

N° d'ordre : 6784

UNIVERSITE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCE
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

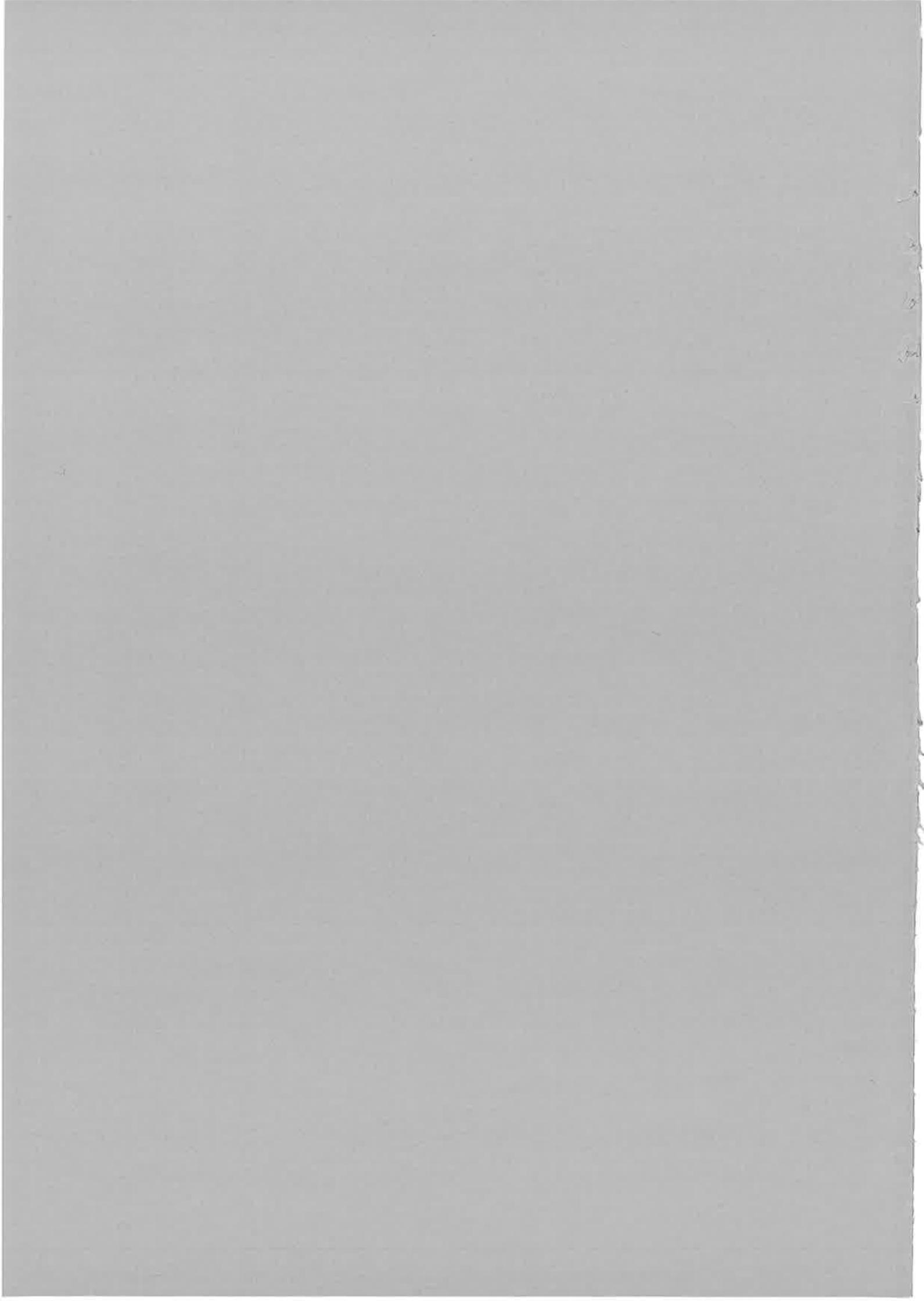
PAR

Alain RICHARD

**Outils pour la spectroscopie en champ proche optique ;
Application à l'imagerie hyperspectrale.**

Soutenue le 20 décembre 2001 devant la commission d'examen :

M.	Bernard Humbert	Rapporteur
M.	Pascal Royer	Rapporteur
M.	Alain Bosseboeuf	Examineur
M.	Christian Colliex	Examineur
Me.	Anne Débarre	Directrice de thèse
M.	Paul Tchénio	Examineur



N° d'ordre : 6784

UNIVERSITE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCE
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

PAR

Alain RICHARD

**Outils pour la spectroscopie en champ proche optique ;
Application à l'imagerie hyperspectrale.**

Soutenue le 20 décembre 2001 devant la commission d'examen :

M.	Bernard Humbert	Rapporteur
M.	Pascal Royer	Rapporteur
M.	Alain Bosseboeuf	Examineur
M.	Christian Colliex	Examineur
Me.	Anne Débarre	Directrice de thèse
M.	Paul Tchénio	Examineur

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers ceux qui m'ont apporté leur aide à différentes étapes de mon travail au laboratoire.

Je suis profondément reconnaissant à Anne Débarre et Paul Tchénio, qui m'ont accueilli dans leur équipe, de m'avoir accordé leur confiance et dirigé mes travaux avec un soutien constant tout au long de cette thèse. Je leur suis également reconnaissant d'avoir consacré le temps de relire ce mémoire et de m'avoir fait part de leurs remarques très fructueuses qui ont permis d'approfondir mes connaissances. Je leur sais gré des longues périodes de travail expérimental que nous avons partagées et où nous avons échangé de nombreuses discussions enrichissantes.

Ma curiosité a aussi trouvé réponse auprès de Joël Azoulay, qui a récemment quitté le groupe pour faire un post-doc, et Rodolphe Jaffiol, actuellement doctorant. Ils ont toujours dispensé enthousiasme et bonne humeur en contribuant inlassablement aux mises au point des différentes configurations expérimentales, je les en remercie et leur souhaite un très bon avenir.

La qualité de la conception des outils exposés dans cette thèse a largement profité des compétences de Patrice Leroy et Daniel Civiale qui ont réalisé les ensembles mécaniques avec une grande précision, ainsi que de celles de Jean Louis Tutou, spécialiste dans la réalisation d'éléments mécaniques de grandes tailles, qui a toujours su trouver la méthode pour assurer, sur les petites pièces du microscope, les soudures électriques délicates. Jean Marc Sintès, par sa maîtrise des logiciels de dessin a dressé les plans des éléments complexes du microscope. Le service d'électronique a amplement contribué à la réalisation des interfaces, et les choix judicieux des composants utilisés ont largement bénéficié des conseils éclairés que Roger Leroux m'a prodigués.

La participation de toutes ces personnes confirme qu'un tel travail ne peut être pleinement accompli qu'avec la richesse des compétences variées des services du laboratoire et la pratique de relations étroites avec leurs équipes. Pour cela, je les remercie très sincèrement.

Je suis reconnaissant à Messieurs Bernard Humbert et Pascal Royer d'avoir, malgré des emplois du temps complets, accepté de rapporter ce mémoire. Je les remercie de l'intérêt qu'ils ont porté à la lecture de cette thèse pour me faire part de leurs remarques avisées.

Je remercie vivement M. Alain Bossebœuf qui, au delà de sa charge importante de travail, s'est intéressé à mon travail. Je lui sais gré d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie particulièrement M. Christian Colliex, spécialiste de spectroscopie électronique, de m'avoir permis de développer mes travaux de doctorat dans le cadre stimulant du projet ICORP (International Cooperation Research Program on Nanotubulites) dont il est coresponsable avec S. Iijima. Je lui suis reconnaissant d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse.

Je souhaite, enfin, remercier mes proches et surtout Joëlle, mon épouse aux grandes qualités, qui m'a toujours soutenu dans mes travaux et qui a su, particulièrement au long de ce travail de thèse, accepter avec beaucoup de patience que les soirées tardives et les week-ends consacrés à ce travail, aient souvent dû interrompre nos moments de compagnie. Je terminerai en souhaitant à mon fils Hervé, qui s'engage dans les métiers de l'informatique, que cette voie lui apporte encore plus de connaissances et de plaisirs que ceux qu'elle m'a donnés.

A mon épouse,

Table des matières

<u>TABLE DES MATIÈRES</u>	I
<u>I - INTRODUCTION</u>	1
IA - PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE DE CHAMP PROCHE	9
IB- SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE DE MOLÉCULES UNIQUES	20
IC- ELÉMENTS DU MICROSCOPE	27
<u>II - CAPTEURS ET ACTIONNEURS.</u>	33
IIA.1 - CAPTEURS, NOTIONS GÉNÉRALES	35
IIA.2 - CAPTEURS OPTIQUES DE DÉPLACEMENTS	37
IIA.3 - CONTRÔLE DE DISTANCES NANOMÉTRIQUES : APPLICATION À LA MICROSCOPIE DE CHAMP PROCHE.	42
IIA.3.1 - CAPTEUR DE DÉPLACEMENTS NANOMÉTRIQUES, DE TYPE STM, APPLICATION À L'ANALYSE DU PHÉNOMÈNE D'EXALTATION SOUS POINTE DE LA FLUORESCENCE.	47
IIA.3.2 - CAPTEUR DE DÉPLACEMENTS NANOMÉTRIQUES DE TYPE SHEAR FORCE, CONTRÔLE DE LA DISTANCE D'INTERACTION POINTE ÉCHANTILLON.	54
IIA.4 - CONTRÔLE DE DISTANCES MICROMÉTRIQUES : MESURE DE POSITION DANS LE PLAN DE L'ÉCHANTILLON:	99
IIA.4.1 - CAPTEUR DE DÉPLACEMENTS DE RÉOLUTION SUBMICRONIQUE : PHOTODÉTECTEUR 4 QUADRANTS.	102
IIA.4.2 - ÉTALONNAGE DU DÉTECTEUR OPTIQUE DE POSITION	115
IIB.1 - ACTIONNEURS, NOTIONS GÉNÉRALES.	131
IIB.2 - POSITIONNEMENT DES ÉLÉMENTS MOBILES DES MICROSCOPES.	135
IIB.3 - SCANNER PENDULAIRE OSCILLANT.	139
IIB.4 - SCANNER PLAN.	144
IIB.5 - MOTEUR LINÉAIRE PIÉZOÉLECTRIQUE.	152
IIC - DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL COMPLET.	164
<u>III - GESTION INFORMATIQUE DE L'ENSEMBLE DU MICROSCOPE :</u>	168
IIIA- INTERFAÇAGE DES DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS MATÉRIELS	174

Table des matières

IIIA.1- PRINCIPES DE GESTION TEMPORELLE DES DIFFÉRENTS CONTRÔLES DU MICROSCOPE	176
IIIA.2 - INTERFACE DE LA CHAÎNE DE COMPTAGE DE PHOTONS.	180
IIIA.2.1 - MODULES DE DÉTECTION DE LA FLUORESCENCE TOTALE.	180
IIIA.2.2 - UNITÉ PROGRAMMABLE DE COMPTAGE DE PHOTONS	182
IIIA.3 - INTERFACE DE COMMANDE DU SCANNER	198
IIIA.4 - INTERFACE DE LECTURE DES DÉTECTEURS OPTIQUES DE POSITION	209
IIIA.5 - INTERFACE DE CONTRÔLE ET DE MESURE DU SYSTÈME D'ANALYSE SPECTRALE.	211
IIIA.5.1 – SYSTÈME D'ANALYSE SPECTRALE.	211
IIIA.5.2 - INTERFACE DE CONTRÔLE ET DE MESURE DU DÉTECTEUR CCD.	212
IIIA.6 - INTERFACE DE CONTRÔLE ET DE MESURE DU GÉNÉRATEUR BASSE FRÉQUENCE, APPLICATION À LA CARACTÉRISATION DES SONDES.	219
IIIB - DÉVELOPPEMENT DES LOGICIELS, CONTRAINTES ET DESCRIPTIONS DES FONCTIONS PRINCIPALES.	224
IIIB.1- SYSTÈME D'EXPLOITATION WINDOWS, ENVIRONNEMENT DE DÉVELOPPEMENT	224
IIIB.2 - FONCTIONNALITÉS DU PROGRAMME.	235
IIIB.3 - BASE DE DONNÉES ET STRUCTURE DES INFORMATIONS NUMÉRIQUES	249
IIIB.4 - DESCRIPTION DE L'INTERFACE UTILISATEUR	257
IV - PRÉSENTATIONS DE QUELQUES RÉSULTATS.	271
<hr/>	
V - CONCLUSION ET PERSPECTIVES	295
<hr/>	

I - Introduction

La course à la miniaturisation est un maître mot toujours actuel depuis le dernier quart du 20^{ème} siècle. Si le formidable enjeu économique qu'elle représente lui a permis de faire des progrès spectaculaires, elle recouvre des enjeux sociétaux et intellectuels tout aussi importants. Le terme très général de miniaturisation s'entend communément dans le domaine de l'électronique où il correspond à une réalité de réduction en taille d'un dispositif réalisant des fonctions données.

L'élaboration d'un dispositif réduit sous-entend, à son tour, le développement des moyens incluant instruments et concepts physiques, appropriés à sa caractérisation. Dans le domaine des échelles « petites », procédés, concepts et méthodes d'exploration expérimentales nouvelles sont étroitement liées. Les concepts de la physique de l'infiniment petit, formalisés dans la première partie du 20^{ème} siècle, ont largement précédé les premières réalisations, faute de moyens technologiques adaptés pour mettre en œuvre des expériences dans le domaine nanométrique. C'est ainsi, par exemple, que le concept de microscopie optique de champ proche, qui correspond à une méthode optique d'analyse d'échantillons à des échelles bien inférieures à celle de la longueur d'onde d'observation, a été proposé par Synghe dès 1928 [1]. La démonstration de cet effet passait par la réalisation d'un trou de diamètre inférieur à celui de la longueur d'onde du rayonnement, et il a fallu attendre 1980, avec les progrès réalisés dans les techniques de micro-usinage, pour enregistrer la première démonstration de la microscopie optique de champ proche.

Si la barrière du micron est largement dépassée en électronique, puisque des transistors de 70nm sont produits de façon routinière, et qu'un transistor d'une taille de 20nm a été élaboré récemment avec succès, la maîtrise de l'interaction du nanoobjet avec son environnement reste l'un des problèmes majeurs qui se pose en nanosciences. Ainsi, les propriétés de transport de courant de fils quantiques ou de nanotubes de carbone, objets dont une dimension au moins est nanométrique, sont déterminées par des mesures qui utilisent des contacts ohmiques.

Pour progresser dans la compréhension du phénomène de transport, il est, d'une part, nécessaire d'obtenir des critères qui assurent que les propriétés mesurées relèvent bien de l'objet étudié, ce qui mêle modélisation et mesure, et d'autre part, de savoir réaliser les contacts appropriés. Ainsi, même si de nombreux objets de taille nanométrique, appelés nanoobjets, existent dans la nature, leur manipulation et leur observation posent un véritable défi à tous les acteurs concernés, ingénieurs, physiciens, chimistes, biologistes... .

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte, puisque j'ai développé des outils destinés à une caractérisation optique de nanoobjets. L'optique est en effet un outil privilégié d'analyse parce que l'observation peut être réalisée d'une part in situ, en cours de procédé de fabrication par exemple, y compris dans un milieu hostile, et d'autre part sans introduire de contacts physiques, entre l'objet à analyser et le moyen d'analyse, autre que l'interaction entre les photons et l'objet. Or dans le domaine de l'interaction entre les ondes et la matière, la modélisation et les concepts sont très avancés, ce qui permet d'adapter des formalismes préexistants à l'optique dans les nanosciences.

Le champ d'application de l'optique est par ailleurs très vaste puisque des signaux aussi différents que la réflexion spéculaire, la diffusion, la transmission, les propriétés de polarisation, la dynamique temporelle de l'émission ou la création de rayonnements de fréquences différentes... peuvent être utilisés comme sondes de processus particuliers selon le caractère de l'étude. Chacun de ces signaux donnent la signature d'une propriété particulière du milieu, que ce soit, par exemple, la valeur complexe de son indice de réfraction qui est un reflet de la dynamique des charges dans ce milieu et qui mesure sa transparence, ou les propriétés de symétrie de ce milieu et son efficacité vis à vis de la création d'effets non-linéaires.

La microscopie optique "classique" a opéré, dès son apparition, une véritable révolution dans les observations expérimentales. Elle s'est dotée d'outils très performants comme les techniques de contraste de phase ou la microscopie de polarisation. Il existe donc un potentiel très important de diagnostics qui rendent la microscopie très attractive. Dans son utilisation courante, la microscopie utilise un objectif de microscope qui focalise la lumière en une tache dont les dimensions déterminent la taille minimum qu'un objet doit posséder si on ne veut obtenir, dans le signal réfléchi ou transmis, que des informations provenant de ce seul objet et non des informations relevant aussi de son environnement (support, objet voisin), ce qui rend l'analyse ultérieure parfois très complexe. Or, quelle que soit l'ouverture de l'objectif utilisé, la dimension ultime de la tache d'éclairement est déterminée par la longueur d'onde du rayonnement utilisé, selon le critère de Rayleigh.

C'est cette barrière que la microscopie optique de champ proche permet de briser. La tache d'éclairement n'est plus alors produite sous l'effet de la focalisation d'ondes propagatives, détectables à distance de l'échantillon, mais résulte de l'interaction de composantes non propagatives du champ électromagnétique avec l'échantillon. L'exploitation de telles ondes, confinées au voisinage très immédiat, de l'ordre d'une centaine de nanomètres, d'un objet, permet de réduire la tache d'éclairement, ou alternativement, la dimension latérale

du volume de collection de la lumière, a des dimensions de l'ordre de 50 nanomètres, ce qui ouvre la voie à une exploration très locale par procédé optique.

La variété des signaux qu'on peut utiliser pour l'analyse confère à cette méthode un grand potentiel dans l'étude à l'échelle nanométrique. Elle rend accessibles de très nombreuses propriétés de nanodispositifs d'une part et permet, d'autre part, d'explorer de très nombreux objets de nature différente dont, en particulier, des objets non conducteurs. De nombreux diagnostics, telle la polarisation, la transmission, la dynamique de l'émission... restent en effet accessibles à la mesure en champ proche.

Une partie de mes travaux, a été consacrée à la conception et à la réalisation d'un microscope optique de champ proche. Le développement d'un microscope de champ proche est subordonné aux principes physiques fondamentaux qui régissent le comportement des ondes de champ proche. Des ondes de champ proche sont confinées au voisinage de tout objet éclairé. Appelons cet objet une nanosource. L'amplitude de ces ondes décroît très rapidement dans la direction perpendiculaire à la nanosource, sur une distance très inférieure à la longueur d'onde d'éclairement.

Si on réalise un microscope fonctionnant dans le visible, la distance considérée est inférieure à 100 nanomètres. En conséquence, si un objet est introduit dans cette zone de champ proche, seule la partie de l'échantillon à la verticale de la nanosource est éclairée. Si la nanosource est de dimensions nanométriques, il en sera de même de la zone de l'objet explorée, pourvu que la distance relative nanosource-échantillon soit du même ordre de grandeur.

La conception d'un microscope optique de champ proche suppose donc non seulement le choix d'une nanosource, mais le développement de méthodes permettant de maintenir deux objets à une distance relative d'une centaine de nanomètres et ce, pendant des temps qui peuvent être très longs selon les expériences réalisées. Ce travail implique le développement d'actionneurs qui permettent de réaliser de façon répétitive des déplacements fins dans le domaine submicronique et des capteurs qui permettent de contrôler en permanence la distance entre nanosource et échantillon. Le chapitre I de ce mémoire précise les particularités des méthodes d'analyse que nous utilisons, les exigences qu'elles impliquent et les éléments principaux d'un microscope de champ proche à balayage. Les chapitres, IIA pour les capteurs et IIB pour actionneurs, exposent, tout d'abord, les problématiques distinctes engendrées par ces méthodes, et décrivent les choix, l'étude, la conception, et les caractéristiques des éléments utilisés, ainsi que ceux de l'électronique particulière développée et mise en œuvre pour en assurer le contrôle par un système informatisé.

Quel que soit le signal optique d'analyse qui est soumis à la détection, il s'agira d'un signal faible, même si ce n'est, par exemple, qu'une simple réflexion spéculaire. J'ai donc été amené à développer des chaînes de mesure spécifiques, dédiées à la détection de faibles signaux optiques comme le décrivent les chapitres IIIA.2 et IIIA.5.

La méthode de champ proche optique, qui est présentée dans ce mémoire se distingue des méthodes les plus couramment utilisées qui exploitent le champ proche directement produit par le passage d'un rayonnement classique à travers une ouverture.

Dans ce travail, au contraire, il s'agit de s'appuyer sur l'effet d'exaltation que voient des ondes électromagnétiques polarisées au voisinage d'un objet oblong. Si cet objet a des dimensions nanométriques, comme c'est le cas, par exemple, d'une pointe de microscope à force atomique, le domaine spatial sur lequel les ondes seront exaltées sera également limité à des dimensions nanométriques. La pointe éclairée est équivalente à une nanosource effective de champ proche. Cette nanosource devrait atteindre des dimensions déterminées par l'apex de la pointe utilisée. Cela permettrait d'obtenir, en optique, des explorations à l'échelle de la dizaine de nanomètres, encore difficilement accessibles. Un des intérêts de cette méthode est d'utiliser des pointes d'usinage connu, de matériaux variés et aisément interchangeables en cas d'endommagement.

Un autre intérêt, lié au développement de ce type de microscopie appelé sans ouverture, est la possibilité d'utiliser des méthodes de contrôle de distance pointe-échantillon matures, développées en microscopie à effet tunnel ou à force atomique. J'ai donc également, au cours de ce travail, adapté de telles méthodes en fonction des expériences à réaliser, en sorte de développer un appareil très versatile.

La cartographie d'une propriété particulière d'un échantillon est obtenue en adjoignant un système de balayage au microscope. Deux solutions sont possibles, soit balayer la nanosource et l'échantillon reste fixe, soit assurer le déplacement de l'échantillon dans son plan. En microscopie optique de champ proche sans ouverture, la nanosource est créée par focalisation d'un faisceau extérieur sur une pointe. Les propriétés de la nanosource vont dépendre directement de la qualité de l'alignement pointe faisceau et il est techniquement très difficile d'asservir la position de la focalisation du faisceau sur la pointe pendant son balayage. J'ai donc développé des systèmes de balayage du second type. Les chapitres IIB.3 et IIB.4 décrivent deux de ces systèmes réalisés au laboratoire. L'un étudié pour fonctionner en environnement cryogénique, l'autre de grande accessibilité pour autoriser différentes configurations de fonctionnement du microscope.

Chaque point de l'échantillon est repéré par ses coordonnées dans le plan du balayage. En y associant la valeur du signal détecté, on réalise la cartographie de la réponse de l'échantillon sous la forme d'une image bidimensionnelle. L'information sur la propriété sondée est déduite de cette image directement ou par un traitement ultérieur. J'ai doté le microscope d'un logiciel interactif qui permet de visualiser une telle image en temps réel.

Au delà de la réalisation des fonctions indispensables à l'élaboration d'un microscope optique de champ proche et à l'acquisition d'images bidimensionnelles, j'ai développé un instrument plus versatile, équipé de diagnostics multiples et des logiciels indispensables à son pilotage et à son exploitation. Il est en particulier adapté à la détection de molécules individuelles qui ont été les principaux objets d'étude. Comme il vient d'être mentionné, la résolution espérée avec le microscope optique de champ proche développé atteindra, dans une situation très favorable, une dizaine ou une vingtaine de nanomètres. A cette échelle de nombreux processus méritent d'être explorés, mais cette sonde reste encore surdimensionnée dans certaines situations. Il est possible de contourner cet écueil en utilisant le microscope de champ proche optique non pas comme la sonde directe de l'échantillon mais comme un moyen très efficace d'étude de molécules une par une. Dans cette configuration, la véritable sonde du milieu sera la molécule elle-même et le signal pertinent sera son rayonnement de fluorescence. Avant d'explicitier l'intérêt de la microscopie de champ proche dans de telles expériences, arrêtons-nous sur les raisons qui confèrent aux molécules une position très privilégiée dans les nanosciences.

Parmi les nanoobjets, les molécules occupent une place particulière qui contribue à donner aux nanosciences une dimension très interdisciplinaire. La caractérisation physico-chimique de molécules, à l'état de traces, et la manipulation de quantités faibles de molécules est un exemple d'enjeu important, qui intéresse en premier lieu l'industrie pharmaceutique et au delà, la santé si on sait contrôler l'insertion de ces molécules dans un tissu donné. Les molécules sont aussi le domaine privilégié de la biologie. Ces molécules naturelles ont un fonctionnement hautement spécialisé. L'analyse nanométrique offre la possibilité d'accéder à la compréhension d'un tel mécanisme élémentaire, parfois très complexe, celui par exemple du rôle de certaines protéines et d'en comprendre le dysfonctionnement dans une cellule malade. En parallèle, se développe une activité importante pour réaliser à partir de ces « briques élémentaires », que sont les molécules, des dispositifs nanométriques artificiels comme les moteurs moléculaires. L'ingénierie moléculaire est un des axes très actifs des nanosciences.

Une particularité distingue les molécules des autres nanoobjets : on sait en synthétiser une grande variété, elles peuvent avoir des tailles véritablement nanométriques voire subnanométriques et beaucoup d'entre elles peuvent être excitées dans des domaines d'énergie couverts par les sources laser actuelles. Si leur étude est un axe de recherche en soi, un autre axe de recherche consiste à les utiliser comme capteurs très locaux, presque ponctuels, des propriétés de milieux variés. Sous le terme nanosciences se cache dans ce cas une analyse très locale d'un milieu qui lui-même n'est pas forcément de taille nanométrique.

L'utilisation de cette méthode d'investigation suppose que les molécules peuvent être insérées de façon contrôlée, en partie au moins, dans l'objet d'étude qu'on appellera « la matrice », et qu'elles y soient stables. La molécule peut être la sonde de milieux très variés comme des matrices polymères dont il est important de caractériser les hétérogénéités qui s'étendent sur des domaines spatiaux variant de quelques millimètres à quelques dizaines de nanomètres, ou des milieux biologiques où elles sont désignées couramment par le terme de marqueurs. De tels marqueurs dépassent très souvent le rôle de sonde pour être par exemple de véritables capteurs chimiques de réactions biologiques comme dans le cas du transport intracellulaire du calcium qui peut-être suivi à l'échelle d'une ou quelques cellules en analysant les fluctuations de fluorescence de molécules spécifiques.

En utilisant l'émission d'une molécule individuelle de petite taille comme sonde du milieu où elle est greffée, on franchit un pas supplémentaire par rapport à l'optique de champ proche pour réaliser de l'imagerie à très haute résolution spatiale. Une possibilité est d'exciter une molécule à résonance et de détecter son rayonnement de fluorescence. Ce rayonnement est constitué d'une succession de photons émis un par un selon un chronogramme qui dépend de la probabilité d'absorption des photons excitateurs par la molécule. A partir de cette émission plusieurs types de signaux peuvent être suivis : la dynamique de l'émission, l'intensité totale de la fluorescence émise pendant un temps d'acquisition choisi, les propriétés de polarisation des photons émis ou le nombre total de photons émis par la molécule avant qu'elle ne subisse un processus irréversible de photodégradation qui la rend inactive optiquement.

De ces signaux, il est possible de déduire de nombreuses informations, comme les paramètres photophysiques de la molécule ou l'orientation de son dipôle par exemple. Or ces paramètres ont des valeurs qui dépendent de l'environnement immédiat de la molécule et des liaisons qu'elle a créées avec cet environnement. Si on détecte les fluctuations de ces paramètres en fonction de la localisation de la molécule, on dispose de sondes véritablement

nanométriques, qui peuvent en particulier être fonctionnalisées pour un processus donné à étudier.

Les technologies actuelles permettent de détecter sans difficulté le signal de fluorescence émis par une seule molécule. La difficulté réside à trouver des méthodes qui permettent d'enregistrer ce signal sur fond noir, c'est à dire d'éliminer les signaux parasites qui dégradent le rapport signal sur bruit. Or ces signaux proviennent des phénomènes de diffusion, non seulement à la traversée des optiques mais de toute la zone de l'échantillon éclairée, au centre de laquelle se situe la molécule sondée. La microscopie optique de champ proche est actuellement la seule méthode qui permet de réduire la tache d'éclairage à des dimensions de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres. C'est le rôle de l'appareil que j'ai élaboré.

En outre, en associant microscopie optique de champ proche et détection de molécules uniques, on dépasse l'imagerie de très haute résolution spatiale si on exploite des propriétés spécifiques de l'émission de fluorescence. C'est l'enjeu, en particulier, de la spectroscopie qui, utilisée dans le cas d'un émetteur unique, atteint une sensibilité ultime. Le terme spectroscopie désigne de manière générale toutes les techniques qui apportent une information sur les niveaux d'énergie du système étudié ou, plus généralement encore, une information sur sa dynamique. Toutefois, ce que recouvre précisément ce terme « spectroscopie optique », quantités mesurées, techniques, dépend fortement de l'objet étudié.

La spectroscopie de molécules uniques repose sur l'emploi de molécules fluorescentes, absorbant, très efficacement, une partie du spectre visible ou proche UV et ré-émettant, après absorption, un rayonnement décalé vers les grandes longueurs d'onde, appelé rayonnement de fluorescence. Parmi ces molécules, la plupart sont des colorants laser bien connus tels que les rhodamines.

Le spectre d'émission est une signature importante de la molécule. L'intensité et la répartition des raies du spectre de fluorescence sont caractéristiques de la conformation d'une molécule et de ses liaisons avec l'environnement. Cette propriété prend toute sa valeur à basse température où les raies spectrales sont fines. Il s'agit en ce cas de spectroscopie à haute résolution. A température ambiante, la section efficace d'absorption de la molécule chute et les raies sont élargies. Un tel spectre conserve, cependant, des propriétés importantes, comme la signature des espèces chimiques mises en jeu et des informations sur la population de niveaux vibrationnels de l'état fondamental. Ces niveaux étant très sensibles aux interactions entre molécules, le spectre va dépendre de la localisation de la molécule dans la matrice.

J'ai développé une chaîne de mesures de haute sensibilité permettant d'acquérir aussi bien l'intensité totale du rayonnement de fluorescence pendant un temps d'acquisition donné, que le spectre d'un émetteur dans un site particulier de l'échantillon. Parmi les étapes à franchir pour réaliser ce travail, il a été nécessaire de développer les techniques aussi bien électroniques qu'informatiques permettant un repositionnement précis de l'échantillon à l'échelle de la tache d'excitation ($\cong 50$ nm) pour pouvoir acquérir le spectre de fluorescence d'un émetteur préalablement repéré. La finesse des actionneurs mentionnés et le développement d'un capteur optique de déplacement submicrométrique, décrit au chapitre IIA.4, assurent un repositionnement avec la précision attendue.

J'ai ensuite développé un logiciel interactif permettant d'acquérir simultanément en chaque point d'une image, l'intensité totale de la fluorescence émise dans le cône de détection du microscope, et son spectre. Le chapitre III décrit les interfaces programmables et les fonctions de ce logiciel constituant l'architecture du programme de gestion du microscope.

Une telle imagerie multidimensionnelle qui permet d'accumuler plusieurs informations complémentaires sur une même molécule, localisation, rendement quantique d'émission, analyse spectrale est un outil qui dépasse la simple imagerie. Le chapitre IV de ce mémoire présente quelques résultats expérimentaux qui illustrent cette richesse d'informations.

En résumé, le plan de ce mémoire est le suivant :

Le chapitre I précise les méthodes d'analyse utilisées et les exigences qu'elles impliquent. Il présente, également, les principaux éléments d'un microscope de champ proche. Le chapitre II expose la problématique de mesure des faibles signaux de fluorescence et celle du maintien de la distance nanométrique existant entre l'échantillon et la pointe du microscope de champ proche. Il décrit les capteurs et les actionneurs spécifiques développés et mis en œuvre avec d'autres éléments manufacturés, pour effectuer ces mesures et positionner précisément l'échantillon dans l'axe du faisceau excitateur. Il présente, enfin le dispositif expérimental complet. Le chapitre III précise les contraintes logicielles et décrit les interfaces programmables ainsi que les fonctions développées pour gérer l'ensemble des éléments du microscope et l'acquisition et l'enregistrement des images, à l'aide d'un outil informatique convivial. Le chapitre IV illustre, à la fois, les potentialités du microscope et celles de son logiciel de gestion.

IA - Principe de la microscopie optique de champ proche

L'optique classique ne permet d'éclairer isolément un nanoobjet que si la séparation entre les différents objets dans le plan d'observation est supérieure à $\lambda/2$. Elle ne permet pas l'étude d'échantillons denses et ne donne pas la possibilité de distinguer les propriétés d'un objet avec une résolution dans le domaine nanométrique. La microscopie de champ proche permet de contourner ces limitations.

Le principe de la microscopie de champ proche ou MOCP est le suivant. Lorsqu'un objet est irradié par une onde électromagnétique, il y a diffraction de deux types de champs: un champ propageant que l'on qualifie de « champ lointain » et un champ ne se propageant pas, appelé « champ proche », constitué d'ondes lumineuses évanescentes confinées très près de l'objet (quelques nanomètres). Ce concept introduit par Newton fut repris en 1928 dans les travaux de Synghe [1]

Une image simple de la notion de champ proche peut-être dérivée de l'analyse du rayonnement électromagnétique d'un dipôle. Dans de nombreuses situations, l'émission d'une molécule et par extension celle d'une source ponctuelle est correctement décrite par une émission dipolaire. Dans un dispositif de champ proche optique idéal, la source lumineuse serait un dipôle unique. Dans ce cas la source serait véritablement ponctuelle. Soit \vec{p} le dipôle constitué par deux charges $+q$ et $-q$ distantes de l . Excité par un rayonnement de pulsation ω , il émet un champ électromagnétique dont l'amplitude est donnée par les équations suivantes :

$$\vec{p} = \vec{p}_0 e^{i\omega t}$$

$$\vec{B} = \frac{-\mu_0 \omega p_0 \sin\theta}{4\pi} \left(\frac{k}{R} \cos(\omega t - kR) + \frac{1}{R^2} \sin(\omega t - kR) \right) \vec{u}_\phi \quad (\text{IA.1})$$

$$\vec{E} = \frac{p_0}{4\pi\epsilon_0} \left\{ \left(\frac{-k^2}{R} \cos(\omega t - kR) \sin\theta \vec{u}_\theta \right) + \left(\frac{-k}{R^2} \sin(\omega t - kR) \left(2 \cos\theta \vec{u}_R + \sin\theta \vec{u}_\theta \right) \right) \right. \\ \left. + \left(\frac{1}{R^3} \cos(\omega t - kR) \left(2 \cos\theta \vec{u}_R + \sin\theta \vec{u}_\theta \right) \right) \right\} \quad (\text{IA.2})$$

où p_0 est l'amplitude du dipôle, ω sa pulsation, $k = \frac{\omega}{c}$ où c est la vitesse de la lumière, $R, \theta, \vec{u}_R, \vec{u}_\theta, \vec{u}_\phi$, des paramètres géométriques définis sur la figure IA.1.

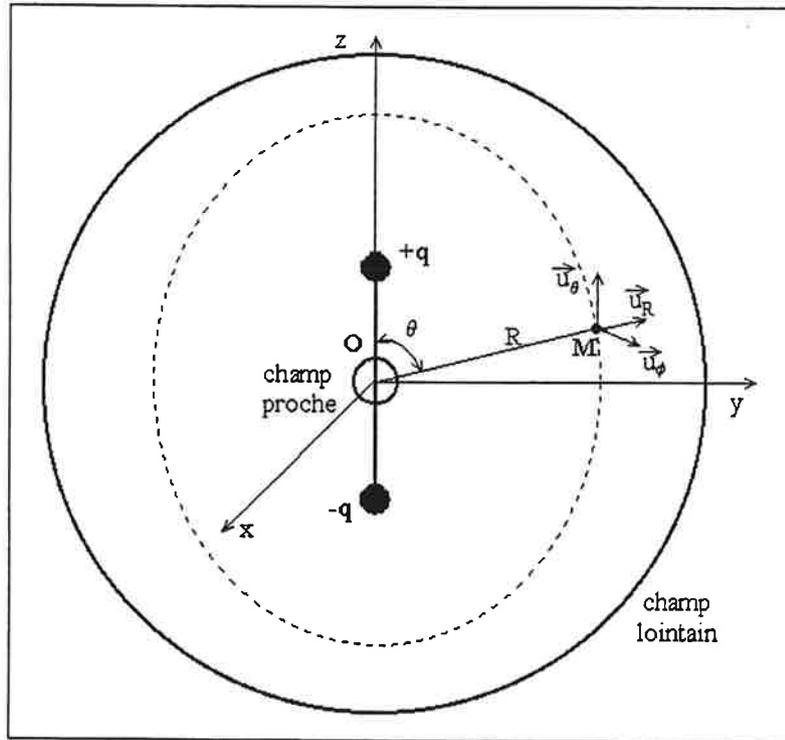


Figure IA.1 : Dipôle ou nanostructure émettrice

La figure IA.2 représente la nanostructure émettrice ou diffusante élémentaire, la nanosource. Elle a été modélisée par un simple dipôle qui permet de dégager les principes généraux de l'imagerie en champ proche. La nanosource a, en réalité, une extension latérale finie, qui conduira à une dégradation de la résolution spatiale. Commençons par analyser le cas idéal du dipôle unique pour comprendre la notion de champ proche.

On obtient une image simple de la notion de champ proche en comparant, dans l'équation (IA.2), l'intensité relative des trois termes qui dépendent de la distance R entre le point d'observation M et le dipôle. Leur dépendance en fonction de R est pondérée par un facteur qui varie avec k , c'est à dire avec la longueur d'onde du rayonnement émis. Le troisième terme, dit de champ proche, peut être dominant dans la situation où :

$$\frac{1}{R^3} \geq \frac{k}{R^2}, \text{ et } \frac{1}{R^3} \geq \frac{k^2}{R} \quad (\text{IA.3})$$

Ces deux inéquations sont satisfaites par la condition suivante :

$$R \leq \frac{\lambda}{2\pi}$$

Le paramètre $\lambda/2\pi$ est l'échelle spatiale qui définit le domaine des expériences de champ proche optique. En deçà de cette valeur, le champ du dipôle est gouverné par une dépendance spatiale en $1/R^3$ et s'identifie au champ électrostatique, c'est le domaine du champ proche.

A partir de cette modélisation dipolaire de la nanosource, il est intéressant de déterminer l'extension latérale de la tache d'éclairage sur un échantillon en champ proche optique (voir fig. IA.3).

Sur la figure IA.2, l représente la distance entre l'axe optique et le point d'observation, et d est la distance entre le dipôle et l'échantillon plan. L'amplitude du champ électrique en un point M de l'échantillon situé à la distance R du dipôle, si l'on ne retient que les termes dominants pour que $R \leq \frac{\lambda}{2\pi}$, a pour expression :

$$|\vec{E}| = \frac{P_0}{4\pi\epsilon_0} \left(\frac{\sqrt{3 \cos^2(\theta) + 1}}{R^3} \right) \quad (\text{IA.4})$$

soit encore

$$|\vec{E}| = \frac{P_0}{4\pi\epsilon_0} \left(\frac{(4l^2 + d^2)^{3/2}}{(l^2 + d^2)^3} \right) \quad (\text{IA.5})$$

L'intensité du champ est donnée par l'expression,

$$|\vec{E}|^2 = \left(\frac{P_0}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 \left(\frac{(4l^2 + d^2)^3}{(l^2 + d^2)^4} \right) \quad (\text{IA.6})$$

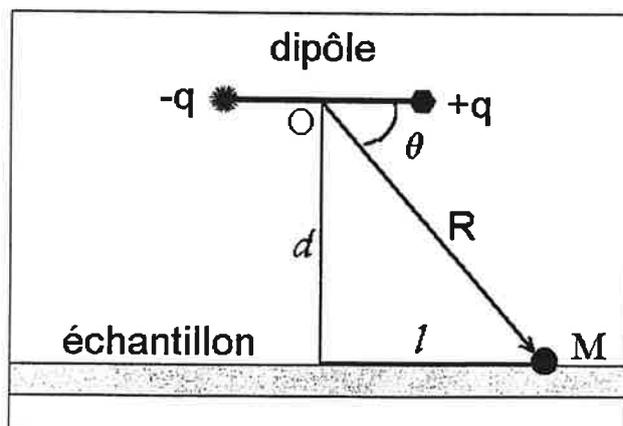


Figure IA.2 :
Eclairage
d'une nanosource,
extension latérale de
la tache d'éclairage.

Comme en témoigne les valeurs des facteurs de normalisation des courbes de la figure IA.3, l'amplitude du champ décroît très rapidement avec la distance pointe/échantillon. Si on prend comme critère d'étendue de la tache d'éclairement, la distance latérale à laquelle l'intensité du champ est réduite de moitié, le diamètre de la tâche d'éclairement varie de 16 nm à 1,6 nm quand la distance entre la pointe et l'échantillon varie de 10 nm à 1 nm. Cette image très simple du champ proche permet de comprendre certaines conditions importantes à respecter pour réaliser un microscope optique de champ proche. L'extension spatiale minimale de la tache attendue est de l'ordre de grandeur de la distance entre la nanosource et l'échantillon. Un éclairage ou une collection conduisant à une bonne résolution ne peuvent être atteints que si cette distance est très inférieure à $\lambda/2\pi$. La fiabilité de l'appareil dépendra de la précision avec laquelle cette distance peut être maintenue constante pendant une expérience. Dans le domaine d'excitation visible des taches de diamètre 10 fois plus petit que λ peuvent être obtenues avec les nanosources actuelles, soit environ 50 nm. Le corollaire de la réduction des dimensions latérales de la tache est une réduction importante de la profondeur de champ dont l'ordre de grandeur est 10 à 20 nm. L'optique de champ proche est une méthode de surface.

Selon que le dipôle est une source primaire ou une source secondaire, on distingue deux modes de fonctionnement des microscopes de champ proche. Dans l'image qui vient d'être décrite, le dipôle est considéré comme la source primaire d'éclairement du microscope optique de champ proche (nanosource). C'est le principe des microscopes optiques de champ proche en mode éclairage.

Un microscope de champ proche peut également être élaboré autour d'une source de champ lointain qui éclaire l'échantillon à étudier. Dans cette situation ce sont les structures de l'échantillon qui peuvent être considérées comme des dipôles. Une fraction de la lumière émanant du champ lointain est diffusée par les nanostructures de l'objet qui forment autant de nanosources primaires. Ces composantes qui transportent l'information sur les hautes fréquences spatiales peuvent être détectées car elles induisent des dipôles secondaires dans la sonde de détection, lorsqu'elle est située à une distance de l'échantillon inférieure à la longueur d'onde (nanosonde). Le microscope optique de champ proche fonctionne alors en mode collection.

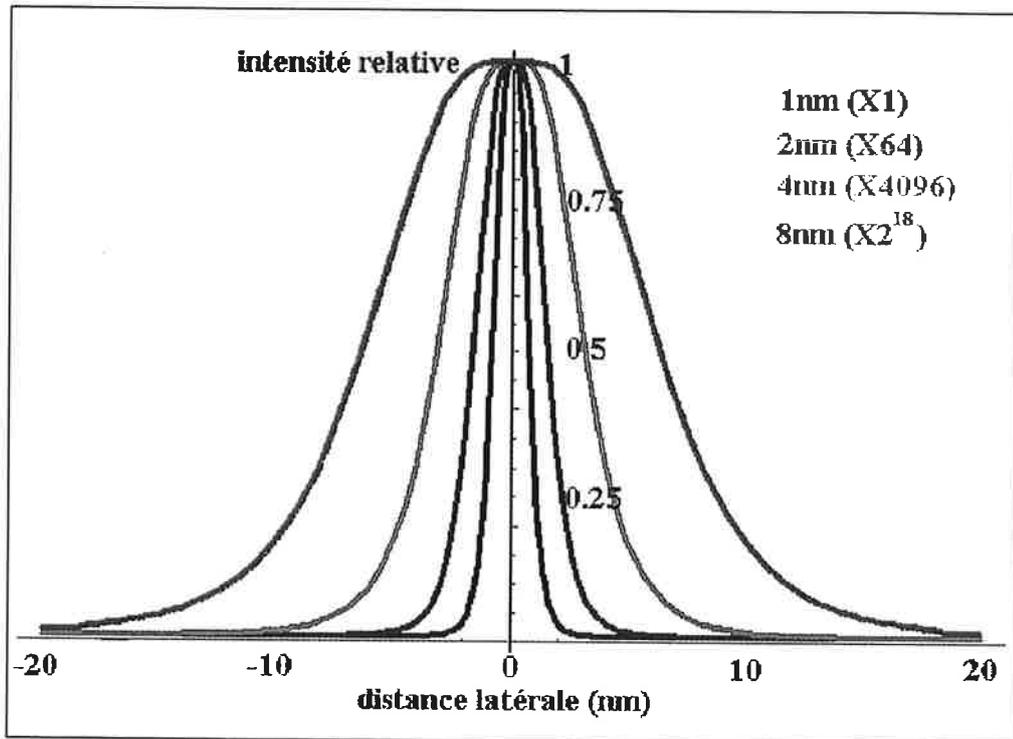


Figure IA.3 : Intensité lumineuse obtenue dans le plan de l'échantillon en fonction de la distance latérale l entre l'axe optique et le point d'observation pour différentes distances verticales d entre sonde et échantillon (voir figure IA.2). Chaque courbe est identifiée par une indication du type : d nm(X G), où d vaut 1, 2, 4 et 8 nanomètres, et G le facteur multiplicateur de l'intensité de chaque courbe pour obtenir la même valeur 1 en $l = 0$. Remarquons que ce facteur augmente rapidement avec d , ce qui correspond à la décroissance en $1/d^6$ de l'intensité du champ et, également, que la largeur latérale des courbe, qui correspond au diamètre de la tache de champ proche, est voisine de d .

Ces deux approches, nanosource (mode éclairement) ou nanosonde ou nanodétecteur (mode collection) peuvent être mises en œuvre en optique de champ proche. C'est un premier critère de classement des microscopes de champ proche souvent désignés par leur acronyme anglais « Scanning Near Field Microscopes » ou SNOM. Un second critère de classement est le type de sonde employée. Les sondes les plus couramment utilisées sont les sondes dites « à ouverture ». De nature diélectrique, elles sont en général constituées d'une fibre optique étirée, pour obtenir une extrémité pointue aussi fine que possible, et métallisée, à l'exception de cette extrémité où subsiste une ouverture transparente. Une seconde famille de SNOM utilise des sondes dites « sans ouverture » d'extrémités très fines et opaques, souvent de nature métallique, parfois diélectrique avec un haut indice de réfraction, elles travaillent, en mode éclairement, par diffusion locale du champ excitateur ou, en mode collection, par diffusion locale du champ proche. Pour un SNOM à ouverture, la taille de l'ouverture fixe la résolution spatiale du microscope. Dans une approche sans ouverture, la dimension de l'apex de la pointe métallique ou diélectrique de la sonde, joue un rôle équivalent sur la résolution. Il est alors possible d'obtenir des résolutions égales à 50 nm, voire meilleures. Un troisième critère de classement est la position relative de l'émetteur et du détecteur par rapport à l'échantillon. Le microscope est dit « à transmission » lorsque émetteur et détecteur sont de part et d'autre de l'échantillon. Dans ce mode, si l'on travaille en émission (nanosource), la collection est réalisée, en général, par une optique classique qui travaille en champ lointain. De même, en mode collection (nanodétecteur), l'illumination est effectuée en champ lointain. Lorsqu'on illumine et collecte le signal du même côté de l'échantillon, le microscope est dit « à réflexion ». Comme pour le mode transmission, seule l'une de deux fonctions, collection ou illumination, est en champ proche. Toutefois, quelques microscopes employant des sondes à ouverture dans le mode réflexion, utilisent une excitation et une collection en champ proche, réalisées par la même fibre étirée.

Les trois critères de classement sont largement indépendants et, la plupart des combinaisons correspondent à des microscopes existants.

Revenons, maintenant, sur les différents types de sondes. L'utilisation des sondes à ouverture présente plusieurs inconvénients. Leur coefficient de transmission optique reste faible, compris entre $T \approx 10^{-4}$ et $T \approx 10^{-6}$. Des méthodes variées sont mises en œuvre pour tenter d'obtenir des extrémités très pointues : l'attaque chimique [2] et plus récemment la fusion-étirage en étapes [3] très prometteuse. Cette dernière conduit à une bonne reproductibilité des fibres obtenues qui ont une ouverture de l'ordre de 60 nm. Un traitement de métallisation des

sondes par évaporation sous vide ($P \leq 5.10^{-6}$ bar) laissant transparente l'extrémité de la pointe est nécessaire pour réduire les fuites de lumière par les parois latérales de la fibre. Comme leur coefficient de transmission optique est d'autant plus faible que la dimension de l'apex est réduite, il est nécessaire de réaliser un compromis entre efficacité de transmission et résolution en fonction de l'application envisagée. L'usinage par faisceau ionique focalisé (FIB) [4] est une méthode lourde qui permet de tronçonner avec beaucoup plus de précision l'extrémité métallisée d'une fibre monomode étirée et d'obtenir ainsi un état de polarisation contrôlé et une transmission accrue, de l'ordre de $T \approx 10^{-4}$. Outre la limitation en puissance, d'autres inconvénients sont liés à ces sondes. Pour les sondes utilisées comme nanosource d'éclairage la puissance du rayonnement injecté dans la sonde ne peut excéder quelques milliwatts afin d'éviter que des effets thermiques ne détériorent la métallisation de la pointe. L'extrémité métallisée de la fibre est en général trop mal définie pour espérer utiliser un asservissement très sensible comme un asservissement sur le courant tunnel employé dans les microscopes STM (Scanning Tunnelling Microscope). Enfin, l'effet de peau qui correspond à la propagation d'une fraction de l'énergie incidente dans le métal limite intrinsèquement la résolution de ce type de sonde à une trentaine de nanomètres. Leur utilisation ne permet pas d'effectuer une microscopie de champ proche de très haute résolution nécessaire à la visualisation individuelle des molécules en interaction. Les essais que j'ai réalisés avec ce type de sonde, ont très vite montré que l'utilisation de fibres étirées comme nanosources de champ proche ne permettaient pas d'études de longue durée. Elles sont extrêmement fragiles et leur extrémité se dégrade très rapidement.

Le groupe s'est orienté vers un autre type de microscopie en champ proche optique qui fait l'objet, actuellement, de recherches actives. Il est caractérisé par l'utilisation d'un autre type de nanosonde, représenté par des pointes opaques, métalliques (tungstène, argent, ...) ou diélectriques de haut indice (silicium ...), définissant ainsi la famille des « SNOM à sonde sans ouverture ».

Ce domaine de la microscopie sans ouverture a d'abord été initié par H.K.Wickramasinghe [5], puis repris par d'autres groupes dont le groupe de A.C. Boccara [6]. Une pointe métallique oscille perpendiculairement à la surface de l'échantillon éclairé en champ lointain par un faisceau extérieur focalisé. Lorsque la pointe est proche de l'échantillon, à une distance très inférieure à la longueur d'onde, elle interagit avec les composantes de champ proche localisées au voisinage de l'échantillon. Cette perturbation se

traduit par l'apparition de composantes de champ diffractées en champ lointain dont la répartition et l'amplitude dépendent des composantes de champ proche. La perturbation de champ introduite par la pointe métallique se traduit par la possibilité de détecter l'information de champ proche en champ lointain. La résolution spatiale qu'on peut atteindre est déterminée par l'apex de la pointe. Cette information de champ proche n'est accessible que tant que la pointe se trouve à une distance de l'échantillon très inférieure à la longueur d'onde. Durant le cycle de vibration de la pointe, seule une fraction faible de sa position est utile, et le signal pertinent, extrait par démodulation à la fréquence d'oscillation de la pointe, présente une amplitude faible par rapport au signal direct de champ lointain.

Une alternative à cette méthode sans ouverture et perturbative est actuellement en cours d'analyse dans différents groupes et au laboratoire en particulier. Moins mature que la précédente, elle retient depuis peu l'attention de plusieurs groupes [7,8]. Nous avons implanté une telle méthode de champ proche sans ouverture destinée à la spectroscopie [9,35]. Cette méthode originale n'a quasiment pas été testée dans le cas d'études moléculaires. Seule une équipe américaine a développé simultanément une méthode reposant sur le même concept pour des études d'imagerie sur une assemblée de molécules [8,10].

Le principe est le suivant : lorsqu'une pointe métallique ou semi-conductrice est éclairée par un champ électromagnétique dont une composante de polarisation est parallèle à l'axe de la pointe, un dipôle est induit dans la pointe. Ceci correspond à une modification de la répartition des charges électriques telle, qu'à l'apex de la pointe, les lignes du champ sont confinées sous la pointe sur un domaine spatial de l'ordre de grandeur des dimensions de cet apex. Ce champ électromagnétique confiné est beaucoup plus intense localement. Cet effet d'exaltation dépend directement de la forme et de la nature de l'objet, c'est un effet géométrique [11]. Il peut être renforcé si l'excitation lumineuse possède une énergie qui permet d'exciter une résonance plasmon du matériau de la pointe. Si cette exaltation, qui peut en théorie atteindre, à quelques nanomètres sous la pointe, une valeur proche de 1000, est suffisante, alors on transforme ainsi une pointe bien choisie, de microscope AFM, en une nanosource effective efficace.

Les avantages sont multiples. Citons les deux principaux : il n'y a plus de limitation de la puissance de cette nanosource et, la résolution d'une telle source n'a plus de limites intrinsèques contrairement au cas des fibres métallisées. La résolution est donnée par la taille de l'apex de la pointe et dépend donc de l'obtention de pointes de géométrie adaptée. Dans ce

domaine, grâce aux développements rapides des AFM et STM, des progrès sont réalisés constamment et, il est commun, aujourd'hui de réaliser des pointes de rayon inférieur à 10 nm. Ces avantages sont communs aux méthodes sans ouverture (perturbatives et non perturbatives). Par contre dans ce dernier cas, la détection du signal utile ne nécessite pas de démodulation. En effet, grâce à l'exaltation du champ sous la pointe, le signal émis dans la zone de l'apex, peut être aussi intense que le signal émis par l'ensemble des molécules contenues dans la zone éclairée en champ lointain.

Mais il y a des contreparties. En analyse point par point des molécules dispersées sur l'échantillon, la lumière, focalisée sur l'apex de la pointe, éclaire en champ lointain, l'échantillon sur un domaine micrométrique, soit très au-delà de la taille du seul point d'observation. Ceci conduit à une exposition excessive des molécules aux radiations lumineuses, avant même leur étude. Cette exposition peut provoquer une dégradation ou reconformation photochimique de la molécule dans son environnement, stoppant l'émission du signal détectable, phénomène que l'on appelle communément « photoblanchiment ». Le faisceau qui éclaire la pointe peut produire un signal de fond important, Rayleigh d'une part, et de fluorescence des molécules proches, situées aux alentours de la pointe de la sonde de détection, d'autre part. Remarquons que ces deux derniers effets disqualifient l'approche sans ouverture perturbative. Par contre, si l'exaltation du champ sous la pointe est importante, cette méthode est a priori compatible avec la spectroscopie de fluorescence de molécules uniques que je présenterai dans le chapitre suivant.

Aucun travail n'ayant été réalisé dans une telle configuration en imagerie moléculaire, j'ai consacré une partie de mon travail à mettre en œuvre un appareil de ce type et à cerner les conditions de son fonctionnement optimal.

Pour conclure ce chapitre, il est utile de dégager les exigences de la microscopie de champ proche optique à partir des principes que nous venons de présenter.

La microscopie de champ proche est une microscopie à balayage. Il est donc nécessaire de développer des scanners ayant une résolution meilleure que celle attendue pour le champ proche (10 nm à 20 nm). Comme toutes les microscopies à balayage, elle nécessite le développement d'un ensemble informatique. Celui-ci regroupe les logiciels et les interfaces électroniques programmables qui permettent de gérer les déplacements, l'acquisition des

signaux en chaque point de l'échantillon, la construction d'images à partir des mesures et l'archivage des données enregistrées.

Un autre point spécifique à la microscopie de champ proche concerne le contrôle des distances qu'il faut effectuer avec une résolution nanométrique sur une gamme étendue, pour maintenir la nanosource à quelques nanomètres de l'échantillon. Pour cela il est nécessaire de développer des capteurs et des actionneurs assurant un positionnement avec une résolution nanométrique ou submicronique.

Pour le fonctionnement particulier que nous envisageons en spectroscopie moléculaire, d'autres exigences sont liées à la détection des très faibles signaux optiques. Pour mieux comprendre ces aspects du microscope, nous allons présenter, dans le chapitre suivant, les principes et les exigences de la spectroscopie de molécules uniques.

IB- Spectroscopie de fluorescence de molécules uniques

Grâce aux techniques de champ proche sans ouverture, présentées au chapitre précédent, on peut espérer réaliser des études optiques et spectroscopiques avec une résolution d'une ou deux dizaines de nanomètres. Bien qu'il s'agisse déjà d'un large progrès par rapport à la microscopie de champ proche à ouverture, dont la résolution est en pratique comprise entre 50 nm et 100 nm pour des études spectroscopiques, et d'un progrès encore plus grand par rapport à la microscopie conventionnelle dont la résolution est au mieux de 250 nm dans le domaine visible, cette résolution reste un ordre de grandeur supérieure aux échelles mises en jeu dans les processus moléculaires. Pour franchir un pas supplémentaire, il est intéressant non pas d'exploiter directement les propriétés du microscope de champ proche mais de l'utiliser comme un instrument efficace qui permet d'obtenir un rapport signal sur bruit élevé dans l'étude de molécules-sondes « uniques ».

Les molécules individuelles utilisées pour sonder localement le milieu, présentent de nombreux avantages. Premièrement, leur taille est très réduite. Une molécule de colorant a des dimensions typiquement d'un nanomètre ou moins. Une telle sonde, à l'échelle des problèmes étudiés, voit un environnement bien déterminé. On évite ainsi les problèmes de micro-hétérogénéité qui sont un obstacle majeur à l'emploi des techniques de spectroscopie optique dans les milieux complexes (biologie, catalyse, polymères, sol-gels,...) [12,13]. De plus, la molécule peut être fonctionnalisée pour marquer une partie très spécifique de l'échantillon. Cette possibilité est très largement utilisée en biologie.

Une conséquence directe de cette petite taille est la possibilité de localiser la molécule-sonde avec une grande précision. Lorsque sa détection est réalisée par microscopie confocale, on peut déterminer le centre de « gravité » de la zone où l'on observe une émission de fluorescence avec une précision de l'ordre de 40 nm et donc localiser la molécule avec cette précision. On peut par exemple tirer partie de cette propriété pour suivre la diffusion de la molécule même dans des milieux relativement hétérogènes. Avec un microscope de champ proche à ouverture, on peut localiser sa position avec une résolution d'un nanomètre [14]. L'utilisation d'un couple de molécules sondes, absorbant des énergies différentes, permet de suivre des mouvements moléculaires avec une résolution encore meilleure. En effet, une technique particulièrement sensible, nommée en anglais « Fluorescence Resonant Energy Transfer », consiste à suivre le transfert d'énergie entre deux molécules sondes que l'on a

greffées sur deux parties de l'objet (protéine par exemple) dont on désire étudier les changements de conformation [15]. Avec cette technique, la position relative des deux molécules peut être déterminée avec une résolution qui est typiquement d'une fraction de nanomètre. Elle permet de suivre des changements de conformation de l'objet d'amplitude inférieure à quelques nanomètres. De plus, une sonde moléculaire est bien plus qu'un capteur de position. Elle peut être fonctionnalisée pour réaliser un capteur nanométrique spécifique de certaines propriétés locales de l'échantillon qui seraient difficilement mesurables directement sur la réponse optique du milieu seul. Ainsi ont été développés des nanocapteurs sensibles au pH de l'échantillon, au potentiel d'oxydo-réduction, aux concentrations d'espèces ioniques notamment Ca^{2+} , à la présence de zones métalliques ou à l'existence de champs électriques [16,17,18].

Enfin, une possibilité intéressante offerte par la détection d'une sonde moléculaire unique est le suivi de la dynamique et des fluctuations du milieu sondé. En effet, la molécule n'est sensible qu'aux changements de son environnement local. Elle ne "moyenne pas à zéro" les fluctuations comme la plupart des méthodes macroscopiques qui collectent des signaux sur des domaines de l'échantillon dont les fluctuations et la dynamique sont indépendantes et qui n'observent donc que les valeurs moyennes (temporelles) des propriétés de l'échantillon. Cet aspect est important en biologie car il permet de suivre une seule enzyme parmi les millions présentes dans le milieu qui travaillent de manière asynchrone et donne une possibilité d'étudier le moteur moléculaire. Mais cette possibilité a aussi été exploitée dans de nombreux autres domaines. Citons par exemple, l'étude de la dynamique dans certains cristaux organiques [16], dans des polymères [8], les problèmes de diffusion dans les polymères [19], dans les films liquides minces et ultraminces [20,21].

Nous venons de décrire les possibilités qu'offre en principe un capteur réduit à une seule molécule. Pour mieux comprendre à la fois les limitations et les exigences d'une spectroscopie fondée sur ce principe, il nous faut maintenant décrire quels sont les diagnostics possibles sur une molécule unique, c'est à dire quels sont les signaux que nous pouvons pratiquement mesurer pour en extraire la réponse moléculaire. La principale difficulté de tout diagnostic optique sur une molécule unique est que sa faible réponse doit être séparée du faisceau optique sondant le milieu et des signaux parasites créés par les nombreuses autres molécules du milieu sondées simultanément. La grande majorité des expériences de molécules uniques reposent sur la détection de leur signal de fluorescence.

La fluorescence est un type de diffusion inélastique de la lumière. Précisément, c'est la capacité de ces molécules, après absorption d'un photon exciteur, de réémettre un photon de plus grande longueur d'onde. Pour cette introduction, je me restreindrai à ce cas de la détection par fluorescence, même si de très récentes expériences, fondées sur la détection de la diffusion Raman (autre type de diffusion inélastique ne mettant pas en jeu d'absorption), ouvrent des perspectives intéressantes. Je présenterai d'ailleurs quelques résultats obtenus en spectroscopie Raman [22,23,24] en fin de ce mémoire pour illustrer cette seconde possibilité.

Le signal de fluorescence est toutefois plus facile à détecter car on peut exploiter plusieurs propriétés remarquables d'un capteur moléculaire.

La première est l'existence de résonance dans l'absorption. Pour un choix judicieux de la molécule sonde et de la longueur d'onde du faisceau optique interrogeant le milieu, l'absorption de la sonde peut être résonante alors que le milieu est transparent. Typiquement, la molécule-sonde dopant le milieu peut présenter une section efficace d'absorption trois ordres de grandeur supérieure à celle des molécules du milieu à température ambiante. Toutefois, l'absorption seule ne permettrait pas d'extraire le signal de la molécule dopante. En effet, d'une part, le volume de l'échantillon sondé correspond à un nombre de molécules de la matrice (c'est une équivalence car la matrice n'a pas nécessairement une structure moléculaire) variant typiquement entre 10^{10} à 10^4 suivant que la technique utilisée est la microscopie confocale classique ou la microscopie de champ proche sans ouverture poussée à ses limites. D'autre part, le signal d'absorption serait noyé dans le bruit de photon du faisceau sonde, car l'absorption d'une molécule, dans le cas très favorable de la microscopie de champ proche sans ouverture, ne serait au mieux que de 0,1%.

La seconde propriété remarquable des molécules utilisées comme sondes locales, est qu'elles fluorescent de façon efficace. Le rendement quantique de fluorescence quantifie cette propriété. C'est le rapport du nombre de photons réémis sur le nombre de photons absorbés. Les marqueurs moléculaires sont généralement très efficaces et ont un rendement de fluorescence voisin de l'unité. La diffusion inélastique des molécules-sondes est typiquement 10^{12} à 10^{14} fois plus efficace que celle des molécules de la matrice, si les sondes sont excitées pour absorber à résonance. De plus, la lumière réémise n'étant pas à la même longueur d'onde que l'excitation, elle peut être séparée du faisceau exciteur par un jeu approprié de filtres spectraux.

La dernière propriété intéressante du signal de fluorescence est qu'il peut être relativement intense. En effet, bien que ce signal sature lorsqu'on augmente la puissance excitatrice, sa valeur à saturation varie typiquement entre quelques dizaines de milliers de photons par seconde et quelques millions de photons par seconde. Il s'agit là du signal total émis par la molécule dans toutes les directions de l'espace. L'efficacité totale de collection de ces photons est limitée par des facteurs géométriques de collection, par la transmission de l'optique et, en particulier, par celle des filtres permettant d'éliminer la lumière excitatrice, et par le rendement quantique des photodétecteurs.

L'ensemble de ces propriétés permet la détection du signal de fluorescence avec un bon rapport signal sur bruit pourvu que deux conditions soient remplies. La première est une collection aussi efficace que possible de la fluorescence avec un taux de collection minimum de l'ordre de 0,01 [25]. Cette valeur ne peut être atteinte que si la chaîne de détection est optimisée. Les facteurs géométriques imposent une optique de collection de grande ouverture numérique. On choisit généralement des objectifs de microscope dits à immersion. De même, les filtres doivent être judicieusement choisis (de type interférentiel) et les détecteurs de grande efficacité quantique sont généralement soit des photodiodes à avalanche en mode Geiger (SPCM Single Photon Counting Module) ou des capteurs CCD (Charge Coupled Device). Le second facteur nécessaire à l'obtention d'un bon rapport signal sur bruit est la réduction du volume sondé pour limiter le nombre de molécules de la matrice, qui vont produire de signaux parasites. Pour pouvoir étudier une large variété de matériaux, il est préférable de réduire ce volume à $1\mu\text{m}^3$ ou moins.

Une solution, qui est celle que nous avons adaptée à notre microscope, est un montage optique de type confocal [26]. La source lumineuse est focalisée en un point sur l'échantillon et le signal de fluorescence réémis n'est envoyé sur le détecteur qu'après un filtrage spatial, qui peut être réalisé par une fibre monomode. On atteint alors un volume sondé de l'ordre du μm^3 et un bon rapport signal sur bruit. L'emploi d'une technique de champ proche permet une réduction supplémentaire du volume sondé.

La détection du signal de fluorescence permet donc d'extraire la réponse d'une seule molécule-sonde dopant le milieu. L'étape suivante est d'extraire des informations à partir de ce signal de fluorescence. Le traitement dépend bien entendu des informations recherchées et je ne traiterai que quelques exemples que j'ai abordés au cours de ce travail de thèse.

Une première propriété est la localisation des molécules-sondes. Que ce soit en microscopie confocale classique ou en microscopie de champ proche optique, cette mesure est réalisée par imagerie à balayage à partir du signal de fluorescence total. Pratiquement, on balaye l'échantillon devant le faisceau excitateur (ou de façon équivalente la sonde devant l'échantillon) et à chaque position on compte, pendant un temps d'analyse fixe, le nombre de photons de fluorescence détectés. Comme dans toutes les microscopies à balayage, on peut reconstruire à partir de ces mesures une image qui permettra de localiser les molécules-sondes.

Une seconde propriété que l'on peut déterminer est l'orientation moléculaire. Une procédure similaire à la précédente peut être employée. Toutefois, il ne suffit plus de détecter le signal de fluorescence total mais il faut analyser les différentes composantes de polarisation qu'il contient (typiquement par insertion d'un cube séparateur de polarisation) et enregistrer l'ensemble de ces mesures pour chaque pixel [27,28].

Les mesures précédentes ne fournissent qu'un paramètre moléculaire. Beaucoup plus d'informations peuvent être extraites, si, au lieu de détecter le signal de fluorescence total, l'émission moléculaire est préalablement dispersée par un spectrographe, et que le signal est analysé par un détecteur multicanal tel qu'une caméra CCD de haute sensibilité. Enregistrer un spectre pour chaque point de l'échantillon ou au moins pour chaque point où une molécule est présente, permet de construire des images multidimensionnelles, dites hyperspectrales. Le nombre de points d'échantillonnage, pris dans la dimension fréquentielle du spectre, représente le nombre de dimensions supplémentaires de ce type d'image. L'information spectrale et la qualité de l'échantillonnage sont liés aux caractéristiques de l'analyseur spectral et au nombre de photoéléments dans la direction d'analyse spectrale, soit 512 éléments dans notre système. De telles images sont idéales par exemple pour caractériser l'environnement chimique d'une molécule (pH, potentiel d'oxydo-réduction par exemple).

L'extraction d'un si grand nombre d'informations d'un capteur mono-moléculaire se heurte cependant à deux limitations. La première est que le signal de fluorescence est réparti sur de nombreux canaux spectraux. Compte tenu de l'efficacité de détection typique de l'ordre de 0.01, le signal total de fluorescence produit quelques 10^2 à quelques 10^4 photons détectés par seconde. Si ces événements sont répartis sur 512 canaux, le signal par canal n'est plus que d'une fraction de photons à quelques dizaines de photons par seconde. Dans de telles conditions, atteindre un bon rapport signal sur bruit, avec les CCD actuels qui ont des bruits

de lecture de quelques électrons, nécessite un temps d'intégration d'une fraction de seconde à quelques secondes. La seconde limitation aux problèmes de détection est caractérisée par la tendance des molécules à se dégrader sous illumination laser. Selon les conditions expérimentales (puissance excitatrice, atmosphère, nature du milieu et de la sonde), la durée de vie des molécules varie typiquement de la seconde à quelques minutes. Seuls, des systèmes très particuliers permettent de travailler sous irradiation intense continue, pendant plusieurs minutes, à température et atmosphère ambiantes.

L'acquisition de spectres de fluorescence est donc une technique intéressante mais délicate. Elle requiert non seulement un système de collection optimisé, mais aussi une gestion automatique rigoureuse, pour synchroniser l'ensemble des éléments mis en œuvre dans cette analyse et n'irradier la molécule que dans les phases d'acquisition du signal. Un dernier aspect important de l'acquisition d'images spectres, est le volume de données qu'il faut gérer. Pour une image de 256×256 pixels et 512 canaux spectraux, les données numériques de chaque image hyperspectrale ont une taille d'environ 7 Mégaoctets. Une gestion intelligente, qui n'acquiert un spectre que pour les pixels où une molécule est présente, est préférable et permet de réduire d'un facteur dix ce volume, pour des balayages de l'ordre de 10 microns.

Un autre type d'analyse multiparamètres que l'on peut effectuer sur le signal de fluorescence est son analyse temporelle. A chaque pixel où une molécule est présente, au lieu d'intégrer le nombre de photons détectés, on acquiert, pour chacun d'eux, leur temps d'arrivée. Une telle analyse permet de remonter à la dynamique de l'environnement local. Pour permettre l'interprétation des signaux enregistrés, cette technique a les mêmes exigences que l'analyse spectrale : une grande efficacité de détection et une gestion temporelle rigoureuse de l'acquisition.

Remarquons que les analyses multiparamètres sont généralement réalisées après l'acquisition d'une première image de fluorescence totale, permettant de cartographier les émetteurs et d'effectuer un repérage de l'émetteur intéressant. Il est donc important, dans ce genre d'expérience, de pouvoir se repositionner précisément sur chaque molécule-sonde.

Dans ce chapitre, nous avons rappelé l'intérêt de sonder un milieu à l'aide de molécules fluorescentes individuelles, et nous avons précisé quelques exigences supplémentaires auxquelles notre microscope doit satisfaire pour permettre ce type de spectroscopie. Il nous

faut construire un microscope de type confocal pour assurer une collection efficace et un faible volume sondé. De plus, il est nécessaire de se repositionner précisément sur chaque émetteur. Il faut donc associer au scanner, un ensemble de capteurs de position permettant de compenser l'inévitable hystérésis des éléments assurant le déplacement. Nous avons vu qu'il existe de nombreux modes d'analyse du signal de fluorescence. Le microscope doit gérer aisément les différents fonctionnements correspondants. Pour terminer, nous avons montré qu'une gestion informatique rigoureuse est nécessaire, tant pour la synchronisation des différents éléments qui assure la prise en compte d'un signal difficile à obtenir, que pour le stockage et l'analyse des données qui peuvent être d'un volume conséquent.

IC- Eléments du microscope

Dans les chapitres précédents j'ai exprimé les enjeux qui motivent la mise en œuvre, dans un même dispositif expérimental, de deux techniques délicates, la microscopie de champ proche et la spectroscopie de molécules uniques. Les principes de ces deux techniques ont aussi été exposés, et maintenant, il est possible de composer la liste des éléments que j'ai retenus ou que j'ai développés et qui sont combinés pour construire un microscope de champ proche.

Comme je l'ai expliqué, la détection de molécules uniques requiert de sonder un faible volume et de disposer d'une collection efficace. Nous avons choisi un montage de type confocal pour assurer ces deux conditions avec, en bout de chaîne optique, deux types de détecteurs commerciaux. Le premier est un détecteur monocanal pour l'imagerie de fluorescence. C'est une photodiode à avalanche en mode Geiger, qui travaille en comptage de photon, c'est à dire, qui fournit une impulsion TTL unique par photon détecté (§ IIIA.2). Le second détecteur est un détecteur multicanal pour l'imagerie hyperspectrale. Il s'agit d'une caméra comportant un détecteur CCD de 512×512 pixels, refroidi à l'azote liquide et illuminé par l'arrière (§ IIIA.5). Comme il est nécessaire de synchroniser le fonctionnement de ces détecteurs avec le microscope de champ proche, j'ai opté pour un système d'acquisition par micro-ordinateur qui contrôle l'ensemble de ces appareils. Pour cela, il m'a fallu développer l'électronique d'interface entre ces détecteurs et l'ordinateur. En ce qui concerne le détecteur monocanal, j'ai construit l'ensemble de la chaîne de comptage que je présenterai au chapitre III. Pour le détecteur multicanal, l'interface et un logiciel dédié étaient livrés avec le matériel. Ma tâche a consisté, tout d'abord à maîtriser le fonctionnement et la gestion de la caméra, puis à réaliser son intégration dans le programme de gestion informatique, sans faire appel au logiciel commercial, mais en utilisant une bibliothèque de fonctions de bas niveau, que nous avons pu obtenir auprès du constructeur.

La réalisation du microscope de champ proche optique et son couplage au microscope confocal que je viens de décrire a nécessité de nombreux développements.

Les premiers concernent le balayage de l'échantillon. La technologie la plus appropriée pour réaliser les déplacements adaptés au champ proche optique est celle des actionneurs piézoélectriques. Au commencement de ces travaux, peu de scanners utilisant ce type d'actionneurs étaient proposés commercialement et aucun d'eux n'était approprié pour coupler le microscope de champ proche et le microscope confocal. Un tel couplage demande un

système de balayage qui, d'une part, soit ouvert et permette d'approcher à la fois l'objectif de microscope du « confocal » et la pointe du microscope de champ proche, et qui, d'autre part, soit suffisamment stable pour l'imagerie de champ proche. J'ai conçu deux scanners qui présentent ces qualités et que je décris, de manière détaillée, au paragraphe IIB.

Avant même de balayer l'échantillon devant la pointe, sur des distances micrométriques avec une résolution nanométrique pour enregistrer des images, il faut effectuer une opération critique qui est celle du prépositionnement relatif de la pointe, de l'objectif et de l'échantillon. Des considérations pratiques, telles que le chargement de nouveaux échantillons, impliquent de pouvoir dégager ces éléments de plusieurs millimètres de leur position de fonctionnement. Il faut alors les repositionner avec une résolution meilleure qu'un micron. Sur le principe des moteurs «stick-slip », j'ai conçu plusieurs translateurs de ce type ayant des courses de 5mm et une résolution submicronique.

Tous ces actionneurs (scanner piézoélectrique, moteurs stick-slip) ont une grande résolution mais présentent aussi une large hystérésis. Une mesure directe de la position des éléments est préférable à un simple contrôle des tensions de commande des actionneurs, pour évaluer les déplacements. A partir de photodiodes quatre quadrants et d'une électronique que j'ai développée (chapitre IIA4), la position (X,Y) de l'échantillon ou de la pointe peut être déterminée avec une précision de 40 nm dans un domaine de balayage de 200 μm . Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, une telle précision est absolument nécessaire pour les études de spectroscopie en molécules uniques afin de se repositionner sur les différentes molécules individuelles choisies, après avoir déterminé leur position dans une image globale.

Un autre point très spécifique de la microscopie de champ proche est le contrôle de la distance entre la sonde de champ proche et l'échantillon. Comme nous l'avons vu au chapitre IA, cette distance est typiquement de l'ordre de quelques nanomètres. Compte tenu de la rugosité et d'une éventuelle inclinaison de l'échantillon, cette distance ne peut être maintenue au cours d'un balayage (d'une fraction de micron et à quelques microns), que si un capteur la mesure en permanence pour qu'un système d'asservissement la maintienne constante. A l'époque du développement du microscope, cette information de distance nanométrique était généralement obtenue en mesurant, de manière optique, la friction entre l'échantillon et la pointe-sonde de champ proche, sur laquelle un petit mouvement oscillatoire, parallèle à la surface de l'échantillon, était appliqué.

Le problème d'une telle méthode réside dans l'apport d'un bruit important dans la mesure des faibles taux de fluorescence. J'ai donc mis au point une solution fondée sur un capteur

piézoélectrique (chapitre IIA3). Un autre type de capteur, du type STM, qui mesure le courant entre la pointe et le substrat a également été développé pour les situations où l'on dispose d'un substrat conducteur et d'une pointe conductrice (chapitre IIA3). Les signaux électriques de ces capteurs sont mis en forme et injectés dans une électronique commerciale de microscope à force atomique qui produit les hautes tensions nécessaires pour commander le mouvement Z du scanner piézoélectrique de façon à maintenir constante la distance pointe/échantillon.

Finalement, le dernier élément indispensable pour permettre à l'ensemble de ces éléments de travailler ensemble est le logiciel informatique, qui a représenté une large partie de mon travail. Ce logiciel a des rôles multiples.

Le premier est celui d'offrir une interface utilisateur correspondant à une configuration du matériel donnée. Il s'agit de pouvoir saisir facilement l'ensemble des paramètres nécessaires à l'acquisition d'une image numérique et à la configuration des matériels mis en œuvre. Les paramètres sont nombreux et regroupés par fonctions (paramètres de balayage, mode d'acquisition mono/multicanal, paramètres caméra, commutateur optique, ...). La gestion des paramètres de balayage comprend par exemple le nombre de pixels de l'image, la vitesse de balayage, la sélection de la zone de balayage. Dans un microscope à balayage, il est commode de choisir la zone de balayage non pas de manière absolue par rapport à l'origine des déplacements du scanner, mais de manière visuelle par rapport à une image précédente. Ce type graphique de paramétrage, m'a conduit à développer une interface utilisateur graphique. Pour configurer le système à partir des paramètres saisis, le logiciel doit être associé à des interfaces électroniques qui permettent de commander l'ensemble du dispositif pour obtenir divers modes de fonctionnement.

Le second rôle du logiciel est de gérer l'acquisition et en particulier la synchronisation des différents éléments. La microscopie de champ proche (ou confocale) est une microscopie à balayage où l'on analyse l'échantillon point par point. Le logiciel doit donc contrôler les déplacements du scanner, puis après chaque déplacement, il effectue l'acquisition et la gestion en mémoire de l'ensemble des signaux nécessaires à l'expérience (topographie, taux de fluorescence, acquisitions de spectres, ...). Finalement, le logiciel doit traiter, parfois en temps réel, les données pour construire les images que pourra exploiter l'utilisateur et sauvegarder l'ensemble des informations utiles, paramètres et mesures, dans une base de données organisée.

Pour donner une vue d'ensemble de notre dispositif et de son fonctionnement, j'ai placé sur la figure IC.1 les différents éléments du microscope ainsi que les voies de commande et d'acquisition que j'ai du développer. J'ai regroupé dans chacun des modules M1 à M5, les

II - Capteurs et actionneurs.

Il existe deux activités clés où les capteurs et/ou les actionneurs sont critiques dans le fonctionnement d'un microscope de champ proche à balayage dédié à l'étude de nanoobjets uniques.

La première est celle de la détection des faibles flux lumineux de l'ordre de 100 photons par seconde voire moins. En effet, en microscopie optique à balayage, la qualité de la mesure du signal optique de fluorescence transportant les informations utiles à l'analyse de l'échantillon est essentielle. Pour détecter l'énergie du signal optique collecté on utilise des capteurs photoélectriques. Selon le domaine spectral du rayonnement mesuré ce sont des photoconducteurs de la famille des semi-conducteurs de type photodiode ou des éléments photoémissoirs de type photomultiplicateur. Pour réaliser l'analyse spectrale du signal on utilise des multidétecteurs, qui sont des semi-conducteurs de type photocapacitif à transfert de charges (détecteur CCD). Leurs spécificités sont décrites aux chapitres IIIA.2 et IIIA.5.

La seconde activité est celle des déplacements qui s'étendent du domaine nanométrique au domaine millimétrique. Les déplacements des éléments des microscopes sont réalisés par des translations linéaires exécutées par des composants que l'on appelle « actionneurs ». Si pour les actions peu répétitives de prépositionnement, dont les déplacements sont supérieurs à la centaine de microns, un contrôle simple, par vis micrométrique graduée, peut convenir, pour les déplacements répétitifs, comme le balayage, et les déplacements de faible dimension, le contrôle sera assuré de manière automatique grâce à l'emploi de capteurs adaptés à la valeur des déplacements. Les principaux éléments mobiles du microscope, dont les déplacements doivent être contrôlés à l'aide de capteurs, sont le scanner et la nanosonde.

