

50376
1987
283

N° d'ordre : 161

50376
1987
283

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

Mention : SPECTROCHIMIE

par

Jean Paul CORNARD



CONCEPTION ET REALISATION D'UN PROTOTYPE DE MICROSPECTROFLUORIMETRE
MULTICANAL A EXCITATION LASER DANS LE DOMAINE DE L'ULTRA-VIOLET

Soutenu le 29 Octobre 1987 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	MM. M.BRIDOUX	Président
	P.DHAMELINCOURT	Rapporteur
	E.DA SILVA	Rapporteur
	J.CORSET	Examineur
	C.SANDORFY	Examineur
	J.BARBILLAT	Examineur

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un Groupement d'Intérêt Public (G.I.P.) "Instrumentation et Spectrométrie". Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur DELHAYE, Directeur d'Institut au C.N.R.S. et président du G.I.P., pour l'intérêt soutenu qu'il a manifesté à l'égard de ce travail.

Je remercie Monsieur J.CORSET, directeur du LASIR, d'avoir encouragé et soutenu notre entreprise ; ainsi que pour l'honneur qu'il me fait de juger ce travail.

J'adresse, également mes plus vifs remerciements à Monsieur M.BRIDOUX, professeur à l'I.U.T. de Béthune, qui m'a initié aux techniques de spectrométrie multi-canal. J'ai toujours trouvé auprès de lui les encouragements et les conseils qui m'ont permis de mener à terme cette étude.

J'ai bénéficié des travaux antérieurs, en micro-analyse, de Monsieur P.DHAMELINCOURT, professeur à l'I.U.T. de Lille et de Monsieur J.BARBILLAT, chargé de recherches au C.N.R.S., avec qui j'ai eu de longues et fructueuses discussions. Je tiens à leur exprimer mes très sincères remerciements.

Monsieur E.DA SILVA, Directeur de la société DILOR, a bien voulu juger ce travail après m'avoir aidé dans l'élaboration du prototype. Sa grande expérience dans le domaine de l'instrumentation m'a beaucoup aidé, qu'il veuille bien trouver ici toute ma gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur qu'a bien voulu me faire Monsieur C.SANDORFY, professeur à l'Université de Montréal, en acceptant de faire partie de mon jury de thèse et d'apporter à cette étude la caution de sa haute autorité scientifique. Je lui adresse mes sincères remerciements.

Je ne saurai bien sûr oublier tous les membres du LASIR avec qui j'ai collaboré et qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail ; notamment Messieurs R.DEMOL et B.PAPILLON ; ainsi que l'équipe technique de la Société DILOR . Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amitié.

Enfin je remercie tout particulièrement Mesdames G.PETIT et C.DESCAMPS pour le soin qu'elles ont apporté à la dactylographie de ce mémoire, ainsi que Monsieur J.P.LABAEYE qui a exécuté les schémas .

SOMMAIRE

	P.
INTRODUCTION	8
CHAPITRE I : METHODES D'ANALYSE DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE	10
I.1. - EMISSION DE FLUORESCENCE	12
I.1.1. Rappel spectroscopique.....	12
I.1.2. Aspect quantitatif de l'émission de fluorescence	14
I.1.2.1. Intensité de fluorescence	14
I.1.2.2. Facteurs intervenant dans les mesures de fluorescence	16
I.1.3. Durée de vie de l'émission de fluorescence	16
I.2.- INSTRUMENTS UTILISES EN SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE	17
I.2.1. Instruments conventionnels.....	17
I.2.1.1. Principes généraux du fluorimètre.....	17
I.2.1.2. Système de détection	24
I.2.1.3. Evolution des spectrofluorimètres	26
I.2.2. Microfluorimètre	31
I.3.- UTILISATION DU LASER COMME SOURCE D'EXCITATION	36
I.3.1. Avantages des sources lasers	36
I.3.2. Perturbation de l'échantillon par l'excitation.....	37
I.3.2.1. Echauffement	37
I.3.2.2. Décroissance de la fluorescence.....	38

I.4.- PREMIER PROTOTYPE DE MICROSPECTROFLUORIMETRE	39
REALISE AU G.I.P.	
I.4.1. <i>Description de l'appareil</i>	40
I.4.2. <i>Performances et limitations de l'appareil</i>	44
I.5.- CONCEPTION D'UN SECOND PROTOTYPE	49
CHAPITRE II : CONCEPTION DU SYSTEME DISPERSIF DU MICROSPECTRO- FLUORIMETRE - DESCRIPTION DU DETECTEUR MULTICANAL	50
II.1.- CONFIGURATION DU SPECTROGRAPHE	54
II.1.1. <i>Caractéristiques d'un monochromateur</i>	54
II.1.2. <i>Principaux types de monochromateurs à réseaux plans</i>	58
II.1.3. <i>Association de monochromateurs</i>	61
II.1.4. <i>Choix de la configuration du spectrographe</i>	66
II.2.- CHOIX DES DISPERSEURS	70
II.2.1. <i>Réseaux de diffraction</i>	70
II.2.2. <i>Prismes</i>	76
II.2.2.1. <i>Etude du prisme</i>	76
II.2.2.2. <i>Choix de la substance constituant les prismes</i>	79
II.2.2.3. <i>Choix de l'angle du prisme</i>	85
II.2.2.4. <i>Perte de flux lumineux provoquée par l'utilisation de prismes</i>	86
II.2.2.5. <i>Performances du spectrographe équipé de prismes</i>	91
II.3.- REALISATION MECANIQUE	93
II.3.1. <i>Bâti et support miroir</i>	93
II.3.2. <i>Fentes</i>	93

II.3.3. Mécanisme de balayage	94
II.4.- DISPOSITIF DE CALIBRATION EN LONGUEUR D'ONDE	99
II.5.- DETECTION MULTICANALE ET INFORMATIQUE ASSOCIEE.....	102
II.5.1. Tube intensificateur d'images	102
II.5.2. Barrette de photodiodes et électronique associée	104
II.5.3. Informatique.....	106
 CHAPITRE III : COUPLAGE OPTIQUE DU MICROSCOPE AU SYSTEME DISPERSIF	108
 III.1.- CONSTITUTION DU MICROSCOPE	109
III.1.1. Généralités	109
III.1.2. Différents constituants optiques du microscope.....	111
III.1.2.1. Optique du corps du microscope.....	111
III.1.2.2. Objectifs	112
III.1.3. Modes d'éclairage	114
III.1.3.1. Eclairage par transmission	114
III.1.3.2. Dispositif d'excitation de la fluorescence.....	114
en lumière réfléchie	
 III.2.- LASER D'EXCITATION	117
 III.3.- ROLE DU DISPOSITIF OPTIQUE DE COUPLAGE.....	118
 III.4.- EXPLORATION SPATIALE DE L'ECHANTILLON.....	119
III.4.1. Intérêt de l'exploration spatiale	119
III.4.2. Mode d'exploration de l'échantillon	119

III.4.2.1. Analyse séquentielle de différents points.....	119
de la préparation	
III.4.2.2. Analyse selon une ligne.....	120
III.4.2.2. Reconstruction d'images bidimensionnelles.....	120
III.4.3. Techniques d'exploration	121
III.4.3.1. Déplacement de la platine porte-échantillon.....	121
III.4.3.2. Déplacement du faisceau laser.....	122
III.4.3.3. Dispositif de couplage permettant une exploration.....	123
spatiale, employé dans le premier prototype.....	
III.5.- CHOIX DE L'OPTIQUE DE COUPLAGE.....	124
III.5.1. Problèmes posés par les aberrations chromatiques.....	124
III.5.2. Recherche de l'achromatisme	125
III.5.3. Principe du balayage au moyen de l'optique à miroir.....	125
III.6.- REALISATION DE L'OPTIQUE DE COUPLAGE.....	127
CHAPITRE IV : ETUDE DES PERFORMANCES DE L'APPAREIL	133
IV.1.- EVALUATION DU SYSTEME DISPERSIF.....	135
IV.1.1. Clichés photographiques du plan focal du spectrographe.....	135
IV.1.2. Enregistrement du spectre d'une lampe néon.....	138
IV.2.- SPECTRES DE FLUORESCENCE	138
IV.2.1. Spectres de fluorescence de molécules excitées dans le.....	138
domaine du visible	
IV.2.2. Spectres de fluorescence de molécules excitées dans le.....	142
domaine de l'ultra-violet	

IV.3.- SPECTRES RAMAN	145
IV.3.1. <i>Etude du domaine des basses fréquences</i>	145
IV.3.2. <i>Influence du temps d'intégration</i>	148
IV.3.3. <i>Spectre Raman de l'eau</i>	149
IV.4.- ETUDE DE LA PROFONDEUR DE CHAMP VUE PAR LE	152
SPECTROGRAPHE	
IV.4.1. <i>Mesure de la profondeur de champ</i>	152
IV.4.2. <i>Influence du diaphragme sur la profondeur de champ</i>	156
I.5.- COMPARAISON DE L'EXCITATION LASER AVEC L'EXCITATION	159
PHOTONIQUE PAR ARC	
IV.5.1. <i>Eclairage global du champ microscopique</i>	159
IV.5.2. <i>Eclairage ponctuel du champ microscopique</i>	160
CONCLUSION	164
BIBLIOGRAPHIE	166

INTRODUCTION

Dans le domaine physicochimique, les méthodes optiques ont l'avantage d'être des méthodes d'analyse susceptibles d'identifier un grand nombre d'espèces moléculaires, et de suivre qualitativement et quantitativement les variations de leurs concentrations dans un milieu sans le perturber.

L'utilisation récente des lasers en chimie analytique a considérablement amélioré les performances des méthodes spectroscopiques. Tout comme la spectrométrie de diffusion Raman, la spectrofluorimétrie bénéficie des avantages apportés par l'excitation du milieu à analyser par le laser.

La spectrofluorimétrie a longtemps été une méthode analytique employée par le chimiste travaillant sur des composés organiques qui constituent l'essentiel des matériaux fluorescents. Depuis quelques années, de nombreux domaines scientifiques portent un intérêt croissant à l'émission de fluorescence. C'est le cas notamment du domaine de la biologie. L'étude de micro-échantillons, atteignant la dimension cellulaire, par microspectrométrie optique constitue un thème de recherche en plein développement.

Les mesures de fluorescence sur des substances microscopiques sont souvent délicates à cause des très faibles signaux qu'il y a lieu de détecter. La solution qui consiste à utiliser une source d'excitation lumineuse très intense conduit à des modifications photochimiques du composé, et n'est pas idéale. Le meilleur compromis semble être l'association d'une source d'excitation d'intensité modérée et d'un système de détection très sensible. Le détecteur multicanal couplé à un tube intensificateur d'images constitue un dispositif de très grande sensibilité. De plus, ce type de détecteur permet l'enregistrement simultané d'un nombre important d'éléments spectraux en un temps très court et a par conséquent l'avantage de limiter le temps d'irradiation de la préparation.

Dans le cadre d'un Groupement d'Intérêt Public (G.I.P.) intitulé "Instrumentation et Spectrométrie" regroupant le C.N.R.S. (L.A.S.I.R.), l'Université des Sciences et Techniques de Lille ainsi que la Société DILOR, nous avons entrepris l'étude et la réalisation d'un microspectrofluorimètre multicanal à excitation laser dans le domaine de l'ultra-violet.

Cet appareil est destiné non seulement à l'étude de la fluorescence d'espèces chimiques ou biologiques, mais aussi à l'obtention de spectres Raman.

