la surface de l'échantillon, on focalise l'onde acoustique au voisinage de celle-ci. L'intérêt majeur est qu'il n'y a que très peu de pertes du signal liées à la génération d'ondes de surface, la quasi-totalité du signal est réfléchi. L'onde est sensible à toutes structures ou défauts situés à moins d'une longueur d'onde acoustique sous la surface [4].

La microscopie acoustique en réflexion a été utilisée pour l'étude quantitative des propriétés élastiques de matériaux isotropes de forte rigidité [9]. Lorsqu'on défocalise légèrement le capteur, le signal de sortie V reçu par le transducteur varie en fonction de cette défocalisation. La courbe résultante, dénommée signature acoustique ou $V(z)$, présente des pseudo-oscillations dues aux interférences entre les ondes longitudinales et les ondes de surface. L'analyse de cette signature permet d'estimer directement les constantes élastiques du matériau [9]. Lors des essais réalisés sur les bois la porosité empêche une bonne propagation de l'onde de surface. La signature obtenue ne comprend que peu d'arches et de faible amplitude. Celles-ci ne permettent pas de déterminer de manière fiable les vitesses des ondes longitudinales et de surface.

1.2. Paramètres explorés

Les essais ont été conduits sur des échantillons de bois prélevés sur du cyprès (*Cupressus arizonica* E.L. Greene), du peuplier (*Populus sp.*), du hêtre (*Fagus sylvatica* L.), du buis (*Buxus sempervirens* L.), du wapa (*Eperua falcata* Amsh.) et du chêne vert (*Quercus ilex* L.). Ces essences ont été choisies en raison de la

Tableau I. Récapitulatif de la résolution en fonction de la fréquence en correspondance avec l'échelle d'observation.

Fréquence	15 MHz	130 MHz	600 MHz	1 GHz
Résolution	80 µm	9 µm	2 µm	1,2 µm

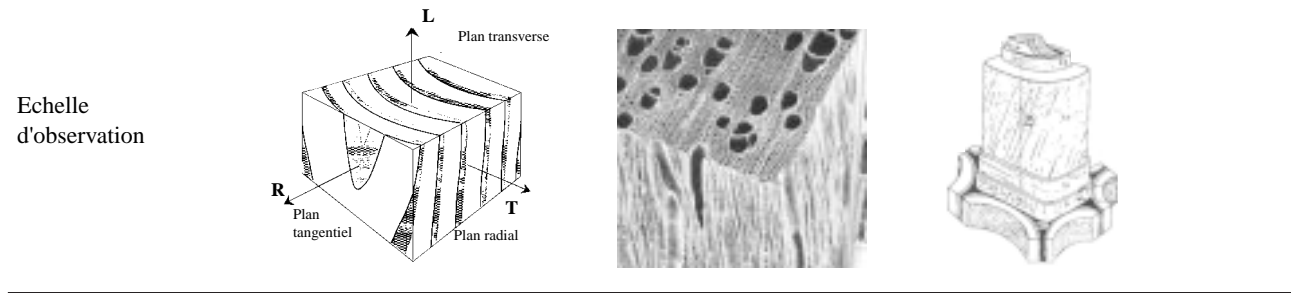
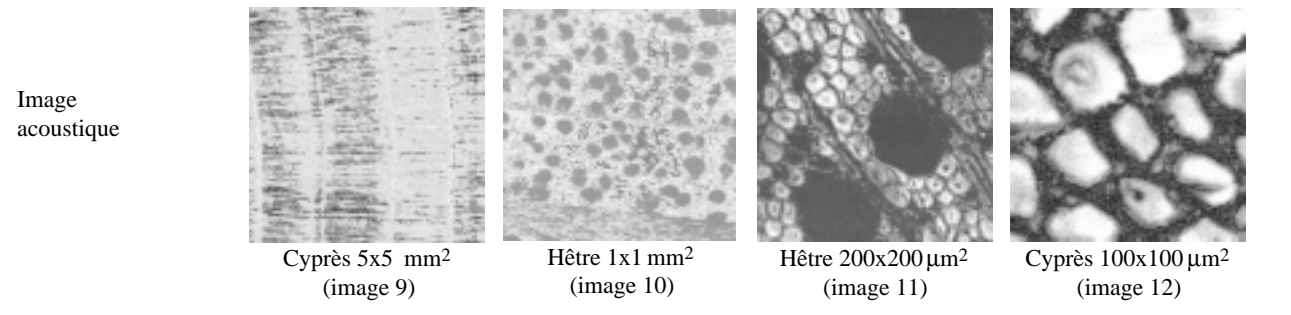


Tableau II. Récapitulatif des caractéristiques des liquides de couplage. D'après Attal et al. [2] et Cros et al. [6].