Dans le cas du scanner porte échantillon, le but principal est de contrôler ses déplacements X et Y (plan horizontal) pour positionner et repositionner le plus fidèlement possible un nanoobjet dans la tache laser excitatrice. Dans les expériences de microscopie de champ lointain, cette tache a des dimensions de l'ordre de quelques centaines de nanomètres et un repositionnement à l'échelle d'une centaine de nanomètres est suffisant.

En microscopie optique de champ proche, la tache d'éclairement est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres et le repositionnement de la sonde est beaucoup plus critique. Il doit être contrôlé à l'échelle de la dizaine de nanomètres. En contrepartie, les déplacements ne s'effectuent que sur des distances limitées, de l'ordre de quelques microns

ou, exceptionnellement de quelques centaines de microns pour explorer des zones nouvelles de l'échantillon.

Le contrôle des déplacements de la nanosonde suivant l'axe Z (vertical) est un problème spécifique aux microscopes de champ proche. La sonde doit être approchée à quelques nanomètres de la surface de l'échantillon de façon contrôlée. La surveillance de cette distance doit être permanente pour éviter toute altération de la sonde ou de l'échantillon.

Les qualités des actionneurs et des capteurs, sensibilité, résolution et fidélité, dépendent de façon critique de leur conception mais aussi du milieu dans lequel ils opèrent. Les paramètres extérieurs, comme la température, les vibrations et la charge qu'ils entraînent, modifient leur réponse. Ces paramètres varient d'une expérience à l'autre, et le seul moyen de s'affranchir de ces fluctuations consiste à les étalonner *in situ*.

Après un rappel de quelques notions générales sur les capteurs, nous discuterons, dans les différents chapitres de la partie IIA de ce mémoire, du choix et de l'intégration des différents capteurs utilisés dans la chaîne de mesure numérique que j'ai réalisée. Respectivement pour les actions de déplacement, la partie IIB présente les actionneurs et en particulier ceux que j'ai développés comme les scanners, décrits aux chapitres IIB.3 et IIB.4, et le translateur millimétrique de grande résolution, au chapitre IIB.5. Quand cela a été possible, j'ai opté pour des capteurs et des actionneurs commerciaux. En particulier les capteurs de grande sensibilité utilisés pour mesurer les signaux optiques de fluorescence tels une photodiode à avalanche, décrite au chapitre IIIA.2, et un détecteur CCD présenté au chapitre IIIA.5. Cependant, il a généralement fallu entrer dans le détail de leur fonctionnement afin de développer des interfaces spécifiques, décrites dans les chapitres de la partie IIIA, qui permettent une gestion programmable informatisée.

Dans le domaine des déplacements nanométriques, toutefois, j'ai été amené à développer des capteurs de position spécifiques, en particulier pour évaluer la distance sonde-échantillon ainsi que pour d'autres actions de déplacements. J'exposerai, au chapitre IIA.4.1, comment il est possible de réaliser un capteur dont la résolution est de quelques dizaines de nanomètres à température ambiante, à partir d'un capteur optique commercial. Cette résolution n'est cependant pas suffisante pour détecter directement les très faibles déplacements verticaux entre la nanosonde et la surface de l'échantillon (≤ 10 nm). Pour mesurer ces distances, je montrerai, au chapitre IIA.3.2, qu'il est possible d'exploiter les forces de friction qui interagissent entre la sonde et le nanoobjet pour réaliser un capteur de déplacement du

domaine nanométrique. De telles forces de friction existent quelle que soit la nature, métallique ou diélectrique, de la sonde et de l'échantillon, à l'air ou en environnement cryogénique. Dans le domaine des forces de friction, il n'existait pas de détecteurs commerciaux au début de ce travail. Depuis, quelques-uns sont apparus, ainsi que quelques autres prototypes, fondés sur des méthodes entièrement électriques. Je montrerai enfin, au chapitre IIA.3.1, que si l'échantillon et la pointe sont conducteurs, le capteur peut également exploiter les propriétés de conduction par effet tunnel.

IIA.1 - Capteurs, notions générales

Je reprendrai dans ce paragraphe les terminologies couramment employées dans le domaine des capteurs. La grandeur physique que l'on veut mesurer (Déplacement, Force, Radiation lumineuse, Température, etc...) est appelée « mesurande » ou excitation et notée m . Les mesures que nous devons effectuer utilisent des moyens électroniques de traitement du signal, donc il est nécessaire de produire une grandeur électrique qui représente le plus exactement possible la grandeur physique à mesurer. Le capteur est le dispositif qui, soumis à l'action du mesurande, présente une caractéristique s de nature électrique (tension, charge, courant ou impédance) définie par la relation :

$$s = F(m) \quad (\text{IIA1.1})$$

s est la réponse du capteur. La valeur numérique de s doit permettre de connaître la valeur de m . La fonction F dépend des lois physiques qui déterminent le fonctionnement du capteur, de ses matériaux et de la géométrie de ses constituants.

Pour tout capteur, l'expression $s = F(m)$ est quantifiée numériquement par l'étalonnage, qui consiste à mesurer les valeurs de s correspondantes à des valeurs m connues.

On peut distinguer deux classes de capteurs, les capteurs actifs et les capteurs passifs. Lorsqu'ils subissent l'action d'une grandeur physique m , ils convertissent cette action, directement pour les capteurs actifs et indirectement pour les capteurs passifs, en énergie électrique. Dans nos applications, je m'intéresserai aux capteurs actifs fondés sur les deux propriétés physiques suivantes.

L'effet piézoélectrique, découvert par Pierre et Jacques Curie dès 1880, résulte de l'action d'une force mécanique, traction, compression ou flexion, provoquant la déformation de certains matériaux tels le quartz et de certaines céramiques spécifiques comme celles de la

famille des PZT (basés sur des oxydes mixtes de Plomb, Zirconium et Titane). En plaçant une paire d'armatures métalliques sur les faces opposées du matériau, la différence de polarisation créée par cette déformation fait apparaître une différence de potentiel proportionnelle à la force exercée sur le matériau. Sa polarité correspond à la direction de la force exercée. Les mesures de forces, d'accélération, de pression ou de friction peuvent être réalisées avec ce type de capteur. Nous verrons, au chapitre IIA.3.2, plusieurs utilisations des PZT pour réaliser un capteur de précision nanométrique fondé sur l'exploitation des forces de friction entre sonde et nanoobjet, ainsi que la description d'un capteur de ce type que j'ai spécifiquement développé.

De manière réversible, l'application d'une différence de potentiel sur les faces du matériau crée une contrainte interne qui tend à modifier sa géométrie. La céramique est alors capable de développer une force proportionnelle au champ électrique pour atteindre une nouvelle géométrie d'équilibre qui dépend de la valeur du champ appliqué et des contraintes mécaniques externes dans la nouvelle position d'équilibre. Ce phénomène est à la base des actionneurs piézoélectriques que j'ai développés pour effectuer les déplacements des différents éléments mobiles du microscope, comme par exemple les deux scanners de balayage décrits aux chapitres IIB.3 et IIB.4 de ce mémoire.

Les céramiques ferroélectriques (PZT), dans leur état d'origine, sont constituées de grains dont la polarité est orientée aléatoirement. Pour augmenter l'efficacité du phénomène piézoélectrique, une orientation privilégiée de la polarisation des grains est obtenue sous l'effet d'un champ électrostatique élevé (de l'ordre de quelques kV/mm). Cette opération est effectuée à une température supérieure à la température de Curie du matériau, suivie d'un refroidissement lent. Ce processus confère aux matériaux ferroélectriques un pouvoir actif très supérieur à celui des autres matériaux piézoélectriques tel que le quartz dont les domaines ne peuvent être réorientés. Cependant ces matériaux présentent des inconvénients liés, pour la plus part, à la réorientation aléatoire de ces domaines pré-orientés. Leur comportement est fortement dépendant de la température. Au-delà de la température de Curie (entre 190 °C et 350 °C pour les PZT), la céramique se dépolarise et perd ses propriétés piézoélectriques. De même, l'efficacité d'action des PZT, aux très basses températures, est réduite d'un facteur voisin de 7. De plus, ces matériaux présentent un phénomène d'hystérésis plus ou moins marqué selon que l'élément piézoélectrique est utilisé plus ou moins près de ses limites d'élasticité, et que l'écart entre l'amplitude de l'action précédente et celle de la nouvelle action, est grand. En effet, la relation entre le champ électrique E et la polarisation P , qui

détermine la densité de charges, $D = \epsilon_0 E + P$, n'est pas linéaire. Elle dépend des valeurs précédentes de E et P .

La photoélectricité est caractérisée par l'émission de charges qui existent au sein d'un matériau soumis à l'action d'un rayonnement lumineux ou d'un champ électromagnétique. La collection de ces charges produit un courant qui est fonction des propriétés du matériau, de la longueur d'onde et de l'intensité du rayonnement. Ce phénomène concerne l'ensemble des capteurs de signaux optiques utilisés dans notre appareil de microscopie. Il est particulièrement utilisé dans les applications de mesure des déplacements submicroniques jusqu'au domaine millimétrique des différents éléments mobiles de notre microscope. Au chapitre IIA.4, j'ai décrit le développement d'un capteur linéaire de déplacement réalisé à partir d'un détecteur optique.

Pour faciliter l'exploitation d'un capteur il est souhaitable qu'une relation linéaire existe entre les variations Δm du mesurande agissant sur le capteur et les variations Δs des grandeurs présentes à l'entrée de la chaîne de mesure, $\Delta s = S \cdot \Delta m$. S est la sensibilité du capteur. Elle représente un critère déterminant dans le choix d'un capteur car la sensibilité permet d'estimer la plage dans laquelle le capteur fournira un signal adapté à la chaîne de mesure.

Ces exigences peuvent être obtenues grâce à l'utilisation d'un circuit électronique spécifique traitant le signal du capteur. Un tel circuit est qualifié de « conditionneur ». Il adapte la réponse du capteur à la chaîne de mesure numérique. Nous verrons, au chapitre IIA.4.1, la description du conditionneur que j'ai développé pour obtenir un signal de mesure proportionnel à un déplacement linéaire, à l'aide d'un capteur optique 4 quadrants.

IIA.2 - Capteurs optiques de déplacements

Parmi les deux catégories de capteurs industriels qui présentent les caractéristiques de précision compatibles avec nos exigences, les capteurs capacitifs et les capteurs optiques, j'ai choisi ces derniers pour leur encombrement plus faible et leur domaine de mesure beaucoup plus étendu.

Tout d'abord, je me suis intéressé à des photodiodes PSD, (Position Sensing Detector) ou photodiodes à effet latéral, éclairées par un faisceau laser ponctuel, émis directement ou transmis par fibre optique. Ces photodiodes permettent de déterminer, avec une précision moyenne de 100 nanomètres, la position du centre de l'impact du faisceau laser sur leur

surface pour des déplacements dont le domaine dépend de la longueur du détecteur et la mesure utile comprise entre 300 nanomètres et 30 millimètres.

Dans la mesure d'un déplacement, deux montages sont possibles puisque la mesure s'opère à partir du déplacement relatif du capteur et de l'impact de la source laser. Le capteur peut être solidaire de l'élément mobile et la source fixe ou vice-versa. L'utilisation d'une fibre optique monomode comme source ponctuelle du faisceau laser incident présente deux avantages importants. Le premier permet aux montages fibre-capteur d'effectuer une mesure directe du déplacement et d'être compacts sans système optique additionnel au voisinage de la zone de déplacement. Le second, assuré par une extrémité parfaitement polie de la fibre monomode, permet d'obtenir une tache lumineuse, dont la répartition spatiale d'intensité est parfaitement définie et indépendante des fluctuations spatiales de la source laser injectée.

Les faibles contraintes mécaniques, apportées par les forces de flexion sur la fibre optique ou sur les fils de connexion du capteur, sont sans influence sur la qualité des déplacements, si les éléments qui les supportent ont une masse relative plus importante et si les actionneurs sont correctement dimensionnés. On peut dire de ces capteurs qu'ils sont de « proximité ». Au contraire, cette méthode n'est pas directement applicable aux éléments de faible masse ou dimension comme la nano-sonde d'un microscope de champ proche ou d'un microscope à force atomique (AFM). Dans ce dernier cas, source et détecteur PSD sont fixes et le faisceau est transmis par réflexion triangulaire sur une partie réfléchissante de l'élément mobile à contrôler, la nano-sonde. La déflexion du faisceau, proportionnelle au déplacement de la nano-sonde, est mesurée par la translation de son impact sur le capteur optique. C'est un mode de mesure couramment utilisé en microscopie à force atomique pour asservir la position de la sonde. La figure IIA.2.1 montre deux exemples de tels capteurs.

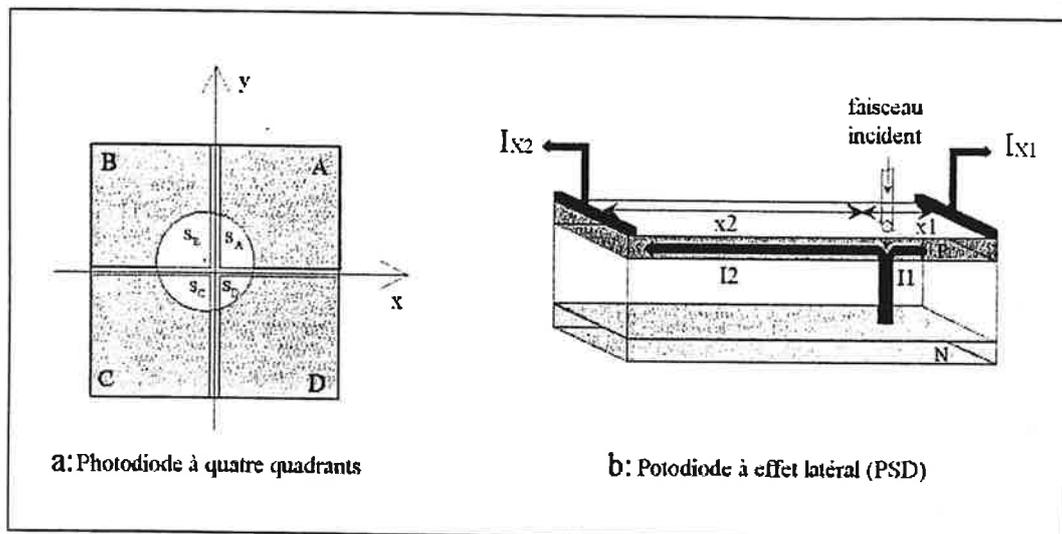


Figure IIA.2.1 : Capteurs optiques de positions, interaction du flux lumineux ;

a : courant de chaque photodiode proportionnel au flux reçu et à la surface éclairée de chaque quadrant S_A , S_B , S_C et S_D .

b : division des courants proportionnelle aux distances x_1, x_2 entre le centre du spot et les bords du capteur.

Les détecteurs PSD existent commercialement. Généralement destinés à fonctionner à température ambiante, ils sont de deux types, uni et bi-dimensionnels. Ils sont constitués d'une surface photosensible sans séparation, de forme rectangulaire pour les uni-dimensionnels et carrée pour les bi-dimensionnels. Le courant photoélectrique, créé au point d'impact du faisceau lumineux incident et du plan photosensible, circule de ce point vers chacune des électrodes situées, pour chaque axe de déplacement, aux bords opposés du plan comme il est montré sur la figure IIA.2.1 b. Ce courant peut s'interpréter comme un courant de polarisation I divisé en deux parties I_1 et I_2 . Les valeurs de I_1 et I_2 sont proportionnelles à la distance séparant le centre du faisceau incident des bords. Une méthode quotientmétrique de mesure des courants I permet de déterminer avec précision une valeur de position en s'affranchissant des fluctuations du flux lumineux ϕ . Pour un détecteur bi-dimensionnel les coordonnées X_0 , Y_0 , du centre du spot lumineux sont données par les relations,

$$k \cdot X_0 = \frac{I_{x2} - I_{x1}}{I_{x1} + I_{x2}} \quad k \cdot Y_0 = \frac{I_{y2} - I_{y1}}{I_{y1} + I_{y2}} \quad (\text{IIA.2.1})$$

où k est une constante déterminée par les caractéristiques du système de mesure.

Mais c'est la capacité de fonctionnement à température cryogénique des photodiodes à « quatre quadrants », modèles de conception moins récente, qui a guidé mon

choix. En effet, les microscopes que nous utilisons sont développés dans le but de réaliser des études spectroscopiques de fluorescence de molécules individuelles. Or la résolution spectrale attendue est nettement supérieure à très basse température en raison de l'augmentation de la section efficace d'absorption des molécules. Les mesures en environnement cryogénique représentent donc un atout important.

De structure différente, ce capteur a sa surface sensible divisée par deux barrières orthogonales de faible largeur (30 microns) qui se croisent au centre et qui déterminent quatre zones indépendantes de surface identique A, B, C et D constituant quatre photodiodes (quatre quadrants). On peut observer sur la figure IIA.2.1. a, un éclairage uniforme de puissance donnée, représenté par le spot circulaire totalement réparti sur les zones A, B, C et D , qui détermine sur chaque photodiode les surfaces d'intersection S_A, S_B, S_C, S_D . Dans ce cas, le courant I_i délivré par chacune des photodiodes est proportionnel à sa surface éclairée. On obtient pour le quadrant i où $i = A, B, C$ ou D :

$$I_i = s_d \cdot \phi_0 \cdot \frac{S_i}{S_0} \quad (\text{IIA.2.2})$$

s_d est la sensibilité des photodiodes en A/W, ϕ_0 la puissance du faisceau incident, S_i la surface éclairée sur le quadrant de la photodiode i , et S_0 la surface totale du spot lumineux, $S_0 = S_A + S_B + S_C + S_D$.

Deux limitations à la précision de mesure sont dues aux défauts de la source laser. La première est représentée par les fluctuations spatiales de position du faisceau d'éclairage. La seconde est l'hétérogénéité de la distribution de l'intensité dans la tache lumineuse. L'utilisation d'une fibre optique monomode, qui a un cœur de 9 microns dans lequel on injecte ce faisceau, effectue un filtrage spatial efficace et permet de contourner ces limitations. En réalité, le profil d'intensité du faisceau n'est pas homogène en sortie de fibre monomode, mais il présente une distribution spatiale gaussienne. Dans ce cas l'expression générale du courant pour le quadrant i est :

$$I_i = \iint dx dy I_{l(x,y)} \quad (\text{IIA.2.3})$$

où $I_{l(x,y)}$ est l'intensité du flux lumineux au point de coordonnées (x,y) .

Je discuterai en détail, au cours de la description de la procédure d'étalonnage, chapitre IIA.4.2, l'influence d'un tel profil sur la réponse du détecteur quatre quadrants.

Pour la géométrie représentée figure IIA.2.1 a, la position P du centre du spot, de coordonnées P_x, P_y , est donnée, en fonction des courants I de chaque zone, par la relation,

$$k \cdot P_x = \frac{(I_A + I_D) - (I_B + I_C)}{I_A + I_B + I_C + I_D} \quad k \cdot P_y = \frac{(I_A + I_B) - (I_C + I_D)}{I_A + I_B + I_C + I_D} \quad (\text{IIA.2.4})$$

où k est une constante déterminée par les caractéristiques du système de mesure.

J'ai déterminé les caractéristiques du PSD uni-dimensionnel (Hamamatsu S3979) [29] que j'ai utilisé. Le courant de bruit est de l'ordre de $1,5 \text{ pA}/\sqrt{\text{Hz}}$ et la sensibilité moyenne est égale à $0,4 \text{ A/W}$. La position du spot lumineux est repérable continûment entre 10% et 90% de sa zone photosensible de dimension $L = 3$ millimètres. La réponse du PSD apporte une erreur de linéarité, sur la mesure du déplacement, qui n'excède pas 0,05 % de la longueur de la zone photosensible. J'ai vérifié que la résolution ultime obtenue à partir de l'électronique commerciale est de l'ordre de 100 nm. Cependant cela reste insuffisant pour repositionner précisément un objet dans la tache de 50 nm de la zone de champ proche.

Pour le détecteur quatre quadrants (Hamamatsu S5980) [30] une limitation inférieure est imposée à la taille du spot par la bande inactive de $30 \text{ }\mu\text{m}$ séparant chacune des quatre photodiodes. Les relations (IIA.2.2) et suivantes, impliquent que la position de l'impact du faisceau incident n'est correctement définie que si le faisceau interagit simultanément avec les quatre photodiodes du plan. Ce détecteur est conçu pour repérer la position du spot lorsqu'il se trouve dans la zone centrale. Pour réaliser efficacement la mesure des déplacements linéaires avec une grande résolution, il n'est utilisable que sur des faibles domaines de déplacement, inférieurs à la taille du spot éclairant sa surface, soit 200 microns.

Sa sensibilité plus importante ($0,72 \text{ A/W}$) que celle des PSD, associée à l'électronique faible bruit que j'ai développée (voir chapitre IIA.4.2) permet d'obtenir une meilleure résolution que dans le cas du PSD unidimensionnel. Dans ces conditions, j'ai vérifié qu'à la température ambiante, il peut être employé pour repérer les positions avec une résolution de l'ordre de 30 nm. De plus ce détecteur peut fonctionner dans le domaine des basses températures et dans l'environnement du vide atmosphérique. Ce détecteur est bien adapté aux exigences de positionnement de la microscopie de champ proche. Dans le chapitre IIA.4.1, je détaillerai le développement d'un capteur optique de position que j'ai réalisé à partir d'une telle photodiode. Les deux techniques décrites dans ce chapitre, l'utilisation d'une fibre optique monomode qui permet de s'affranchir des fluctuations spatiales de la source, et la méthode de mesure quotientométrique qui réduit les fluctuations d'intensité de cette source, apportent les qualités essentielles de fidélité et de précision nécessaires à nos mesures.

IIA.3 - Contrôle de distances nanométriques : application à la microscopie de champ proche.

Les distances relatives mises en jeu dans les microscopes de champ proche correspondent à trois domaines.

Celles, associées aux déplacements compris entre quelques millimètres et quelques microns représentent les parcours de prépositionnement permettant d'approcher les éléments dans la zone de fonctionnement, ne nécessitent pas de contrôle précis.

Les distances submicroniques jusqu'à 100 nm, permettant l'optimisation de la mise au point optique de l'objectif dans le plan focal de l'échantillon, impliquent un contrôle fini.

Et les distances verticales nanométriques, typiques des portées des interactions en champ proche entre la sonde et l'échantillon, requièrent un contrôle critique qui nécessite l'emploi de méthodes de mesure originales et les développements de moyens spécifiques. La précision de ce contrôle conditionne, en partie, la résolution du microscope, où le signal d'asservissement de position de la sonde traduit la topographie de l'échantillon.

Après une présentation des deux premiers domaines concernant les déplacements mesurables à l'aide de capteurs conventionnels, j'exposerai la problématique de mesure des distances nanométriques spécifiques aux très faibles variations de la position relative entre la sonde et la structure observée de l'échantillon. Ensuite, je décrirai deux détecteurs (§ IIA.3.1 et § IIA.3.2) que j'ai réalisés pour satisfaire à la mesure de ces faibles distances, adaptés à l'utilisation de couples sonde-échantillon conducteurs ou non.

L'objectif est l'élément mobile le plus massif. De plusieurs dizaines de grammes, c'est un objectif à immersion de microscope optique classique, interchangeable, de grande ouverture numérique et n'ayant qu'un minimum d'aberrations, pour collecter le signal de fluorescence émis par les molécules excitées dans le volume focal. Cet objectif est placé sur un support solidaire du bâti du microscope et nous pouvons considérer que la position de fonctionnement de l'ensemble objectif plus support est déterminée par construction pour être située dans la fourchette de mise au point. Néanmoins la présence de jeux mécaniques nécessaires au montage de l'objectif et la variation des caractéristiques optiques liées au changement des différents objectifs peuvent représenter des variations de position d'une configuration à l'autre pouvant s'étendre de quelques dizaines de microns à quelques millimètres. Suivant la configuration du microscope, la compensation de ces distances sera faite soit par une crémaillère mécanique de précision dont le fonctionnement manuel,

mécaniquement très démultiplié, apporte une sensibilité permettant d'obtenir une précision de l'ordre de $1\mu\text{m}$, soit par un actionneur piézoélectrique de grande efficacité (de type stick-slip, décrit dans le chapitre IIB exposant les actionneurs).

Dans un microscope confocal, la résolution dépend de la longueur d'onde λ et de l'ouverture numérique ON de l'objectif. La résolution utile, dans un déplacement nécessaire à la mise au point, est déterminée par la résolution axiale ou profondeur du champ p donnée par la relation suivante.

$$p = \frac{\lambda}{ON^2} \quad (\text{IIA.3.1})$$

Sheppard et Wilson [26] ont mesuré à partir d'une source laser HeNe ($\lambda = 632\text{ nm}$), une profondeur de champ¹ $p = 500\text{ nm}$ pour un objectif à immersion d'ON = 1,2 et Hell et al. [31], une profondeur de champ $p = 350\text{ nm}$ pour un objectif à immersion d'ON = 1,4.

Sur un de nos montages, la collection est assurée par une lentille asphérique présentant une ouverture numérique ON = 0,65. Nous avons effectué l'analyse de profondeur de champ en mesurant l'efficacité de collection du faisceau de la source lumineuse réfléchiée par l'échantillon et focalisée par la lentille sur le cœur de 9 microns de diamètre d'une fibre monomode. La profondeur de champ est déterminée en faisant varier, autour du plan focal, la distance relative séparant l'échantillon de la lentille asphérique. Ces résultats, illustrés par la courbe de la figure IIA.3.1, montrent que pour une intensité réduite de 50% la plage totale de variation de distance focale mesure 3,7 microns soit $p = 1,85\text{ microns}$. Suivant nos montages p varie entre 2 microns et 400 nanomètres.

Les déplacements de l'objectif effectués avec le réglage manuel de la crémaillère ne peuvent pas atteindre la résolution nécessaire. La mise au point finale de la focalisation est obtenue par un déplacement vertical fin de l'échantillon. Ce déplacement est réalisé par des actionneurs piézoélectriques qui font partie intégrante des scanners porte échantillon que j'ai développés et qui sont décrits aux chapitres IIB.3 et IIB.4. La finesse et la fiabilité de ses déplacements verticaux permettent de positionner l'échantillon dans le plan focal de l'objectif, avec une résolution $R \leq 40\text{ nm}$ ce qui représente un ordre de grandeur plus faible que la profondeur de champ la plus faible.

¹ La profondeur de champ totale est égale à $2p$.

La position relative de l'objectif et de l'échantillon est donc critique pour la mise au point optique. Le montage optique des microscopes associé à un ensemble caméra et moniteur vidéo permet à l'expérimentateur un premier contrôle visuel de la mise au point et d'interagir sur la commande verticale du scanner en observant sur le moniteur les variations géométriques de la tache de la source de lumière réfléchiée par l'échantillon. Un contrôle plus élaboré utilise la mesure analogique des variations de l'intensité de la lumière réfléchiée sur l'échantillon en fonction de la distance focale. La mesure numérique de la position verticale relative de l'objectif et de l'échantillon peut s'avérer nécessaire pour automatiser la mise au point. L'étendue des déplacements permise par l'ensemble des deux actionneurs, celui de l'objectif et celui de l'échantillon est de quelques millimètres. La plage de mesure utile est déterminée par le domaine de réglage fin accessible au scanner soit, quelques dizaines de microns. Pour effectuer les mesures dans ce domaine de déplacement, le capteur optique de position que j'ai développé et précédemment décrit au chapitre IIA.4.1 est parfaitement adapté.

Le dernier élément mobile est la sonde ou pointe du microscope de champ proche, dont l'extrémité est de taille nanométrique. Nous avons déjà exposé le principe et les conditions essentielles au fonctionnement du microscope en mode de champ proche telles que le positionnement et le maintien de la sonde à une distance h de l'échantillon telle que $h \ll \frac{\lambda}{2\pi}$, soit typiquement à quelques nanomètres du relief des structures disposées sur l'échantillon.

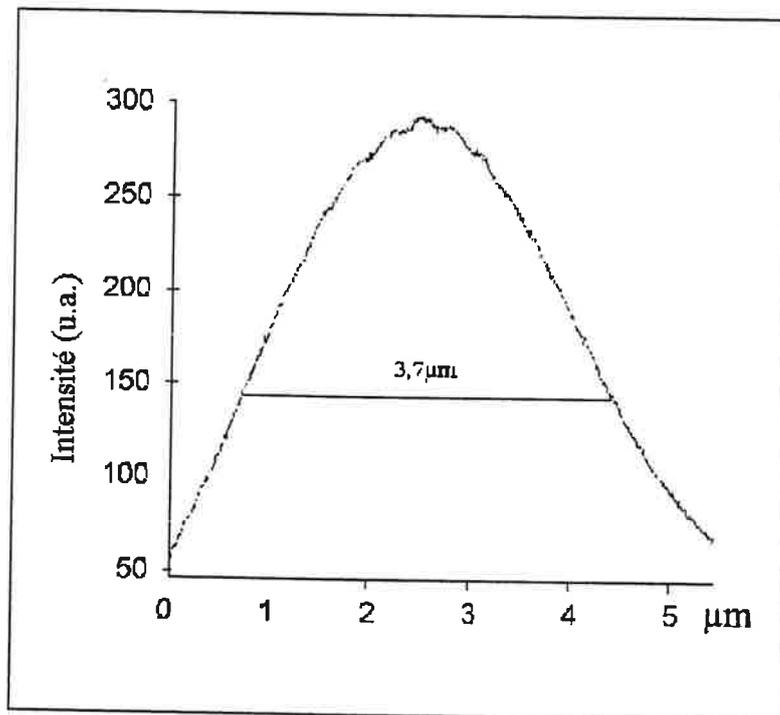


Figure IIA.3.1 : Mesure du signal réfléchi collecté en fonction de la position axiale de l'échantillon pour une longueur d'onde de 0.632 nm, et un objectif d'ouverture numérique $ON = 0.65$. La profondeur de champ totale à mi hauteur est 3.7 μm.

Pour mesurer ce domaine de distance j'ai mis en œuvre deux méthodes distinctes. Pour les couples sonde-échantillon conducteurs, j'ai utilisé une méthode très sensible couramment employée en microscopie électronique à effet tunnel (STM) [32]. La valeur du courant tunnel mesuré est proportionnelle à la différence de potentiel V appliquée entre la pointe et l'échantillon et elle diminue exponentiellement avec l'accroissement de la distance qui les sépare. A tension V constante, les variations du courant tunnel sont reliées à la distance relative pointe-échantillon. Par cette méthode, le domaine de distance utile peut s'étendre jusqu'au nanomètre.

Pour les couples non-conducteurs, E.Betzig dès 1992 a initié une technique fondée sur la variation de l'intensité des forces de friction (shear force) [33] qui apparaissent entre les objets de l'échantillon et l'extrémité de la pointe lorsqu'on lui imprime un mouvement vibratoire de direction parallèle au plan de l'échantillon. Ces forces varient en fonction de la distance d'interaction et ont une portée typique de la dizaine de nanomètres.

La mesure du courant tunnel ou de la force de friction est utilisée pour asservir avec précision la position de la sonde par rapport à l'échantillon. De plus, lorsqu'on balaie l'échantillon, latéralement en X, Y à l'aide du scanner, le système d'asservissement varie la position Z de l'échantillon pour maintenir la distance d'interaction constante. Les variations $Z(X, Y)$ représentent alors le relief de l'échantillon et permettent de construire des images dites « topographiques ».

IIA.3.1 - Capteur de déplacements nanométriques, de type STM, application à l'analyse du phénomène d'exaltation sous pointe de la fluorescence.

Ce type de capteur a été développé pour contrôler l'approche et maintenir la distance de travail des sondes métalliques mise en œuvre sur nos microscopes. Elles sont de deux types, en argent ou en tungstène, et sont réalisées au laboratoire grâce à un procédé contrôlé qui utilise en pratique des méthodes de gravure électrochimique. Ce procédé peut être complété par une érosion finale par bombardement ionique. Pour les pointes en tungstène, à partir d'un fil métallique de 125 μm de diamètre, nous obtenons un apex voisin ou inférieur à 30 nm. L'utilisation de films moléculaires, déposés sur des lamelles transparentes et conductrices soit d'ITO soit de verre recouvertes d'un film mince d'or, autorise le contrôle de la distance relative pointe échantillon par effet tunnel. La mesure du courant tunnel, largement utilisée en STM, a été développée et mise en œuvre par de nombreux groupes de microscopistes. Un montage original par sa simplicité et son efficacité a été réalisé par A.Dhirani en 1996 [34] pour obtenir des images présentant une résolution de distance verticale de 1 Å avec des courants tunnel de l'ordre de 10^{-12} A. Comme le montre la figure IIA.3.1.1, le montage électronique extrêmement dépouillé utilise un circuit OPA128 LM (Burr-Brown) au cœur d'un montage trans-impédance ayant une résistance de charge très élevée d'un gigaohm pour permettre la mesure des faibles courants recueillis.

Cette application a inspiré le montage que j'ai mis au point. Il est utilisé pour mesurer des distances nanométriques typiques du domaine de la MOCP.

L'information de distance sonde-échantillon est contenue dans la mesure du courant tunnel. Elle est utilisée, en premier lieu, pour asservir en position constante la hauteur de la sonde au-dessus de l'échantillon. Elle permet également d'analyser le phénomène d'exaltation de la fluorescence sous la pointe. Dans ce but, on imprime à la pointe, très près de l'échantillon, un mouvement de vibration perpendiculaire à la surface de l'échantillon, à sa fréquence de résonance qui peut atteindre 80 kHz. Le courant tunnel se trouve alors modulé par cette vibration. L'analyse des corrélations qui peuvent exister entre les variations du courant tunnel qui reflète la variation de la distance pointe objet, et les variations du signal de fluorescence, fournit un élément de comparaison important de l'exaltation sous pointe, avec le modèle théorique existant [35]

Dans ce chapitre je décrirai les caractéristiques de l'amplificateur de courant que j'ai développé et je discuterai de ses particularités en regard du montage de A.Dhirani.

Pour des tensions faibles, l'expression l'intensité I_t du courant tunnel s'écrit de la manière suivante :

$$I_t \approx \frac{V}{d} \exp\left(-A \phi^{1/2} d\right) \quad (\text{IIA.3.1.1})$$

où A est une constante qui vaut $1,025 / \sqrt{\text{eV}/\text{Å}}$. ϕ est la valeur moyenne de la barrière de potentiel entre la pointe et l'échantillon conducteur. Pour des bons conducteurs ϕ est de l'ordre de 4 eV et I_t s'écrit :

$$I_t \approx \frac{V}{d} e^{-2.05 d} \quad (\text{IIA.3.1.2})$$

Dans nos applications de microscopie de champ proche, pour une différence de potentiel de l'ordre du Volt appliquée entre la pointe et l'échantillon, le courant attendu pour une séparation d'un nanomètre entre la pointe et l'échantillon est de l'ordre de 125 pA.

En régime continu, pour mesurer ce courant un montage trans-impédance présente l'avantage d'offrir une entrée faible impédance et peu sensible aux capacités parasites des fils de connexion extérieurs transportant le courant tunnel. En contrepartie, le gain de l'amplificateur sur le signal de courant est égal à l'unité. Obtenir un signal d'une dizaine de millivolts pour un courant tunnel de 100 pA, à l'aide d'un montage proche de celui de A.Dhirani, comportant un seul amplificateur opérationnel comme celui présenté par le premier étage U1 sur la figure IIA.3.1.2, implique l'utilisation d'une résistance de charge $R1$ de valeur élevée et au moins égale à $100 \text{ M}\Omega$, placée dans le circuit de contre réaction. Pour garantir cette sensibilité j'ai choisi un circuit qui a très peu de bruit [36] (OPA111, Burr-Brown) ainsi que de bonnes caractéristiques statiques et, qui est généralement utilisé dans la mesure des courants faibles. Son entrée présente un faible courant de polarisation, au maximum de 1 pA et une tension maximale d'offset de $250 \mu\text{V}$. Son bruit de courant maximum est de $0,8 \cdot 10^{-15} \text{ A}/\sqrt{\text{Hz}}$. Il intervient peu au regard du bruit thermique de la résistance $R1$ de $10^8 \Omega$ qui, suivant la bande passante utile, est supérieur de 3 à 4 ordres de grandeur et représente un courant de quelques picoampères. Les tensions de mode commun tel le 50 Hz résiduel circulant à travers les circuits de masse sont notablement atténuées par un taux de réjection de mode commun CMR (Common Mode Rejection) minimum de 100 dB.

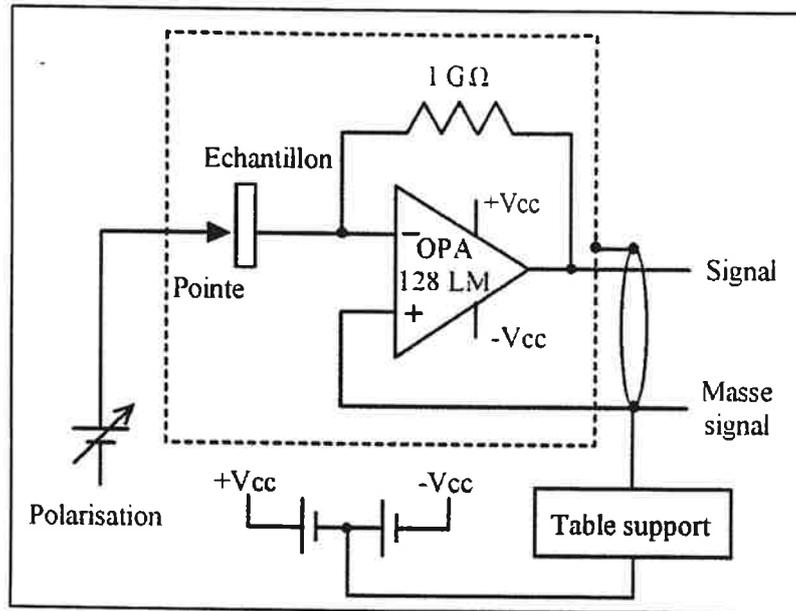


Figure IIA.3.1.1 : Convertisseur courant-tension, résolution 1 pA, GBW < 4 kHz.

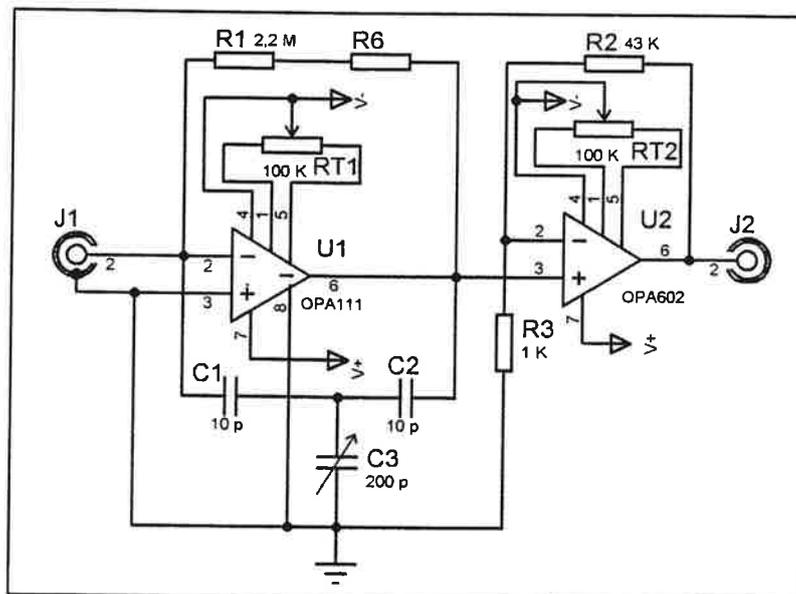


Figure IIA.3.1.2 : Amplificateur de courant tunnel (100 pA), GBW ≈ 80 kHz.

Le taux de réjection des tensions d'alimentation PSR (Power Supply Rejection) de 110 dB apporte une réduction suffisante de l'ondulation résiduelle présente dans la bande passante restreinte de 60 Hz. Toutefois, l'utilisation d'une alimentation modulaire commerciale fonctionnant par découpage augmente notablement le bruit. Elle produit une ondulation à une fréquence de l'ordre de 40 kHz. Le taux PSR décroît avec la fréquence, et ne présente plus que 60 dB d'atténuation à 40 kHz. Pour renforcer cette atténuation, on ajoute une cellule de filtrage supplémentaire abaissant par écrêtage, à l'aide de diodes Zener et de condensateurs de découplage, le potentiel initial de ± 15 V à ± 10 V. Dans ces conditions le bruit mesuré en sortie de l'amplificateur U1 est de l'ordre de 400 μ V. Sans compensation de tension d'offset sur l'amplificateur OPA111, la tension maximale de repos en sortie est de 500 μ V. Ce montage trans-impédance, couramment employé, utilise un minimum de composants et il est satisfaisant pour extraire un courant tunnel de 100 pA. Cependant il présente une limitation importante. Sa bande passante effective est très inférieure à celle de 80 kHz, nécessaire dans les expériences.

En effet, une capacité parasite C_p d'une valeur faible, par exemple 0,5 pF seulement, entre l'entrée et la sortie de U1, et principalement apportée par l'insertion de la résistance de contre réaction R1, limite la bande passante du signal à 3,2 kHz.

Pour réduire ce phénomène, des précautions particulières sur l'isolement des connexions d'entrée, à l'aide de bornes en téflon, et de choix de résistance de faible capacité doivent être respectées. Ces procédés sont contraignants et peu efficaces sur un montage réalisé avec des méthodes de fabrication standard.

Pour obtenir une bande passante de 80 kHz tout en conservant une sensibilité suffisante à la mesure du courant tunnel, j'ai, comme le montre la figure IIA.3.1.2, réalisé un montage à deux étages d'amplification. Pour accroître la bande passante du premier étage, on diminue la valeur de la résistance R1. Le signal mesuré chute. Pour compenser cette perte de gain, le second étage, monté en amplificateur de tension [37] (OPA602, Burr-Brown) et placé derrière l'étage de conversion courant-tension, accroît le signal de sortie de l'amplificateur OPA111.

Le premier étage U1 est semblable au montage trans-impédance précédemment décrit. Mais la résistance R1 est abaissée à 2,2 M Ω , la résistance R6, utilisée pour une facilité de câblage, est nulle. La capacité parasite C_s agissant sur le circuit de contre réaction de l'amplificateur U1 est un paramètre difficile à estimer. Il est cependant très influent sur la bande passante. Cette capacité dépend de plusieurs facteurs tels les caractéristiques de la résistance, et l'implantation des composants et fils de connexion sur le circuit imprimé. Les

tests de bande passante effectués sur notre montage nous permettent de l'évaluer à environ 0,5 pF, ce qui correspond à une bande passante théorique de 144 kHz, supérieure à celle nécessaire.

Une cellule capacitive en T, constituée de trois condensateurs C1, C2 et C3, permet si besoin d'ajuster la bande passante à 80 kHz. La capacité équivalente

$$C_{eq} = \frac{C1 \cdot C2}{C1 + C2 + C3} \quad (\text{IIA.3.1.3})$$

peut être ajustée entre 0,5 pF et 1 pF à l'aide de C3 pour que la capacité totale $C_T = C_{eq} + C_s$ dans la contre réaction de l'amplificateur U1 donne une bande passante de :

$$\frac{1}{2 \cdot \pi \cdot R1 \cdot C_T} = 80 \text{ kHz} \quad (\text{IIA.3.1.4})$$

Le gain de tension A_v de l'amplificateur non-inverseur U2 est

$$A_v = 1 + \frac{R2}{R3} \quad (\text{IIA.3.1.5})$$

soit avec les valeurs du montage, $A_v = 44$. Ce montage a une structure semblable au montage trans-impédance précédent dans la mesure où la résistance de charge équivalente $R = A_v R1$, est de l'ordre de 100 MΩ. Pour une bande de fréquence de 80 kHz, le bruit B_{U1} en sortie du premier amplificateur U1 est de l'ordre de 54 μV. Comme dans le montage précédent, mais de moindre valeur, c'est le bruit thermique de la résistance R1 de l'ordre de 25 pA qui est prépondérant devant le bruit propre de l'amplificateur. Compte tenu du bruit B_{U2} du circuit U2, la dynamique totale du bruit B_{J2} à la sortie J2 est donnée par la relation :

$$B_{J2} = A_v \sqrt{B_{U1}^2 + B_{U2}^2} \quad (\text{IIA.3.1.6})$$

B_{J2} est de l'ordre de 2,4 mV ce qui, pour un courant tunnel de 100 pA produisant une tension de 10 mV à la sortie J2, représente un rapport signal sur bruit supérieur à 4. Sans compensation de la tension d'offset sur les circuits U1 et U2, il subsiste sur J2 un décalage de l'ordre de 4,6 mV, qui peut être efficacement compensé à l'aide des potentiomètres RT1 et RT2. Un bruit relativement haute fréquence en sortie de U2 pourra être limité par une faible capacité placée en parallèle sur R2, la valeur correspondant à une bande passante de 80 kHz est de 46 pF.

Ce montage est réalisé sur une plaquette de circuit imprimé de quelques centimètres carrés en résine de verre, avec deux plans de connexions. Le circuit U1 recevant le courant tunnel est implanté sans plan de masse afin d'augmenter l'isolement et minimiser les capacités parasites entre les connexions. La cellule d'alimentation filtrée et le circuit U2, plus

rapide et ayant un gain élevé, sont associés à un plan de masse réduisant l'influence des courants de bruit parasites. L'ensemble de ces éléments est monté dans un boîtier métallique constituant l'électrode de masse commune des alimentations. La connexion d'entrée J1 est électriquement isolée du boîtier. Le faible volume de l'ensemble permet son fonctionnement à proximité du scanner portant l'échantillon réduisant ainsi les longueurs de connexions d'entrée qui sont des sources additionnelles de bruit.

La polarisation de la sonde et de l'échantillon est réalisée par une pile de 9 V qui, à travers une commande potentiométrique, délivre une tension variable entre 1 V et 9 V pour être compatible avec les caractéristiques des différentes sondes utilisées. Pour minimiser le bruit d'antenne et l'influence du 50 Hz, la pile est placée à l'intérieur du boîtier métallique contenant l'amplificateur et la liaison aux électrodes est assurée par un câble blindé.

Ce montage ne tire pas pleinement partie des caractéristiques faible bruit des amplificateurs habituellement employés pour la mesure des faibles courants. Toutefois il présente l'avantage d'avoir une bande passante élevée (80 kHz) au détriment du rapport signal sur bruit qui n'est que de l'ordre de quatre.

Utilisé à travers un amplificateur à détection synchrone, la sensibilité de ce montage offre une dynamique suffisante. Les caractéristiques obtenues avec ce montage répondent aux exigences de nos mesures. Des améliorations peuvent être apportées principalement en réduisant l'excès de bruit des résistances en les remplaçant par des résistances à couches métalliques. Le bruit d'alimentation peut être très atténué si on alimente le montage à l'aide de piles incorporées au boîtier métallique. De plus, les excellentes performances de ces amplificateurs permettent, dans le domaine des faibles signaux, d'obtenir un gain plus élevé pour cette bande de fréquence de fonctionnement.

Ce dispositif s'est avéré indispensable à l'asservissement des pointes non commerciales métalliques, et en particulier pour les pointes en argent. Ces pointes, élaborées au laboratoire, ont été conçues pour obtenir des facteurs d'exaltation notables de la fluorescence des molécules sous pointe dans des configurations particulières de champ proche. Elles sont extrêmement fragiles. Leur bonne conductivité a permis de les asservir correctement avec ce montage à courant tunnel. Celui-ci présente l'avantage, sur le mode d'asservissement par les forces de friction, décrit au chapitre IIA.3.2, d'induire une perturbation contrôlable sur la molécule sondée qui rayonne en présence d'un champ électrique appliqué. Il en résulte la possibilité, à terme, d'effectuer des nano-manipulations sur des molécules individuelles et de réaliser, ainsi, de la nano-chimie.

IIA.3.2 - Capteur de déplacements nanométriques de type shear force, contrôle de la distance d'interaction pointe échantillon.

Actuellement de nombreuses méthodes de contrôle de la distance pointe échantillon en SNOM font appel à la détection des forces de friction (shear-force). Le principe de la mesure est le suivant. La pointe ou l'extrémité libre d'une fibre optique, de direction normale au plan de l'échantillon, est mise en vibration sur une fréquence égale à sa fréquence de résonance fondamentale ou sur une harmonique de cette fréquence, dans un mouvement parallèle au plan de l'échantillon. Lorsque la pointe est éloignée de l'échantillon, le facteur de qualité Q de la vibration qui qualifie la finesse de la résonance est de l'ordre de 50 à 200, selon les pointes. Lorsque la pointe est approchée de l'échantillon, les forces d'interaction avec l'échantillon ou avec le film moléculaire qui recouvre l'échantillon agissent sur le mouvement de vibration et l'amortissent. L'amplitude de vibration décroît quand les forces d'interaction augmentent, c'est à dire quand la distance pointe-échantillon diminue. Il se produit simultanément un décalage de la fréquence de résonance. En utilisant la caractéristique amplitude de vibration/distance, on peut créer un asservissement, permettant de réguler et maintenir constante une distance pointe échantillon de quelques nanomètres.

Pour détecter l'amplitude de vibration de la pointe, une technique communément employée utilise une détection optique. Un faisceau laser d'intensité constante et de direction fixe perpendiculaire au mouvement de vibration de la pointe est focalisé sur celle-ci. Une photodiode détecte la lumière diffusée derrière la pointe dans la direction du faisceau laser. Le mouvement périodique de vibration de la pointe module l'intensité de la lumière détectée par la photodiode. L'amplitude S du signal électrique modulé de la photodiode est mesurée par une détection synchrone, à la fréquence de vibration de la pointe. Quand le mouvement de la pointe est amorti, S décroît jusqu'à atteindre une valeur nulle si la pointe vient en contact avec l'échantillon. [38,39]. Plusieurs modèles de détection optique ont été développés en MOCP. Ils présentent cependant certaines limitations. Ces modèles utilisent un laser, que j'appellerai « laser-pointe », distinct du laser utilisé comme source d'illumination de l'échantillon. La puissance du faisceau couramment utilisée dans ces détections est supérieure de 5 ordres de grandeur à la puissance d'émission de la nanosource de champ proche. Pour contourner les signaux parasites inhérents à cet éclairage intense et qui peuvent masquer les faibles signaux de champ proche, une technique est couramment utilisée. Elle consiste à utiliser un rayonnement de longueur d'onde différente du faisceau excitateur et de compléter le dispositif de champ proche avec des filtres optiques. Cette méthode est très efficace quand l'imagerie de

champ proche optique concerne des échantillons non absorbants, dont on étudie par exemple la topographie. Dans le cas d'études de la fluorescence moléculaire, cette méthode ne suffit pas à rendre la méthode de détection optique des forces de cisaillement non invasive. En effet, le rayonnement intense issu du laser-pointe perturbe les informations du signal de fluorescence issu du domaine éclairé directement par la source d'illumination en créant des signaux parasites (diffusion Rayleigh et diffusion Raman) même si les objets fluorescents ne sont pas directement excités à résonance. De plus ce faisceau d'incidence presque rasante éclaire en permanence une zone importante de l'échantillon. Cela entraîne un photoblanchiment prématuré des molécules avant même qu'elles ne soient sondées sous la pointe. De plus, les éléments optiques nécessaires à la focalisation du laser-pointe sur l'extrémité oscillante de la pointe présentent un encombrement et des difficultés d'alignement accrues dans les réalisations de microscope de champ proche devant travailler dans des volumes étroits ou à très basses températures. Ces difficultés ont été contournées élégamment dans certains dispositifs où la lumière diffusée après la pointe est collectée dans une fibre optique orientable à l'aide d'actionneurs piézoélectriques commandés à distance.

Pour éviter ces difficultés, j'ai utilisé une technique ne mettant pas en œuvre de détection électro-optique mais une détection directe fondée sur l'exploitation de l'effet piézoélectrique.

Une première démonstration de capteur électrique, connu depuis sous le nom de « tuning fork » (« diapason accordable »), a été proposée en 1995 par Karrai et Grober [40]. Le principe consistait à coller une pointe en fibre optique sur le bras d'un cristal de quartz, le quartz étant un oscillateur mécanique ayant un grand facteur de qualité Q . L'ensemble de la pointe et du quartz peut être considéré comme un oscillateur harmonique. Les forces de friction entre la pointe et l'échantillon entraînent un décalage de fréquence et une atténuation des vibrations de l'ensemble. Plus récemment un détecteur intégré [41], où la pointe est solidaire d'un oscillateur développé sur un substrat en silicium, utilise l'effet capacitif pour détecter les vibrations. Dans de nombreux dispositifs, le bruit dominant la détection est de nature mécanique. Il se traduit par une vibration résiduelle x_0 imposée à la pointe en dehors de toute excitation directe. Cette vibration représente le signal minimum qui pourra être détecté par le capteur. Une bonne sensibilité du capteur suppose que l'amplitude minimum de vibration de la pointe en présence des forces de friction qui s'exercent lorsque la pointe et l'échantillon sont proches soit supérieure à cette valeur x_0 .

Les forces de friction F_i s'appliquant à la pointe sont données par la relation :

$$F_i = f_i \omega x,$$

f_i est le coefficient de frottement, ω est la pulsation de résonance, x représente l'amplitude du mouvement de vibration à la résonance. Elles sont proportionnelles, par l'intermédiaire du coefficient de frottement f_i au produit $m \times B$, où m est la masse de la pointe et B représente la largeur de la bande de fréquence de détection donnée par :

$$B = \omega / Q$$

Q est le facteur de qualité de la résonance de la pointe.

Si la résonance détectée n'est pas celle de la pointe, mais celle de l'ensemble pointe et oscillateur pour la même bande de fréquences de détection, le coefficient de friction augmente dans le rapport des masses M/m :

$$F_t = B_t \times M_t$$

M_t représente la masse totale de l'oscillateur, c'est à dire celle du levier excitateur portant la pointe et celle de la pointe

Pour atteindre un amortissement équivalent, la force qui doit s'exercer entre la pointe et l'échantillon doit être plus importante dans le second cas. La plage de distances sur laquelle l'amortissement est détectable est réduite dans le rapport des masses du système oscillant et de la pointe. La sensibilité du capteur sera d'autant plus réduite que la vibration résiduelle de la pointe x_0 , qui traduit le bruit mécanique, est élevée. Il en résulte un risque important d'endommagement de la pointe et de l'échantillon lui-même si ce dernier n'est pas très dur. Ces considérations ont piloté le choix du capteur que j'ai développé. Il se démarque de ce point de vue des capteurs préexistants. Cet écueil a été contourné différemment dans le capteur développé ultérieurement par Karraï, d'une part en utilisant des pointes très courtes de fréquence de résonance très élevées, et d'autre part en développant un asservissement utilisant l'harmonique 2 de la fréquence de résonance.

Une autre technique utilisée par Hsu [42] est fondée sur l'énergie dissipée par un oscillateur qui oscille à sa fréquence de résonance. Cette énergie est proportionnelle à son facteur de qualité Q . La puissance dissipée peut être quantifiée en mesurant les variations d'impédance aux bornes du circuit électrique de pilotage.

Le montage proposé par Hsu utilise un tube piézoélectrique comme oscillateur à une extrémité duquel une fibre optique est collée. La pointe de cette fibre est mise en vibration latéralement à sa fréquence de résonance par le tube oscillateur. Lorsque la pointe approche

de l'échantillon le facteur de qualité Q décroît, le tube oscillateur transmet moins de puissance et son impédance se modifie. Cette technique présente certaines difficultés. En particulier, l'identification de la fréquence de résonance de la pointe par la mesure de l'impédance est souvent ambiguë. Les modes de résonance des composants du microscope mécaniquement solidaire du tube oscillateur ou du tube lui-même induisent des variations d'impédance plus importantes que la vibration de la pointe elle-même. La mesure de ces faibles variations d'impédance requiert une détection différentielle par un pont de Wheatstone, indispensable pour compenser le signal de commande de l'oscillateur. De plus le système de détection est très sensible aux dérives thermiques.

Une version améliorée a été mise au point par Barenz [43] en 1996. La fibre optique est collée sur un tube cylindrique piézoélectrique quatre quadrants, c'est à dire que la métallisation externe du cylindre est divisée suivant la périphérie du tube en quatre électrodes de surface égale ayant chacune la longueur du tube (voir, chapitre IIB.1, la figure IIB.1.2). Le signal d'excitation de l'oscillateur et le signal de détection des vibrations utilisent des électrodes différentes ce qui favorise leur indépendance. Ce capteur fonctionne grâce à l'effet piézoélectrique direct qui permet de détecter la force exercée sur le tube par la vibration de la pointe. Le signal électrique recueilli aux bornes du tube piézoélectrique est directement analysé par un amplificateur à détection synchrone.

Une méthode très semblable développée en 1996 par Dräbenstedt [44] utilise un tube piézoélectrique qui présente une segmentation annulaire de ses électrodes, non pas comme le modèle quatre quadrants, mais séparant la partie détection et la partie excitation en deux zones tubulaires d'inégales longueurs. Comme le montage de Hsu ces méthodes de détection utilisées pour le contrôle de position de la pointe ont permis d'obtenir des images de la structure de l'échantillon observé. Malgré la séparation des circuits électriques, le signal de fond issu du couplage entre les électrodes du circuit d'excitation et de détection reste élevé.

Dans l'ensemble, ces méthodes présentent plusieurs inconvénients. Tant que les électrodes du circuit d'excitation et du circuit de détection seront sur le même tube piézoélectrique, le mouvement d'oscillation de l'ensemble du tube engendré par l'application d'une tension alternative sur son électrode d'excitation créera un signal de fond sur l'électrode de détection, indissociable de celui induit par les résonances de la pointe. De plus, bien que la dimension des tubes piézoélectriques soit relativement faible, étant donné le but original de leur conception pour réaliser des actionneurs, la masse de la portion tubulaire délimitée par l'électrode de détection est d'au moins deux ordres de grandeur plus importante que la masse

de la pointe. De ce fait l'identification, parmi les différents modes de résonance, de la fréquence de vibration de la pointe reste difficile. Cela conduit à utiliser un système de détection indépendant, par exemple une détection optique. Une bonne identification de la résonance de la pointe est un facteur clé pour obtenir des images de qualité particulièrement avec des échantillons fragiles. Comme je l'ai mentionné plus haut, il est souvent possible de contrôler la distance pointe échantillon en utilisant d'autres systèmes résonants, seule la détection de la résonance de la pointe permet d'obtenir des images en n'exerçant que de faibles forces de friction sur l'échantillon.

La dernière méthode citée, exploite l'effet piézoélectrique avec ses deux fonctions d'excitation et de détection des vibrations de la pointe. Elle peut être grandement améliorée à condition de briser la symétrie présentée par le montage entre l'élément détecteur et l'élément exciteur.

En effet le signal que nous pouvons détecter représente le travail des forces qui agissent sur l'élément détecteur lui-même. Dans les précédentes méthodes la résonance de la pointe est difficilement identifiable car le spectre de fréquences de l'élément détecteur montre principalement sa propre résonance avec éventuellement celle de l'élément exciteur. Les vibrations de la pointe introduisent de faibles perturbations dans ce spectre. L'une des faibles résonances observées correspond à la fréquence de résonance de la pointe, les autres sont dues à des couplages entre l'élément détecteur et l'élément exciteur. La nature mécanique du signal à détecter nécessite un ensemble exciteur détecteur asymétrique où l'élément piézoélectrique, de masse plus importante, provoquera les mouvements de vibration de la pointe alors que l'élément piézoélectrique de faible masse détectera les variations de vibration de la pointe. Dans cette configuration, les vibrations de la pointe contribueront avec plus d'efficacité à la dynamique de l'élément de détection et la fréquence de résonance de la pointe pourra plus aisément être identifiée parmi le spectre de l'ensemble des résonances mesurées.

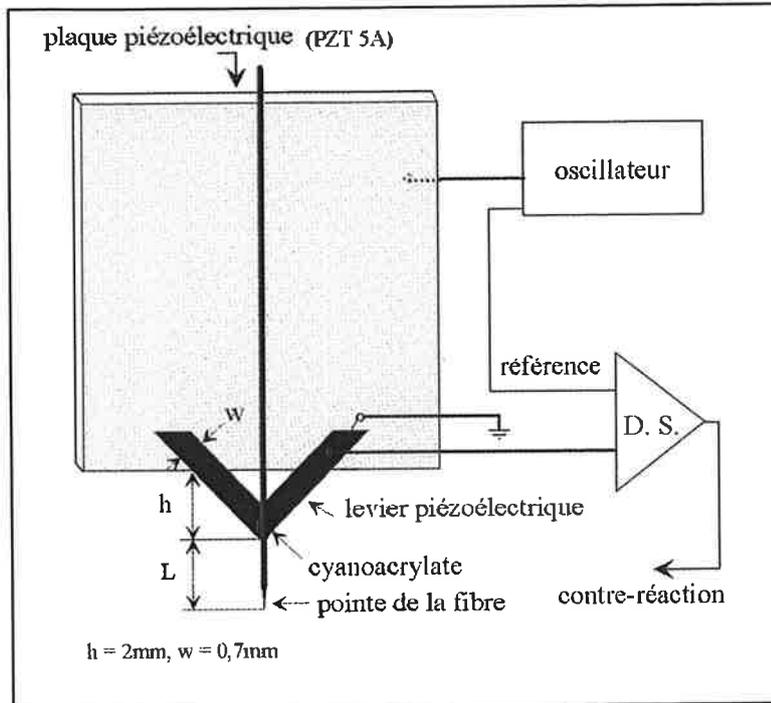


Figure IIA.3.2.1 : capteur de distances nanométriques utilisant les forces de friction engendrées entre la pointe de la fibre et l'échantillon

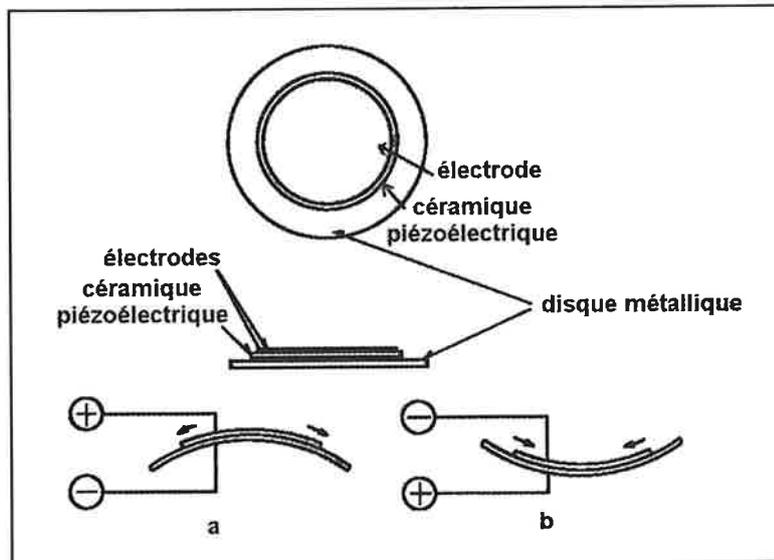


Figure IIA.3.2.2 : diaphragme piézoélectrique dans lequel est usiné le levier du capteur de distances nanométriques. On distingue l'inversion de la tension présente aux bornes du diaphragme lorsque la céramique est déformée en extension sur le dessin a et en compression sur le dessin b.

Le dispositif que j'ai réalisé [45,46] comprend un ensemble excitateur détecteur schématiquement représenté sur la figure IIA.3.2.1. Le tube piézoélectrique utilisé dans les méthodes précédentes est remplacé par une simple plaquette carrée de 10 mm de côté et d'épaisseur 1 mm en céramique piézoélectrique (PZT 5A) polarisée suivant un axe normal aux plans de ses faces principales qui constituent ses deux électrodes. Cette plaquette compose l'élément excitateur. La face inférieure de la plaquette est collée avec une résine époxy sur un support permettant le montage sur le microscope. Les électrodes de cette plaquette sont alimentées par une tension alternative de l'ordre du Volt. Entre cette plaquette et la pointe est interposé un levier piézoélectrique de très faible masse qui est le détecteur des variations de vibration de la pointe. C'est le capteur à proprement parler. Il a une forme de **V**. Il est découpé dans le diaphragme souple d'un vibreur sonore miniature (buzzer) de très faible coût [47]. Dans le texte, j'appellerai ce levier du nom de « buzzer ». Comme le montre la figure IIA.3.2.2, ce diaphragme est constitué d'un disque en acier inoxydable d'une épaisseur de 50 μm sur lequel est déposé un disque très mince de céramique piézoélectrique avec ses électrodes, par sérigraphie. Le levier est découpé suivant une géométrie présentant une largeur des bras de 0,7 mm et un angle entre bras de 90°. Ce levier est collé par une résine époxy (araldite) sur le bord la plaquette excitatrice de manière à écarter l'extrémité libre du **V** d'une distance $h = 2$ mm. Il est important de respecter cette géométrie, afin d'éliminer les modes de vibration parasites dus à la torsion suivant la largeur de chaque bras, et de privilégier les modes de vibration suivant l'axe de flexion des bras, qui correspondent aux mouvements d'oscillation transmis par la pointe dans la direction parallèle au plan de l'échantillon. La pointe est fixée sur l'extrémité du levier, à la croisée des deux bras, par une goutte de colle cyanoacrylate qui confère au système oscillant un meilleur facteur de qualité Q que celui obtenu avec un collage à base de résine époxy. Sur ce montage, une bonne qualité des liaisons électriques, réalisées par des fils très fins de 125 microns de cuivre émaillé soudés sur les électrodes de la plaquette excitatrice et sur le levier, permet d'éviter toute contrainte ou résonance mécanique parasite significative. La vibration entretenue, transmise au levier par la plaquette excitatrice, provoque un travail de flexion du levier piézoélectrique. C'est dans ce mode de fonctionnement (force de cisaillement) que la variation de la polarisation électrique en fonction de la force exercée est maximale. On utilise donc la céramique dans son mode le plus sensible.

La constante piézoélectrique correspondante de la céramique (PZT 5A), $d_{15} \cong 0,5$ nm/V et sa forte constante diélectrique ϵ (1700) minimisent l'influence des faibles variations de capacité de son câble de liaison à la chaîne de mesure (*capacité du levier > capacité du câble*)

et permettent de supprimer la proximité d'un amplificateur de charge contrairement aux capteurs à effet capacitif couramment utilisés.

L'amplitude du mouvement d'oscillation de la pointe à sa fréquence de résonance n'excède pas quelques nanomètres avec un facteur de qualité $Q \approx 100$. Veiller à conserver cette faible amplitude de mouvement est important pour plusieurs raisons. La réponse percussive du microscope est déterminée par l'amplitude de vibration de la pointe qui doit être faible devant la taille de l'objet à imager pour que la résolution ne soit pas dégradée. Comme j'ai mentionné dans le chapitre (I A), l'information sur les hautes fréquences spatiales diffusées par une nanostructure n'est accessible que lorsque la pointe est située dans la zone de champ proche à une distance de quelques nanomètres de cette nanostructure observée. Cette information s'atténue rapidement avec la distance du rayonnement. Un mouvement d'amplitude supérieure à la taille de la nanostructure introduit une limitation dans la détection des hautes fréquences et la réponse percussive du microscope est équivalente à celle d'un filtre passe-bas d'autant plus étroit que l'amplitude de vibration est importante. De plus un mouvement de grande amplitude ne peut être amorti qu'avec des forces de friction importantes obtenues lorsque l'échantillon et la pointe sont à quelques nanomètres de distance. Le risque d'endommagement de la pointe et de l'échantillon sont accrus.

La céramique piézoélectrique PZT 5A présente une importante constante piézoélectrique d_{33} voisine de $0,4 \text{ nm/V}$. Si l'on dispose d'une source d'excitation d'au moins quelques Volt, l'avantage des grands déplacements offert par le tube piézoélectrique n'est pas nécessaire. Si la plaquette piézoélectrique est un élément moins coûteux qu'un tube, elle possède aussi une masse plus faible et sa fréquence de résonance est plus élevée que celle du tube piézoélectrique. Dans ce montage le mode de résonance fondamental apparaît à 63 kHz et se trouve au-delà du domaine utile des fréquences de résonance de la pointe.

Avec un tel montage, le signal de résonance de la pointe, détecté par le levier, est de 1 mV pour un signal d'excitation de $0,1 \text{ V}$. L'élément détecteur est directement relié à l'amplificateur à détection synchrone par un câble blindé approprié haute impédance. Le spectre de résonances obtenu en faisant varier la fréquence d'excitation présente un rapport signal sur bruit satisfaisant.

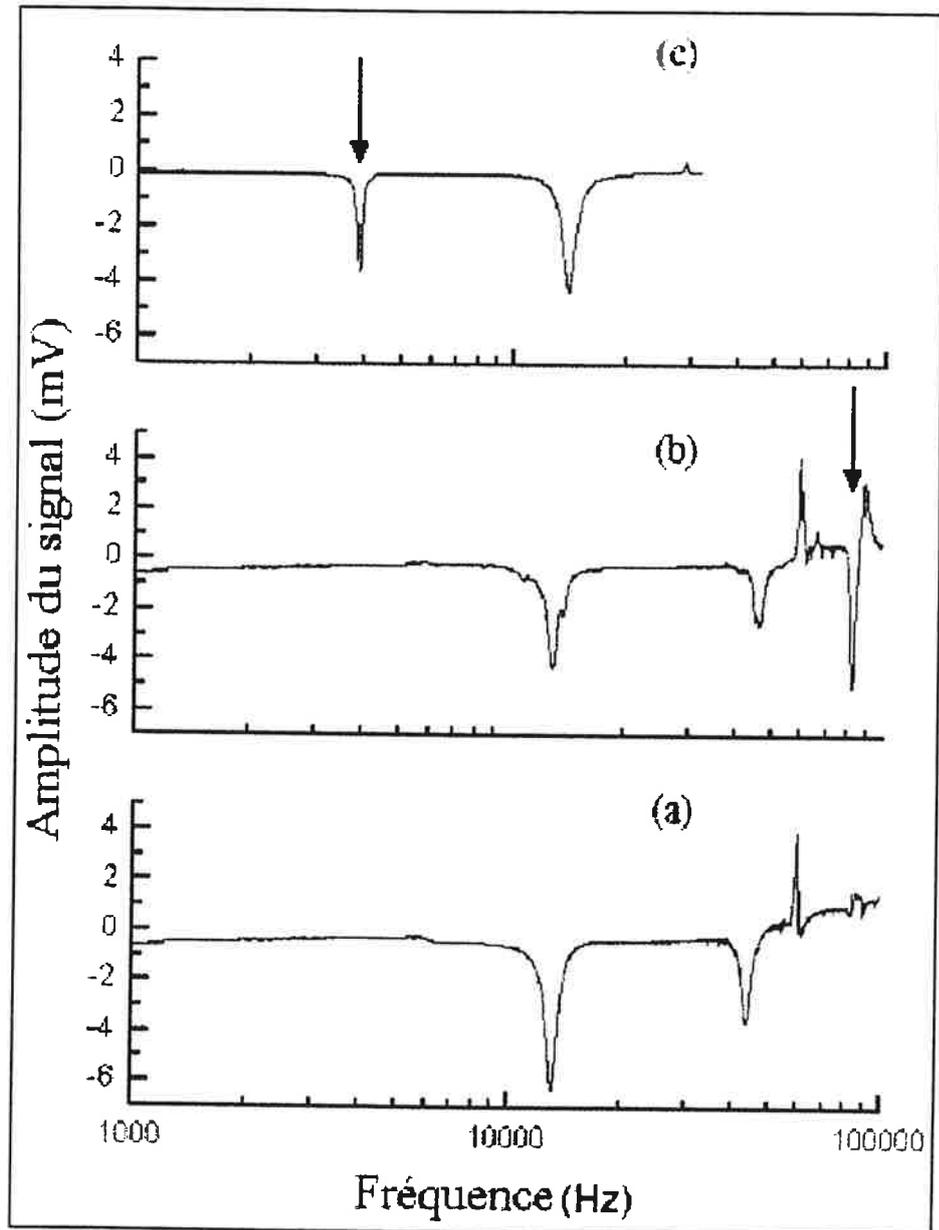


Figure IIA.3.2.3 : mesures des caractéristiques de la nanosonde. Profils spectraux des fréquences de résonance des éléments. a, levier libre sans le montage de la pointe, b et c respectivement avec une pointe de 0,9 mm et 4,5 mm de longueur, où la fréquence est repérée par une flèche.

Le levier de détection, dont l'inertie s'oppose au mouvement de vibration induit par la plaquette excitatrice, est soumis à une force dont le moment \mathcal{M} est de l'ordre :

$$\mathcal{M} = M_L x_1 \omega^2 h$$

où M_L représente la masse du levier, x_1 l'amplitude de l'oscillation du levier, ω la pulsation du signal d'excitation, et h la hauteur de la partie libre du levier.

Lorsque la pointe est excitée à sa fréquence de résonance fondamentale, elle transmet au levier une force dont le moment \mathcal{M} s'écrit :

$$\mathcal{M} = m x_2 \omega^2 h = m Q x_1 \omega^2 h$$

où x_2 est l'amplitude d'oscillation de la pointe. Cette expression est identique à l'expression du moment \mathcal{M} mais où la masse de la pointe m remplace M_L et où apparaît le facteur de qualité Q de l'oscillateur représenté par la pointe vibrant à la fréquence de résonance. Pour que le levier soit un détecteur du mouvement de vibration de la pointe et non de son propre mouvement il faut respecter la condition suivante :

$$\mathcal{M} > \mathcal{M}$$

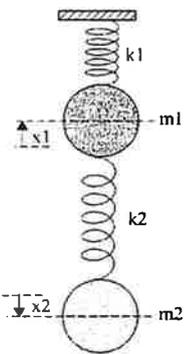
soit encore,

$$m > M_L/Q$$

Le rapport signal sur bruit à la détection croît selon la même condition. Dans la réalisation du capteur, la masse du levier détecteur est légèrement supérieure à celle de la pointe sans excéder un ordre de grandeur. Cette condition améliore la sensibilité du capteur et permet d'obtenir un rapport signal sur bruit largement supérieur à un. Cette condition est toujours remplie lorsqu'on utilise des pointes de longueur supérieure à 2 mm pour lesquelles le facteur de qualité est de l'ordre de 100. Lorsque la longueur de la pointe diminue, sa masse diminue proportionnellement, alors que le facteur de qualité augmente moins vite. Dans cette situation cependant, le signal sur bruit est encore largement supérieur à un. Cette discussion est illustrée par la figure IIA.3.2.3 où la courbe (a) présente le spectre des fréquences de résonance détectées par le levier libre sans montage de la pointe, les courbes (b) et (c) celui obtenu avec des pointes de 0,9 mm et 4,5 mm respectivement. Le spectre de vibration du détecteur présente trois pics de résonance. Les deux premières résonances, à 13 kHz et 42 kHz sont dues au levier, le troisième pic à 63 kHz correspond à une résonance de la plaquette excitatrice portant le levier, ce qui a été vérifié par le montage de différents leviers sur le même élément excitateur.

Lorsqu'une pointe, oscillant à sa fréquence de résonance, est fixée à l'extrémité du levier (courbes b et c), on retrouve sans ambiguïté le spectre du levier seul et un pic supplémentaire,

d'amplitude élevée, du à la résonance de la pointe. Ceci a été confirmé par corrélation avec une mesure optique des vibrations de cette pointe, méthode décrite au début de ce chapitre. Les trois courbes présentées par la figure IIA.3.2.3 montrent qu'avec ce détecteur on obtient un bon rapport signal sur bruit et que l'amplitude du signal de résonance de la pointe est beaucoup plus grande que l'amplitude du signal de fond même pour une pointe courte (0,9 mm de long) où le signal de résonance atteint six fois le niveau du signal de fond. Le modèle précédent est un modèle simple qui décrit correctement la réponse du capteur quand les longueurs de pointe sont telles que la résonance associée est notablement différente de celle du levier lui-même. Dans les situations intermédiaires, la réponse est celle associée à deux oscillateurs couplés.



En effet, le capteur de distance entre la pointe et l'échantillon, peut être décrit de façon simple mais instructive comme l'ensemble de deux oscillateurs couplés- le buzzer d'une part et la pointe de l'autre- dont l'oscillation est entretenue par l'intermédiaire de la plaquette piézoélectrique excitée sinusoïdalement. Sur la figure ci à gauche, on observe une représentation possible du capteur qui correspond à l'ensemble de deux ressorts.

La réponse du capteur est décrite par un système de deux équations qui couplent les élongations des ressorts,

$$- m_1 \omega^2 x_1 + (k_1 + k_2) x_1 + j f_1 \omega x_1 - k_2 x_2 = k_1 x_0 \quad (\text{IIA.3.2.1})$$

$$- m_2 \omega^2 x_2 + k_2 x_2 + j f_2 \omega x_2 - k_2 x_1 = 0 \quad (\text{IIA.3.2.2})$$

Le terme $k_1 x_0$, traduit la force exercée sur le buzzer par la vibration de la plaquette piézoélectrique. La notation retenue est la notation complexe. Dans les équations couplées, $m_{1(2)}$, $k_{1(2)}$, $f_{1(2)}$, $x_{1(2)}$ correspondent à la masse, la constante de raideur, le coefficient de frottement et l'élongation des oscillateurs 1 et 2 respectivement. Dans ces équations n'apparaissent que la variation d'élongation des oscillateurs par rapport à leur position d'équilibre, qui n'est pas explicitée. Le terme oscillant $e^{j\omega t}$ a été omis. La fréquence de l'oscillation entretenue ω est choisie quelconque a priori.

Les solutions des équations donnent les amplitudes de vibration du buzzer (x_1) et de la pointe(x_2):

$$x_1 = \frac{k_1(-m_2 \omega^2 + k_2 + jf_2 \omega)x_0}{[(-m_2 \omega^2 + k_2 + jf_2 \omega)(-m_1 \omega^2 + (k_1 + k_2) + jf_1 \omega) - k_2^2]} \quad (\text{IIA.3.2.3})$$

$$x_2 = \frac{k_1 k_2 x_0}{[(-m_2 \omega^2 + k_2 + jf_2 \omega)(-m_1 \omega^2 + (k_1 + k_2) + jf_1 \omega) - k_2^2]} \quad (\text{IIA.3.2.4})$$

L'amplitude de vibration de la pointe est proportionnelle à l'amplitude d'excitation extérieure x_0 , Elle dépend des caractéristiques propres des deux oscillateurs et en particulier de la longueur utile de la pointe. Cette longueur utile L est la portion de la pointe qui vibre c'est à dire celle comprise entre le point de fixation supposé rigide sur le buzzer et l'extrémité libre. L détermine les valeurs des paramètres m_2 , f_2 et k_2 . Le comportement général de l'ensemble dépend des caractéristiques relatives des deux oscillateurs et je prendrai comme paramètres de référence les valeurs des paramètres m_1 , f_1 et k_1 suivantes :

$$m_1 = 1, \quad k_1 = 1, \quad f_1 = 1/60$$

La valeur de f_1 est une valeur réaliste, compte tenu de la géométrie du buzzer et du choix de m_1 égal à l'unité.

La résonance fondamentale de la pointe, sans couplage avec le buzzer, est reliée à sa longueur par l'expression :

$$\omega = \frac{2\pi\alpha}{L^2} \sqrt{\frac{EI}{\rho A}} \quad (\text{IIA.3.2.5})$$

E est le module d'Young de la silice, I le moment d'inertie, ρ la masse volumique et A la section de la pointe. α est une constante qui vaut 0,5595 pour la résonance fondamentale et 3,507 pour la première harmonique. L'analogie avec l'expression de la fréquence fondamentale dans le modèle précédent où la pointe est considérée comme un ressort permet de comprendre la dépendance du paramètre k_2 avec la longueur de la pointe :

$$m_2 = \rho AL = \beta_1 L, \quad k_2 = (2\pi\alpha)^2 \cdot EI / L^3 = \beta_2 / L^3 \quad (\text{IIA.3.2.6})$$

Des valeurs réalistes de β_1 et β_2 sont 0,2 et 20, compte tenu des valeurs de référence prises pour les paramètres du buzzer. L'amortissement varie de manière inversement proportionnelle au carré de la longueur de la pointe

$$f_2 = 0,1/L^2 \quad (\text{IIA.3.2.7})$$

Les équations (IIA.3.2.3) et (IIA.3.2.4) s'écrivent finalement de la manière suivante :

$$x_1 = x_0 L^3 \frac{(-0,2 \omega^2 L^4 + 20 + j 0,1L\omega)}{[(-0,2 \omega^2 L^4 + 20 + j 0,1L\omega)(-\omega^2 L^3 + (L^3 + 20) + jL^3 \omega/60) - (20)^2]} \quad (\text{IIA.3.2.8})$$

$$x_2 = x_0 L^3 \frac{20}{[(-0,2 \omega^2 L^4 + 20 + j 0,1L\omega)(-\omega^2 L^3 + (L^3 + 20) + jL^3 \omega/60) - (20)^2]} \quad (\text{IIA.3.2.9})$$

L'amplitude et l'écart des fréquences de résonance ω_1 et ω_2 du système dépendent du couplage de l'oscillateur « pointe » et de l'oscillateur « buzzer ». Ce comportement est représenté sur la figure IIA.3.2.4 qui représente l'amplitude de vibration de la pointe x_2 en fonction de ω et de L .