Dans un premier chapitre, après avoir rappelé brièvement les principes fondamentaux de l'émission de fluorescence, nous présentons les différents éléments entrant dans la constitution d'un fluorimètre. Nous décrivons également et citons les limitations de quelques appareils existants, et notamment le premier prototype de microspectrofluorimètre qui a été réalisé au G.I.P.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude et à la réalisation du système dispersif de l'instrument, ainsi qu'à la détection multicanale des signaux de fluorescence ou Raman. Nous mettons l'accent d'une part sur le choix des disperseurs et d'autre part sur la mécanique de positionnement des disperseurs qui a été réalisée.

Le troisième chapitre de ce mémoire a trait au dispositif optique de couplage microscope-spectromètre. Après une description du microscope à fluorescence, nous exposons la solution optique qui a été retenue pour le couplage, et nous citons les avantages qu'apporte l'analyse spatiale de l'échantillon sous microscope.

Enfin, dans un dernier chapitre, nous abordons les différents tests qui ont été effectués afin d'évaluer les performances de l'appareil, et nous présentons quelques spectres de fluorescence et de diffusion Raman obtenus au moyen de celui-ci.

CHAPITRE I

METHODES D'ANALYSE DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE

La première partie de ce chapitre est consacrée à quelques rappels théoriques concernant l'émission de fluorescence .

Nous décrivons ensuite les différents éléments de tout spectromètre de fluorescence .

Nous insistons notamment sur les avantages qu'apportent, une détection multicanale pour l'enregistrement de signaux à bas niveau lumineux, ainsi que l'utilisation de laser comme source d'excitation .

Nous détaillons quelques types de spectrofluorimètres et microspectrofluorimètres qui présentent des originalités sur le plan instrumental .

Enfin nous abordons, plus en détail, la description du premier prototype de microspectrofluorimètre qui a été réalisé dans le cadre du G.I.P. , et nous expliquons les raisons qui nous ont conduits à réaliser une seconde version .

L'interaction de la lumière avec des molécules M peut être schématisée par trois processus essentiels, un processus d'absorption et deux processus diffusionnels (Fig. 1).

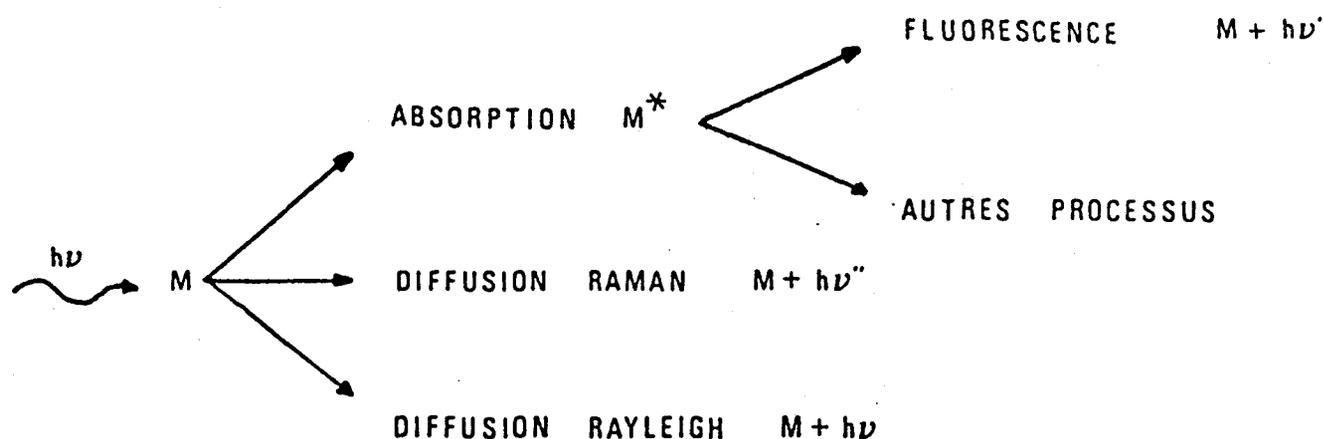


FIG.1 : Processus intervenant lors de l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière

L'état électroniquement excité M^* produit par l'absorption de la lumière, est très instable. L'énergie absorbée par la molécule excitée est restituée au milieu extérieur suivant différents processus de désactivation compétitifs qui dépendent de la nature de l'espèce chimique. Parmi les processus de désactivation, on peut citer :

- les pertes d'énergie par dissociation de la molécule
- le transfert d'énergie à une autre molécule
- le transfert d'énergie au milieu ambiant sous forme de chaleur par un mécanisme non radiatif
- les pertes d'énergie lumineuse : fluorescence ou phosphorescence, mécanismes radiatifs avec changement de longueur d'onde.

La diffusion Raman correspond à une émission lumineuse dont les longueurs d'onde sont différentes de celle de l'excitatrice. Les écarts en fréquence observés, indépendants du choix de la radiation excitatrice, correspondent aux fréquences de vibration de l'édifice polyatomique éclairé.

La diffusion Rayleigh qui correspond à la lumière diffusée, dans toutes les directions de l'espace, à la même longueur d'onde que le rayonnement incident. La diffusion Rayleigh constitue un rayonnement parasite qu'il y a lieu d'éliminer pour observer, dans les meilleures conditions possibles, les phénomènes de diffusion Raman et de fluorescence.

I.1. - EMISSION DE FLUORESCENCE

I.1.1. Rappel spectroscopique

La longueur d'onde d'excitation de la fluorescence doit être comprise dans un domaine correspondant à une bande d'absorption intense du composé fluorescent. Selon la molécule étudiée, cette bande d'absorption peut se trouver dans le domaine du visible ou dans celui de l'ultra-violet.

Une molécule interagissant avec une radiation lumineuse de fréquence appropriée (ν_0) peut absorber le quantum $h\nu_0$ correspondant et effectuer une transition de son état fondamental S_0 vers un premier état électronique excité S_1 (état singulet), ou plus précisément vers certains niveaux vibrationnels de cet état, S_{1v} (Fig. 2).

La molécule excitée ne reste pas sur le niveau vibrationnel S_{1v} . Lors des collisions avec d'autres molécules non excitées voisines, la molécule transfère son énergie vibrationnelle à une autre molécule, et elle revient sans émettre de radiation à l'état vibrationnel $v = 0$ de l'état excité $S_{1v=0}$. Ce processus de relaxation vibrationnelle a une durée inférieure à 10^{-13} secondes.

La molécule se trouve encore dans un état d'énergie élevée, donc thermodynamiquement instable. Divers processus de désactivation de la molécule peuvent être envisagés. La désactivation radiative par émission de fluorescence est le processus le plus probable. La molécule va revenir dans un état vibrationnel v de l'état fondamental (S_{0v}) en émettant un photon de fréquence . La durée de vie de l'état singulet excité ($S_{1v=0}$) est de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-7} seconde, et la durée de décroissance de la fluorescence est du même ordre de grandeur.

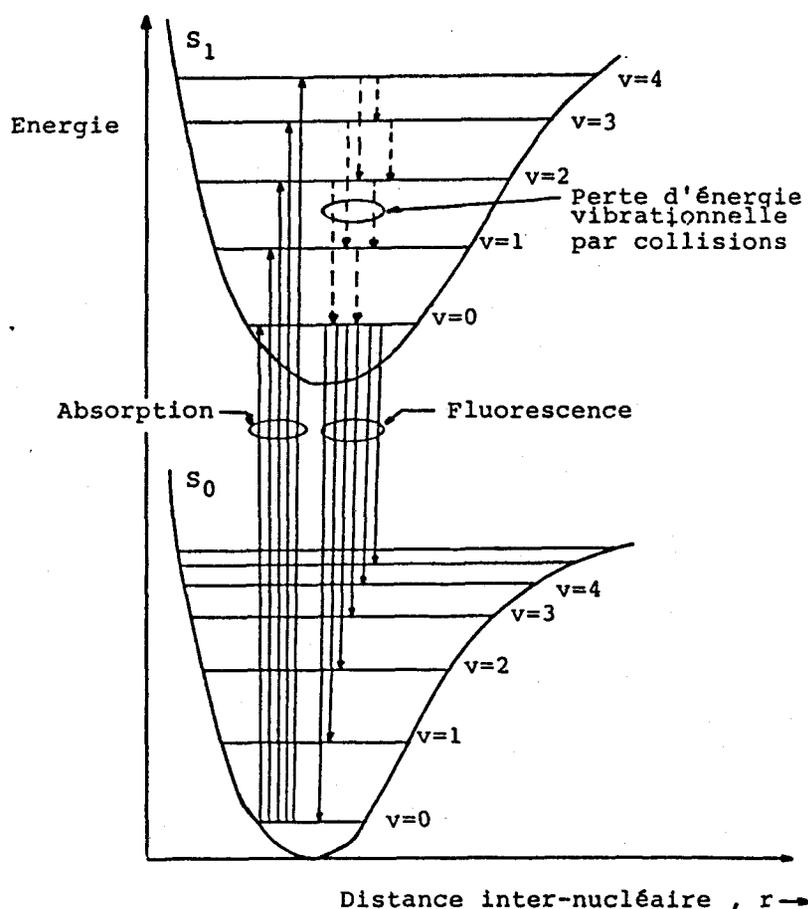
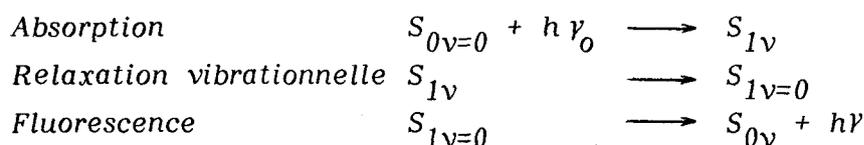


FIG.2 : Courbes d'énergie potentielle et transitions intervenant dans le processus de fluorescence

On peut résumer les différentes étapes intervenant dans le processus de fluorescence de la manière suivante :



La molécule ayant perdu de l'énergie lors de la relaxation vibrationnelle, l'énergie lumineuse de fluorescence $h\nu$ sera inférieure à celle de l'excitation, ce qui explique que l'on observe un déplacement vers les grandes longueurs d'onde du spectre de fluorescence par rapport au spectre d'absorption (loi de Stokes).

Le spectre de la lumière émise par fluorescence est caractéristique de la substance analysée. Dans le cas des gaz, ou de certains solides (ex : terres rares), la lumière émise est constituée de bandes résolues en raies ; dans le cas général des liquides ou des solides, le spectre de la lumière émise s'étend de manière continue sur un intervalle spectral de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. La répartition de l'énergie rayonnée entre les différentes longueurs d'onde de cette bande est indépendante de la longueur d'onde de la lumière excitatrice.

I.1.2. - Aspect quantitatif de l'émission de fluorescence

I.1.2.1. Intensité de fluorescence

Pour une radiation excitatrice et des conditions d'observation données, l'intensité de la lumière émise par fluorescence est proportionnelle à l'intensité de la lumière excitatrice [1-2].

Si on néglige les phénomènes d'auto-absorption et d'extinction de la fluorescence par l'ensemble des molécules constituant l'échantillon, il y a proportionnalité entre l'intensité de fluorescence I_F et le nombre de photons absorbés par seconde, et l'on peut écrire :

$$I_F = (I_0 - I) \cdot q \quad (1)$$

I_0 étant l'intensité du faisceau incident, I l'intensité du faisceau transmis et q le rendement quantique défini comme le rapport du nombre de photons émis par fluorescence sur le nombre de photons absorbés.

La loi de Beer-Lambert permet de relier I et I_0 :

$$I = I_0 \cdot e^{-2,3 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l} \quad (2)$$

Avec :

- ϵ : Coefficient d'extinction molaire (litre.mole⁻¹.cm⁻¹)
 c : Concentration de la substance fluorescente (mole.litre⁻¹)
 l : La profondeur de la solution traversée par I_0 (cm).