	Eau	Éthanol	(KOH)aq	(KI)aq	Mercure
Atténuation	moyenne	forte	faible	faible	très faible
Adaptation d'impédance	bonne	bonne	bonne	bonne	mauvaise
Agressivité	nulle	nulle	forte	nulle ou faible	nulle
État hydrique du bois	saturé	anhydre	saturé	saturé	au choix
Facilité d'utilisation	très facile	facile	moyenne	moyenne	très difficile

diversité de leur plan ligneux (*images 1, 2, 3 et 7*) et afin d'obtenir une large gamme de densité. Les observations sont faites dans le plan transverse (plan RT). Le type et le mode de préparation de l'échantillon, la fréquence de l'onde ultrasonore et la nature du liquide de couplage ont été les paramètres expérimentaux explorés selon les *tableaux I et II*.

Diverses techniques de préparation d'échantillons ont été mises en œuvre pour optimiser la qualité des images acoustiques :

- i. Échantillons de bois massif dont la surface a été rafraîchie au microtome (coupe à température ambiante et coupe en congélation $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- ii. Coupe $60\text{ }\mu\text{m}$ entre lame et lamelle;
- iii. Coupe $60\text{ }\mu\text{m}$ collée à la glycérine sur lame de verre sans lamelle;
- iv. Coupes $3\text{ à }9\text{ }\mu\text{m}$ après inclusion dans une résine (Technovit 7100 Kulzer, méthacrylate de méthyle, éthylène glycol diméthacrylate) étalée sur une lame de verre;
- v. Coupes $3\text{ à }9\text{ }\mu\text{m}$ étalée sur une lame de verre après inclusion (*n*-butyl méthacrylate, méthacrylate de méthyle, DTT, benzoin éthyle éther (sous photo-activation)) puis dérésinée avant observation.

2. RÉSULTATS OBTENUS ET CHOIX DES PARAMÈTRES

i. Avec des échantillons de bois massif, la qualité de l'image acoustique est médiocre (*image 4*). Ceci semble provenir d'un niveau de bruit élevé dû à des réflexions multiples de l'onde acoustique dans l'échantillon;

ii. Les coupes entre lame et lamelles sont inexplorables en microscopie acoustique. En effet, la lamelle présente entre le liquide de couplage et l'échantillon fait « écran » à l'onde acoustique qui s'y réfléchit en quasi-totalité;