Les variations de l'amplitude maximale de vibration de la pointe en fonction de sa longueur sont reportées sur la figure IIA.3.2.5, pour les valeurs de référence des constantes $m_{1(2)}$, $k_{1(2)}$, $f_{1(2)}$. Cette figure correspond à une situation où l'amortissement de la vibration de la pointe est uniquement dû au frottement visqueux, c'est à dire au cas idéal où la liaison elle-même entre la pointe et le buzzer ne provoque aucune dissipation d'énergie. Le couplage entre la pointe et le buzzer se traduit, comme il a été mentionné, par l'apparition de deux fréquences de résonance couplées pour chaque oscillateur. La représentation de la variation de l'écart entre les fréquences conduit à des courbes dont l'allure est bien connue dans les systèmes en interaction. L'allure de ces courbes dans le cas présent est reproduite sur la figure IIA.3.2.6.

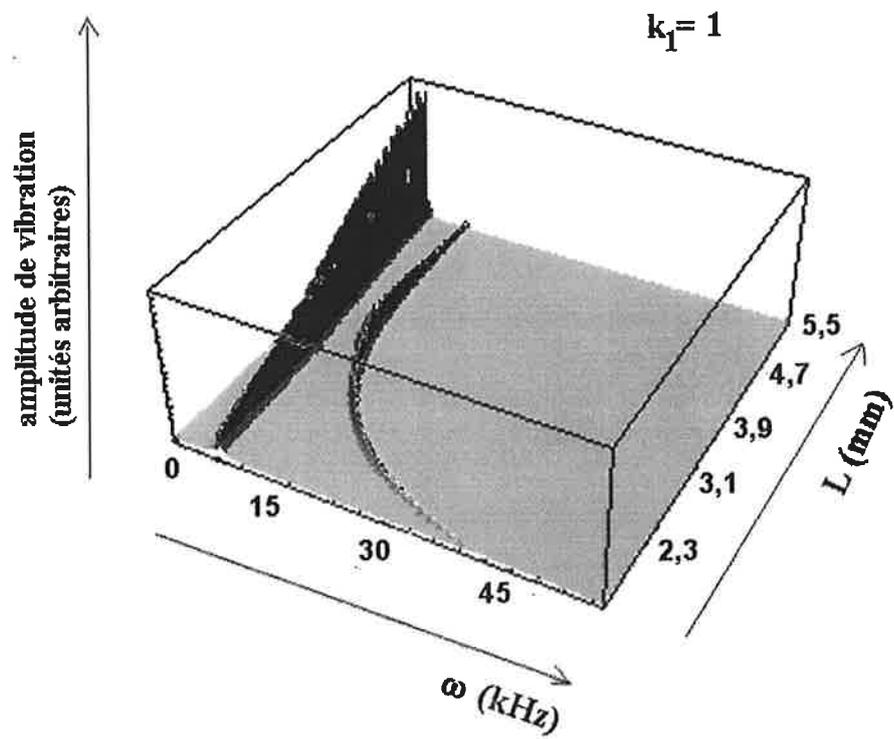


Figure IIA3.2.4 : Amplitude de vibration de la fibre couplée au buzzer en fonction de sa longueur et de la fréquence d'excitation externe du système

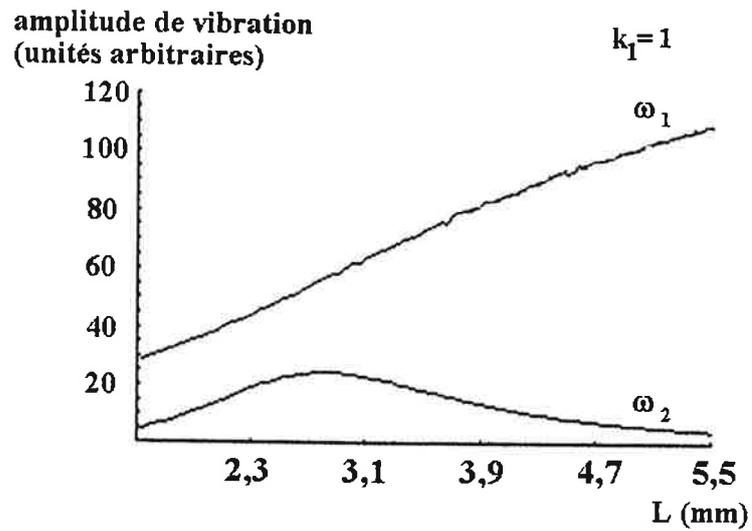


Figure IIA3.2.5 : maxima d'amplitude de vibration de la fibre dans le système couplé en fonction de sa longueur L

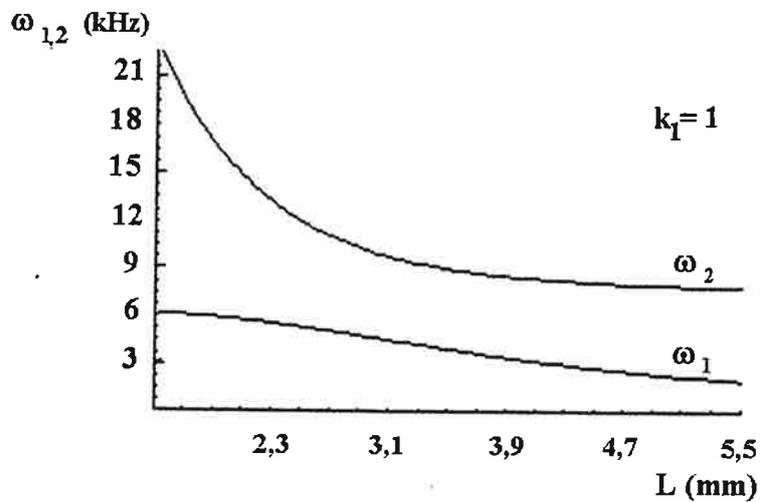


Figure IIA3.2.6 : Fréquences de vibration de la fibre couplée au buzzer en fonction de sa longueur

Le couplage dépend directement de la longueur de la pointe. Il est maximum lorsque l'écart entre les courbes est minimum, c'est à dire dans le cas modélisé ci-dessus pour une longueur de pointe de l'ordre de 3 mm. On peut en déduire des conditions pour obtenir un capteur de grande sensibilité. L'oscillateur réalisé avec une pointe longue est mou. Sa constante de raideur est faible et la pointe ne peut vibrer qu'à une fréquence peu élevée, mais son amplitude de vibration peut être grande. La pointe vibre lentement, et elle ne sera sensible à des variations brusques du frottement lié à la topographie de l'échantillon que pour des acquisitions d'images lentes. C'est un inconvénient majeur. Intrinsèquement, une grande amplitude de vibration de la pointe est aussi un inconvénient puisque la résolution accessible sera la convolution de la réponse percussionnelle du système avec la surface explorée par la pointe au cours de son mouvement de vibration. A l'opposé, l'oscillateur réalisé avec une pointe courte est raide. Il n'est pas perturbé ou peu par le couplage avec le buzzer et sa fréquence de vibration est sensiblement plus élevée. Cette situation, plus difficile à réaliser expérimentalement, est a priori plus favorable, si l'amplitude de détection est suffisante dans ces conditions.

On peut comparer ces résultats avec ceux obtenus dans le cas où la pointe vibre seule, entretenue par une excitation extérieure identique à celle appliquée sur le buzzer. L'équation qui pilote le mouvement est identique à l'équation (IIA.3.2.2).

$$-m_2 \omega^2 x_2 + k_2 x_2 + jf_2 \omega x_2 - k_2 x_0 = 0 \quad (\text{IIA.3.2.10})$$

dans laquelle x_1 est remplacé par la valeur fixe x_0 , imposée par un générateur. Contrairement au cas des oscillateurs couplés précédents, la pointe a une seule fréquence de résonance. Pour une fréquence donnée ω , son amplitude de vibration est donnée par l'expression :

$$x_2 = \frac{k_2 x_0}{(-m_2 \omega^2 + k_2 + jf_2 \omega)} \quad (\text{IIA.3.2.11})$$

L'amplitude de vibration de la pointe en fonction de sa longueur est représentée sur la figure IIA.3.2.7, pour différentes fréquences d'excitation, avec des valeurs des paramètres m_2 , k_2 et f_2 inchangés.

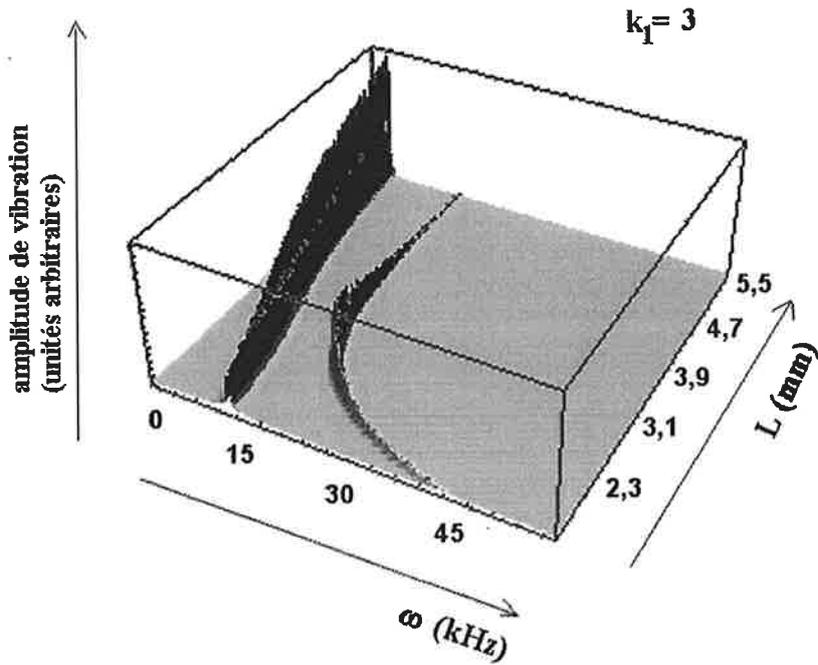


Figure IIA3.2.9 : Amplitude de vibration de la fibre couplée au buzzer en fonction de sa longueur et de la fréquence d'excitation externe du système, pour un buzzer de raideur $k = 3$.

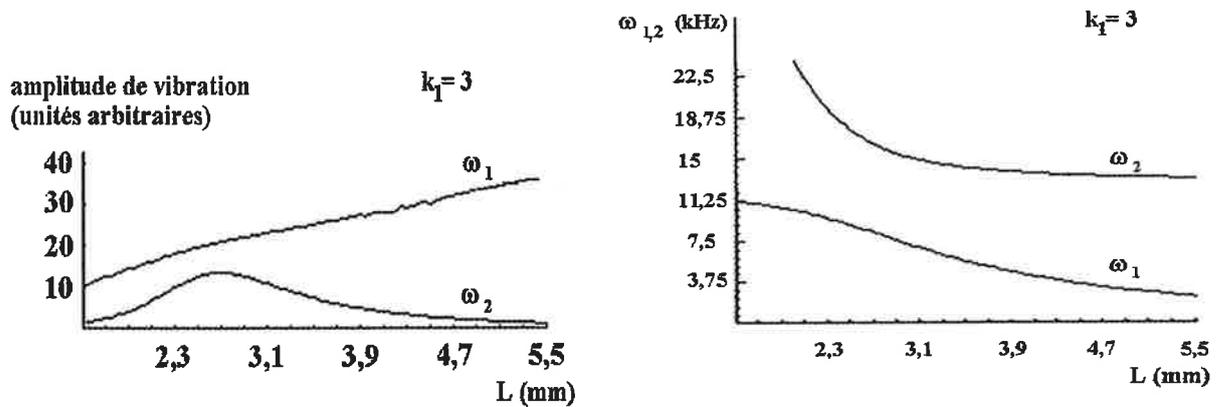


Figure IIA3.2.10 : Influence de la raideur du buzzer sur le couplage des oscillateurs.

L'amplitude de vibration à la fréquence ω_1 décroît rapidement avec le frottement G et le maximum de vibration est déplacé vers les courtes longueurs de pointe pour lesquelles la raideur de la pointe est suffisante pour contrebalancer l'amortissement. Le comportement de l'amplitude de la vibration à la fréquence ω_2 qui dépend essentiellement des caractéristiques du buzzer sont quasiment insensibles à la valeur de l'amortissement qui est directement appliqué à la pointe. Si G est trop important, le capteur n'a qu'une sensibilité réduite. Dans cette situation, la pointe n'est plus véritablement un oscillateur "indépendant" mais une extension du buzzer. Le capteur présente alors les mêmes limitations que celles rencontrées dans les montages de Hsu ou de Dräbenstedt.

Un autre phénomène à prendre en compte est l'influence de l'amortissement lié au frottement de l'air. Il s'agit d'un amortissement de type visqueux, qui peut être décrit par le modèle de Sader [48]. Sans entrer dans les détails de ce modèle complexe, l'effet de l'air est pris en compte à travers deux paramètres qui rendent compte de l'influence relative des forces de viscosité et des forces inertielles mises en jeu. Cet effet qui peut modifier la valeur du coefficient constant (ici 0.1) de f_2 . L'évolution des amplitudes de vibration est décrite par les courbes de la figure IIA.3.2.12.

La comparaison avec les courbes IIA.3.2.5 et IIA.3.2.6 montre que l'amplitude de vibration de la pointe décroît rapidement avec le frottement, le coefficient pertinent pour la courbe ci-dessus n'étant que de 0,5, alors que la fréquence des maxima est inchangée.

La vibration de la pointe et donc celle du système complet est la grandeur qui est directement affectée par les phénomènes physiques qui provoquent un amortissement. Parmi ceux-ci, nous nous intéressons aux forces d'interaction entre un objet et la pointe. Ces forces d'interaction peuvent être de natures différentes. En milieu ambiant, les échantillons sont recouverts d'un mince film d'eau qui va provoquer un amortissement visqueux pour tout objet qui pénètre dans ce film. Quand un échantillon est approché de la pointe, son amplitude de vibration va diminuer dès que la pointe va être suffisamment proche de l'échantillon pour pénétrer dans le film d'eau de quelques nanomètres d'épaisseur. Cet amortissement va se répercuter sur l'amplitude de vibration du buzzer que l'on détecte. La pointe est donc un capteur de distance.

Ce capteur peut également fonctionner sous vide, l'amortissement est provoqué en ce cas par les forces de Van der Waals qui s'exercent entre la pointe et l'échantillon. Ce type d'amortissement peut être modélisé en considérant que le frottement induit sur la pointe varie en d^{-3} , d étant la distance entre la pointe et l'échantillon. Les courbes, montrées par les figures IIA.3.2.13 et IIA.3.2.14, reproduisent les variations d'amplitude de la pointe, pour une longueur de pointe variant de 2 à 6 mm, aux fréquences de vibration ω_1 et ω_2 .

On remarque que le mouvement de la pointe est amorti complètement sur une distance d'autant plus courte que la pointe est longue, et dans tous les cas sur une variation de la distance pointe-échantillon de l'ordre de dix nanomètres. La détection de l'amortissement de la pointe offre donc la possibilité de contrôler le positionnement de la pointe dans le domaine du champ proche optique.

Les propriétés de sensibilité du capteur reposent sur l'efficacité de détection des modes de flexion de la céramique piézoélectrique qui constitue le buzzer. Le signal électrique détecté, est le signal périodique de même fréquence que la vibration du buzzer. Il est proportionnel à la variation de l'amplitude de flexion au cours du temps c'est à dire à :

$$S = \alpha \omega | |x_1| | \quad (\text{IIA.3.2.13})$$

soit encore:

$$S = \alpha \omega x_1 = \frac{k_1 \alpha \omega (-m_2 \omega^2 + k_2 + j f_2 \omega) x_0}{[(-m_2 \omega^2 + k_2 + j f_2 \omega)(-m_1 \omega^2 + (k_1 + k_2) + j f_1 \omega) - k_2^2]} \quad (\text{IIA.3.2.14})$$

soit en fonction des paramètres choisis :

$$x_1 = \alpha \omega x_0 \text{ Abs} \left(L^3 \frac{(-0,2 \omega^2 L^4 + 20 + j 0,1 L \omega)}{[(-0,2 \omega^2 L^4 + 20 + j 0,1 L \omega)(-\omega^2 L^3 + (L^3 + 20) + j L^3 \omega / 60) - (20)^2]} \right) \quad (\text{IIA.3.2.15})$$

où Abs() signifie le module de l'expression (). La variation du signal de détection est représentée sur les courbes des figures IIA.3.2.15 et IIA.3.2.16 qui montrent l'évolution de l'amplitude des vibrations du buzzer aux fréquences ω_1 et ω_2 en fonction de la longueur de la pointe, puis l'évolution des valeurs de ces fréquences en fonction également de la longueur de la pointe.

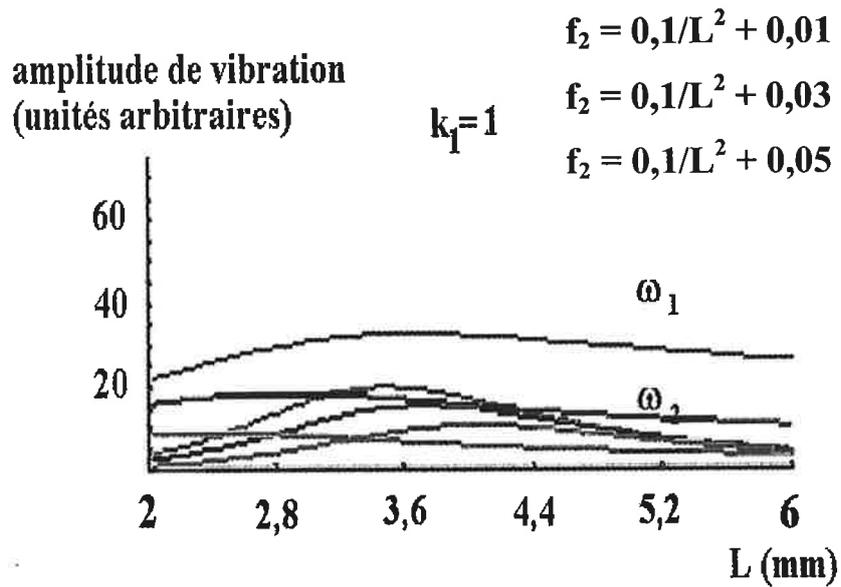


Figure IIA3.2.11 : Evolution des maxima d'amplitude de vibration de la fibre dans le système couplé en fonction du frottement.

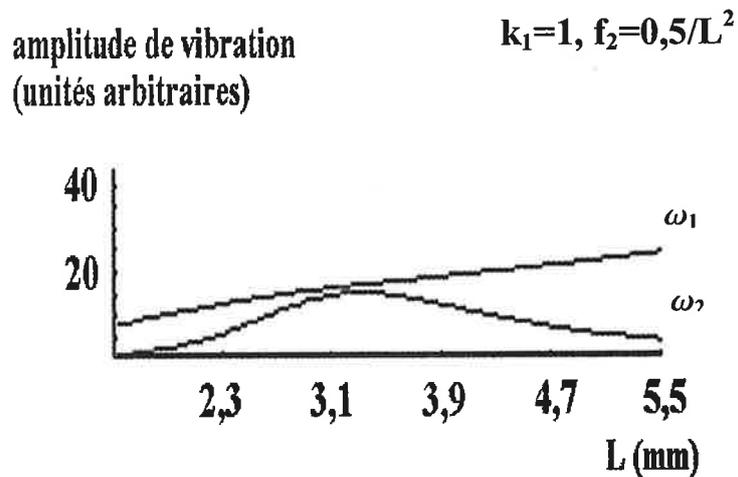


Figure IIA3.2.12 : Evolution de la figure IIA3.2.5 lorsque f_2 augmente.

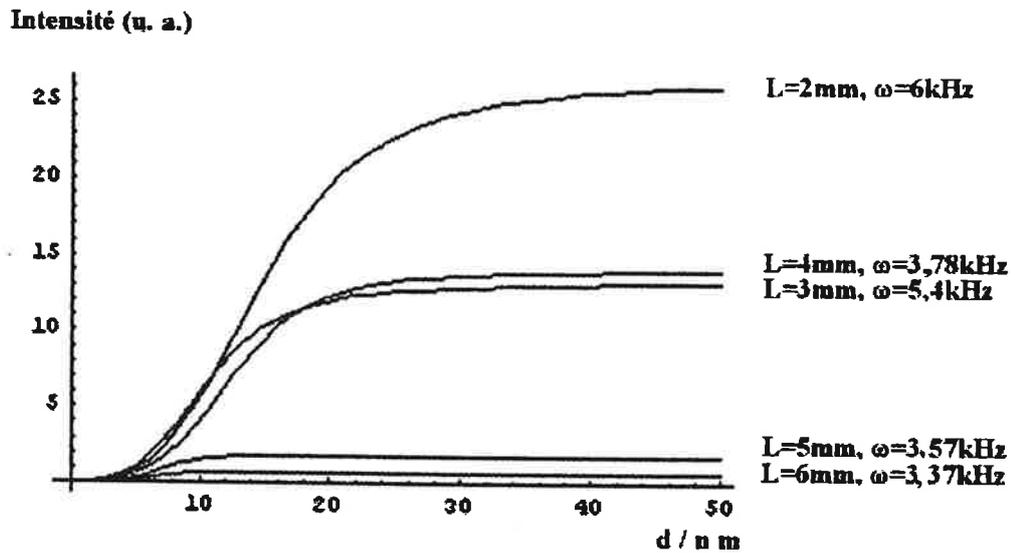


Figure IIA3.2.13 : Courbes d'approche de la fibre et de l'échantillon pour des valeurs données du couple (L, ω_1) , calculées avec les paramètres de référence.

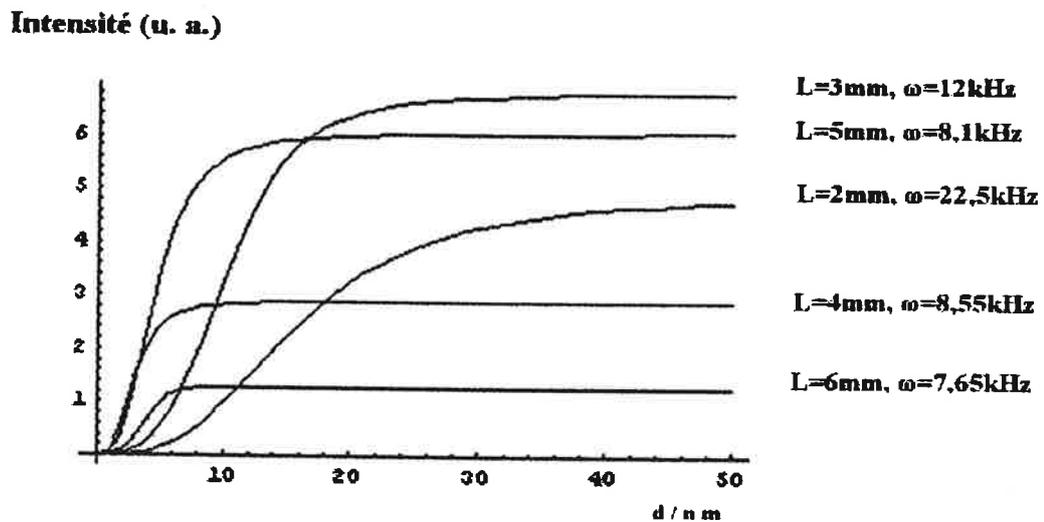


Figure IIA3.2.14 : Courbes d'approche de la fibre et de l'échantillon pour des valeurs données du couple (L, ω_2) , calculées avec les paramètres de référence.

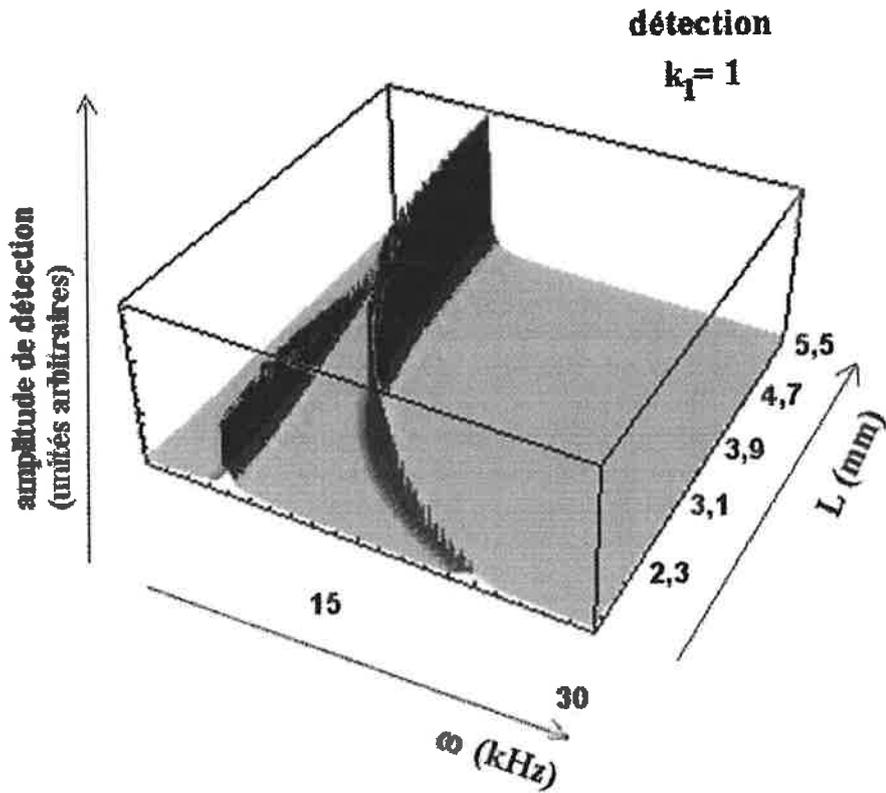


Figure IIA3.2.15 : Amplitude de détection du buzzer en fonction de la longueur de la fibre et de la fréquence d'excitation externe du système

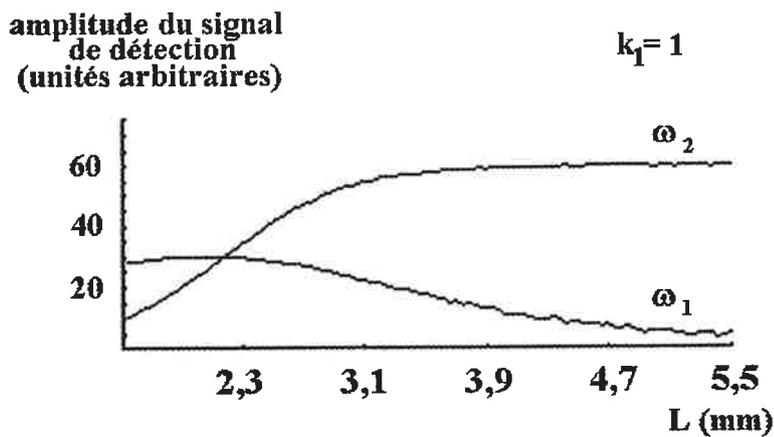


Figure IIA3.2.16 : Maxima d'amplitude de détection du buzzer en fonction de la longueur L de la fibre.

L'amplitude de vibration du buzzer est maximum à la fréquence ω_2 , proche de sa fréquence propre ω_{20} , lorsque la longueur de la pointe dépasse la valeur critique L_c du couplage maximum. Mais dans cette situation, le buzzer est peu influencé par la vibration de la pointe. La courbe IIA.3.2.16 montre que le capteur aura une sensibilité meilleure si les pointes restent courtes ($L < 3$ mm). Pour atteindre une sensibilité de détection suffisante, il peut être intéressant d'insérer au niveau du buzzer un amplificateur miniaturisé..

Quand un échantillon est approché de la pointe, l'amplitude du mouvement de la pointe va diminuer comme je l'ai illustré par les courbes IIA.3.2.13 et IIA.3.2.14. Cet effet va modifier l'amplitude de vibration du buzzer. Pour déterminer les conditions dans lesquelles le buzzer est un capteur sensible de la distance pointe-échantillon, il est essentiel de modéliser la variation du signal piézoélectrique quand la pointe subit un amortissement supplémentaire dû à l'approche de l'échantillon. La situation envisagée est la plus restrictive, celle de l'interaction avec des forces de Van der Waals, pour lesquelles l'amortissement subi par la pointe est le moins violent. La figure IIA.3.2.17 montre chaque courbe tracée pour chaque longueur de pointe donnée. La fréquence correspondante est déduite de la résolution des équations (IIA.3.2.15), avec le jeu de paramètres initial. L'amortissement supplémentaire subi par la pointe varie comme d^{-3} , où d est la distance en nanomètres entre la pointe et l'échantillon.

Lorsque la longueur de la pointe est inférieure à la valeur L_c pour laquelle le couplage entre le buzzer et la pointe est maximum (avec les valeurs du modèle, cela correspond à $L \approx 3$ mm) le signal de détection chute très rapidement sur une dizaine de nanomètres quand la distance pointe-échantillon diminue. Le système "buzzer + pointe" est alors un capteur très sensible de distance. Quand L vaut L_c , la sensibilité du capteur est maximum puis le signal chute. Quand L est sensiblement plus élevée que L_c , le signal de détection augmente quand la pointe s'approche de l'échantillon. Le système reste un capteur de distance mais sa sensibilité est très réduite car il faut détecter non une extinction de signal mais une variation de signal, faible par rapport au signal détecté quand pointe et échantillon sont loin. La sensibilité du buzzer aux fréquences d'oscillation correspondantes, faibles par rapport aux fréquences propres de résonance du buzzer, est trop insuffisante. Lorsque la détection s'opère à ω_2 , la situation est identique sauf à $L \approx L_c$ pour laquelle la sensibilité est accrue.

En pratique, cette situation ne peut être exploitée, car le signal augmente quand la distance pointe- échantillon diminue et aucun critère ne permet de s'arrêter avant le contact. C'est ce que montre la courbe sur la figure IIA.3.2.18.

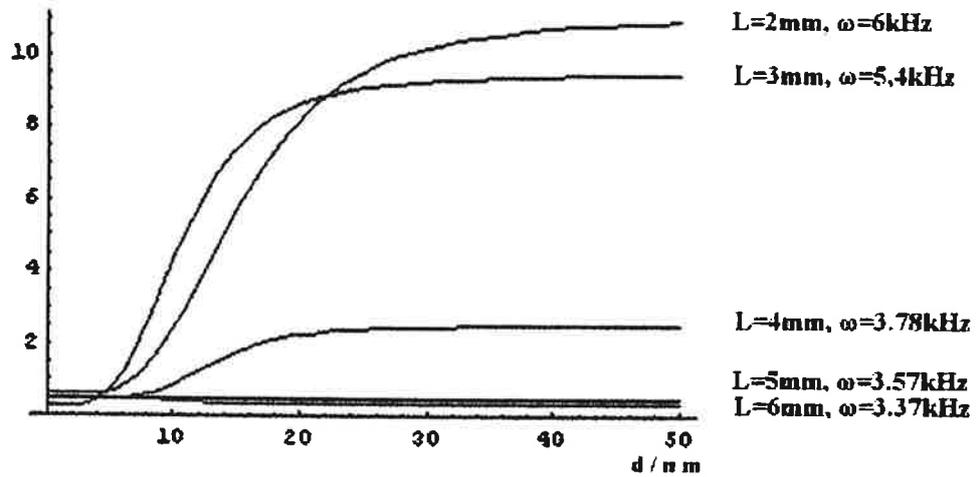
Ce capteur sera efficace si l'oscillateur le plus raide est la pointe ce qui compte tenu des valeurs du modèle, correspond à une longueur maximale de pointe inférieure à la longueur critique L_c . En pratique, il est donc impératif que la pointe soit courte.

Dans la figure IIA.3.2.19 j'ai représenté les courbes correspondant aux mesures expérimentales réalisées sur un buzzer donné. Les valeurs mesurées des fréquences de résonances du système sont représentées en fonction des différentes longueurs de pointes utilisées. Ces courbes montrent clairement la forme caractéristique « d'anticroisement » entre les résonances de ces deux oscillateurs couplés. Dans la région centrale autour de $L = 2$ mm, on ne peut plus considérer les deux oscillateurs comme indépendants et leur interaction mutuelle se traduit par une modification des fréquences propres de résonance de chaque oscillateur. Dans la zone d'anticroisement, l'écart entre les fréquences observées quantifie la valeur du couplage entre les oscillateurs. Sur les courbes de la figure IIA.3.2.19, représentées en échelle logarithmique, j'ai tracé une droite joignant les régions asymptotiques des résonances des pointes longues aux résonances des pointes courtes. Cette droite représente les fréquences de résonance de pointes libres (non couplées au levier) en fonction de leur longueur. Elle présente un coefficient directeur $a = -2$, ce qui permet, en fonction de la longueur de pointe L en millimètre, d'établir la relation exprimant en kHz sa fréquence de résonance ν :

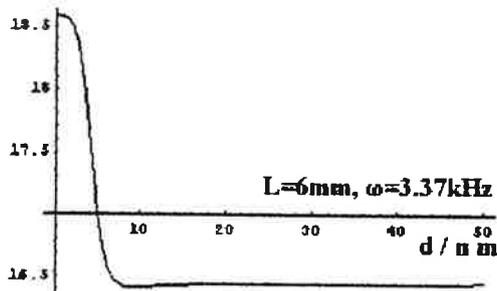
$$\nu = 75 / L^2$$

L'accord théorie/expérience est très satisfaisant. Le jeu des paramètres qu'il a fallu modifier pour obtenir cet accord s'explique facilement d'après la discussion précédente. Les valeurs des raideurs k_1 et k_2 influent directement sur la valeur de l'asymptote horizontale qui coïncide avec la fréquence propre de résonance du buzzer seul et sur la pente de la deuxième asymptote. Les coefficients de frottement influent essentiellement sur les amplitudes de vibration qui n'ont pas fait l'objet d'une comparaison théorie/expérience. Leurs valeurs n'ont pas été modifiées.

Intensité (u. a.)



Intensité (u. a.)



Intensité (u. a.)

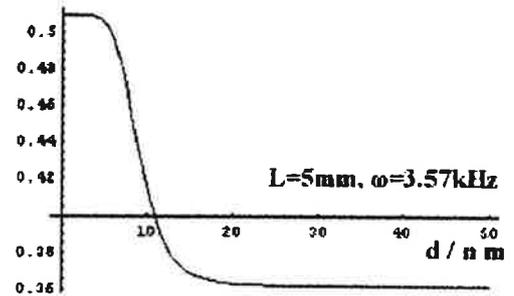


Figure IIA3.2.17 : Evolution de l'amplitude du signal de détection du capteur lors de l'approche de la fibre et de l'échantillon pour des valeurs données du couple (L, ω_1) , calculées avec les paramètres de référence. Les courbes sous la figure principale sont des agrandissements des courbes tracées pour $L=5\text{mm}$ et $L=6\text{mm}$.

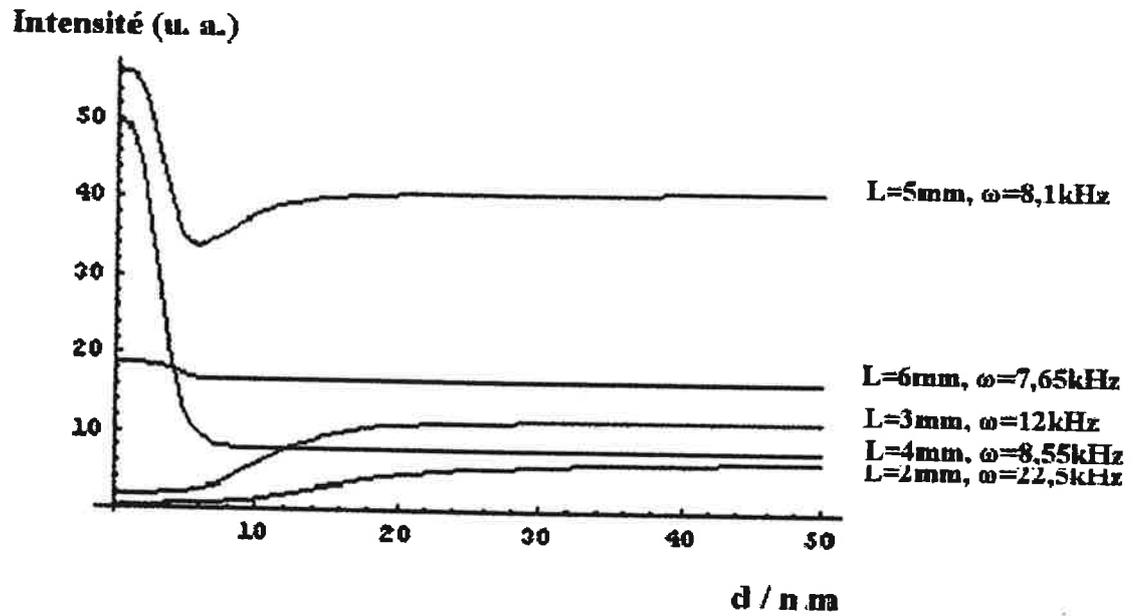


Figure IIA3.2.18 : Evolution de l'amplitude du signal de détection du capteur lors de l'approche de la fibre et de l'échantillon pour des valeurs données du couple (L, ω_2) , calculées avec les paramètres de référence.

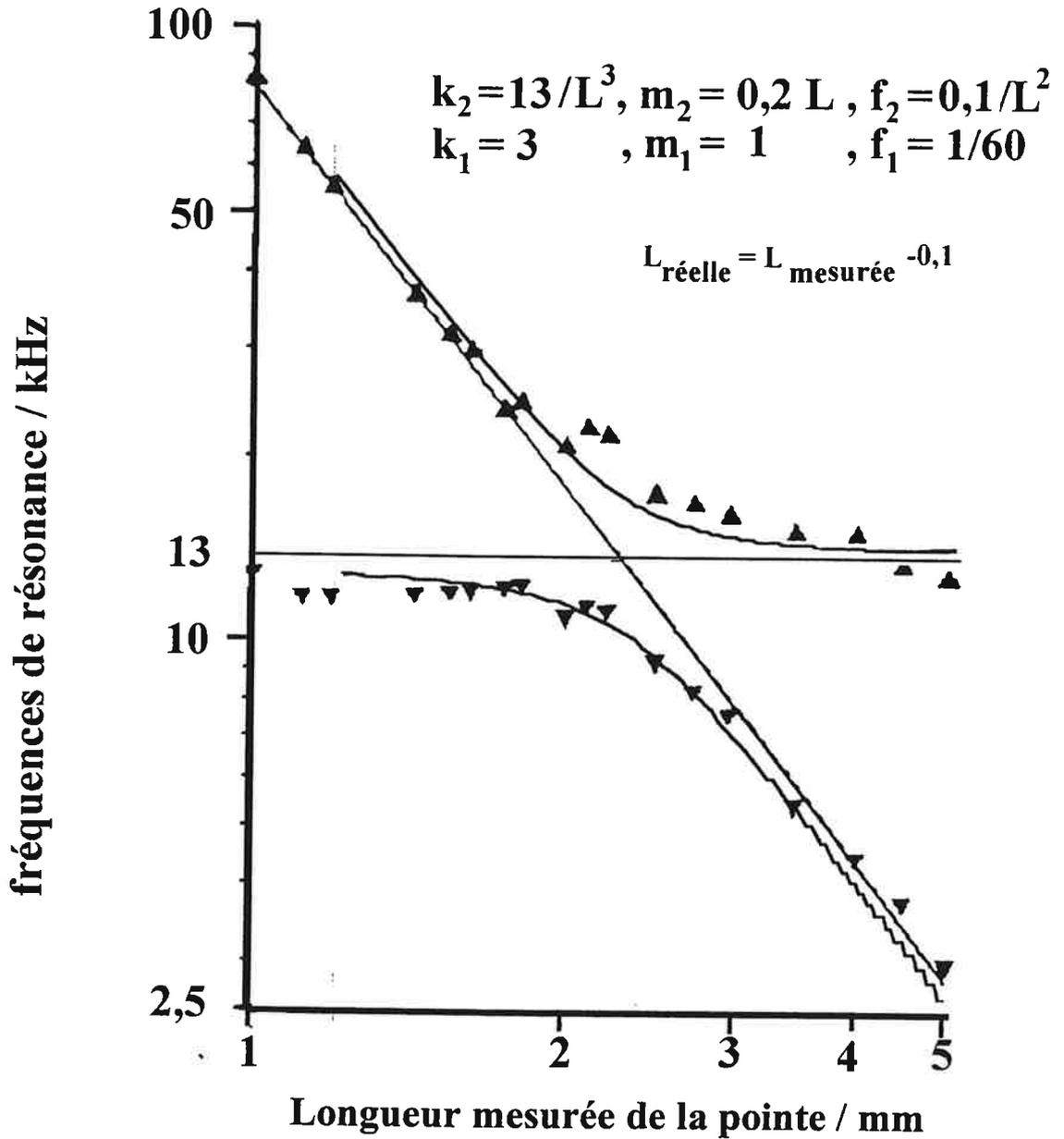


Figure IIA3.2.19 : Comparaison modèle/expérience pour un buzzer donné.
 Les paramètres optimum sont donnés sur la figure.

Un bon accord a été obtenu avec les valeurs de référence des masses, ce qui confirme que leur ordre de grandeur est réaliste. Avec ce jeu de paramètres toutefois, il n'a pas été possible de trouver une valeur correcte de la longueur critique L_c . Pour en rendre compte, le calcul a été réalisé avec une variable L égale à $L_{\text{mesurée}} - 0,15$ mm. Or la longueur utile de la pointe a été mesurée avec un microscope qui exclut une telle erreur. Cette différence s'explique, par contre, par la difficulté de déterminer avec précision le point d'ancrage de la pointe et du buzzer.

La figure IIA.3.2.20 permet de déterminer la dynamique réelle du détecteur. La courbe représente l'amortissement de la vibration de la pointe en fonction de son approche vers la surface de l'échantillon, constitué d'une lamelle de verre parfaitement propre. La pointe est une fibre optique ayant une fréquence de résonance centrée sur 26 kHz avec un facteur de qualité $Q = 66$. La tension d'excitation appliquée (0,4 V) entraîne une oscillation de l'extrémité de la pointe d'environ 10 nanomètres d'amplitude. Bien que les origines précises des forces d'amortissement qui peuvent agir sur la pointe sont mal connues, on peut dire qu'elles dépendent des caractéristiques de la pointe, de l'environnement, et de la nature de l'échantillon. Dans cette mesure, réalisée dans l'air à température ambiante avec un échantillon de verre, la plage d'atténuation du signal, due aux forces de friction, est comprise entre 10% et 90% de la mesure totale et représente une variation de la distance pointe échantillon de 11 nanomètres. Ces résultats montrent que ce type de détecteur piézoélectrique convient bien à la mesure des faibles forces de friction agissant sur la pointe et que, associé à un asservissement, il permet de réguler la distance pointe échantillon avec une précision meilleure que le nanomètre.

Cet asservissement est effectué par une électronique d'asservissement de microscope AFM commercial, à laquelle j'ai adapté le signal de ce détecteur. Le signal de ce dernier, d'amplitude de l'ordre du millivolt, est directement amplifié par un amplificateur à détection synchrone accordé sur la fréquence de résonance de la pointe, pour fournir un signal proportionnel à l'amortissement de la résonance, ayant une dynamique de ± 10 V compatible avec l'électronique d'asservissement.

Pour calibrer notre détecteur j'ai enregistré des images présentant des structures régulières de dimensions connues. Le chapitre IV présente ces résultats. En particulier, sur la figure IV.1 est représentée l'image d'un creux de 100 nm de diamètre dans un film de chrome de 20 nm. Le diamètre du trou mesuré sur l'image est de 119 nm soit légèrement plus grand que la taille de 100 nm attendue, ceci est du à la convolution de la structure du trou avec celle de l'apex de la pointe.

L'image de la figure IV.2 correspond à celle d'une grille de plots de chrome rigoureusement espacés d'une distance de 115 nm et ayant une hauteur de 20 nm.

Ces résultats montrent que, grâce à la détection des forces induites par la structure du relief de l'échantillon en interaction avec la pointe, le contrôle de la distance pointe échantillon, en évitant une détection optique, peut être résolu de manière très satisfaisante, par un capteur basé sur l'effet piézoélectrique, en détectant directement les variations de vibrations de la pointe. L'originalité de ce capteur est caractérisée, en particulier, par la différence très nette dans le rapport de la masse de l'élément exciteur et la masse de l'élément détecteur bien plus proche de celle de la pointe, ceci permettant d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit que ceux obtenus par les méthodes précédemment développées. De plus ce type de détecteur, de par la nature simple et robuste de ses constituants sans autre composant électronique à proximité et son faible encombrement, peut fonctionner dans des conditions d'environnements plus sévères. Il est bien adapté au domaine des basses températures.

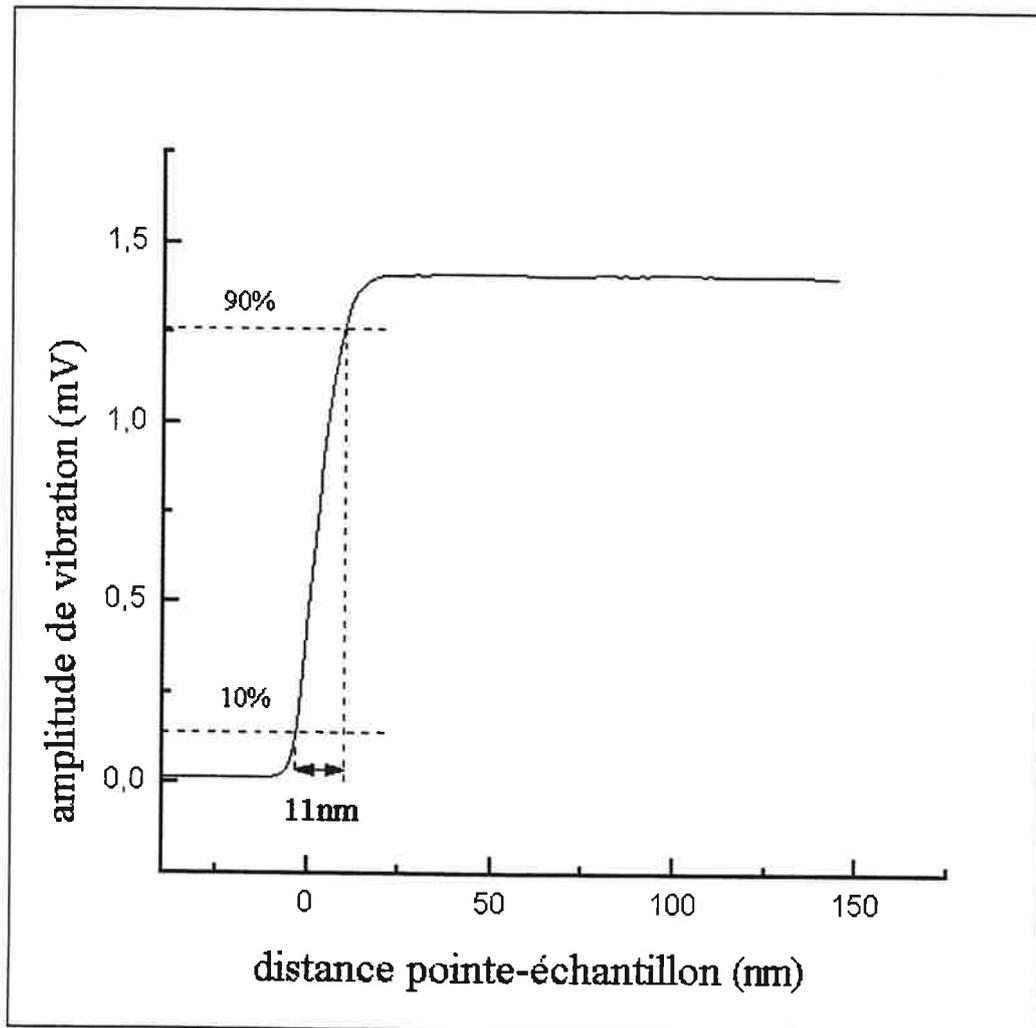


Figure IIA.3.2.20 : Amortissement de la vibration de la pointe du détecteur en fonction de sa distance avec la surface d'une plaque de verre nue.

IIA.4 - Contrôle de distances micrométriques : mesure de position dans le plan de l'échantillon:

Une première image, balayée à l'aide du scanner porte-échantillon, permet de cartographier les objets sur l'échantillon. Ensuite, malgré une erreur de déplacement de l'ordre de 5% à 10% due à l'hystérésis des actionneurs du scanner, il faut repositionner, précisément, dans la tache d'excitation, l'objet choisi pour faire l'analyse spectroscopique de son rayonnement. La précision de mesure nécessaire à ces opérations est liée au pouvoir résolvant du microscope.

La résolution latérale r dans le plan focal d'un microscope confocal peut être exprimée par la relation :

$$r = \frac{0,6\lambda}{ON} \quad (\text{IIA.4.1})$$

λ est la longueur d'onde du rayonnement de la source d'illumination, soit 600 nanomètres dans le visible, et ON l'ouverture numérique de l'objectif. Pour un objectif très ouvert (objectif à immersion, $ON = 1,3$), la résolution peut atteindre 300 nm.

L'exaltation et le confinement du champ électromagnétique se produisent sous l'apex de la pointe sur laquelle est focalisé le faisceau exciteur. L'alignement pointe-faisceau est très délicat. Il ne peut être réalisé que si le faisceau exciteur initial et la pointe sont fixes. L'image est, par conséquent, obtenue par balayage de l'échantillon. En champ proche, la position de la sonde, à la verticale du plan horizontal, est fixée au début de l'expérience.

En microscopie de champ proche sans ouverture, la résolution latérale espérée, devrait atteindre des valeurs de l'ordre des dimensions de l'apex de la pointe, soit une dizaine de nanomètres. La MOCP est beaucoup plus exigeante que la microscopie confocale quant à la précision requise pour le repositionnement de l'objet individuel dans la tache d'éclaircissement.

Mesurer la position des objets dans le plan de l'échantillon avec une telle précision est du domaine des capteurs capacitifs généralement volumineux et qui présentent une mise en œuvre difficile dans des environnements plus sévères tels que le vide et les basses températures.

Cependant nous n'avons pas besoin de connaître la position absolue des objets répartis sur l'échantillon, avec une telle précision. Si l'on est capable, par l'intermédiaire d'un système de mesure, de connaître la position relative entre l'objet et l'axe de la sonde, avec une résolution de quelques dizaines de nanomètres, alors il devient possible d'effectuer le repositionnement avec une précision de quelques nanomètres grâce à la très grande finesse de

commande des actionneurs piézoélectriques et ceci malgré l'hystérésis. Ainsi, si la distance relative mesurée atteint, de façon contrôlée, une valeur de l'ordre de la résolution du détecteur, soit 50 nm environ, le mouvement de repositionnement restant à exécuter pour atteindre le domaine de quelques nanomètres est accessible au dispositif grâce à la finesse de déplacement du scanner sur de petites distances.

Le contrôle du positionnement est alors directement réalisé par la détection du signal émis par le nanoobjet. L'erreur apportée par l'hystérésis de l'actionneur sur ce dernier déplacement sera au plus de 5 nm. Imager des objets en champ proche, avec une telle résolution, nécessite de contrôler la position relative de l'objet et de la sonde avec une précision meilleure que la résolution. C'est le rôle de la linéarisation par étalonnage du système de mesure qui fournira la calibration des images.

Les détecteurs utilisés doivent présenter un faible volume d'intégration pour être placés au plus près de la zone de travail ou sur les éléments mobiles du microscope. Les contraintes mécaniques liées aux forces de rappel dues au montage et aux connexions électriques doivent être en rapport avec les forces exercées par les actionneurs utilisés pour ne pas perturber la précision de mouvement souhaitée ni la reproductibilité des mesures. Ils doivent, également, pouvoir fonctionner jusqu'aux températures cryogéniques (quelques °K) pour réaliser des images à haute résolution spectrale.

La vitesse de réponse de ces détecteurs doit correspondre aux capacités d'exploitation de leurs signaux par le système auquel ils sont destinés. Un système d'asservissement de position peut réclamer une vitesse de réponse du détecteur plus grande (quelques dizaines de microsecondes) que celle nécessaire à un simple enregistrement de la mesure (quelques millisecondes) par un système informatique. De plus, la construction d'une image pouvant durer plusieurs dizaines de minutes, le détecteur devra avoir une bonne stabilité pour garantir la précision des mesures au cours du temps.

Comme je l'ai mentionné dans le chapitre IIA.2, deux types de capteurs optiques présentent des caractéristiques intéressantes pour réaliser des détecteurs précis, fiables et versatiles qui répondent à l'ensemble des mesures nécessaires au contrôle des positions submicroniques des différents éléments mobiles, sur les microscopes que nous avons développés. Le détecteur unidimensionnel de type PSD et son électronique sont des éléments entièrement commerciaux dont j'ai décrit les caractéristiques principales au chapitre IIA.2. Je rappelle que leur plage de mesure est comprise entre 100 nanomètres et quelques millimètres et qu'ils n'ont pas été testés en environnement cryogénique. Dans le chapitre suivant, je détaillerai la réalisation d'un capteur de déplacements de résolution submicronique fondé sur

un photodétecteur quatre quadrants offrant les avantages d'obtenir une information dans deux directions orthogonales et de fonctionner aussi bien aux très basses températures qu'à température ambiante.

Pour repérer les déplacements du scanner, le montage consiste à fixer de manière très stable le capteur sur le bâti du microscope, sa face sensible située dans un plan horizontal parallèle au plan du scanner. La partie mobile du détecteur, constituée par l'extrémité d'une fibre optique monomode, est fixée sur l'armature mobile du scanner qui supporte le porte échantillon. La fixation de la fibre est réalisée de manière à présenter son axe optique perpendiculaire et au centre du plan photosensible du capteur lorsque le scanner est à sa position de repos.

Comme je l'ai dit dans le paragraphe IIA.1, une détection de la position du spot dans chaque direction orthogonale X et Y, ne peut être obtenue de manière efficace que pour des déplacements linéaires inférieurs à la taille du spot éclairant sa surface soit 300 microns. Le détecteur délivre deux tensions qui dépendent des coordonnées X,Y du centre du spot, donc de la position de l'axe de la fibre mobile, par rapport au centre du capteur fixe.

Le choix d'une fibre optique monomode présente plusieurs intérêts. Le cœur d'une telle fibre, d'un diamètre plus faible (9 μm) de presque un ordre de grandeur que celui d'une fibre multimode (50 μm à 90 μm), réalise un filtrage des fluctuations spatiales de la source laser injectée. Le faisceau de sortie a une divergence faible de l'ordre de 0,1 et le spot lumineux résultant est beaucoup plus petit. Cela permet d'éloigner l'extrémité de la fibre de la fenêtre du capteur, d'une distance confortable de l'ordre de 2 millimètres, tout en conservant un impact d'un diamètre de l'ordre de 200 μm sur sa surface. Cette taille de spot est optimale pour couvrir un domaine de déplacement de 200 μm . La taille de l'impact lumineux peut varier de quelques microns en fonction du domaine d'excursion vertical du scanner limité à quelques dizaines de microns. Cette variation peut apparaître au cours de la mise au point du microscope, avant de commencer une image, et n'introduit pas d'erreur significative sur la mesure des positions horizontales.

Pour obtenir une position continûment définie et une bonne linéarité, sur l'étendue du déplacement, plusieurs précautions doivent être observées.

La mesure n'est plus définie dès que l'une des photodiodes du capteur ne reçoit plus le flux lumineux. Pour mesurer une translation d'amplitude $-\Delta x$, $+\Delta x$, la taille minimale du spot lumineux sur le détecteur devra être égale à $2 \Delta x$. La distance relative entre la fibre optique et le capteur détermine le domaine maximum de déplacement qui pourra être mesuré. La taille minimum du spot laser acceptable, en cas de petits déplacements, dépend directement de l'architecture du capteur qui présente des bandes centrales orthogonales inactives de 30 microns. La non-linéarité qu'elles introduisent dans la mesure devient négligeable si la

taille du spot excède largement cette valeur. Pour le domaine de repositionnement de l'échantillon j'ai retenu une plage de translation, comprise entre $-100 \mu\text{m}$ et $+100 \mu\text{m}$, correspondant à un diamètre du spot de $200 \mu\text{m}$.

La courbe de réponse du capteur, dont le modèle théorique est développé dans le chapitre suivant, présente un déplacement régulier du spot lumineux. Son allure, pour le domaine de mesure choisi, est schématisée par la figure ci-dessous

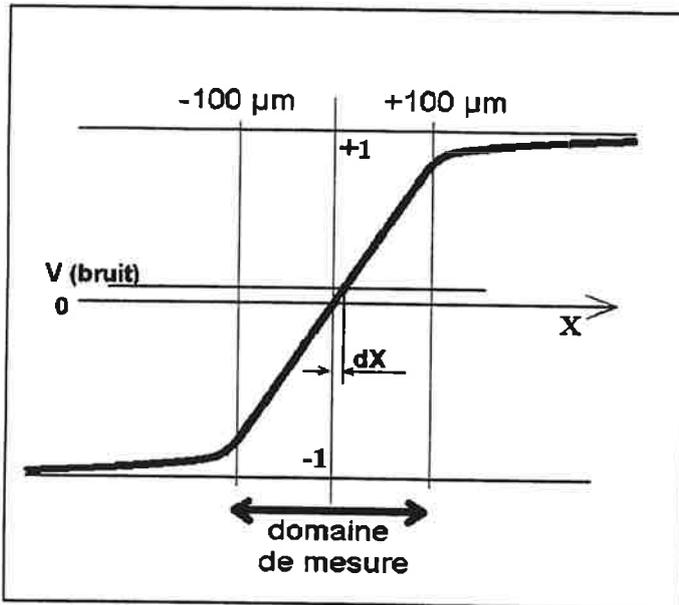


Figure IIA.4.1.2 : Réponse du capteur 4 quadrants pour un spot de $200 \mu\text{m}$ de diamètre. Limite de résolution dX due au bruit optique de la source $V(\text{bruit})$.

La pente de la courbe dépend du diamètre du spot, elle croît lorsque le diamètre diminue. Les fluctuations spatiales du faisceau de la source laser, représentées sur cette figure, par $V(\text{bruit})$, apportent une imprécision dX sur la mesure. En sortie de fibre monomode ce bruit n'est plus significatif.

Dans notre montage, nous utilisons une diode laser émettant à une longueur d'onde fixe de 830 nm . Nous avons optimisé sa puissance de fonctionnement pour obtenir en sortie de fibre optique un faisceau stable et gaussien délivrant une puissance de $1,6 \text{ mW}$ soit $400 \mu\text{W}$ par photodiode.

Le bruit électronique du capteur, lié au flux lumineux qu'il reçoit et à son rendement quantique, dépend du nombre aléatoire d'électrons et de trous qui participent à l'établissement du photo-courant dans la jonction de la photodiode. Il s'agit d'un bruit blanc ou « bruit de grenaille » à distribution de Poisson. L'expression de son courant I_b est donnée par la relation :

$$I_b = \sqrt{2 \cdot e \cdot I_e \cdot B} \quad (\text{IIA.4.1.1})$$

soit pour le flux optimal de $400 \mu\text{W}$, $I_b = 0,95 \text{ nA}$, où e est la charge de l'électron, I_e le courant dans la jonction qui dépend de la puissance lumineuse et du rendement quantique du capteur ($0,7 \text{ A/W}$), et B la bande passante utile égale à 10 kHz .

J'ai apporté un soin particulier à la réalisation du conditionneur électronique pour concevoir un détecteur stable et fidèle. Comme le montre le schéma de la fig. IIA.4.1.3, les photodiodes sont à cathode commune et chaque anode est reliée à un premier étage U1, U2, constitué de deux circuits comportant chacun deux amplificateurs de précision LTC1051 [49]. Ces circuits assurent la conversion du courant donné par chaque photodiode pour obtenir, à la sortie de cet étage, les tensions A,B,C et D correspondantes. Pour minimiser l'imprécision apportée par cet étage j'ai choisi le circuit LTC1051 pour sa faible tension d'offset d'un maximum de $5 \mu\text{V}$, avec une très faible dérive maximale en température de $0,05 \mu\text{V}/^\circ\text{C}$. Son courant de bruit d'entrée est négligeable car, voisin de 10 pA , il est inférieur de deux ordres de grandeur devant le bruit du capteur. Son temps de montée de $4 \text{ V}/\mu\text{s}$ et son produit gain-bande passante de $2,5 \text{ MHz}$ assurent une réponse rapide. Sa tension d'alimentation issue d'une alimentation stabilisée $\pm 15 \text{ V}$ est abaissée à $\pm 5 \text{ V}$ à l'aide de diodes Zener et il possède une cellule de filtrage supplémentaire. Les résistances de charge $R_{1A,B,C,D}$ ont été choisies et appariées, avec une précision meilleure que 1 pour 1000, pour obtenir un rapport de conversion identique pour chaque photodiode. Après conversion courant-tension on obtient en sortie du premier étage, pour chaque photodiode, les tensions respectives A,B,C et D. Compte tenu de la puissance de la source laser ($400 \mu\text{W}$), de la sensibilité optique du capteur ($0,7 \text{ A/W}$) pour la longueur d'onde utilisée et de la valeur de R_1 , une tension maximale de $2,5 \text{ V}$ est obtenue sur chacune des quatre sorties du premier étage. Un signal plus élevé entraînerait, sur les étages secondaires, un dépassement de la dynamique, imposée à 10 V et dégraderait la linéarité de mesure. A partir de ces valeurs, les coordonnées X et Y, qui correspondent à la position du centre du spot, peuvent être calculées indépendamment des fluctuations d'intensité lumineuse de la source laser ou de sensibilité optique du capteur, à l'aide des opérations analogiques réalisées par le conditionneur:

$$X = [(A+D)-(B+C)] / (A+B+C+D) = X_1 / S \quad (\text{IIA.4.1.2})$$

$$Y = [(A+B)-(C+D)] / (A+B+C+D) = Y_1 / S \quad (\text{IIA.4.1.3})$$

Le second étage détermine la valeur des opérands utilisés dans ces expressions. Ces opérations sont réalisées par trois amplificateurs opérationnels de précision [50] (OPA2277,

Burr-Brown). Leurs caractéristiques sont les suivantes : une faible tension d'offset de l'ordre de 50 μV , une faible dérive maximale en température de 0,25 $\mu\text{V}/^\circ\text{C}$ et un faible bruit d'entrée de 0,8 μV . L'amplificateur U3A, (respectivement U3B), établit en sortie, le terme $(A+D)-(B+C)$, (respectivement $(A+B)-(C+D)$), qui correspond aux variations suivant la direction X, (respectivement Y). Le terme somme des signaux $(A+B+C+D)$ reçus par les quatre photodiodes est délivré à la sortie de l'amplificateur U4A. L'utilisation de réseaux de résistances de précision R2A à R4E couplés à ces amplificateurs permet de conserver l'unicité du gain dans le calcul de ces opérands.

La normalisation des signaux par le signal somme permet de s'affranchir des fluctuations d'intensité de la source lumineuse. Elle est obtenue, pour chaque direction, par deux diviseurs analogiques (AD734 Analog Devices) [51] dont le mode opérationnel, pour la direction X, est décrit par la relation :

$$W = 10 \frac{X_1}{S} \quad (\text{IIA.4.1.4})$$

et respectivement pour la direction Y, où W est la sortie du circuit diviseur.

Les tensions de bruit sont évaluées pour une bande passante utile $B = 10 \text{ kHz}$. Le bruit du capteur, composé du courant d'obscurité et du bruit « de grenaille », est de l'ordre de 1,2 nA pour une tension de polarisation de 5 V et correspond à une tension de bruit $V_{bcap} = 12 \mu\text{V}$ en sortie du premier étage du détecteur. La tension efficace de bruit thermique V_{bR1} de la résistance $R_{1A,B,C,D}$ de 10 k Ω à une température T de 300°K est donné par la relation :

$$V_{bR1} = \sqrt{4 \cdot k \cdot T \cdot R \cdot B} \quad (\text{IIA.4.1.5})$$

soit un bruit de 1,3 μV , où $k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ est la constante de Boltzmann. Le bruit de courant de l'amplificateur est négligeable, sa tension de bruit V_{bop1} est de l'ordre de 0,8 μV . Soit un bruit total pour une voie du premier étage

$$V_{b1} = \sqrt{V_{bcap}^2 + V_{bop1}^2 + V_{bR1}^2} \quad (\text{IIA.4.1.6})$$

soit $V_{b1} \cong 12,5 \mu\text{V}$. On procède de manière identique pour obtenir le bruit V_{b2} en sortie d'une voie de sommation du second étage. L'amplificateur OPA2277, utilisé en gain unité, a une tension de bruit propre $V_{bop2} = 0,8 \mu\text{V}$. Le courant d'entrée étant négligeable, seules, la tension de bruit thermique V_{bR2} apportée par les six résistances $R_{2A,B,C,D,E,F}$ de 10 k Ω , et les tensions de bruit V_{b1} du premier étage présentes sur les résistances $R_{2A,B,C,D}$, contribuent au bruit V_{b2} .

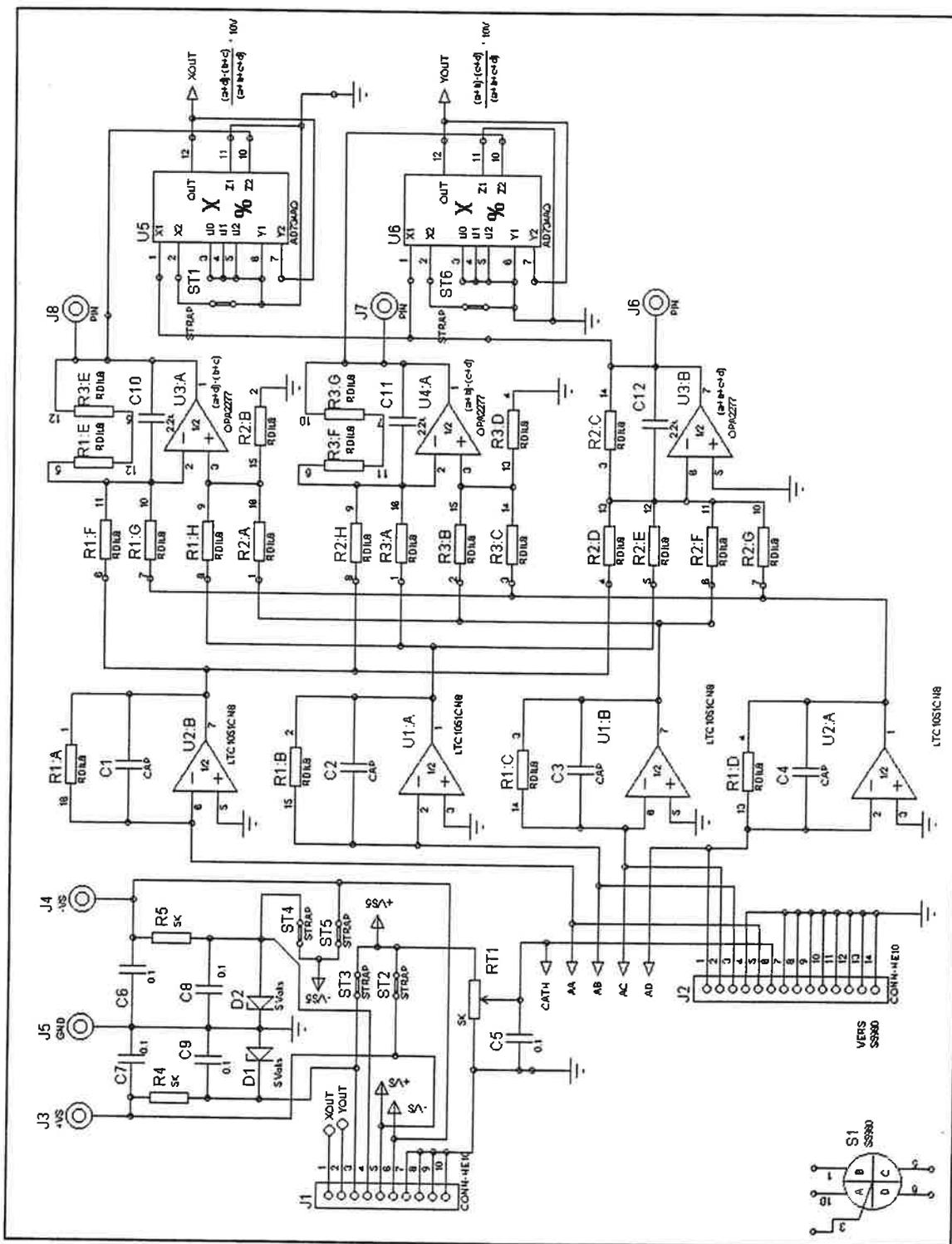


Figure IIA.4.1.3 (nano4quad) Conditionneur du capteur 4 quadrants, xout et yout valeurs ± 10 V de la position.

$$V_{b2} = \sqrt{V_{bop2}^2 + 6V_{bR2}^2 + 4V_{b1}^2} \quad (\text{IIA.4.1.7})$$

soit $V_{b2} \cong 25,2 \mu\text{V}$ identique sur chacune des sorties des trois amplificateurs $U3_{A,B}$ et $U4_A$. Pour le dernier étage le bruit dynamique maximum $V_{b\max}$ attendu en sortie du détecteur pour chaque direction X et Y est le résultat de la contribution du bruit propre du circuit diviseur $V_{b\text{div}} = 100 \mu\text{V}$ et des bruits d'entrée, attachés à chacune des tensions des deux opérandes de la division, multiplié par le gain constant $G = 10$ du diviseur. Il est donné par la relation :

$$V_{b\max} = G \cdot \sqrt{V_{b\text{div}}^2 + (2V_{b2})^2} \quad (\text{IIA.4.1.8})$$

soit $V_{b\max} \cong 100 \mu\text{V}$ pour une dynamique totale du signal de sortie comprise entre $\pm 10 \text{ V}$. Ce bruit représente la limite théorique de résolution du détecteur ainsi réalisé. Malgré le soin apporté à ce conditionneur, le bruit mesuré est supérieur de plus d'un ordre de grandeur à la valeur attendue. Les causes principales sont : le bruit optique introduit par l'instabilité haute fréquence de la source laser, l'effet d'antenne sur les connexions longues (2 m) reliant le capteur au conditionneur. Pour réduire ce bruit, j'ai réalisé un filtrage soigné des fréquences supérieures à 10 kHz sur les deux derniers étages. Dans ces conditions, le bruit mesuré est réduit à 1 mV sur une dynamique totale de $\pm 10 \text{ V}$. Pour un domaine de mesure de $-100 \mu\text{m}$ à $+100 \mu\text{m}$ et un diamètre de spot de $200 \mu\text{m}$, le dispositif permet d'atteindre une résolution ultime de 20 nm soit un facteur de sensibilité voisin de 10^{-4} .

Cependant l'erreur sur la mesure absolue de position, apportée principalement par le circuit diviseur AD734 est d'un ordre de grandeur supérieure au bruit. En effet l'erreur statique totale définie par le fabricant est constituée de termes constants tels une erreur de gain, un offset et une non-linéarité. Pour une valeur du dénominateur S telle que $0,1 \text{ V} \leq X_i \leq 10 \text{ V}$, cette erreur est au plus égale à 0,1 % de la pleine échelle de 10 V. Outre la nécessité d'étalonner le détecteur avant son montage sur le microscope, on remarquera que la qualité du circuit diviseur est déterminante dans la précision de mesure du dispositif.

Remarquons que cette imprécision n'est pas critique dans nos expériences car nous ne cherchons pas à obtenir une mesure absolue mais un repositionnement. Les deux qualités exigées sont donc un faible bruit, assurant la résolution, et une grande reproductibilité des mesures, ce que satisfait ce dispositif.

En résumé, le détecteur conçu autour de ce capteur, utilise une méthode sans contact permettant de mesurer les positions d'un élément mobile dans un domaine maximum de

déplacement de 200 μm avec une résolution de 30 nm. Il répond parfaitement aux exigences des expériences réalisées. Le faible encombrement, la robustesse du capteur et la simplicité de guidage fibré du spot lumineux en font un système de mesure versatile ayant les avantages d'un capteur intégré pouvant s'installer dans des montages compacts et fonctionner dans toutes les orientations jusqu'aux températures cryogéniques. Sa faible dérive en température et son procédé différentiel de mesure du signal lui confèrent une grande fidélité malgré les variations de l'environnement et les fluctuations d'intensité de la source. Son temps de réponse, inférieur à 200 μs , peut être mis à profit dans le montage d'un actionneur rapide asservi en position pour contrôler des micro-translations. Sa résolution typique de 30 nanomètres et sa dynamique supérieure à 6.10^3 permettent de contrôler, précisément et sur un large domaine, les déplacements latéraux du scanner du microscope pour repositionner un objet choisi dans la zone de champ proche.

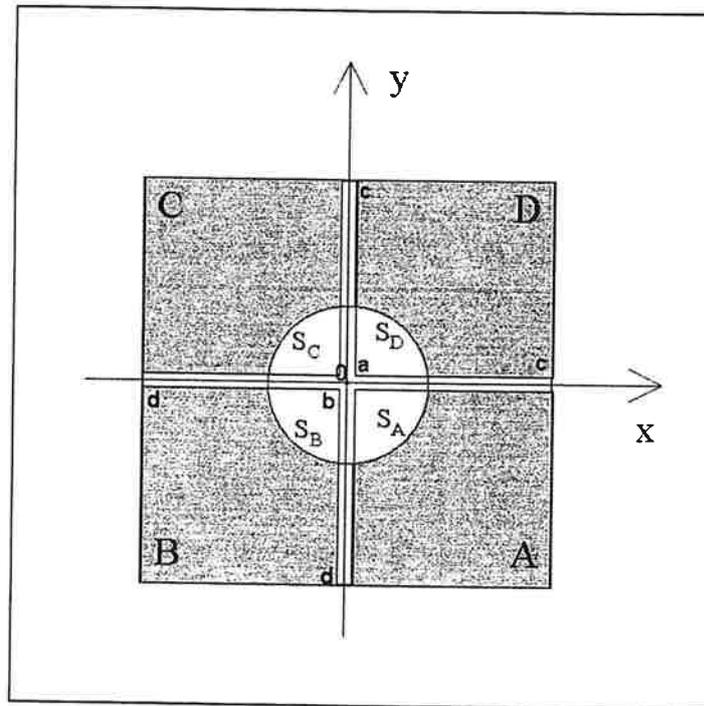


Figure IIA.4.2.1: Schéma de la photodiode 4 quadrants. L'origine 0 des axes x et y est au centre du capteur. Pour les deux directions X et Y et pour les valeurs positives, a ($15\ \mu\text{m}$) et c ($2500\ \mu\text{m}$) représentent les bords du gap central et les extrémités de la photodiode, pour les valeurs négatives $b = -15\ \mu\text{m}$ et $d = -2500\ \mu\text{m}$. La tache lumineuse, projetée par l'extrémité de la fibre, est représentée par le disque blanc.

IIA.4.2 - Etalonnage du détecteur optique de position

Comme je l'ai expliqué au chapitre IIA.1. Chaque photodiode engendre un courant I proportionnel au flux lumineux reçu et à la surface de chaque zone éclairée par ce flux. La figure IIA.4.2.1 présente le cas où l'éclairement est centré.

La réponse en tension, mesurée lorsqu'on effectue un déplacement unidirectionnel, dépend de la distribution spatiale du flux lumineux dans la tâche d'éclairement. Lorsque cette source est émise par une fibre monomode, la répartition du flux est gaussienne.

Le modèle élaboré pour déterminer la réponse du capteur est fondé sur l'expression permettant d'obtenir le flux I_0 reçu par un quadrant éclairé par un faisceau de profil gaussien de waist w dont l'intensité I est donnée par l'expression suivante :

$$I = I_0 e^{-\frac{(X-x)^2}{2w^2}} e^{-\frac{(Y-y)^2}{2w^2}} \quad (\text{IIA.4.2.1})$$

x et y sont les coordonnées du centre de la tâche laser et X et Y celles d'un point quelconque de la tâche. La procédure d'étalonnage consiste à enregistrer les variations du signal donné par le capteur 4 quadrants en fonction du déplacement mesuré de la fibre. Pour obtenir une courbe d'étalonnage du capteur directement exploitable, il est nécessaire de faire coïncider l'origine du balayage et le centre du capteur. Cette procédure nécessite un positionnement de la fibre au démarrage des mesures très précis, dont le contrôle absolu est très délicat voire impossible. Il est donc nécessaire de développer un modèle qui tienne compte de cette erreur à l'origine et qui permet de reconstruire a posteriori la courbe d'étalonnage juste. Il est clair que ce positionnement initial de la fibre va varier d'une expérience à l'autre quand le capteur sera utilisé pour mesurer des déplacements et que l'étalonnage préalable du capteur nécessitera de dresser un jeu de courbes suffisant pour quadriller le capteur.

Le modèle prend en compte cet effet en supposant que les valeurs mesurées de la position du centre de la fibre correspondent en réalité à $x-X_0$ et $y-Y_0$ où X_0 et Y_0 sont les coordonnées de la position initiale de la fibre.

Les dimensions des bornes du domaine de mesure sont définies par la géométrie du capteur montrée sur la figure IIA.4.2.1. Le gap central de $30 \mu\text{m}$ détermine les bornes de départ a et b , respectivement égales à $15 \mu\text{m}$ et $-15 \mu\text{m}$ et la largeur du capteur de 5 mm fixe les bornes extrêmes, c et d égales à $2500 \mu\text{m}$ et $-2500 \mu\text{m}$. Calculons la variation du flux reçue par le quadrant D en supposant que la fibre se déplace dans la direction X ($y=0$):

$$I_D = I_0 \int_a^c e^{-(X-x+X_0)^2/2w^2} dX \times \int_a^c e^{-(Y+Y_0)^2/2w^2} dY \quad (\text{IIA.4.2.2})$$

I_0 est l'intensité du flux au centre du spot. L'expression IIA.4.3 se calcule aisément. Elle s'écrit :

$$I_D = I_0 \frac{\pi w^2}{2} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{(c-x+X_0)}{w\sqrt{2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{(a-x+X_0)}{w\sqrt{2}} \right) \right] \times \left[\operatorname{erf} \left(\frac{(c-Y_0)}{w\sqrt{2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{(a-Y_0)}{w\sqrt{2}} \right) \right] \quad (\text{IIA.4.2.3})$$

La fonction d'erreur erf est définie de la façon suivante :

$$\int_0^\alpha e^{-X'^2} dX' = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \operatorname{erf}(\alpha)$$

Le flux reçu par chacun des trois autres quadrants se calcule de façon similaire et on obtient :

$$I_C = I_0 \frac{\pi w^2}{2} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{(d-x+X_0)}{w\sqrt{2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{(b-x+X_0)}{w\sqrt{2}} \right) \right] \times \left[\operatorname{erf} \left(\frac{(c-Y_0)}{w\sqrt{2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{(a-Y_0)}{w\sqrt{2}} \right) \right] \quad (\text{IIA.4.2.4})$$

$$I_B = I_0 \frac{\pi w^2}{2} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{(d-x+X_0)}{w\sqrt{2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{(b-x+X_0)}{w\sqrt{2}} \right) \right] \times \left[\operatorname{erf} \left(\frac{(d-Y_0)}{w\sqrt{2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{(b-Y_0)}{w\sqrt{2}} \right) \right] \quad (\text{IIA.4.2.5})$$

$$I_A = I_0 \frac{\pi w^2}{2} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{(c-x+X_0)}{w\sqrt{2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{(a-x+X_0)}{w\sqrt{2}} \right) \right] \times \left[\operatorname{erf} \left(\frac{(c-Y_0)}{w\sqrt{2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{(b-Y_0)}{w\sqrt{2}} \right) \right] \quad (\text{IIA.4.2.6})$$

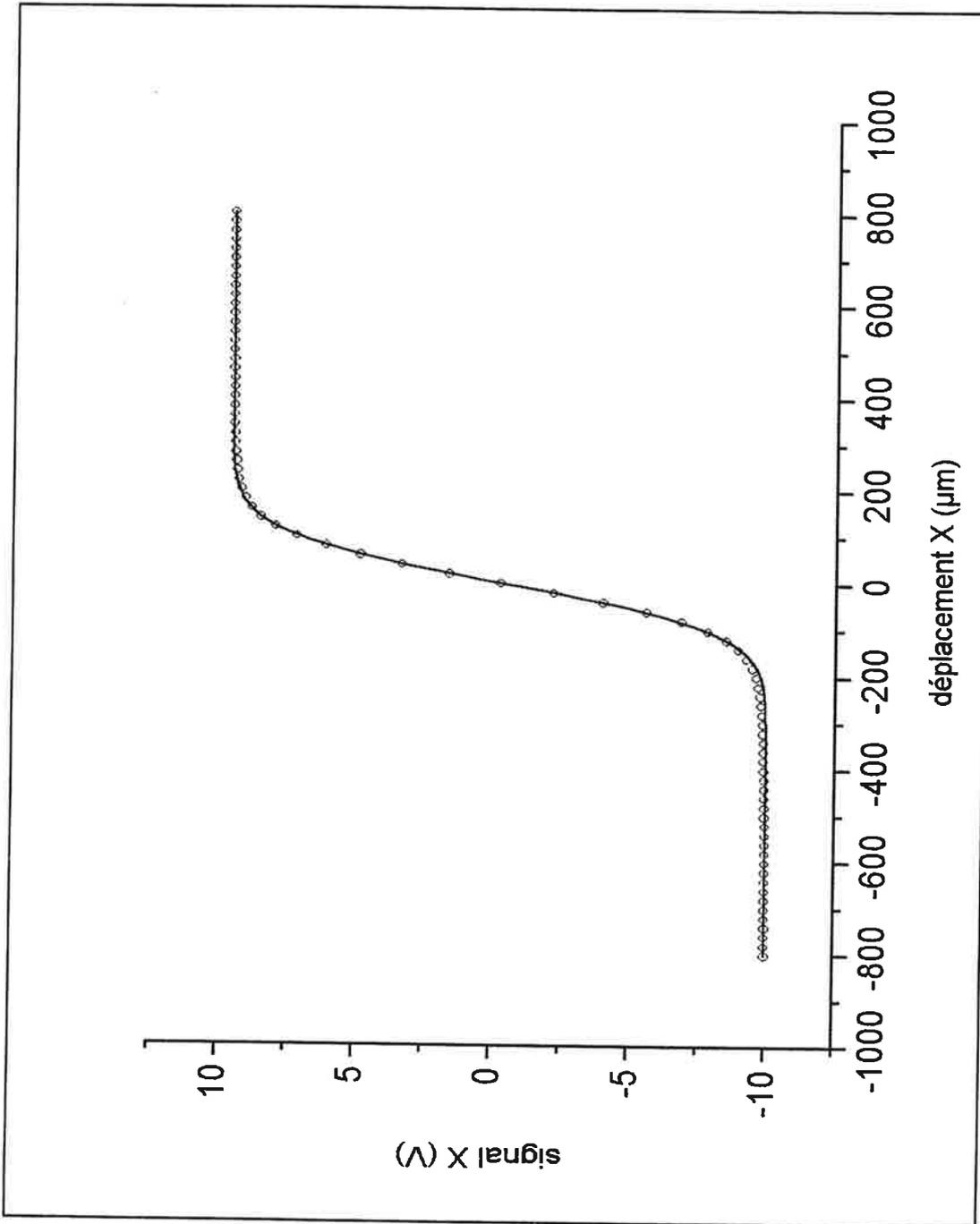


Fig. IIA.4.2.2 : Réponse du capteur 4 quadrants. Comparaison entre le déplacement X mesuré (points cerclés), et le modèle théorique (courbe en trait plein).