Ce qui conduit à la relation :

$$I_F = q \cdot I_0 \cdot (1 - e^{-2,3 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l}) \quad (3)$$

Le développement limité de cette formule donne :

$$I_F = q \cdot I_0 \cdot (2,3 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l) \left[1 - \frac{2,3 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l}{2} + \frac{(2,3 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l)^2}{6} \dots \right] \quad (4)$$

Lorsque $\epsilon \cdot c \cdot l$ est faible, la relation (4) se réduit à :

$$I_F = q \cdot I_0 \cdot (2,3 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l) \quad (5)$$

Dans le cas où $\epsilon \cdot c \cdot l$ est faible, l'équation fondamentale (5) donnant l'intensité de fluorescence d'une solution diluée, montre qu'il existe une relation linéaire entre l'intensité de fluorescence et la concentration, donc le nombre de molécules contenues dans le volume fluorescent.

D'autre part, à très haute intensité d'excitation, un phénomène de saturation intervient : toutes les molécules fluorescentes dans l'élément de volume irradié sont excitées et l'intensité de fluorescence devient indépendante de l'intensité d'excitation ; les équations précédentes ne sont plus valables.

I.1.2.2. Facteurs intervenant dans les mesures de fluorescence

De nombreux facteurs peuvent intervenir sur l'intensité de l'émission de fluorescence [3] :

- Le pH de la solution qui affecte le coefficient d'extinction molaire.
- La température. Le rendement quantique q dépend du "quenching" collisionnel qui est relatif à la viscosité du solvant. Dans la majorité des cas, une augmentation de la température conduit à une diminution du rendement quantique.
- La réabsorption de la lumière émise. Ce phénomène perturbe le spectre d'émission dans la région proche de la bande d'absorption surtout lorsque la concentration des molécules fluorescentes est élevée.
- L'effet d'écran interne. Des molécules non fluorescentes peuvent absorber la radiation excitatrice ce qui a pour effet de constituer un écran pour les molécules fluorescentes.
- La formation d'un dimère dont la bande d'absorption peut différer considérablement de celle du monomère.
- La photodécomposition. Cet effet conduit à une décroissance de l'intensité de fluorescence, ainsi qu'à une distorsion du spectre.

Ces différents phénomènes rendent difficiles les mesures quantitatives absolues en spectrométrie de fluorescence. La détermination de la concentration d'espèces chimiques en solution se fait généralement après un étalonnage à l'aide de solutions de concentration connue.

I.1.3. - Durée de vie de l'émission de fluorescence

Le phénomène de fluorescence n'est pas caractérisé uniquement par le spectre d'émission mais aussi par le temps de décroissance qui permet d'accéder à la durée de vie de la molécule excitée.

L'intensité de la radiation de fluorescence, après avoir coupé la radiation excitatrice, varie en fonction du temps suivant l'équation :

$$I(t) = I(0) e^{-t/\tau} \quad (6)$$

où $I(t)$ et $I(0)$ représentent respectivement les intensités au temps t et au temps $t = 0$; τ est la période de décroissance de fluorescence, c'est à dire le temps au bout duquel $I(t)$ a atteint la valeur $\frac{I(0)}{e}$. La valeur de τ est comprise entre 10^{-9} et 10^{-6} seconde et peut être déterminée directement en utilisant une excitation pulsée et en observant la décroissance radiative qui suit la fin de l'impulsion d'excitation.

L'étude de la durée de vie de l'état excité donne de nombreux renseignements concernant la cinétique des réactions intermoléculaires telle que la formation de dimères, d'excimères ou de transferts d'énergie, etc...

De nombreux travaux [4 à 9] nécessitant des appareils très sophistiqués, ont été réalisés afin de mesurer la durée de vie des états excités, donnant ainsi une information à la fois sur la molécule fluorescente et sur son environnement.

I.2. - INSTRUMENTS UTILISES EN SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE

I.2.1. Instruments conventionnels

I.2.1.1. Principes généraux du fluorimètre

Les éléments de base (Fig. 3) de tout appareil destiné à l'étude de l'émission de fluorescence sont :

- la source d'excitation
- la cellule contenant l'échantillon
- les filtres d'excitation et d'émission
- le système de détection.

On appelle fluorimètres les appareils qui utilisent des filtres optiques pour sélectionner les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ; et spectrofluorimètres les appareils qui comportent deux monochromateurs.

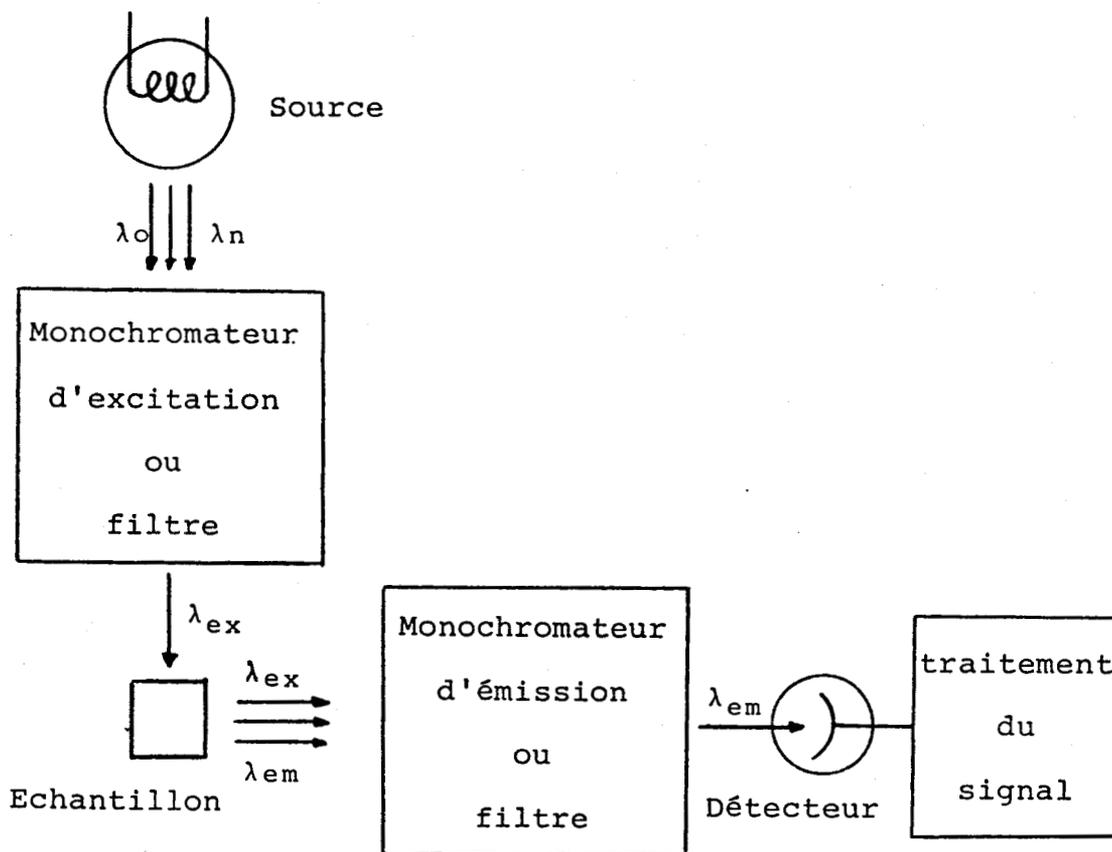


FIG.3 : Différents constituants d'un spectrofluorimètre



a) La source

La source est habituellement, soit une lampe à mercure, soit une lampe au xénon. La lampe à mercure a l'avantage de fournir des raies d'émission de très forte intensité ; l'intensité de l'arc au xénon est comparativement plus faible mais elle est plus uniforme sur la gamme de fréquences la plus communément utilisée (proche ultra-violet et visible). Le principal problème posé par l'utilisation de ces lampes est la décroissance de l'intensité d'émission avec le temps d'utilisation qui nécessite, très souvent, d'apporter des corrections au moyen de photodétecteurs de référence. La mesure de l'intensité lumineuse d'excitation au moyen d'un photodétecteur de référence permet également de normaliser les spectres lorsque l'on change de longueur d'onde d'excitation.

b) Filtre d'excitation

La sélection de la radiation excitatrice qui est envoyée sur l'échantillon peut se faire au moyen d'un filtre optique ou d'un monochromateur. L'avantage majeur du filtre est qu'il permet le passage d'une grande intensité lumineuse, néanmoins le manque de sélectivité spectrale du filtre est un inconvénient considérable, aussi la plupart des instruments commerciaux sont équipés d'un monochromateur d'excitation.

c) Géométrie excitation-collection

Pour illuminer la solution, la lumière excitatrice doit traverser les fenêtres de la cellule contenant l'échantillon. Le choix du matériau constituant la cellule est alors très important, il ne faut pas que celui-ci absorbe à la longueur d'onde d'excitation. Il est nécessaire, pour travailler dans le domaine de l'ultra-violet, d'utiliser des cuves en quartz.

Trois arrangements sont possibles pour placer la cellule par rapport à l'excitation et à la détection (Fig. 4).

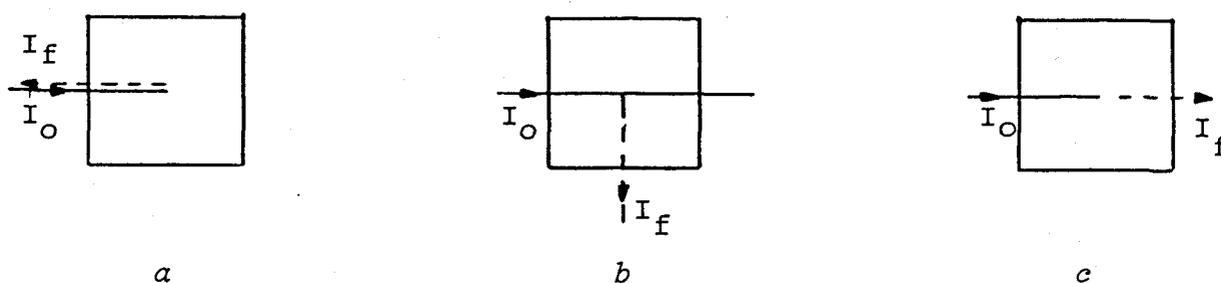


FIG.4 : Méthodes d'excitation - collection de la lumière réémise

- a) frontale (à 180°)
- b) à angle droit
- c) à 0°

Nous avons calculé, pour les trois configurations possibles, l'intensité de fluorescence observée en fonction de la concentration d'une espèce moléculaire en solution, en tenant compte des phénomènes d'absorption du faisceau d'excitation et de réabsorption de la lumière émise par fluorescence.

Pour simplifier notre modèle, nous avons considéré une excitation linéaire obtenue au moyen d'un faisceau laser, ce qui représente une approximation, dans une cuve parallélépipédique de section carrée.

Compte-tenu de l'absorption du rayonnement d'excitation, l'intensité du faisceau laser I_x au point de coordonnée x à l'intérieur de l'échantillon est donnée, dans les trois cas, par la relation :

$$I_x = I_0 \cdot e^{-2,303 \cdot \epsilon_0 \cdot c \cdot x} \quad (7)$$

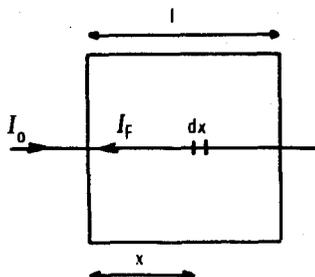
avec :

I_0 : l'intensité du faisceau laser d'excitation

ϵ_0 : le coefficient d'extinction molaire correspondant à la fréquence d'excitation

c : la concentration de l'espèce fluorescente.