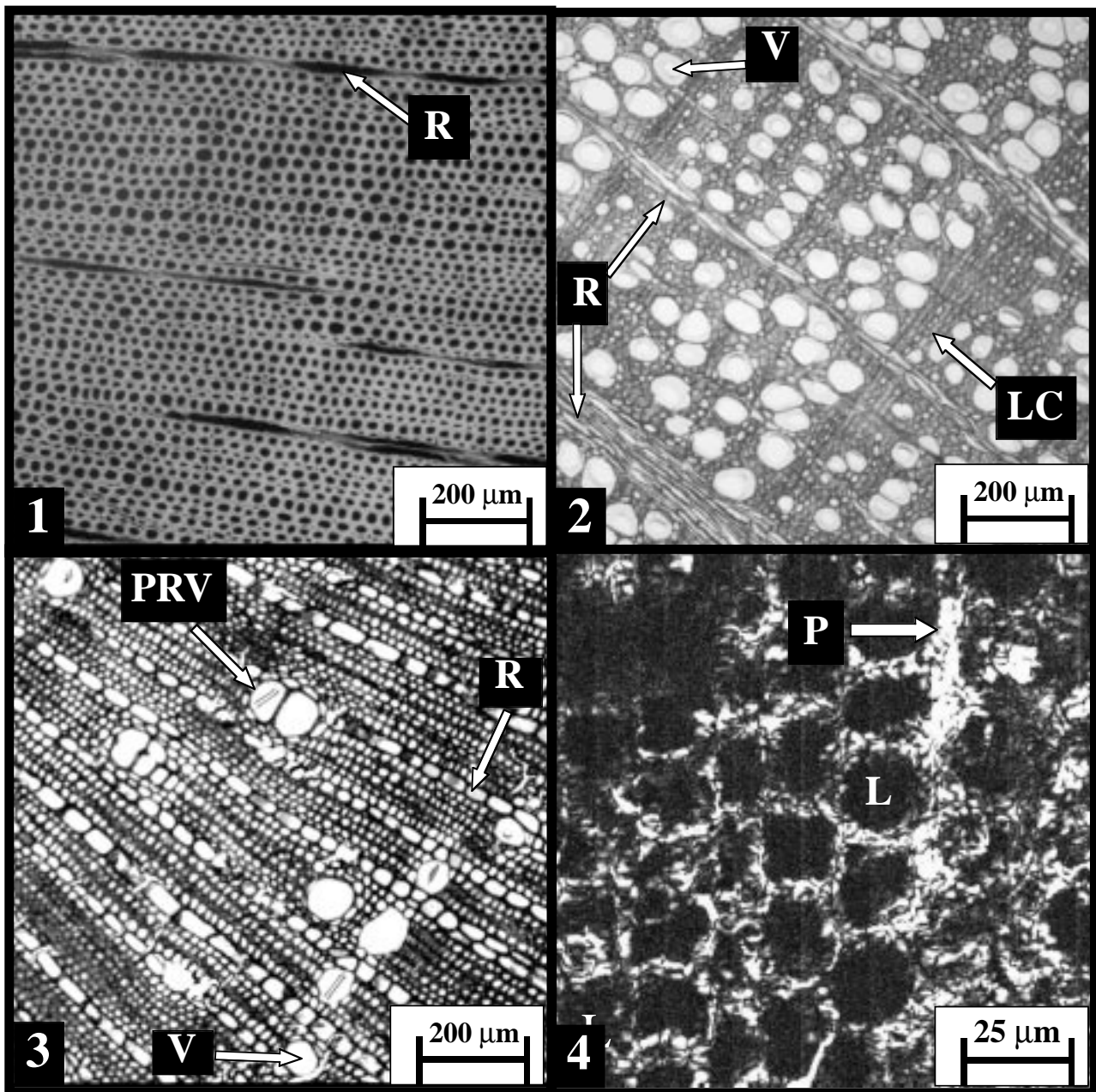
iii. Pour les coupes de $60\text{ }\mu\text{m}$ collées à la glycérine, il est, en pratique, très difficile d'assurer un collage total, homogène et sans bulle d'air ni sur-épaisseur de colle, l'état de surface reste le problème majeur pour obtenir une image de bonne qualité;

iv. Les coupes de $3\text{ à }9\text{ }\mu\text{m}$ après inclusion dans une résine supposent un protocole expérimental beaucoup plus lourd, mais les images obtenues sont satisfaisantes (*image 5*). On retrouve bien la structure géométrique du plan ligneux (*images 6 et 7*) avec une résolution de l'ordre de $2,5\text{ }\mu\text{m}$. Toutefois, le signal renvoyé par la résine peut être confondu avec des zones de la paroi de même rigidité (*image 8*) d'où une confusion possible lors de l'interprétation;