Pour la géométrie représentée figure IIA.4.2.1, la courbe théorique de la réponse S du détecteur en fonction du déplacement X est tracée en trait plein, sur la figure IIA.4.2.2 Elle est donnée par l'expression :

$$S = k \frac{(I_A + I_D) - (I_B + I_C)}{I_A + I_B + I_C + I_D} + \varepsilon \quad (\text{IIA.4.2.7})$$

k est l'amplitude totale du signal mesuré et ε une tension de décalage induite par le montage. La comparaison entre l'expérience et la théorie est satisfaisante. Dans cet exemple, l'erreur commise sur le centrage de la fibre au début des mesures est $X_0 = 4 \mu\text{m}$. Dans la partie centrale du domaine utile de déplacement limité à $\pm 100 \mu\text{m}$, la différence maximum entre valeur calculée du déplacement et la valeur mesurée est de l'ordre de 0,5 %. Cette précision, obtenue sur un tel domaine, montre qu'à partie d'un montage mécanique soigné du capteur, dont la référence de position centrale de repos peut être aisément déterminée, le modèle théorique suffirait à lui seul à utiliser le capteur dans de nombreuses situations, sans étalonnage systématique.

Pour effectuer la calibration du détecteur, j'ai développé un banc informatisé de mesure optique, par méthode interférométrique, fondé sur le comptage de franges d'interférence. L'interféromètre, dont le principe est montré sur la figure IIA.4.2.4, correspond au dispositif suivant.

Deux prismes sont montés en regard, le premier est fixe et le second solidaire de la partie mobile du dispositif de translation dont on veut étalonner le déplacement. Ces prismes sont orientables grossièrement à l'aide de vis de réglage fin insérées dans leur support où le jeu est éliminé grâce à des lames en chrysocale dont l'élasticité assure un positionnement précis. Ils sont réglés en sorte que leurs faces principales restent, avec une bonne précision, en vis à vis sur toute la course de déplacement de l'élément mobile. Ce système constitue un interféromètre très compact. Le faisceau incident traverse le premier prisme. Un deuxième faisceau est créé par réflexion sur la face d'entrée du prisme mobile. Ces deux faisceaux interfèrent. L'état d'interférence dépend de la distance entre les deux prismes, c'est à dire de la position de l'élément mobile. A partir de ce seul faisceau incident, il est aisé d'obtenir deux systèmes d'interférences déphasés. Pour cela, on polarise le faisceau incident à l'aide d'un polariseur rectiligne placé à 45° de l'axe $e_{//}$ du plan de déplacement. Entre les deux prismes on place une lame de phase λ/n dont les axes sont à 45° de celui du polariseur. En sortie des

prismes on obtient deux systèmes d'interférences de polarisations orthogonales et déphasés de $4\pi/n$, donnés par les équations suivantes écrites en notation complexe:

$$\mathbf{E} e^{i\omega t} = [(a_0 + a_0 \exp(4\pi d / \lambda)) \mathbf{e}_{//} + (a_0 + a_0 \exp(4\pi d / \lambda + 4\pi / n)) \mathbf{e}_{\perp}] e^{i\omega t} \quad (\text{IIA.4.2.9})$$

soit encore :

$$\mathbf{E} e^{i\omega t} = 2 a_0 [\cos(2\pi d / \lambda) \mathbf{e}_{//} + \cos(2\pi d / \lambda + 2\pi / n) e^{i2\pi / n} \mathbf{e}_{\perp}] e^{i\omega t + i2\pi d / \lambda} \quad (\text{IIA.4.2.10})$$

Dans ces expressions, λ est la longueur d'onde du faisceau, ω la fréquence correspondante, $a_0\sqrt{2}$ est l'amplitude du champ initial, d est la distance entre les deux prismes, \mathbf{E} le champ résultant à la sortie de l'interféromètre. Dans ces expressions, j'ai omis par souci de clarté de prendre en compte les coefficients de réflexion qui peuvent être eux-mêmes complexes.

Le faisceau est alors dirigé sur deux détecteurs identiques à l'aide d'une lame séparatrice et d'un miroir. L'un des détecteurs est précédé d'un polariseur rectiligne orienté selon la direction $\mathbf{e}_{//}$ et l'autre d'un polariseur rectiligne de direction orthogonale \mathbf{e}_{\perp} . Les intensités mesurées par ces détecteurs correspondent à celles d'états d'interférence déphasés de $4\pi/n$. Si n est proche de 8, les deux signaux sont en quadrature. En réalité, les réflexions sur la lame séparatrice et le miroir introduisent des déphasages supplémentaires, qu'il est néanmoins possible de compenser d'une part en jouant sur l'orientation de la lame de phase et d'autre part sur l'orientation relative des polariseurs qui n'est pas rigoureusement perpendiculaire. La lame de phase est une lame de mica proche de $\lambda/8$ à 632nm qui est la longueur d'onde incidente. Le système optique ainsi réalisé produit deux signaux en quadrature permettant à l'électronique de déterminer le sens direct ou le sens inverse du déplacement en fonction du défilement des franges.

La table numérique d'étalonnage est construite en enregistrant distinctement, pour chaque position donnée au cours du déplacement, le nombre de franges comptées et la tension du signal directement mesurée par le détecteur optique. Cet ensemble, montré sur la figure IIA.4.2.3, nécessite plusieurs fonctions pour réaliser, de manière fiable, les séries de mesures nécessaires à l'étalonnage. Ce banc d'étalonnage présente plusieurs intérêts. Il utilise un moteur de translation linéaire, conçu au laboratoire et décrit au paragraphe IIB.5, qui

fonctionne pas à pas et autorise un grand nombre de points de mesure avec une résolution nanométrique sur des déplacements de plusieurs millimètres. Le dispositif optique, nécessitant peu d'éléments, a un volume restreint et présente des qualités de simplicité, d'alignement et de stabilité essentielles pour un système interférométrique. Le capteur étant bidimensionnel, le procédé d'étalonnage, s'effectuant suivant une seule direction, devra être répété en montant le capteur suivant l'autre direction, pour obtenir une cartographie complète en X,Y.

Comme je l'ai souligné, le dénombrement des franges d'interférences, qui défilent lors du déplacement linéaire du bras mobile de l'interféromètre, suffit à mesurer la valeur absolue de son déplacement avec une grande précision. C'est une mesure importante pour réaliser un étalonnage absolu à partir d'une position de référence. La numérisation de cette valeur est obtenue par comptage électronique des franges, en distinguant le sens de défilement. En effet, la mesure est réalisée suivant une seule direction de translation. Cependant, au cours de la progression de l'élément mobile du dispositif, des aléas de déplacement, créés par des points durs ou des vibrations mécaniques, peuvent produire, à l'échelle du domaine de résolution de la mesure, des déplacements faibles dans la direction inverse. Ces déplacements de retour seront interprétés optiquement comme de nouvelles franges s'ajoutant à celles créées précédemment par le déplacement dans le sens direct qui, comptées, apporteront une erreur de mesure. La méthode qui s'affranchit de ces erreurs est la suivante. A partir d'une position d'origine, il s'agit de compter le nombre de franges, M_d pour le sens direct et M_i pour le sens inverse, apparaissant au cours du déplacement. Pour un déplacement, effectué par exemple suivant la direction X, sa valeur absolue D sera donnée par la relation :

$$D_{(X)} = \lambda/2 (M_d - M_i) \quad (\text{IIA.4.2.8})$$

où $(M_d - M_i)$ représente la somme algébrique des déplacements effectués depuis la position d'origine. La production de deux systèmes de franges déphasés d'un quart de période permet de déterminer le sens de défilement des franges et d'éliminer toute erreur de déplacement, comme je vais le décrire ci-dessous.

Les éléments nécessaires à la gestion programmée de ce banc d'étalonnage interférométrique, et représentés sur la figure IIA.4.2.3, sont les suivants :

Une carte d'interface ADA2000 (Real Time Device) implantée dans l'ordinateur permet de disposer des fonctions programmées de commande du moteur et de comptage des franges. Une carte de mesure analogique 16 bits ACL 8216 également interne à l'ordinateur reçoit le signal analogique de position traduit par le capteur, et permet d'enregistrer sa valeur

numérique. Et une électronique externe spécifique, que j'ai développée pour mettre en forme et traiter les signaux de franges avant comptage.

La mesure par comptage est continue. Elle s'effectue en temps réel et dépend uniquement de la dynamique du système de franges. La mesure des signaux analogique est effectuée séquentiellement après chaque pas de déplacement imposé au capteur.

La commande du moteur est effectuée à travers deux voies du circuit de communication parallèle (PPI8255, Intel), qui, respectivement pour le sens direct et le sens inverse, produisent des impulsions de niveau TTL qui commandent l'électronique associée au moteur pour piloter son mouvement pas à pas. Une impulsion déclenche un pas élémentaire de translation de dimension préalablement réglée (40 nm à 400 nm). Chaque point de mesure correspond à un déplacement choisi et constant tout au long d'une série de mesures. Sa dimension représente un certain nombre de pas de translation du moteur, déterminée en fonction de la résolution de mesure choisie, la résolution minimale étant de l'ordre de 50 nanomètres pour un seul pas.

Les signaux optiques de frange, voies A et B sur les figures IIA.4.2.3 et IIA.4.2.4, reçus par deux photodétecteurs, au cours du déplacement, sont mis en forme au standard TTL pour être compatibles avec les niveaux d'entrée de la logique combinatoire de décodage du sens du déplacement, et du circuit électronique compteur-temporisateur (TMP82C54, Toshiba) qui effectue le comptage. Le fonctionnement de ce circuit utilisé dans la chaîne de comptage de photons est décrit dans le chapitre IIIA.2.

Simultanément, l'enregistrement du signal électrique analogique de la position du capteur soumis à la procédure d'étalonnage, est obtenu à partir de la carte d'acquisition de mesure (ACL 8216, NUDAQ). Elle assure la conversion numérique du signal analogique d'entrée en une valeur codée sur 16 bits. Ce signal correspond à la position du capteur obtenue après chaque translation. Il est connecté en mode différentiel sur deux entrées analogiques de la carte et sa dynamique est de ± 10 V. La précision de la mesure numérique, n'est que de 14 bits, compte tenu du bruit électrique dû à l'environnement de fonctionnement interne au PC. L'erreur ainsi apportée, inférieure à 1,3 mV, n'a pas d'influence sur la mesure en regard de la précision du détecteur.

Cependant une remarque doit être faite sur le mode de translation utilisé. Le moteur « stick & slip » est un moteur inertiel nécessitant des actions rapides et saccadées qui entraînent des vibrations dans les déplacements. La fréquence de ces vibrations dépend de la cadence d'envoi des impulsions de contrôle qui peut varier entre 250 Hz et 4 kHz.

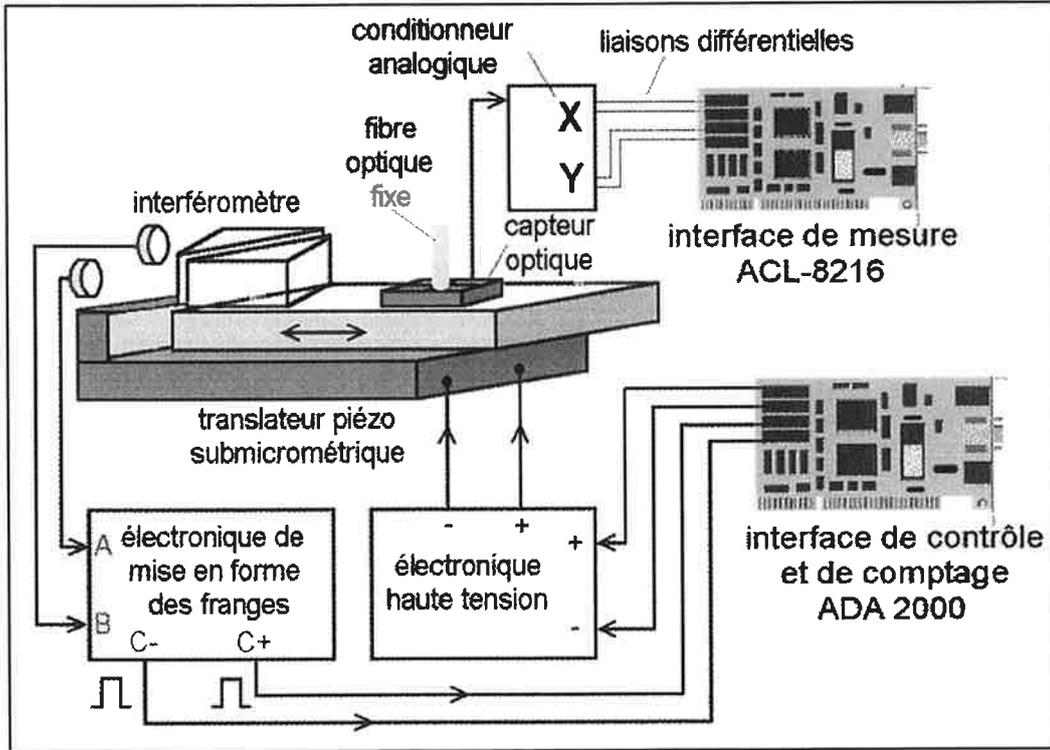


Figure IIA.4.2.3 :Eléments du banc informatisé de mesures interférométriques, pour étalonner les capteurs optiques de déplacement.

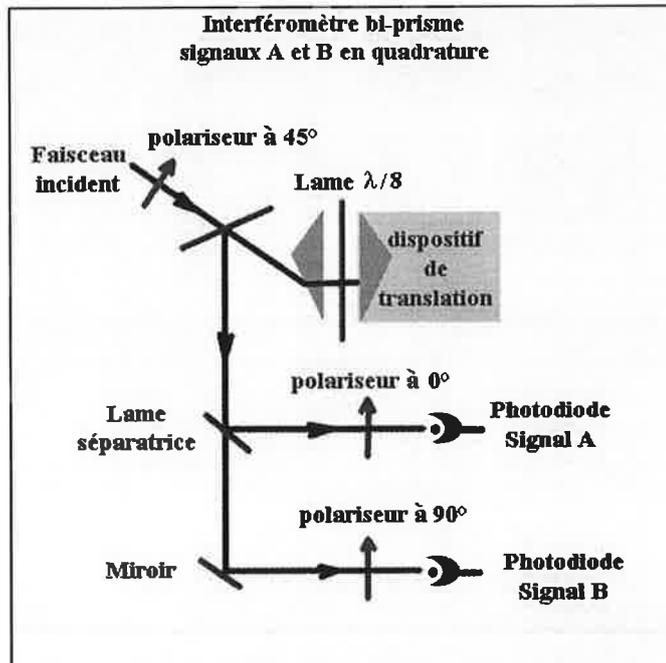


Figure IIA.4.2.4 : Schéma de principe du banc interférométrique d'étalonnage. Les signaux A et B de défilement des franges reçus sur les photodiodes sont en quadrature.

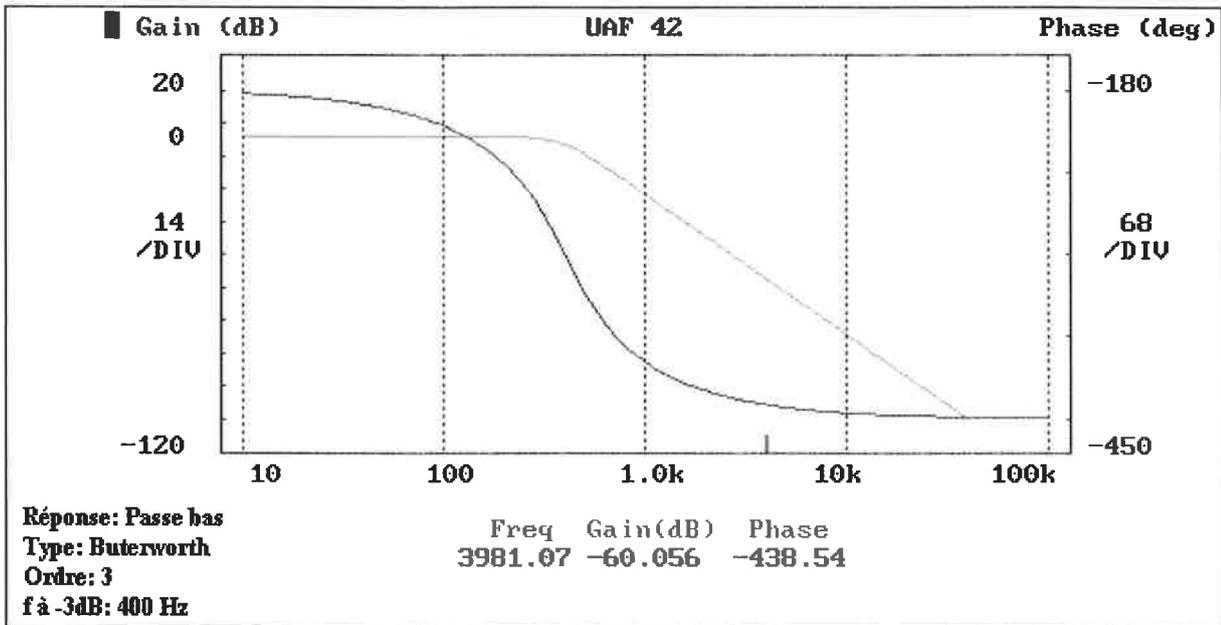


Figure IIA.4.2.5 : Courbe d'atténuation du circuit UAF42 utilisé pour filtrer chaque voie A et B des signaux analogiques de frange en sortie des photodétecteurs de l'interféromètre.

L'amplitude de ces vibrations, pour un montage de masse constante, augmente avec l'amplitude du pas élémentaire de translation qui, sur ce moteur, peut varier entre 40 nm et 400 nm de façon contrôlée. Elle peut être importante pour un mode de résonance propre au montage mécanique. Le signal optique de frange se trouve alors modulé par ces vibrations.

Pour une fréquence d'impulsions de 1 kHz avec un pas de 40 nm la fréquence de défilement des franges est de l'ordre de 100 Hz. L'amplitude, à 1 kHz, de modulation parasite du signal de frange pouvant atteindre plus de 10 % de l'amplitude des franges, est préjudiciable à l'exactitude de l'étalonnage.

En effet le principe de transformation du signal sinusoïdal de franges en signal de niveau TTL est fondé sur l'utilisation d'un circuit bistable qui effectue une comparaison de seuil de tension proche de zéro Volt afin d'obtenir un signal de sortie carré avec rapport cyclique voisin de l'unité. Cette méthode simple couramment employée est sensible aux variations de l'amplitude U du signal. Son principe est le suivant.

Deux niveaux de tension U_1 et U_2 , centrés autour de $U_0 = 0$ V, déterminent la plage d'hystérésis à l'intérieur de laquelle toute fluctuation ϵ de la tension U ne modifie pas l'état du signal TTL obtenu au basculement de la précédente comparaison. Une transition vers le niveau bas est validée si $U < U_1 < U_2$ et une transition vers le haut si $U > U_2 > U_1$. Un bruit sur le signal inférieur à $\epsilon = U_2 - U_1$ n'induit de fausses transitions et n'altère pas la valeur du comptage. Toutefois lorsque la modulation du signal apporte une instabilité du niveau zéro qui est supérieure à la plage des tensions d'hystérésis U_1, U_2 , elle provoque des transitions intempestives du signal TTL et engendre des impulsions de comptage sans rapport avec les variations sinusoïdales du signal de frange. Le comptage de ces impulsions, se produisant à la fréquence de vibration, introduit une erreur rédhibitoire à la procédure d'étalonnage.

Pour éviter ce type d'erreur, deux améliorations sont apportées. Premièrement, on contrôle l'avance du moteur avec la plus grande fréquence possible située en dehors d'une résonance mécanique du montage et on utilise une faible dimension du pas de translation. Ainsi on diminue le niveau de vibration à vitesse de déplacement égale. De plus, on augmente la différence de fréquence entre la modulation des franges due au déplacement et celle due aux vibrations. On peut alors apporter une seconde amélioration en éliminant électriquement la modulation due aux vibrations. Ceci est réalisé à l'aide d'un filtre actif passe bas, ayant une forte pente d'atténuation, placé entre la sortie analogique du signal de frange et l'entrée du circuit de mise en forme. La courbe de réponse de ce filtre est montrée sur la figure IIA.4.2.5. Cette opération est effectuée sur les deux voies du signal d'interférences en quadrature de

phase A et B de l'interféromètre. Les signaux carrés obtenus sur ces deux voies sont analysés par une fonction logique combinatoire qui détermine le sens du mouvement de translation, et assure l'aiguillage des impulsions vers la voie de comptage correspondante.

Le principe de détermination du sens de déplacement, effectué par le circuit logique que j'ai développé et qui est représenté figure IIA.4.2.7, est le suivant. A la sortie du circuit de mise en forme des franges on dispose des signaux carrés A et B de niveau TTL et en quadrature de phase, ayant un rapport cyclique = 1. La figure IIA.4.2.6 présente deux chronogrammes qui montrent que le sens est déterminé en comparant, en fonction du temps, la croissance ou la décroissance du signal de frange de la voie A par rapport à la phase du signal de référence B en quadrature. Le chronogramme de gauche, pour le sens de défilement direct et celui de droite pour le sens inverse. La croissance du signal est matérialisée par le front de montée du signal A, flèche vers le haut, qui engendre l'impulsion Am obtenue par une bascule monostable et, respectivement l'impulsion Ad pour le front de descente de la décroissance, flèches vers le bas. Dans le sens direct, on observe que Am est en phase avec le niveau haut du signal B, complément du signal de référence B, et Ad en phase avec le niveau haut de B. Cette correspondance permet d'établir l'équation booléenne qui sélectionne les impulsions C+ qui seront comptées pour ce sens direct :

$$C_+ = (A_m \cdot \bar{B}) + (A_d \cdot B) \quad (\text{IIA.4.2.11})$$

Et réciproquement pour le sens inverse :

$$C_- = (A_m \cdot B) + (A_d \cdot \bar{B}) \quad (\text{IIA.4.2.12})$$

La largeur τ des impulsions C_+ et C_- est déterminée pour correspondre aux caractéristiques d'entrée du circuit de comptage (TMP82C54).

L'intérêt de cette méthode réside principalement dans le fait d'éliminer les impulsions résultant d'éventuels retours arrière de l'élément mobile, mais également dans la capacité d'obtenir une impulsion pour une demi-période de franges, améliorant la résolution de la mesure d'un facteur 2. Dans ce cas, la valeur N_d du nombre d'impulsions comptées, correspondant au nombre de franges M_d ayant défilé, est $N_d = 2 M_d$ et respectivement pour le sens inverse, $N_i = 2 M_i$, alors, la valeur absolue de la position $D_{(x)}$ sera donnée par la relation :

$$D_{(x)} = \lambda/4 (N_d - N_i) \quad (\text{IIA.4.2.13})$$

Un autre type d'actionneur de réalisation commerciale, une table de translation mécanique (Microcontrol) pilotée de manière programmable, a été testé pour réaliser le déplacement nécessaire à l'étalonnage. Il n'a pas satisfait aux exigences car il présente des inconvénients majeurs.

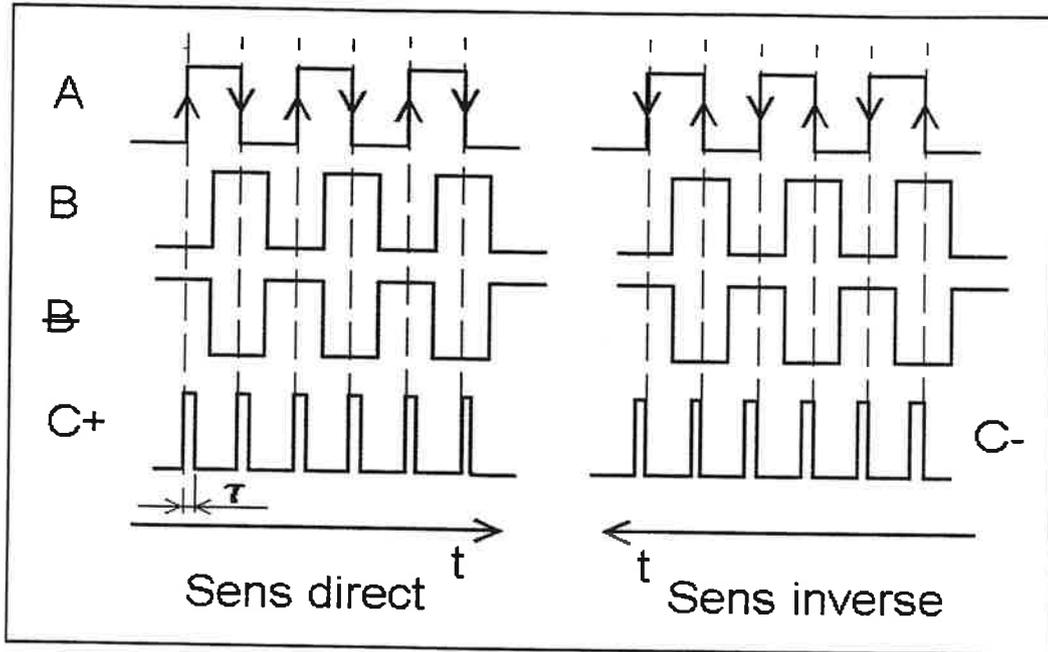


Figure IIA.4.2.6 Analyse temporelle du sens de translation du bras mobile de l'interféromètre d'étalonnage des capteurs de déplacements. Les signaux A et B issus des franges d'interférence sont en quadrature.

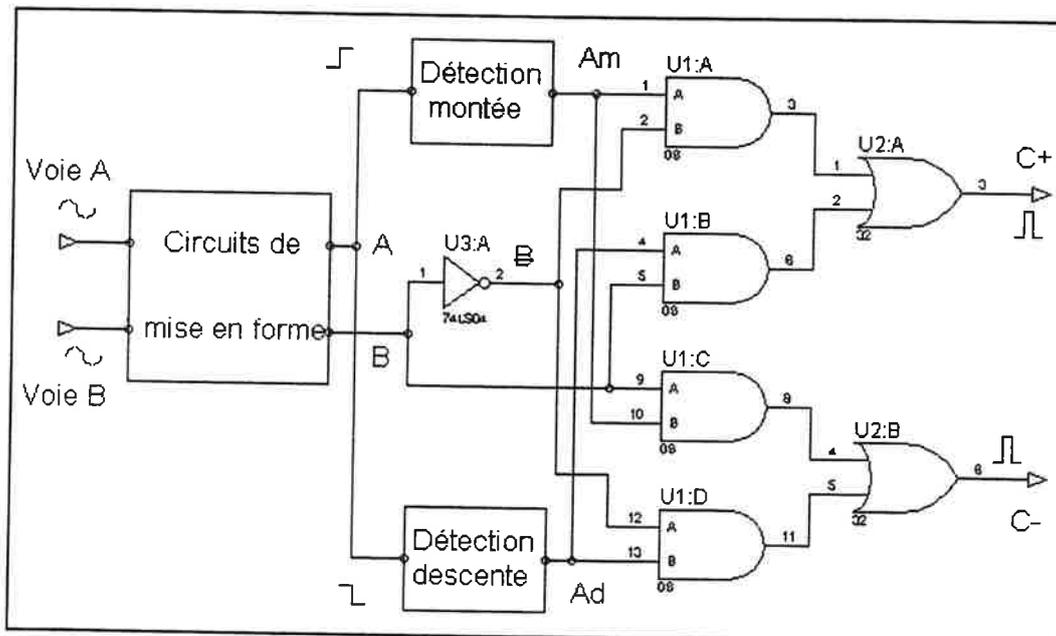


Figure IIA.4.2.7 : Circuits électroniques de mise en forme et d'aiguillage des impulsions de comptage de franges. Les deux voies A et B, en quadrature, des signaux sinusoïdaux de ces franges sont mises en forme et traitées par le circuit logique d'aiguillage pour produire les impulsions de comptage C+ ou C- correspondant respectivement au sens direct et au sens inverse de défilement des franges d'interférence.

Les dimensions et la masse de cette table en particulier celles du plateau mobile, sont beaucoup plus importantes que celles du moteur piézoélectrique. Son système d'entraînement, constitué d'un moteur pas à pas couplé à une vis micrométrique agissant sur la translation de la table, nécessite des forces importantes qui introduisent de fortes vibrations mécaniques à l'ensemble du montage. La taille minimum du pas d'avance de l'ordre du micron apporte moins de précision dans l'étalonnage du capteur. La mesure du signal analogique de position ne pouvait être effectuée que lorsque le chariot était à l'arrêt. Le temps d'amortissement des vibrations entre deux mouvements est de plusieurs millisecondes. De plus les vibrations n'ont pas permis le comptage électronique des franges d'interférence de manière satisfaisante.

Le système automatisé de mesures interférométriques que nous avons développé autour du moteur piézoélectrique permet d'obtenir une courbe d'étalonnage du capteur quatre quadrants. A partir de la position d'origine située au centre du capteur, cette courbe détermine les positions absolues d'un spot de $200\ \mu\text{m}$ sur un plan de $200\ \mu\text{m}^2$ avec un maillage pouvant atteindre une résolution de $207,5\ \text{nm}$ avec la source lumineuse utilisée dont la longueur d'onde est de $830\ \text{nm}$.

IIB.1 - Actionneurs, notions générales.

De la manière la plus générale, un actionneur se définit comme un dispositif pneumatique, hydraulique ou électrique convertissant l'énergie qui lui est fournie en une énergie mécanique permettant de mouvoir ou contraindre un élément sur lequel il exerce son action. Les actionneurs pneumatiques et hydrauliques, utilisés dans des actions qui demandent beaucoup de puissance pour animer des éléments massifs et volumineux, sont hors de nos applications de microscopie.

Nous nous intéressons aux actionneurs utilisés dans les mouvements de translation communément appelés « translateurs », pour obtenir, à partir d'une commande électrique, des déplacements linéaires nécessaires au positionnement des différents éléments des microscopes. Plusieurs dispositifs sont capables de produire une translation. Ceux, fondés sur le fonctionnement rotatif d'un moteur électrique peuvent développer des forces considérables et assurer des déplacements précis d'éléments massifs sur des courses importantes.

Ainsi pour satisfaire aux déplacements longs de l'ordre de 5 millimètres, tout en disposant d'une force importante et d'une certaine précision de positionnement, j'ai utilisé un autre dispositif, bien adapté, qui est constitué d'un moteur électrique rotatif à courant continu

et d'un réducteur de vitesse mécanique qui entraîne une vis micrométrique. Ses paramètres sont les suivants : la vitesse de rotation V_R imposée par la plage de tension de commande U du moteur, le rapport de démultiplication du réducteur mécanique, le couple d'entraînement, le pas de la vis micrométrique (250 microns / tour, pour une vis Martock) et le jeu mécanique des éléments de transmission.

D'autres exploitent directement les propriétés de déformation du matériau qui les constituent pour modifier faiblement leur propre géométrie (extension) comme les céramiques piézoélectriques. Rappelons que l'effet piézoélectrique inverse, lorsqu'on applique une différence de potentiel sur les faces d'une céramique de type PZT, engendre une force, proportionnelle au champ électrique. Une telle céramique constitue un actionneur piézoélectrique.

Ces derniers, largement employés dans les déplacements micrométriques ou nanométriques, permettent des mouvements continus de faible amplitude sur quelques dizaines de microns, avec une rapidité du domaine de quelques dizaines de microsecondes et une grande résolution, de l'ordre du nanomètre. Cependant leur précision et fidélité restent moyennes. Des déplacements de plus grande amplitude peuvent être obtenus en associant plusieurs éléments. Par exemple, un empilement de disques de céramique piézoélectrique produit un effet cumulatif d'extension. D'autres structures de type bilame (bimorphe) [52,53] engendrent, par un effet d'amplification mécanique, une déformation importante du bilame.

Tous ces dispositifs ont, toutefois, de grands avantages. Ils permettent des déplacements linéaires ou assimilables, de quelques centaines de microns avec une finesse submicronique. Ils sont souvent compacts, ils peuvent être actionnés à distance et contrôlés automatiquement par un système informatique, et ils fonctionnent à basse température, malgré une réduction de leur efficacité, domaine où les autres actionneurs sont rares. Leurs principales limitations sont leur fréquence de résonance relativement basse, la faiblesse de la force qu'ils peuvent exercer, et l'effet d'hystérésis important qu'ils présentent.

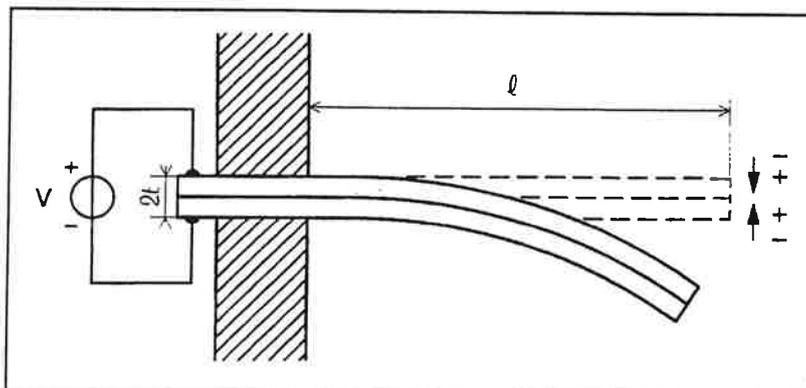


Figure IIB.1.1 Structure bilame de céramiques piézoélectriques. Flambage produit par l'application de la tension V .

Les géométries des éléments piézoélectriques utilisés dans les actionneurs que j'ai réalisés sont de deux types. Les plaquettes bilames ou bimorphes, montrées figure IIB.1.1, composées de deux lames rectangulaires de céramique piézoélectrique de même épaisseur superposées et collées l'une sur l'autre, développent, sous l'action d'un champ électrique, des forces longitudinales qui provoquent la flexion de l'extrémité libre ou le flambage des plaquettes dans la direction du champ électrique appliqué sur leurs faces opposées, c'est à dire un mouvement perpendiculaire à la direction de dilatation des lames. Pour une plaquette, ayant une largeur W , une longueur ℓ et une épaisseur de t , à laquelle une tension électrique V est appliquée, le déplacement δ (en mètres) de l'extrémité libre est donné par la relation :

$$\delta = 3 \cdot D_{31} \cdot V \cdot \left(\frac{\ell}{t}\right)^2 \quad (\text{IIB.1.1})$$

La force F engendrée par cette action s'exprime par la relation :

$$F = \frac{3}{4} \cdot D_{31} \cdot V \cdot \left(\frac{tW}{\ell}\right) \cdot Y_{11} \quad (\text{IIB.1.2})$$

avec $D_{31} = d_{31} + M \cdot \frac{V}{t}$ où M est un coefficient correcteur, d_{31} une constante piézoélectrique qui est de l'ordre de $1,73 \text{ \AA} / \text{V}$ et Y_{11} le module de Young, ces trois paramètres dépendent des caractéristiques du matériau constituant le bimorphe. On voit apparaître sur ces expressions, les deux phénomènes mentionnés. Le déplacement est amplifié par le facteur $(d_{31}/d_{33}) \times 3 \cdot \left(\frac{\ell}{t}\right)^2$, $(d_{31}/d_{33}) \cong 1/2$ soit $\frac{3}{2} \cdot \left(\frac{\ell}{t}\right)^2$, alors que le déplacement d'une simple plaque de céramique est donné par $d_{33} \cdot V$. Ce gain sur le déplacement est obtenu au détriment de la force maximale que peut exercer le bilame par rapport à une simple plaquette dont l'expression est :

$$d_{33} \cdot V \cdot \left(\frac{\ell W}{2t}\right) \cdot Y_{11} \quad (\text{IIB.1.3})$$

Le deuxième type d'actionneur développé utilise des tubes cylindriques de céramique piézoélectrique quatre quadrants, c'est à dire que la métallisation externe du cylindre est divisée suivant la périphérie extérieure du tube en quatre électrodes de surface égale, séparées par quatre lignes isolantes, le long de la génératrice du cylindre. Comme le montre la figure IIB.1.2, la paroi interne du tube constitue l'électrode commune, et l'axe de polarisation est colinéaire avec le rayon du tube.

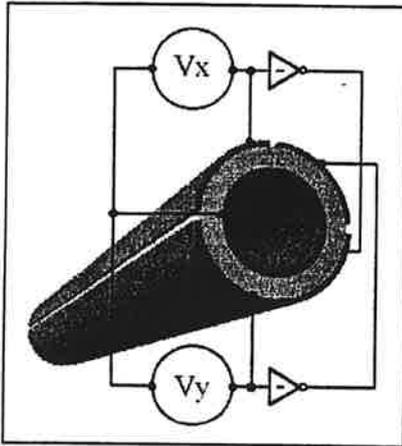


Figure IIB.1.2, tube piézoélectrique 4 quadrants. Pour une grande efficacité, les électrodes opposées sont alimentées avec des tensions opposées.

Lorsque l'on applique une tension sur un quadrant on obtient une élongation de ce seul quadrant qui produit, de manière similaire au bilame, une flexion et provoque un déplacement de l'extrémité libre du tube, dans le plan radial reliant le centre du tube au centre du quadrant actif. Une tension de signe contraire appliquée simultanément sur l'électrode diamétralement opposée multiplie l'action par 2. Cette opération effectuée sur l'autre paire d'électrodes produira un déplacement dans une direction perpendiculaire à la précédente. Ces directions représentent les axes de déplacement X et Y dans un plan horizontal. Au contraire une tension identique sur chacune des électrodes entraînera une élongation coaxiale suivant l'axe longitudinal du tube, ou axe Z, perpendiculaire au plan X Y. Le déplacement suivant X ou Y de l'extrémité d'un tube, lorsque la tension est appliquée à deux quadrants opposés, est donné par la relation

$$\delta_{(x,y)} = 2 \cdot \frac{0.45 \cdot d_{31} \cdot V \cdot L^2}{dm \cdot t} \quad (\text{IIB.1.4})$$

La déformation axiale du tube ou l'élongation suivant Z s'écrit

$$\delta_{(z)} = \frac{d_{31} \cdot V \cdot L}{t} \quad (\text{IIB.1.5})$$

où L , t et dm représentent respectivement la longueur, l'épaisseur de la paroi cylindrique du tube et son diamètre moyen.

Enfin, j'ai développé un moteur linéaire inertielle qui exploite une autre propriété des céramiques piézoélectriques. La rapidité de leur réponse permet, en effet, de réaliser des déplacements de grande résolution sur des distances millimétriques en combinant les forces de frottement et les actions de glissements. Cet actionneur sera décrit au chapitre IIB.5.

IIB.2 - Positionnement des éléments mobiles des microscopes.

Comme je l'ai expliqué au début du chapitre II, dans les montages des microscopes confocaux et de champ proche réalisés, deux activités clés concernent le positionnement de l'échantillon et de la sonde. A ces deux activités il faut ajouter le déplacement de l'objectif. En position de travail ces trois éléments sont placés très près les uns des autres. Dans ce cas les déplacements relatifs pour la mise au point optique, le balayage de l'échantillon ou la distance sonde-échantillon restent du domaine micrométrique et nanométrique. Par contre le changement de chacun de ces trois éléments, l'objectif, l'échantillon ou la sonde, nécessite des déplacements de plusieurs millimètres pour autoriser leur manipulation et permettre leur repositionnement dans la zone de travail.

L'élément le plus massif est l'objectif avec une masse de quelques dizaines de grammes. Son positionnement est réalisé grâce à des platines mécaniques de translations micrométriques. Le porte échantillon, de l'ordre d'une dizaine de grammes, doit effectuer des balayages XY sur des domaines de 10 microns par pas variant entre 30 nm et 500 nanomètres, avec une vitesse moyenne de 100 μm /s et un minimum de vibrations. Il est nécessaire d'avoir un contrôle et une grande finesse de déplacement latéral inférieure à 30 nm, autorisant un repositionnement très précis de l'échantillon dans la zone d'interaction. De plus, dans le sens vertical, la distance relative entre l'objectif et l'échantillon doit être précisément mise au point dans la zone de champ proche dont la profondeur n'est que de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

Le changement d'échantillon implique un déplacement de la sonde de plusieurs millimètres. Pour éviter des actions répétées de montages et de connexions délicats à chaque changement d'échantillon, le déplacement de la sonde sera effectué par un translateur piézoélectrique trois axes de grande efficacité et de grande résolution. En effet, lorsque la sonde est en position de travail, ses positions latérales, X et Y, situent sa pointe dans l'axe du faisceau optique et sa position axiale initiale Z, représente une distance pointe-échantillon de l'ordre de 10 nm. Ce moteur doit assurer, dans les trois axes, les déplacements précis de la sonde sur un domaine de 4 à 5 mm correspondant aux distances de dégagement utiles au changement d'échantillon.

L'approche de la sonde effectuée par ce moteur doit être réalisée avec une précision de l'ordre du micron pour être compatible avec les faibles dimensions de la tache lumineuse d'excitation. L'approche nanométrique finale de la pointe, dans la zone de champ proche vers

l'échantillon, sera effectuée par un actionneur piézoélectrique de type bilame. Une stabilité accrue peut être obtenue en construisant des montages compacts symétriques et peu volumineux qui permettent un fonctionnement dans des environnements sévères tel que le vide et les très basses températures.

Je décrirai, dans ce chapitre, trois systèmes que j'ai réalisés et qui répondent à ces exigences. Un scanner porte échantillon pendulaire au paragraphe IIB.3, un scanner porte échantillon plan au paragraphe IIB.4 ainsi qu'un translateur millimétrique piézoélectrique de grande résolution au paragraphe IIB.5.

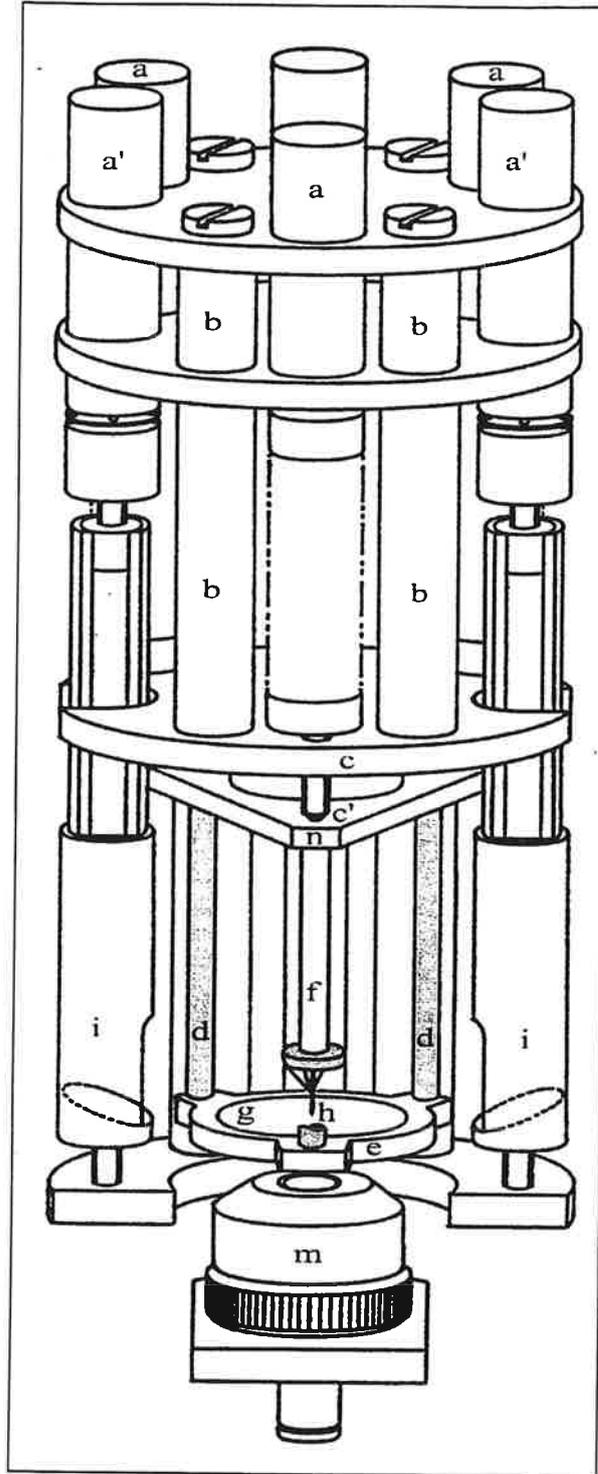


Figure IIB.3.1 : Eléments du MOCP fondé sur le scanner pendulaire type Besoke. La détection des forces de frictions exercées sur la pointe est effectuée optiquement à l'aide du faisceau transversal réfléchi sur les miroirs c et i.

IIB.3 - Scanner pendulaire oscillant.

Les microscôpes développés dans notre groupe de recherche sont destinés principalement à réaliser des études de spectroscopie de fluorescence. A basse température, les raies spectrales sont beaucoup fines qu'à température ambiante et les études à haute résolution spectrale doivent être réalisées en environnement cryogénique. Ce dernier impose des contraintes importantes sur la forme du microscope et sur les matériaux qui le constituent. La forme cylindrique et la taille du puits central du cryostat (90 mm de diamètre) ne sont compatibles qu'avec le développement d'un microscope compact. Son utilisation à température cryogénique suppose une compensation optimale des dilatations relatives des ses différents composants. Un scanner pendulaire, construit autour d'un tripode déplaçant l'échantillon, du type de celui développé par Besocke en 1987 [54] répond à ces exigences. C'est sur le même principe que j'ai élaboré une tête de microscope comportant un scanner fondé sur le mouvement conjugué de trois tubes piézoélectriques à quatre quadrants. Son architecture est représentée sur la figure IIB.3.1 et la figure IIB.3.2 montre une photo du dispositif en action sur un montage test.

Le scanner pendulaire, suspendu par une rotule d'articulation, utilise des actionneurs électromécaniques pour les grands déplacements compris entre quelques dizaines de microns et quelques millimètres. Les faibles déplacements de quelques nanomètres à quelques micromètres sont effectués par les tubes piézoélectriques.

Comme le montre la figure IIB.3.1, le microscope comprend deux étages principaux. L'étage supérieur réunit, par quatre colonnes en invar (b), trois platines horizontales supportant cinq actionneurs (a, a') de grand déplacement, motorisés. Deux actionneurs latéraux et diamétralement opposés (a') agissent sur l'orientation des miroirs (i) d'un système optique destiné à éclairer l'extrémité de la fibre pour mesurer optiquement les forces de friction pointe-échantillon (voir § IIA.3.2). Ils n'interviennent pas dans les actions du scanner. Les trois autres actionneurs, placés à 120° (a), agissent sur l'inclinaison du scanner. Ils sont composés chacun d'un moteur électrique à courant continu auquel est associé un réducteur mécanique de vitesse qui entraîne la rotation d'une vis micrométrique (c'). La platine inférieure du premier étage du microscope est solidaire de la colonne centrale en invar dont l'extrémité supporte le détecteur shear-force, à une hauteur fixe déterminée par construction. Cette platine comporte en son centre la rotule mâle de la suspension articulée qui permet l'orientation du scanner. Le scanner est constitué de la manière suivante. Le plateau métallique supérieur, de forme triangulaire, comporte la partie femelle de son

articulation qui présente la particularité d'assurer un couplage sans jeu dans les mouvements d'inclinaison et de translation sur quelques millimètres. Trois tubes quatre quadrants sont collés par une extrémité à chacun des trois sommets du plateau métallique supérieur. Ces tubes ont une dimension de 30 mm de longueur, 3,1 mm de diamètre extérieur et une épaisseur de 0,5 mm. Une variation de potentiel sur leurs électrodes de ± 150 V produit une flexion et engendre un déplacement latéral de l'ordre de 50 microns, de leur extrémité libre. La partie inférieure de chaque tube comporte un plot magnétique au centre duquel est collée une bille en saphir qui assure un seul point de contact avec un plan. Cette conception offre un trépied qui permet aisément d'accoupler par contact magnétique, de manière très stable et répétitive, le porte échantillon métallique aux actionneurs du scanner. Le plateau supérieur du scanner est maintenu dans son articulation par des ressorts qui exercent une force de rappel importante et maintiennent les sommets du plateau en appui sur les vis micrométriques. La rotation motorisée des vis, exercée simultanément sur les trois sommets, produit une translation, de 250 μm par tour suivant l'axe Z, qui est utilisée pour éloigner ou approcher la sonde de sa position de travail. Cette translation peut atteindre quelques millimètres. Appliquée sur un seul point du triangle, cette même rotation provoque l'inclinaison du scanner et donc un déplacement latéral du porte échantillon. Ceci peut conduire à une inclinaison trop importante de l'échantillon et introduire une erreur topographique importante sur l'échantillon observé. La commande motorisée est donc contrôlée.

Le parcours final de la distance nanométrique entre la pointe de la sonde et l'échantillon est assuré par l'application d'une seule et même tension V de polarisation simultanément sur les quatre quadrants des trois tubes piézoélectriques qui produisent un allongement identique de chaque pied du scanner. Cet allongement engendre une translation de l'échantillon suivant l'axe Z, proportionnelle à la tension de commande V. Sa valeur δ_z , donnée par la relation (IIB.4) du paragraphe IIB.1, est, dans notre montage de l'ordre de 5 μm , pour une tension de 150 V.

Comme je l'ai décrit dans le paragraphe IIB1.1, les tensions opposées (+V, -V), appliquées respectivement sur les quadrants opposés d'un tube piézoélectrique engendrent une flexion de l'extrémité du tube dans la direction normale au plan séparant les deux quadrants opposés. Le sens est fonction de la polarité des tensions de commande. Une action identique appliquée simultanément sur les mêmes électrodes pour chacun des trois tubes du scanner produit un mouvement de même sens de leur extrémité dans des directions parallèles.

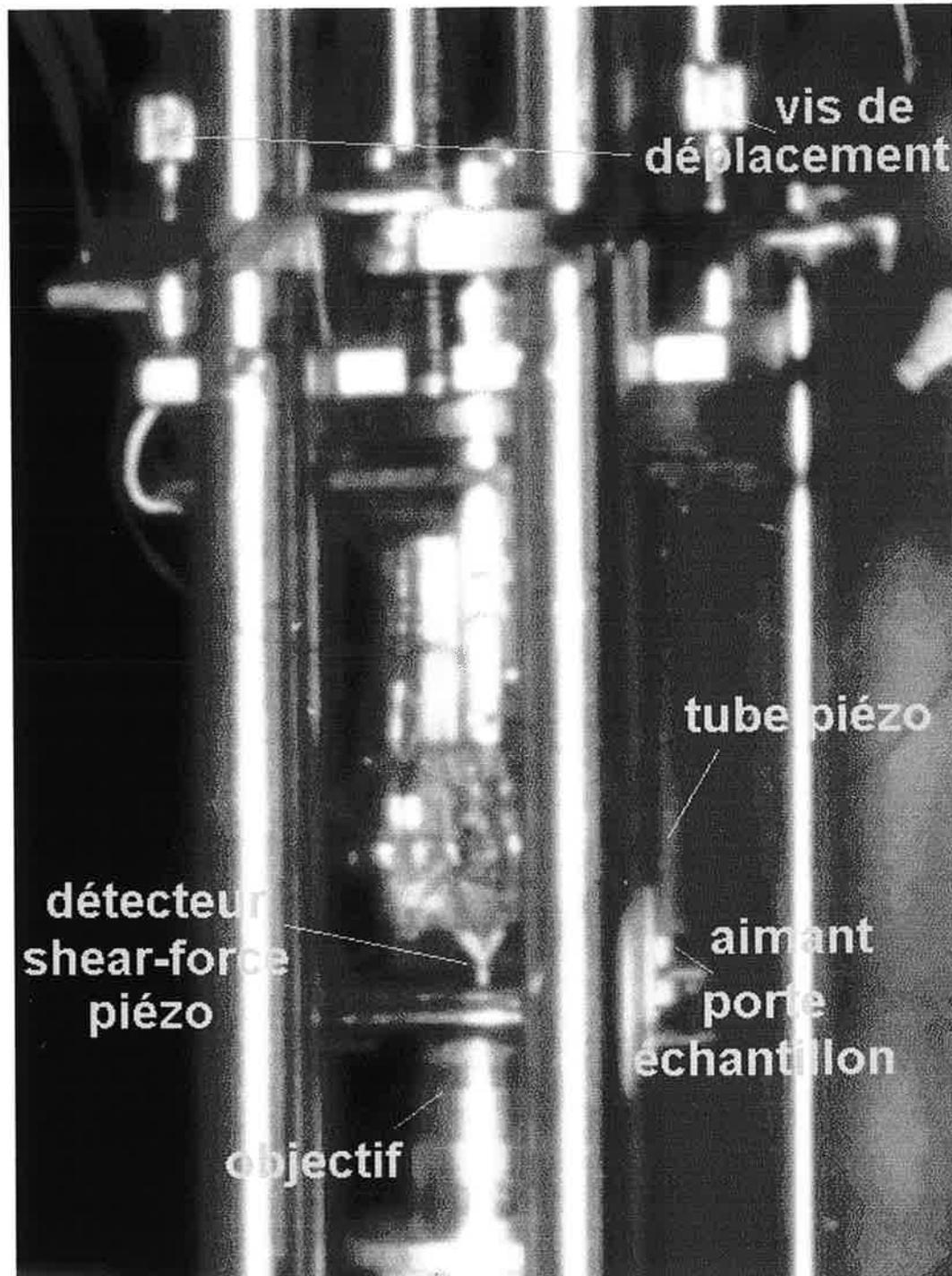


Figure IIB.3.2 : Tête du scanner pendulaire tripode, l'échantillon est solidaire de la base du tripode par le maintien du porte échantillon à l'aide des 3 aimants. Les grands déplacements sont effectués par 3 vis micrométriques appuyant sur la tête du tripode. Le balayage est actionné par 3 tubes piézoélectriques. L'objectif à immersion est placé contre la face inférieure de l'échantillon. Le détecteur shear-force est en contact avec la face supérieure de l'échantillon.

Il est indispensable d'orienter précisément les électrodes de chaque tube au cours de leur collage sur le plateau supérieur. Une tension de commande appliquée sur les électrodes placées en quadrature provoque un déplacement du porte échantillon selon un axe perpendiculaire. L'échantillon peut être déplacé suivant les directions X et Y en variant les tensions appliquées. Dans ce montage, il existe un léger couplage entre les déplacements latéraux X,Y et le déplacement vertical Z.

Le déplacement horizontal de l'extrémité libre du scanner d'une quantité H , petite devant la longueur $L = 30$ mm des tubes, correspond en réalité à une rotation d'un angle α petit autour du plan de référence du scanner. C'est l'origine du terme « scanner pendulaire ». Cet angle α est au maximum de l'ordre de quelques milliradians.

Le mouvement pendulaire a deux conséquences : la pointe et l'échantillon ne sont plus strictement perpendiculaires, ce qui peut entraîner, pour les images de grandes dimensions, un artefact de topographie ; la distance pointe - échantillon varie au cours du balayage.

La différence de hauteur h , entre le centre de l'échantillon à sa position de repos et après balayage d'une quantité H , est donnée par la relation :

$$h = L \times \frac{\alpha^2}{2} \quad \text{soit} \quad h = \frac{H^2}{2L} \quad (\text{IIB.3.1})$$

Pour un déplacement horizontal de $50 \mu\text{m}$, h vaut 40 nm, valeur que l'asservissement de la distance pointe-échantillon mentionné au chapitre IIA.3.2 peut aisément compenser. Même pour des images de grande taille, le mouvement peut être assimilé à un simple mouvement de translation dans un plan. La géométrie symétrique de ce scanner lui confère un attrait important.

IIB.4 - Scanner plan.

Le scanner pendulaire décrit au chapitre précédent, adapté aux températures cryogéniques, a été utilisé pour réaliser un microscope optique de champ proche entièrement élaboré au laboratoire. Il exploite efficacement les nanosondes (fibres étirées, pointes métalliques) fabriquées au laboratoire. Comme je l'ai mentionné au chapitre IA, il peut être avantageux d'utiliser des pointes commerciales particulièrement en microscopie de champ proche sans ouverture. Aujourd'hui, l'éventail de pointes proposées par l'industrie comprend des nanosondes métalliques ou diélectriques de haut indice issues de la technologie microélectronique, des pointes en silicium, diamant, tungstène, platine-iridium qui sont de bonne qualité. L'utilisation de telles pointes apporte une grande résolution dans nos expériences réalisées en champ proche. De plus, il évite un travail local relativement long de réalisation et de contrôle de ces pointes. L'asservissement précis en position de ces pointes réclame en général l'utilisation d'une tête de microscope AFM commercial souvent relativement volumineuse. On peut alors concevoir le microscope de champ proche à partir d'un microscope confocal offrant un accès plus aisé. De plus il faut disposer d'un scanner permettant l'approche de la tête AFM près de l'échantillon. Le scanner pendulaire que j'ai décrit ne permet pas, de réaliser un microscope de champ proche obtenu en combinant un microscope confocal et un microscope à force atomique (AFM) commercial. Dans un tel microscope, le microscope confocal joue un rôle essentiel, en produisant une tache d'excitation dont l'étendue est limitée par la diffraction sur l'échantillon et, en permettant une collection très efficace du signal optique produit dans la zone éclairée. Dans le microscope confocal réalisé au laboratoire, l'objectif, en contact avec la face inférieure de l'échantillon¹, dégage totalement le plateau supérieur de son bâti, et permet aisément de placer une tête de détection portant une sonde AFM ou STM sur ce plateau, de telle manière que la sonde puisse approcher, dans l'axe optique, l'échantillon porté par le scanner. L'approche préliminaire de la sonde AFM suivant l'axe Z jusqu'à une distance de l'ordre du micron de l'échantillon, avant contrôle de l'asservissement, est une opération délicate car, dans notre dispositif, elle est réalisée manuellement par une action directe sur les vis du tripode de la tête de microscope AFM.

¹ Dans cette configuration expérimentale, les échantillons utilisés sont transparents

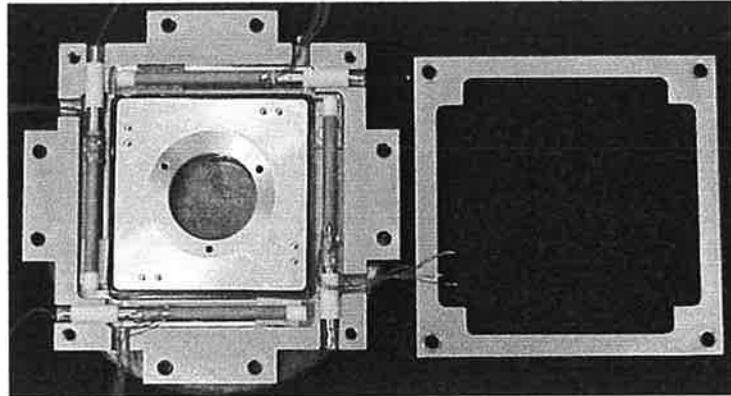


Figure IIB.4.1: Vue des éléments du scanner plan.
Les extrémités libres des tubes piézoélectriques actionnent le porte échantillon.

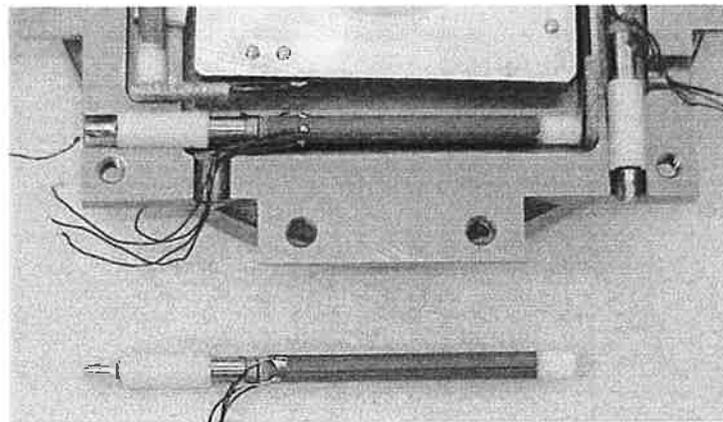


Figure IIB4.2 : Tube piézoélectrique 4 quadrants. On distingue le manchon en téflon et à son extrémité, la connexion de l'électrode centrale interne au tube.

Les vibrations introduites sur l'extrémité de la sonde, par ce procédé, peuvent provoquer un contact pointe-échantillon dommageable. Le contrôle de cette approche manuelle est effectué par visualisation directe de l'extrémité de la sonde à l'aide d'une lunette de fort grossissement.

A cette approche exclusivement manuelle, on peut substituer une approche plus contrôlée. Dans ce but, le développement d'un scanner de faible épaisseur possédant une dynamique de plusieurs dizaines de microns de déplacement suivant Z est un atout important. Son utilisation limite l'approche manuelle à une dizaine de microns, limitant ainsi le risque de contact avec l'échantillon.

Le type de scanner que j'ai élaboré s'inspire directement de celui imaginé par Lieberman et Lewis [55]. Il est actionné par quatre tubes piézoélectriques quatre quadrants. Au contraire du scanner type Besocke, il offre une capacité de déplacement, suivant l'axe Z, équivalente à celle des axes X-Y. Le modèle que j'ai réalisé déplace une platine métallique d'une masse d'une dizaine de grammes sur un domaine de 40 μm dans les trois axes. Cette platine supporte, au centre, l'échantillon à observer. L'épaisseur faible du scanner de l'ordre de 7 mm et les évidements coniques de sa platine centrale mobile permettent à différents objectifs de s'approcher jusqu'au contact de l'échantillon.

La monture du scanner présentée sur la figure IIB.4.1, est constituée d'un cadre métallique carré de 70 mm de côté, qui comporte, dans l'épaisseur, quatre tubes piézoélectriques quatre quadrants de 30 mm de longueur, 3,1 mm de diamètre extérieur et 0,5 mm d'épaisseur, identiques à ceux utilisés dans le scanner pendulaire décrit au chapitre précédent. Dans ce montage le porte échantillon est mis en mouvement par le parallélogramme déformable constitué des quatre tubes piézoélectriques. Le cadre est composé de deux demi-coquilles carrées dont le plan de séparation se trouve à mi-hauteur de l'épaisseur. Sur la face interne de chacune des demi-coquilles, un berceau horizontal à la taille du diamètre d'un tube piézoélectrique, a été aménagé à chaque angle du cadre. Chaque berceau est orienté parallèlement à un bord intérieur du cadre, et reçoit un embout métallique cylindrique relié électriquement à l'électrode interne du tube. Cet embout est collé à l'extrémité de chaque tube quatre quadrants, puis isolé électriquement du berceau par une gaine de téflon comme le montre la figure IIB.4.2. Il constitue l'extrémité fixe du tube. L'assemblage superposé des deux demi-coquilles provoque la fixation, dans un même plan horizontal des quatre tubes piézoélectriques, par serrage des embouts à l'intérieur de leur berceau. Les tubes quatre quadrants, ainsi disposés et alimentés parallèlement deux à deux, forment les bras oscillants d'un parallélogramme.

A chaque extrémité libre des tubes piézoélectriques est collé une lamelle de ressort en chrysocale qui relie respectivement chacun des quatre côtés du porte échantillon mobile et assure sa fixation horizontale dans le volume du cadre. Cette liaison élastique transmet le mouvement effectué par l'extrémité libre du tube et permet une déformation du parallélogramme forçant ainsi le porte échantillon à se déplacer linéairement. De plus, ce couplage élastique présente l'avantage considérable, dans le domaine des microdéplacements, d'éliminer tout jeu mécanique dans la transmission du mouvement. Comme pour le scanner type Besocke, au moment du montage des tubes quatre quadrants il est nécessaire de veiller précisément à l'orientation des électrodes horizontales rigoureusement dans le même plan horizontal.

L'application d'une tension symétrique sur les électrodes latérales symétriques de deux tubes opposés provoque un déplacement de la platine mobile dans une direction horizontale X. La même action sur les deux tubes placés en quadrature entraîne un déplacement horizontal suivant Y. Une tension symétrique appliquée simultanément sur les électrodes supérieures et inférieures des quatre tubes produit une translation suivant l'axe vertical Z. L'efficacité de ce scanner à quatre tubes permet d'obtenir des déplacements dans les trois axes X,Y et Z de l'ordre de 40 μm pour des tensions de commande variant entre ± 150 V.

Outre l'intérêt, mentionné plus haut, de la grande dynamique en Z de ce scanner, il est tout aussi intéressant d'avoir une grande dynamique de déplacement dans le plan de l'échantillon, ne serait-ce que pour étudier une plus grande surface donc un plus grand nombre de molécules dans les mêmes conditions expérimentales sans renouvellement de l'échantillon.

Cependant l'hystérésis, dû en grande partie aux caractéristiques ferro-électriques de la céramique PZT, est de l'ordre de 5 % et introduit une limitation importante dans la précision du repositionnement.

La localisation des molécules de l'échantillon est obtenue par un premier balayage d'une zone étendue choisie sur l'échantillon puis, l'analyse d'une molécule particulière nécessite son repositionnement précis dans la tache de focalisation du champ. Pour un balayage de 40 μm de dimension l'erreur de repositionnement liée à l'hystérésis et à la vitesse de balayage atteint 2 μm . Le repositionnement direct à l'échelle de la centaine de nanomètres est trop aléatoire pour être systématiquement utilisé. Par contre, l'erreur est considérablement réduite si le balayage est moins étendu.

Pour limiter l'imprécision due à l'hystérésis j'ai développé deux méthodes complémentaires. La première m'a conduit à réaliser le capteur optique de position

horizontale décrit dans le chapitre IIA.4.1 et qui offre une résolution de 30 nm. La deuxième consiste à diviser, de manière programmable, l'aire maximale de balayage en plusieurs zones contiguës réduisant la dimension utile du balayage à la taille d'une zone soit, au maximum, 11 microns carrés. A partir d'une telle dimension de balayage, le repérage d'une molécule sur l'échantillon et le repositionnement de cette molécule dans la zone d'interaction avec une précision de 50 à 100 nanomètres peut être effectué en deux ou trois opérations de repérages successifs accompagnés de réductions et de centrages de la zone de balayage en choisissant le domaine de balayage souhaité jusqu'à, par exemple, obtenir une image de 1 micron carré. La mesure du signal aux différents points de l'image n'est réalisée que dans un sens donné du balayage pour éviter les déformations possibles de l'image liées à l'hystérésis. Cette procédure donne des résultats satisfaisants mais elle présente un inconvénient. Si les molécules sont peu stables, leur étude fine n'est réalisée qu'après plusieurs repérages donc plusieurs cycles d'excitation lumineuse successifs au cours desquels ces molécules peuvent avoir subi une transformation photochimique irréversible.

La sélection de la zone de balayage est contrôlée par programmation et présente une stabilité de position latérale meilleure que le nanomètre. La résolution de la position de l'échantillon au cours du déplacement dépend de la discrétisation de la tension de commande. Cette tension est obtenue à partir d'une interface de conversion numérique-analogique de 16 bits de dynamique. La description de cette interface et la méthode de sélection de la zone de balayage est développée dans le chapitre IIIA.3. J'ai choisi un nombre binaire codé sur 16 bits soit, un entier non signé compris entre 0 et 65535 pour représenter la valeur numérique d'un déplacement maximal D_m correspondant à une zone de 11 μm . En théorie, le plus petit pas élémentaire de déplacement D_e , qui correspond à 0,17 nanomètre, est donné par la relation :

$$D_e = \frac{D_m}{2^{16}-1} \quad (\text{IIB.4.1})$$

En fait le bruit électrique, apporté par les erreurs de linéarité du convertisseur et les hautes fréquences présentes dans l'environnement de l'ordinateur, limite la précision des valeurs de positionnement à 14 bits, ce qui équivaut à un pas élémentaire de 0,67 nanomètre pour une tension de 18 mV appliquée sur les électrodes des tubes piézoélectriques. Le bruit dynamique de l'électronique haute tension est inférieur à 30 mV. Indépendamment de la stabilité mécanique du montage, la précision du pas de positionnement est de l'ordre du nanomètre c'est à dire de la taille moyenne typique des molécules étudiées.

Les déplacements suivant l'axe Z sont initialisés avant tout début de construction d'image. Ils sont utilisés à deux fins. Tout d'abord, ils permettent d'ajuster précisément la

distance relative entre l'objectif et l'échantillon pour fixer la distance de mise au point dans le plan focal de la zone de champ proche. Ensuite, ils assurent la progression de l'approche pointe-échantillon jusqu'à la zone active du contrôle de cette distance relative par asservissement. Des précautions particulières doivent être observées concernant la stabilité du scanner suivant l'axe Z. En effet la qualité de l'information optique de champ proche et topographique est liée à la stabilité de la distance relative entre la sonde et l'échantillon. La précision voisine de un micron sur les déplacements mécaniques de la crémaillère portant l'objectif permet de limiter la dynamique utile du scanner suivant l'axe Z à une dizaine de microns. Cette réduction de la tension de commande par un facteur quatre abaisse le bruit autour de 10 mV et confère une stabilité de la distance sonde échantillon meilleure qu'un nanomètre.

Le contrôle programmable, décrit au chapitre IIIA.3, doit être adapté aux caractéristiques mécaniques du scanner. Sa fréquence de résonance et son inertie influent sur la réponse des actionneurs piézoélectriques. Dans le mode de repérage des molécules sur l'échantillon, l'observation de la zone de 10 μm est effectuée à faible résolution avec 32 ou 64 pixels par ligne. Cela implique un pas entre points de mesure de l'ordre de 300 nm, donc des variations de tension sur les actionneurs supérieures à huit Volt. Le convertisseur numérique analogique a un temps de réponse très rapide voisin de 17 μs , la chaîne d'amplification haute tension présente également un temps de montée de 20 V/ μs . Appliquée instantanément, chaque pas de tension provoquera une accélération rapide au niveau de la commande des actionneurs. Cette accélération est préjudiciable pour plusieurs raisons. La fragilité aux chocs des tubes de céramique piézoélectrique soumis à des à-coups importants entraîne un risque de cassure. De plus, les à-coups peuvent être sources de vibrations mécaniques du scanner dont la fréquence de résonance est voisine de 350 Hz.

Pour minimiser ces effets deux actions conjointes sont mises en œuvre. La première intervient sur la limitation de la bande passante des circuits amplificateurs haute tension. La deuxième, décompose, par programmation, tout déplacement important en une série de petits déplacements et d'autre part impose, après chaque déplacement, que l'acquisition d'une mesure soit précédée d'un temps d'attente (3 ms dans notre montage) pour assurer la stabilisation de la platine mobile du scanner.

Avec la description du scanner plan que j'ai réalisé, j'ai montré qu'à partir du même type d'actionneurs piézoélectriques que ceux utilisés dans le scanner type Besocke, l'efficacité de déplacement suivant l'axe Z est plus importante d'un ordre de grandeur. Deux fois plus grande dans la direction horizontale, elle permet une meilleure exploitation de nos

échantillons. La finesse de ses déplacements est bien adaptée à la dimension de nos observations. Cependant, la limitation par hystérésis de la précision dans le repositionnement implique qu'il est nécessaire de l'associer à capteur de position pour l'utiliser en MOCP. Une des limitations de ce type de scanner est liée à sa structure mécanique : le montage coplanaire des actionneurs piézoélectriques et leur couplage élastique au porte échantillon introduisent une fréquence de résonance basse et un manque de stabilité sur l'axe Z, ce qui ne permet pas le contrôle de l'approche de la sonde à des distances $\Delta z < 1$ nm. Au contraire le scanner type Besocke présente une fréquence de résonance de l'ordre de 10 kHz avec une excellente stabilité verticale, $\Delta z < 1$ Å.

Ce scanner plan de faible épaisseur est un compromis entre stabilité et grand déplacement suivant l'axe Z. Il ne permet pas de réaliser des images à l'échelle atomique mais il autorise un accès facile par les deux faces de l'échantillon et confère à notre microscope un caractère versatile permettant plusieurs configurations, microscope confocal, microscope SNOM, ou microscope AFM.

IIB.5 - Moteur linéaire piézoélectrique.

Les manipulations du changement de la sonde ou de l'échantillon sur le montage nécessitent l'éloignement puis l'approche de la sonde sur une distance de quelques millimètres. Cet actionneur piézoélectrique, appelé « stick-slip », est un moteur inertiel progressant par glissement. Dans la version que j'ai réalisée, il offre un déplacement linéaire maximum de 5 mm.

Solidaire du bâti du microscope, il constitue un support mobile destiné au retrait et à l'approche de la sonde dans l'axe optique du microscope. L'échantillon étant positionné sur le scanner, il s'agit de placer la pointe de la sonde dans la partie intense au centre du faisceau lumineux, à une distance d'une dizaine de microns de la surface de l'échantillon. Cette position initiale correspond au début de la zone de contrôle des distances nanométriques par un asservissement exploitant les forces de friction pointe - échantillon.

De plus, les faibles disparités de taille des sondes et les écarts de positionnement apportés par leur montage sur le support mobile impliquent un repositionnement précis dans les trois directions X,Y et Z. Pour cela, nous avons réalisé un translateur inertiel « stick-slip », à partir du modèle développé par Pohl [56] et repris par Rozman [57], pour construire, au laboratoire, un ensemble mobile compact constitué de trois translateurs « stick-slip » orientés et accouplés pour obtenir un déplacement de la sonde dans les trois directions. La précision dans le positionnement est contrôlée par la mesure relative de la position de la sonde effectuée à l'aide de capteurs optiques quatre quadrants identiques à celui décrit dans le chapitre IIA.4.1. Les dimensions du moteur correspondent à une longueur de 36 mm, une largeur de 15 mm et une épaisseur de 7 mm.

Le principe de ce moteur est le suivant. Un plateau métallique d'une dizaine de grammes est solidaire d'un trépied actif composé de trois plaquettes de céramique piézoélectrique terminées chacune par une bille en appui sur une surface lisse d'un élément fixe. Une tension V croissante appliquée, simultanément sur les électrodes des trois céramiques provoque une déformation progressive du matériau piézoélectrique, de même sens, dans un mouvement de cisaillement illustré par la figure IIB.5.1.

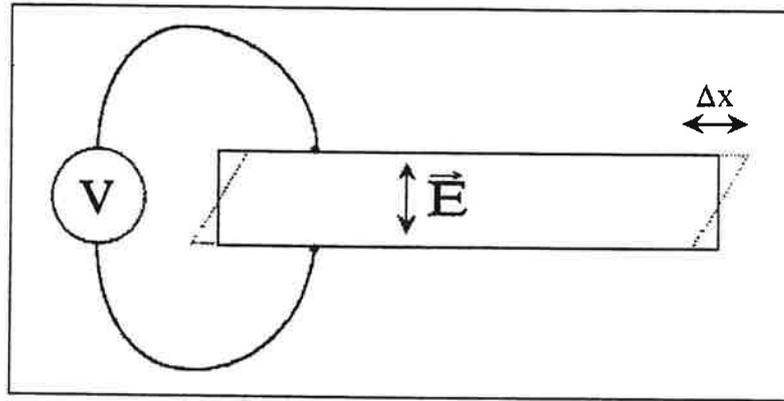


Figure IIB.5.1 Déformation de la céramique, sous l'action d'une tension $\Delta x \approx V$.

Grâce à la force de friction des billes en appui sur l'élément fixe, le plateau se déplace d'un mouvement de translation proportionnel à la tension V et d'amplitude Δx en Å qui peut être exprimée par la relation :

$$\Delta x = V \times d_{15} \quad (\text{IIB.5.1})$$

où V est la valeur de la tension de commande en Volt crête à crête, et d_{15} le coefficient piézoélectrique en Å / V. Pour un matériau de type PZT5A, d_{15} vaut 5 Å / V.

Lorsque la tension chute brutalement à une valeur nulle, l'inertie du plateau ne permet pas à la force de friction existant entre les billes et le plan lisse de l'élément fixe d'entraîner le plateau dans un mouvement de retour. Les céramiques reprennent alors leur géométrie initiale en contraignant les billes à glisser sur le plan lisse jusqu'à la nouvelle position d'équilibre des céramiques. Ceci constitue un déplacement élémentaire d'amplitude Δx .

Le moteur que nous utilisons peut fonctionner dans toutes les orientations de l'espace. Comme le montre la figure IIB.5.2, il est composé de deux plateaux métalliques de mêmes dimensions en appui sur trois points l'un contre l'autre et maintenus parallèlement face à face grâce au champ magnétique induit par deux aimants permanents de grande efficacité. Les deux plateaux peuvent indifféremment être élément fixe ou mobile. Dans une configuration horizontale, je parlerai de plateau inférieur et supérieur.

Sur le plateau inférieur trois plaquettes de céramique piézoélectrique sont positionnées par collage suivant une même orientation, l'axe de polarisation étant l'axe de translation. Elles portent chacune une bille de saphir en leur centre et forment ainsi un trépied en appui sur le plateau fixe. Ce trépied solidaire du plateau mobile est guidé suivant l'axe de translation par deux de ses pieds dont la bille glisse dans un rail en forme de V .

La description du montage représenté par la figure IIB.5.2 est la suivante. Sur la surface interne du plateau inférieur sont collées, en contact électrique, trois plaquettes carrées de 5 mm de côté et 1 mm d'épaisseur de céramique piézoélectrique (PZT5A) disposées en triangle et largement espacées. Chaque céramique reçoit par collage (époxy à l'argent) une électrode commune en chrysocale de 0,05 mm d'épaisseur, fixée sur un plot de connexion monté de manière isolée sur le champ du plateau. Au centre de chacune des céramiques est collée une bille en alumine (Al_2O_3) polie de 1 mm de diamètre. Un évidement aménagé dans l'épaisseur de l'électrode en chrysocale, visible sur la figure IIB.5.3, permet une meilleure assise de la bille et accroît la robustesse du montage.

Le plateau supérieur reçoit, noyés dans son épaisseur, deux aimants permanents de 5 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur qui produisent un champ voisin de 3500 Gauss et qui sont alignés sur l'axe central de manière équidistante sur la longueur du plateau. Près d'un bord de ce plateau, deux évidements sont aménagés, parallèlement à l'axe des aimants. Ils correspondent aux extrémités de deux pieds du plateau inférieur. Ces évidements reçoivent chacun deux « aiguilles » cylindriques de 1,5 mm de diamètre et 6 mm de longueur conçues pour les roulements mécaniques. Comme le montre la figure IIB.5.4, ces aiguilles, collées en contact deux à deux de manière colinéaire à l'axe de translation, constituent les deux parois du rail de guidage en V sur lesquelles le glissement de la bille de chacun des deux pieds provoque la translation linéaire du plateau inférieur.

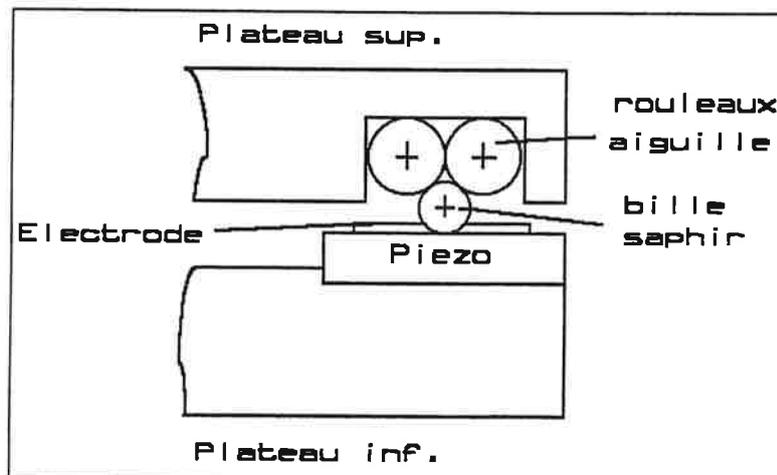


Figure IIB.5.4 Vue d'un pied d'entraînement du moteur stick-slip. Le plateau inférieur est fixe. La bille, mue par la cale piézo, entraîne par friction le plateau supérieur. Immobilisé par son inertie, le retour rapide de la bille s'effectue par un glissement guidé sur les rouleaux aiguille.