Dans le cas de la méthode frontale, l'intensité de fluorescence observée dans une direction opposée à la direction de propagation du faisceau laser et provenant d'un élément dx situé sur le trajet du faisceau d'excitation, à la profondeur x , est égale à :



$$dI_F = K \cdot I_x \cdot q \cdot c \cdot e^{-2,303 \cdot \epsilon \cdot c \cdot x} dx \quad (8)$$

K = constante dépendant de la géométrie de collection de la lumière de fluorescence

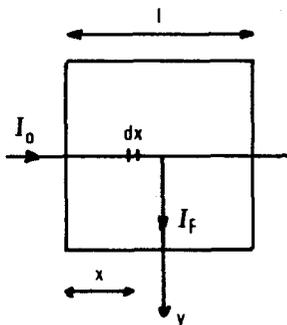
ϵ représentant le coefficient d'extinction molaire correspondant à la fréquence d'analyse, et q un facteur de proportionnalité faisant intervenir le rendement quantique de fluorescence.

L'intégration suivant x , (de 0 à l) de l'équation (8) conduit à la relation :

$$I_F = \frac{K \cdot I_0 \cdot q \cdot (1 - e^{-2,303 \cdot (\epsilon_0 + \epsilon) \cdot c \cdot l})}{2,303 \cdot (\epsilon_0 + \epsilon)} \quad (9)$$

l correspondant à la longueur de la cuve.

Pour une géométrie excitation-collection à angle droit, on obtient :



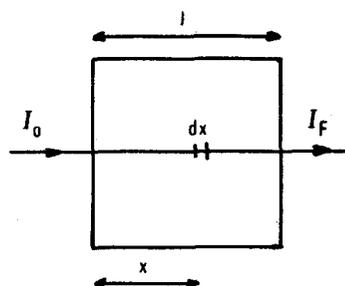
$$dI_F = K' \cdot I_x \cdot q \cdot c \cdot e^{-2,303 \cdot \epsilon \cdot c \cdot y} dx \quad (10)$$

Ce qui donne après intégration :

$$I_F = \frac{K' \cdot I_0 \cdot q \cdot e^{-2,303 \cdot \epsilon \cdot c \cdot y} \cdot (1 - e^{-2,303 \cdot \epsilon_0 \cdot c \cdot l})}{2,303 \cdot \epsilon_0} \quad (11)$$

K' : constante dépendant de la géométrie de collection de la lumière de fluorescence.

Enfin pour une géométrie excitation-collection à 0° :



$$dI_F = K \cdot I_x \cdot q \cdot c \cdot e^{-2,303 \cdot \epsilon \cdot c \cdot (l-x)} dx \quad (12)$$

Soit après intégration suivant x

$$I_F = \frac{K \cdot I_0 \cdot q \cdot e^{-2,303 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l} \cdot (1 - e^{2,303 (\epsilon_0 - \epsilon) \cdot c \cdot l})}{2,303 (\epsilon_0 - \epsilon)} \quad (13)$$

Nous avons tracé, au moyen des trois relations (9), (11) et (13), l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration d'une solution de fluoresceïne. En admettant une excitation à une longueur d'onde de 488 nm ($\epsilon_0 = 10^5 \text{ l.mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et en observant la fluorescence au maximum d'émission, soit à 520 nm ($\epsilon = 10^3 \text{ l.mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) les courbes obtenues pour les trois cas de figures sont représentées sur les figures 5 et 6.

La géométrie frontale est très certainement la meilleure méthode au point de vue de la mesure de l'intensité de fluorescence ; elle présente un avantage pour l'étude de systèmes très absorbants ou de systèmes à concentration importante.

Le montage à angle droit présente l'avantage de collecter uniquement la fluorescence de l'échantillon, et non celle des parois de la cellule et les réflexions sur celle-ci qui réduisent la précision de la mesure.

La détection à 0° est utilisée dans de très rares cas, même si on la rencontre pour certains microfluorimètres que nous décrirons ultérieurement, elle a pour inconvénient de collecter une grande partie de la radiation excitatrice, ce qui a pour conséquence d'augmenter le taux de lumière parasite.

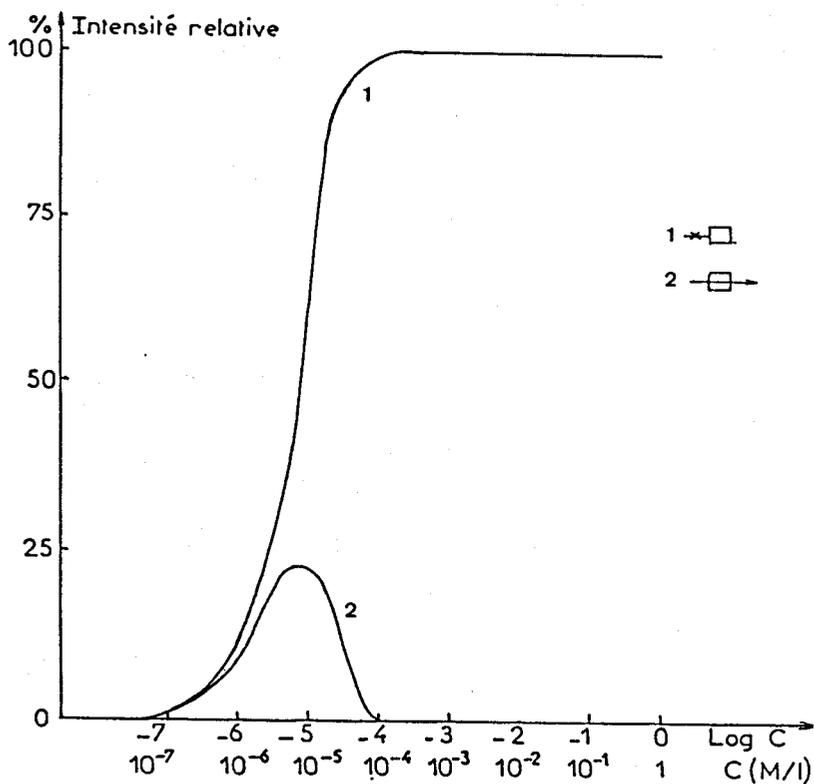


FIG.5 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour une géométrie excitation - collection 1) frontale 2) à 0°

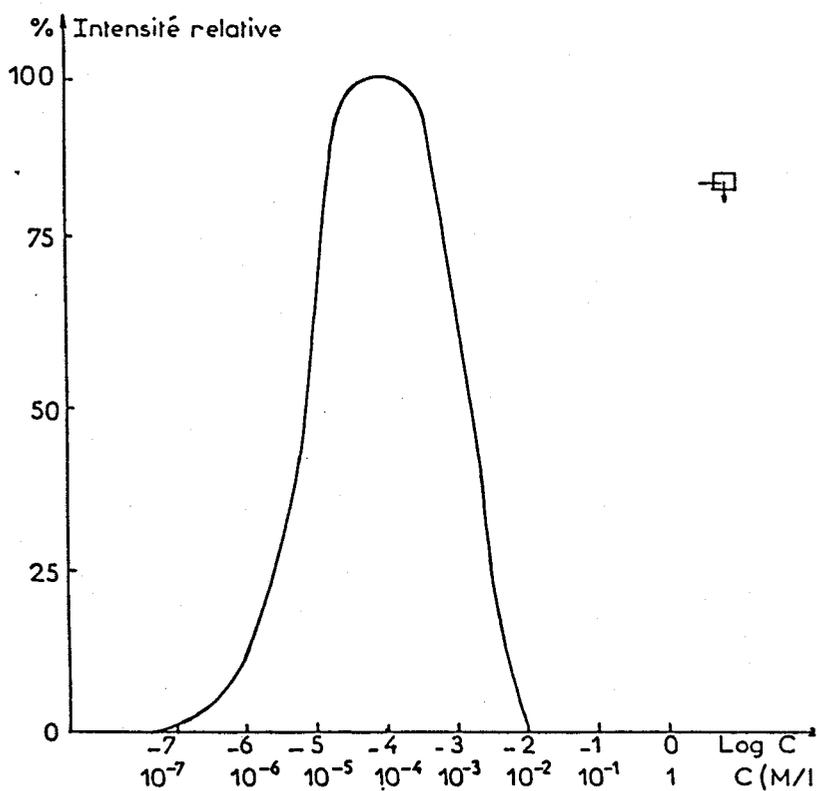


FIG.6 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour une géométrie excitation - collection à 90°



d) Filtre d'émission

L'émission de fluorescence, quittant l'échantillon, traverse de nouveau un filtre, ou est focalisée sur la fente d'entrée d'un second monochromateur qui a pour but d'éliminer la longueur d'onde d'excitation.

Lorsque l'on utilise deux monochromateurs, l'un d'excitation, l'autre d'émission, le problème de la largeur des fentes est particulièrement important. Il est nécessaire pour obtenir une résolution spectrale correcte, de travailler avec une faible ouverture des fentes du monochromateur d'émission. Cependant lorsque l'on enregistre un spectre d'émission de fluorescence, les fentes du monochromateur d'excitation peuvent être larges de manière à avoir un maximum de lumière excitatrice et lorsque l'on enregistre un spectre d'excitation, ce sont alors les fentes du monochromateur d'émission qui peuvent avoir une ouverture plus importante.

Souvent, il est souhaitable d'enregistrer le spectre de fluorescence et le spectre d'excitation. Ces spectres peuvent être obtenus uniquement avec des spectrofluorimètres. Le spectre de fluorescence est obtenu en laissant la longueur d'onde d'excitation fixe et en enregistrant l'intensité de l'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde. Le spectre d'excitation est obtenu en enregistrant l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde fixe en fonction de la longueur d'onde de l'excitation, il est donc mesuré en laissant le monochromateur d'émission à une longueur d'onde sélectionnée et en balayant le monochromateur d'excitation. Le profil d'excitation obtenu coïncidera le plus souvent avec le spectre d'absorption du composé.

1.2.1.2. Système de détection

a) Détection monocanale et multicanale

Fluorimètres et spectrofluorimètres nécessitent un système de détection très sensible, vu le bas niveau lumineux de l'émission de fluorescence observé lors de l'étude de solutions peu concentrées ou d'échantillons microscopiques. La majorité des instruments fonctionne en mode monocanal et utilise un détecteur sensible au flux, tel que le photomultiplicateur ; il est alors nécessaire pour l'enregistrement d'un spectre d'effectuer un balayage en longueur d'onde.

On trouve également depuis une vingtaine d'années, aussi bien des instruments de laboratoire que des appareils commerciaux qui utilisent une détection multicanale.

La détection multicanale permet l'enregistrement simultané d'un grand nombre d'éléments spectraux à l'aide d'un récepteur unique comportant plusieurs canaux indépendants. Le détecteur multicanal (tube vidicon - caméra SIT, SEC - barrette de photodiodes, etc...) peut être associé à un tube intensificateur d'images qui donne d'une image photonique primaire, une image photonique secondaire intensifiée et qui possède sensiblement les mêmes caractéristiques géométriques et photoniques que l'image primaire [10-11-12-13].

b) Avantages de la détection multicanale

Cette technique de mesure simultanée des intensités présente de nombreux avantages :

- Pour une durée d'analyse et une résolution données, on obtient une amélioration très sensible du rapport Signal/Bruit de l'enregistrement. En effet pour un spectre constitué de n éléments spectraux, la mesure effectuée pendant le temps t donne un gain de l'ordre de \sqrt{n} sur le rapport Signal/Bruit par rapport à une détection monocanale où le balayage du spectre nécessite un même temps t .
- Pour un rapport Signal/Bruit et une résolution donnés, la durée de l'enregistrement d'un spectre est divisée par un facteur n (nombre de canaux) par rapport à celle obtenue en mode monocanal. Cet avantage est très appréciable pour l'étude d'espèces photosensibles, car on peut réduire considérablement le temps d'acquisition d'un spectre, donc le temps d'illumination de l'échantillon.
- Il est possible d'obtenir, en utilisant des détecteurs bidimensionnels, une image reproduisant les variations spatiales de compositions chimiques d'une zone de l'échantillon étudié. La figure 7 représente le résultat d'une étude spatiale monodimensionnelle, où le faisceau laser est focalisé sur une droite optiquement conjuguée des fentes du spectrographe équipé d'une détection multicanale bidimensionnelle.