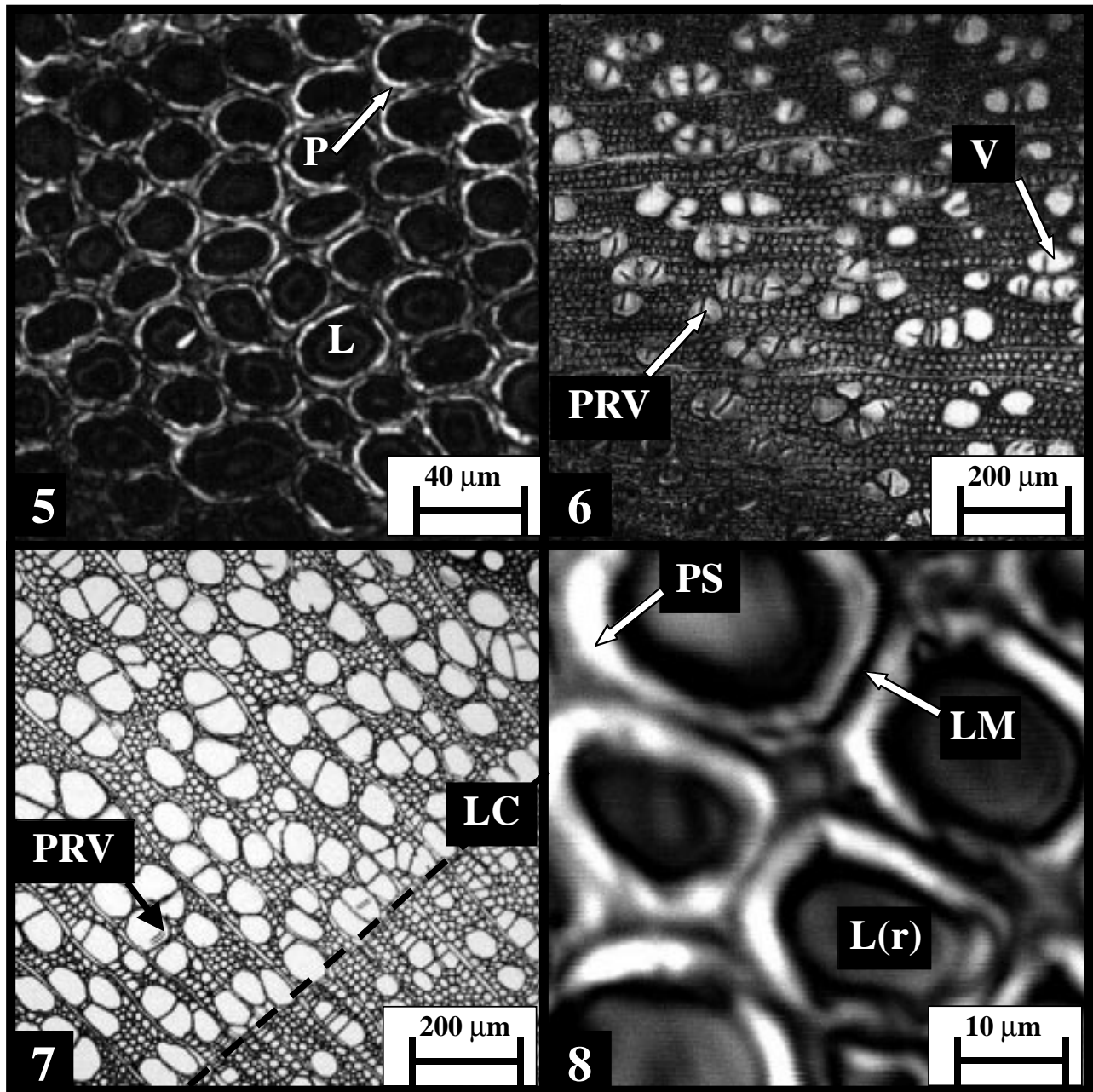
v. Dans le cas de l'utilisation de coupes de $5\text{ }\mu\text{m}$ dérésinées, l'absence de résine dans les lumen permet de faire apparaître le contraste entre la paroi cellulaire, de rigidité non nulle, et le lumen qui apparaît en noir (*image 13*). L'interprétation est ainsi rendue plus aisée. Mais, cette résine semble mal adaptée pour certains bois (le hêtre a été très bien imprégné alors que le cyprès et le peuplier ont été peu voire pas imprégnés à une profondeur de quelques dizaines de microns au-dessous de la surface) et ceci nuit à la qualité des coupes. De plus, cette technique ne permet pas une adhésion de bonne qualité de la coupe sur la lame. Ces deux problèmes ont une influence directe sur la qualité des images acoustiques. Enfin, l'observation au microscope optique montre que l'échantillon n'est que partiellement dérésiné.

L'utilisation de coupes minces ($5\text{ }\mu\text{m}$) après inclusion dans la résine apparaît clairement comme la meilleure solution dans l'état actuel de nos investigations pour les observations à fort grossissement.