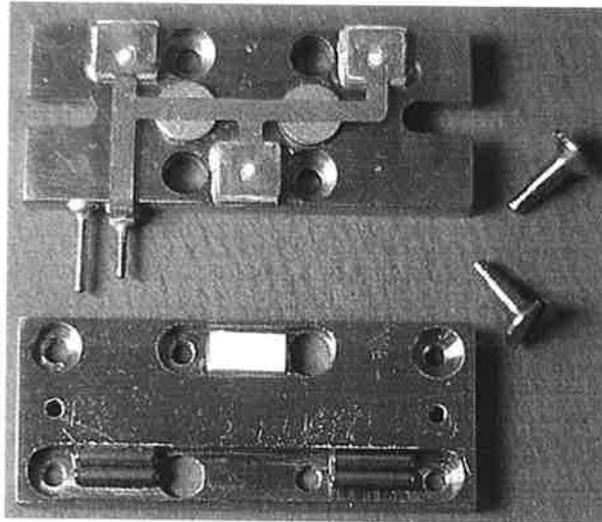


Figure IIB.5.2 Vue des éléments du moteur de translation. Le plateau passif avec ses rouleaux de guidage et le support d'alumine. Le plateau actif avec ses 2 plots de connexion électrique et son tripode piézoélectrique. Les 2 vis se montent aux extrémités du plateau passif et limitent le déplacement dans la zone utile.

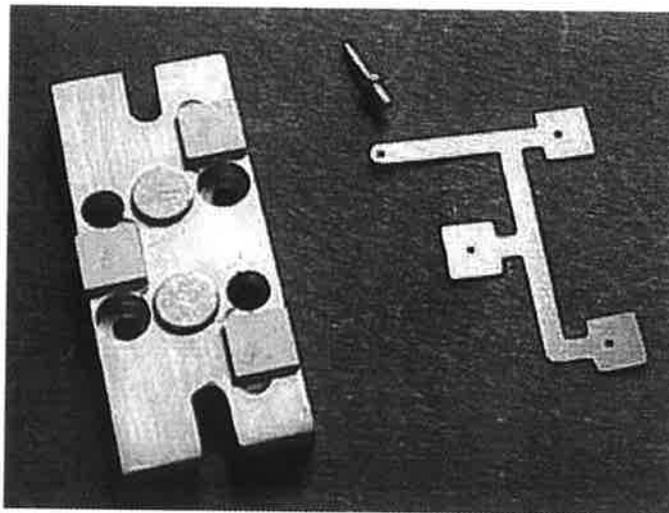


Figure IIB.5.3 Plateau actif du moteur de translation. Il comporte les 3 céramiques piézoélectriques carrées, entre lesquelles sont disposés les deux aimants permanents assurant l'attraction du plateau passif. On distingue l'électrode en chrysocale très mince, commune aux plaquettes, avec un trou pour recevoir chaque bille, et son plot de connexion.

Comme le montre la figure IIB.5.5, l'erreur latérale de guidage i dépend de la rectitude de la génératrice de l'aiguille est inférieure à 500 nm.

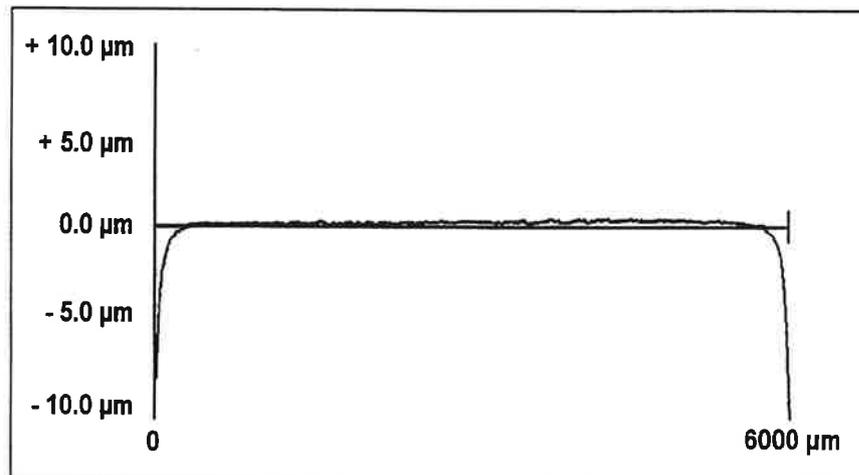


Figure IIB.5.5 Profil de la surface des rouleaux aiguilles servant au guidage.

L'erreur latérale totale est due principalement à l'imprécision de l'usinage des évidements et du montage des aiguilles. Sur les moteurs que nous avons réalisés elle reste inférieure à 30 µm sur un déplacement de 5 mm de longueur. Dans le troisième évidement, face au dernier pied, une plaquette de faible épaisseur d'alumine (Al_2O_3) polie est rendue solidaire du plateau supérieur par collage. Elle offre un plan lisse au contact de la bille en saphir situé à l'extrémité du troisième pied (voir figure IIB.5.2).

Pour commander ces moteurs nous utilisons une électronique haute tension commerciale (OMICRON) contrôlée par programmation. Elle utilise 6 voies d'un port huit bits sur un circuit de communication parallèle (PPI8255, Intel) de la carte d'interface multifonctions (ADA2000 Real Time Device) implantée dans l'ordinateur. Chaque axe de déplacement nécessite deux voies, une pour le sens positif et une pour le sens négatif. A chaque impulsion de niveau TTL et d'une durée de 10 µs délivrée sur une voie par le programme de commande, l'électronique construit une impulsion de tension ayant un profil sinusoïdal comme le montre la figure IIB.5.6. Durant la période $T = t_2 - t_1$ de l'impulsion haute tension d'une durée de l'ordre de 250 µs, on peut distinguer trois phases. Un démarrage en tension, très progressif, phase a, une zone de croissance constante, phase b et un palier de ralentissement, phase c, établissant la tension maximale. Cette méthode apporte deux avantages. Elle limite l'effet d'inertie indésirable dans la partie active du déplacement et

augmente, ainsi, l'efficacité de commande principalement aux faibles valeurs de déplacement. Elle atténue l'amplitude de vibration mécanique et diminue son temps d'amortissement. La fréquence maximale acceptée par l'électronique haute tension est de l'ordre de 4 kHz.

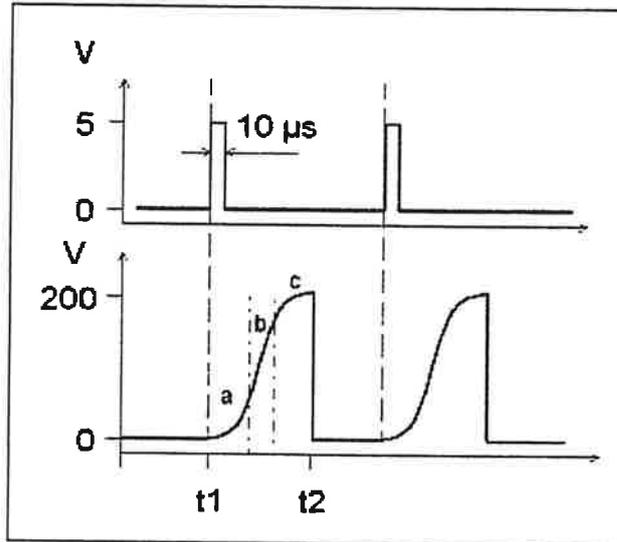
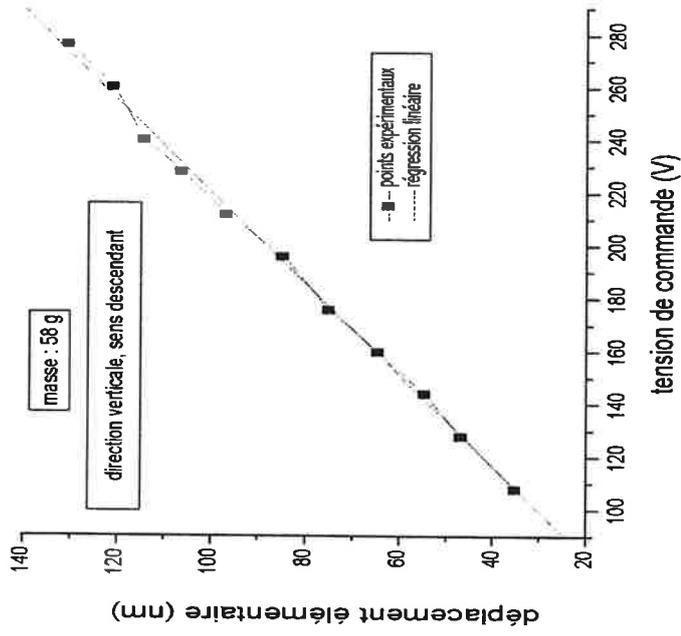


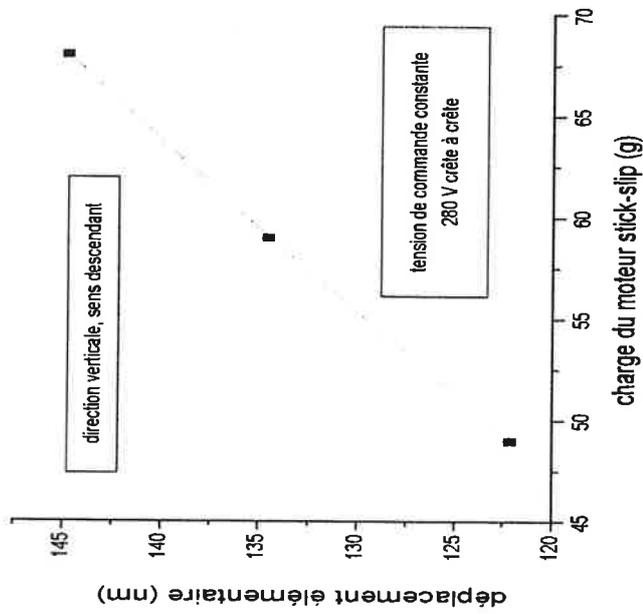
Figure IIB5.6 Commande TTL programmée de 10 µs, produisant l'impulsion électrique, de tension prédéterminée (ici 200V), appliquée aux céramiques piézoélectriques du moteur à translation pour produire un déplacement d'un pas élémentaire. L'action, de durée $t_2 - t_1 \cong 250 \mu\text{s}$, comporte les phases a, b, c respectivement d'accélération, de vitesse constante et de décélération.

A partir du banc d'étalonnage interférentiel que j'ai réalisé (voir § IIA.4.2), j'ai effectué des mesures de déplacement avec différentes masses fixées sur le plateau mobile, pour étudier la variation de la valeur du pas de déplacement en fonction de la tension crête de commande. En position de fonctionnement horizontal, le déplacement est régulier et symétrique dans les deux directions de translation. Suivant la charge, la largeur du pas varie, linéairement, entre 10 nm et 400 nm pour une tension de commande crête à crête variant de 50 V à 400 V.

L'utilisation la plus critique de ces moteurs inertiels correspond à un déplacement vertical. J'ai donc étudié les déplacements selon ce mode pour analyser le comportement du moteur suivant la charge et le sens de translation. Les différents résultats de ces mesures sont représentés par les figures IIB.5.7 et IIB.5.8.



B



A

Figure IIB.5.7 Mesures du pas élémentaire de translation du moteur stick-slip supportant des charges dans le sens vertical descendant. Figure A, variation du pas en fonction de la charge.

Figure B, pour une charge de 58 g, variation du pas en fonction de la tension de commande.

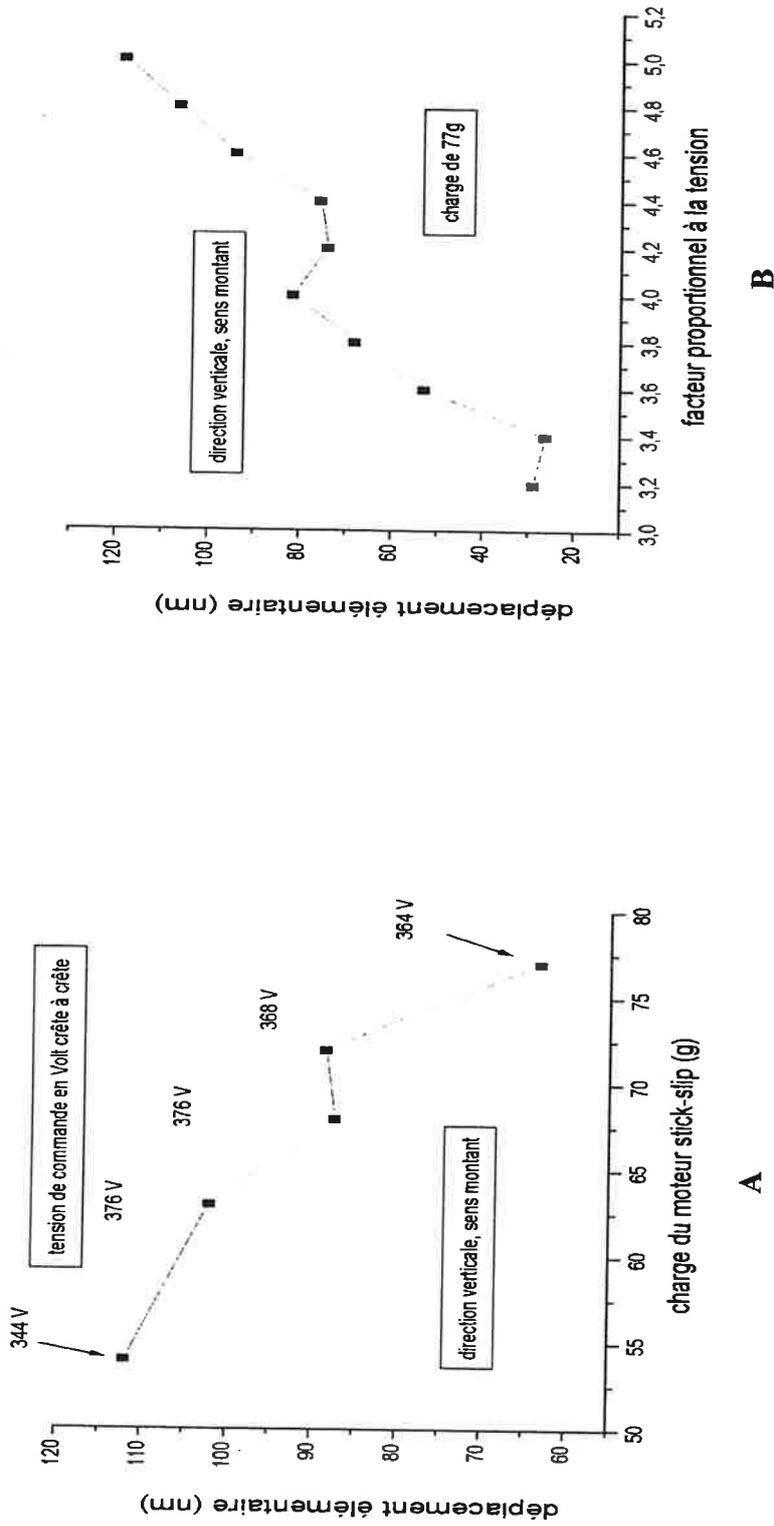


Figure IIB.5.8 : Mesures du pas élémentaire de translation du moteur stick-slip supportant des charges dans le sens vertical ascendant. Figure A, variation du pas en fonction de la charge. Figure B, pour une charge de 77 g, variation du pas en fonction de la tension de commande.

Dans le sens descendant, la courbe A de la figure IIB.5.7 montre la variation du pas de déplacement élémentaire en fonction de la charge supportée par le plateau mobile. On remarque, sur cette courbe, que pour une tension de commande donnée, la valeur du pas croît de façon presque linéaire avec l'augmentation de la charge. La courbe B montre qu'un tel moteur assure une bonne linéarité du déplacement, même dans le sens vertical descendant, d'une charge constante (58 g) en fonction de l'accroissement de la tension de commande.

Des mesures semblables ont été réalisées dans le sens ascendant et ce moteur, malgré la force de pesanteur fonctionne de façon satisfaisante. De manière symétrique, la courbe A de la de la figure IIB.5.8 montre une variation décroissante à peu près linéaire du pas avec l'augmentation de la masse de la charge. Sur la courbe B, on peut observer l'évolution du pas en fonction de la tension de commande pour le déplacement d'une forte charge de 77 g. Les courbes mesurées dans les mouvements ascendants montrent cependant quelques irrégularités qui sont principalement dues à des pertes d'adhérence du trépied sur le plateau fixe. En effet, dans le mode vertical, l'équilibre à atteindre, pour assurer une force de friction suffisante mais pas trop importante, pour entraîner le plateau avec sa charge et permettre le retour des céramiques par glissement, est beaucoup plus délicat.

Ce moteur, capable de déplacer sur plusieurs millimètres, des charges de plusieurs dizaines de grammes dans la direction verticale et de plusieurs centaines de grammes en direction horizontale, présente une résolution supérieure de deux ordres de grandeur à une résolution micrométrique. Son comportement linéaire, au regard des tensions de commande et des masses qui lui sont appliquées, facilite son utilisation. Son architecture en plateau reposant sur trois points lui confère une grande stabilité de position et un très bon guidage. Son faible encombrement permet d'associer plusieurs moteurs ensemble pour obtenir des déplacements multidimensionnels fiables et précis dans toutes les directions de l'espace. La robustesse de ses éléments autorise son emploi en environnement sévère tel que les basses températures et l'ultra vide. Le principe impulsif de sa commande permet aisément un pilotage informatique et de manière quantifiée de ses déplacements. Ces caractéristiques font de ce moteur un actionneur de choix pouvant répondre à de multiples besoins de translation dans les montages de microscopie.

IIC - Dispositif expérimental complet.

Le chapitre I a permis de dégager les différentes techniques qu'il faut associer pour réaliser des microscopes optiques spécialement dédiés à l'analyse de signaux optiques de très faibles flux, combinée avec une haute résolution spatiale. Les deux premières parties de ce chapitre ont été consacrées à décrire successivement les « briques » élémentaires du dispositif que j'ai développé pour satisfaire aux exigences de telles expériences. Ce chapitre a pour objectif de donner une vue complète d'une part du microscope modulable qui a été élaboré à partir de ces composants et de le restituer dans le contexte plus général du dispositif expérimental dans sa totalité. Ce dispositif est représenté sur la figure IIC.1 qui est découpée en plusieurs modules.

Le module central M1 correspond au microscope confocal lui-même. Réalisé à partir d'un microscope à colonne inversée, il reçoit à sa partie supérieure, au-dessus de l'objectif, le scanner plan porte-échantillon décrit au chapitre IIB.4. Pour contrôler son positionnement dans le plan de l'échantillon, j'ai associé un capteur optique de position quatre quadrants décrit au chapitre IIA.4.1. Il contient un bloc optique qui reçoit, du module M3, le faisceau d'excitation fibré, à travers des filtres de polarisation, pour être réfléchi sur un miroir dichroïque dans l'axe du microscope, vers l'objectif qui focalise le faisceau sur l'échantillon. Le signal de fluorescence, collecté à travers l'objectif et le miroir dichroïque est filtré spatialement puis injecté dans une fibre optique pour être dirigé vers la chaîne de mesure du module M4. Associé au module M2, il forme le microscope optique de champ proche.

Le module M2 correspond en effet à la tête de microscopie à force atomique. On reconnaît le détecteur « buzzer » décrit au chapitre IIA3.2 avec son module électronique d'asservissement en mode shear-force ou en mode STM à partir de l'électronique décrite au chapitre IIA3.1, les moteurs stick-slip de prépositionnement de la sonde décrits au chapitre IIB.5, et ses capteurs optiques de position identiques à ceux utilisés pour le positionnement du scanner.

Le module M3 correspond à la mise en forme et au couplage du rayonnement excitateur au microscope. Dans ce module, la mise en forme du faisceau laser est effectuée de deux façons. La première, contrôle l'intensité du faisceau à l'aide d'un modulateur acousto-optique placé dans une boucle d'asservissement exerçant une contre réaction par rapport à l'amplitude du signal mesuré à l'aide d'une photodiode. La seconde est un filtrage des fluctuations spatiales réalisé par injection du faisceau utile dans une fibre optique.

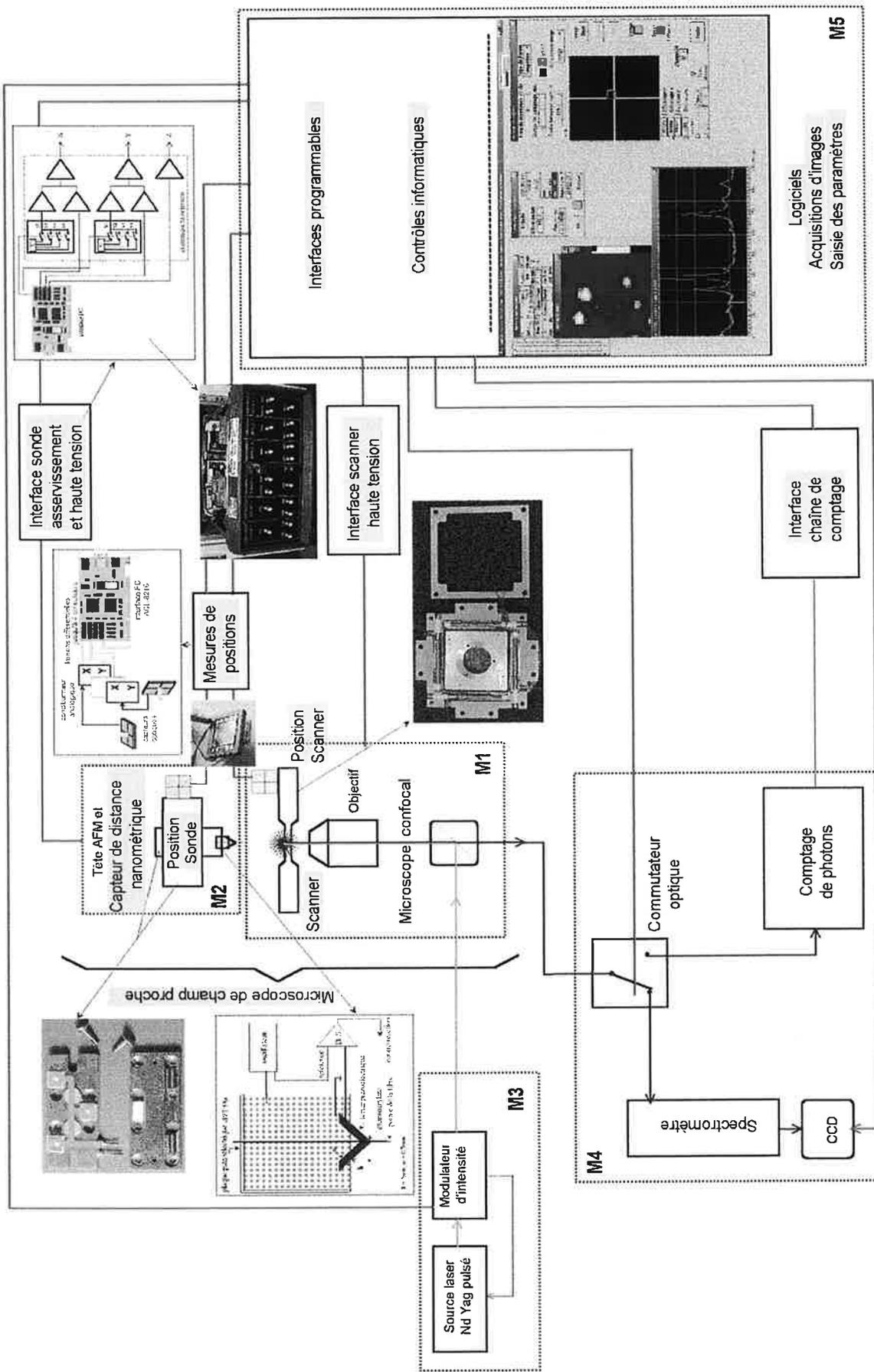


Figure IIC1 : Éléments modulaires développés et mis en œuvre pour la réalisation du microscope de champ proche optique.

La source utilisée est un laser Nd :Yag à modes bloqués délivrant, à une longueur d'onde de 532 nm, des impulsions de 100 ps à haut taux de répétition (76 MHz).

Le module M4 correspond à la détection des signaux pertinents. Le signal issu du microscope est d'abord dirigé à l'aide d'un commutateur optique vers la voie de mesure adaptée à la méthode d'analyse utilisée, soit la mesure de fluorescence totale, soit la mesure spectrale multidimension. Les caractéristiques des détecteurs spécifiques à chacune des voies seront décrites dans les chapitres IIIA.2 et IIIA.5.

Le module M5 rassemble les fonctions que j'ai développées pour réaliser le pilotage informatique de l'ensemble du dispositif expérimental. Les méthodes que j'ai mises en œuvre pour assurer cette gestion informatique font l'objet du chapitre III.

III - Gestion informatique de l'ensemble du microscope :

Comme je l'ai expliqué dans les chapitres précédents, la mesure des signaux optiques du microscope et le contrôle de ses éléments mobiles sont assurés par des capteurs et des actionneurs dont les informations et les commandes sont représentées par des signaux électriques. La numérisation, de ces signaux, grâce à des interfaces électroniques spécifiques de mesure et de contrôle, est nécessaire pour concevoir une gestion informatisée de l'ensemble du microscope. L'intérêt majeur d'un système informatisé est sa capacité à acquérir et archiver de manière ordonnée une grande quantité d'informations utiles à la construction d'images numériques, obtenues dans différentes conditions expérimentales. L'écran de l'ordinateur est un outil privilégié pour visualiser les images ainsi que les différents paramètres et états de contrôle du microscope. De plus, l'ordinateur peut, efficacement et automatiquement grâce à la modularité de son langage de programmation, contrôler les fonctions électroniques de ces interfaces et piloter, de manière optimale, les éléments du microscope. En cela, il permet un changement aisé entre les différentes configurations expérimentales et les différents types de mesures. L'emploi de l'ordinateur permet de réaliser un appareil d'imagerie interactif et versatile.

Cependant, le fonctionnement de cet appareil nécessite un pilotage précis de ses interfaces. En effet, obtenir des enregistrements de grande qualité implique un enchaînement et une synchronisation parfaits des actions sur les éléments qui interagissent, en particulier, dans les déplacements et mesures des différents actionneurs et capteurs du microscope. Il n'existe pas de logiciel commercial correspondant à ces exigences.

Une partie importante de mon travail a consisté à mettre en œuvre des interfaces que j'ai développées et d'autres commerciales, et développer un logiciel original de gestion de notre appareil à partir du système logiciel d'exploitation de l'ordinateur ou OS (Operating System) WINDOWS-95®. Tirant partie des possibilités graphiques de cet OS, orienté vers la visualisation, ce logiciel est un outil d'imagerie numérique novateur dans le domaine de la MOCP.

La figure III.1 montre les différents éléments qui sont sous contrôle du système informatique. Leurs liaisons représentent les voies de mesures et de commandes analogiques et numériques qui sont réalisées à travers des cartes d'interface directement implantées sur le bus interne de l'ordinateur. Ces cartes sont dotées de fonctions spécifiques de conversions numériques, de contrôles logiques et de communications et sont adaptées aux caractéristiques

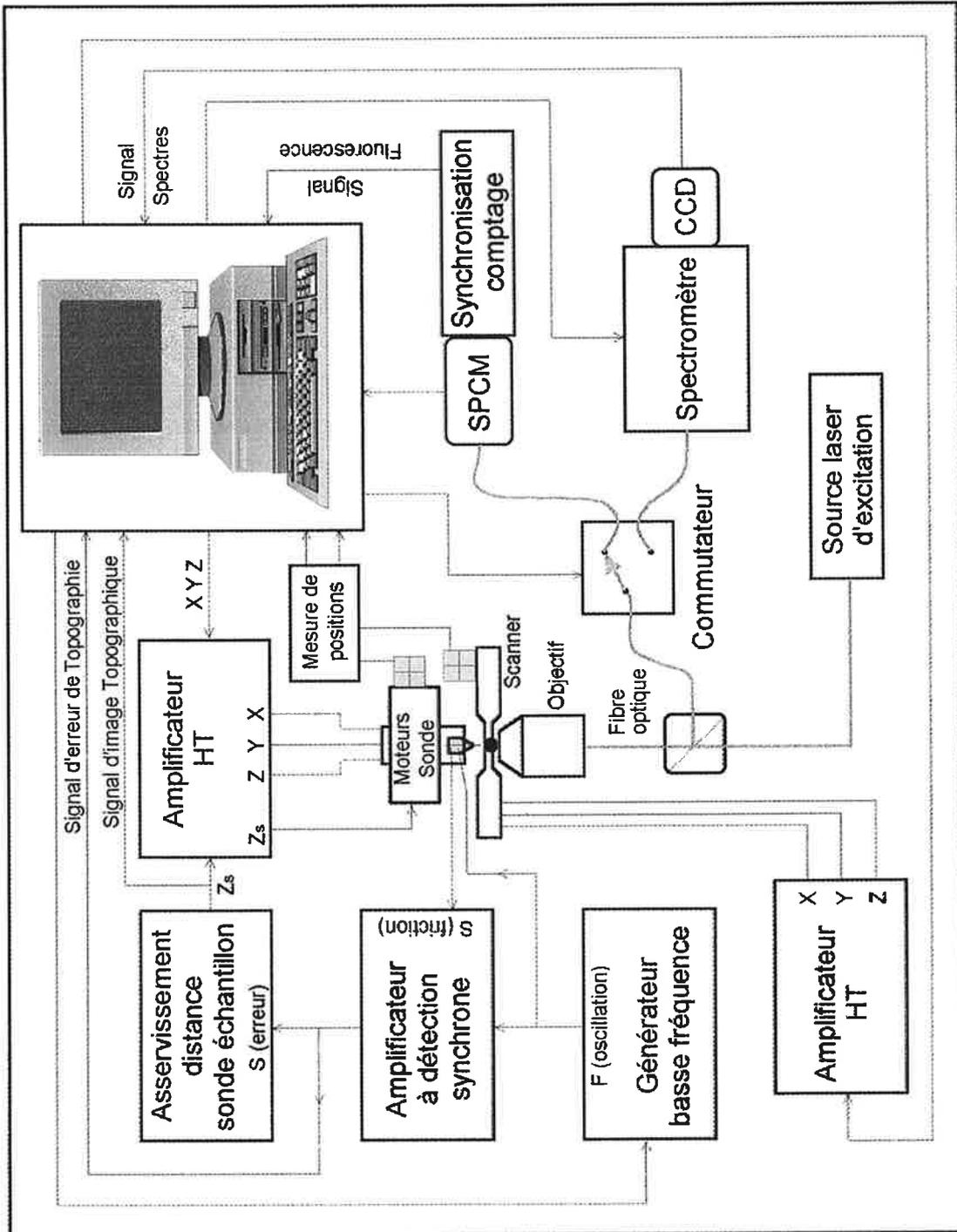


Figure III.1: Synoptique général des éléments du microscope.

des signaux électriques présents sur ces voies. On reconnaît, dans ce schéma, de nombreux capteurs et actionneurs que j'ai présentés au cours de ce manuscrit.

Les fonctions d'exploitation, importantes, des microscopes de type confocal et de champ proche que nous utilisons, gérées par l'ordinateur peuvent être classées dans les catégories suivantes :

- Le balayage de l'échantillon. L'actionneur peut être soit un scanner du type Besocke, soit un scanner plan ou un scanner galvanométrique du faisceau lumineux dans le mode simplement confocal du microscope sans champ proche. L'ordinateur gère, à la fois, les commandes de balayage avec la mesure des déplacements et l'acquisition du signal issu des différentes positions de l'échantillon balayé.
- Le contrôle de la nanosonde dans le mode de fonctionnement en champ proche. L'asservissement de la position de la nanosonde est géré par une électronique externe. L'ordinateur intervient dans la caractérisation initiale de la nanosonde et en particulier de sa fréquence de résonance. Pour cela il pilote le générateur de fréquence et acquiert le « signal d'erreur » délivré par la nanosonde. En cours de balayage, l'ordinateur intervient aussi pour acquérir le signal de l'image topographique, qui est proportionnel à la valeur de la haute tension appliquée sur l'actionneur qui maintient la distance pointe échantillon constante. Ou, éventuellement, il acquiert l'image d'erreur topographique, qui est la différence entre la valeur correspondant à la référence imposée de position de la sonde, c'est la consigne, et la valeur de position mesurée par le capteur de distance pointe-échantillon.
- L'acquisition des signaux optiques utile à la construction des images. L'ordinateur contrôle l'intensité de la source laser d'excitation, soit en mode tout ou rien pour les obturateurs électromécaniques soit de manière variable à travers la commande d'un modulateur acousto-optique. Il gère également la commutation entre le mode imagerie (détecteur SPCM) ou imagerie spectrale (détecteur multicanal CCD) et effectue l'acquisition des signaux optiques éventuellement à travers une électronique de mise en forme.

Les fonctions développées dans le logiciel réalisent trois types d'opérations :

- La saisie et la présentation interactive des paramètres expérimentaux et des mesures.
- Le pilotage des éléments actifs et l'acquisition des mesures.
- Le traitement des signaux en temps réel et l'archivage dans leur base de données.

La saisie et la présentation interactive des paramètres de fonctionnement concernent les différents systèmes de déplacement et les multiples détecteurs assurant le contrôle et la mesure des signaux contribuant à la construction d'une image typique. Ainsi, la position et la dimension de la zone d'intérêt balayée de l'échantillon, le nombre de points donc la résolution de l'image, constituent les paramètres géométriques de la portion d'échantillon observée. Le temps d'intégration est le caractère temporel adapté aux mesures des taux d'émission de photons de fluorescence. La sélection et l'affichage du mode de mesure, qui correspond à l'acquisition du signal par un détecteur ponctuel ou multicanal, spécifie le type d'image. La nature de la sonde d'analyse du microscope et sa fréquence de résonance caractérisent la configuration du microscope optique de champ proche.

Cette saisie interactive des paramètres, effectuée par l'utilisateur à l'aide du clavier et de la souris à travers une présentation visuelle spécifique et intuitive de l'écran de l'ordinateur, utilise l'interface logicielle graphique GUI (Graphic User Interface) de WINDOWS-95 et sera décrite au chapitre IIIB.1.1.

Le pilotage des différents interrupteurs commutateurs et actionneurs inclut trois types d'actions.

Le pilotage programmé permet, à l'aide d'une interface standard de type (RS232C) [58] et d'un langage codé propre à l'appareil piloté, la transmission conversationnelle d'ordres et de requêtes pour sélectionner et contrôler le domaine spectral du spectromètre et, la fréquence de référence du générateur basse fréquence correspondant à la résonance de la sonde.

Le pilotage tout ou rien présente des niveaux constants pour activer les commandes des éléments électroniques tel le boîtier de synchronisation de la chaîne de comptage SPCM et électromécaniques comme le commutateur qui assure l'aiguillage de la voie optique à mesurer vers le système de détection choisi. Il est réalisé à l'aide des ports logiques d'entrées/sorties parallèles qui sont des composants des cartes d'interfaces.

Le pilotage d'une grandeur qui varie au cours du temps, ce qui est le cas des actionneurs piézoélectriques qui équipent le scanner et les moteurs de positionnement de la sonde, est assuré par la conversion d'une valeur numérique variable du programme en une tension analogique de commande convenablement amplifiée par une électronique haute tension qui commande les axes X, Y et Z. Cette conversion est effectuée par une carte d'interface spécifique dont la valeur numérique maximale (2^{16}), résultant de la dynamique de l'élément convertisseur, détermine la résolution de la commande.

L'acquisition des mesures utilise des interfaces variées. Soit ces interfaces sont spécifiques à chaque détecteur comme la caméra CCD et la chaîne de comptage associée au détecteur SPCM, décrite au chapitre IIIA2, soit elles sont adaptées à plusieurs types de mesure, (tensions analogiques, niveaux logiques, comptage) et elles acceptent plusieurs capteurs ou contrôlent plusieurs éléments distincts. De telles interfaces sont les cartes multifonctions, qui comportent, en particulier, des éléments convertisseurs de tension analogique en valeur numérique. La dynamique de cette conversion, par exemple (2^{16}), caractérise la résolution de la mesure. Les tensions analogiques, issues de différents capteurs, sont préalablement amplifiées et traitées par une électronique adaptée pour constituer une information continue de position d'un élément mobile ou un signal de mesure du microscope. Un exemple d'une telle électronique est le conditionneur du capteur de position décrit chapitre IIA.4.1 ou l'amplificateur à détection synchrone. Ces tensions sont ensuite converties en valeurs numériques par l'interface. La mesure des signaux et le stockage en mémoire de leurs valeurs s'effectuent en temps réel au cours de la construction de l'image.

La sauvegarde des mesures associées aux multiples dimensions de l'image est réalisée en temps réel, les paramètres expérimentaux et le graphisme de l'image sont sauvegardés à la fin d'acquisition. L'archivage de toutes ces valeurs est organisé au sein d'une base de données dont la structure est optimisée pour exploiter rapidement les images et particulièrement les images multidimensionnelles.

Dans la partie IIIA de ce chapitre, après une introduction sur les contraintes matérielles et logicielles qui ont guidé mes choix, j'exposerai, dans les sous-chapitres suivants, la mise en œuvre des interfaces matérielles, celles acquises commercialement comme celles que j'ai développées. Dans le paragraphe IIIA.1, je préciserai les classes temporelles caractérisant le mode de gestion des contrôles à travers les actions et les événements. Ensuite, je décrirai, dans les paragraphes suivants, chaque interface ayant fait l'objet d'une intégration ou d'une conception originale avec les fonctions matérielles et logicielles qui lui sont associées.

Dans la partie IIIB, je décrirai l'environnement du développement logiciel, l'architecture du programme de gestion et de la base de données de stockage des images, et j'illustrerai les fonctions du programme en montrant les spécificités d'interaction et de présentation graphique offertes à l'utilisateur pour cet outil d'imagerie en MOCP.

IIIA- Interfaçage des différents éléments matériels

Le choix du matériel informatique, centré sur un ordinateur de type PC, a été déterminé en fonction des exigences matérielles et logicielles imposées par le détecteur multicanal CCD utilisé en imagerie spectrale.

Ce détecteur commercial, avec son électronique de contrôle programmable, est particulièrement adapté pour la mesure de faibles flux dans l'analyse spectrale. Il est initialement destiné à fonctionner de manière individuelle sur un ordinateur PC, à l'aide du logiciel WINSPEC fourni par le constructeur et qui fonctionne sous l'OS WINDOWS.

Ce logiciel a un caractère très fermé qui ne permet pas d'incorporer les contrôles de ce détecteur dans le système de gestion informatique de nos microscopes.

Nous avons pu obtenir du constructeur (PRINCETON) une bibliothèque logicielle [59] compatible avec une programmation en langage C pour nous fournir des fonctions de bas niveau pilotant le système CCD sous WINDOWS au format 16 bits. Cette bibliothèque, livrée dans un niveau de version préliminaire, constituait, au début de ce travail, une option récente à ce matériel. La première étape de l'analyse fonctionnelle du programme de gestion du CCD fut la compréhension et la reconstruction du jeu de fonctions élémentaires permettant de contrôler un cycle d'exposition-lecture du capteur CCD et de gérer l'ensemble des paramètres (temps d'exposition, mode d'obturation, binning, saut de ligne, ...).

J'ai ainsi pu réaliser l'intégration de la gestion informatique de ce détecteur multicanal avec efficacité.

Le degré de compatibilité de cette bibliothèque logicielle a déterminé le langage de développement du programme de gestion informatique de nos microscopes. Ces développements ont été réalisés en langage objet C++ avec une méthode rapide de développement (RAD) composée de l'environnement de programmation BCW de INPRISE-(BORLAND)® [60,61].

Le système d'exploitation WINDOWS-95® constitue un OS multitâches dont le fonctionnement est bien plus complexe que celui d'un OS monotâche purement séquentiel comme MSDOS ® [62]. Il est capable d'exécuter simultanément ou parallèlement (par tranche de 20 ms) plusieurs programmes ou processus et plusieurs fonctions ou unités de traitement (threads) [63].

Comme je l'ai dit, pour être compatible avec la bibliothèque logicielle PRINCETON, il était nécessaire de développer notre programme sur une plate-forme 16 bits. Sous l'OS WINDOWS-95 cela impose une structure monotâche de son code exécutable. L'analyse temporelle de la gestion de nos microscopes dans les différents environnements expérimentaux de la MOCP a montré que les fonctions, gérées par l'ordinateur, s'enchaînent de manière séquentielle et qu'une exécution de type « parallèle » n'est pas nécessaire. En conséquence l'exécution du programme sous l'OS sera celle d'un seul processus ne possédant qu'un seul thread exécutant séquentiellement ses fonctions.

Les actions de l'utilisateur sur le clavier et la souris, appliquées aux contrôles de l'interface graphique du programme sont prises en compte par le GUI de l'OS. A une action détectée, le GUI transmet un message au programme de gestion du microscope qui exécutera la fonction correspondante. Le programme traite les messages séquentiellement et ne peut recevoir de nouveaux messages tant que la fonction en cours n'est pas terminée. On remarquera que le programme doit inclure dans sa structure, en plus des fonctions propres à la gestion des éléments du microscope, les fonctions de traitements des messages du GUI correspondant aux actions utilisateur sur l'interface graphique spécifiquement construite pour le programme.

Cette transmission de message et la structure d'un tel programme est caractéristique du fonctionnement de WINDOWS et conditionne les mécanismes de gestion logicielle effectués par ce programme.

Cependant le caractère multitâches de cet OS perturbe aléatoirement, suivant le nombre de tâches qui sollicitent le processeur, la régularité temporelle de l'exécution séquentielle des instructions du programme. Cet inconvénient majeur, ne permet pas au programme d'effectuer directement la gestion temporelle nécessaire à la synchronisation précise de certaines actions de contrôle et de commande des différents éléments de nos appareils. Comme je l'explique dans le chapitre suivant, cela implique le développement de solutions matérielles spécifiques et de méthodes logicielles en accord avec le fonctionnement d'un tel OS.

IIIA.1- Principes de gestion temporelle des différents contrôles du microscope

La prise en compte d'évènements externes au PC et le séquençage des actions dans les mesures et les commandes des éléments du microscope sont régis par trois modes de gestion [64]: le mode asynchrone ou différé, le mode temporisé et le mode synchrone. Ces modes sont caractérisés par la rapidité, la reproductibilité et la précision temporelle de ces actions.

Un ordre programmé exécuté ou un changement d'état reçu à travers une carte d'interface, établissent une nouvelle action dans le fonctionnement du microscope ou dans celui d'un de ses éléments. La vitesse de réponse du logiciel correspond au temps d'établissement de cette action. Elle dépend principalement du temps d'exécution des instructions du programme de gestion du microscope, augmenté d'un temps d'exécution des instructions appartenant aux tâches indépendantes de gestion de l'OS multitâches.

Pour citer quelques exemples de ces tâches, la communication sur réseau, l'écriture et la lecture d'informations sur le disque dur, la réorganisation dynamique de l'espace mémoire (RAM), le déplacement de la souris et la prise en compte des actions sur ses boutons sont autant de fonctions système pouvant intervenir simultanément avec les fonctions de la tâche de gestion du microscope. Le caractère prioritaire des modes d'exécution de ces fonctions de l'OS interrompt, de manière parcellaire, le déroulement de la tâche dédiée au microscope et, introduit une exécution séquentielle de durée temporelle erratique de ses fonctions. Des différences importantes dans les temps de réponse peuvent en découler et varier ainsi du domaine de la microseconde à plusieurs centaines de microsecondes.

La périodicité de ces perturbations temporelles dépend en moyenne du nombre de tâches s'exécutant de manière concurrente. Pour minimiser ces perturbations des précautions doivent être observées. La suppression de la tâche de gestion réseau, l'action différée des lectures et écritures de données sur le disque dur et l'utilisation d'un espace mémoire deux fois plus important que l'espace moyen nécessaire, améliorent sensiblement les temps de réponse du programme.

Les mesures des signaux des différents capteurs analogiques de notre appareil comme les informations de position sont effectuées sur un état de repos de l'élément mobile. Une

nouvelle action programmée sur ces éléments est conditionnée à l'obtention du résultat numérisé de l'information de position par une interface spécifique. Ce principe ne présente pas de condition de synchronisation temporelle précise et est directement réalisé par le logiciel.

Cependant la capture programmée d'évènements extérieurs fugitifs de durée inférieure à 500 μ s de même que les commandes de changement d'état destiné à synchroniser précisément des actions temporelles ne peuvent pas, avec l'OS WINDOWS, être correctement effectuées par une simple exécution logicielle. En conséquence les fonctions synchrones sont assurées par des interfaces matérielles.

Néanmoins le mode programmé asynchrone ou différé permet la capture fiable de ces évènements à condition que la transition fugitive du niveau électrique correspondant soit mémorisée dans un état maintenu jusqu'à ce que sa détection logicielle soit effective. Cette méthode différée de capture de l'évènement correspond à une boucle de lecture (polling) d'une entrée du port de communication affectée à la scrutation de l'état mémorisé. La mémorisation de ces transitions est réalisée, de manière matérielle par des circuits électroniques de synchronisation, associés ou intégrés aux cartes d'interfaces.

Au contraire, dans la plus part des actions, telles les commandes de systèmes piézoélectriques et électromécaniques qui présentent un temps de réponse T supérieur au temps d'exécution des instructions programmées comme le déplacement du scanner du microscope ou le basculement du commutateur optique, il est nécessaire d'attendre, pendant une durée $T_{min} \geq T$, l'accomplissement de l'action et la stabilité de l'élément avant d'enchaîner la commande programmée de mesure du signal de fluorescence.

Ce mode de fonctionnement est le mode temporisé. Son principe consiste à imposer un temps d'attente minimum T_{min} entre l'instruction courante du programme qui déclenche l'action souhaitée et l'instruction qui déclenche l'action suivante.

La production de cette attente programmée peut, suivant sa durée, être réalisée de deux façons. A l'aide d'une minuterie matérielle interne (timer), gérée par l'OS et contrôlée par le programme, qui, lorsqu'elle est activée, émet un message vers le programme au bout d'un temps, appartenant au domaine $1\text{ ms} \leq T_{min} \leq 65535\text{ ms}$.

Le timer interne présente deux avantages, la durée T_{min} de son délai est indépendante de la fréquence de fonctionnement du processeur et elle est aussi indépendante de l'exécution du

programme qui peut se poursuivre pendant cette attente. Cependant, cette minuterie ne gère pas les temps courts.

Pour $T_{min} < 1$ ms, le délai est essentiellement réalisé par l'exécution d'une fonction logicielle « délai », composée d'une boucle d'instructions inopérantes, dont l'appel est inséré entre les deux actions à enchaîner dans le déroulement de l'exécution du programme. La valeur minimale T_{min} de cette temporisation, pour N cycles de boucle, est donnée par la relation :

$$T_{min} = N \sum_{i=1}^n T_i \quad (\text{IIIA.1.1})$$

avec T_i le temps d'exécution propre de chaque instruction élémentaire présente dans une boucle de n instructions, on négligera le temps d'exécution de l'appel de la fonction délai et on supposera que l'OS n'apporte aucune perturbation pendant son exécution.

Si la conception logicielle de ce délai est simple, sa valeur T n'est pas toujours reproductible car elle dépend de la cadence d'horloge utilisée sur l'ordinateur et peut aléatoirement être modifiée par la durée T_{multi} (500 μ s ou plus) d'exécution d'autres tâches, prioritaires à celle du programme en cours, entreprises par l'OS. Dans la pratique, avec une configuration optimisée, ces perturbations ne sont pas fréquentes. La valeur du délai T est alors représentée par :

$$T_{min} \leq T \leq T_{min} + T_{multi} \quad (\text{IIIA.1.2})$$

Cette structure de mécanisme de boucle, qu'elle soit utilisée dans une boucle de temporisation, une boucle de scrutation d'un événement externe et plus généralement une boucle d'exécution d'un ensemble d'instructions du programme, présente un inconvénient et un avantage.

Dans le programme monotâche, l'exécution d'une boucle d'instructions représente la tâche en cours et interdit, tant que la fin de boucle n'est pas atteinte, toute possibilité pour le programme de gestion du microscope de recevoir les messages des contrôles du GUI. Ces messages sont consécutifs aux actions immédiates de l'utilisateur (souris, menus, boutons, clavier, timer, ...) pour interrompre ou modifier le traitement en cours.

Pour des boucles ayant un temps d'exécution long, comme la mesure spectrale, l'utilisateur devra attendre la fin de boucle pour effectuer une interruption ou une nouvelle action. Le programme donne l'impression d'être inactif, ce mécanisme de boucle est « bloquant ».

Par contre, pendant l'exécution d'une telle boucle dans une fonction de temporisation, la valeur de temporisation T ne présentera pas d'accumulation de retards aléatoires dus aux temps de traitements des messages émis par le GUI, donc $T_{min} \approx T$ en conservant le principe $T_{min} \geq T$.

Cet avantage est mis à profit pour commander les interfaces et appareils électroniques externes à l'ordinateur. Généralement ces commandes sont formées d'impulsions de niveau TTL de courte durée, quelques microsecondes, produites par le changement rapide de la valeur d'un port logique de communication parallèle dont une sortie (un bit) est dédiée à la commande impulsionnelle. Lorsque les instructions logicielles nécessaires à l'activation du port sont placées dans une telle boucle de temporisation il est possible d'assurer, par programmation, une bonne calibration de la largeur de ces impulsions pour les adapter à la vitesse d'exécution du processeur et satisfaire aux caractéristiques temporelles des systèmes électroniques qu'elles commandent. La boucle de délai écrite en langage C peut être représentée par la structure suivante :

```
void attend_ms(double dblms){
    long time_mus, Calibre = 13133L; /* pour pentium-90 */
    //12500L; /* pour DX-4-120 */
    time_mus = (long) (dblms * Calibre);
    while(time_mus-- > 0); }
```

Où **dblms** est un nombre décimal exprimant en millisecondes le temps demandé, **time_mus** est sa valeur en microsecondes et **Calibre** est un facteur de calibration qui dépend de la fréquence d'horloge du processeur de l'ordinateur.

Pour les longues boucles d'exécution (acquisition image), pouvant présenter un caractère bloquant, l'insertion, judicieusement placée dans le cycle de boucle, de l'appel d'une fonction maître (PeekMessage) du GUI permet de traiter, prioritairement à l'exécution de la boucle, les contrôles de l'interface graphique qui ont émis un message vers le programme.

Pour des actions temporelles nécessitant des synchronisations précises, seule une électronique externe peut être utilisée. Elle doit comporter le temporisateur de résolution adaptée et un mécanisme de mémorisation de l'état de fin de temporisation qui permettra au programme d'effectuer un contrôle logiciel en mode différé.

Le chapitre IIIA.2 décrit l'interface qui pilote la chaîne de comptage et dans laquelle la production des temporisations précises est indépendante des fluctuations temporelles du logiciel. Son contrôle programmé est de type différé.

Les choix appropriés des cartes d'interface industrielles auxquelles j'ai associé les montages électroniques externes qui assurent les exigences impératives de synchronisation dans les fonctions de mesure et de contrôle m'ont permis d'élaborer un logiciel original d'imagerie capable d'assurer une reproductibilité très satisfaisante dans la gestion de nos appareils expérimentaux de MOCP avec l'utilisation des mécanismes asynchrones.

IIIA.2 - Interface de la chaîne de comptage de photons.

Les chaînes de mesure mises en œuvre répondent aux besoins de détection et d'analyse des deux types de signaux pertinents, intensité de fluorescence émise en un point de l'échantillon et acquisition de son spectre. Elles sont détaillées aux chapitres IIIA.2 et IIIA.5 suivants.

IIIA.2.1 - Modules de détection de la fluorescence totale.

Le signal de fluorescence des molécules, dont l'ordre de grandeur varie entre 100 et 10000 photons/seconde, principalement répartis sur une bande spectrale de l'ordre d'une cinquantaine de nanomètres, est détecté par un module de comptage de photons uniques SPCM AQ 152 FL (EG&G). Il s'agit d'une photodiode qui travaille en mode Geiger. Le capteur de type photodiode silicium PIN à avalanche présente une zone active de 200 μm de diamètre, qui a une efficacité quantique de détection de photon supérieure à 70 % pour une longueur d'onde de 630 nm. Pour des raisons de simplicité, de compacité et de robustesse de l'alignement optique, l'entrée du signal lumineux est fibrée. La photodiode est polarisée par une alimentation stabilisée. L'arrivée d'un photon provoque un phénomène d'avalanche électronique qui décharge une capacité réservoir. Le signal produit est amplifié et mis en forme avec une logique TTL. Chaque photon détecté produit une impulsion électrique d'une largeur de 8 ns. La résolution temporelle du détecteur est de 400 ps.

Le bruit de détection, ou bruit d'obscurité, est d'origine thermique. Pour détecter le signal avec un rapport signal sur bruit suffisant, il est impératif de refroidir la photodiode. Le système de refroidissement, interne au module, utilise l'effet Peltier. Cette méthode de refroidissement, pratique et peu onéreuse, est fondée sur le fonctionnement d'un module thermoélectrique, dans lequel un transfert de chaleur est réalisé par déplacement d'électrons

dans des éléments semi-conducteurs. Le froid produit du côté endothermique du module s'accompagne d'une augmentation de chaleur du côté exothermique. Il faut donc, impérativement et de manière efficace, évacuer les calories produites à l'aide d'un radiateur convenablement dimensionné ou par une ventilation forcée.

Le taux de comptage C_0 correspondant au bruit d'obscurité est inférieur à 50 coups/seconde. Le taux maximal de photons détectables, dont la valeur nominale liée au temps mort est de 25 MHz est limité à 8 MHz en raison du refroidissement de la photodiode. Ce taux est bien supérieur à celui nécessaire pour détecter les molécules individuelles dans nos expériences et l'effet du temps mort est négligeable.

L'efficacité quantique du SPCM (EG&G) diminue notablement avec la longueur d'onde pour n'atteindre que quelques pour-cents vers 300 nm et rendre la mesure inexploitable. Pour pallier cette limitation dans la bande des longueurs d'onde courtes comprises entre 300 nm et 500 nm, nous utilisons un autre détecteur, le SPCM H6240 (Hamamatsu). Ce module est conçu de manière similaire au SPCM (EG&G) avec une alimentation unipolaire 5 V et la mise en forme TTL des impulsions électriques. Le principe de détection est, toutefois, nettement différent car l'élément central de ce détecteur n'est pas une photodiode à avalanche mais un photomultiplicateur miniature, de facture récente. La photocathode présente une forme rectangulaire de 4 mm x 20 mm. Son efficacité quantique est de 25 % pour une longueur d'onde de 300 nm. Le bruit d'obscurité est de 30 c/s. Le temps nécessaire à la détection de deux photons consécutifs est de 35 ns. Ceci correspond à une capacité de comptage calculée de $C_N > 25$ MHz, C_N étant le nombre de coups mesurés en sortie du module, très supérieur aux taux de comptage des signaux.

La largeur des impulsions de sortie TTL est de 30 ns et la résolution de la réponse temporelle du SPCM est de 2 ns.

Ces détecteurs s'intègrent dans la chaîne de mesure de l'intensité de la fluorescence totale en chaque point de l'échantillon sondé après balayage du scanner. La méthode de mesure couramment employée pour quantifier un signal impulsionnel consiste à totaliser, à l'aide d'une unité de comptage électronique, les impulsions délivrées par le détecteur pendant un temps T déterminé. Le développement et la mise en œuvre de cette méthode seront détaillés dans le chapitre IIIA.2.2

IIIA.2.2 - Unité programmable de comptage de photons

Le temps minimum de comptage des impulsions en sortie du module SPCM, pour chaque pixel, est de 500 μ s pour obtenir une statistique suffisante. Cette valeur temporelle, quel que soit le mode d'action logiciel (asynchrone ou temporisé, voir chapitre IIIA.1), ne permet pas à l'ordinateur de gérer directement la durée de la fenêtre de comptage car, le temps maximum de réponse de l'OS est supérieur au temps de comptage. De même, la fréquence d'arrivée des photons est trop élevée pour que les impulsions délivrées par le SPCM puissent être totalement prises en compte par l'ordinateur.

En conséquence, pour permettre une gestion informatique de la chaîne de comptage de photons, j'ai choisi d'utiliser une carte d'interface comportant des circuits programmables de comptage et de lui adjoindre une électronique externe de synchronisation. Cet ensemble que je vais décrire réalise, dans chaque cycle d'intégration, la temporisation de la fenêtre d'intégration et le comptage du nombre d'impulsions correspondant à chaque pixel.

La mesure est pilotée par l'ordinateur dont le programme exécute une première fonction d'initialisation des paramètres de comptage puis lance la fonction de comptage. Ce faisant, le logiciel déclenche, sur l'électronique externe, le début du cycle d'intégration et entre dans une boucle de contrôle, en « mode asynchrone (polling) », pour détecter la fin du cycle d'intégration signalée par l'électronique. A la fin de l'intégration, l'ordinateur lit la valeur du comptage représentant la mesure de l'intensité avant d'enchaîner les actions nécessaires pour passer au pixel suivant.

Pour acquérir rapidement chaque mesure et permettre ainsi une présentation visuelle simultanée, sur l'écran de l'ordinateur, de la construction de l'image en cours d'acquisition, j'ai conçu un système de comptage électronique programmable qui utilise un matériel commercial de coût réduit directement implanté dans l'architecture de l'ordinateur. Ce matériel, largement répandu sous la forme d'une carte d'interface programmable multifonctions pouvant s'insérer sur le bus de connexion interne de l'ordinateur (PC), est dans ce cas une carte ADA2000 (Real Time Device). Pour réaliser l'unité de comptage, cette interface fournit des fonctions de commande et de contrôle diversifiées dont les niveaux électriques sont conformes à la norme TTL. Certaines de ces fonctions attribuent et lisent des états logiques. Elles opèrent à travers un circuit de communication parallèle (PPI8255, Intel).

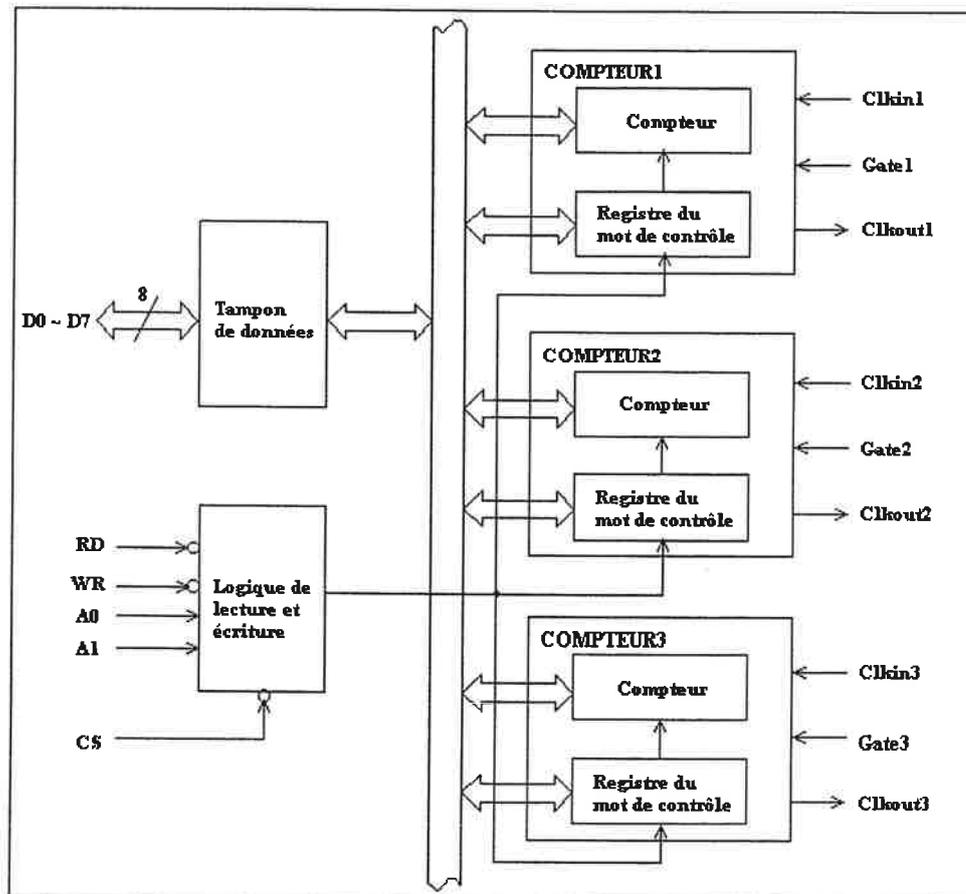


Figure IIIA.2.1 : Architecture interne du circuit électronique programmable de comptage (timer) TMP82C54.

D'autres utilisent le circuit compteur-temporisateur (TMP82C54, Toshiba) permettant de réaliser des fonctions de comptage numérique. Ce dernier comprend trois compteurs binaires indépendants de 16 bits de dynamique ayant chacun un registre de contrôle programmable. L'organisation interne de ce circuit, montré sur la figure IIIA.2.1, caractérise les différents modes de fonctionnement que l'on peut attribuer à chacun des compteurs par programmation du registre de contrôle.

Le choix et la combinaison judicieux des modes de fonctionnement offerts par le circuit TMP82C54 permettent de concevoir une fonction d'intégration des impulsions sur une durée programmable et indépendante des fonctions d'initialisation et de contrôle des circuits utilisés. Associée à une électronique additionnelle que j'ai développée et décrite en fin de ce chapitre, cette fonction d'intégration permet de mesurer, avec une grande précision et une excellente reproductibilité temporelle, le taux de photons détectés pour chaque pixel.

L'acquisition du signal doit répondre principalement à deux exigences :

- Le temps d'intégration T doit être défini avec une précision suffisante pour ne pas entraîner une erreur de comptage importante de la mesure d'un pixel à l'autre d'une image.
- La plage de temps, sur laquelle l'intégration varie, doit avoir une étendue suffisante pour détecter efficacement des signaux qui peuvent varier entre 50 coups/seconde et 10^6 coups/seconde, et éviter, en particulier les phénomènes de saturation de la chaîne de comptage. Celle-ci doit donc présenter une grande dynamique.

La première exigence est amplement satisfaite dans le système réalisé. Dans le système que j'ai réalisé, on dispose d'un signal numérique d'horloge stabilisée par un oscillateur à quartz ayant une fréquence de 5 MHz. Pour une même image, le temps T , de valeur minimale 500 μ s, est défini par un nombre entier et constant de périodes d'horloge. Sa représentation est discrète avec une résolution temporelle égale à une période d'oscillation t_{CLK} de l'horloge soit 200 nanosecondes. Le facteur de précision temporelle de l'intégration Pt peut être défini par

$$Pt = \frac{t_{CLK}}{T}, \quad Pt = 4.10^{-4} \quad (\text{IIIA.2.1})$$

Le temps minimum écoulé entre deux photons qui peuvent être successivement détectés par le SPCM est de 125 ns et l'incertitude sur la valeur de T , induit une erreur de comptage de quelques photons au plus sur l'intensité détectée.

Cette précision est grande en regard de l'incertitude liée au bruit de photons détectés. Le bruit de photons est égal à \sqrt{N} où N est le nombre de photons détectés. Le signal ne sera exploitable que si N est au minimum de l'ordre de grandeur de 50 coups/seconde ce qui correspond à un bruit de l'ordre de 10 coups/seconde.

La deuxième exigence peut être satisfaite par les compteurs-temporisateurs programmables dont la capacité d'association en cascade permet d'obtenir de grandes dynamiques.

L'architecture interne de chaque compteur, représentée sur la figure IIIA.2.1, montre l'organisation des différents registres accessibles par programmation pour « écrire » les valeurs de contrôle ou « lire » les valeurs de mesure ou d'état. Les caractéristiques électriques sont les suivantes. La largeur minimale des impulsions TTL d'entrée est de 30 ns, la fréquence maximale de comptage est de 10 MHz et le nombre maximum d'évènements comptés atteint 65536. Les retards éventuels dus au temps de propagation des signaux à travers les éléments logiques internes sont inférieurs à 100 nanosecondes et peuvent être négligés.

Comme le montre le schéma de principe de la figure IIIA.2.2, le système de comptage est composé de deux parties. La première partie est constituée du circuit TMP82C54 contenant les trois compteurs (*Compt1*, *Compt2*, *Compt3*) et de l'horloge à quartz $ClockF = 5$ MHz appartenant à la carte ADA2000 implantée dans le PC. La deuxième partie est composée de circuits externes au PC, pour la mise en forme des impulsions et la synchronisation des signaux de commande et de contrôle afin qu'ils puissent être gérés par le logiciel.

Le rôle et le fonctionnement des compteurs ne sont pas identiques. Le compteur *Compt1* abaisse la fréquence d'horloge $ClockF$ à une valeur, $F2 = ClockF / N1$, compatible avec la durée d'intégration choisie lorsque la valeur entière $N1$ telle que $2 \leq N1 \leq 65535$, est chargée dans son registre de décomptage.

De manière différente, le compteur *Compt2* produit le signal de base de temps d'intégration de durée $T = N2 / F2$, avec $1 \leq N2 \leq 65535$. Le compteur *Compt3* compte pendant l'intervalle de temps T les impulsions, issues du signal de fluorescence, arrivant sur son entrée *Clkin3*.

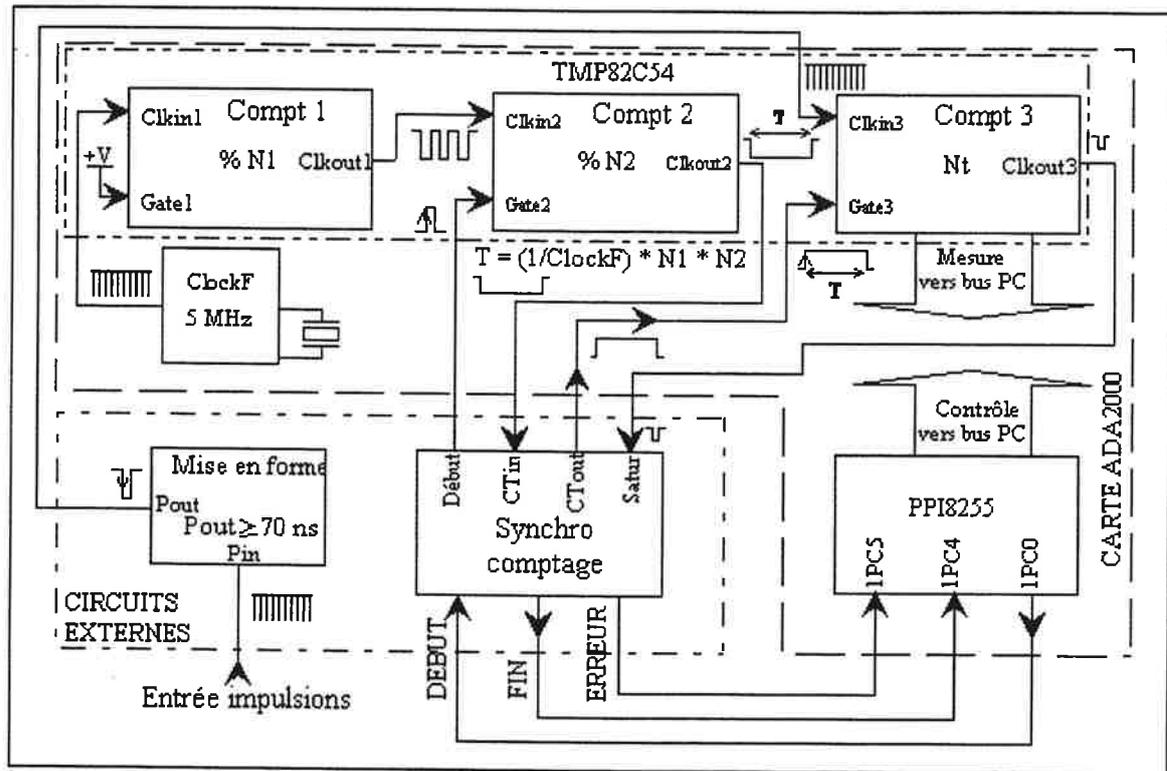


Figure IIIA.2.2 : Synoptique de l'ensemble électronique de comptage dédié au module photodétecteur SPCM. La carte d'interface ADA 2000, interne au PC, utilise une électronique externe (CIRCUITS EXTERNES) spécifique, pour la mise en forme et la synchronisation des impulsions d'entrée et des signaux de contrôle.

Le choix des valeurs N1 et N2 est déterminé par programmation pour approcher au plus près la valeur T_U demandée par l'utilisateur telle que :

$$T_U \cong \text{Clock}F / (N1 \times N2) \quad (\text{IIIA.2.2})$$

où N1 est la plus petite valeur possible satisfaisant à cette condition et qui offre ainsi la meilleure résolution temporelle dans la valeur approchée de T_U .

Un compteur fonctionne suivant 6 modes différents, chaque mode est déclenché soit par programme soit matériellement et réalise une fonction différente comme la division de fréquence, la création de signaux carrés ou d'impulsion de durée programmable ou le simple comptage. Le terme « comptage » appliqué au circuit TMP82C54 représente en fait un « décomptage », chaque prise en compte d'une impulsion sur l'entrée *Clkin* décrémente d'une unité la valeur numérique N préalablement chargée par programmation dans le registre de comptage. Je décrirai brièvement le fonctionnement des trois modes utilisés pour cette réalisation.

Le mode de fonctionnement du compteur *Compt1* est celui d'un diviseur de fréquences (mode 2). Cette fonction est activée par programmation. Elle requiert l'application permanente d'un niveau logique 1 sur l'entrée *Gate1* qui autorise la prise en compte des signaux sur l'entrée *Clkin1*. Dès l'écriture, par programmation, du code associé à ce mode dans le registre de contrôle du circuit TMP82C54, le signal de sortie *Clkout1* passe à l'état initial de niveau 1. Le chargement de la valeur entière N1 telle que $2 \leq N1 \leq 65535$ dans le registre de décomptage démarre le décomptage. Chaque front descendant du signal d'entrée *Clkin1* décrémente N1 jusqu'à atteindre la valeur 1, alors le signal de sortie *Clkout1* retombe au niveau 0. A l'impulsion suivante présente sur *Clkin1*, le signal de sortie *Clkout1* repasse au niveau 1, la valeur initiale N1 est, sans nouvelle programmation, automatiquement rechargée dans le registre de décomptage et sa décrémentation vers 1 recommence. Si la fréquence du signal d'entrée sur *Clkin1* est égale à $\text{Clock}F$, ce cycle produit sur la sortie un signal logique périodique de fréquence $F2 = \text{Clock}F / N1$. Comme le montre le chronogramme de la figure IIIA.2.3, ce processus se reproduit de manière permanente tant que l'entrée *Gate1* est maintenue au niveau 1. Un niveau 0 appliqué sur l'entrée *Gate1* stopperait l'action du signal *Clkin1*, le décomptage serait suspendu et la sortie *Clkout1* maintenue au niveau 1.

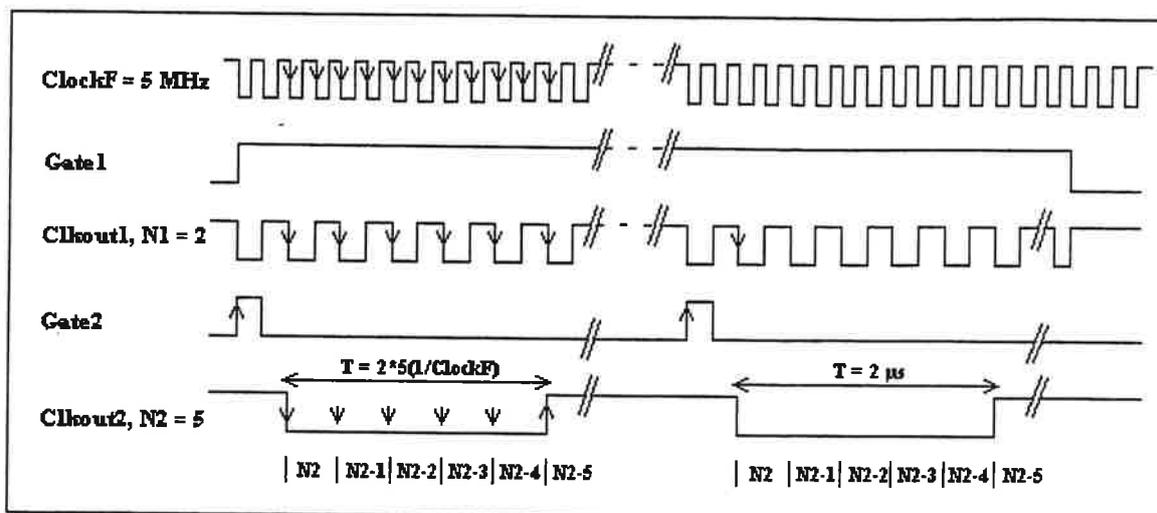


Figure IIIA.2.3 Chronogramme du fonctionnement chaîné, des compteurs 1 et 2. Ici, la commande de comptage, qui dépend du produit $N1 \times N2$, a une durée $T = 10 \times 1/\text{ClockF}$.

Remarque : Dans ce mode le facteur de division minimum est $N1 = 2$.

Le mode générateur d'impulsions de durée programmable (mode 1) du compteur *Compt2*, offre la fonction produisant le signal de fenêtre temporelle d'intégration qui contrôle la durée T de comptage des impulsions issues du signal de fluorescence. Le mode de cette fonction est tout d'abord initialisé par programmation avec l'écriture du code associé à ce mode dans le registre de contrôle. Cette fonction est initialisée au début de chaque mesure par le chargement programmé de la valeur entière $N2$ telle que $1 \leq N2 \leq 65535$ dans le registre de comptage. Cette action place le signal de sortie *Clkout2* au niveau 1. Puis le processus de décomptage de cette fonction est armé par une transition montante d'un signal logique *Début* de durée $t \leq T$ appliqué sur l'entrée *Gate2*. Alors le premier front descendant du signal présent sur l'entrée *Clkin2* déclenche le décomptage et provoque le début de l'impulsion de durée T en basculant le signal de sortie *Clkout2* au niveau 0. Les fronts suivants de *Clkin2* décrémentent $N2$, périodiquement à la fréquence $F2$, jusqu'à atteindre la valeur 1. Alors, au bout d'un temps égal à T le signal de sortie *Clkout2* repasse au niveau 1 jusqu'au prochain armement par le signal *Début* appliqué sur l'entrée *Gate2*. Le processus de décomptage peut être stoppé par programmation.

$$T = \frac{N2}{F2} \quad (\text{IIIA.2.3})$$

Dans le montage choisi qui utilise deux compteurs *Compt1* et *Comp2* en cascade avec une fréquence d'horloge $ClockF = 5 \text{ MHz}$ l'expression de T en fonction $ClockF$ s'exprime par

$$T = \frac{N1 * N2}{ClockF} \quad (\text{IIIA2.4})$$

dont la valeur minimale TMIN est obtenue pour $N1 = 2$ et $N2 = 1$ soit $TMIN = 400 \text{ ns}$ et la valeur maximale TMAX pour $N1 \leq N2 \leq 65535$, $TMAX = 858,993 \text{ s}$, le domaine de définition temporelle de T est :

$$400 \text{ ns} \leq T \leq 858,993 \text{ s}$$

alors qu'un montage n'ayant qu'un seul compteur offrirait un domaine temporel de :

$$400 \text{ ns} \leq T \leq 13,1 \text{ ms}$$

Au bout du temps écoulé T, la transition montante du signal de sortie *Clkout2* est présentée à l'entrée *Ctin* du module électronique de synchro comptage pour mémoriser l'état de fin de mesure FIN. Cet état est consulté, à travers une ligne de communication du circuit programmable PPI8255, par une méthode séquentielle d'interrogation programmée (serial polling) effectuant la lecture de son registre d'entrée.

Le mode « décompteur » programmable (mode 4) du compteur *Compt3* exécute la tâche principale de décomptage permettant d'obtenir directement la valeur numérique de la mesure de l'intensité intégrée du signal de fluorescence issu de notre détecteur optique. De manière similaire au mode 1, le préchargement du registre de décomptage avec la valeur entière $N_{\max} = 65535$ (capacité maximale du compteur) est effectué par programmation. Puis le niveau 1 du signal logique *CTout* est appliqué sur l'entrée *Gate3* autorisant l'action du signal sur l'entrée *Clkin3*. A la première impulsion de fluorescence présente sur l'entrée *Clkin3* le registre de décomptage est chargé avec N_{\max} et le signal de sortie *Clkout3* passe au niveau 1. Le processus de décomptage démarre et reste actif pendant la durée T de son maintien. Pendant cette durée T, le front descendant de chaque impulsion décrémente séquentiellement d'une unité la valeur initiale de N_{\max} . Après inversion du signal *CTin* issu de la sortie de *Compt2*, au bout du temps T, le signal *CTout* présent sur l'entrée *Gate* retombe au niveau logique 0 et stoppe le décomptage à la valeur N_T . La lecture programmée de la valeur N_T contenue dans le registre de comptage permet de déterminer le nombre d'impulsions d'entrée N_P comptées, plus précisément le nombre de photons intégrés, suivant la relation :

$$N_P = N_{\max} - N_T + 1 \quad (\text{IIIA2.5})$$

La valeur +1 tient compte de la première impulsion reçue par le compteur qui ne décrémente pas la valeur de N_{\max} mais en fait, provoque le chargement interne de cette valeur dans le registre de comptage.

Les erreurs de mesure ont deux origines possibles : l'absence d'impulsion d'entrée sur *Clkin3* ou la saturation du compteur *Compt3* par dépassement de la dynamique de comptage $N_P > 2^{16}$. Dans le cas où le nombre d'impulsions N_P est nul, la mesure $N_T = N_{\max}$ ne peut pas être décelée par la simple lecture du registre de comptage. En effet, comme je l'ai précisé dans la relation (IIIA2.5), les mécanismes de synchronisation interne du compteur dans ce mode de fonctionnement impliquent que, lors du chargement programmé initial de la valeur N_{\max} dans ses registres, le transfert de cette valeur dans le registre de comptage n'est effectivement réalisé qu'à la première transition logique de l'impulsion présente sur l'entrée *Clkin3*. En l'absence d'impulsion sur cette entrée, l'initialisation de la valeur de N_{\max} n'est pas transmise dans le registre de comptage qui conserverait la valeur N_T de la mesure précédente. La lecture de ce registre présenterait une valeur $0 < N_T < N_{\max}$ et donnerait une mesure fautive puisque $N_P = 0$. Pour détecter cette erreur, un mécanisme interne du compteur, nommée *NULL COUNT*, mémorise dans le registre d'états du compteur, la validité du transfert de la valeur d'initialisation N_{\max} dans le registre de comptage c'est à dire l'arrivée d'au moins une impulsion sur l'entrée *Clkin3*. A chaque mesure, la lecture programmée du niveau *NULL COUNT*, dans le registre d'états, indique précisément le cas où la valeur N_{\max} n'a pas été transférée c'est à dire $N_P = 0$.

Le deuxième type d'erreur est celui créé par un dépassement de capacité du registre de comptage. Au cours d'une mesure, si le temps d'intégration T ou le flux de photons ϕ sont importants, il se peut que le nombre d'impulsions N_P apparaissant pendant le temps d'intégration T soit, tel que $N_P > N_{\max}$. Lorsque la valeur N_P atteint N_{\max} , le registre de comptage contient la valeur $N_T = 0$ et un niveau 0 apparaît sur la sortie *Clkout3* du compteur. Au front suivant, arrivant sur l'entrée *Clkin3* la sortie *Clkout3* remonte au niveau 1, la vraie valeur de N_P devient $N_P = N_{\max} + 1$ et N_T , qui vaut 0, est décrémente d'une unité pour prendre la valeur $N_T = -1$; ce qui s'exprime, en valeur binaire 16 bits non signée, comme la valeur de N_{\max} (65535). A ce stade, la lecture programmée de la valeur N_T contenue dans le registre de comptage amène à cette incohérence $N_{\max} + 1 = N_{\max}$. Cette erreur est repérable si l'on peut détecter, à la sortie *Clkout3* l'impulsion produite lorsque la valeur du registre de comptage passe de $N_T = 0$ à $N_T = -1$. La durée de cette impulsion est égale au temps séparant l'arrivée de deux impulsions photoniques sur l'entrée *Clkin3* du compteur soit un temps minimal de 125 ns (8MHz). Ce temps est bien trop court pour permettre une lecture programmée

synchrone du changement d'état de la sortie *Clkout3*. Pour rendre observable cet évènement, la transition montante du signal de sortie *Clkout3* est présentée à l'entrée *Satur* du module électronique de « synchro comptage » pour mémoriser l'état de dépassement *ERREUR*. Cet état est consulté, à travers une ligne de communication du circuit programmable PPI8255, par une méthode programmée de lecture séquentielle (serial polling) de son registre d'entrée.

Au début de ce chapitre, j'ai mentionné que la précision de nos mesures découle du caractère d'indépendance temporelle entre la fonction de mesure et les fonctions de contrôle de l'unité de comptage.

Dans la conception de cette unité de comptage, j'ai particulièrement veillé à dissocier son fonctionnement asynchrone, que j'appellerai programmable, du fonctionnement que je nommerai matériel. C'est pourquoi j'ai choisi le mode de fonctionnement du compteur *Compt2*, pour que la construction de l'impulsion d'intégration de temps T ne requiert pas d'action programmée pour établir sa durée.

Donc l'erreur de mesure ne dépend effectivement que de l'imprécision apportée par les circuits sur la construction de l'impulsion de durée de T . Cette impulsion est obtenue par division exacte du signal d'horloge, à la fréquence *ClockF*, à l'aide des compteurs *Compt1* et *Compt2*. Cette horloge, pilotée par un oscillateur à quartz présente une incertitude $\epsilon_t \ll 1$ ns tout à fait négligeable dans le domaine temporel utile pour T .