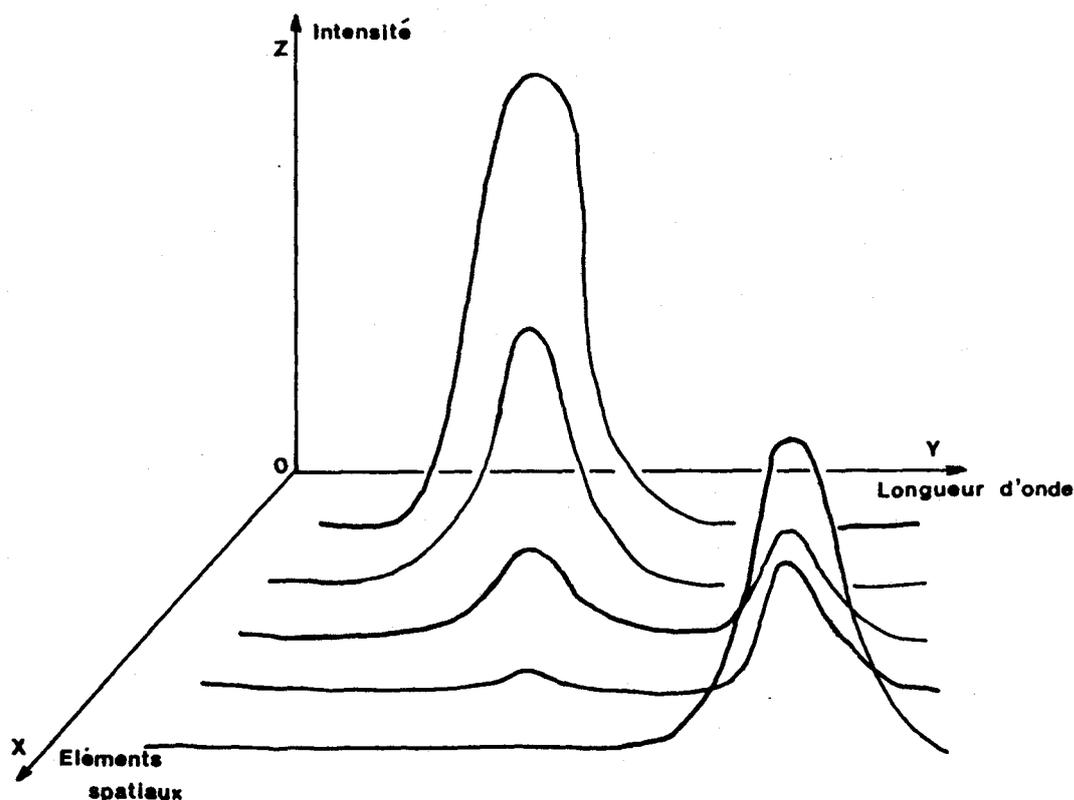


FIG.7 : Résultat d'une analyse spatiale obtenue, à partir d'une ligne, au moyen d'une détection multicanale (spectrométrie 3D)



1.2.1.3. Evolution des spectrofluorimètres

a) Amélioration du système de détection et informatisation

La configuration de base du spectrofluorimètre n'a pas été modifiée depuis les premières études qui ont été réalisées par BOWMAN [14], qui dès 1955 utilisa un spectrofluorimètre travaillant dans le domaine de l'ultra-violet pour l'étude de molécules organiques.

Toutefois d'importantes améliorations ont été apportées aux méthodes de détection par l'utilisation de compteurs de photons, mais aussi de détecteurs multicanaux. Les moyens informatiques [15-16-17-18] d'autre part, ont été mis en oeuvre pour assurer des fonctions intéressantes :

- Positionnement et balayage des monochromateurs d'excitation et d'émission.
- Acquisition des spectres de fluorescence ou d'excitation.
- Calibration du spectre.
- Traitement des données (ex : soustraction du fond de lumière parasite, ou du spectre du solvant).

CHRISTIAN et ses collaborateurs [19-20-21] ont mis à profit l'avantage de la détection multicanale pour enregistrer simultanément les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence.

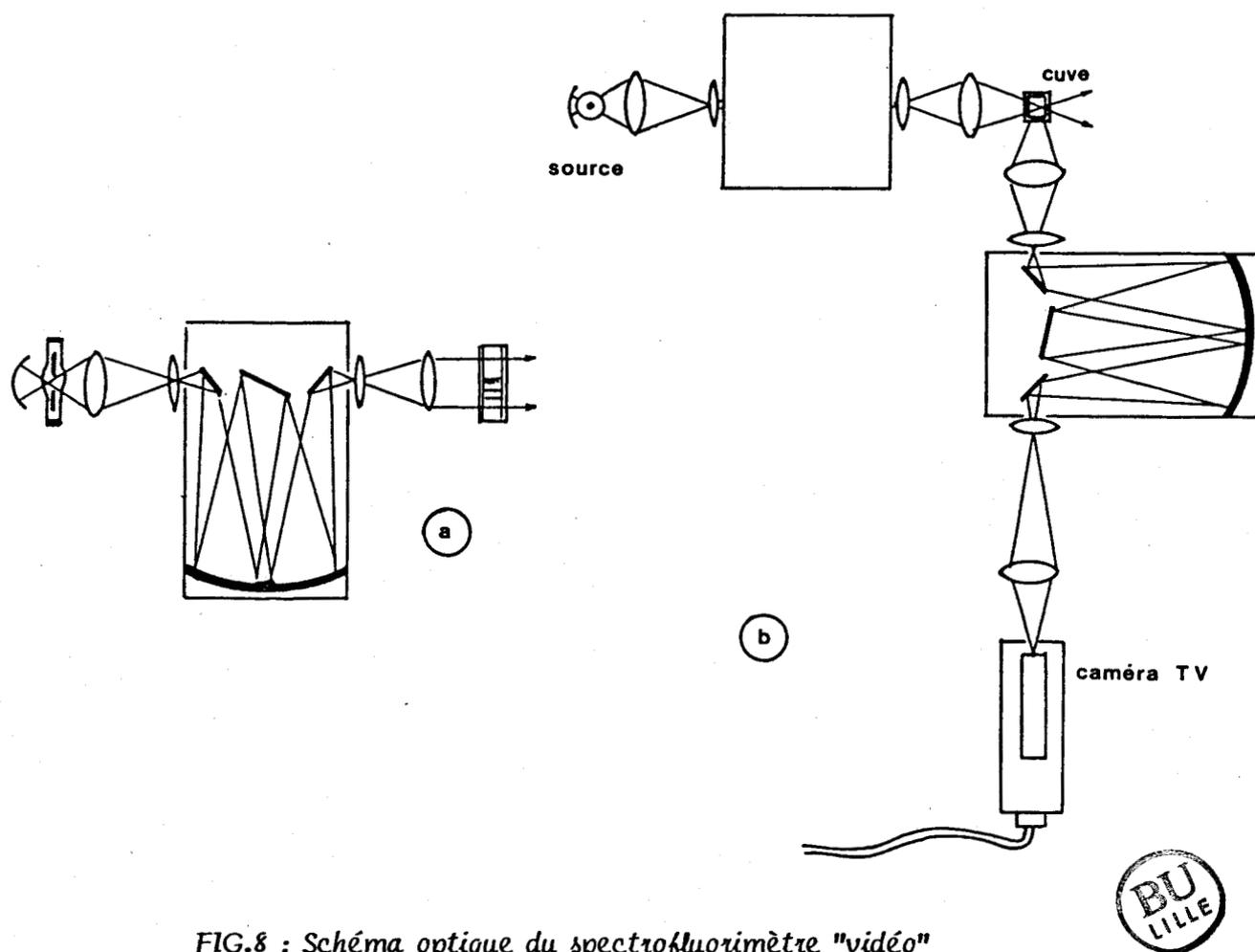


FIG.8 : Schéma optique du spectrofluorimètre "vidéo"

a) vue de côté de l'excitation

b) vue de dessus de l'excitation

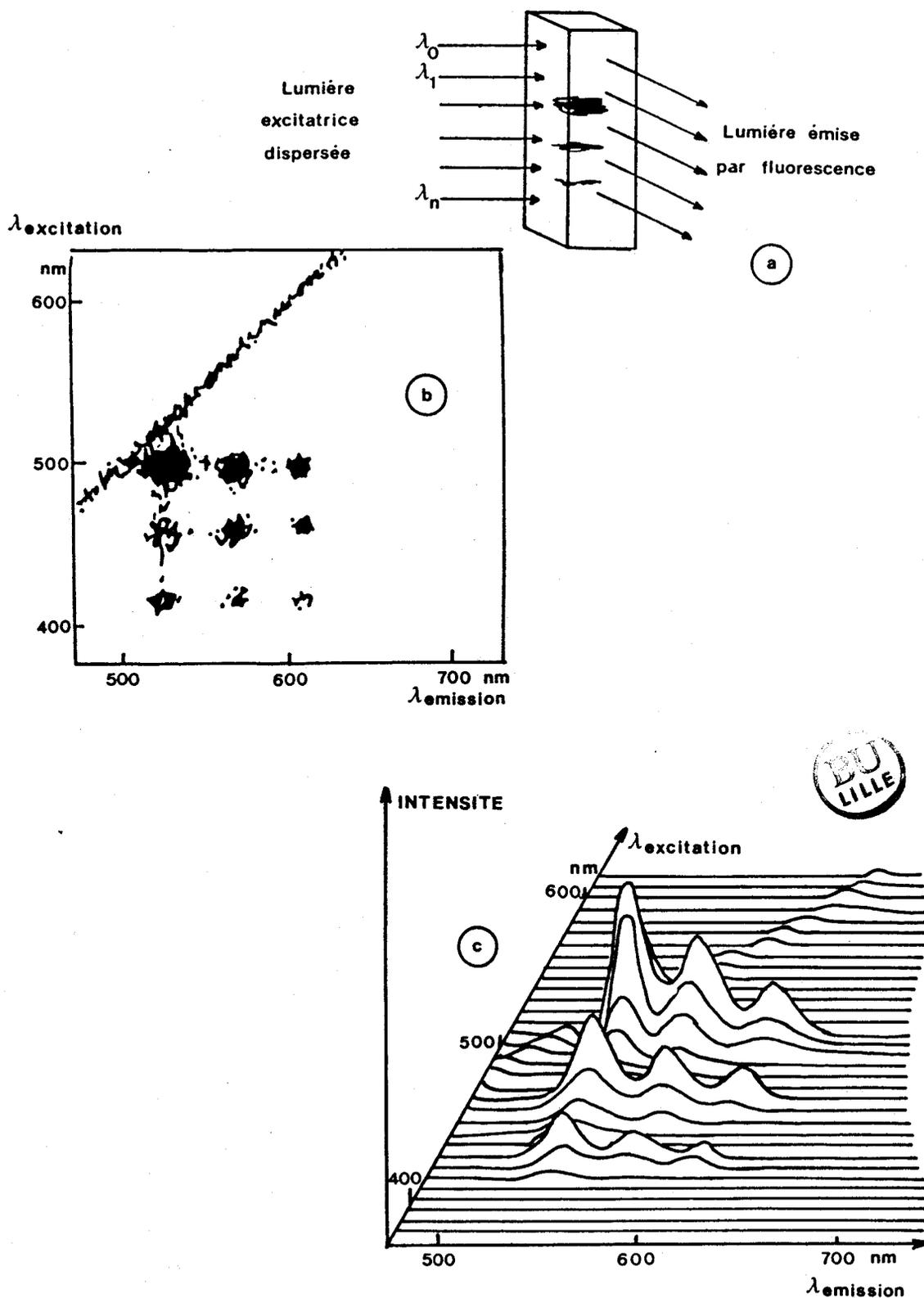


FIG.9 : Obtention d'une matrice excitation - émission

a) Géométrie de l'illumination

b) Image spectrale

c) Projection de la matrice excitation - émission

L'originalité de l'appareil réside en la géométrie de l'illumination de l'échantillon (Fig. 8).