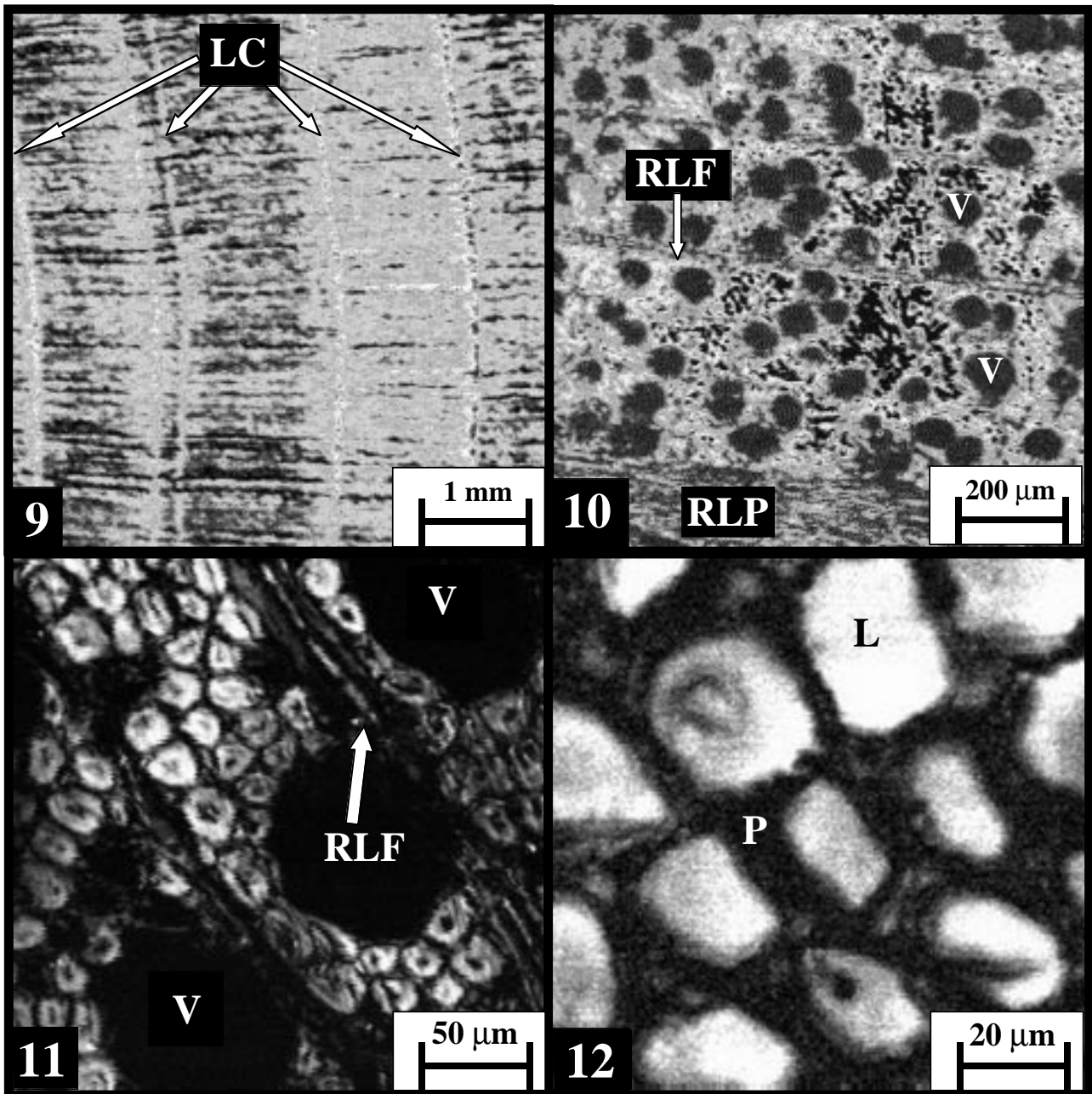
La fréquence de 15 MHz (résolution latérale de $80\text{ }\mu\text{m}$) permet de recueillir des informations à l'échelle du cerne comme par exemple l'alternance bois initial bois final (*image 9*) ou des zones de bois de réaction.