Au contraire, l'exactitude sur les temps de transition des niveaux logiques au sein des circuits dépend de plusieurs facteurs. Certains sont constants, comme le nombre de transitions effectuées et les retards de propagation des signaux dans la logique combinatoire des circuits, pour un facteur de division donné (N_1, N_2). Les autres sont variables, tels le bruit électrique résiduel présent sur les niveaux logiques et l'effet de la température de fonctionnement, qui apportent une contribution négligeable à l'imprécision temporelle.

Pour la classe de matériel que nous utilisons cela produit des écarts temporels (jitter) de plusieurs dizaines de nanosecondes et de toute façon inférieurs à l'écart minimum de 125 ns existant entre deux photons. L'erreur attendue sur la mesure est au plus d'une impulsion.

Un test effectué avec un générateur basse fréquence (HP 33120 A, Hewlett Packard) à la fréquence de 10 MHz et un temps d'intégration $T = 100$ ms, a permis de mesurer des valeurs N_p du nombre d'impulsions telles que $999999 \leq N_p \leq 1000001$, soit un écart de plus ou moins 1 impulsion. Cette mesure confirme que T est défini avec une précision de ± 100 ns au cours

de l'enregistrement de toute l'image, pour un même facteur de division $N1 \times N2$. Ce qui introduit une erreur de mesure tout à fait négligeable.

L'électronique additionnelle « synchro comptage » montrée sur la figure IIIA.2.4, inverse la phase de l'impulsion d'intégration $CT_{in} \rightarrow Ct_{out}$ et gère la prise en compte des événements du comptage comme la fin de mesure FIN et l'erreur de saturation de comptage $Satur$. Ces événements sont mémorisés par un niveau logique 1 de façon à pouvoir être consultés de manière asynchrone par programmation. Deux fonctions logiques (bascule de type D) initialisées par l'impulsion de commande $DEBUT$ présentent un niveau logique 0 sur leur sortie Q . Sur leur entrée D est appliqué un niveau permanent égal à 1. Une transition, d'un niveau 1 vers un niveau 0, sur leur entrée CLK provoque un changement de l'état 0 à l'état 1 sur leur sortie Q . Cet état est conservé jusqu'à ce que le programme lance la prochaine mesure en générant une autre commande $DEBUT$. En attendant cette nouvelle mesure, les états présents sur les sorties Q peuvent être lus par le programme.

Le module « mise en forme », présenté sur la figure IIIA.2.5, a pour fonction d'élargir les impulsions courtes, de 8 ns de durée, fournies par le détecteur afin qu'elles puissent être correctement interprétées par l'entrée $Clkin$ de $Compt1$. Le circuit TMP82C54 nécessite une largeur minimale d'impulsion égale à 70 ns. Son pouvoir de discrimination, déterminé par sa bande passante de 8 MHz, est de 125 ns. Pour obtenir un fonctionnement présentant une marge de sécurité, j'ai fixé la largeur des impulsions à 80 ns. Ceci est réalisé en utilisant et en accumulant les retards de propagation des signaux à travers une chaîne de portes logiques (74HCT00, 74HCT32). La coïncidence temporelle partielle des différents signaux retardés est additionnée étage par étage pour former une impulsion dont la largeur est égale au temps de propagation le plus long qui, dans le montage, représente 8 transferts de porte logique soit pour des circuits intégrés de la famille 74HCTxx, un temps de propagation de 48 ns. Cette impulsion est de largeur suffisante pour, à son tour, être élargie par un circuit logique monostable (74LS123) permettant d'obtenir une impulsion de durée proportionnelle à la constante de temps $RV1 \times C1$ de sa cellule de charge, soit pour notre besoin, une largeur temporelle de 80 ns.

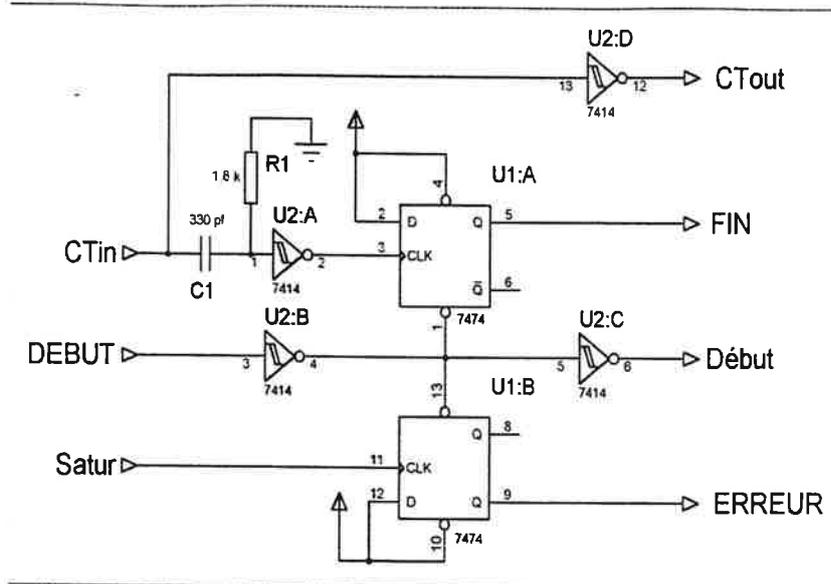


Figure IIIA.2.4 Circuit de détection des signaux de fin et d'erreur de comptage. La mémorisation des états FIN et ERREUR correspondants par le circuit U1, permet à l'ordinateur de contrôler la séquence de comptage.

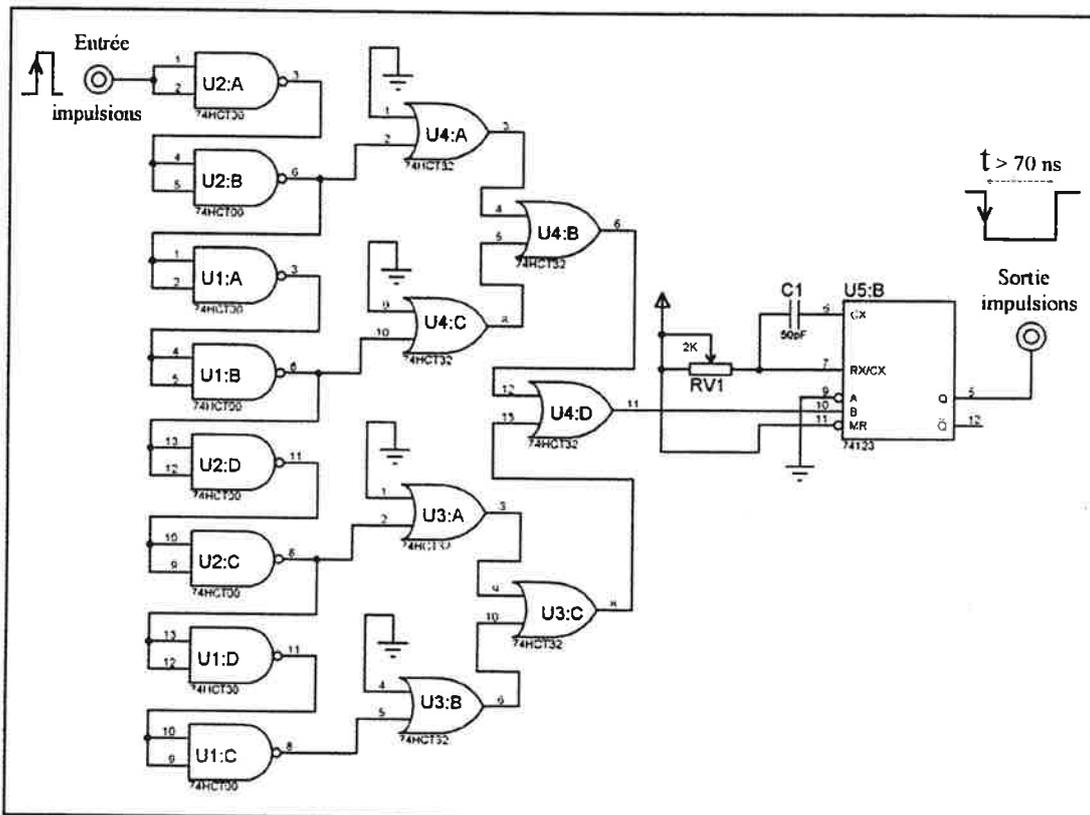


Figure IIIA.2.5 : Elargissement de l'impulsion du module SPCM avant comptage. L'addition des retards de transfert de l'impulsion produit un premier retard de l'ordre de 50 ns. Le circuit monostable U5 délivre une largeur variable de l'impulsion, supérieure à 70 ns à l'aide du réglage de RV1.

Cette description montre qu'à partir d'un matériel programmable largement diffusé, tel que les cartes multifonctions pour ordinateur comportant des circuits de communication parallèle (type PPI8255) et des circuits compteur-temporisateur (type TMP82C54), il suffit d'associer quelques fonctions électroniques externes à l'architecture de ces cartes pour concevoir une chaîne de comptage totalement programmable et de faible coût. La chaîne ainsi réalisée présente l'indépendance temporelle de sa fonction mesure face à ses fonctions programmables de contrôle et garantit une grande précision et une excellente reproductibilité dans les mesures périodiques du signal, de la même façon qu'une réalisation commerciale.

IIIA.3 - Interface de commande du scanner

Au chapitre IIB paragraphes 1.3 et 1.4 j'ai décrit l'architecture et les caractéristiques des deux scanners que nous avons développés. Tous les deux sont fondés sur l'utilisation du même actionneur piézoélectrique. Ils présentent un fonctionnement commun qui est piloté par la même interface programmable haute tension pour assurer le positionnement de l'échantillon suivant les axes X, Y et Z du champ d'observation des microscopes. Cependant il faut dissocier les commandes destinées au balayage et au positionnement de l'échantillon, permettant la mise au point optique, qui s'exercent, respectivement, suivant le plan X, Y et l'axe Z, des commandes d'approche et de maintien de la distance relative pointe-échantillon travaillant suivant l'axe Z sous contrôle d'un asservissement de réalisation commerciale associé à la tête de détection de type AFM. En fin de paragraphe je présenterai sommairement les différents éléments commerciaux composant la chaîne d'asservissement pilotant les déplacements de l'axe Z.

Dans ce paragraphe je décrirai l'interface de contrôle programmable que j'ai développée pour appliquer une tension variable entre ± 150 V qui permet d'obtenir des déplacements d'un maximum de 40 μm dans le plan X, Y avec le scanner type Lieberman que nous avons réalisé.

Son principe, représenté par la figure IIIA.3.1, est fondé sur la conversion de l'information numérique de position, codée sur 16 bits, en une valeur de basse tension, entre ± 10 V, convenablement amplifiée pour obtenir une haute tension de commande des actionneurs.

La carte d'interface PC (CIO-DDA 06/16 ComputerBoards) est un modèle multifonctions implantée sur le bus PCI dans l'ordinateur. Elle comporte six voies de conversion numérique-analogique délivrant une tension de ± 10 V sur une dynamique de 16 bits. Un circuit de communication parallèle (PPI8255, Intel) permet l'échange de niveaux logiques compatibles TTL.

Comme je l'ai mentionné au chapitre IIB.1.4, pour limiter l'imprécision de déplacement due à l'hystérésis des tubes piézoélectriques, j'ai choisi de diviser l'aire de balayage maximal de l'échantillon, en 16 zones ou ROI (Region Of Interest) contiguës de 10 microns carrés.

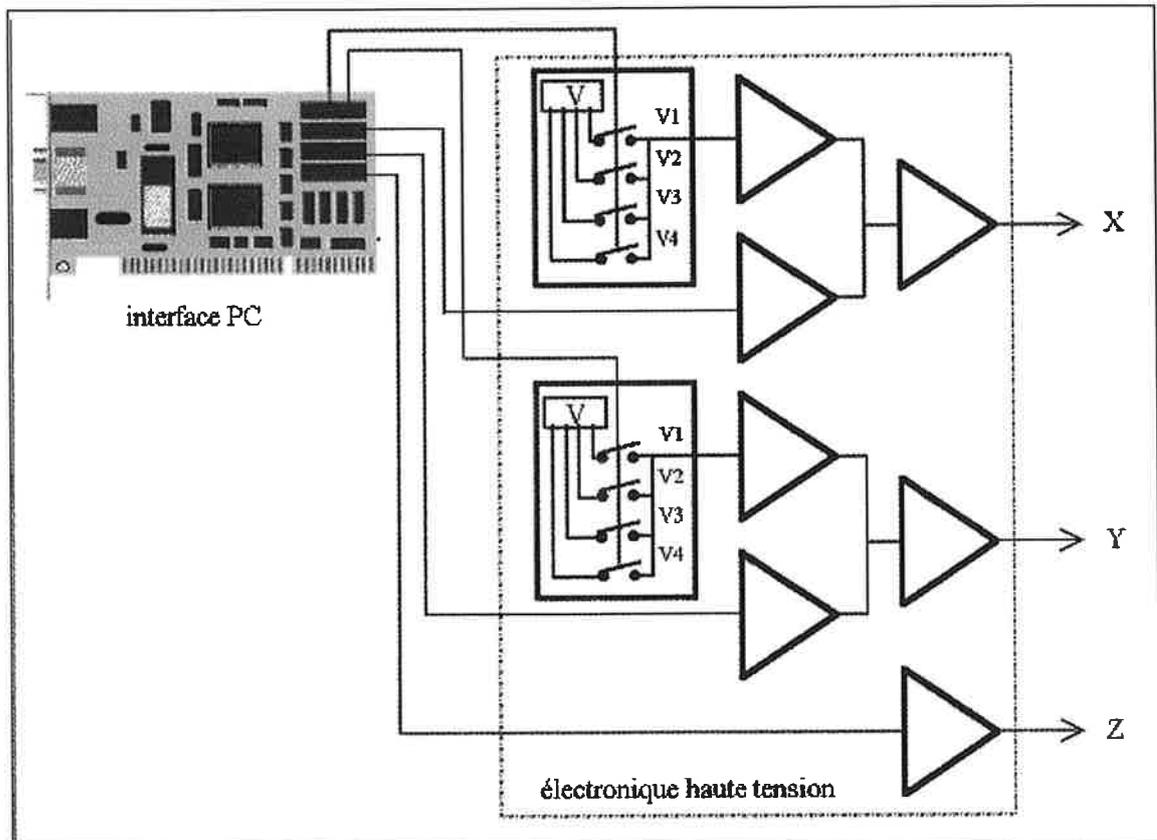


Figure IIIA.3.1 : Commande haute tension appliquée aux actionneurs piézoélectriques du scanner pour assurer le balayage de l'échantillon. Chaque voie X, Y, Z reçoit une tension continûment variable directement issue de l'interface PC de conversion numérique-analogique 16 bits. Les voies X et Y utilisent 4 tensions précises de décalage au balayage continu, délimitant les 16 zones d'analyse de l'échantillon. Les tensions sont comprises entre -150 V et 150 V .

Et, afin de pouvoir observer l'aire totale accessible par la dynamique du scanner, la dimension de balayage d'une zone est étendue de $\pm 5\%$ pour assurer un recouvrement de 500 nm sur chaque bord de la ROI, permettant ainsi la continuité d'observation entre chaque zone, ce qui porte sa dimension à 11 μm .

La sélection de la zone d'intérêt est réalisée, de manière programmée, par commutation de différentes tensions de décalage appliquées au positionnement du scanner. Sa fonction logicielle adresse directement la combinaison logique codée sur un octet au port huit bits du circuit PPI8255 de la carte d'interface. Les quatre bits de poids fort pilotent le commutateur analogique de l'électronique d'amplification affecté à la direction X. Celui-ci délivre la tension V correspondante qui peut prendre quatre valeurs V1, V2, V3 et V4 obtenues à partir d'une source de tension très stable. Il en est de même avec les quatre bits de poids faible pour la direction Y. Chaque couple de tension V_X , V_Y , fait correspondre le centre de chacune des seize zones au centre optique du microscope.

Les déplacements fins du scanner à l'intérieur d'une zone, comme le balayage ou le repositionnement de l'échantillon, sont contrôlés par la conversion des valeurs numériques entières, représentant l'information de position sur un domaine de 0 à 65535. Cette valeur est convertie en tension analogique sur une dynamique de $\pm 10\text{ V}$ correspondant à un déplacement maximal de 11 μm soit $\pm 5,5\ \mu\text{m}$, dans chaque direction X et Y, par rapport à l'origine centrale de la ROI. La plus petite valeur de déplacement, ou pas élémentaire de translation qui correspond à l'accroissement unitaire de sa valeur numérique, est égal à 0,17 nanomètre. Elle dépasse largement les exigences de précision requise dans le déplacement de l'échantillon.

La construction des images s'établit en enregistrant chaque pixel correspondant à chaque cellule d'une matrice carrée de dimension $R \times R$ où R représente la résolution numérique de l'image. Son domaine est exprimé par une valeur binaire, dont l'exposant varie de manière croissante, entre 2^2 et 2^8 pixels par ligne. La résolution numérique est un paramètre choisi par l'utilisateur et attaché aux caractéristiques de l'image. On peut en déduire les valeurs maximales d'un pas de déplacement entre deux pixels successifs qui représente 2,5 μm ou 16384 pas élémentaires pour une image basse résolution de 4 pixels par ligne.

Le temps d'établissement de la tension en sortie du convertisseur, par rapport à la commande programmée de conversion, est de l'ordre de 30 μs pour obtenir 90 % du niveau attendu. Cependant, pour un niveau inférieur, l'établissement plus rapide d'une tension de

quelques Volt peut engendrer une pente de montée de tension de plusieurs dizaines de V/ μ s et produire des accélérations du déplacement très importantes. Ces accélérations peuvent faire apparaître un phénomène inertiel de glissement de l'échantillon ou des objets dispersés sur l'échantillon, qui aurait pour conséquence la perte du repère original de position de cet objet et rendrait inefficace toute opération de repositionnement. Cet effet est d'autant plus perturbateur que les écarts de déplacement entre deux mesures successives sont grands, c'est à dire lorsque la résolution de l'image est faible.

Pour surmonter ce problème, j'ai associé l'action de deux méthodes. La première, d'ordre matériel porte sur la limitation de la bande passante de la chaîne d'amplification à une fréquence de coupure f_c de 300 Hz, légèrement inférieure à la fréquence de résonance mécanique du scanner. Le temps de réponse T_r nécessaire, pour atteindre un écart ϵ de la tension à l'équilibre égal à 50 %, se déduit des relations suivantes :

$$\frac{\epsilon}{100} = e^{-\frac{T_r}{\tau}} \quad (\text{IIIA.3.1})$$

avec $\tau = \frac{1}{2\pi f_c}$, T_r vaut alors 367 μ s, ce qui représente une vitesse initiale de

déplacement de 3,4 millimètres/s. Pour limiter l'accélération, j'utilise un filtre du second ordre, à deux cellules RC indépendantes et cascadées, chacune ayant un temps caractéristique égal à $T_r/2$.

Cette méthode matérielle trouve son efficacité dans les commandes de tensions commutées effectuées pour sélectionner la ROI et qui provoquent des grands déplacements d'un seul pas pouvant atteindre 40 μ m.

La seconde méthode est logicielle et fondée sur la division du déplacement à effectuer, en une série de pas de déplacements secondaires, de moindre amplitude, dont le séquençage logiciel, convenablement temporisé, diminue la pente de montée de la tension appliquée au scanner. Cette méthode inclut, en supplément, une attente de 3 ms, en fin de déplacement, permettant au scanner d'être complètement stabilisé avant d'effectuer la mesure du point image.

Ce ralentissement du temps de réponse n'est pas préjudiciable à la durée de nos enregistrements car la mesure des faibles flux lumineux, produits par les nanoobjets observés, nécessite, dans les cas les plus favorables, des temps de comptage de quelques dizaines de millisecondes, voir d'avantage, pour chaque point d'image enregistré.

Les fonctionnalités attachées au scanner se divisent en trois groupes. Le premier concerne l'initialisation de l'origine et de la taille de l'aire de l'échantillon destinée à être balayée au cours de la construction de l'image. Cette initialisation est présentée à l'utilisateur sur l'écran, suivant le graphisme de la figure IIIA.3.2, et regroupe les fonctions logicielles interactives suivantes :

- La sélection de la zone ROI, parmi les 16 régions accessibles de l'échantillon, s'effectue en cochant, dans la matrice, une des 16 « case à cocher » qui représentent l'aire d'observation maximale de l'échantillon lorsqu'il est fixé sur le scanner.

- Le choix dans la ROI, de l'origine et de la taille du balayage traduites en pourcentage de la taille totale admissible. Ces paramètres sont immédiatement visualisés à l'écran de deux manières. Celle statique qui affiche numériquement les valeurs et celle dynamique ou graphique qui trace un cadre sur fond noir, dont les dimensions et la position se modifient de manière interactive avec les actions de saisie au clavier ou les mouvements de la souris exécutés par l'utilisateur. Cette fonction graphique sera décrite dans le chapitre IIIB.4.

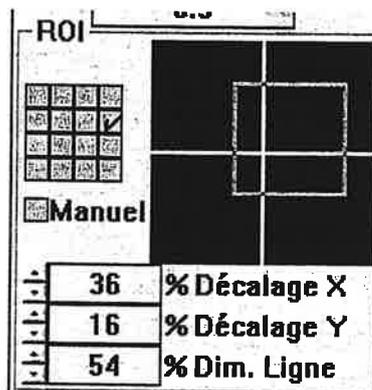


Figure IIIA.3.2 : Initialisation de la zone de balayage de l'échantillon.

Ce cadre représente la position et les dimensions de l'aire de l'échantillon qui sera effectivement balayée dans la construction de l'image.

Le mode « Manuel » représenté sur la figure IIIA.3.2, permet, lorsqu'il est coché, d'associer les actions de déplacement du scanner pour qu'elles s'exécutent simultanément avec les actions de modifications des paramètres. A l'inverse, le mode automatique effectuera, en accord avec ces paramètres, le positionnement du scanner uniquement au début de la construction d'une image.

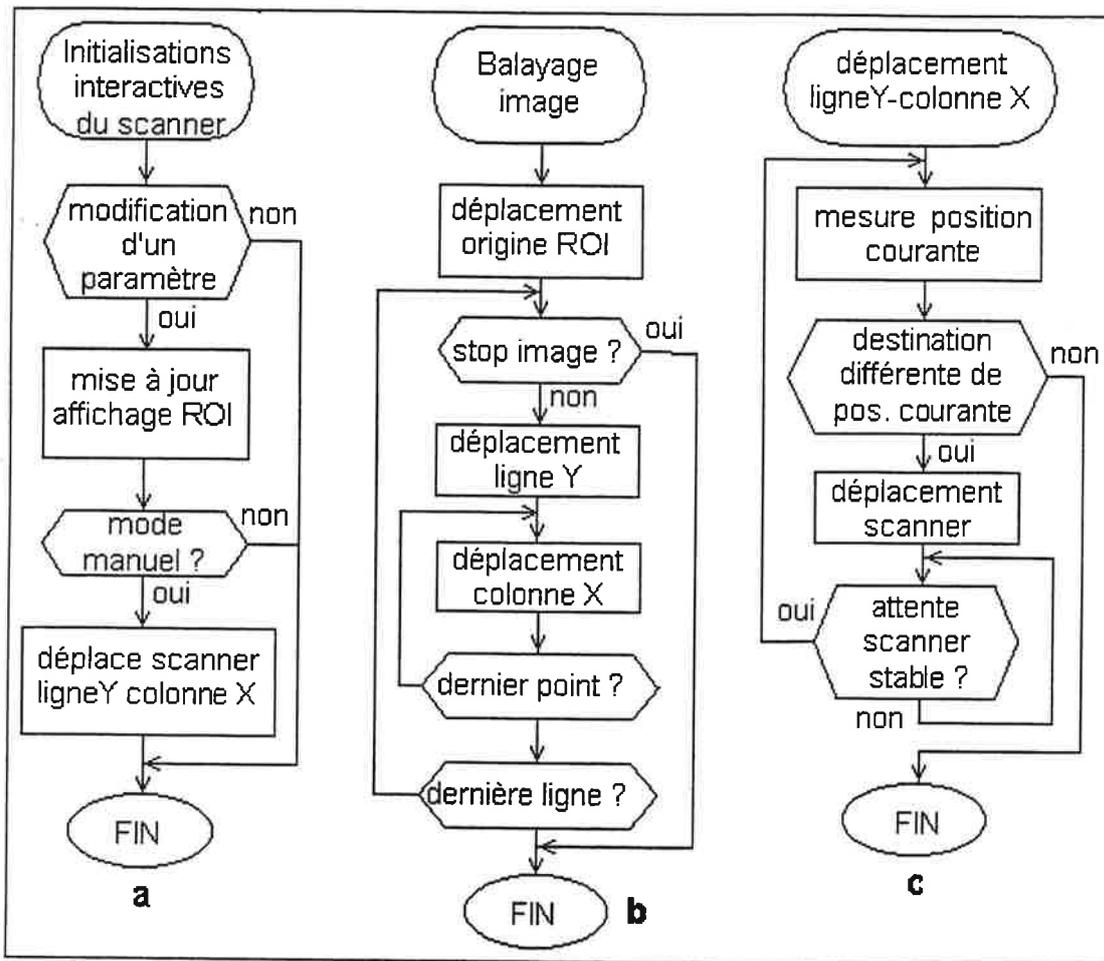


Figure IIIA.3.3 : Trois fonctions activent les déplacements du scanner. Suivant le contexte de fonctionnement du microscope, la séquence d'instructions **a** correspond à l'initialisation des paramètres de la ROI, l'organigramme **b** est exécuté au cours de l'acquisition d'image. Les séquences **a** et **b** appellent la fonction de déplacement de séquence **c**.

Les fonctions programmées pilotant cette interface seront décrites dans le chapitre IIIB.3 qui expose les fonctions logicielles. La figure IIIA.3.3 c, montre l'organigramme des fonctions nécessaires à un déplacement élémentaire du scanner. En particulier, on remarquera l'insertion d'un contrôle logiciel temporisé, destiné à gérer l'attente de stabilité du scanner après son déplacement.

Pour minimiser les déformations de l'image dues aux erreurs cumulatives d'hystérésis dans un balayage aller et retour symétrique de la ROI, j'ai privilégié l'enregistrement des points de l'image dans un sens de balayage unique. Cette méthode augmente sensiblement le temps d'acquisition. La vitesse de retour du scanner est en effet, limitée pour éviter le risque de glissement de l'échantillon par effet inertiel. La durée du retour est exploitée, pour afficher graphiquement à l'écran, la couleur représentant l'intensité de chaque pixel de la ligne de l'image qui vient d'être enregistrée, ainsi que son profil d'intensité.

Le temps d'enregistrement d'une image de fluorescence totale, dont les paramètres choisis correspondent à 64 lignes de 64 pixels, peut être déduit, en première approximation, des cinq phases temporelles correspondant aux temps d'exécution de l'acquisition et de l'affichage d'une ligne de l'image sur l'écran. On négligera les temps d'exécution des instructions du programme et la durée de déplacement du scanner d'un pas, correspondant à un point de mesure.

Les deux phases de durées T_1 et T_2 sont spécifiques à l'enregistrement d'un pixel et les trois phases, de durées respectives T_3 , T_4 , T_5 , sont attachées à celui de la ligne.

Le temps T_{pt} d'enregistrement d'un point comprend le temps T_1 , essentiellement représenté par l'attente de stabilisation du scanner après un pas de déplacement, soit 3 ms et le temps T_2 de comptage du signal photonique de fluorescence. Ce temps est variable en fonction de l'intensité du signal et, dans l'exemple suivant, nous lui attribuerons une valeur de 25 ms.

$$T_{pt} = T_1 + T_2, \quad T_{pt} = 28 \text{ ms} \quad (\text{IIIA.3.2})$$

Alors le temps T_4 d'enregistrement de 64 points de mesure pour une ligne de 64 pixels est

$$T_4 = 64 \times T_{pt} \quad (\text{IIIA.3.3})$$

Si le temps de réponse d'ouverture d'un obturateur du faisceau au début de chaque ligne T_3 est de 30 ms et, le temps total de retour du scanner et de l'affichage graphique T_5 , de 200 ms, alors le temps T_{lig} d'enregistrement d'une ligne de 64 pixels sera :

$$T_{lig} = T_3 + T_4 + T_5, \quad T_{lig} \cong 2 \text{ s} \quad (\text{IIIA.3.4})$$

L'enregistrement d'une image de 4096 pixels est alors de deux minutes.

Le dernier groupe de fonctions est constitué par les fonctions interactives d'isolement et de centrage d'un objet repéré dans une image précédemment enregistrée, pour le placer dans l'axe optique du microscope et en faire une analyse à plus haute résolution. Ces fonctions, permettant d'encadrer visuellement une région de l'image, sont semblables aux fonctions de sélection de la ROI, évoquées plus haut. Leurs particularités d'interaction graphique avec les fonctions logicielles, obtenue grâce aux possibilités de l'OS WINDOWS-95, seront discutées en détail dans le chapitre IIIB.4 qui décrit l'interface utilisateur du programme.

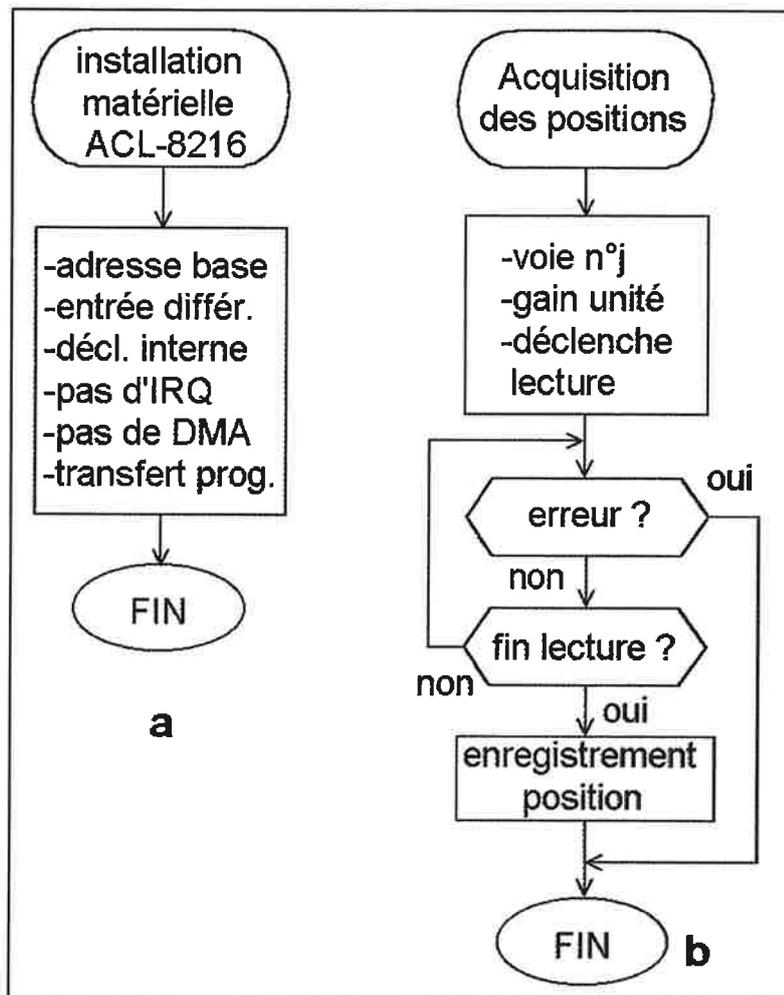
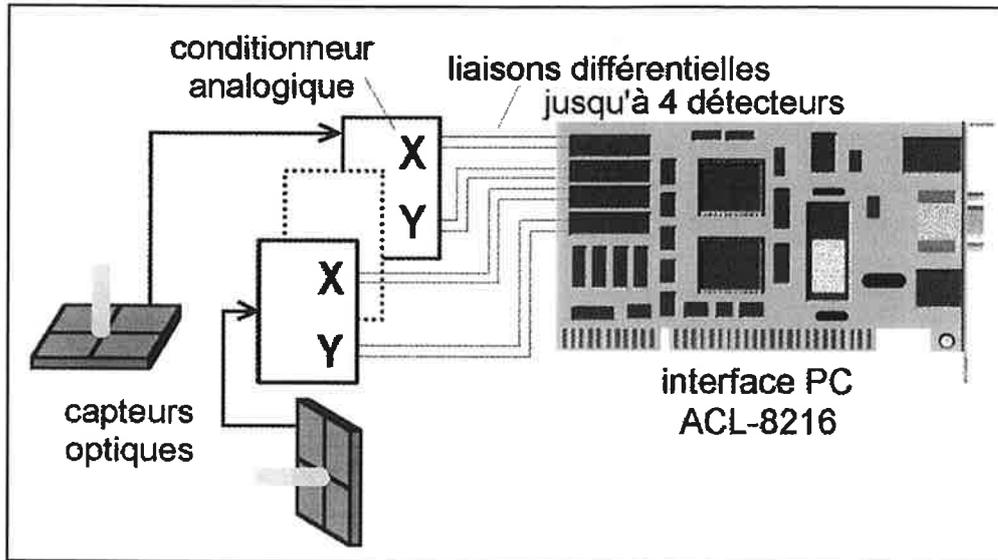


Figure IIIA.4.1 Ensemble programmable de mesure optique des déplacements. L'organigramme des fonctions d'initialisation de l'interface en **a** et d'acquisition de la mesure pour chaque détecteur optique en **b**.

IIIA.4 - Interface de lecture des détecteurs optiques de position

Au chapitre IIA.4.1, j'ai décrit les caractéristiques des détecteurs optiques bidimensionnels que j'ai développés pour nos microscopes. L'information de position, délivrée par chaque voie X ou Y en sortie du conditionneur, est représentée par une tension électrique variant proportionnellement entre ± 10 V pour un domaine de mesure de 200 microns. L'enregistrement de la position par le système informatique, est réalisé à l'aide du montage représenté par la figure IIIA.4.1, qui met en œuvre une carte d'acquisition multifonctions (ACL 8216, NUDAQ) implantée dans l'ordinateur. Cette carte assure la conversion du signal analogique d'entrée en une valeur numérique codée sur 16 bits. Cependant, la précision de la mesure numérique garantie, compte tenu du bruit électrique dû à l'environnement de fonctionnement interne au PC, n'est que de 14 bits soit un niveau minimum de détection de l'ordre de 1,22 mV. Cette sensibilité est convenablement adaptée à la valeur de 3 mV qui représente la variation minimale de position (30 nm) obtenue avec le détecteur 4 quadrants. Néanmoins, la distance entre le détecteur et l'ordinateur pouvant être de plusieurs mètres, des effets de boucle de masse peuvent apparaître, il peut subsister des variations de tension de mode commun supérieures à ce niveau minimum de détection. Pour assurer cette sensibilité, j'ai choisi, pour chaque voie du signal analogique, un mode de connexion de type différentiel qui utilise deux entrées de la carte ACL 8216. Cette carte peut recevoir 8 connexions différentielles de ce type soit un total de quatre détecteurs X,Y. La lecture programmée de l'information de position se fait de manière asynchrone du processus du programme qui l'a déclenchée. Elle est exécutée dans chaque séquence de commande de déplacement des éléments mobiles du microscope qui sont sous contrôle tels que le scanner et le dispositif de déplacement de la sonde.

L'installation matérielle de la carte d'interface est réalisée en sélectionnant, parmi ses différentes possibilités de fonctionnement, une configuration en accord avec le matériel déjà présent et les exigences du logiciel développé. L'organigramme de la figure IIIA.4.1 a, montre les différentes fonctions qui constituent le paramétrage statique de l'interface. Pour la carte ACL 8216, ces sélections s'opèrent par changement de position des éléments de connexions, cavaliers ou interrupteurs, sur le circuit imprimé de l'interface. Tout d'abord, le choix de la plage d'adresses des 16 registres de communication appelée « adresse base », implantés dans l'espace mémoire de l'ordinateur, est fixée ici aux valeurs hexadécimales comprises entre 220 et 22F. Par opposition au mode simple, le mode différentiel de connexion du signal analogique d'entrée est sélectionné. Le déclenchement de l'opération de conversion

numérique qui peut être fait par un signal logique externe est choisi en mode interne pour être activé par programmation. Le mode de transfert du résultat de conversion peut être réalisé suivant trois modes dont je détaillerai les mécanismes dans le chapitre IIIB. Le mode « interruption » est caractérisé par l'action matérielle d'un signal (IRQ) de contrôle du PC qui déclenche une séquence d'instructions de programme exécutant le transfert du résultat. Le mode (DMA) est un transfert direct et très rapide de la valeur numérique dans la mémoire de l'ordinateur et, le dernier mode choisi pour notre cas, assure un transfert contrôlé par programmation.

J'ai réalisé la programmation des instructions de contrôle de cette interface, dans l'environnement Windows, à partir du langage C++ en faisant appel à des fonctions primitives du pilote logiciel (driver) fourni par le constructeur de la carte d'interface. Le bloc de fonctions, figure IIIA.4.1 b, montre le séquençement des fonctions du programme qui effectue les contrôles dynamiques de lecture d'une valeur de position suivant une voie X ou Y. Une boucle d'exécutions/tests assure le déclenchement de la lecture de position et l'enregistrement de sa valeur au sein des données du logiciel. Un cycle d'instructions de cette boucle de lecture est défini par :

- choix de la voie signal
- fixer le gain unité (± 10 V)
- déclenchement lecture.
- si lecture terminée alors enregistrement position et fin de lecture.
- si erreur alors fin de lecture.
- retour à « si lecture terminée ».

IIIA.5 - Interface de contrôle et de mesure du système d'analyse spectrale.

Avant de décrire l'interface proprement dite du détecteur CCD commercial, je préciserai les caractéristiques du système d'analyse spectrale utilisé ainsi que celles du détecteur.

Le mode d'imagerie multidimensionnelle que j'ai développé correspond à une imagerie « hyperspectrale ». L'image source est construite en associant, à chaque point du balayage (x, y) de l'échantillon, la mesure spectrale $I_{(\nu)}$ émise en ce point, qui correspond à la mesure de l'intensité de la fluorescence sur un ensemble de N canaux spectraux.

Le système d'analyse spectrale est constitué d'un spectromètre (Jobin Yvon, HR640) pourvu d'une interface programmable pilotée à travers le port série standard (RS232 C) de l'ordinateur. Cet appareil dispose de deux réseaux optiques de 300 et 1200 traits/mm qui dispersent, sur les 512 canaux du détecteur, un intervalle de longueur d'onde respectivement de 80 nm pour le réseau de 300 traits et de 20 nm pour celui de 1200 traits. La résolution spectrale maximale dans ce second cas, est de 3 cm^{-1} .

IIIA.5.1 – Système d'analyse spectrale.

Les 512 canaux sont représentés par 512 photoéléments ou pixels d'une des deux dimensions d'un détecteur matriciel (Tektronix 512×512 D) de type CCD (Charge Coupled Device), refroidi à l'azote liquide et intégré dans une caméra commerciale (LN/CCD, Princeton Instrument Inc.). Un circuit de chauffage thermostaté permet un fonctionnement du détecteur entre $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ et $-140 \text{ }^\circ\text{C}$. L'efficacité quantique du CCD est de l'ordre de 65% à 780 nm ce qui permet d'obtenir une charge de 2 électrons pour 3 photons reçus. A basse température, son courant d'obscurité est de l'ordre de 1 à 2 électrons/pixel/heure, c'est à dire négligeable pour nos mesures, et le bruit de lecture est de 6 électrons/pixel pour une fréquence de lecture de 50 kHz. Remarquons que le bruit de lecture, lié à la mesure de la charge intégrée par chaque pixel du détecteur est indépendant du bruit d'obscurité de même qu'il ne dépend ni de la durée d'exposition ni du nombre de charges accumulées tant que les pixels du détecteur ne sont pas saturés.

La capacité de stockage de chaque pixel est supérieure à 2^{16} fois la valeur du bruit de lecture et confère une dynamique de détection plus grande que 2^{16} . Pour protéger le CCD très sensible, d'une saturation éventuelle entre deux mesures successives, un obturateur électromécanique, masquant le faisceau lumineux, est placé entre la sortie du spectromètre et la caméra CCD.

La dimension des pixels photo-sensibles est de $27\mu\text{m} \times 27\mu\text{m}$. Une électronique programmable (ST138, Princeton) contrôle la caméra CCD et assure le transfert des données numérisées vers la plate-forme informatique, à travers une interface programmable spécifique implantée dans l'ordinateur. Cette électronique commande l'obturateur, contrôle le temps d'exposition du capteur au signal optique et offre différentes fonctions de lecture sélective et combinée des pixels.

En particulier, une fonction de regroupement de pixels, appelée « binning », permet d'additionner le signal de pixels adjacents et d'adapter la surface du détecteur à la géométrie de la tache lumineuse qui l'éclaire. Dans notre cas, la dispersion du faisceau de fluorescence par le spectromètre forme une image linéaire qui éclaire toute la largeur du détecteur de 512 pixels suivant un axe X (ligne) et une dizaine de pixels en hauteur, selon l'axe Y. Un regroupement des 10 pixels suivant l'axe Y forme un « super-pixel » de hauteur et de surface 10 fois plus grande. Cette fonction de regroupement de pixels présente un avantage important par rapport à un détecteur linéaire composé d'une simple rangée de pixels comme le sont les détecteurs de type « barrette CCD ». En effet, le bruit d'obscurité est, comme pour un détecteur linéaire, proportionnel à la dimension verticale des pixels et peut donc être maintenu à une valeur minimum. De plus, lorsqu'on regroupe plusieurs pixels, le bruit de lecture du « super pixel » est identique à celui d'un simple pixel. En associant, verticalement, plusieurs photodiodes indépendantes, nous n'aurions pas bénéficié d'une telle propriété. C'est pourquoi, dans ces applications de mesure de faibles flux, les capteurs bidimensionnels sont généralement utilisés. Le regroupement des pixels permet donc de collecter l'ensemble du signal optique avec un bruit minimum et une adaptation rapide aux changements de géométrie de la tâche d'éclairement dus à l'utilisation d'optiques différentes, comme par exemple l'emploi de fibres optiques soient monomodes, soient multimodes dans nos différentes expériences.

IIIA.5.2 - Interface de contrôle et de mesure du détecteur CCD.

Le système de mesures spectrales est piloté à travers plusieurs voies de l'ordinateur. La figure IIIA.5.2.1 montre le synoptique d'interfaçage des différents éléments de ce système, le spectromètre, le contrôleur électronique externe, la caméra CCD et son obturateur.

Pour effectuer le pilotage de la caméra CCD, un contrôleur électronique externe ST138 et une carte d'interface spécifique, qui s'implante dans l'ordinateur, sont fournis par le constructeur. L'interface assure la liaison avec le contrôleur ST138 pour échanger, avec le programme, les paramètres de fonctionnement, les commandes et les mesures.

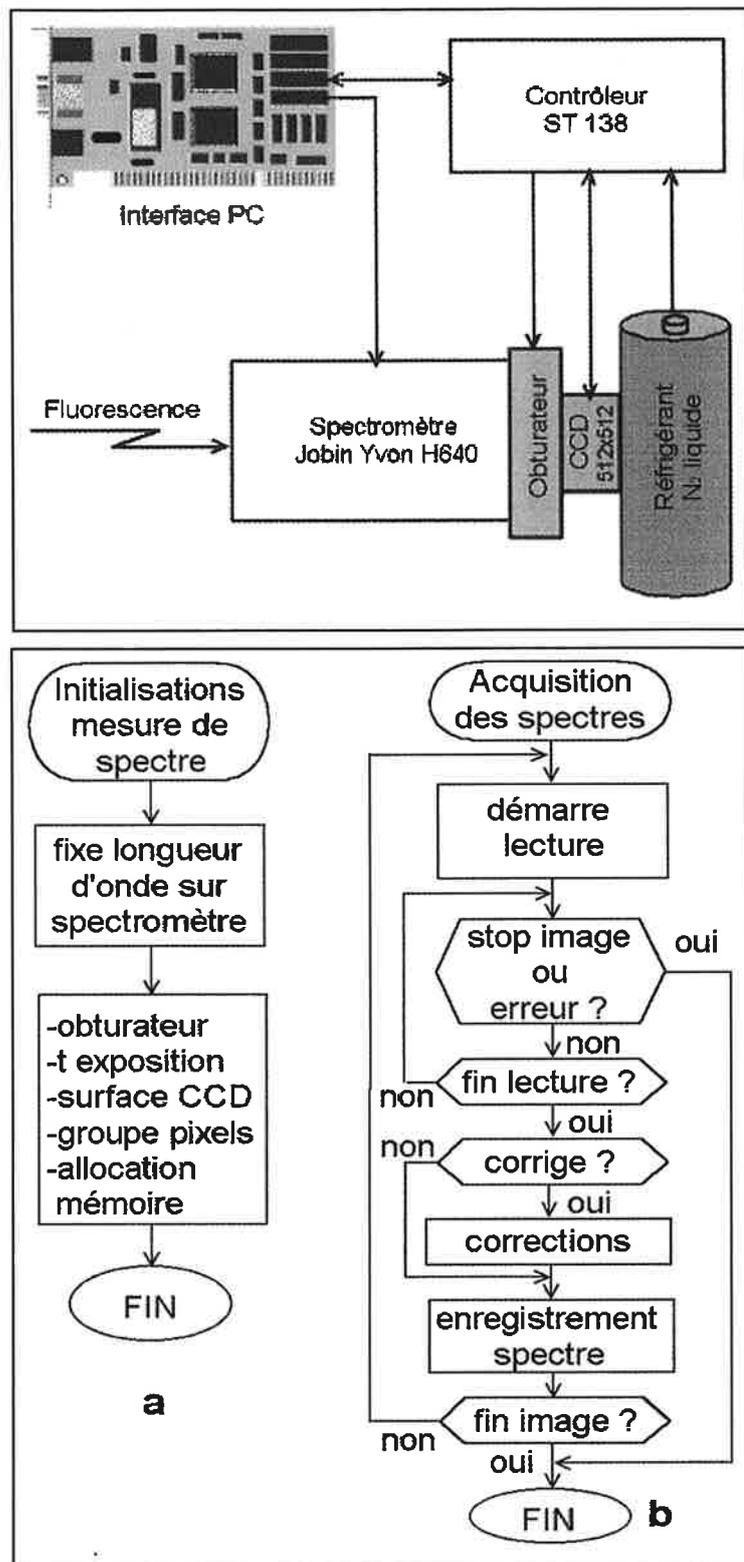


Figure IIIA.5.2.1 : Système programmable de mesures spectrales avec l'ensemble spectromètre et détecteur CCD. L'organigramme des fonctions est présenté respectivement en a pour l'initialisation des paramètres et en b pour l'acquisition de la mesure.

Dans le programme de gestion du microscope, la fonction développée pour acquérir les images spectrales, et d'autres fonctions indépendantes de test, et d'enregistrement de spectres nécessitent l'utilisation de la caméra CCD. Afin d'assurer l'exécution du programme sans perturbation, celui-ci vérifie l'état actif du système de mesures spectrales pour autoriser, à travers l'interface utilisateur du programme, l'accès à ces fonctions. Dans ce chapitre je ne décrirai, comme exemple, que les fonctions logicielles développées pour assurer les différents contrôles et commandes qui permettent l'acquisition d'images spectrales qui sont un exemple d'images multidimensionnelles.

La figure IIIA.5.2.1 a, présente l'enchaînement d'un premier bloc de fonctions exécutées avant tout début d'acquisition de l'image. Il représente les initialisations des paramètres comme le domaine spectral, les dimensions de la surface de détection choisie sur la caméra, le nombre de canaux spectraux actifs, le temps d'exposition du détecteur et le contrôle de l'obturateur.

Le réglage du spectromètre (Jobin Yvon, HR640), à la longueur d'onde centrale du domaine d'analyse, est effectué à travers une interface électronique de puissance. Cette interface, interne au spectromètre, utilise le port de communication série (RS232C) standard de l'ordinateur. L'échange bidirectionnel d'informations effectué par le logiciel, sous la forme de chaînes de caractères (ASCII), commande et contrôle les actionneurs du spectromètre pour positionner ses éléments optiques.

Les fonctions logicielles qui pilotent la caméra CCD et l'obturateur font appel à une librairie de fonctions primitives (DLL) fournie par le constructeur pour programmer le contrôleur ST138 qui gère les actions et l'acquisition des mesures du CCD. L'initialisation de la caméra consiste à définir le temps d'exposition T dans le domaine $0,1 \text{ s} \leq T \leq 1000 \text{ s}$, la position et la dimension de la zone du détecteur recevant le signal à mesurer et le facteur de regroupement de pixels ou « binning » en X et en Y pour obtenir la résolution et la sensibilité souhaitées. La taille du détecteur CCD étant de 512×512 pixels, toutes les dimensions sont exprimées en pixels. En sortie du spectromètre, le faisceau lumineux du signal de fluorescence est dispersé horizontalement sur la largeur totale X du détecteur et verticalement sur une hauteur utile Y de l'ordre de 10 pixels. Les autres pixels ne reçoivent pas de signal significatif. Cependant, un montage optique élaboré, capable de disperser, de manière superposée, plusieurs signaux spectraux de même géométrie, permettrait, à terme, d'utiliser plus largement l'aire du détecteur pour effectuer une mesure parallèle des spectres projetés. La géométrie à un seul faisceau, représente 512 points de mesure ou canaux spectraux distincts constitués chacun d'une colonne de 10 pixels. L'enregistrement des 512 canaux avec

un regroupement de 10 pixels dans chaque colonne Y du détecteur apporte la résolution et l'intensité maximale détectable. Ceci correspond aux paramètres de binning respectivement égaux à 10 suivant Y et à 1 (aucun regroupement) suivant X.

Le nombre de canaux spectraux enregistrés et la dynamique de leur représentation binaire déterminent la taille mémoire réservée au sein de l'ordinateur pour recevoir les 512 valeurs à chaque enregistrement d'un spectre. Le contrôleur ST 138 effectue le binning et numérise sur 16 bits chacun des 512 canaux spectraux constituant une information binaire contenue dans 1024 octets. La transmission de ces données est effectuée, tout d'abord vers la carte d'interface par une liaison série très rapide (4 Mo/s) et ensuite, en mode DMA (direct memory access) vers la mémoire de l'ordinateur. Le temps total de transfert pour un spectre de 512 canaux, après mesure du CCD, n'excède pas 300 μ s. Ce temps reste très peu significatif devant le temps d'exposition dont la valeur varie entre 500 ms et plusieurs dizaines de secondes dans l'analyse de molécules uniques.

L'ensemble de ces paramètres d'initialisation est encapsulé dans deux structures logicielles, contenant des chaînes de caractères ASCII. Chacune est sauvegardée dans deux fichiers attachés à la base de données. La première nommée PARAM_CAM_STRUC est sauvee dans le fichier « NOM_IMAGE.CAM » et présente le squelette écrit en langage C de programmation, suivant :

```
typedef struct {
    char str_date[9], // la date d'enregistrement de l'image
    str_Shutter[7], // le mode de contrôle de l'obturateur
    str_Speed[4], // la vitesse de conversion numérique des signaux de chaque pixel
    str_Timing[9], // le mode de synchronisation du déclenchement de la mesure
    str_Exposure[6], // le temps d'exposition du détecteur CCD
    str_NbOfClean[7]; // le nombre d'opération de lectures du détecteur utile à
} PARAM_CAM_STRUC; // l'élimination des charges accumulées dans les pixels
du détecteur CCD avant une nouvelle détection.
```

Le contenu du fichier NOM_IMAGE.CAM est visible sous un simple éditeur de texte et présente, par exemple le contenu des 6 champs de la structure séparés par un caractère espace, « 12/11/00 fermé 50 freerun 0.1 1 ».

La seconde structure, PARAM_BANDE_STRUC, sauvegardée dans le fichier « NOM_IMAGE.BAN » comprend les champs :

```
typedef struct {
```

```

char str_XStart[4], //pixel de début du spectre sur ligne X : 1..512
str_XEnd[4], //pixel de fin du spectre sur ligne 1..512
str_XNpt[4], //nombre de pixels ou super-pixel du spectre après groupement en X
str_YStart[4], //pixel de début du groupement de lignes
str_YEnd[4]; //pixel de fin du groupement de lignes
}PARAM_BANDER_STRUC;

```

Le contenu du fichier NOM_IMAGE.CAM présente par exemple les 4 champs suivants « 1 512 512 250 270 ».

L'initialisation de la caméra CCD s'effectue par l'appel à la fonction logicielle « Init_Setup_Sequencer(Test_download_flag, lpBufCam); » qui télécharge les paramètres vers le contrôleur ST138. Les deux paramètres d'appel de cette fonction sont, respectivement le drapeau d'état « Test_download_flag » indiquant le bon déroulement de l'initialisation et, l'adresse de la zone ou tampon mémoire de l'ordinateur « lpBufCam » recevant les valeurs du spectre à acquérir.

Le deuxième bloc de fonctions sur la figure IIIA.5.2.1 b, montre le séquençage des contrôles de la caméra en cours d'enregistrement de l'image spectrale. Une boucle d'exécutions/tests assure l'acquisition d'un spectre correspondant à chaque point d'image au cours du balayage de l'échantillon. Le choix des modes de correction du signal, soustraction d'un fond et compensation des rayons cosmiques peut activer ces fonctions logicielles spécifiques dans la boucle d'acquisition. Un cycle d'exécution de cette boucle est défini par :

- démarrage lecture spectre.
- si stop image ou erreur alors fin d'enregistrement des spectres.
- si lecture non terminée alors retour à « si stop image ou erreur ... »
- si correction fond, alors soustraire le spectre de fond
- si compensation, alors compenser les cosmiques
- enregistrement du spectre.
- si image terminée alors fin d'enregistrement des spectres.
- sinon retour à « démarrage lecture spectre ».

Le démarrage de la séquence de mesure du spectre sur le détecteur CCD est effectué par l'appel de la fonction « Test_Setup_Sequencer(); » qui enchaîne les actions d'ouverture de l'obturateur, d'exposition et de numérisation des pixels du CCD.

L'attente de la fin de lecture du spectre par l'événement «fin lecture» est effectuée en mode asynchrone par la fonction «Test_Run_Sequencer(); ». Son action est celle d'une boucle de polling qui interroge le registre d'état du contrôleur ST138 sur l'achèvement de l'ensemble des fonctions de lecture du CCD jusqu'au transfert des données en mode DMA dans le tampon mémoire qui a été réservé à l'initialisation.

Dans certaines conditions expérimentales, le faible flux lumineux à détecter nécessite un temps de pose du détecteur CCD important (0,5 à quelques dizaines de secondes) pour chaque pixel de l'image spectrale. Le mécanisme d'exécution de l'attente de «fin lecture» est bloquant. Pour assurer la gestion des contrôles du GUI et la maîtrise du logiciel par l'utilisateur, en cours d'acquisition de longue durée, avec un délai de réponse plus court que le temps d'acquisition d'un spectre, il est impératif, comme je l'ai expliqué au chapitre IIIA.1, d'insérer dans la boucle de polling de lecture du spectre la fonction « PeekMessage » qui est prioritaire sur l'exécution du programme d'acquisition.

IIIA.6 - Interface de contrôle et de mesure du générateur basse fréquence, application à la caractérisation des sondes.

Le générateur basse fréquence contrôlé par le système de gestion informatique intervient dans deux applications distinctes en rapport avec les pointes/sondes d'analyse utilisées dans les expériences de MOCP. La première consiste à déterminer les caractéristiques de vibration de ces pointes, lorsqu'elles sont placées sur la tête du microscope. Cette caractérisation est essentielle pour les pointes non commerciales, élaborées dans le groupe. Elle s'obtient à partir de l'enregistrement de la courbe de résonance de la pointe montée *in situ*. L'autre application, active en cours d'acquisition d'image, permet d'obtenir un oscillateur de référence qui entretient les vibrations de la pointe à sa fréquence de résonance, tout en contrôlant son amplitude d'oscillation, dans le but de détecter de manière optimale le signal d'asservissement maintenant sa position au-dessus de l'échantillon.

Ce générateur, appareil commercial, est le model HP-33120A (Hewlett-Packard), programmable à travers un port de communication série au standard RS232C. Il est utilisé comme oscillateur sinusoïdal dans la plage de fréquences comprises entre 1 kHz et 100 kHz avec une amplitude de signal variant entre quelques dizaines et quelques centaines de millivolts.

Comme pour le pilotage du spectromètre (§ IIIA.5), les commandes et informations échangées entre le HP-33120A et le logiciel de gestion du microscope sont constituées de chaînes de caractères ASCII.

Pour piloter cet appareil à l'aide du port série du micro-ordinateur, j'ai développé un pilote ou « driver » logiciel qui contrôle directement le port série COM2 de l'ordinateur, à travers le modem interne programmable 8250 [58]. Ce driver présente des fonctions, bidirectionnelles, de transmission de caractères, directement appelées par le programme. Il utilise les mécanismes d'interruption matérielle gérés par le noyau du système d'exploitation WINDOWS.

Sans décrire complètement le fonctionnement du circuit modem 8250, je préciserai succinctement le format de communication imposé par le HP et celui imposé par les commandes utiles aux applications de caractérisation des pointes. Enfin, je montrerai la structure des fonctions principales du driver.

La transmission des chaînes de caractères s'effectue caractère par caractère à la vitesse de 9600 bauds, avec un format de 8 bits sans contrôle de parité et une condition de fin de

transmission représentée par deux stop-bits , correspondant à un flux de transmission de 1200 caractères par seconde. Chaque suite de caractères, constituant une unique commande ou réponse échangée, est terminée par un caractère spécifique, indiquant la fin de la transmission, qui est le retour à la ligne noté CR ou, en langage C « \n ». Le générateur HP 33120A utilise les lignes de contrôle DTR (Data Terminal Ready) et DSR (Data Send Ready) dans son protocole de communication. DTR est un signal de blocage qui doit être à « VRAI » pour que le générateur puisse recevoir des commandes. Au contraire DSR placé à VRAI par le générateur indique que ses données peuvent être lues par l'ordinateur.

La mesure des courbes de résonance de la sonde du microscope est obtenue à partir de la détection synchrone du signal de vibration de la sonde lorsqu'elle est excitée par le générateur HP-33120A. Comme le montre la figure III.1, le signal du capteur piézoélectrique portant la sonde, est détecté par l'amplificateur à détection synchrone accordé sur la fréquence d'oscillation correspondant à la résonance de la pointe ou sonde.

Cette mesure est effectuée dans une boucle d'acquisition qui contrôle le générateur pour balayer le domaine de fréquence pas à pas et qui enregistre le signal de sortie de l'amplificateur à détection synchrone. Cette fonction affiche en temps réel le graphe de la courbe de réponse de la sonde, montrée par la figure IIA.3.2.3 du chapitre II, et permet, a posteriori, de déterminer avec précision la fréquence de vibration choisie par l'utilisateur. Cette fréquence, une fois déterminée, est utilisée dans les paramètres d'acquisition de l'image.

La tension analogique, représentant le signal de sortie de l'amplificateur à détection synchrone, est numérisée par le convertisseur intégré à l'interface multifonction ADA2000. La mesure S est limitée à une dynamique de 12 bits et exprimée par un nombre entier tel que $0 \leq S \leq 4095$.

Au cours de cette mesure, à chaque pas de fréquence, il est nécessaire d'attendre le temps d'établissement du régime permanent de vibration pour atteindre l'amplitude maximale de vibration avant d'enregistrer sa valeur. Pour une fréquence F et un facteur de qualité Q de la sonde, le temps d'établissement d'un régime stable est donné par la relation $T = Q / F$. En conséquence, la construction de la courbe de réponse de la sonde est réalisée en faisant varier la fréquence pas à pas. Cet échantillonnage de la fréquence, introduit un allongement temporel de la bande passante. Dans la pratique, la valeur du temps choisi $T_s = 2Q / F$ est totalement fonctionnelle.

La boucle de mesure détermine le temps d'attente T_s correspondant à la fréquence d'excitation F et utilise une temporisation logicielle « attend_s(T_s) » utilisant le mécanisme de la fonction « délai », décrit dans le chapitre IIIA.1.

Cette attente n'est réellement utile qu'aux basses fréquences d'excitation pour lesquelles T_s est supérieur au temps T_{ex} de réponse du générateur à la commande programmée de changement de fréquence. Elle doit être appréciée en fonction de la vitesse de transmission des caractères et du temps de réponse du générateur à la commande spécifiée. Concrètement, si la transmission des commandes vers le générateur s'effectue à 1200 caractères par seconde, une commande de type « `FREQ 3456\n` », qui signifie d'osciller à 3456 Hz, demande plus de 8 millisecondes pour être transférée et seulement 2 millisecondes pour être exécutée, temps minimum mesuré lorsque la fonction d'affichage de la fréquence sur le panneau avant du générateur est désactivée. La commande de changement d'amplitude nécessite 30 ms et certaines commandes de reconfiguration plus complexes peuvent demander plus de 300 ms.

Les chaînes de commandes du générateur utilisées dans le programme sont :

`"*CLS\n"` réinitialise le registre d'états et d'événement de l'appareil. La lecture de sa valeur renseigne sur son fonctionnement courant.

`"SYST:REM\n"` place le générateur sous contrôle de l'ordinateur, les fonctions du panneau avant de l'appareil deviennent inopérantes.

`"DISP 0\n"` désactive les fonctions d'affichage sur le panneau avant. Ce mode accélère le traitement des commandes par le générateur.

`"SYST:ERR?\n"` lit une information d'erreur apparue sur le générateur.

`"VOLT 0.040\n"` sélectionne une amplitude du signal d'oscillation à 40 mV.

`"FREQ 3456\n"` sélectionne une fréquence.

Les fonctions de pilotage développées dans le driver logiciel, ont une structure qui correspond au contexte de fonctionnement du générateur, nécessaire à chacun des stades de l'exécution programmée de la mesure de la résonance de la sonde. Elles font appel à une fonction commune de communication RS232_com construite comme suit :

```
long RS232_com(char *BUFFER) {
    char c;
    long val_ret;
    init_com();
    c=BUFFER[strlen(BUFFER)-2];
    emet_chaine(BUFFER);
    if (c == '?') {
        switch (reponse_RS232()) {
            case 1: BUFFER_CAR[NBCARECU] = '\0';
```

```

    val_ret = 1;
    break;
case 2: affich_erreur(102); /* puts("\nR,ponse table incomplŠte\n"); */
    val_ret = 0;
    break;
}
} else val_ret = 1;
restor_vect ();
return (val_ret);
}

```

Cette fonction exécute l'émission des commandes et la réception des informations envoyées par le générateur. La distinction entre ces deux modes dépend du type de commande émise et elle est déterminée par l'analyse de son dernier caractère. S'il s'agit d'un « ? », la fonction attend une réception. Pour émettre ou recevoir les chaînes de caractères circulant entre le générateur et l'ordinateur, la fonction contrôle l'état des lignes DSR et DTR du câble de liaison qui relie les appareils. Le contrôle de ces lignes, avant chaque émission, utilise la boucle polling suivante :

/ on ne sort de cette boucle avec la valeur VRAI que lorsque les registres d'émission et de décalage sont vides, c'est à dire lorsque les bits 5 et 6 du registre de contrôle de ligne et DSR sont VRAI */.*

```

int ready(void) {
    long MaxTempo = 1000000L ;
    do val.valeur = inportb (REG_ETAT_LIGNE);
    while (!((val.rel.reg_emet_vide) && (val.rel.reg_decal_vide) &&
    (MaxTempo-- > 0)&&(inportb(REG_ETAT_MODEM) & 0x20)));
    return(MaxTempo > 0);
}

```

Dans la fonction d'initialisation du mode de fonctionnement du générateur plusieurs commandes sont envoyées, séquentiellement et dans un ordre donné, au générateur. Le temps de réponse de l'appareil pour ces commandes est relativement long. Il est impératif d'observer des temps d'attente suffisants entre chaque commande pour assurer la prise en compte complète du processus d'initialisation. La vérification du bon déroulement de l'exécution de

ces commandes par le générateur est donnée par sa réponse à la commande **SYST:ERR?**, placée à la fin de la fonction comme le montre la structure ci-après.

```
int init_HP33120(void) {
    RS232_com("SYST:REM\n");
    attend_s(0.2);
    reset_HP33120();
    attend_s(0.2);
    RS232_com("DISP 0\n"); /* affichage HP33120 désactivé */
    attend_s(0.2);
    RS232_com("SYST:ERR?\n");
    return(BUFFER_CAR[1]=='0');
}
```

Les difficultés principales rencontrées dans le pilotage du générateur sont essentiellement d'ordre temporel. L'analyse de son fonctionnement et l'observation des temps de réponse pour ses différentes fonctions m'ont permis de développer un driver logiciel [65] de communication adapté au contrôle programmable de cet appareil et compatible avec le fonctionnement du système d'exploitation WINDOWS.

Outre la fonction d'oscillateur de référence nécessaire à l'entretien des vibrations de la sonde, l'intérêt de cet appareil programmable réside dans le fait qu'il fournit un outil fiable et précis qui permet, *in situ*, l'analyse de la courbe de réponse en fréquence de la sonde montée sur le microscope, et ce pour une large variété de sondes.

Cette interface est utilisée de façon satisfaisante pour caractériser les performances du capteur de distances nanométriques (sonde), décrit au chapitre IIA.3.2, avec une excellente précision.

IIIB - Développement des logiciels, contraintes et descriptions des fonctions principales.

Comme je l'ai souligné dans l'introduction du chapitre IIIA, j'ai choisi l'OS WINDOWS-95® et le langage de programmation C++, pour être compatible avec la bibliothèque logicielle fournie avec la caméra CCD PRINCETON et utiliser les avantages d'un langage orienté objet, bien adapté pour manipuler les structures des fonctions graphiques de l'interface de programmation WINDOWS.

Pour développer les versions distinctes du programme de gestion correspondant aux différentes configurations matérielles des microscopes réalisés, j'ai utilisé l'environnement de programmation BCW (INPRISE - BORLAND®). Je décrirai cette méthode dans le chapitre IIIB.1. Je rappellerai les principes de la programmation orientée objet avec ses notions de classes d'objets. Je préciserai les spécificités principales des fonctions graphiques élémentaires que j'utilise dans le programme, ainsi que la méthode qui permet, au sein de BCW, de construire les interfaces graphiques du programme. J'exposerai l'architecture du programme, en citant les différentes classes d'objets graphiques qui le caractérisent, dans le chapitre IIIB.2. Je décrirai dans le chapitre IIIB.3 les différentes structures d'informations et de mesures qui constituent les éléments de la base de données ainsi que l'organisation de leur sauvegarde sur fichier. Enfin, dans le chapitre IIIB.4, j'expliquerai quels sont les critères d'une bonne interaction entre le programme et l'utilisateur ou « interface homme-machine » et, j'illustrerai les actions offertes à l'utilisateur en présentant les interfaces graphiques spécifiques, développées pour piloter les fonctions du programme. Je montrerai, ainsi, le niveau d'interaction et de présentation réalisés grâce à l'ordinateur et son OS WINDOWS pour cet outil d'imagerie en MOCP.

IIIB.1- Système d'exploitation Windows, environnement de développement

Les avantages majeurs que présentent les nombreuses fonctions de l'interface graphique WINDOWS ne sont pas les seuls apportés par cet OS. En effet, il possède un noyau logiciel, Win32, qui constitue l'interface de programmation ou l'API (Application Programming Interface), chère au développeur. Ce noyau contient le jeu de fonctions disponibles au programmeur, dont les appels peuvent être insérés dans le code source du programme développé.

Ce jeu de fonctions est « universel », c'est à dire qu'il ne dépend pas du matériel sur lequel il est utilisé, et qu'il permet d'écrire un code logiciel unique qui, une fois mis au point, peut fonctionner sur toutes les plateformes utilisant cette API comme WINDOWS NT, WINDOWS 98 ou WINDOWS 95.

Un sous domaine de l'API, qui nous intéresse plus particulièrement, est le GDI (Graphic Device Interface) qui, comme je l'ai déjà mentionné, regroupe les fonctions de gestion des objets graphiques. Les principaux domaines de l'OS, gérés par l'API Win32, sont la mémoire, l'ordonnancement des tâches, les contrôles hiérarchiques, le clavier et la souris, les fenêtres, les primitives graphiques, les fichiers et le réseau. L'accès, par le programme développé, à ces différents domaines, permet de construire des interfaces graphiques de saisie, de contrôle et d'affichage conviviales, essentielles pour l'utilisation d'un outil d'imagerie.

La structure des entités codées correspondant aux différents éléments logiciels de chacun des domaines gérés par l'API Win32, correspond à celle d'un langage de programmation orienté objet, comme le C++, qui utilise des règles hiérarchiques de construction et de gestion de ces objets.

Un objet donné est représenté par un code logiciel, ou code source, ayant une structure définie, appelée la « classe » de l'objet. Celle-ci comporte plusieurs champs qui permettent la gestion d'une fonction plus ou moins complexe du programme. Prenons l'exemple de la boîte édition, bien connue dans l'environnement WINDOWS pour saisir un paramètre ou un commentaire. Elle contrôle l'affichage à l'écran et la saisie des caractères frappés au clavier, leur effacement, leur duplication et leur sélection. Elle est gérée par l'objet « boîte d'édition ». Pour cela, parmi les champs de la classe d'un tel objet, figureront des variables, en particulier des chaînes de caractères. Un autre type de champ, et c'est là une caractéristique de la programmation orientée objet (POO), est celui des fonctions attachées spécifiquement à la classe, appelées « méthodes ». Dans le cas de l'objet boîte d'édition, les méthodes sont par exemple celles réalisant l'effacement, la duplication et la sélection du texte. En fait, une boîte d'édition est construite par héritage, à partir d'un objet « père » moins spécialisé. Le fait d'attacher des fonctions à des objets dont la représentation est généralement graphique, apporte à l'utilisateur une grande lisibilité dans la présentation fonctionnelle du programme. En particulier, dans la gestion des différents éléments du microscope j'ai été amené à construire plusieurs objets graphiques complexes, appelés boîtes de dialogue. A chacune d'elle, sont associées des méthodes (fonctions) que j'ai définies par programmation et qui permettent la gestion des fonctions spécifiques du microscope.

Un autre aspect intéressant de la POO est la construction d'objets complexes dits « enfants », à partir d'objets plus élémentaires dits « parents », par la méthode d'héritage. L'héritage permet de transmettre à l'objet enfant, l'ensemble des méthodes de l'objet parent, supprimant ainsi la nécessité de les redéfinir. De plus, l'objet enfant peut comporter de nouveaux champs et méthodes qui lui sont propres (elles n'existent pas dans l'objet parent).

Dans notre exemple, la construction de l'objet boîte d'édition s'appuie sur la structure d'un objet parent. Ce dernier est de type « fenêtre » et il apporte ses méthodes de base à l'objet boîte d'édition (enfant), telles que l'affichage graphique du texte, la gestion du clavier et de la souris, et celles de sa fenêtre comme l'agrandissement, la mise en icône et sa fermeture ou destruction.

En résumé, l'objet « boîte d'édition » qui, dans cet exemple, est « l'enfant » de l'objet père « fenêtre », hérite des méthodes de son parent et, sous certaines conditions que je ne préciserai pas, accède à ses variables. L'ensemble des méthodes de base, apportées par l'objet père, et des méthodes spécifiques à la boîte d'édition sont accessibles à travers le seul objet enfant boîte d'édition. Ces liens de parenté peuvent présenter plusieurs niveaux hiérarchiques allant de l'objet de base de l'API Win32 vers l'objet le plus complexe. C'est là tout l'intérêt de la programmation orientée objet, qui permet, à partir d'objets de base préexistants dans L'API Win32 ou l'environnement BCW, de créer des objets complexes, répondant à une gestion spécifique d'un élément de contrôle ou de mesure du microscope, tout en écrivant un code source plus concis.

Un exemple, est celui de la gestion des fonctions de sélection des dimensions et positions de la ROI à balayer sur l'échantillon, qui interagissent sur les déplacements du scanner. Pour cela, le programme utilise un type ou une classe de boîte d'édition hérité de celui que je viens de décrire. En effet, reprenons cet objet et appelons le édition1. A partir de sa classe, il est aisé de recréer une autre boîte d'édition identique que j'attribuerai à la fonction de décalage suivant X de la position de la ROI. Cependant il est utile d'ajouter sur cet objet un contrôle supplémentaire sur la validité d'un nombre entier, compris entre 0 et 100, saisi au clavier, pour accepter ou refuser le changement de l'affichage de ce nombre, dans la zone graphique de la boîte d'édition. Egalement, à partir d'un changement d'affichage du nombre validé, on souhaite déplacer le scanner à la position correspondante. Pour cela il faut disposer d'un objet édition1 avec deux méthodes supplémentaires. La première effectue la sauvegarde de la valeur présente avant saisie, compare la nouvelle valeur saisie au domaine de validité et décide, de manière conditionnelle, de conserver l'affichage ou de réafficher

l'ancienne valeur. La seconde, calculera le nombre de pas de déplacements nécessaire pour déplacer le scanner de sa position courante à la nouvelle position. Ceci peut rapidement être réalisé en créant, à partir de la classe de l'objet père édition1, une nouvelle classe pour l'objet enfant édition2. On dira que la classe de l'objet édition2 est dérivée de la classe de l'objet édition1. A ce titre, elle hérite des méthodes de l'objet édition1, déjà définies, et n'aura besoin que de deux méthodes spécifiques pour que l'objet édition2 assure le test, la validation et le déplacement du scanner pour la valeur éditée.

D'une manière générale ces objets, qu'ils soient élément de base de l'API Win32 ou fonction élaborée du programme de gestion du microscope, sont définis, distinctement, dans leur classe. Le caractère architecturé apporté par l'API Win32 et le langage C++, sur la structure des objets, donne une indépendance et une protection de leurs variables qui permet à plusieurs objets, créés à partir d'une classe donnée, de coexister au sein du même programme et aussi dans plusieurs tâches fonctionnant de manière concurrente car WINDOWS 95 est un OS multitâche.

Le programme de gestion du microscope est principalement fondé sur l'élaboration d'une interface graphique utilisateur, réalisée à partir d'objets complexes que j'ai développés pour gérer le paramétrage, le contrôle et l'affichage des acquisitions de mesures dans les différentes configurations de fonctionnement des microscopes que nous avons mis en œuvre.

L'outil BCW que j'ai utilisé est dénommé outil rapide de développement (RAD, rapid application development toolkit). Il est constitué d'un ensemble d'outils de programmation comprenant un éditeur pour saisir le code source, d'un compilateur interactif doublé d'un débogueur qui gère les erreurs de construction du programme ainsi que les erreurs d'exécution, et d'un éditeur de liens unifiant les différents codes compilés d'une programmation modulaire et les déclarations de ressources graphiques des objets construits dans le programme.

Ces codes, outre ceux du langage saisi et compilé, peuvent être, ceux issus d'une bibliothèque spécifique au fonctionnement d'un matériel commercial, ou ceux des ressources graphiques du programme. Les objets graphiques de l'API Win32 et plus généralement de la librairie « ObjectWindows » de l'environnement de programmation BCW, contiennent entre autre, un grand nombre de classes d'objets prédéfinies avec toutes les caractéristiques utiles à leur représentation graphique. Ces informations graphiques constituent, avec celles des objets spécifiquement créés au cours du développement du programme, les « ressources » du programme.

Le RAD, adapté au développement sous WINDOWS, intègre plusieurs outils de programmation autour d'une interface graphique unique à l'écran du développeur. Par cette méthode, le développement du programme de gestion du microscope se définit comme le développement d'un « projet » informatique. Je parlerai indistinctement du programme ou du projet.

Le projet est structuré en plusieurs éléments ou modules. Chacun d'eux contient le code source utile à la construction spécifique d'un objet de l'interface utilisateur graphique du programme et à la gestion de ses contrôles.

Un module est habituellement constitué de 3 éléments ou 3 fichiers, « l'entête » représente les déclarations des classes d'objets contenues dans le fichier « module.h », le corps des fonctions ou méthodes traitant les actions se rapportant à cet objet, est écrit dans le fichier « module.cpp » et les ressources graphiques utiles à la visualisation de l'objet sur l'écran, dans le fichier « module.rc ».

Un objet gérant une fonction du microscope, par exemple le paramétrage des caractéristiques d'acquisition d'une image, nécessite de nombreuses fonctions disponibles individuellement dans le GUI (saisie de paramètres, marquage d'options de configuration, affichage d'image, ...). Pour cela l'objet est construit à partir d'objets plus élémentaires architecturés par des classes prédéfinies, auxquels il faut ajouter la programmation de toutes les méthodes spécifiques au fonctionnement du microscope (les fonctions d'acquisition, de visualisation d'images, d'analyse, ...). Parmi les classes d'objets prédéfinis on peut citer :

- Le menu, qui permet le déclenchement d'une action, facilite le regroupement et la présentation thématique des fonctions du programme. Il contient les noms des fonctions à exécuter. Ces fonctions elles-mêmes peuvent, de manière arborescente, présenter d'autres sous-menus. L'affichage des menus est, soit permanent et placé sur un bord de fenêtre, soit surgissant (pop menu) et déplaçable sur l'écran.

- La boîte d'édition permet la saisie par le clavier d'un nombre, d'un paramètre et présente les facilités des commandes de duplication et correction d'un logiciel d'édition.

- La flèche de défilement est sensible au clic de souris et, utilisée conjointement avec la boîte d'édition, elle apporte une méthode fine et rapide de variation incrémentale des valeurs des paramètres. Elle constitue un procédé de réglage précis dans les commandes des actionneurs.

- Le bouton, « enfoncé » par le click de la souris, montre à l'utilisateur le déclenchement d'une action.

- La case à cocher présente une situation permanente tel un état, un contexte de mesure ou un mode de fonctionnement pour le programme. Activée par le clic de souris elle fonctionne en bascule, un clic l'active, le suivant la désactive.

Deux autres éléments plus généraux, dont l'aspect est largement modifiable pour représenter des objets graphiques plus complexes ou plus spécifiques en fonction des différents contextes de fonctionnement du programme, sont :

-Les fenêtres, cadres vides permettent d'afficher tout objet graphique. De dimensions variables et capables d'être déplacées sur l'écran, elles sont l'élément de base qui reçoit tout type d'objet graphique. La fenêtre principale est de la taille de l'écran et reçoit toutes les interfaces graphiques du programme. Une image topographique ou la courbe d'un graphe utilisera le cadre d'une fenêtre pour être visualisés.

-Les « boîtes de dialogue » sont des objets graphiques plus complexes constitués d'une fenêtre qui contient un ensemble d'objets élémentaires comme ceux précédemment cités. L'organisation choisie par le développeur du projet, dans la disposition et l'aspect de ces objets, sera, à la manière d'un tableau de bord, représentative des fonctions de contrôle et d'information accessibles à l'utilisateur pour initialiser un fonctionnement du microscope. Par exemple le paramétrage et les commandes de l'acquisition d'image dans le mode choisi.

Comme je l'ai dit, le RAD possède une bibliothèque de tous ces objets graphiques élémentaires avec les définitions de chacune de leurs classes. Un des principaux outils, le constructeur de ressources, permet d'importer chacun de ces objets dans la construction des objets complexes du projet. A l'aide de la souris, il positionne, en cours de construction, avec précision et une relative aisance, le graphisme de chacun de ces objets sur l'écran. L'organisation des objets sur l'écran, est effectuée visuellement et de manière interactive pour déplacer, modifier la taille ou les attributs de style des objets [61], que je ne décrirai pas dans ce mémoire. Ainsi, il est possible de construire un nouvel objet dont la complexité est fonction du nombre de ses objets élémentaires et des spécificités de gestion logicielle des nouvelles méthodes, créées pour satisfaire à un degré élevé de fonctionnement. Cet objet complexe, habituellement du type boîte de dialogue, est l'interface graphique du module pour lequel le RAD crée automatiquement, dans le fichier « module.rc » le code source correspondant aux types, aux positions et aux dimensions de tous ses éléments.

La figure IIIB.1.1 montre la liste des objets créés avec le constructeur de ressources pour constituer l'interface homme-machine de ce programme. Ils sont regroupés sous la

dénomination de la classe de base à partir de laquelle ils sont dérivés. En particulier la rubrique « DIALOG » contient toutes les boîtes de dialogue créées à l'aide du RAD pour ce projet. De cette manière, l'interface graphique du programme, se trouve constituée de zones graphiques actives traitant les méthodes de base ou celles nouvellement construites pour obtenir les fonctions pratiques de haut niveau recherchées par l'utilisateur.

Les objets complexes sont multifonctions. Le fonctionnement de la « boîte de dialogue », avec l'ensemble de ses objets graphiques internes plus ou moins primitifs, est reconnu par le GUI de la manière suivante. Toute action effectuée par l'utilisateur sur l'un de ces objets, transmettra un message interne au programme, qui exécutera la méthode correspondante appartenant à l'objet complexe. Cette fonction peut être le déroulement et la sélection d'un élément de menu, l'affichage d'un message sur écran, la saisie d'un paramètre numérique, le click sur un bouton déclenchant une commande ou l'ouverture d'un autre contexte de dialogue avec le programme, etc.

Un éditeur de texte adapté à la structure du langage de programmation C++ est intégré dans le RAD pour créer les fichiers sources « module.h » et « module.cpp ». Un compilateur interactif vérifie la syntaxe et la cohérence de l'écriture des lignes de code source du module pour les transcrire en code machine en produisant un fichier « module.obj ». Puis, un éditeur de liens complète les informations communes aux différents modules du projet pour construire, dans son ensemble, le programme exécutable. Pour cela, le RAD permet d'inclure dans le projet les bibliothèques « constructeur » et les pilotes développés, en code machine, qui regroupent les fonctions spécifiques comme celle du détecteur CCD et celles des interfaces électroniques de contrôle des éléments du microscope. La figure montre la présentation arborescente, développée ici au premier niveau, de tous les modules gérés par le RAD pour obtenir le programme exécutable complet de gestion du microscope « mphocam2.exe ».