Un faisceau polychromatique, dispersé par un monochromateur dépourvu de fente de sortie, est focalisé dans la cellule contenant l'échantillon. Chaque élément vertical de la cuve voit ainsi une longueur d'onde différente (Fig. 9.a). La variation spatiale de la fluorescence est alors analysée en focalisant l'image de la cuve sur la fente d'entrée d'un spectrographe stigmatique, qui donne une image spectrale (Fig. 9.b) sur la surface photosensible d'une caméra à bas niveau lumineux, intensifiée.

L'image ainsi obtenue, peut être représentée sous forme d'une matrice excitation-émission, où chaque élément M_{ij} de la matrice représente l'intensité de fluorescence excitée à la longueur d'onde i et observée à la longueur d'onde j . Les résultats peuvent être visualisés au moyen d'un ordinateur, sous forme d'un graphique à trois dimensions, présentant 241 spectres de fluorescence pris à 241 longueurs d'onde différentes (Fig. 9.c).

b) Correction des spectres de fluorescence

- Absorption et fluorescence

La réabsorption de la lumière émise par fluorescence constitue très souvent un phénomène gênant en fluorescence. C'est pourquoi, afin de corriger les spectres enregistrés des effets de réabsorption, des instruments mesurant simultanément, pour chaque longueur d'onde, l'absorption et la fluorescence ont été réalisés [22].

D'autre part, les enregistrements du spectre d'absorption et du spectre de fluorescence du même échantillon, avec les mêmes composants optiques conduisent à l'obtention du rendement quantique réel de fluorescence de l'espèce moléculaire étudiée.

La figure 10 schématise un instrument équipé de fibres optiques qui permet de mesurer simultanément l'intensité de la source pour chaque longueur d'onde (signal de référence), la transmittance et l'émission de fluorescence d'une solution circulant dans un tube capillaire. Un troisième monochromateur à dû être ajouté pour effectuer la réjection de la lumière parasite et de la fluorescence qui interfèrent avec la mesure de la transmittance.

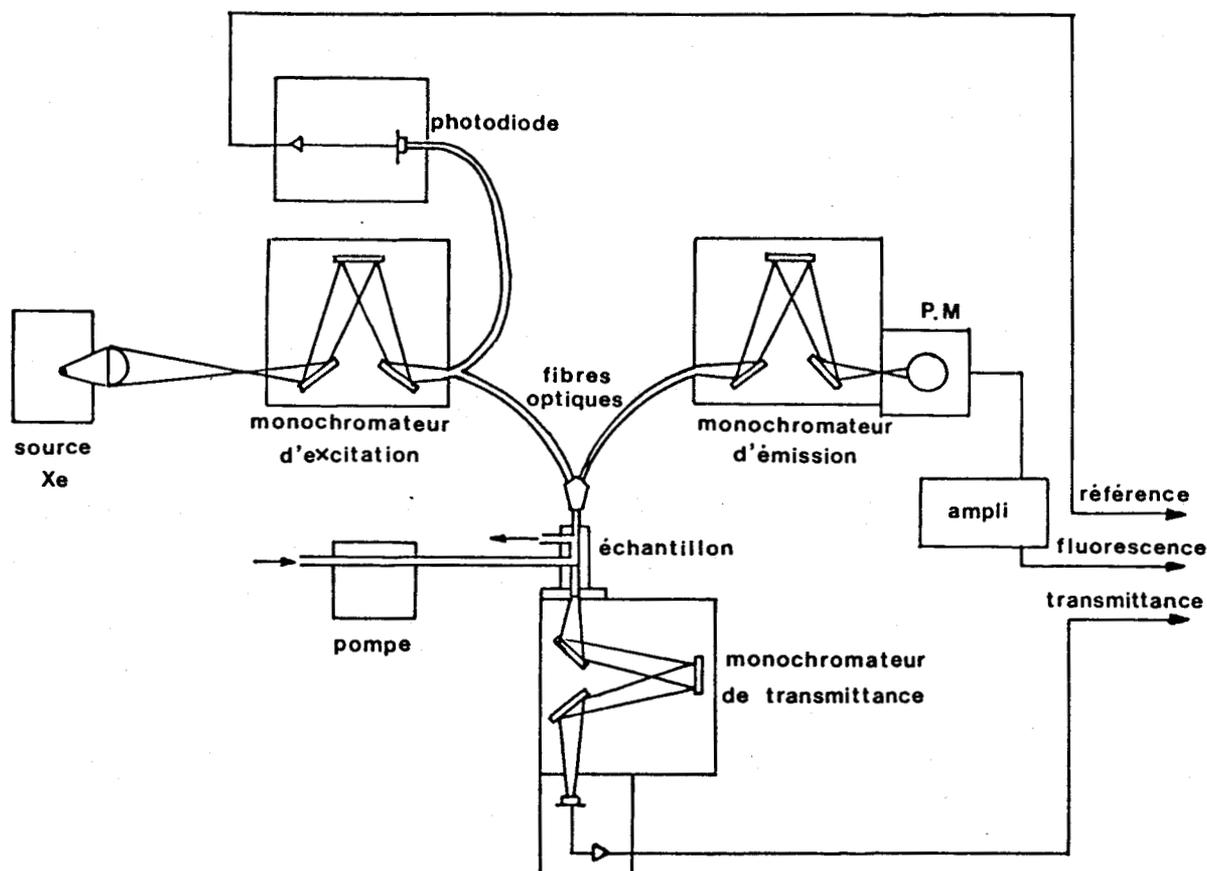


FIG.10 : Spectrofluorimètre à fibres optiques mesurant simultanément la fluorescence et la transmittance [23]



Outre le phénomène de réabsorption, d'autres facteurs et notamment des facteurs instrumentaux interviennent dans les mesures de fluorescence. Parmi ceux-ci, on peut citer :

- Les variations temporelles d'intensité de la source.
- La distribution spectrale de celle-ci.
- La transmission des monochromateurs d'excitation et d'émission.
- La sensibilité du détecteur.
- Le gain et la linéarité du système d'amplification.

- Méthode différentielle

Certains instruments comportant deux cuves, donc deux faisceaux d'excitation, permettent d'effectuer des mesures différentielles.

La comparaison permanente entre l'échantillon et un témoin (solvant pur par exemple) compense les variations d'intensité de fluorescence en fonction de la température (sous illumination prolongée, la température de l'échantillon s'élève et provoque des variations d'intensité). Elle permet également de tenir compte de l'éventuelle dérive du photomultiplicateur ; et surtout permet d'annuler par différence la fluorescence intrinsèque de certains solvants.

Pratiquement, ces appareils utilisent une seule source, dont le faisceau est envoyé alternativement sur l'échantillon et sur la référence au moyen d'un secteur tournant constitué d'une partie réfléchissante et d'une partie découpée. En sortie du photomultiplicateur, les signaux issus de chacune des deux cuves sont soustraits.

Il existe des appareils commerciaux [24] et de laboratoire utilisant la méthode différentielle, tel l'appareil, conçu par GUERIN et SEGUI [25], qui utilise comme source d'excitation un laser hélium-néon afin d'obtenir le spectre de fluorescence de la chlorophylle dans le rouge.

I.2.2. Microfluorimètre

Si les chimistes utilisent fréquemment les spectrofluorimètres il existe un autre domaine de la science où l'étude de la fluorescence est d'une grande importance, il s'agit de la biologie. Grâce à la sélectivité, c'est à dire à la possibilité d'observer préférentiellement la fluorescence d'une substance par le choix judicieux de la radiation excitatrice, il est possible de suivre parmi l'ensemble des substances intracellulaires, la fluorescence de certaines d'entre-elles. Aussi bien en biochimie clinique, pour les dosages des médicaments, de protéines ou d'hormones, qu'en biologie cellulaire et en immunologie, les techniques de fluorescence sont particulièrement bien adaptées. Malheureusement le spectrofluorimètre classique n'est pas suffisant dans ces domaines et il faut lui apporter un élément supplémentaire : le microscope. C'est pourquoi des microspectrofluori-

mètres ont été développés ces dernières années afin d'analyser l'émission de fluorescence de faible intensité à partir d'échantillons microscopiques.

C'est vers les années 1960, qu'apparaissent les premiers microspectrofluorimètres tel que celui de OLSON [26] qui est basé sur l'utilisation d'une fente en spirale dont la rotation permet d'envoyer successivement sur la photocathode d'un photomultiplicateur les radiations de fluorescence dispersées au préalable (Fig. 11). Ou encore celui de WEST [27] qui utilise une détection multicanale (Fig. 12). Dans les deux cas, l'excitation a lieu sous microscope inversé, la collection de l'émission de fluorescence se faisant à 0° , géométrie qui n'est pas la plus favorable, car une grande partie de la radiation excitatrice est envoyée directement vers l'appareil dispersif.

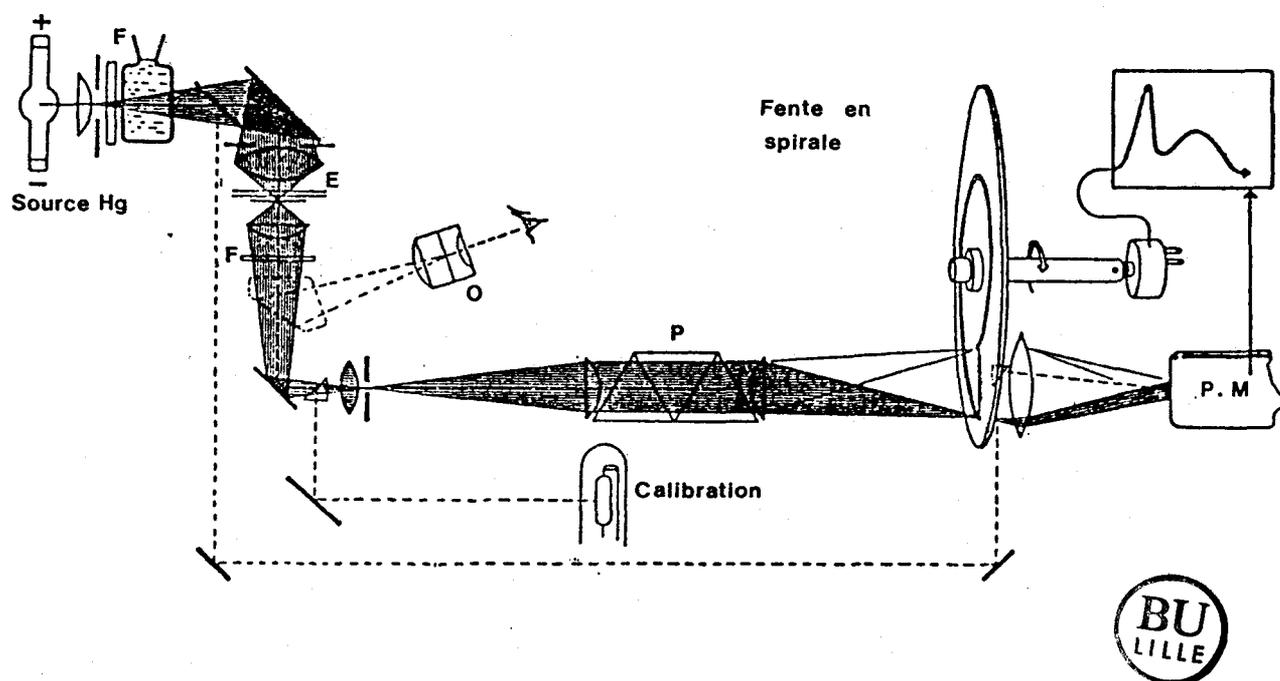


FIG.11 : Microspectrofluorimètre réalisé par Olson
(F : filtre - E : échantillon - O : oculaire - P :prisme)