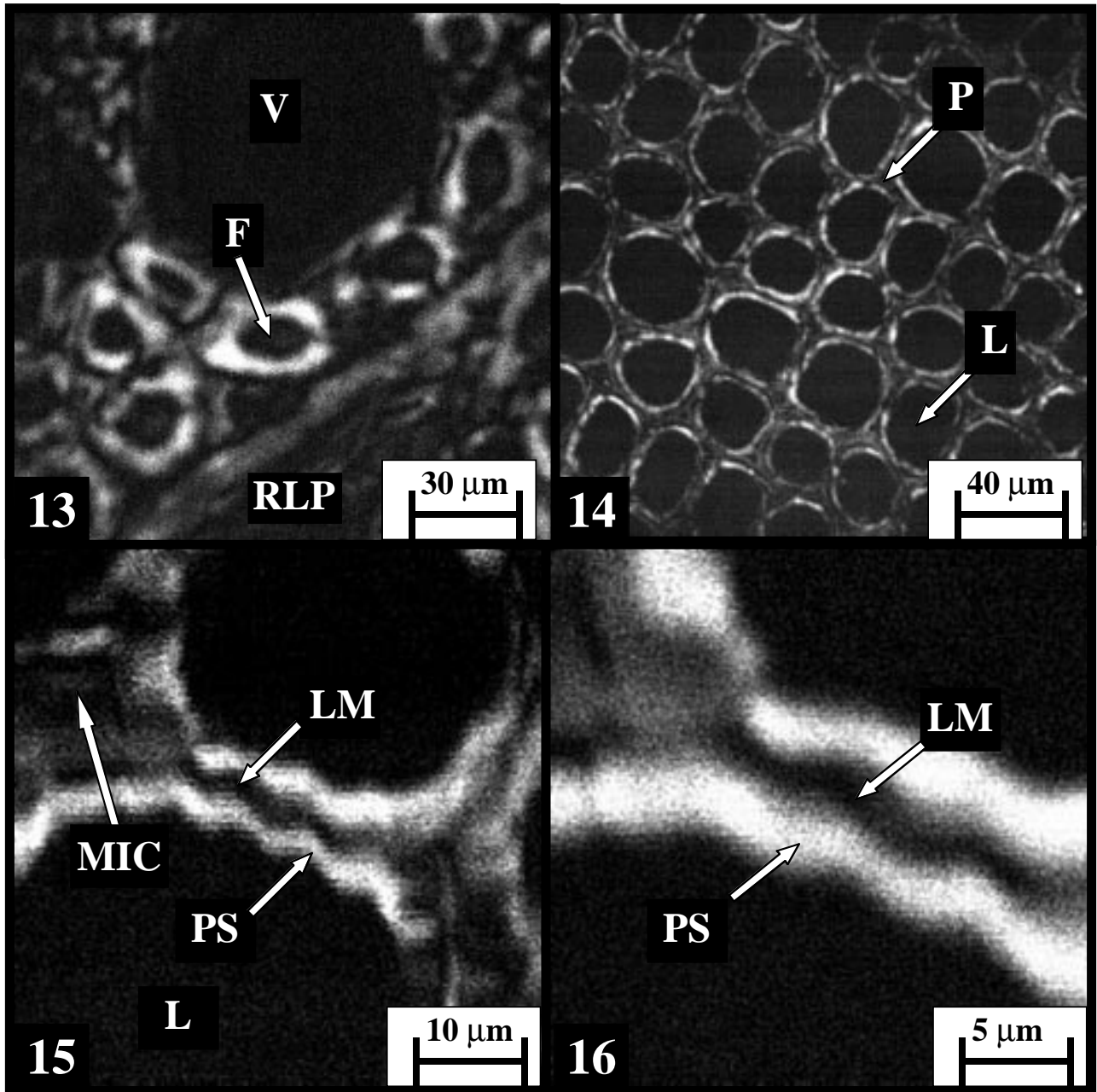
1. Plan ligneux de cyprès (microscopie optique d'une coupe de 5 μm étalée sur une lame après inclusion dans une résine, 960 \times 960 μm^2) 2. Plan ligneux de hêtre (microscopie optique d'une coupe de 5 μm étalée sur une lame après inclusion dans une résine, 960 \times 960 μm^2) 3. Plan ligneux de wapa (microscopie optique d'une coupe de 5 μm étalée sur une lame après inclusion dans une résine, 960 \times 960 μm^2) 4. Image acoustique (120 \times 120 μm^2) d'un échantillon de cyprès massif dans l'eau à 600 MHz (coupe à -40°C). (LC = limite de cerne; R = rayon ligneux; V = vaisseaux; PRV = pli de résine dans les vaisseaux; P = paroi; L = lumen).