BITMAP	
BMP_HLP1	(1)
BMP_HLP2	(2)
BMP_ROI	(101)
BMP_OFF_ETEINT	(102)
BMP_OFF_VERT	(103)
BMP_ON_ETEINT	(104)
BMP_ON_VERT	(105)
BMP_VERT_ALLUME	(106)
BMP_VERT_ETEINT	(107)
MENU	
ID_MENU1	(1100)
IDM_COMMENT_EDIT	(1172)
DIALOG	
DIAL_ACQ_IMAGE	(120)
DIAG_TEST_PHOTONS	(201)
DIAG_CONT_LUMI	(300)
DIAG_WINLIGNE	(500)
DIAG_SetupCam	(1119)
DIAG_SAISIE_VALEUR	(1153)
DIAG_COMMENT	(1170)
DIAG_Binning	(1299)
DIAG_ChoixSpectre	(1400)
DIAG_CHOIX_DIR	(1450)
DIAG_INFO_IMAGE	(1500)
DIAG_ProfilRaie	(1600)
DIAG_CalibSpectre	(1700)
DIAG_AxeHor	(3000)
CURSOR	
CURSOR_2	(100)
CURSOR_1	
ICON	
ID_MPHOCAM_ICON	(4000)

Fig. IIIB.1.1 : Liste des objets graphiques, spécifiques aux actions du programme. Il sont construits à l'aide du RAD, et contenus dans le fichier de ressources « module.rc ».

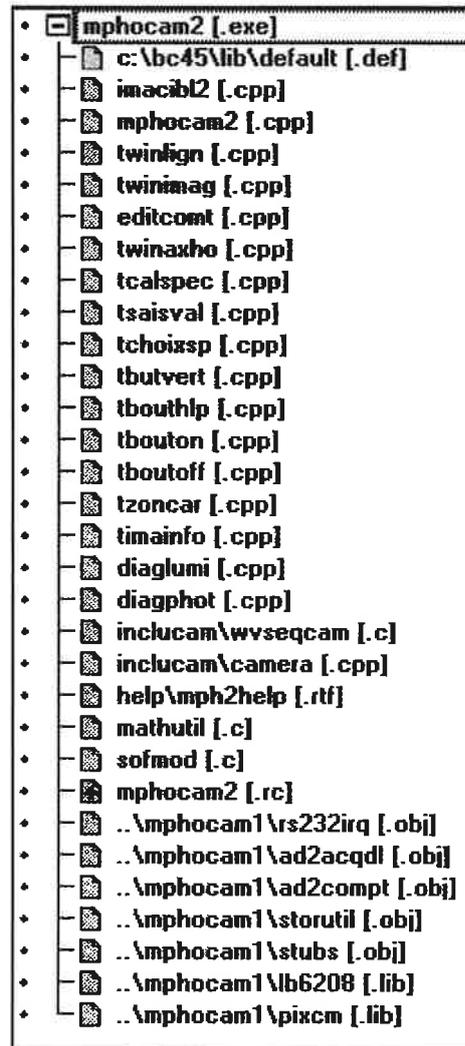


Fig. IIIB.1.2 : Ensemble des modules logiciels du projet informatique.

Si la structure d'un outil de développement de type RAD, comme celui que j'utilise, semble complexe et nécessite un investissement significatif pour maîtriser l'ensemble de ses fonctions de développement, sa gestion hiérarchique des nombreux modules logiciels nécessaires se révèle indispensable à la construction et à la maintenance d'un projet informatique de cette ampleur. Dans le chapitre IIIB.4, la figure IIIB.4.1 montre un aspect du graphisme de l'interface principale du projet, réalisée avec ce RAD.

Les avantages de cette méthode et les règles de hiérarchie propres à la programmation en langage objet C++ sont en adéquation avec les relations interdépendantes entre les objets des différents modules. Cette programmation inclut les notions parent-enfant qui existent entre les éléments graphiques au sein de la programmation sous WINDOWS.

Cet outil favorise la construction modulaire du programme et permet d'obtenir rapidement une nouvelle version exécutable du projet adaptée à une autre configuration du microscope utilisé.

IIIB.2 - Fonctionnalités du programme.

Le programme de gestion du microscope offre deux possibilités d'exploitation soit active, soit passive. Son utilisation passive est celle d'un outil d'analyse exploitant les enregistrements préalablement acquis dans la base de données. Son utilisation active est celle qui contrôle les différents détecteurs, actionneurs et autres éléments du microscope pour mesurer, déplacer, construire et enregistrer des images de microscopie à balayage.

Au chapitre IIIA, j'ai décrit les interfaces qui pilotent les principaux éléments du microscope tels le scanner, les détecteurs de position, de signaux de fluorescence, etc.. Dans le contexte actif, la gestion de ces interfaces par le programme représente environ 70 % du temps de fonctionnement du processeur de l'ordinateur. Le reste du temps d'exécution, se partage entre la gestion des messages du GUI et le stockage des mesures.

Ici, j'exposerai l'organigramme du programme et je préciserai le rôle des fonctions, dans l'ordre où elles apparaissent à l'utilisateur. En utilisant la notation employée dans le RAD [61], je décrirai, pour chaque fonction, la classe de l'objet graphique complexe qui la représente. Je détaillerai les objets élémentaires à partir desquels cet objet est composé, seulement lorsque cela sera nécessaire à la compréhension d'un fonctionnement particulier. J'ai exposé les classes des objets élémentaires au chapitre IIIB.1.1. Je préciserai, également, les méthodes standard ou spécifiquement créées qui sont attribuées à l'objet complexe pour exécuter la fonction et s'il y a lieu, j'expliquerai l'originalité de leur fonctionnement.

La figure IIIB.2.1 présente le squelette principal du programme. Le premier bloc représente la fenêtre graphique principale MPHOCAM, qui reçoit tous les autres objets graphiques utilisés dans le programme. Cette fenêtre appartient à la classe « TWindow » et a pour seules fonctions, celles d'assurer l'affichage ou le masquage de l'interface graphique du programme sur l'écran. Au sein de l'OS, elle constitue l'application ou la tâche à exécuter. Sa fermeture implique l'arrêt de l'exécution du programme de gestion du microscope.

Les éléments graphiques principaux parmi ceux auxquels je fais référence dans ce chapitre sont visibles sur la figure IIIB.2.2. Ceux, communs au déroulement du programme, qui sont affichés en permanence et déplaçables sur la fenêtre principale, sont représentés en bleu (DIAG_INFO_IMAGE, DIAG_CONT_LUMI, DIAG_WINLIGNE). Cette figure représente quelques objets activables, c'est à dire qu'ils sont affichés uniquement sous l'action d'une fonction, comme l'objet TWINIMAGE qui affiche et traite l'image et l'objet DIAG_ACQ_IMAGE qui saisit les paramètres d'acquisition et en gère les contrôles.

En fait, la figure IIIB.2.2 ne présente qu'une partie des objets développés pour le programme. Une liste plus exhaustive des objets, créés pour cette interface utilisateur, peut être reconstruite à partir du fichier de ressources qui contient, en particulier, toutes les boîtes de dialogue ayant une représentation prédéfinie. Dans cette liste, présentée sur la figure IIIB.1.1, on retrouve les objets précédemment cités et bien d'autres dont le nom évoque (particulièrement dans le langage du développeur) la fonction principale qu'il gère. Un des objets qui n'apparaît pas dans cette liste, est celui de la fenêtre Image1 nommé TWINIMAGE, car il n'a pas de ressource prédéfinie. En effet, la représentation graphique de cet objet ainsi que ses variables internes dépendent des caractéristiques d'acquisition, et en particulier du nombre d'informations à enregistrer qui conditionne sa taille, et donc, ne peuvent être prédéfinis.

Je vais maintenant présenter quelques-uns de ces objets, dans l'ordre dans lequel ils pourraient apparaître à l'utilisateur, ordre qui est représenté sur la figure IIIB.2.1.

A l'ouverture du programme, quatre éléments graphiques de l'interface du programme, sont affichés en permanence à l'écran, dans la fenêtre MPHOCAM.

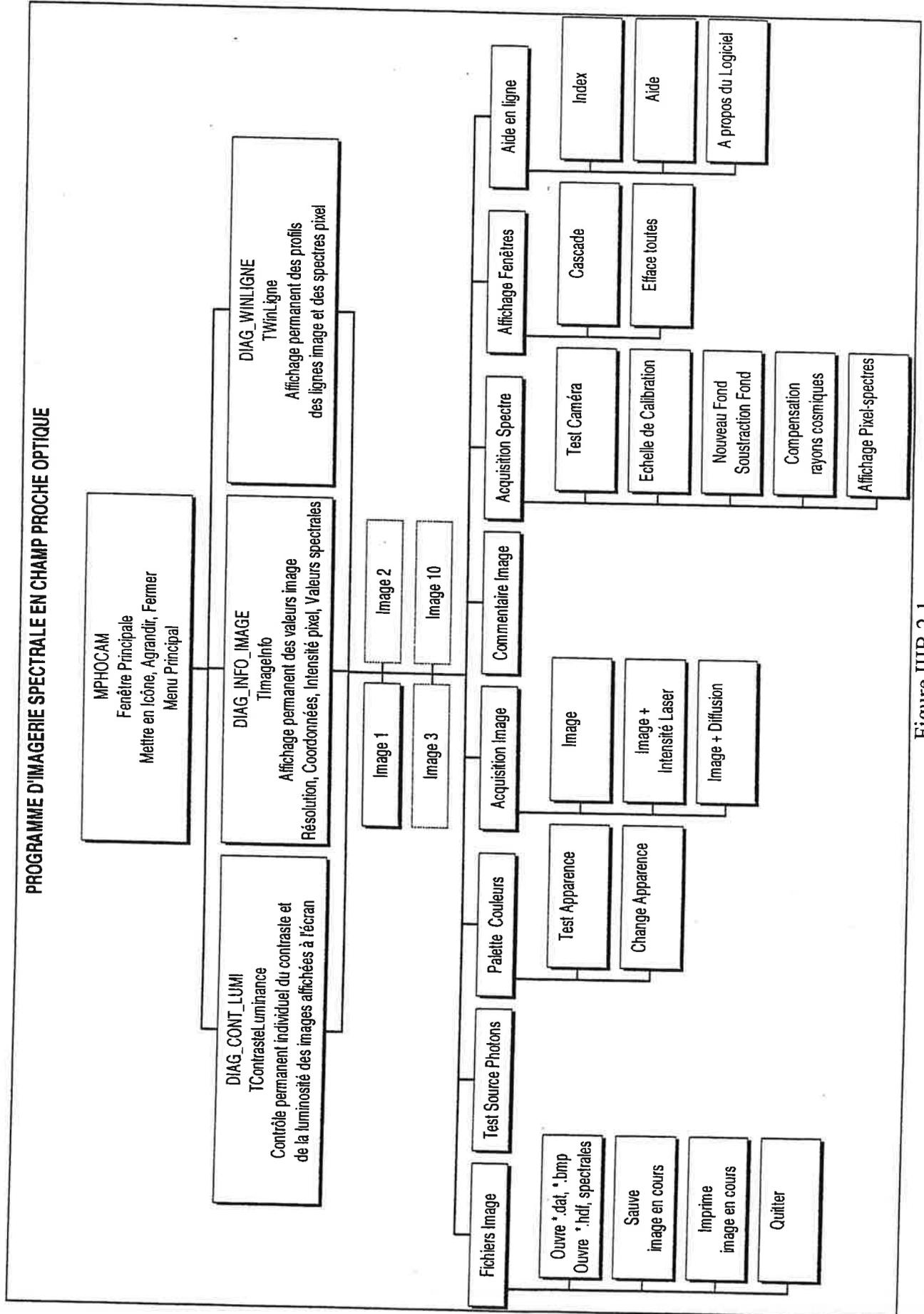


Figure IIIB.2.1

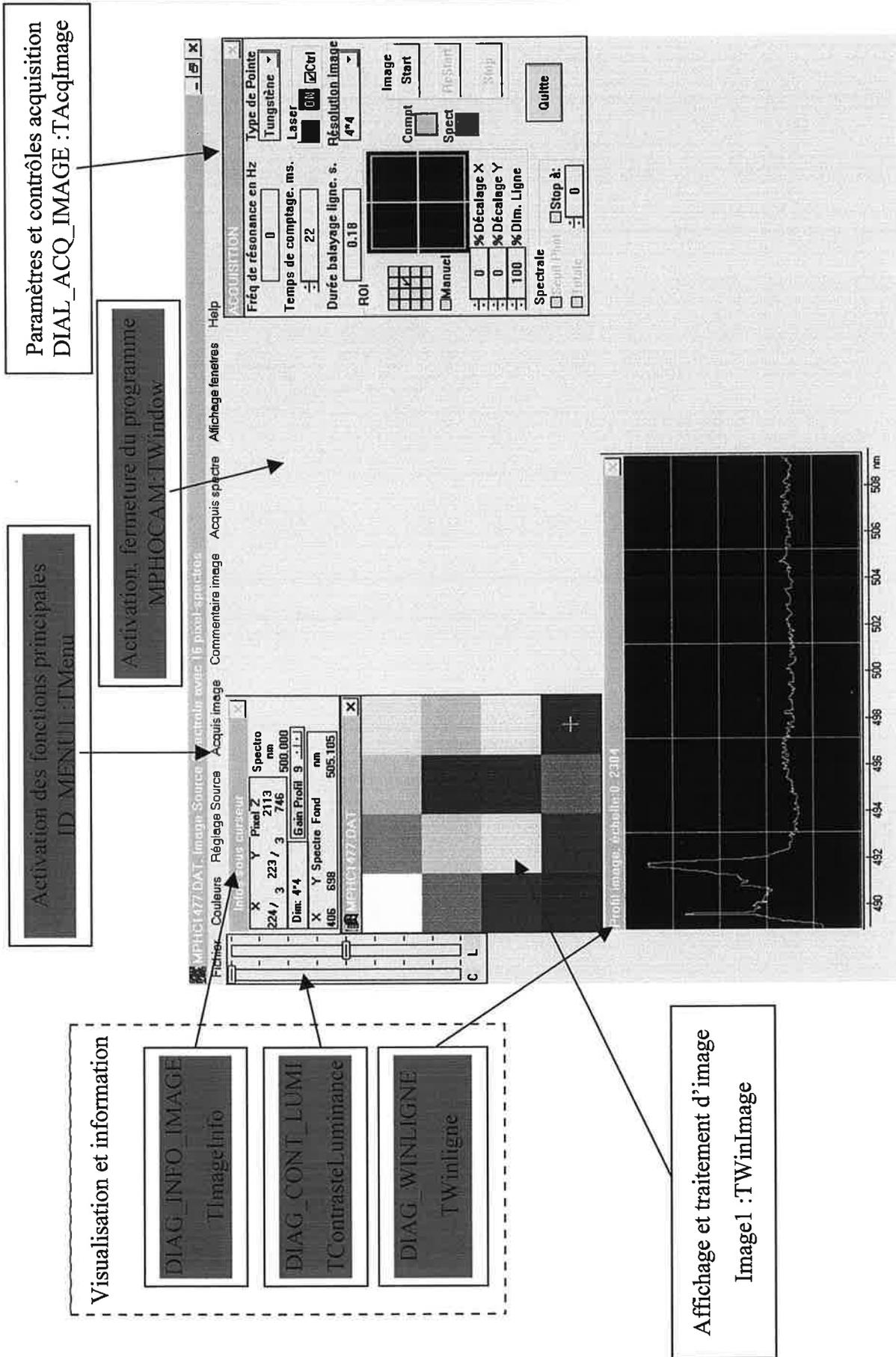


Figure IIIB.2.2 : Objets graphiques principaux de l'interface, identifiés par leur nom et leur classe (ID_MENU1, classe Tmenu,...) indiqués en bleu, ils sont affichés en permanence, DIAL_ACQ_IMAGE n'apparaît qu'avec un objet de type Image1.

L'objet ID_MENU1, menu principal du programme, est affiché en permanence en haut de la fenêtre MPHOCAM. Il appartient à la classe « Tmenu » et est destiné à la présentation et à l'activation des fonctions par l'utilisateur. Il est structuré par domaine d'activité. Tout d'abord les actions de sauvegarde, de chargement et d'impression des données enregistrées sont accessibles par la sélection du groupe de commandes « Fichiers Image ». Ces commandes utilisent les objets graphiques de l'APIWin32, réservés aux manipulations standard des fichiers. Parmi ces commandes, il est d'usage, dans les applications WINDOWS, d'intégrer la fonction de fermeture de l'application (quitter le programme) qui est écrite de manière spécifique pour gérer la fermeture ou destruction des objets graphiques complexes du programme. Avec l'objet ID_MENU1, on peut distinguer les trois objets spécifiques utiles à la visualisation et à la présentation des résultats et informations qui sont : DIAG_CONT_LUMI, DIAG_INFO_IMAGE et DIAG_WINLIGNE.

Découvrons ces objets, avant de détailler les fonctions du menu, spécifiques à la gestion du microscope, qui les utilisent.

L'objet DIAG_CONT_LUMI est de taille fixe par construction. Il appartient à la classe « TcontrastLuminance » et assure le réglage de la luminosité et du contraste de l'image en cours de visualisation. Ce réglage modifie la répartition des valeurs de la palette de 256 couleurs, associée à chaque image présente sur l'écran. Il est représenté par deux curseurs linéaires sur l'écran. Toute action de déplacement de ces curseurs, entraîne un réaffichage immédiat de l'image en cours avec les nouvelles couleurs et, permet ainsi d'obtenir rapidement, un réglage optimal de la luminosité et du contraste de l'image pour une meilleure présentation visuelle adaptée à la dynamique des signaux.

L'objet DIAG_WINLIGNE est d'une taille fixe permettant l'affichage de 512 pixels d'écran. Il appartient à la classe « TwinLigne » et, à la manière d'un écran d'oscilloscope, il présente en deux dimensions, suivant le type spectral ou non de l'image, le graphe du spectre attaché à un pixel de l'image ou celui du profil d'intensité d'une ligne. La sélection du profil à visualiser s'effectue à l'aide de la position du curseur de souris, placé sur le pixel choisi de l'image, elle-même sélectionnée sur l'écran parmi les objets « Image1, 2, ... » présents. Dans le cas du profil d'intensité, la position du pixel de l'image sous curseur est matérialisée sur le profil. Sur un profil spectral, le parcours du curseur sur ce profil provoque l'affichage numérique de ses valeurs dans l'objet DIAG_INFO_IMAGE décrit ci-après.

L'objet `DIAG_INFO_IMAGE`, de la classe « `TimageInfo` » est de taille fixe et présente, en relation avec le point image ou le point spectral situé sous le curseur de souris les informations numériques suivantes : les valeurs de position X, Y et Z d'intensité du pixel sélectionné de l'image, ou les valeurs spectrales qui sont le numéro X du canal spectral, son intensité Y, sa longueur d'onde et la longueur d'onde centrale du domaine correspondant au réglage de l'analyseur spectral. De plus, un réglage d'amplitude, incrémental, permet d'accroître ou de réduire l'amplitude d'affichage vertical du signal à l'intérieur de la fenêtre `DIAG_WINLIGNE`.

L'une des premières fonctions activées par l'utilisateur, lorsque le paramétrage du matériel a été effectué, est la fonction d'acquisition qui appartient au groupe de commandes « `Acquisition Image` ». Ces commandes ont nécessité la construction des objets complexes les plus riches, tant dans la variété des objets graphiques élémentaires que dans les méthodes de traitement afférant à ces commandes. Ce groupe présente trois modes principaux d'acquisition, adaptés respectivement aux catégories des signaux mesurés. Le mode « `image` » est celui de l'enregistrement du signal de fluorescence totale effectué avec la chaîne de comptage et le détecteur de type SPCM.

Le mode « `Image + Intensité laser` » enregistre un signal supplémentaire, l'intensité du faisceau laser excitateur, avec un détecteur optique ponctuel de type photodiode. Dans le mode « `Image + Diffusion` » il s'agit d'associer, à l'enregistrement de l'image, une information supplémentaire sur le temps d'arrivée des photons de fluorescence, utile à l'analyse du temps de diffusion de la molécule dans le volume de la tache du faisceau excitateur. Cette fonction de mesure temporelle, dont j'ai introduit le principe au chapitre IB, n'est pas encore complètement intégrée dans le programme.

L'action de l'une quelconque des fonctions du groupe « `Acquisition Image` » fait apparaître l'objet `DIAG_ACQ_IMAGE` de la classe « `TacImage` ». Cet objet est le plus complexe des objets de l'interface graphique offerts à l'utilisateur. Il gère la saisie et l'affichage des paramètres d'acquisition d'image tels que la dimension et la zone du balayage (ROI), les caractéristiques de la sonde de champ proche, sa nature et sa fréquence de résonance, le temps de comptage et le mode de construction d'image spectral ou non. Ces paramètres, qui caractérisent l'image à acquérir, constituent les différents champs de la structure « `TparamManip` » qui est un élément de la base de données décrite au chapitre IIIB.3.

L'objet graphique secondaire BMP_ROI offre une sélection interactive rapide de la zone de balayage grâce à une méthode de tracé graphique qui sera exposée dans le chapitre IIIB.4. L'objet DIAG_ACQ_IMAGE comporte des objets secondaires visibles sur la figure IIIB.4.1 qui, regroupés par zone graphique, contrôlent les différents modes d'acquisition. Ceux encadrés dans la zone « Spectrale », influent sur le mode d'acquisition des images spectrales.

La boîte d'édition permet de saisir la valeur du seuil d'intensité de fluorescence S choisie pour effectuer les mesures des spectres.

La case à cocher « Totale » active le mode d'acquisition hyperspectrale qui impose l'enregistrement systématique d'un spectre à chaque pixel enregistré et ceci pour tous les pixels de l'image.

La case « Seuil Phot. » sélectionne le mode d'acquisition spatio-spectral où, la comparaison d'un seuil minimum de fluorescence S , avec la valeur de l'intensité de fluorescence du pixel de l'image en cours d'acquisition, conditionne automatiquement l'enregistrement du spectre associé à ce pixel. Dans ce dernier mode, l'acquisition d'image utilise deux détecteurs. Le signal de fluorescence, dirigé sur un détecteur ponctuel de type SPCM pour la mesure de l'intensité du pixel, est commuté vers l'analyseur spectral et le détecteur CCD pour enregistrer le spectre associé.

D'autres objets secondaires, de type « bouton », permettent à l'utilisateur d'agir directement sur le faisceau laser d'excitation, en particulier, pour moduler son intensité dont plusieurs valeurs prédéfinies peuvent être sélectionnées, et pour diriger le signal de fluorescence vers l'analyseur spectral ou la chaîne de comptage de photons SPCM. Egalement, l'objet DIAG_ACQ_IMAGE présente d'autres boutons pour les actions immédiates de démarrage et d'arrêt de la fonction d'acquisition. La modification de la couleur d'affichage et la forme du relief de ces boutons indique, en permanence, les états d'activité des contrôles respectifs.

Tous ces objets secondaires possèdent des méthodes héritées des classes de base, que j'ai adaptées et auxquelles j'ai ajouté d'autres méthodes ou fonctions spécifiques au fonctionnement attendu. En particulier, trois méthodes indépendantes, associées à l'objet DIAG_ACQ_IMAGE assurent l'exécution des principaux contrôles impliqués dans les déplacements au cours de l'acquisition d'une image. Leur organigramme respectif est montré sur la figure IIIB.2.3, *a,b,c*. La gestion des signaux optiques, commutation, acquisition, est automatisée et synchronisée avec les commandes de balayage. Elle est ignorée pour améliorer la clarté du dessin. Les contrôles dédiés à la sélection de la zone de balayage ROI activent

l'enchaînement de la séquence « Initialisations interactives du scanner », notée *a*, sur la figure. Ceux attribués aux actions de démarrage ou d'arrêt de l'acquisition ou « Balayage image » suivent le processus noté *b*. L'exécution des actions du processus « déplacement ligneY-colonneX » noté *c*, dépend de la séquence active des processus *a* et *b*.

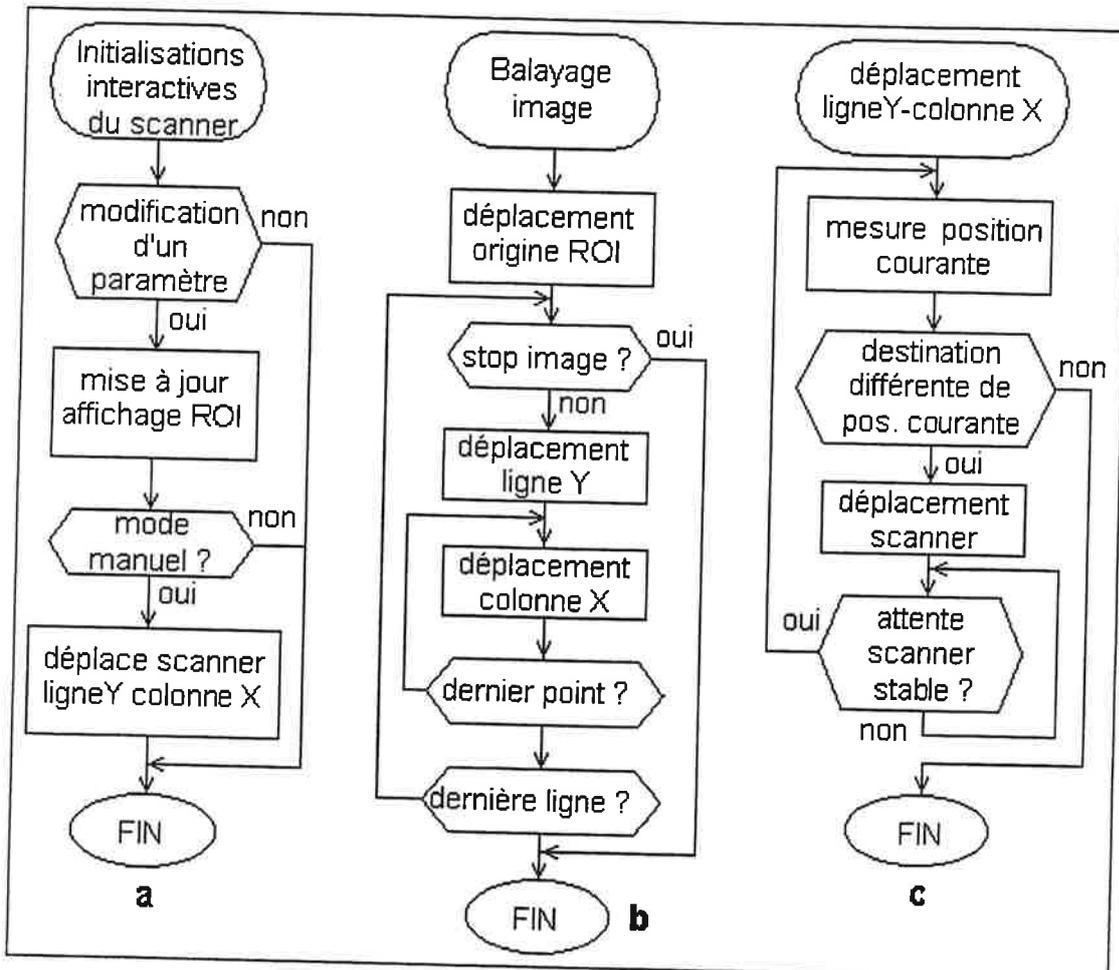


Figure IIIB.2.3 : Trois fonctions activent les déplacements du scanner. Suivant le contexte de fonctionnement du microscope, la séquence d'instructions **a** correspond à l'initialisation des paramètres de la ROI, l'organigramme **b** est exécuté au cours de l'acquisition d'image. Les séquences **a** et **b** appellent la fonction de déplacement de séquence **c**.

Le groupe de commandes « Acquisition Spectre » présente un sous-menu qui regroupe des fonctions réservées à la gestion de l'acquisition d'image spectrales et à certaines opérations de traitement numérique des spectres en temps réel. La commande « Test Caméra » est la plus complexe de ce groupe. Elle concerne plusieurs objets. La saisie des

paramètres de fonctionnement de la caméra CCD, décrits au chapitre IIIA.5, est réalisée d'une part, par l'objet DIAG_SETUP_CAM pour le temps d'exposition et la cadence de lecture, et d'autre part, par l'objet DIAG_BINNING pour définir les dimensions et organiser les zones de mesure utiles, sur le détecteur CCD. La commande « Test Caméra » appelle la fonction de calibration décrite ci-dessous.

La commande « Echelle de Calibration » réalise la calibration de l'échelle attribuée à l'objet DIAG_WINLIGNE, permettant de repérer les longueurs d'onde des profils de spectre qui s'y trouvent affichés. Elle enchaîne l'exécution de deux actions. La première saisit les paramètres, correspondant au réglage de l'analyseur de spectre, à l'aide de l'objet DIAG_CALIB_SPECTRE. La seconde construit et affiche un axe d'abscisse calibré sous l'objet DIAG_WINLIGNE. L'affichage de cette calibration est indépendant. Il apparaît, au gré de l'utilisateur, uniquement lors de la présence, dans l'objet DIAG_WINLIGNE, d'un profil spectral. L'objet qui représente cet axe est DIAG_AXE_HOR. Sa méthode utilise les paramètres de calibration pour calculer et représenter, dans l'unité choisie, les valeurs des différentes graduations de cet axe.

La commande « Soustraction du fond » positionne un état d'activation ou de désactivation permettant à l'opération de réduction du fond spectral de s'effectuer ou non dans les différentes fonctions d'acquisition ou de consultation /analyse des images spectrales. Représentée sous la forme d'une zone cochée ou non, en face de son emplacement dans le menu, son mode d'action, activation / désactivation, fonctionne en bascule.

La commande « Nouveau Fond » charge et remplace en mémoire les valeurs d'un spectre enregistré contenu dans un fichier, et définit ces valeurs comme spectre de fond. Il peut s'agir d'un signal de fond indépendant d'une image spectrale enregistrée ou au contraire, un fond correspondant aux caractéristiques d'enregistrement d'une image spectrale acquise.

Par exemple, le fichier Mphc1477.fsp représente le spectre de fond mesuré avec les caractéristiques d'enregistrement de l'image spectrale Mphc1477 (voir chapitre IIIB.3). Tant que les valeurs de ce spectre de fond restent chargées en mémoire, elles peuvent, en fonction de l'état d'activation du mode « Soustraction du fond », être utilisées a posteriori dans les

fonctions de consultation /analyse, ou en temps réel pendant l'acquisition de l'image spectrale, pour réduire le signal de fond sur chaque enregistrement d'un spectre.

La commande « Compensation des rayons cosmiques » est de même type que la commande précédente. Activée suivant les mêmes principes, elle permet un filtrage numérique des pics étroits existant dans les profils spectraux. En particulier, les collisions des rayons cosmiques avec le détecteur CCD produisent des pics très intenses sans rapport avec le signal de fluorescence mesuré. Son action est fondée sur la détermination de la pente du signal spectral mesurée. J'ai observé, sur le profil spectral, que la largeur typique d'un pic est celle d'un canal spectral correspondant à 1/512 du domaine spectral total, soit 1 point de mesure sur le détecteur CCD. Dans ce cas, la méthode de correction est fondée sur l'observation de la variation de la pente du signal, mesurée sur un intervalle de 3 canaux. Elle est effectuée consécutivement sur tous les points du spectre. Chaque point du spectre étant représenté par une valeur positive, il y a correction si l'accroissement, en valeur absolue, entre les deux premier points $\delta y_{(1,2)}$, de l'intervalle d'analyse, est supérieur à trois fois $\delta y_{(1,3)}$, qui est celui existant entre les 2 points extrêmes de cet intervalle. Lorsque cette condition est satisfaite, la correction entraîne, pour les points consécutifs du spectre $P_{(i+1)}$, $P_{(i+2)}$ et $P_{(i+3)}$, un réajustement de la valeur de $P_{(i+2)}$ telle que :

$$P_{(i+2)} = 1/2 \delta y_{(1,3)} \quad (\text{IIIB.2.1})$$

Ces deux dernières commandes de correction des valeurs spectrales sont exécutables a posteriori sur l'analyse des données enregistrées et également en temps réel, au cours de l'acquisition d'image. Cependant, les données enregistrées dans la base de données conservent la valeur brute de leur mesure. La correction temps réel n'influe que sur la présentation visuelle temps réel de l'image.

La dernière commande du groupe « Acquisition Spectre » est la commande « Affichage Pixel-spectres ». Elle positionne également un état, qui autorise une présentation visuelle de l'image spectrale où, seuls les pixels, qui présentent une intensité de fluorescence supérieure à une valeur de seuil donnée, seront affichés dans une couleur intensifiée, distincte de la palette. Cette opération permet d'apprécier, rapidement sur l'image, les zones spectrales intéressantes.

La commande « Test Source Photons » gérée par la boîte de dialogue DIAG_TEST_PHOTONS contrôle la chaîne de comptage de photons. La fonction effectuée des mesures continues à la cadence de 2 mesures par seconde. Elle offre un temps de comptage ajustable dans cet intervalle et présente, visuellement à l'écran, l'amplitude du signal de fluorescence mesurée ainsi que les valeurs minimales et maximales afin d'optimiser les réglages optiques du microscope.

La commande « Palette de Couleurs » ne possède pas d'objet graphique dédié. Elle appelle les fonctions développées pour charger un fichier contenant les 256 valeurs des couleurs caractérisant la palette choisie pour visualiser les différents niveaux d'intensité des pixels de l'image. Cette opération remplace la palette existante pour l'image sélectionnée. Elle est utilisée pour modifier, de manière caractéristique, la représentation visuelle des images. Une fonction test construit et affiche une image virtuelle montrant la distribution, ordonnés de manière croissante, des 256 niveaux possibles.

La commande « Commentaire Image », construite sur l'objet DIAG_COMMENT de la classe « TeditComment », présente une fenêtre d'édition permettant d'écrire un texte, limitée à 300 caractères, qui est le commentaire de l'image enregistrée. Cette information, est attachée à l'image et archivée avec elle dans la base de donnée.

Le groupe de commandes « Affichage Fenêtres » permet de réorganiser, ordonner la position des fenêtres des objets « Image1, ..., Image10 » et de les effacer pour améliorer la visibilité de l'interface de contrôle du programme.

Le dernier groupe de commandes « Aide en ligne » présente un texte d'aide à l'utilisation des principales commandes comportant des liens interactifs ou liens « hypertextes » avec les figures des objets graphiques de l'interface du logiciel qui représentent les principales fonctions du programme. Quelques renseignements complémentaires sur la création du logiciel, comme le numéro de version, l'auteur et la période du développement, apparaissent à l'activation de la commande « A propos du logiciel ».

Comme je l'ai expliqué dans les chapitres IIIA, le fonctionnement de l'OS, la gestion des messages du GUI, les affichages graphiques, utilisent une part importante du

fonctionnement des ressources de l'ordinateur et ralentissent les fonctions de mesure du logiciel. Bien que cela soit moins critique sur des temps de mesures de longues durées comme les mesures spectrales, il est nécessaire d'optimiser l'emplacement des fonctions de gestion du GUI dans le séquençement des instructions de mesure. Par exemple, utiliser les attentes de stabilisation des systèmes électromécaniques ou l'attente des boucles temporelles de mesures elles-mêmes (plusieurs ms), pour lire les messages de l'OS ou afficher le graphisme.

Cependant, une imbrication trop spécifique des séquences d'exécution de ces fonctions nuit à la facilité d'implantation d'une modification logicielle, donc d'une adaptation rapide aux conditions d'expérience d'un appareil prototype utilisé en laboratoire. Il est souhaitable pour un système programmable de conserver une certaine souplesse de développement. Un logiciel trop optimisé implique, à terme, une réécriture importante du projet.

Pour conserver un compromis entre souplesse d'adaptation et efficacité temporelle, il est bon de minimiser les affichages en cours de mesure, de rendre prioritaire la fonction d'acquisition en inhibant les contrôles des interfaces graphiques utilisateur. Seules la gestion des messages d'erreur et les commandes stop sont prises en compte. En respectant ces principes, la mesure des temps des différentes exécutions nécessaires au balayage d'une ligne image de 64 pixels sur un domaine de 10 microns présente une durée totale de 1,9 s pour un temps de mesure de 25 ms par point.

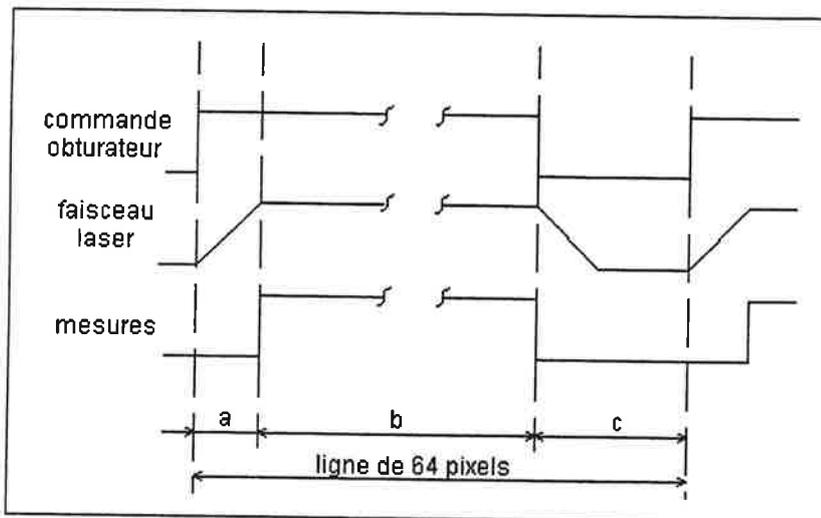


Figure IIIB2.4

Chronogramme de la séquence de mesure d'une ligne image de 64 pixels. a : ouverture faisceau, 30 ms, b : balayage et mesure de 25 ms par pixel, c : obturation faisceau et retour scanner.

La figure IIIB2.4 montre les trois phases *a*, *b*, *c*, de fonctionnement, utiles au balayage. La phase *a* correspond au temps de réponse de l'obturateur de source laser activé, à l'ouverture au début de la ligne, et à la fermeture en fin de ligne. Sa durée ne contribue à la durée totale, qu'au début du balayage pour une valeur de 30 ms. La phase *b* représente

l'action de déplacement du scanner porte échantillon pour balayer 10 microns sur 64 pixels en effectuant, pour chaque pixel, une attente de stabilisation du scanner de l'ordre de 3 ms et un temps de mesure de 25 ms soit un temps total de 1,79 s mesuré pour la phase *b*. La phase *c*, d'une durée de 80 ms, représente la durée du balayage de retour du scanner au premier pixel de la ligne suivante. Le temps de fermeture de l'obturateur, inférieur au temps de retour du scanner, n'intervient pas car il est totalement inclus pendant cette action.

Ces problèmes d'optimisation temporelle des séquences d'exécutions du programme sont minimisés avec la montée en puissance du matériel équipant les machines récentes. Les temps de réponse plus courts de leur OS, qu'ils permettront d'obtenir, pourront satisfaire à une gestion entièrement programmable des synchronisations entre évènements. Une organisation architecturée des différentes données manipulées par le programme, décrite dans le chapitre IIIB.4 suivant améliore cette réponse temporelle. Le fonctionnement de notre système actuel, fondé sur un ordinateur (pentium 90) associé à quelques montages électroniques, pour le domaine temporel de nos mesures est entièrement satisfaisant.

IIIB.3 - Base de données et structure des informations numériques

Les fonctions du programme de gestion du microscope, utiles au paramétrage de ses éléments et à la mesure des signaux, manipulent des données décorréées, relatives à différentes propriétés qu'on appellera de manière générique « contexte », comme le réglage de la caméra CCD et l'acquisition d'une image. Toute l'information acquise dans une expérience ne se résume pas uniquement aux valeurs des pixels d'une image. Celles-ci ne sont significatives que si elles sont associées à d'autres informations issues de différents contextes qui caractérisent la configuration expérimentale.

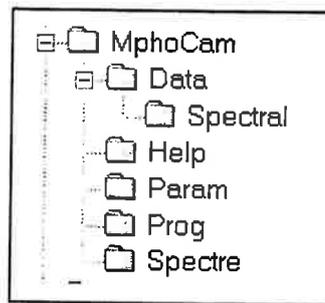
Ces informations sont, suivant leur nature, représentées dans des formats différents. Un archivage ordonné d'un grand nombre d'images, quelques milliers, implique d'organiser la répartition de ces informations de manière structurée, en distinguant chaque contexte, pour permettre un accès efficace à une caractérisation complète d'une image donnée.

Pour représenter chaque contexte, j'ai créé plusieurs structures logicielles spécifiques regroupant chacune les formats, ou types différents, des informations de mesure ou de configuration associées au même élément. Dans ces structures, chaque valeur indépendante, quel que soit son type, au sens du langage de programmation, un nombre entier, une chaîne de caractères, une variable booléenne, etc, est nommée « champ » ; une structure regroupe

plusieurs champs. Le langage C++, employé pour le développement de ce programme, est un outil de choix pour définir et manipuler de telles structures de données.

De très nombreuses structures ont été créées, au sein du logiciel. Dans un souci de clarté, je détaillerai uniquement les structures des éléments d'information suivants : la représentation des caractéristiques de l'image en cours, au sein du programme, et les structures qui supportent les informations archivées sur le disque dur de l'ordinateur pour constituer la base de données du programme. Je montrerai, d'abord, l'organisation arborescente de cette base de données et je décrirai les formats d'enregistrement de ses éléments dans leurs fichiers respectifs. Enfin, je détaillerai un processus d'accès permettant la visualisation interactive des profils de spectre lors de l'observation d'une image spectrale à l'aide du programme.

Figure IIIB.3.1 : Organisation du stockage des données sur le disque dur.



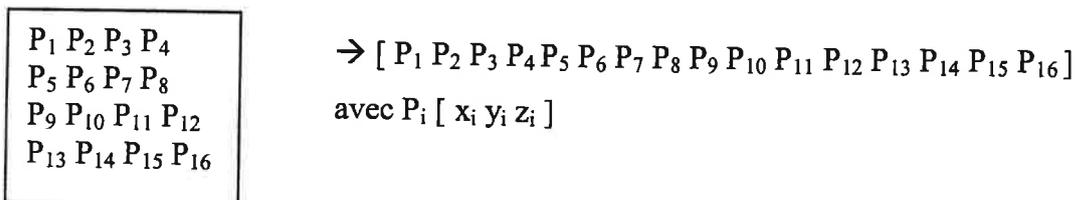
Les fichiers de la base de données, communs au programme d'imagerie, utilisent une suite de caractères ASCII formant un nom générique qui rappelle le nom du fichier contenant le code exécutable du programme « Mphocam.exe ». Ce nom générique, est associé au numéro d'enregistrement des images pour composer les noms des différents fichiers de mesures associés à chaque image. Les trois caractères ASCII formant l'extension des noms de fichier (situés après le point) caractériseront la structure des données qu'ils contiennent. Par exemple, pour l'enregistrement de l'image n° 1477, les fichiers se nommeront respectivement « Mphc1477.dat » pour celui contenant les valeurs de l'image, « Mphc1477.par » pour les paramètres de configuration du microscope, « Mphc1477.spe » pour les valeurs spectrales, Mphc1477.fsp pour les valeurs spectrales d'un signal de fond, « Mphc1477.ban » et « Mphc1477.cam » pour les paramètres de configuration de la mesure spectrale sur la caméra CCD.

Quel que soit le type de détecteur, ponctuel ou multicanal, choisi pour acquérir les images, le format de l'image visualisée sur l'écran reste, au sens numérique, une représentation trois dimensions. Les dimensions caractéristiques d'un pixel de l'image, ses coordonnées x, y et son intensité z ont une amplitude maximale 65535 correspondant à la

dynamique de 16 bits des circuits numériques des interfaces de mesure. Elles sont insérées dans la structure suivante :

```
struct TDATAPixel{
    uint16 x, y, z;
};
```

La structure TDATA**Pixel** comporte trois champs, x, y et z de même format ou même type « uint16 » (nombre entier non signé 16 bits). D'une taille mémoire totale de 6 octets elle représente l'élément unitaire de représentation interne au programme et aussi l'élément unitaire d'enregistrement du fichier de l'image « Mphc1477.dat ». La zone mémoire allouée pour contenir tous les pixels de l'image est un tableau à trois dimensions. Chacun de ses éléments TDATA**Pixel** se trouve placé consécutivement, à partir du 1^{er} pixel P₁ placé en haut et à gauche de l'image. Pour une image de résolution 4 x 4, le contenu de la mémoire représente l'ordre naturel des éléments obtenu par le balayage ligne après ligne de l'image. L'enregistrement du fichier, effectué par la méthode d'enregistrement direct, présente la même organisation, montrée dans la séquence suivante :

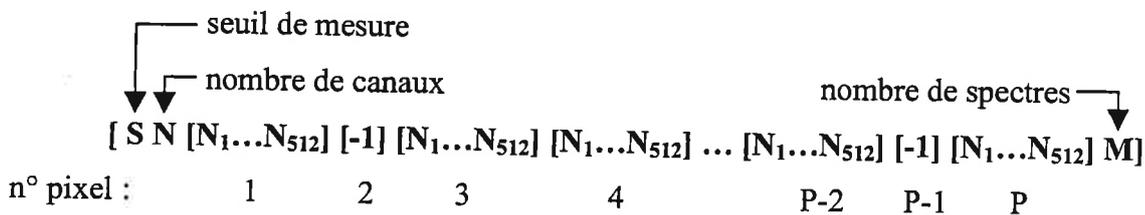


L'enregistrement d'une image multicanale ou spectrale est réalisé sur deux fichiers, les éléments TDATA**Pixel** dans « Mphc1477.dat » et les spectres enregistrés pour chaque pixel dans « Mphc1477.spe ». Ce dernier présente un format d'enregistrement variant suivant deux modes d'acquisition de l'image, le mode spectral total et le mode spectral avec seuil, décrits au chapitre IIIB.2.

Les spectres, constitués des N canaux qui représentent le domaine spectral choisi par l'utilisateur, sont enregistrés consécutivement dans leur fichier, dans l'ordre d'acquisition des pixels. Une acquisition effectuée dans le mode spectral total comportera un nombre M de spectres égal au nombre total P des pixels de l'image, construisant ainsi une image hyperspectrale. Dans le mode avec seuil, seuls les pixels satisfaisant à un taux d'émission de fluorescence égal ou supérieur au seuil, seront considérés pour enregistrer les N canaux du spectre correspondant. Pour les autres pixels, une valeur égale à -1 sera enregistrée dans le fichier, à la place des N valeurs d'un spectre invalide. Dans ce cas, le nombre de spectres $M \leq P$, et il s'agit d'une image spectrale.

Le début du fichier reçoit, dans un entête de 10 octets, les deux premières valeurs S pour la valeur du seuil, et N pour le nombre de canaux spectraux, puis les spectres dans l'ordre d'acquisition et la dernière valeur M pour le nombre de spectres. Le canal spectral est représenté par une valeur V telle que $0 < V \leq 65535$ codée sur un entier non signé 16 bits soit un format de deux octets.

Dans une acquisition sur P pixels en mode d'enregistrement avec seuil, et sur un domaine spectral total de 512 canaux, le fichier «Mphc1477.spe» a un format du type suivant :



dans cet exemple $M < P$

En particulier les pixels n° 2 et n° P-1, présentent une amplitude du signal de fluorescence inférieure au seuil S donné, car aucun spectre enregistré ne leur correspond.

La taille maximale d'un tel fichier spectre, pour une image spectrale totale de 256×256 enregistrée avec 512 canaux spectraux par pixel, est de l'ordre à 68 Mégaoctets.

Pour l'enregistrement des paramètres expérimentaux trois fichiers sont créés à chaque expérience. Le contexte de la caméra est enregistré dans «Mphc1477.ban» et «Mphc1477.cam» qui contiennent les structures d'information PARAM_BANDE_STRUC et PARAM_CAM_STRUC que j'ai détaillées, au chapitre IIIA-1.4, dans la description de l'interface de contrôle de la caméra. Le contexte d'acquisition de l'image comprend plusieurs informations et en particulier celles qui définissent la position et les dimensions de la zone de balayage ou ROI choisie sur l'échantillon. Le fichier «Mphc1477.par» enregistre ces informations supportées par la structure TparamManip qui présente les champs suivants :

```

struct TParamManip {
    char str_date[9],     // date d'enregistrement
    str_NumManip[5],    // numéro de l'expérience
    str_Freq_Reson[10], // Fréquence de résonance de la pointe en Hz
    str_Type_Pointe[10], // Tungstène, Verre, ...

```

```

str_Resol_Image[10], // taille image 64*64, 128*128, 256*256
str_Temps_Comptage[6], // temps de comptage en ms = temps d'acquisition pour un
pixel
str_Temps_Ligne[10], // durée de balayage d'une ligne en seconde
str_BalDimensionX[4], // dimension X de l'image
str_BalDimensionY[4], // dimension Y de l'image
str_MinXanalog[6], // position scanner au début du balayage X
str_MaxXanalog[6], // position scanner à la fin du balayage X
str_MinYanalog[6], // position scanner au début du balayage Y
str_MaxYanalog[6], // position scanner à la fin du balayage Y
str_Decale_X[4], // % de décalage de balayage X de la ROI
str_Decale_Y[4], // % de décalage de balayage Y de la ROI
str_Dim_Ligne[4], // valeur, en % de la largeur du carré de balayage X,Y
str_Zone_interet[3], // n° 1 à 16 du carré sélectionné dans la mosaïque ROI
str_Seuil_Z[5]; // Seuil du pixel en % du maximum (enregistrement spectral)
};

```

D'une taille de 112 octets elle est constituée de chaînes de caractères qui permettent l'utilisation des fonctions de lecture et de recherche à l'aide d'un outil d'édition standard.

Développée pour représenter numériquement une image au sein du programme, la structure « Tstate » définit les champs des variables qui regroupent les caractéristiques, d'une image donnée. Elle contient les paramètres nécessaires à sa représentation visuelle au moment de la création de l'objet graphique qu'elle représente au sein du GUI. Elle conserve les adresses d'accès aux variables de type « TDATAPixel » et les valeurs d'états correspondant à différents modes d'acquisition, de construction, de traitement et d'affichage.

```

struct TState {
TDC* DC; // pointeur sur le contexte graphiques alloué par le GUI pour l'image
TPalette* Palette; // palette de couleur définie pour l'image
int contraste; // sélection du contraste de l'image affichée
int luminance; // sélection du niveau de luminosité de l'image affichée
int GainPhot; // non utilisé
void huge* lpDATA; // pointeur sur la mémoire réservée pour les pixels de l'image
HGLOBAL DATAhglb; // module de réservation mémoire pour les pixels de l'image

```

```

TDib* Dib; // type d'objet graphique représentant l'image
TBitmap* Bitmap; // autre type d'objet graphique représentant l'image
int FgColor; // non utilisé
int BgColor; // non utilisé
string Name; // titre de la fenêtre graphique de l'image
string Title; // nom générique de l'expérience (Mphc1477)
bool Image_ToBeSaved; // image acquise non archivée
bool ACQUIS_IMAGE_EN_COURS; // acquisition image en cours
bool STOP_IMAGE; // acquisition stoppée
bool SPECTRE_FOND_RETIRE;//affichage des spectres avec soustraction d'un fond
bool IMAGE_I_LASER;// valeurs d'intensité laser incluses dans les paramètres de
l'image
bool SPECTRE_PROFIL; // affiche le profil du spectre du pixel sous curseur
bool SPECTRE_FOND_EXIST; // existence d'un fond-spectre pour l'image en cours
bool SPECTRE_EXIST; // existence d'un spectre pour l'image en cours
bool IMAGE_NORMALISEE; //mode d'affichage de l'image normalisée
bool PIXEL_ET_SPECTRE_IMAGE; // affiche les pixel-spectres en surbrillance
bool IMAGE_SPECTRALE; // image enregistrée à partir des spectres
bool MADE_IMAGE_SPECTRALE; // image construite avec un intervalle spectral
choisi parmi une image spectrale mère.
bool COSMIC_COMPENSATION; //affichage spectres avec compensation des
rayons cosmiques
};

```

Parmi les outils d'analyse développés au sein du programme, le traitement des profils spectraux, associés à l'acquisition d'une image spectrale, utilise un accès direct et permanent à la base de données et particulièrement au fichier « Mphc1477.spe ». J'ai choisi cette méthode d'accès pour deux raisons.

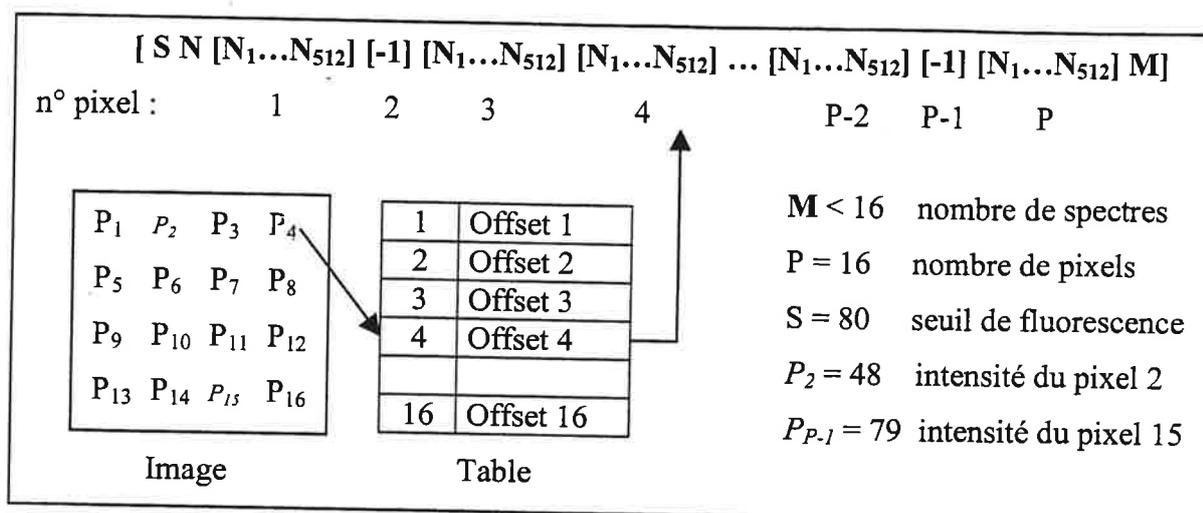
La première est la rapidité d'accès qui permet de reconstruire des images Raman filles, à partir d'images Raman hyperspectrales. Ces images filles sont distinguées dans la structure de l'objet image, par la variable booléenne `MADE_IMAGE_SPECTRALE` à `VRAI`. L'image fille est construite à partir des paramètres de l'image spectrale mère en sélectionnant un domaine spectral réduit, caractéristique, par exemple, d'une espèce chimique dont on cherche à déterminer la localisation sur l'image.

Pour obtenir de telles images, une fonction spécifique du programme a été développée. Elle offre à l'utilisateur, la possibilité de mettre en évidence la zone caractéristique du signal, bornée dans le domaine spectral choisi. Elle prélève les valeurs des canaux spectraux correspondants, dans chacun des spectres de l'image mère, pour construire les valeurs des pixels de l'image fille.

Le second critère de choix de cette méthode d'accès s'apprécie par un faible taux d'occupation de la capacité mémoire RAM disponible de l'ordinateur. Cet avantage est significatif lorsqu'on utilise les fonctions de traitement spectral sur plusieurs images affichées simultanément sur l'écran.

Cette méthode est illustrée ci-dessous par la description du mécanisme d'accès d'une fonction d'analyse spectrale qui permet de visualiser le profil spectral enregistré, correspondant au numéro du pixel sélectionné par la position du curseur de la souris sur l'image. D'après le format d'enregistrement que j'ai décrit plus haut, la position du profil spectral dans le fichier est corrélée au numéro de pixel. Pour accéder, dans le fichier, au premier point de ce profil afin d'effectuer la lecture des N canaux de manière sûre et rapide, quelle que soit l'image sélectionnée sur l'écran, j'utilise une table d'indexation construite spécifiquement en mémoire d'après les caractéristiques d'acquisition de chaque image.

Cette table contient, pour chaque pixel d'une image, les valeurs calculées des déplacements du pointeur de la fonction lecture de données (offset), pour atteindre, dans le fichier « Mphc1477.spe », le spectre enregistré ou le spectre nul, associé au pixel. Le mécanisme d'accès correspondant à l'exemple de l'expérience Mphc1477 est montré sur la figure suivante.



Les valeurs d'offset sont toutes exprimées en nombre d'octets, à partir du début du fichier. Elles sont déterminées à l'aide du format de chaque élément enregistré dans le fichier. Offset1, qui est constant et pointe sur le premier canal du premier spectre, correspond à la taille des variables S et N de l'entête du fichier. Le calcul des offsets successifs est obtenu en comparant les valeurs de chaque pixel de l'image **DATAPixel.z**, chargées en mémoire, à la valeur du seuil d'enregistrement spectral (**Seuil_Z**) déterminée à l'acquisition. La construction de la table d'offsets est effectuée suivant l'algorithme suivant :

Offset [0] = taille(S) + taille(N) ;

Offset-courant = Offset [0] ;

Pour chaque pixel P, à partir du second pixel, faire

{

si (DATAPixel[P - 1].z ≤ Seuil_Z) alors Offset-courant = Offset-courant + 2 ;

sinon Offset-courant = Offset-courant + taille(spectre) ;

Offset [P] = Offset-courant ;

si il ne reste plus de spectre à positionner alors stop ;

sinon continuer ;

}

Cette méthode offre une lecture des données spectrales sur fichier sans erreur d'identification des spectres nuls (-1). En effet une telle erreur peut résulter de l'ambiguïté entre la représentation du format binaire standard 16 bits du nombre entier signé -1 et celle de la valeur spectrale maximum de 65535 qui, en code de complément à 2, sont identiques. Bien

que cette coïncidence soit peu probable, l'indétermination d'une valeur spectrale maximale est supprimée par la fonction lecture qui exploite la validité de la relation existant entre la valeur de l'intensité du pixel, toujours positive et codée au format entier 16 bits non signé, et la valeur positive de **Seuil_Z**.

Cette méthode présente plusieurs avantages. A partir d'une simple analyse de l'ensemble des pixels de l'image, elle construit en mémoire une table de corrélation existant entre la position du spectre enregistré dans le fichier et le pixel correspondant. Elle permet d'accéder rapidement, d'une manière indexée semblable à l'accès des valeurs d'un tableau unidimensionnel stocké en mémoire, aux structures multidimensionnelles enregistrées sur disque dur, dans des fichiers de grande taille. La taille mémoire de cette table est jusqu'à M fois plus faible que la taille du fichier spectral, dans le cas d'une image spectrale totale. Ceci permet une analyse spectrale comparative et interactive de plusieurs images présentes simultanément sur l'écran de l'ordinateur.

IIIB.4 - Description de l'interface utilisateur

J'ai montré, dans le chapitre IIIB.2, que les fonctions qui contrôlent différents appareils ou traitent différentes informations, sont regroupées ou combinées pour correspondre à des contextes de travail distincts comme le paramétrage de l'acquisition d'une image, les réglages de visualisation de l'image ou le paramétrage du détecteur multicanal. Pour faciliter le niveau de décision de l'utilisateur, sur les actions qui correspondent à la gestion de ces contextes, il est indispensable que ces contextes apparaissent, clairement et de façon différenciée, à l'écran de l'ordinateur. Leur présentation graphique doit être organisée et offrir une interaction étroite, grâce à la visualisation instantanée d'une réponse à ces actions ou d'un résultat modifié. Pour optimiser l'utilisation du logiciel, j'ai respecté plusieurs critères de conception classiques dans les logiciels commerciaux et familiers à l'utilisateur qui sont énoncés ci-après :

- La répartition sur l'écran des zones fonctionnelles attribuées à chaque contexte est définie par défaut pour appréhender le plus rapidement possible les différentes informations et les commandes afférant aux actions offertes à l'utilisateur. Cette répartition par défaut peut être ultérieurement modifiée au gré de l'utilisateur.

- La présentation des résultats de mesures correspond à un type d'affichage habituel aux appareils de mesure commerciaux. L'affichage, par exemple, d'un écran d'oscilloscope avec sa mire, permet de voir les profils des spectres enregistrés ou d'une ligne d'image numérique pour observer des valeurs précises.

- La création d'un panneau de contrôle, comportant les boutons actifs, les voyants, les options à cocher ou les curseurs linéaires, permet de gérer aisément les actions qui seront prises en compte par le logiciel. Associer, à une action sollicitant un tel contrôle, une modification de l'aspect visuel du contrôle, apporte immédiatement à l'utilisateur l'assurance du bon fonctionnement du programme, même si le résultat effectif de l'action finale est différé.

- Un affichage permanent du menu qui englobe les fonctions principales du programme facilite l'utilisation du logiciel. Regroupées par thèmes ces fonctions donnent accès à des menus « déroulants » faisant apparaître les fonctions secondaires.

- L'accès aux fonctions propres à un contexte de travail présent dans sa zone écran est obtenu en plaçant le curseur de la souris dans la zone graphique réservée à ce contexte. Un menu surgit ou un contrôle s'active sous l'action d'un click.

- La configuration du contexte de travail détermine la possibilité d'activer ou de visualiser des fonctions compatibles avec cette configuration. De manière complémentaire d'autres fonctions incompatibles seront inhibées ou masquées. Par exemple, seule la prise en compte d'un détecteur CCD autorise l'accès aux fonctions de paramétrage et d'acquisition spectrales. De même, seule la prise en compte du caractère multidimensionnel de l'image, permet d'activer les fonctions de recherche et de visualisation des spectres.

Dans ce chapitre, à partir d'objets complexe développés spécifiquement et dont le graphisme est représenté, je détaillerai des exemples de fonctions pratiques réalisées par l'interface utilisateur telles que :

- a)- Tracer et déplacer un cadre matérialisant une zone dimensionnée. C'est une fonction indispensable au suivi du repositionnement d'un objet.
- b)- Déterminer une zone de balayage (ROI) sur la surface l'échantillon. C'est un outil qui conditionne la résolution spatiale choisie pour une expérience donnée.
- c)- Afficher les valeurs propres aux pixels de l'image.

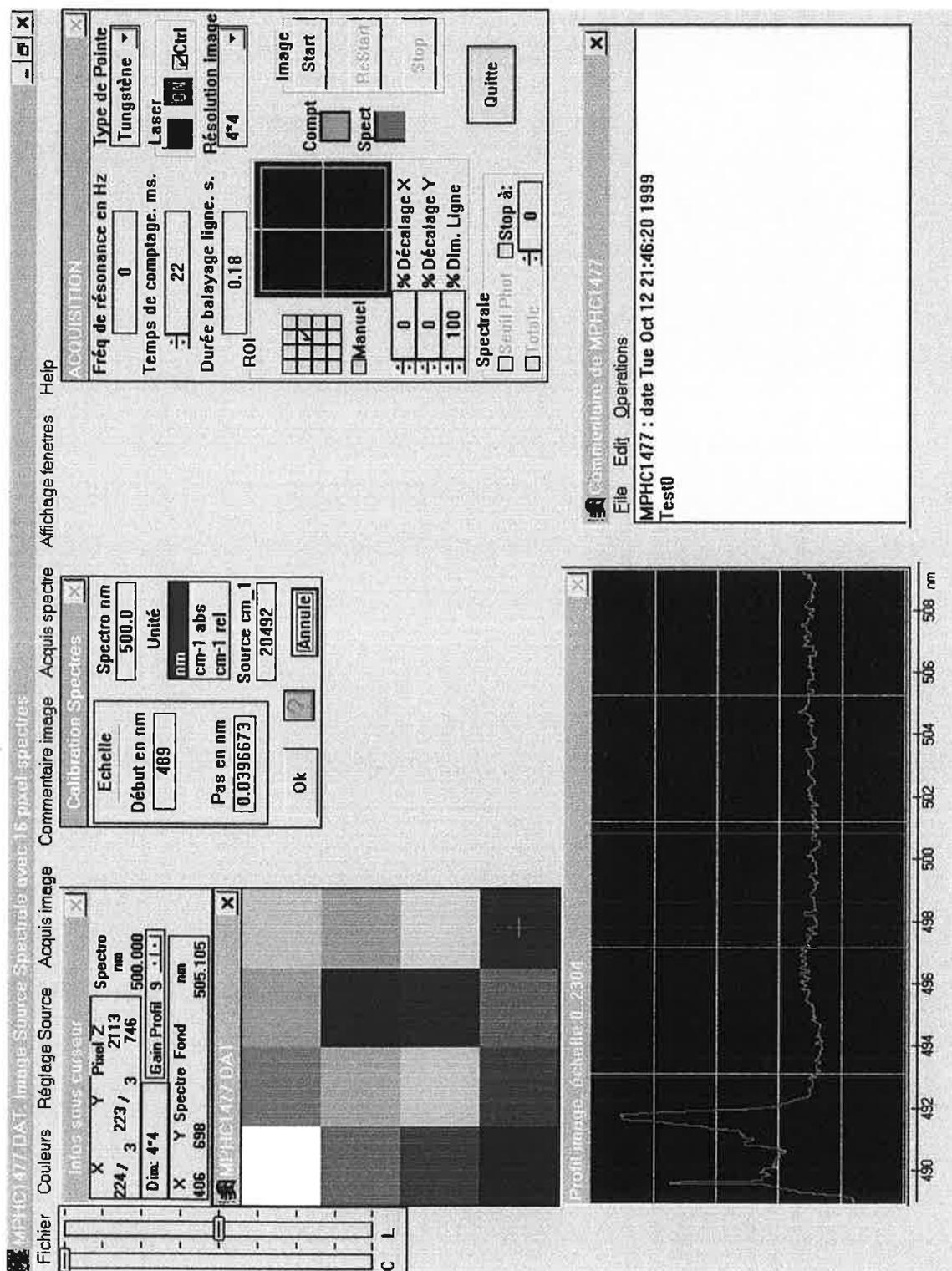


Figure IIIB.4.1 : Interface utilisateur du programme

- d)- Afficher le profil et les valeurs d'un spectre correspondant à un pixel d'une image hyperspectrale.
- e)- Construire un signal de fond adapté à l'analyse d'une famille de profils spectraux.

J'illustrerai la description de ces fonctions en sélectionnant dans l'interface graphique totale montrée sur la figure IIIB.4.1, la zone graphique active concernée. Je nommerai « fenêtres » les différentes zones graphiques que je vais décrire. Elles sont identifiables par les mots (la chaîne de caractères) qui apparaissent en entête, dans la barre de titre, et je les repèrerai par cet entête. Les fonctions de tracés graphiques utilisées, comme un point, une ligne, un rectangle, etc, appartiennent aux fonctions du GDI (graphic device interface) qui est le domaine graphique spécifique géré par L'API Win32. L'organisation des objets complexes de cette l'interface utilisateur, cités dans ce chapitre par le nom de leur classe, est décrite au chapitre IIIB.2, et représentée par la figure IIIB2.1.

a) *Tracer et déplacer un cadre de manière interactive:*

Dessiner un cadre unique de géométrie carrée à l'aide de la fonction « rectangle » est la seule fonction graphique qu'il est nécessaire d'actionner pour réaliser les fonctions pratiques de sélection de la ROI, lorsque l'on dessine sur un fond noir comme le montre la figure du paragraphe suivant. En effet, à partir des coordonnées données de deux sommets opposés d'un carré, la fonction « Rectangle » trace un cadre avec un trait de couleur définie, verte dans notre application. Cependant l'utilisation d'un mode graphique particulier permet de réaliser une opération booléenne de type XOR, entre la couleur du fond et la couleur du trait. Le résultat de cette opération détermine la couleur d'affichage de ce trait. Pour une couleur de fond noire, qui représentant le terme nul de l'opération booléenne, la couleur du cadre sur le fond noir est verte, et le cadre visible. Si par contre, on redessine ce cadre vert sur lui-même, le résultat de l'opération (vert XOR vert) est nul et la couleur verte du trait affiché devient noire. Le cadre paraît donc effacé.

A partir de cette fonction élémentaire, le déplacement d'un cadre se limite à l'action de redessiner, avec la même couleur, le cadre à la position courante, suivie de celle qui dessine le cadre à la nouvelle position. La vitesse d'exécution du système informatique permet d'enchaîner rapidement ces fonctions de dessin pour présenter un déplacement continu du cadre à l'intérieur de la zone de fond noir.

Avec une telle méthode de tracé, le déplacement visuel rapide d'un cadre peut être réalisé à condition d'exécuter un cycle rapide de tracés successifs pour toutes nouvelles coordonnées. Pour cela, j'ai exploité la capacité de déplacement rapide du curseur de souris. La « méthode » standard de l'objet « souris » du GUI, transmet les valeurs de ses nouvelles coordonnées au programme, à chaque modification de la position du curseur sur l'écran. L'adaptation logicielle de cette méthode, par l'insertion des appels à la fonction rectangle, permet de modifier les coordonnées du cadre en fonction de celles du curseur souris. Avec cette nouvelle méthode, le déplacement de la souris impose le déplacement du cadre. Cependant, la souris étant déplacée par l'utilisateur pour bien d'autres actions que le déplacement de ce cadre, cette fonction ne doit être active que lorsque qu'elle est sollicitée par l'utilisateur. Le déplacement du curseur sur l'objet graphique représenté par le fond noir ou les autres objets de l'interface, doit pouvoir être effectué sans perturber la position du cadre.

En fait, il s'agit de donner accès de manière conditionnelle à cette fonction de déplacement du cadre. Ceci est réalisé à l'aide du bouton gauche de la souris. Deux autres méthodes standard, associées à l'objet bouton gauche, sont utilisées. La première détecte la position enfoncée du bouton. Elle permet d'accéder à la fonction de déplacement du cadre à deux conditions : premièrement, la position du curseur doit être située à l'intérieur du cadre existant avant déplacement et deuxièmement, le bouton gauche doit être maintenu enfoncé pendant le déplacement. La seconde méthode, associée à l'objet bouton, détecte la position relâchée du bouton. Elle a pour conséquence d'interdire l'accès à la fonction de déplacement du cadre.

En résumé, tant que le bouton gauche de la souris est enfoncé et que son curseur est à l'intérieur du cadre, tout déplacement du curseur entraîne un déplacement du cadre. Le curseur semble être un point fixé à l'intérieur du cadre pour l'entraîner dans ses déplacements, qui sont limités aux coordonnées graphiques du fond noir représentant l'aire totale de la ROI.

b) Détermination d'une zone de balayage (ROI)

Comme je l'ai expliqué, dans le chapitre IIIA.3, la sélection de la zone d'intérêt (ROI) de l'échantillon qui détermine l'origine et les dimensions du balayage effectué par le scanner, est matérialisée par deux objets graphiques actifs, visibles sur la figure IIIB.4.2. Le premier, sous l'aspect d'une mosaïque de petits carrés à cocher, reproduit les 16 zones de balayage, qui représentent ensemble, l'aire totale de l'échantillon, accessible au scanner.

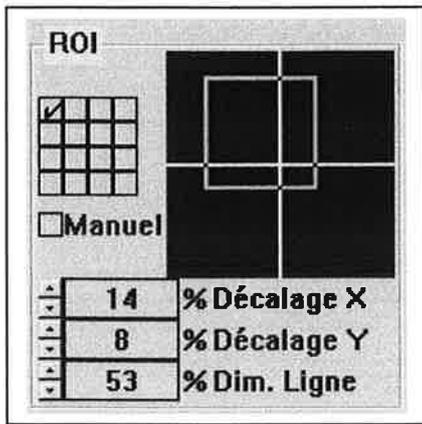


Figure IIIB.4.2 :

Objets graphiques utiles au paramétrage des dimensions de la zone de balayage (ROI) sur l'échantillon. L'objet BMP_ROI (carré noir) gère les tracés des cadres de sélection.

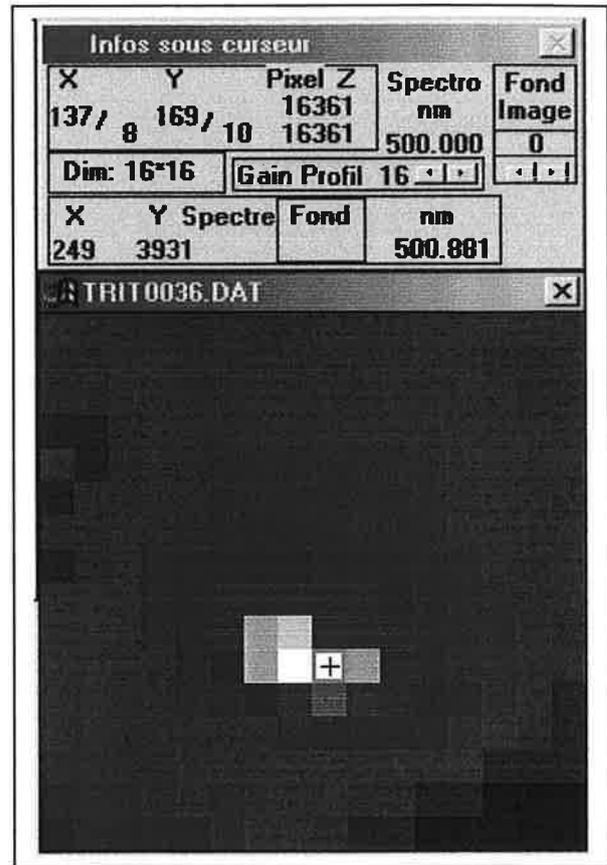


Figure IIIB.4.3 : L'objet « TRIT0036.DAT » de la classe « Image1 » affiche l'image et gère les fonctions de traitement et d'analyse. L'objet, « Infos sous curseur » affiche les caractéristiques de l'image. Le pixel (8,16) est sélectionné.

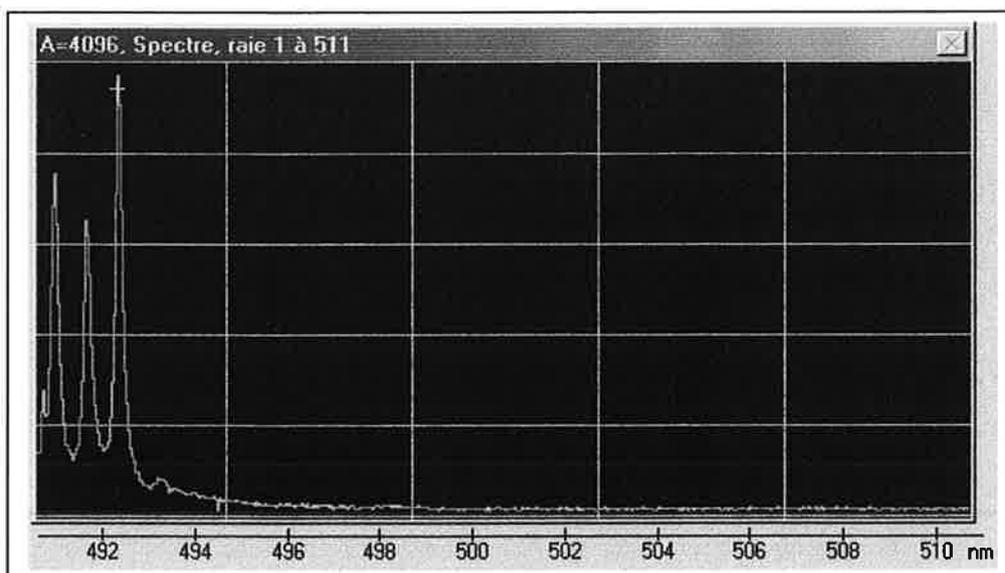


Figure IIIB.4.4 : L'objet « A=4096, Spectre ... », de la classe TwinLigne, permet de visualiser un profil représenté par une ligne de pixels ou, dans cet exemple, le spectre du pixel (8,16).

Le deuxième objet défini sous le nom BMP_ROI, dans la liste des ressources du programme (§ IIIB.2), correspond à une visualisation agrandie de la zone cochée choisie, qui est représentée graphiquement par un carré au fond noir. Ce dernier matérialise la surface maximale que le scanner peut balayer continûment avec précision, au cours d'une acquisition. Le cadre vert matérialise la zone de balayage effectif correspondant au paramétrage donné pour cette acquisition.

Après avoir coché la zone de balayage choisie, plusieurs fonctions pratiques sont offertes à l'utilisateur pour agir directement sur la position et la dimension de ce cadre. Les plus intuitives correspondent à la modification des valeurs affichées dans les boîtes d'édition, par saisie au clavier ou action du click de la souris sur les flèches des zones graphiques ou boîtes d'édition « Décalage X, Décalage Y et Dim. Ligne ». Chaque modification entraîne immédiatement le remplacement du cadre actuel par un nouveau cadre, aux dimensions choisies.

Les autres fonctions pratiques associées à la sélection de la ROI, utilisent les fonctions de gestion de la souris. A partir de la fonction élémentaire de dessin et de déplacement d'un cadre de dimensions données, décrite dans le paragraphe *a*, j'ai créé une fonction pratique, pour tracer un cadre de dimensions variables à l'intérieur du carré noir.

Cette fonction correspond à la sélection interactive des dimensions de la ROI par la méthode graphique suivante. L'utilisateur détermine la position du premier sommet du cadre à l'aide d'un premier click sur le bouton gauche de la souris. En maintenant le bouton enfoncé, il déplace le curseur de souris dont les nouvelles coordonnées définissent celles du sommet opposé du nouveau cadre. Celui-ci est ainsi successivement redessiné à chaque nouvelle position du curseur, en utilisant la fonction de déplacement du cadre. La taille et la position finales du cadre sont obtenues dès le relâchement du bouton gauche de la souris, qui stoppe l'accès à la fonction de déplacement du cadre.

La dernière de ces fonctions utilise la méthode associée à l'objet bouton droit de la souris. Elle sélectionne une action d'affichage du cadre parmi trois possibilités. Ces trois modes sont déterminés successivement à chaque click sur le bouton droit, pour obtenir, de manière tournante, les affichages suivants:

- au premier click, un cadre de taille maximale, correspondant à la ROI totale pouvant être balayée continûment.
- au second, l'effacement du cadre, permettant un nouveau tracé interactif à l'aide de la souris.

- au troisième, le retour au cadre précédemment défini, en cas d'annulation du nouveau tracé.

Le click suivant correspondra à la phase d'action du premier click.

Ces fonctions graphiques, que j'ai élaborées pour obtenir un contrôle pratique et interactif de la sélection de la ROI, mettent à jour, simultanément au tracé du cadre, l'affichage numérique des valeurs dans les boîtes d'édition « Décalage X, Décalage Y et Dim. Ligne ». Réciproquement, toute modification des valeurs dans ces boîtes d'édition entraîne immédiatement le tracé du nouveau cadre correspondant.

c)- Afficher les valeurs propres aux pixels de l'image.

Sur la figure IIIB.4.3, deux objets graphiques de l'interface utilisateur, sont superposés. Le premier, « TRIT0036.DAT » de la classe « Image1 » est une image de type hyperspectrale qui est identifiée par le nom du fichier de mesures de l'image « Trit0036.dat » archivé dans la base de données. Ce fichier est relu en mémoire, pour effectuer l'affichage de l'image. Le second objet, « Infos sous curseur » regroupe les informations sur les dimensions et les signaux ayant servi à construire l'image. En particulier, les caractéristiques du pixel repéré par la position du curseur de souris représenté par une croix (+), sont affichées de manière interactive. L'interactivité est obtenue par l'adaptation de la fonction de gestion du GUI traitant les déplacements de la souris dans l'objet « TRIT0036.DAT ». En effet, à partir des coordonnées du curseur placé à l'intérieur de cet objet, la fonction déplacement calcule les coordonnées effectives du pixel image correspondant, accède à sa valeur en mémoire et affiche ces valeurs, caractéristiques du pixel, dans les boîtes d'éditations correspondantes de l'objet « Infos sous curseur ».

Dans l'exemple choisi, le curseur de la souris est placé sur le pixel de coordonnées X,Y (8,10) de l'image de dimension (16 × 16). Dans les dimensions de la représentation graphique sur l'écran (256 × 256), il s'agit du pixel écran (137,169). L'origine (0,0), commune à ces deux représentations, est située au premier pixel de l'image, en haut à gauche. L'intensité du pixel image pointé par le curseur, Z = 16361 est affichée ainsi que la valeur (identique ici) du pixel le plus intense de cette image.

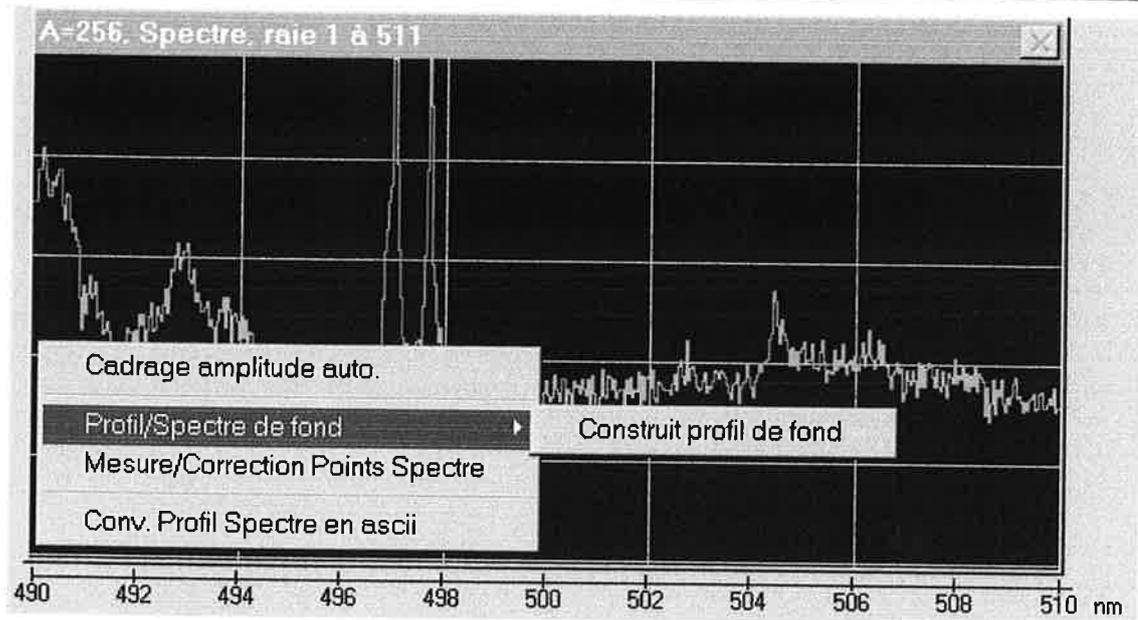


Figure IIIB.4.5 : Accessible, parmi d'autres fonctions de traitement, proposées dans un pop-menu activé par un click du bouton droit de la souris, la fonction « Construit profil de fond » est une méthode de l'objet « A=256, Spectre ... » appartenant à la classe d'objet TWINLIGN.