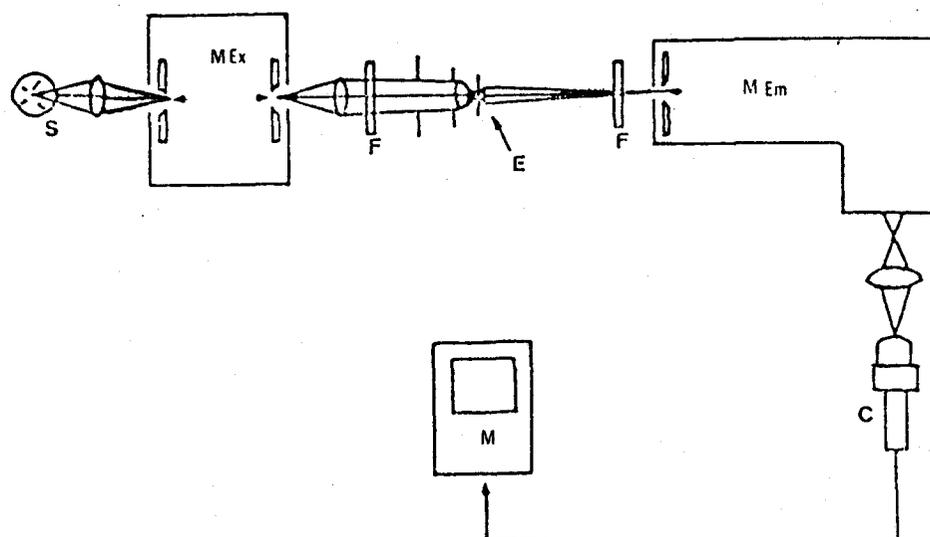


FIG.12 : Microspectrofluorimètre réalisé par West

(S : source - F : filtre - E : échantillon - M.Ex : monochromateur d'excitation - M.Em : monochromateur d'émission - C : caméra - M : moniteur T.V.)

Désireux d'obtenir une information spatiale, KOHEN [28-29] fit appel à une technique électronique séduisante donnant successivement des renseignements sur deux sites cellulaires distincts. Le montage de KOHEN comporte un photomultiplicateur équipé d'une cathode vibrante, oscillant entre deux positions extrêmes soigneusement calibrées. Grâce à ce dispositif, il est possible de stocker alternativement dans deux mémoires différentes les signaux optiques correspondant aux deux positions extrêmes de la cathode, c'est à dire aux signaux émis par deux sites présélectionnés de la cellule étudiée.

D'autres chercheurs se sont intéressés à l'étude des variations temporelles de la fluorescence (à l'échelle de temps de la seconde), et ont réalisé un microspectrofluorimètre permettant l'enregistrement rapide d'un spectre afin de pouvoir étudier les phénomènes biologiques intracellulaires [2-30-31-32].