5. Image acoustique ($200 \times 200 \text{ mm}^2$) d'une coupe très mince ($5 \text{ }\mu\text{m}$) de cyprès étalée sur une lame après inclusion dans une résine à base de méthacrylate. Observation dans l'eau à 600 MHz. 6. Image acoustique ($1000 \times 1000 \text{ }\mu\text{m}^2$) d'une coupe très mince ($3 \text{ }\mu\text{m}$) de peuplier étalée sur lame après inclusion dans une résine à base de méthacrylate. Observation dans l'eau à 600 MHz. 7. Image optique ($960 \times 960 \text{ }\mu\text{m}^2$) d'une coupe très mince de peuplier étalée sur une lame après inclusion dans une résine à base de méthacrylate. 8. Image acoustique ($50 \times 50 \text{ }\mu\text{m}^2$) d'une coupe très mince ($5 \text{ }\mu\text{m}$) de cyprès étalée sur une lame après inclusion dans une résine à base de méthacrylate. Observation à 600 MHz. (L = lumen; LC = limite de cerne; LM = lamelle moyenne; L(r) = lumen contenant de la résine; P = paroi; PRV = pli de résine dans les vaisseaux; PS = paroi secondaire; V = vaisseaux).



9. Image acoustique ($5 \times 5 \text{ mm}^2$) d'un échantillon de cyprès massif. Observation dans l'alcool à 15 MHz. 10. Image acoustique ($1 \times 1 \text{ mm}^2$) d'un échantillon de hêtre massif. Observation dans l'alcool à 130 MHz. 11. Image acoustique ($200 \times 200 \mu\text{m}^2$) d'un échantillon de hêtre massif. Observation dans l'eau à 600 MHz. 12. Image acoustique ($100 \times 100 \mu\text{m}^2$) d'une coupe mince de cyprès. Observation dans une solution d'iodure de potassium à 1 GHz. (LC = limite de cerne; RLF = rayon ligneux fin (1-2 série); RLP = rayon ligneux plurisérié (> 2); V = vaisseau; P = paroi; L = lumen).



13. Image acoustique ($150 \times 150 \mu\text{m}^2$) d'une coupe très mince ($5 \mu\text{m}$) de hêtre étalée sur une lame après inclusion puis dérésinée. Observation dans l'eau à 600 MHz. **14.** Image acoustique ($200 \times 200 \mu\text{m}^2$) d'une coupe très mince de cypres étalée sur une lame après inclusion dans la résine à base de méthacrylate. Observation dans l'eau à 600 MHz. **15.** Image acoustique ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$) d'une coupe très mince ($5 \mu\text{m}$) étalée sur lame après inclusion dans une résine à base de méthacrylate. Observation à 600 MHz. **16.** Détail image 15 ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$). (F = fibre; L = lumen; LM = lamelle moyenne; MIC = méat inter cellulaire; P = paroi; PS = paroi secondaire; RLP = rayon ligneux plurisériel (> 2); V = vaisseau).

À 130 MHz (résolution latérale de 9 μm), la longueur d'onde est de 11 μm . Elle permet la caractérisation d'une plage de cellules (*image 10*).

À 600 MHz, la résolution latérale est de 2 μm . Certains détails de la paroi apparaissent en particulier la lamelle mitoyenne (*image 11*).

À 1 GHz, la résolution théorique est de 1,2 μm . Cependant, l'atténuation étant proportionnelle au carré de la fréquence², le rapport signal sur bruit s'approche de 1. De ce fait les images obtenues ont une mauvaise définition (*image 12*). Par ailleurs la recherche du plan focal est très délicate dans la mesure où la profondeur de champ est très faible, de l'ordre du μm .