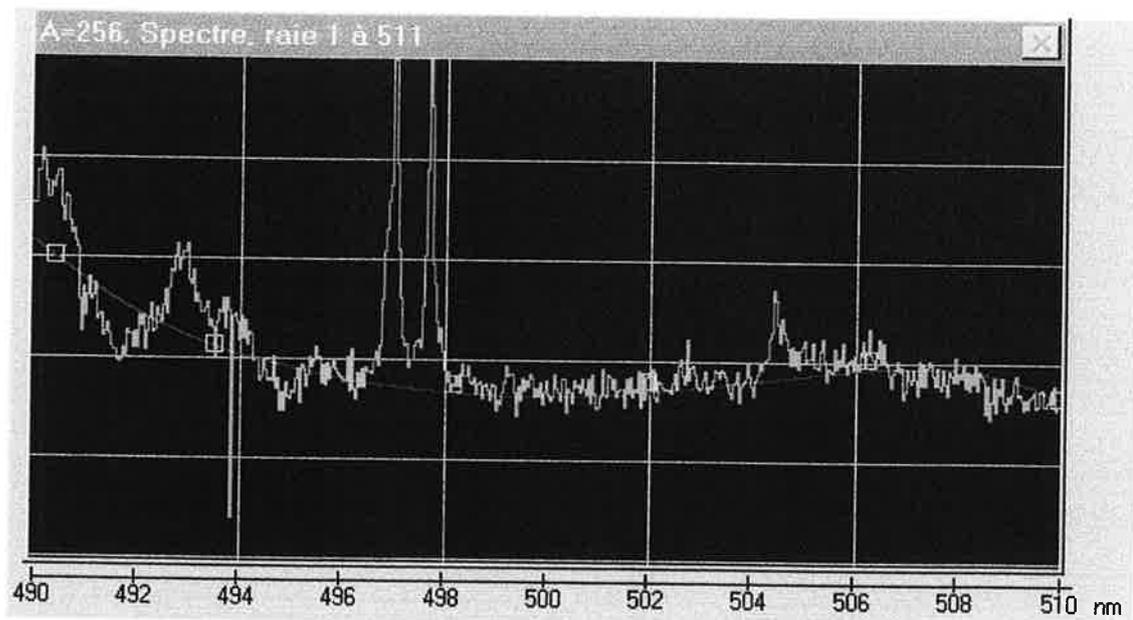


Figure IIIB.4.6 : Le profil de fond (rouge), interpolé numériquement, comporte 6 points « actifs » matérialisés chacun par le centre d'un cadre (jaune). Ces cadres, déplaçables avec la souris, déterminent les valeurs des points utiles au calcul de la fonction d'interpolation spline.

d)- *Afficher le profil et les valeurs d'un spectre correspondant à un pixel d'une image hyperspectrale.*

Un autre objet de l'interface, représenté sur la figure IIIB.4.4 par l'objet « A=4096, Spectre ... », de la classe TwinLigne, permet de visualiser un profil à la manière d'un « écran d'oscilloscope ». Pour cette image « TRIT0036.DAT », la sélection par l'utilisateur, du mode de visualisation spectral, active l'affichage du spectre correspondant au pixel (8,10) repéré par le curseur sur l'image. Le positionnement du curseur de la souris (+) sur le profil spectral et en particulier sur le sommet de la raie intense montrée sur cette figure, provoque l'affichage, dans l'objet « Infos sous curseur », de la position du canal spectral $X = 249$ et de son intensité $Y = 3931$. D'autres paramètres apparaissent dans cet objet comme, le « Gain profil » égal à 16 qui correspond à une renormalisation de l'amplitude des profils de spectre pour ajuster le graphe à la dimension des 256 pixels écran de la fenêtre d'affichage. Un click sur l'un des deux objets de contrôle de type flèche associés à la boîte d'édition « Gain profil », augmente ou diminue la valeur du facteur de renormalisation et réaffiche immédiatement le profil en indiquant, dans la barre de titre de cette fenêtre la dynamique maximale du signal correspondant à la hauteur totale de la fenêtre, ici, $A = 4096$ soit 16×256 .

e)- *Construire un signal de fond adapté à l'analyse d'une famille de profils spectraux.*

La fonction de tracé et de déplacement d'un cadre, décrite dans le paragraphe a, est également utilisée pour repérer une zone restreinte particulière sur un profil deux dimensions d'une ligne image, d'un spectre, ou d'une courbe de fond spectral. En particulier elle constitue la fonction interactive visuelle par excellence, qui permet de construire numériquement, à partir d'un enregistrement spectral effectué, un signal de fond utilisé dans les analyses des données spectrales.

Comme on le voit sur la figure IIIB.4.5, avec l'objet « A=256, Spectre ... », cette fonction « Construit profil de fond » est une méthode de la classe des objets TWINLIGN. Elle est accessible, parmi d'autres fonctions de traitement, proposées dans un pop-menu activé par un click du bouton droit de la souris, sous deux conditions : la première est la sélection du mode d'analyse spectrale et la seconde implique que le curseur de souris soit placé à l'intérieur de la fenêtre de l'objet.

Le profil de fond est construit numériquement par interpolation entre des points positionnés, par l'utilisateur, le long du profil spectral, à l'aide de la souris. La fonction d'interpolation est une fonction polynomiale de type Spline [66]. Le nombre de points est

choisi dans un intervalle de 3 à 10 points, en fonction de la qualité de superposition désirée entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales.

Le résultat de cette fonction numérique, exécutée avec 6 points, est montré sur la figure IIIB.4.6. La courbe calculée (rouge) comporte 6 points « actifs » matérialisés chacun par le centre d'un cadre (jaune) de la taille du curseur de souris. Ces cadres, déplaçables avec la souris, suivant le même principe que la celui de la fonction de sélection de ROI décrite dans le paragraphe *a*, déterminent les valeurs des points utiles au calcul de la fonction d'interpolation spline. La méthode de cet objet TWINLIGN, qui gère les déplacements cadres ou points, a été adaptée pour exécuter un calcul numérique et un affichage instantané du profil de fond, à chaque déplacement d'un de ces cadres jaunes. Elle permet à l'utilisateur d'obtenir, après quelques manipulations de souris, une courbe numérique de fond adaptée à ses exigences.

Sous l'OS WINDOWS 95, les méthodes, nombreuses, appartenant aux objets standard du GUI et les fonctions graphiques élémentaires du GDI permettent de réaliser des méthodes élaborées adaptées aux objets graphiques complexes créés spécifiquement pour rendre interactives, intuitives et conviviales les fonctions du programme, que ce soit dans les tâches de contrôle, de mesure ou d'analyse.

Si leur développement représente un travail de programmation conséquent, la facilité et la robustesse qu'elles apportent dans l'utilisation du programme est un atout majeur dans la l'exploitation de l'outil d'imagerie que j'ai réalisé. Cet outil nous permet d'obtenir des images multidimensionnelles de qualité dans des expériences exigeantes où les signaux optiques pertinents sont très faibles. Le chapitre IV donnera un aperçu concret de quelques résultats obtenus avec cet outil.

IV - Présentations de quelques résultats.

Dans ce chapitre, sans entrer dans l'analyse des processus physiques qui dépassent le cadre des travaux de ce mémoire, je présenterai quelques résultats illustrant les performances des éléments du microscope et de la gestion des signaux. Je montrerai, en particulier, plusieurs images qui, enregistrées en mode simple ou en mode spectral, démontrent d'une part les performances du capteur de distances nanométriques, le buzzer que j'ai développé (§ IIA3.2) et d'autre part, les facilités de repérage et de repositionnement d'un nanoobjet unique. Les exemples suivants sont consacrés à l'imagerie multidimensionnelle, spatio-spectrale ou hyperspectrale. Ils permettent de décrire les possibilités de présentation visuelle et d'analyse des enregistrements multidimensionnels.

IV.1 – Images simples.

La figure IV.1 montre l'image topographique d'un échantillon qui présente un creux dans un film de chrome déposé par évaporation sous vide sur une lamelle de verre. Il a été obtenu par masquage à l'aide d'une bille de polystyrène de 100 nm, déposée avant évaporation, puis dissoute dans un solvant après dépôt du film de chrome.

Cette image a été réalisée avec le capteur buzzer, à l'extrémité duquel est collée une fibre optique spécialement usinée pour obtenir une pointe fine. L'asservissement de la distance pointe/échantillon est assuré par une électronique commerciale de microscope AFM. Le balayage de l'échantillon est effectué par le scanner type Besocke, décrit au chapitre IIB.3. Dans cette acquisition, l'amplitude de la tension d'excitation de la pointe, à sa fréquence de résonance voisine de 26 kHz, est égale à 0,1 V. L'amplitude de vibration de l'extrémité de la pointe est de l'ordre de 2,5 nm. La taille de l'image est de 128×128 pixels et la vitesse de balayage de 0,2 ligne/s. On peut remarquer, sur le profil tracé sous la figure, que la largeur mesurée de 119 nm, est légèrement plus grande que la taille de la bille de masque. Ceci est du, principalement, à la géométrie de l'apex de la pointe. On remarquera aussi, les faibles variations du signal, dans les parties plates du relief, qui montrent une stabilité verticale du scanner meilleure que le nanomètre [45].

Un autre type d'échantillon a été élaboré pour analyser les performances du microscope optique de champ proche. Des billes de 220 nm de diamètre sont déposées en monocouche sur un substrat en verre. Ces billes sont jointives et les espaces résiduels forment un réseau hexagonal. Ce masque est recouvert d'un dépôt de chrome de 20 nm d'épaisseur. Les billes sont ensuite dissoutes pour produire un réseau hexagonal de plots de chrome qui entourent des zones de l'échantillon transparentes, de forme circulaire. La forme nominale de l'espace libre entre trois billes jointives est une structure triangulaire incurvée de 115 nm de côté. Ces espaces sont jointifs et leur distance est également de 115 nm. En réalité, les limites imposées par le procédé de déposition du chrome, puis de dissolution du masque formé par les billes, ne permet pas d'obtenir des plots de chrome jointifs. La topographie de l'échantillon obtenu a été analysée par imagerie à force atomique, avec un microscope commercial. L'écart entre les plots, de l'ordre de 110 nm est voisin de la valeur nominale et la taille réelle des plots varie entre 25 et 50 nm.

La figure IV.2 montre deux images de cet échantillon qui correspondent aux enregistrements simultanés d'un signal topographique (A) et optique en champ proche (B), obtenues avec le microscope optique de champ proche développé. La mesure de l'espacement entre les plots et le recouvrement correct de la forme des plots, démontrent la résolution latérale élevée du dispositif.

On observe toutefois une corrélation anormale entre l'image optique (B) et l'image topographique (A) [35]. L'image optique devrait présenter un réseau hexagonal de taches circulaires brillantes, complémentaire du réseau de l'image topographique. Cette corrélation est la signature d'un des artefacts connus sinon clairement démontrés en microscopie optique de champ proche sans ouverture [67]. L'analyse de ce phénomène montre que c'est une conséquence de l'asservissement pointe-échantillon et qu'il peut être contourné en implantant un dispositif supplémentaire de contrôle interférométrique du signal, que je ne décrirai pas [35].

La figure IV.3 montre l'enregistrement d'une zone restreinte de 220 nm × 220 nm du même échantillon, obtenu en utilisant une telle méthode. Le contraste inversé de l'image optique indique une correction effective de cet artefact.

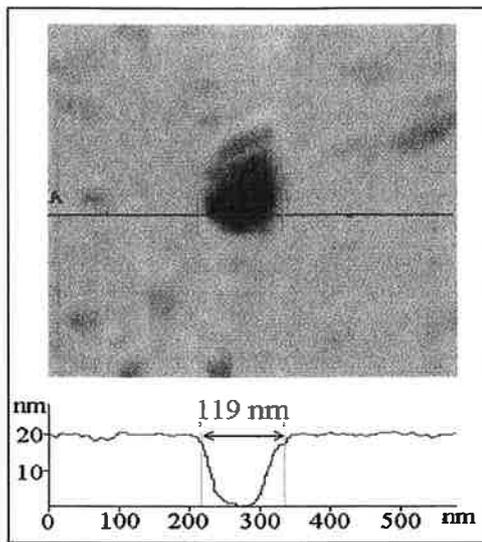


Figure IV.1 : Image topographique de 600 nm \times 600 nm. Elle montre la détection du relief d'un trou de 100 nm de diamètre réalisé dans un film de Cr de 20 nm d'épaisseur, à l'aide du capteur « buzzer » associée au scanner Besocke avec un vitesse de balayage de 0,2 ligne/s.

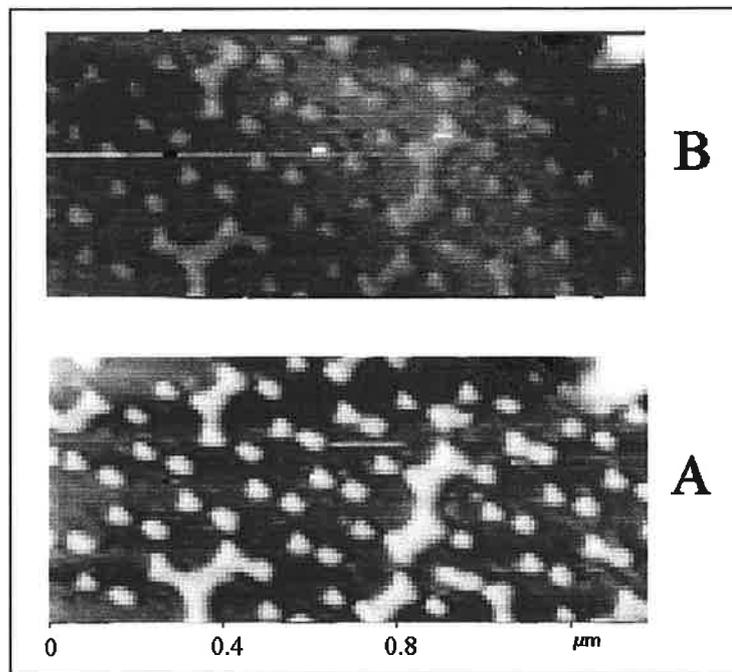


Figure IV.2 : Imagerie de champ proche sans ouverture, réalisée avec le scanner type Besocke et le buzzer portant une pointe métallique. Les dimensions de l'image sont de 1,4 μm \times 0,6 μm . Les variations du signal topographique (A) sont comprises entre 0 et 30 nm. En (B), on observe les variations du signal optique détecté. Les plots en Cr, d'épaisseur de 20 nm, sont répartis selon une structure hexagonale.

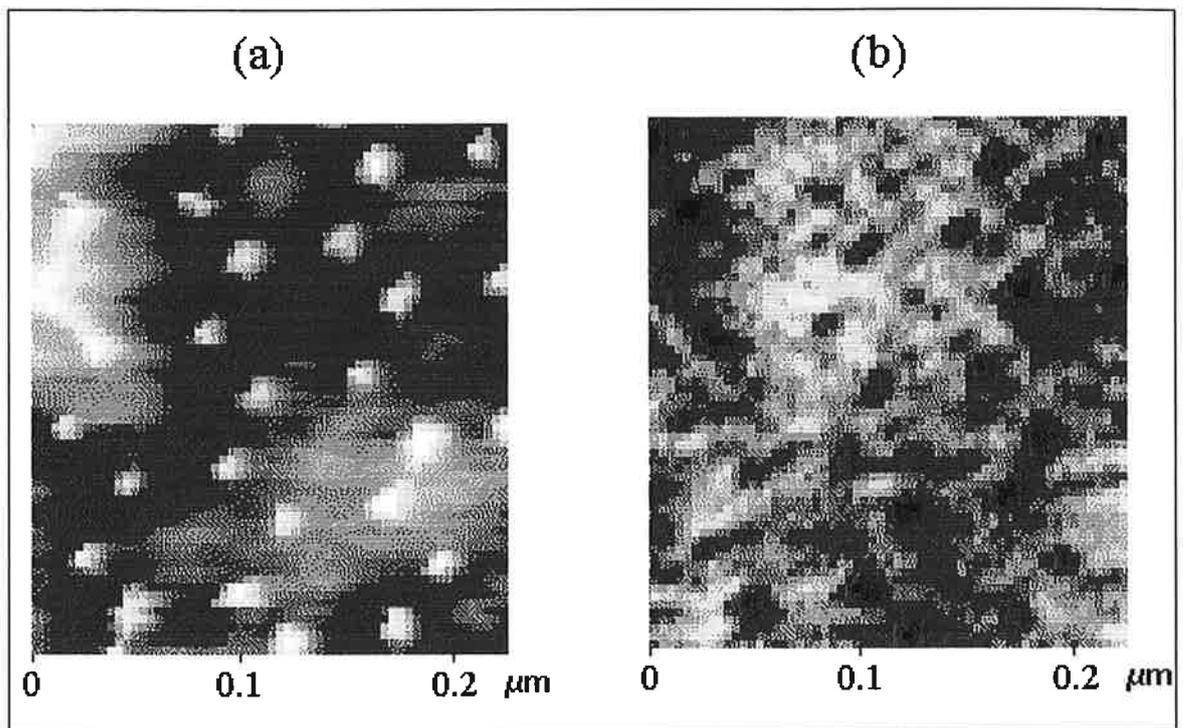


Figure IV.3 : Enregistrements simultanés d'une zone de $220 \text{ nm} \times 220 \text{ nm}$ des plots de chrome disposés en hexagones réguliers. L'image (a) correspond au signal topographique donné par le buzzer. L'image (b) est le résultat de la mesure du signal optique en utilisant un contrôle interférométrique supplémentaire du signal.

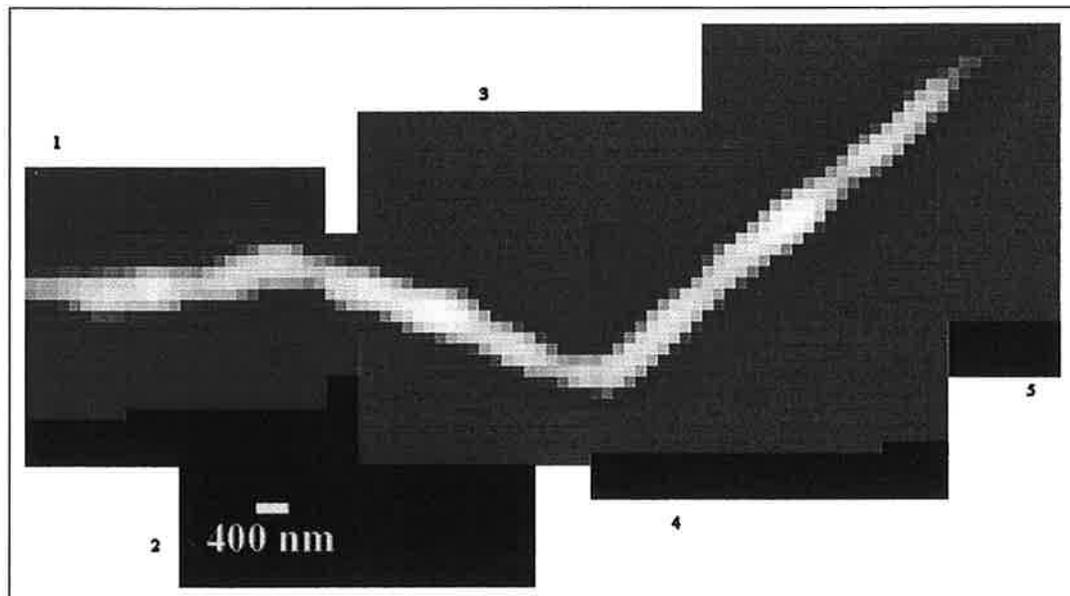


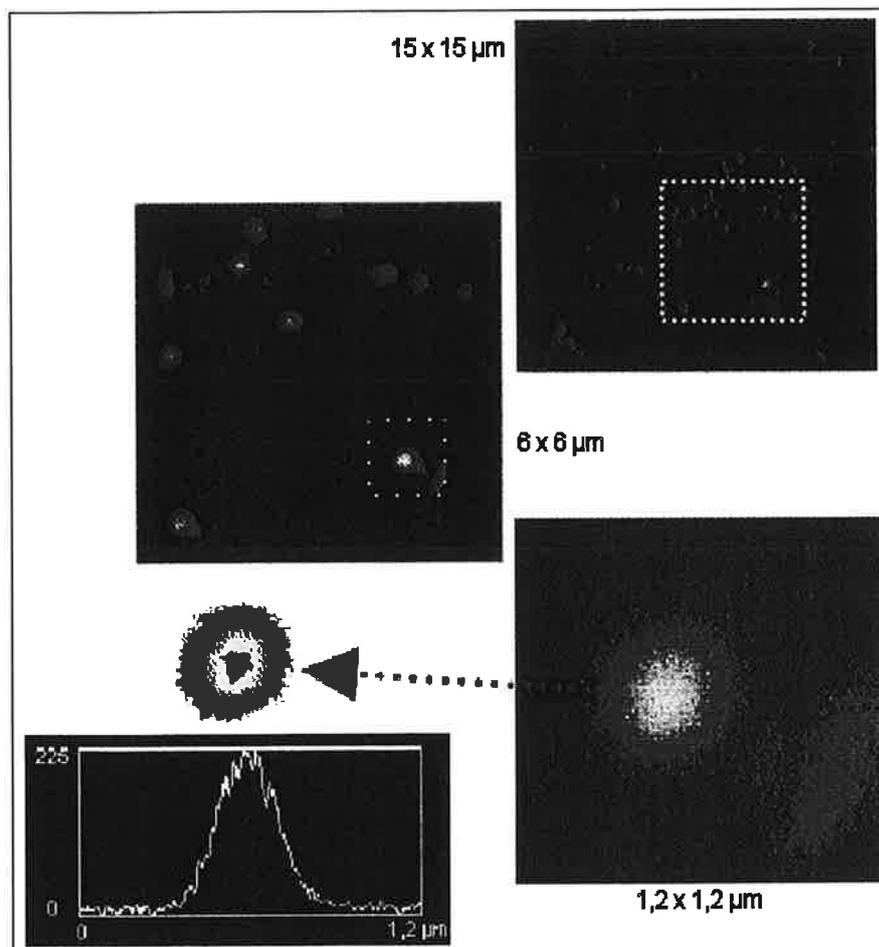
Figure IV.4 : Images spectrales Raman de nanotubes de carbone $4 \text{ }\mu\text{m} \times 4 \text{ }\mu\text{m}$. Les images de 32×32 pixels présentent un pas de balayage égal à 125 nanomètres.

Une des contraintes importantes des expériences de spectroscopie de nanoobjets est la nécessité de réaliser des repositionnements précis, et répétitifs, à l'échelle de quelques dizaines de nanomètres pour acquérir des signaux supplémentaires en des zones très localisées des échantillons. Les acquisitions suivantes illustrent, de ce point de vue, les performances du dispositif global, « système de balayage plus logiciel de gestion ».

La figure IV.4 représente les enregistrements consécutifs des signaux optiques de diffusion Raman de nanotubes de carbone monofeuillets, à l'aide de la configuration confocale du microscope. Ces nanotubes sont dispersés de façon à pouvoir isoler en certains endroits de l'échantillon des nanotubes uniques ou des petites cordes qui englobent une dizaine à une centaine de nanotubes. Un nanotube isolé a une longueur variable et un diamètre de l'ordre de 1,5 nm. Les diamètres des cordes sont de l'ordre d'une vingtaine de nanomètres. Le balayage de l'échantillon, correspondant à un domaine de $4 \mu\text{m}^2$ avec une résolution de 32×32 pixels, a été effectué avec le scanner plan que j'ai développé (§ IIB.4). Le signal optique est obtenu par sommation des intensités du signal Raman mesurées sur les 512 canaux spectraux de la caméra pendant un temps de 1 s/pixel soit 17 minutes par image complète. Cinq zones de l'échantillon, correspondant aux images 1, 2, 3, 4 et 5, ont été enregistrées. Chacune représente l'image d'une partie d'un faisceau de nanotubes de carbone. La largeur de la structure brillante est de l'ordre de $1 \mu\text{m}$. Cette dimension latérale correspond au résultat de la convolution de la fonction d'appareil de l'ordre de 440 nm et de la taille de l'objet imagé. On peut en déduire que la corde imagée est large, de l'ordre de 500 nm. Les méthodes graphiques de sélection interactive de la ROI sur l'échantillon (§ IIIB.4) permettent de suivre, avec précision, la topographie de ce faisceau de nanotubes qui s'étend sur un domaine de $13 \mu\text{m}$, supérieur à la dimension maximale de balayage d'une image unique. Le repérage visuel d'une forme caractéristique sur l'image 1 par exemple, permet de recentrer le scanner à quelques centaines de nanomètres près pour suivre, sur l'image 2, le tracé de cette forme. La fiabilité de repositionnement du scanner permet d'obtenir un raccordement du tracé, entre les 5 images avec une précision de quelques dizaines de nanomètres, repérable sur des détails particuliers de la structure.

Les expériences de molécules uniques permettent d'illustrer précisément ce repositionnement, car l'objet est pratiquement ponctuel ($\cong 1$ nm) et les dimensions apparentes des objets sondés dans l'image optique sont limitées par la réponse percussionnelle du microscope.

La figure IV.5 montre 3 images de 128×128 pixels, acquises successivement sur un échantillon qui est une couche mince sol-gel dopée de molécules de pérylène excitées à résonance. Ces images correspondent aux mesures des signaux optiques de fluorescence totale effectuées avec la chaîne de comptage de photons pour un temps de mesure de 10 ms/pixel soit environ 3 mn par image. Ces enregistrements ont été réalisés dans la configuration confocale du microscope. Dans cette situation, le repérage d'une molécule unique nécessite deux étapes : une première image étendue de $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ permet de repérer une zone de l'échantillon où les molécules sont réparties de façon satisfaisante. Une image agrandie de $6 \times 6 \mu\text{m}^2$ est enregistrée dans une zone donnée, qui inclut la molécule choisie. Après cette étape, une image très agrandie de la molécule peut être réalisée, comme le montre la dernière image de la figure IV-5. La taille de cette image est $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$, et le pas est de l'ordre de 10 nm, très supérieur à la résolution spatiale du microscope qui est de l'ordre de 380 nm. L'intérêt d'utiliser un maillage aussi fin est de pouvoir analyser à l'intérieur de la tache de diffraction qui représente la molécule, les fluctuations temporelles du signal, caractéristiques de la dynamique des molécules uniques excitées à résonance. Le profil de la tache de diffraction, qui montre un excellent rapport signal sur bruit, a une largeur à mi-hauteur de l'ordre de 300 nm. Cette figure met en évidence l'efficacité des méthodes de sélection de la ROI, la précision du balayage du scanner et le bon synchronisme du déplacement de l'échantillon et de l'acquisition des signaux.



La figure IV.5 : Image de molécule unique $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$, de 128×128 pixels, obtenue après sélection et enregistrement de deux zones échantillon de repérage, de $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ et $6 \times 6 \mu\text{m}^2$.

IV.2 - Images spatio-spectrales de molécules individuelles.

J'ai mentionné la possibilité d'acquérir en tout point de l'image optique totale où apparaît un centre émetteur, un spectre de la fluorescence émise. Il s'agit d'un exemple d'imagerie multidimensionnelle, spatio-spectrale. L'acquisition répond à plusieurs exigences : l'intensité du faisceau excitateur résonnant avec la molécule doit rester inférieure à l'intensité de saturation pour optimiser le taux de photons émis par la molécule. Un rapport signal sur bruit suffisant ne peut donc être acquis qu'au prix d'un temps d'accumulation de plusieurs secondes. Pendant cet intervalle de temps, la molécule a une probabilité non négligeable de se photodégrader, par un processus de photoionisation par exemple. Pour limiter cet effet, le logiciel pilote durant une telle acquisition, outre les éléments de déplacement du scanner plan et le fonctionnement des détecteurs, l'obturateur électromécanique qui permet de masquer le faisceau laser pendant les intervalles de temps où le signal de fluorescence n'est pas détecté. En optimisant tous les paramètres de la collection et en utilisant des optiques de grande ouverture numérique (objectif à immersion $\times 100$), nous avons enregistré des spectres de différentes molécules uniques au sein d'une seule image de la fluorescence totale. L'échantillon est une couche mince sol-gel de l'ordre d'une cinquantaine de nanomètres, dopée de molécules de pérylène orange, excitées à résonance par le laser en impulsions (100 ps) à 532 nm. La puissance est de l'ordre de $4 \mu\text{W}$. Ces spectres, acquis en microscopie confocale, sont montrés sur la figure IV.6, en regard de l'image optique de la fluorescence totale. Le réseau utilisé est celui de 300 traits/mm, car les raies de fluorescence enregistrées à température ambiante sont larges. Les molécules dont le spectre a été enregistré sont labellées de 1 à 5. Dans cet enregistrement, un effet de seuillage a été utilisé pour stopper le scanner et déclencher l'acquisition spectrale pour les molécules les plus brillantes. Alors qu'un signal sur bruit satisfaisant est obtenu en 50 ms/pixel dans l'imagerie optique totale, 10s sont nécessaires pour acquérir des spectres avec un rapport signal sur bruit correct. Dans ces conditions, le signal atteint 60 coups dans les canaux spectraux correspondant aux pics de fluorescence. L'image a une dimension totale de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ et correspond à un enregistrement de 128×128 pixels. Le temps d'acquisition est de 13 mn. La résolution obtenue est de 40 nm par pas. Des images de moindre résolution peuvent être acquises beaucoup plus rapidement.

L'analyse détaillée de l'image et des spectres associés dépasse le cadre de mon travail de doctorat, mais on peut cependant remarquer de nettes différences de forme et d'intensité d'un spectre à l'autre. Ces différences sont liées à la variété des sites occupés par les molécules sondées. On peut noter également que la tache lumineuse correspondant à la molécule 5 est très perturbée et que son spectre est peu intense. Cette molécule est certainement dans une configuration très instable et il est probable qu'elle a photoblanchi avant la fin de l'enregistrement spectral.

Le même type d'imagerie spatio-spectrale a été mis en œuvre en microscopie optique de champ proche, comme je l'ai décrit. En ce cas, le maximum d'émission de fluorescence des molécules devrait être observé quand la molécule est située sous l'apex de la pointe. Un exemple d'une telle image multidimensionnelle est donné sur la figure IV.7. Cette image est de même dimensions que la précédente ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) et elle a été acquise sur le même échantillon. Il apparaît clairement que la résolution spatiale est nettement accrue. Sur cet exemple, elle est de l'ordre d'une cinquantaine de nanomètres, limitée par le pas du balayage. Ceci démontre que le microscope de champ proche optique, conçu en combinant un microscope à force atomique et un microscope confocal, est un outil adapté à la spectroscopie de très haute résolution spatiale et de très faible flux d'une part et que son pilotage informatique est suffisamment précis pour accéder à l'enregistrement du spectre de molécules localisées sous une pointe dont l'apex est d'une dizaine de nanomètres, d'autre part. La puissance du laser a été divisée par 5 par rapport à l'enregistrement précédent, et le temps d'acquisition est identique au cas précédent. En comparant les intensités des pics de fluorescence dans les deux images, on peut évaluer le facteur d'exaltation à quelques unités seulement sous cette pointe en silicium. L'obtention de facteurs d'exaltation plus grands, qui permettraient des acquisitions plus rapides, est un des enjeux des expériences futures. Dans cette configuration, il a été possible d'enregistrer le spectre de la fluorescence, aux points les plus brillants. Cela démontre un contrôle satisfaisant de la distance pointe-échantillon pendant des temps d'acquisition longs, et une stabilité satisfaisante du dispositif expérimental. L'allure des spectres en microscopie optique de champ proche diffère de celle observée en microscopie confocale. L'aile rouge est plus intense. L'explication de ce phénomène, hors du champ de mes travaux, est complexe.

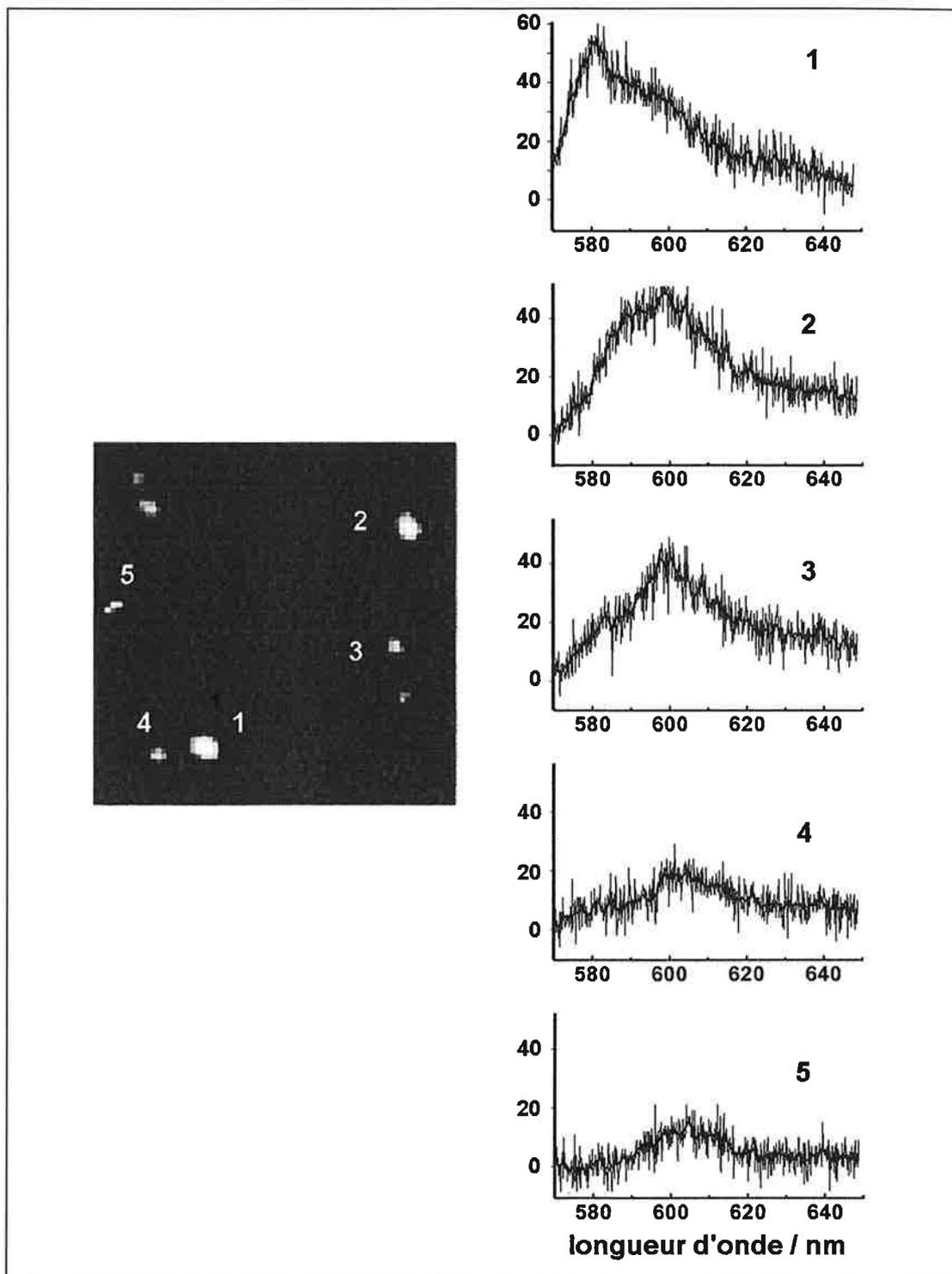


Figure IV.6: Image spatio-spectrale de molécules individuelles.

A gauche, sur l'image de la fluorescence totale ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), sont repérées cinq molécules dont les spectres de fluorescence sont représentés dans la colonne à droite de l'image. En ordonnée est reporté le nombre de coups acquis pendant les 10 secondes d'acquisition spectrale. L'échantillon est une matrice mince de sol-gel, dopée de molécules de pérylène orange.

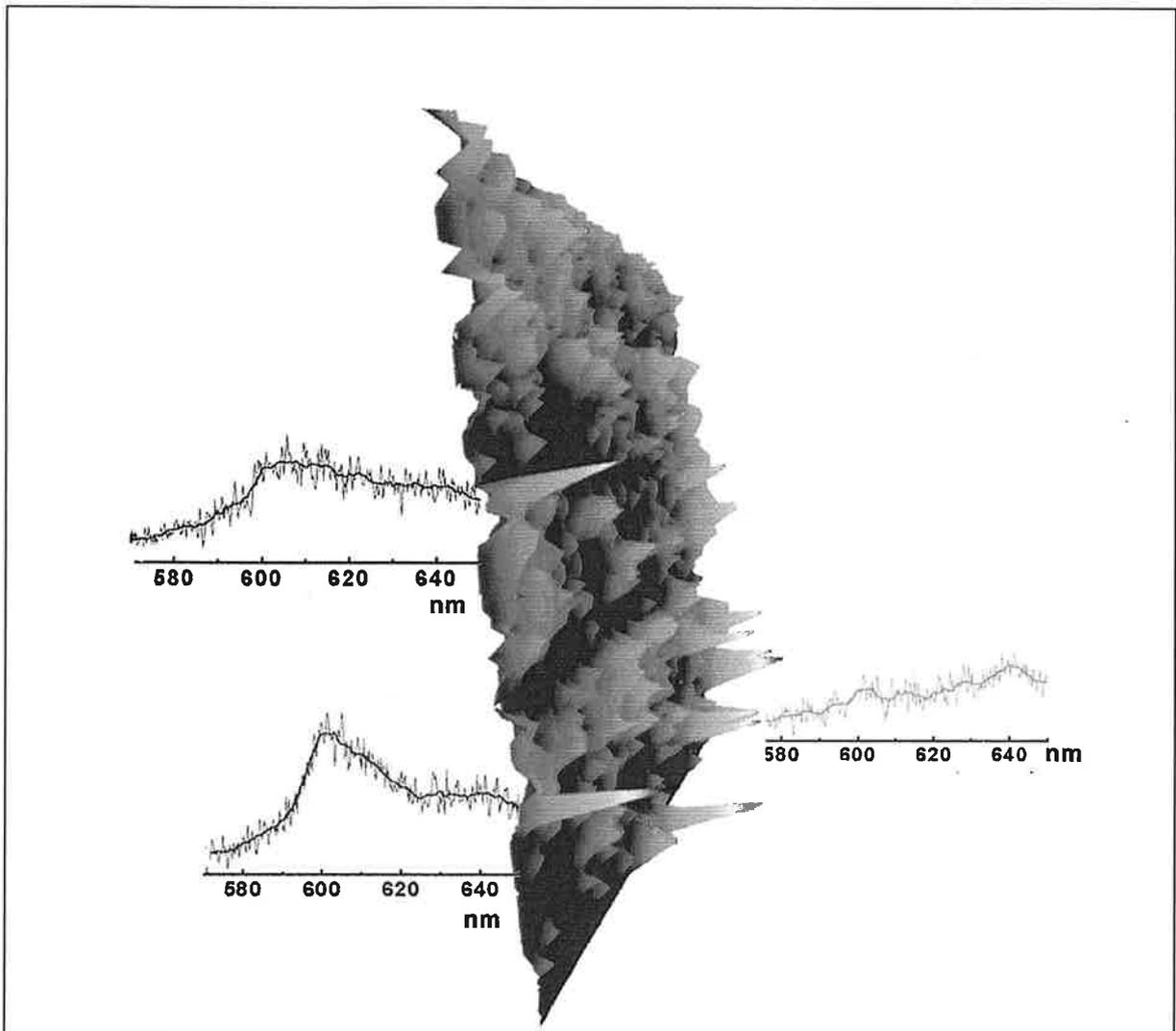


Figure IV.7: Image spatio-spectrale de molécules individuelles, acquise en microscopie optique de champ proche. L'image de la fluorescence totale ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) est représentée en 3D. Trois molécules sont repérées avec leur spectre de fluorescence représenté en regard dans l'axe de leur pic intense imagé. La puissance du faisceau d'excitation est de $0,8 \mu\text{W}$.

IV.3 - Imagerie Raman hyperspectrale

Un autre type d'imagerie multidimensionnelle a été implanté grâce aux outils que j'ai développés. Il s'agit de l'imagerie Raman hyperspectrale. Elle est réalisée dans une configuration simplement confocale, c'est à dire en l'absence de pointe. Le signal de diffusion Raman non résonante a une intensité très faible, puisque le rapport typique des sections efficaces d'absorption du signal Raman et du signal de fluorescence pour un objet donné est de l'ordre de 10^{-14} . Un signal d'aussi faible intensité ne peut pas être détecté sans faire intervenir un processus d'exaltation. Celui qui a été retenu est l'exaltation du signal Raman d'un objet déposé sur une surface nanostructurée d'argent. Le phénomène est connu sous son acronyme anglais, SERS, qui signifie, « Surface-Enhanced Raman Scattering », ou exaltation Raman de surface.

L'imagerie hyperspectrale correspond à l'acquisition d'un spectre Raman en chaque point du balayage du scanner, sur une bande spectrale suffisamment large pour inclure de multiples informations, d'où la terminologie hyperspectrale [24]. Le spectre Raman d'une espèce chimique particulière présente des raies caractéristiques de l'élément considéré. Ces données, très utiles pour connaître la composition d'un échantillon sont répertoriées dans des bibliothèques. Pour obtenir de multiples informations par cette méthode, la largeur de la bande spectrale d'acquisition est choisie en sorte que la signature de plusieurs espèces chimiques différentes peut apparaître dans le spectre. Le dispositif expérimental utilise le réseau de 300 traits/mm, ce qui permet d'obtenir en une seule acquisition, un spectre Raman s'étalant sur 2700 cm^{-1} . Malgré l'exaltation du signal, de telles images sont longues à acquérir si on travaille sur des échantillons dilués pour éviter les effets de moyenne qui masque la présence des espèces minoritaires. A chaque pixel, l'intensité du signal des 512 canaux spectraux est sommée et la dimension de l'image est 512×3 , les trois données non spectrales correspondant à l'intensité totale de la diffusion Raman et les coordonnées x et y du point de mesure. Cette image est l'image parent. Son enregistrement est la première étape du processus. Dans une deuxième étape, un algorithme de filtrage spectral permet de construire des images-filles qui affichent les zones où est localisée une espèce particulière. Dans ce but, l'utilisateur sélectionne dans le spectre total une bande spectrale qui inclut la signature de l'espèce recherchée.

J'ai implanté un traitement mathématique simple des données spectrales qui permet, par comparaison des valeurs minimales déterminées par l'intensité du signal de fond voisin, et des valeurs maximales du signal sur ce domaine restreint, de repérer l'existence d'une raie à l'intérieur de la bande retenue. Les valeurs de l'intensité des pixels de la raie sont additionnées et utilisées pour reconstruire une image de l'intensité totale de diffusion Raman à cette longueur d'onde. Cette image, affichée sur l'écran en même temps que l'image parent, permet de repérer la localisation de l'espèce choisie avec un contraste qui dépend de la largeur de la bande choisie. Des images-filles peuvent également être reconstruites en découpant des bandes plus larges pour inclure la signature de deux espèces différentes et analyser la co-localisation de ces espèces. Le logiciel permet d'afficher simultanément jusqu'à dix images, soit l'image-mère et neuf images-filles, ce qui en permet une comparaison aisée et fructueuse. Ce microscope confocal, combiné à la méthode SERS s'avère très performant pour extraire des informations sur de petites quantités de matière. Plusieurs méthodes d'imagerie Raman ont été implantées, mais la plus fréquemment utilisée n'a pas de caractère hyperspectral. Le signal Raman est enregistré en chaque point de l'échantillon pour une valeur fixe du décalage Raman [68,69]. Une telle image est acquise beaucoup plus rapidement, mais ne permet pas d'extraire d'autres informations ultérieurement. L'analyse de la présence d'une autre espèce chimique suppose l'enregistrement d'une deuxième image à un décalage Raman différent. Il est alors impératif pour corrélérer les résultats a posteriori que le repositionnement du dispositif soit très précis. Une autre méthode, hyperspectrale cette fois, consiste à acquérir le spectre sur une bande large mais sur une seule ligne de balayage. La méthode utilise en effet une dimension d'une matrice CCD pour acquérir un spectre et l'autre dimension pour acquérir l'information de position selon une ligne [70]. L'analyse d'une zone 2D de l'échantillon s'effectue éventuellement par des déplacements successifs, de l'échantillon dans une direction donnée, pour décrire un faisceau de lignes parallèles. Un dispositif complet d'imagerie hyperspectrale a été décrit récemment [71]. Ce dispositif inclut des dispositifs commerciaux élaborés et la reconstruction des images-filles répond à des traitements a posteriori complexes. Dans la très grande majorité des études, les échantillons sont épais.

La figure IV.8 illustre un des atouts de cette méthode dans l'analyse d'échantillons dilués. Il s'agit de nanotubes de carbone monofeuillets dispersés sur un substrat d'argent recuit en sorte d'exalter les signaux proches de 514 nm. Le laser d'excitation est un laser à argon ionisé, émettant en à 514 nm.

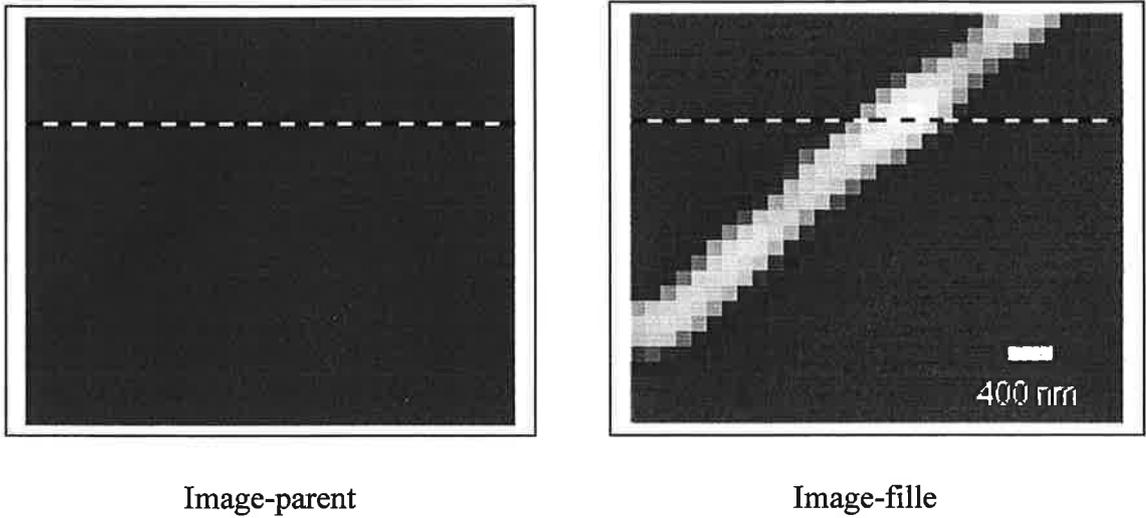


Figure IV.8 : Imagerie hyperspectrale de nanotubes de carbone ; exemple d'amélioration du contraste par filtrage spectral. $4,5 \times 4 \mu\text{m}^2$, 1 s/pixel, 32×28 pixels.

Le signal Raman caractéristique d'un nanotube de carbone monofeuillet inclut deux bandes principales, une bande vers les faibles décalages Raman ($100\text{-}250\text{ cm}^{-1}$), et la bande principale complexe située vers 1590 cm^{-1} .

L'image-parent, pour laquelle le spectre dispersé sur la bande $100\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ est enregistré pendant 4 secondes à chaque pixel, présente un faible niveau de contraste. Une image-fille est construite en sélectionnant une bande spectrale de 40 cm^{-1} centrée à 1580 cm^{-1} , c'est à dire par sélection de la bande principale des nanotubes. Cette image, de très bon contraste, montre une structure linéaire dont la dimension latérale est de 400 nm . Cette valeur coïncide avec la valeur attendue de la tache de diffraction avec l'objectif ($\times 1,3$) utilisé. Cette observation montre l'efficacité du réglage confocal du microscope. Cette dimension est préservée sur toute la zone de l'image brillante, ce qui démontre les qualités de stabilité du montage, de fiabilité du balayage et du synchronisme des commandes de déplacement et d'acquisition des signaux. L'allure de cette image permet de conclure que l'objet imagé est très probablement un petit faisceau de nanotubes monofeuillets. L'imagerie hyperspectrale se révèle donc être un outil bien adapté à l'analyse d'échantillons dilués, non fluorescents, situation pour laquelle il existe peu de diagnostics.

Le deuxième exemple est plus complexe et je ne m'attacherai qu'à souligner l'adéquation de l'outil réalisé avec le problème posé. Il s'agit de l'analyse d'un échantillon dilué de nanotubes de carbone qui sont dopés avec des molécules de pérylène. Peu de variétés de nanotubes dopés ont été étudiées à ce jour [72,73], car la proportion d'espèces dopées dans l'échantillon est en général très minoritaire et seule une méthode dont la sensibilité permet d'analyser des traces peut donner des résultats. L'échantillon est du même type que celui utilisé dans l'expérience précédente. L'image-parent est acquise avec un temps d'acquisition de 10 secondes par pixel [Figure IV.9-1]. Elle présente de larges hétérogénéités et en particulier deux zones plus brillantes en bas à gauche et en bas à droite. Les raies Raman caractéristiques du pérylène sont connues. La première image-fille [Figure IV.9-2] est construite en sélectionnant l'une de ces raies, décalée de 1368 cm^{-1} par rapport à la raie d'excitation. La zone brillante qui apparaît en bas à gauche de cette image indique la présence de pérylène. Le pérylène est également présent, mais de façon plus diffuse en bas à droite de l'image. Ces deux zones recoupent les zones brillantes de l'image-parent. Une deuxième image-fille est construite en sélectionnant cette fois la raie principale des nanotubes, ou bande G [Figure IV.9-3].

Son analyse montre que les zones brillantes de la figure précédente correspondent à des zones où sont co-localisés des nanotubes et des composés du pérylène, mais que ces deux espèces ont des intensités différentes dans les deux cas. En regard des images 2 et 3, sont tracés les spectres typiques de l'image-parent qui ont été enregistrés dans ces régions. Le spectre 2 présente des raies fines à 1296 cm^{-1} et 1368 cm^{-1} , caractéristiques du pérylène et une raie à 1592 cm^{-1} spécifique des nanotubes. Les autres raies, plus compliquées à analyser traduisent l'interaction entre les deux espèces. Le spectre 3 est celui de nanotubes de carbone monofeuillets simples.

Les images mère et filles ont une dimension de $3 \times 2,3\ \mu\text{m}^2$ (32×26 pixels) et la dimension de la zone brillante de l'image 2 est de l'ordre de 100 nm. Ceci démontre que les composés « nanotubes+pérylène » qui offrent la possibilité d'étudier soit de nouvelles espèces, soit des interactions marquées entre les deux espèces sont très minoritaires et qu'elles ne pourraient être déterminées sans une analyse préalable du type de celle de l'imagerie Raman hyperspectrale de haute sensibilité.

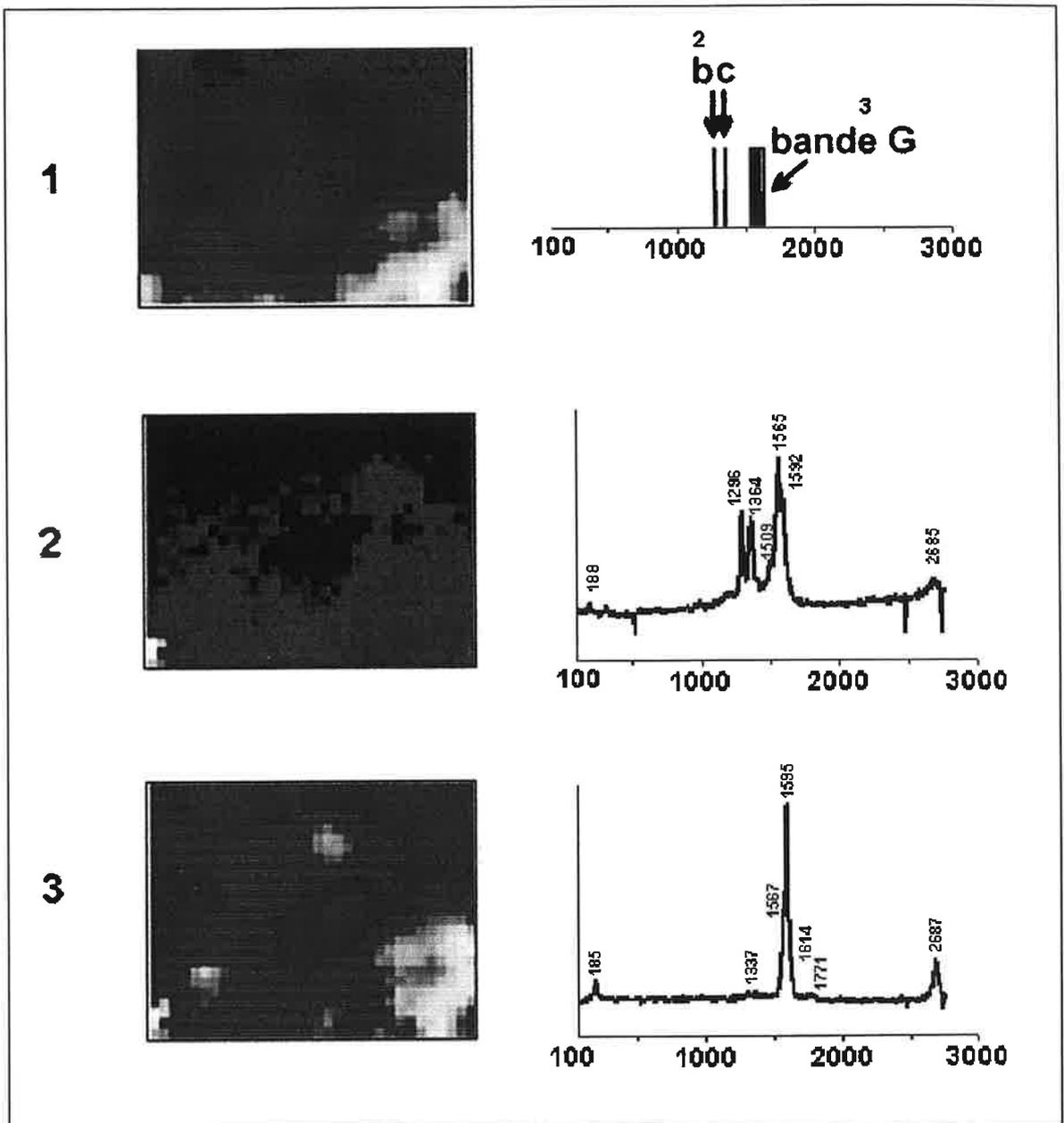


Figure IV.9 : Imagerie Raman hyperspectrale de nanotubes dopés au pérylène.

Image 1 : image-parent enregistrée sur l'intervalle spectral 100-2700 cm^{-1} . Le temps d'acquisition est de 10 s/pixel, la dimension de l'image est de $3 \times 2,3 \mu\text{m}^2$ et de 32×26 pixels. Un schéma de raies Raman caractéristiques du pérylène (b et c) et de nanotubes monofeuillets simples (bande G) est représenté en regard.

Image 2 : image fille construite en sélectionnant la bande c. Le spectre typique d'un point de la zone brillante est représenté en regard. On note la signature du pérylène (1296 cm^{-1} et 1368 cm^{-1}) et des nanotubes (1592 cm^{-1}).

Image 3 : image fille construite en sélectionnant la bande G des nanotubes. En regard, est reporté un spectre typique de nanotubes simples observé dans la partie brillante supérieure de l'image.

V - Conclusion et perspectives

Les travaux exposés dans ce mémoire représentent une contribution au développement d'outils de nanositionnement et de construction d'images, indispensables au pilotage d'un microscope optique de champ proche et plus généralement à celui des différents microscopes construits dans le groupe. L'ensemble des contrôles et des mesures utilise des méthodes d'acquisitions numériques que j'ai mises en œuvre en réalisant les interfaces électroniques spécifiques et en développant un programme de gestion informatique interactif particulier. A la suite de ce travail, deux montages de microscopie de champ proche à balayage, destinés à l'étude spectroscopique d'objets individuels de taille nanométrique, ont été réalisés.

Un premier montage destiné, plus particulièrement, à fonctionner à température cryogénique, a nécessité la réalisation d'un scanner de grande résolution qui permet, à température ambiante, de balayer un domaine de 50 μm avec une stabilité verticale de l'ordre de quelques Angström. Il offre la possibilité d'observer un échantillon sur un domaine de plusieurs centaines de microns, de manière contrôlée et sans manipulation. Il est équipé d'un capteur shear-force tout électrique, que j'ai développé et qui permet de contrôler les forces qui s'exercent à la distance de quelques nanomètres, entre sa pointe et l'échantillon.

Une autre méthode de mesure de cette distance, utilisée pour des couples pointe-échantillon conducteurs, dont l'idée est empruntée à la microscopie à effet tunnel a été également implantée au cours de mon travail. L'asservissement nécessaire, pour maintenir la pointe à cette faible distance, ne peut cependant pas être piloté par le système informatique de gestion du microscope, en raison du caractère asynchrone apporté par le système d'exploitation dans le traitement du signal de contre-réaction. L'adaptation que j'ai réalisée pour que ce capteur puisse s'intégrer à un système électronique commercial d'asservissement d'un microscope à force atomique, nous permet, indifféremment, de construire des images optiques en champ proche et des images topographiques d'objets dont le relief est de quelques dizaines de nanomètres, avec une résolution latérale de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres. Des essais validant l'aptitude de cet ensemble à fonctionner à basse température ont été réalisés avec succès. Le dispositif n'est pas actuellement mis en œuvre dans de véritables acquisitions à basse température mais il sera utilisé à terme dans des études spectroscopiques d'imagerie spectrale à haute résolution.

Le signal optique pertinent dans les expériences réalisées sur des molécules uniques et plus généralement sur des nanoobjets est intrinsèquement très faible. La chaîne programmable de comptage de photons que j'ai développée à partir d'un détecteur commercial de type SPCM de fort rendement quantique et de faible bruit en autorise la détection puis le traitement avec un rapport signal sur bruit très satisfaisant. Le contrôle automatique et programmable de cette chaîne de comptage, par le logiciel de gestion, a pu être totalement intégré grâce au développement d'une électronique externe de synchronisation temporelle.

Un deuxième montage, construit autour d'un microscope confocal inversé, a été réalisé pour obtenir un microscope de grande efficacité de collection et suffisamment versatile pour travailler aussi bien en mode confocal qu'en mode de champ proche, autorisant différentes configurations, d'illumination – collection, en champ proche ou en champ lointain. Le scanner plan que j'ai développé est un atout majeur dans la mise en œuvre de ces différentes configurations. Il permet d'associer, au microscope confocal, une tête de microscope à force atomique équipée de sondes de différents types. On dispose, en associant ces deux microscopes, d'un microscope de champ proche sans ouverture. De nombreuses exigences ont du être surmontées pour rendre ce microscope opérationnel, parmi lesquelles on retrouve celles déjà soulignées dans le premier montage, asservissement fiable de la sonde à quelques nanomètres de l'échantillon et alignement de la sonde avec un faisceau exciteur focalisé avec une précision de l'ordre de la centaine de nanomètres. Une exigence spécifique aux études en champ proche optique est liée à la nécessité de localiser la molécule étudiée dans la zone de champ proche, c'est à dire de contrôler son positionnement et repositionnement avec une précision latérale de l'ordre de la cinquantaine de nanomètres. Le repérage initial de l'émetteur par rapport à la sonde est réalisé par microscopie confocale. Un positionnement direct et systématique, à partir de cette seule donnée, est impossible sans capteur additionnel en raison de l'hystérésis des actionneurs piézoélectriques du scanner. J'ai développé un détecteur optique de déplacements ayant une résolution de 30 nm, en m'appuyant sur un capteur commercial 4 quadrants. Un étalonnage précis de ce capteur, a été effectué par une méthode interférométrique. L'interféromètre correspondant est construit autour d'un moteur inertiel piézoélectrique de résolution nanométrique et de course millimétrique que j'ai élaboré. La prise en compte de cet étalonnage permet le repositionnement rapide et automatique de l'échantillon dans la zone de champ proche, ce qui permet de pouvoir étudier la fluorescence d'une molécule donnée, après repérage de sa position dans une image optique. Sans l'aide de ce capteur, cette opération ne peut être effectuée que par plusieurs prises

d'images et recentrages successifs de la molécule qui risque d'être dégradée par photoblanchiment.

Ce microscope a permis d'acquérir des images optiques en champ proche, avec une résolution de l'ordre de $\lambda/20$.

A ce montage a été associé un analyseur spectral et une caméra CCD très faible bruit dont j'ai totalement intégré les contrôles dans le programme de gestion du microscope. Ce dispositif est un appareil d'imagerie en champ proche efficace pour réaliser une cartographie des émetteurs dispersés dans l'échantillon, tout en mesurant le spectre en chaque point observé, malgré le faible flux recueilli de quelques centaines ou dizaines de photons/s émis dans chaque canal spectral. Il nous a permis de démontrer pour la première fois, la possibilité d'utiliser la microscopie optique de champ proche sans ouverture pour la spectroscopie de molécules individuelles et de développer une méthode d'analyse par imagerie optique multidimensionnelle, en l'occurrence l'imagerie spectrale, pour des nanoobjets. Les performances de cet outil d'analyse sont liées à celles du microscope développé, mais elles sont également directement tributaires de la gestion informatique des différents éléments du montage, de la chaîne d'excitation à celle de détection.

Les interfaces électroniques programmables, intégrées dans le logiciel de gestion du microscope pour piloter et contrôler les différents actionneurs et capteurs de mesures, ont nécessité le développement de fonctions logicielles spécifiques de haut niveau dont la représentation graphique sur l'ordinateur, ordonnée de manière thématique, offre une interface de contrôle en interaction totale avec l'utilisateur.

L'organisation de la base de données, adaptée aux différents formats des enregistrements des mesures optiques spectrales et de fluorescence totale, et des mesures topographiques, a permis de développer des fonctions logicielles interactives d'analyse, de filtrage et de visualisation rapide de nos résultats.

La bibliothèque de fonctions logicielles de bas niveau, fournie au début de ce travail par le constructeur de la caméra CCD, est une des premières versions en format 16 bits. Ce format s'est donc imposé pour développer l'ensemble du logiciel de gestion. Sa mise au point, pour qu'il puisse être exécuté sur une plate-forme 32 bits comme l'OS WINDOWS 95, a nécessité de contourner des problèmes fréquents de compatibilité et de fiabilité, en particulier, dans la gestion dynamique de l'espace mémoire. Ce travail pourrait être poursuivi en utilisant une version 32 bits récente de cette bibliothèque nécessaire à la reconstruction du code de

l'ensemble du programme dans ce format, ce qui donnerait une meilleure robustesse au logiciel de gestion du microscope.

Un des atouts de ce logiciel est sa grande versatilité. Les fonctions de base de construction de l'image par balayage, de synchronisation du balayage et de l'acquisition des signaux pertinents (intensité de la fluorescence, spectre), ainsi que l'affichage constituent le noyau dur d'un système informatique de pilotage et d'acquisition auquel il est désormais possible d'adjoindre l'acquisition de signaux supplémentaires. Le pilotage informatique des montages expérimentaux diffère principalement par le contrôle spécifique des différents scanners qui, grâce au caractère modulaire du logiciel, ont pu être aisément intégrés, et par la gestion de signaux de caractères différents.

Depuis l'obtention des premiers résultats en imagerie spectrale de fluorescence, de telles extensions du montage et de son système de gestion ont été mises en œuvre pour adapter cet outil à l'analyse d'échantillons non fluorescents. Une extension récente permet par exemple de réaliser une analyse d'un échantillon par imagerie Raman « hyperspectrale ». Le signal acquis en tout point de l'image est un spectre Raman, enregistré sur une bande spectrale suffisamment étendue pour inclure plusieurs raies caractéristiques d'une espèce donnée ou pour englober des raies caractéristiques de plusieurs entités chimiques. Cette image constitue une image mère à partir de laquelle, il est possible de déterminer les zones de l'échantillon où les interactions entité-matrice sont suffisamment importantes pour modifier le spectre de référence de l'entité, en analysant la répartition d'intensité du signal dans des images filles construites en sélectionnant un domaine spectral particulier. Le même outil permet de déterminer la colocalisation de deux espèces avec une résolution spatiale de l'ordre de quelques centaines de nanomètres. Les espèces concernées sont actuellement des nanotubes de carbone.

Très récemment, j'ai commencé à implanter un diagnostic supplémentaire qui dépasse le caractère spectral de l'imagerie multidimensionnelle décrite précédemment pour y adjoindre une dimension temporelle. Cette nouvelle information est analysée a posteriori pour connaître la valeur des paramètres physico-chimiques des différentes molécules de l'image.

L'analyse repose sur une technique de comptage des photons individuels émis par la molécule excitée par un laser en impulsions picosecondes avec un taux de répétition de 76 MHz (technique voisine de la technique classique Time Correlated Single Photon

Counting). J'ai implanté un dispositif programmable commercial permettant d'enregistrer continûment, à la cadence de 3 MHz, le retard de chaque photon émis par rapport à l'instant d'arrivée de l'impulsion laser qui l'a créé, avec une résolution temporelle de 35 ps, et son instant « absolu » d'émission avec une résolution de 100 ns.

N'ayant pu obtenir jusqu'à présent, la bibliothèque informatique nécessaire à l'analyse des mesures, je n'ai pas pu intégrer les contrôles de ce dispositif dans le logiciel de gestion du microscope pour l'instant. Pour cette raison, ce travail n'a pas été décrit dans ce mémoire. Cependant j'ai développé un logiciel indépendant d'analyse numérique optimisé effectuant, a posteriori, un traitement des enregistrements acquis à partir du logiciel de base, fourni par le constructeur, pour extraire différents types d'informations tels que :

- L'histogramme des réponses transitoires d'émission donnant la probabilité, pour une molécule, d'émettre un photon en fonction de son retard avec l'excitation laser, et qui permet l'étude des durées de vie des émetteurs en fonction de leur position dans l'échantillon.

- Les fluctuations autour du taux moyen de fluorescence $\langle I_t \rangle$ en fonction du temps t qui sont déduites du calcul de la fonction d'autocorrélation d'intensité :

$$g_T = \langle I_t I_{(t+T)} \rangle / (\langle I_t \rangle \langle I_{(t+T)} \rangle).$$

Ces corrélations d'intensité permettent d'autres mesures comme celles du temps de diffusion d'une molécule dans un solvant ou celles des durées de vie d'états transitoires noirs (non fluorescents) de la molécule.

Ces aspects temporels élargissent le champ des problèmes analysables avec le microscope de champ proche développé. Ils sont en particulier précieux dans l'étude des phénomènes dynamiques liés aux interactions de la molécule avec son environnement. A terme, l'intégration des contrôles de cette électronique de mesures temporelles, du domaine des picosecondes, faciliterait le traitement statistique de nos enregistrements et augmenterait le potentiel d'analyse de cet outil d'imagerie multiparamètres.

-
- 1 E. Synge, «On a method for extending microscopic resolution», *Philosophical Magazine*, **6** 356-362, (1928).
 - 2 F. de-Fornel, L. Salomon, Y. Chen, *Proceedings-of-the-SPIE --The-International-Society-for-Optical-Engineering*. **2785** 313-21, (1996).
 - 3 G. Lampel, P. Bertrand, J. Peretti, V. I.Safarov, dans «Le champ proche optique», collection technique et scientifique des télécommunications, D. Courjon, C. Bainier, 153-6, (2000).
 - 4 M. Spager, «Les sondes optiques en champ proche», Ecole thématique «Optique du champ proche», La Londe les Maures, France, (2000).
 - 5 F. Zenhausern, M.P.O'Boyle et H.K. Wickramasinghe, *Appl. Phys. Lett.* **65**, 1623-5 (1994).
 - 6 A.C. Boccara, R. Bachelot, P. Gleyzes, *Appl. Phys. Lett.* **61**, 111-16, (1995).
 - 7 H. Furukawa, S. Kawata, «Local field enhancement with an apertureless near-field microscope probe», *Opt. Comm.* **148** 221-224, (1998).
 - 8 X. Xie, R.C. Dunn, «Probing single molecule dynamics», *Science* **265** 361-4, (1994).
 - 9 J. Azoulay, A. Debarre, P. Tchenio, «Field enhancement and apertureless near-field optical spectroscopy of single molecules», *Journal-of-Microscopy* **194**, 486-90, (1999).
 - 10 E.J. Sanchez, L. Novotny, X. Sunney-Xie, «Near-field fluorescence microscopy based on two-photon excitation with metal tips», *Phys. Rev. Lett.* **82** 4014, (1999).
 - 11 J. Azoulay, A. Debarre, A. Richard, P. Tchenio, «Quenching and enhancement of single-molecule fluorescence under metallic and dielectric tips», *Europhys. Lett.* **51**, 374-80, (2000).
 - 12 W.E. Moerner, M. Orrit, «Illuminating Molecules in Condensed Matter», *Science*, **283** 1670-1676, (1999).
 - 13 S. Weiss, «Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules», *Science*, **283**, 1676-1683, (1999).
 - 14 E. Betzig, «Proposed method for molecular optical imaging», *Optics-Letters*, **20** 237-9, (1995).

- 15 T. Ha, A.Y. Ting, J. Liang, A.A. Deniz, D.S. Chemla, P.G. Schultz, S. Weiss, «Temporal fluctuations of fluorescence resonance energy transfer between two dyes conjugated to a single protein», *Chemical-Physics*. **247**, 107-18, (1999).
- 16 «Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy», édité par T. Basché, W.E. Moerner, M. Orrit, et U.P. Wild (VCH, Weinheim, Germany, 1997).
- 17 S. Brasselet and W.E. Moerner, «Fluorescence Behavior of Single-Molecule pH-sensors Single Molecules», **1**, 15-21 (Inaugural issue, 2000).
- 18 K. Flora, J.D. Brennan, «Fluorometric Detection of Ca^{2+} Based on an Induced Change in the Conformation of Sol-Gel Entrapped Parvalbumin», *Anal. Chem.* **70** 4505-4513, (1998).
- 19 M.A. Bopp, G. Tarrach, M.A. Lieb, A.J. Meixner, «Super-resolution fluorescence imaging of single dye molecules in thin polymer films», *Journal-of-Vacuum-Science-&-Technology-A-(Vacuum,-Surfaces,-and-Films)*. **15**, 1423-6, (1997).
- 20 T. Schmidt, G.J. Schutz, W. Baumgartner, H.J. Gruber, H. Schindler, «Imaging of single molecule diffusion», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **9** 2926-29, (1996).
- 21 L. Cognet, G.S. Harms, G.A. Blab, P.H.M. Lommerse, T.Schmidt, *Appl.Phys.Lett.* **77**, 24, 4052-4, (2000).
- 22 J. Azoulay, A. Debarre, A. Richard, P. Tchenio, «Confocal observation of individual classes of single wall nanotubes by surface-enhanced Raman spectroscopy», *Journal-de-Physique-IV-(Proceedings)*, **10**, 223-6, (2000).
- 23 J. Azoulay, A. Debarre, A. Richard, P. Tchenio, S. Bandow, S. Iijima, «Polarised spectroscopy of individual single-wall nanotubes: radial-breathing mode study», *Europhys. Lett.* **53**, 407-13, (2001).
- 24 J. Azoulay, A. Debarre, R.Jaffiol, A. Richard, P. Tchenio, «Original diagnostics for single nanoobject spectroscopy», *Journal-of-Luminescence*. À paraître (2001).
- 25 P. Tchénio, «Spectroscopie de molécules uniques», Ecole thématique «Optique du champ proche», Lalonde les Maures (2000).
- 26 T. Wilson «Confocal microscopy», Edited by T. Wilson, Academic Press, London (1984).

-
- 27 T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, PR. Selvin, S. Weiss, « Single molecule dynamics studied by polarization modulation », *Phys. Rev. Lett.* **77** 3979-82, (1996).
- 28 T. Ha, T. A. Laurence, D. S. Chemla, and S. Weiss , «Polarization Spectroscopy of Single Fluorescent Molecules», *J. Phys. Chem. B* **103** 6839-6850, (1999).
- 29 Hamamatsu PhotonicsK.K., «One-dimensional PSDs».
- 30 Hamamatsu PhotonicsK.K., «Multi-elements Si Photodiodes».
- 31 S. Hell, G. Reiner, C. Cremer, E.H.K. Stelzer, *J.Micoscopy* **169**:391 – 405, (1993).
- 32 U. Dürig et al., *J. Microscopy Part I* **152**, 259, (1988).
- 33 E. Betzig, P.L. Fin, J.S. Weiner, *Appl. Phys. Lett.* **60**, 2484, (1992).
- 34 A.Dhirani, A.J. Fisher, & P. Guyot-Sionnest, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 8, (1996).
- 35 J. Azoulay, A. Debarre, A. Richard et P. Tchenio, «Optical contrast in apertureless microscopy», *Appl. Opt.* **39** 129-34, (2000).
- 36 Burr-Brown Corporation, OPA111 data sheet PDS-526K, (1995).
- 37 Burr-Brown Corporation, *Applic. Bulletin – 075*, (1995).
- 38 R. Toledo-Crow, P.C. Yang, Y. Chen, M. Vaez-Iravani, *Appl. Phys. Lett.* **60**, 2957, (1992).
- 39 R.D. Grober, T.D. Harris, J.K. Trautman, E. Betzig, *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 626, (1994).
- 40 K.Karrai, R.D. Grober, *Appl. Phys. Lett.* **66**, 1842, (1995).
- 41 R.S. Decca, H.D. Drew, K.L. Empson, *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 1291, (1997).
- 42 J.W.P. Hsu, M. Lee, B.S. Deaver, *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 3117, (1995).
- 43 J. Barenz, O. Hollricher, O. Marti, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 1912, (1996).
- 44 A. Dräbenstedt, J. Wrachtrup, C. von Borczyskowski, *Appl. Phys. Lett.* **68**, (1996).
- 45 Debarre-A, Richard-A, Tchenio-P, «High-contrast piezoelectric fiber resonance detection for near-field optical microscopy», *Review-of-Scientific-Instruments.* **68**, 4120-3, (1997).
- 46 Debarre-A, Richard-A, Tchenio-P, «Optical and piezoelectric shear-force controls designed for cryogenic environment», *Journal-of-Luminescence.* **76-77**, 303-5, (1998).

-
- 47 Buzzer type EI-242-B fournit par Euroind.
- 48 J.E. Sader. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *J. Appl. Phys.* **84**(1), 64-76, (1998).
- 49 Linear Technology, LTC1051, data sheet 2-306 (1996).
- 50 Burr-Brown Corporation, OPA2277, PDS-1413C, (1998).
- 51 Analog Devices, AD734, «4 Quadrant Multiplier/Divider», Rev. B.
- 52 Murata Manufacturing Co.,Ltd., Piezoelectric ceramic sensors, (1995).
- 53 Philips Component, Technical information piezo ceramic products (2000).
- 54 K. Besocke, J. Frohn, J. F. Wolf and N. Teske, *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 1200, (1989).
- 55 K. Lieberman, Nilly Ben-Ami and Aaron Lewis, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 10, (1996).
- 56 D. W.Pohl, *Rev. Sci. Instrum.* **58**, 54, (1987).
- 57 M. G. Rozman, M. Urbakh, and J. Klafter, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 683, (1996).
- 58 P.Olivier, « Développer en langage C », Micro Application (1987).
- 59 Princeton Instrument, « P.I. General Command Library Programming Manual », (1996).
- 60 Borland C++, « guide du programmeur », (1995).
- 61 G.Lebanc, « Borland C++ version 5 », Eyrolles (1996).
- 62 H.Tornsdorf, M.Tornsdorf, « MS – DOS 5.0 », Micro Application, (1992).
- 63 J.Richter, « Développer sous Windows 95 », Microsoft Press (1995).
- 64 Crocus, J.Bellino et al. « Systèmes d'exploitation des ordinateurs », DUNOD, (1985).
- 65 K.Hazzah, « Writing Windows VxDs and Device Drivers », R&D Books, (1997).
- 66 W.H.Press, S.A.Teukolsky, W.T.Vetterling, B.P.Flannery, « Numérical recipes in C », Cambridge University Press, (1996).
- 67 B. Hecht, H. Bielefeld, Y. Inouye, D. W. Pohl and L. Novotny, *J. App. Phys.* **81**, 2492 (1997).
- 68 N. M. Sijtema, S. D. Wouters, C. J. de Grauw, C. Otto and J. Greve, *Appl. Spectroscopy* **52**, 348 (1998).

- 69 C. J. L. Constantino, R. F. Aroca, C. R. Mendonça, S. V. Mello, D.T. Balogh and O. N. Oliveira Jr, *Spectrochimica Acta A* **57**, 281 ((2001).
- 70 L. Markwort and B. Kip, *J. of Appl. Polymer Science* **61**, 231 (1996).
- 71 Y. Batonneau, C. Brémard, J. Laureyns and J. C. Merlin, *J. of Raman Spectroscopy* **31**, 1113 (2001).
- 72 N. Bendiab, A. Righi, E. Anglaret, J. L. Sauvajol, L. Duclaux and F. Béguin, *Chem. Phys. Lett.* **339**, 305 (2001).
- 73 A. M. Rao, P. C. Eklund, S. Bandow, A. Thess and R. E. Smalley, *Nature* **388**, 257 (1997).



Résumé :

L'étude optique d'objets individuels de taille nanométrique (nanoobjets) suppose de développer des outils de sélection spatiale et d'analyse optique à des échelles « ultimes ».

J'ai réalisé un dispositif dédié à ce type d'études, en combinant la microscopie optique en champ proche à balayage et des méthodes spectroscopiques de fluorescence ou de diffusion Raman. Les informations sur les nanoobjets sont obtenues par imagerie optique hyperspectrale. En chaque point exploré de l'échantillon sont acquis le flux total du signal émis et son spectre enregistré sur un grand domaine spectral. J'ai élaboré à cet effet des dispositifs instrumentaux spécifiques parmi lesquels un capteur de distances nanométriques original, de type « shear-force », entièrement électrique. Le balayage de l'échantillon est assuré par un scanner de 50 μm de dynamique que j'ai réalisé à l'aide d'actionneurs piézoélectriques. L'hystérésis est compensée par un capteur optique de positions indispensable au repositionnement précis d'un objet dans la zone d'excitation de champ proche. Ce dernier a une résolution de 30 nm. Pour mesurer les faibles signaux optiques, j'ai développé deux chaînes de mesures. La mesure de fluorescence totale est effectuée par un module de détection de photons (SPCM) pour lequel j'ai réalisé une interface programmable de mesure. La mesure spectrale est obtenue par une caméra CCD sensible associée à un spectrographe.

J'ai développé sous Windows 95, un logiciel en langage C++ qui pilote les opérations d'acquisition des signaux lors de la construction des images. Une interface graphique interactive assure la saisie des paramètres d'acquisition, la présentation en temps réel des images et des signaux mesurés, l'enregistrement et le stockage des données. Les fonctions numériques du logiciel qui traitent les informations multidimensionnelles des images hyperspectrales apportent la puissance de mesure attendue dans ce domaine de la nanospectroscopie.

Abstract

Optical studies of single nanoobjects imply the development of tools allowing a high spatial selection and of high optical sensitivity.

I have implemented a set-up dedicated to such studies, by combining scanning near-field optical microscopy and fluorescence or Raman spectroscopy. The analysis of single nanoobject properties is derived from hyperspectral optical imaging. Both the total intensity of the emitted signal and its spectrum are recorded at each location of the probed sample area. For that purpose, I have built specific devices, among which an original all electric sensor to measure distances in the nanometer range. It is based on shear force principle. The movement of the sample is obtained with a 50 μm dynamical range flat scanner including piezoelectric tubes. An optical sensor, that I have developed, controls the scanner displacement in order to compensate the scan for the piezotube hysteresis. This control allows us to ensure a satisfying repositioning of the nanoobject in the near-field region. This optical sensor has a 30nm resolution. In order to measure the weak optical signals, I have implemented two different schemes for measurements. The detection of the fluorescence intensity is ensured by a single photon counting module (SPCM) that I have interfaced. Spectral recording is done by a standard spectrometer associated to a highly sensitive CCD camera.

I have built a C++ software, under Windows 95 operating system, which drives signal acquisition during imaging. An interactive graphic interface allows one to select the acquisition parameters, to display images and measures in real time, to record and to store data. I have added simple numerical treatments to the software in order to get a powerful tool devoted to nanospectroscopy.