L'eau est le liquide de couplage qui offre le meilleur rapport qualité/facilité d'utilisation à 600 MHz. Pour des plus basses fréquences (15 MHz par exemple), l'éthanol est une bonne solution alors que pour les fréquences plus élevées l'utilisation de solutions d'iodure de potassium est le meilleur choix.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour les coupes minces les images acoustiques obtenues à fort grossissement permettent l'observation de certains éléments de la paroi. Elles montrent clairement la plus forte rigidité des parois secondaires comparativement à celle des lamelles mitoyennes qui apparaissent plus sombres (*images 14, 15 et 16*). Ces résultats sont conformes aux résultats de la littérature [8].

Cela illustre bien les possibilités d'application de la microscopie acoustique pour la caractérisation des rigidités mécaniques locales du bois. Pour quantifier ces rigidités, il faudrait étalonner les niveaux de gris en s'appuyant sur les données de la littérature et en utilisant des matériaux de référence qui auraient des rigidités proches des valeurs maximales et minimales attendues dans le bois. Ces matériaux de référence devraient être inclus et coupés avec le bois.

Le microscope acoustique en réflexion ayant été essentiellement utilisé pour des matériaux à forte rigidité, quelques améliorations doivent être apportées pour l'étude des tissus d'origine biologique tels que le bois.

² Pour exemple, l'atténuation visqueuse (qui est la plus significative dans le liquide de couplage en microscopie acoustique) est donnée par la relation : $\alpha = 2 \omega^2 \eta / 3 \rho v_0^2$ avec η la viscosité en N.s.m^{-3} , v_0 la vitesse de l'onde dans le milieu, ρ la densité et $\omega = 2 \pi f$ la pulsation où f est la fréquence. Ainsi, $\alpha \propto f^2$ [4].

Notamment la calibration du pouvoir réflecteur, l'amélioration des capteurs et l'installation d'un système d'amplification du signal plus puissant et plus sélectif vis-à-vis du bruit permettraient d'utiliser des capteurs de plus haute fréquence (1 à 2 GHz) et donc une résolution plus fine (1,2 à 0,6 μm).

La meilleure voie d'amélioration consiste à utiliser les progrès importants en matière de nano-mécanique, d'électronique et d'informatique de traitement du signal ou du pilotage pour fabriquer un nouveau microscope acoustique en transmission destiné aux matériaux biologiques, en appréciant notamment la phase du signal (ou le retard) liée à la vitesse de propagation dans le matériau. Un premier prototype réalisé il y a 20 ans pour de l'imagerie médicale [1] avait montré l'intérêt de cette approche en terme de qualité d'image avec les moyens de l'époque. Les résultats de l'investigation présentée dans cet article seront immédiatement utilisables pour cette application.

RÉFÉRENCES

- [1] Attal J., Lamarque J.L., La microscopie acoustique et ses applications en biologie et médecine., ITBM 2, 1 (1981) 41-52.
- [2] Attal J., Quate C.F., Investigation of some low ultrasonic absorption liquids, J. Acoust. Soc. Am. 59, 1 (1976) 69-73.
- [3] Bereiter-Hahn J., Probing Biological Cell and Tissues with Acoustic Microscopy, in: A. Briggs (Ed.), Advanced in Acoustic Microscopy, Plenum Press: New York and London, 1995, pp. 79-110.
- [4] Briggs A., Acoustic Microscopy, Clarendon Press, Oxford, 1992.
- [5] Bucur V., Saied A., Attal J., Identification of wood anatomical elements by acoustic microscopy, 22nd International Symposium on Acoustical Imaging, Florence, Italy, 1995.
- [6] Cros B., Gigot V., Despax G., Study of the efficiency of coupling fluids for acoustic microscopy, Appl. Surf. Sci. 119 (1997) 242-252.
- [7] Guitard D., Mécanique du matériau bois et composites. Coll. Nabla, Cépadués Editions, Toulouse, 1987.
- [8] Harrington J.J., Booker R., Astley R.J., Modelling the elastic properties of softwood, Part I: The cell-wall lamellae, Holz als Roh-und Werkstoff 56 (1998) 37-41.
- [9] Saurel J.M., Alami K., Amaudric du Chaffaut C., Dugne O., Guette A., Mechanical characterisation by Acoustic Techniques of SiC CVD Thin Films, Conference of European Materials Research Society Strasbourg, 1989.
- [10] Wimmer R., Lucas B.N., Comparing mechanical properties of secondary wall and cell corner middle lamella in spruce wood, IAWA Bull. 18, 1 (1997) 77-88.