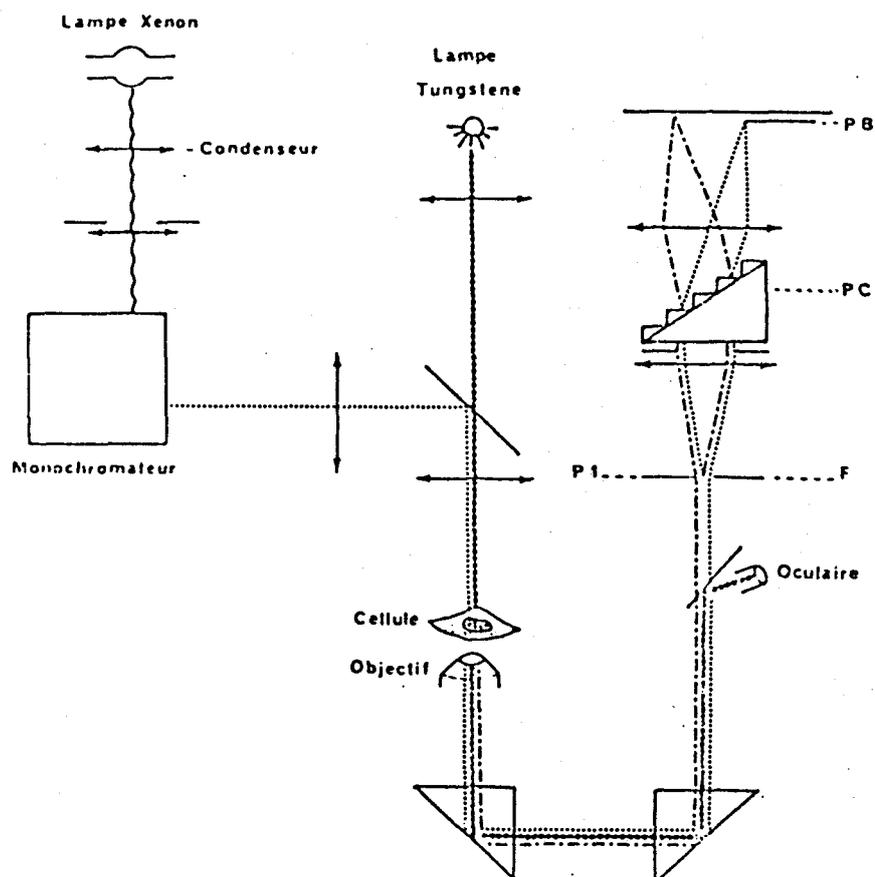


FIG.13 : Schéma optique du microspectrofluorimètre réalisé par Salmon

- ~~~~ Spectre continu de la lampe xénon
- Radiation excitatrice sélectionnée par le monochromateur
- Fluorescence émise par la cellule
- Lumière blanche pour la visualisation du champ.

La figure 13 schématise la partie optique de l'instrument qui est constitué :

- D'un dispositif d'excitation (lampe xénon + monochromateur à prismes).
- D'un microscope inversé qui donne dans le plan P_1 de la fente F d'entrée du monochromateur une image de la fluorescence du champ microscopique.

- D'un système dispersif fixe comportant un prisme de Carpenter (prisme + réseau).
- D'une détection multicanale.

Le champ observé s'étend de 370 à 690 nm. Un filtre passe bas (P.B) mobile en translation permet d'éliminer la radiation excitatrice quelle que soit sa longueur d'onde.

L'ensemble du dispositif de détection est constitué d'un tube intensificateur d'images couplé à une caméra TV.

Des mesures de temps de décroissance de la fluorescence, ont également été effectuées en microfluorimétrie. Certains appareils utilisent comme source d'excitation un laser à azote pulsé pompant un colorant [33-34]. Le faisceau envoyé dans le microscope est focalisé en un point de la préparation, l'émission de fluorescence est alors dispersée et mesurée au moyen d'un photomultiplicateur qui enregistre la décroissance du signal (Fig. 14).

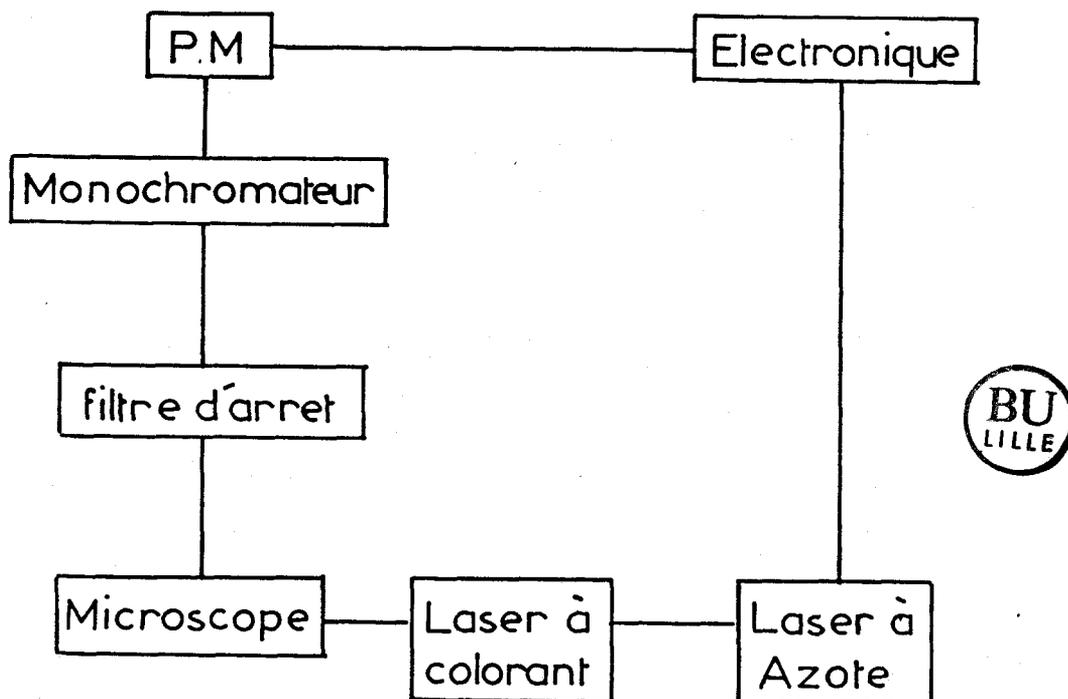


FIG.14 : Installation de microfluorescence utilisant un laser pulsé

Pour d'autres appareils, une cellule de Pockels a été introduite dans le faisceau d'excitation permettant une modulation de la source, c'est le cas du microfluorimètre à transformée de Fourier, réalisé par MURRAY [35].

I.3. UTILISATION DU LASER COMME SOURCE D'EXCITATION

I.3.1. Avantages des sources laser

Pour obtenir une émission de fluorescence, l'excitation par lampes spectrales, xénon ou mercure, nécessite l'utilisation d'un filtre ou d'un monochromateur ; une grande partie de l'énergie émise par la source est perdue. De plus, afin de corriger les fluctuations temporelles d'intensité de la source, certains instruments sont équipés d'un séparateur de faisceau qui envoie une partie de la lumière vers un photodétecteur. Les variations de signal mesurées serviront à la correction de l'intensité du spectre de fluorescence.

L'utilisation, devenue classique, de la cohérence du rayonnement laser permet de concentrer toute l'énergie lumineuse de la source sur l'échantillon. Par ailleurs, l'excitation est parfaitement monochromatique. De plus sous microscope, l'utilisation d'un faisceau laser focalisé à la limite de la diffraction rend possible la mesure de la fluorescence d'une très petite surface sélectionnée dans le champ microscopique, alors qu'avec les systèmes d'illumination classique, la sélection d'une petite surface est obtenue en positionnant un diaphragme dans un plan image du microscope.

Le diamètre d du point de focalisation pour une distribution gaussienne de l'intensité du faisceau laser (mode TEM_{00}), dans le champ objet est donné par l'expression :

$$d = \frac{4 \cdot \lambda}{\pi \alpha} \quad (14)$$

où α est l'angle de focalisation donné par l'ouverture numérique de l'objectif utilisé et λ la longueur d'onde d'excitation. Ainsi pour une ouverture numérique égale à 0,65 et une radiation à une longueur d'onde de 514,5 nm fournie par un laser à argon ionisé, le diamètre de la tâche de focalisation est de l'ordre de 0,5 μm et peut descendre jusqu'à 0,3 μm lors de l'utilisation de radiations ultra-violettes.

Il faut remarquer que l'utilisation d'un laser à argon ionisé ne fournissant que quelques longueurs d'onde discrètes, rend impossible l'enregistrement d'un spectre d'excitation, ou encore le choix de la longueur d'onde d'excitation qui correspond au maximum d'absorption du composé étudié. La solution à ce problème est l'utilisation d'un laser à colorant accordable sur une large gamme spectrale.

I.3.2. Perturbation de l'échantillon par l'excitation

I.3.2.1. Echauffement

Un des intérêts de l'analyse par fluorescence réside dans le fait que l'intensité de l'émission est proportionnelle à l'intensité du faisceau incident quand on reste en dessous du seuil de saturation. En augmentant l'intensité de la source, il est possible d'atteindre des niveaux de détection 10^2 à 10^3 fois plus faibles que par spectrophotométrie d'absorption classique par exemple. Cependant avec ce type d'éclairement intense, il y a risque de destruction par échauffements pour certains échantillons particulièrement absorbants ou photosensibles. Une molécule instable sous l'illumination intense peut se décomposer et donner de nouveaux produits. En effet, l'irradiance d'une petite surface de l'échantillon sur laquelle est focalisé le laser atteint une valeur très élevée. Ainsi pour une tache de focalisation dont le diamètre est de $1\mu\text{m}$, et pour une puissance laser de 1mW , l'irradiance est voisine de $127\text{KW}/\text{cm}^2$.

Par contre l'irradiance est de l'ordre du watt/cm^2 pour un éclairage global de la préparation par une lampe à arc au mercure.

L'élévation de température résultant de l'irradiation est directement proportionnelle à l'intensité de celle-ci et s'exprime de la façon suivante :

$$\Delta T = \frac{K}{\xi} \cdot \frac{V_i}{V} \cdot I_0 \quad (15)$$

où

- ΔT représente l'élévation de température par unité de temps
- ξ la résistivité thermique du matériau étudié exprimée en $\text{W}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{K}^{-1}$.

- K le coefficient d'absorption du matériau (cm^{-1}).
- V et V_i le volume total et le volume irradié de l'échantillon (cm^3)
- I_0 l'irradiance au niveau de l'échantillon (W.cm^{-2}).

En fait, l'élévation de température obtenue en appliquant la relation (15) est tout à fait théorique. Le reste de l'échantillon qui n'est pas irradié joue le rôle de radiateur thermique et dissipe une partie de la chaleur.

En pratique, le calcul précis de l'élévation de température est délicat, vu la géométrie complexe des échantillons étudiés.

1.3.2.2. Décroissance de la fluorescence

KAUFMAN et ses collaborateurs [36] ont étudié la décroissance de la fluorescence de l'isothiocyanate de fluorescéine en fonction du temps d'irradiation et en fonction de la puissance d'excitation.

Ils ont montré que pour une densité de puissance de $0,025\text{W/cm}^2$, l'intensité de fluorescence décroît de 4% au bout de 10 secondes d'irradiation, alors qu'elle décroît de 89% pour une densité de 160W/cm^2 .

La figure 15 illustre cette décroissance de fluorescence et montre qu'après une période de non illumination, l'intensité de fluorescence est plus faible que l'intensité initiale.

Cette décroissance, ainsi que la diminution d'intensité de fluorescence après une période de non illumination qui peut aller jusqu'à 48 heures montre qu'il y a une photodécomposition de la molécule. Ce risque de photodécomposition impose une limitation de la puissance d'excitation, notamment dans le cas d'utilisation d'un faisceau laser. La grande sensibilité des barrettes de photodiodes permet de réduire la puissance du faisceau laser d'excitation ; de plus l'utilisation d'une détection multicanale permet de réduire considérablement le temps d'acquisition d'un spectre, donc le temps d'irradiation.

Des constatations identiques ont été faites sur la fluorescéine [37-38] .

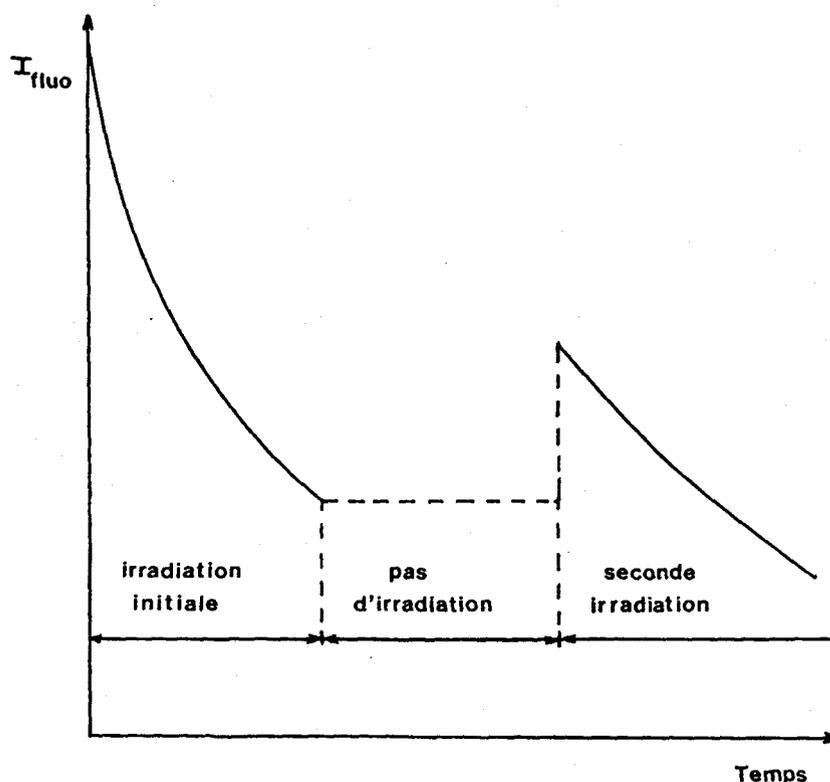


FIG.15 : Décroissance de la fluorescence avec la durée d'illumination

I.4. - PREMIER PROTOTYPE DE MICROSPECTROFLUORIMETRE REALISE AU G.I.P.

Depuis de nombreuses années, le L.A.S.I.R., en collaboration avec la Société DILOR, porte un intérêt à l'instrumentation dans le domaine de la microanalyse locale par effet Raman [39-43]. Les similitudes sur le plan instrumental entre la spectrométrie de fluorescence et la spectrométrie Raman ont conduit à la réalisation, dans le cadre du G.I.P., d'un premier prototype d'appareil destiné à analyser l'émission de fluorescence ou la diffusion Raman d'un échantillon placé sous microscope [44].

Ce microspectrofluorimètre présente l'avantage d'être équipé d'une excitation laser dans le domaine du visible et d'une détection multicanale. De haute sensibilité il est capable de fournir en un temps très court, à partir d'une émission de fluorescence ou d'une bioluminescence :

- Le spectre complet du domaine analysé.

- La distribution spatiale des centres émetteurs, en déplaçant le point de focalisation du faisceau laser sur l'échantillon ; la résolution spatiale est de l'ordre du micromètre.

1.4.1. Description de l'appareil

Le microspectrofluorimètre dont le plan d'ensemble est représenté par la figure 16 et le cliché 1, est constitué de sept parties distinctes :

1. - Un laser à argon ionisé refroidi par air, modèle 162 de Spectra-Physics : longueurs d'onde d'émission : 458, 488 et 514,5nm : puissance réglable entre 0 et 25mW toutes raies.

2. - Un microscope optique Olympus, type BHT incluant :

* 3 objectifs : 100X, 50X et 10X montés sur tourelle.

* 2 illuminateurs fond clair (réflexion et transmission) avec éclairage par lampes à halogène.

* 1 platine à commandes coaxiales.

* 1 tube trinoculaire permettant l'entrée du faisceau laser et la sortie de la lumière diffusée.

* 2 oculaires : 10X.

3. - Un dispositif optique de balayage de l'échantillon permettant d'analyser tout point du champ objet sans avoir à déplacer la préparation. La précision et la reproductibilité du positionnement sont meilleures que le micromètre. Le déplacement du faisceau laser se fait par translation d'une lentille. Nous reviendrons plus en détail sur ce dispositif optique de balayage au Chapitre III.

4. - Une série de filtres d'arrêt permettent d'éliminer la radiation excitatrice et de laisser passer l'émission de fluorescence. Il s'agit soit de filtres colorés passe haut (Schott) dont les longueurs d'onde de coupure sont adaptées aux radiations émises par le laser argon, soit de filtres interférentiels coupe-bande (filtre Notch).

5. - Un système dispersif constitué d'un spectrographe de type Spectrinfo commercialisé par la Société DILOR. La figure 17 représente le schéma optique de ce spectrographe dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Collimateur de longueur focale 160mm ouvert à $f/4,7$.
- Objectif de longueur focale 130mm ouvert à $f/3,8$.
- Champ plan sur 30mm.
- Deux réseaux de diffraction (au choix, 300, 1200 et 1800 traits/mm), montés dos à dos sur une tourelle afin d'obtenir deux valeurs de dispersion.

Le positionnement automatique en longueur d'onde est entièrement informatisé et ne demande aucune intervention manuelle.

6. - Un dispositif de détection multicanale constitué d'un tube intensificateur d'images à galette de microcanaux couplé à une barrette de photodiodes Réticon de 512 ou 1024 photodiodes, refroidie à -25°C par effet Peltier. Ce système de détection est identique à celui développé par la Société DILOR pour sa gamme de spectromètres multicanaux [45].

Le champ spectral observé et la résolution par photodiode en fonction du nombre de traits du réseau de diffraction utilisé figurent dans le tableau I.

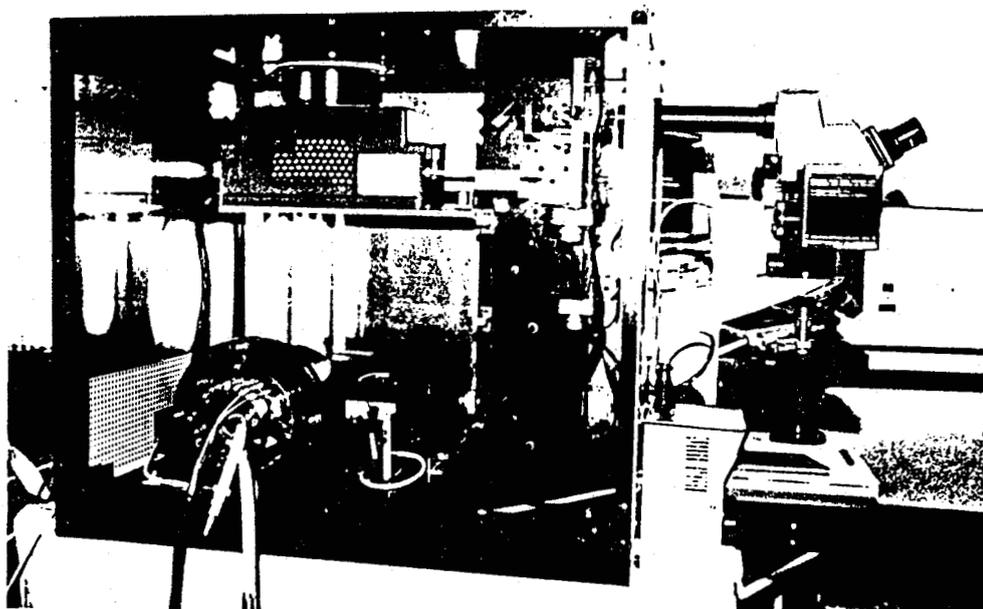
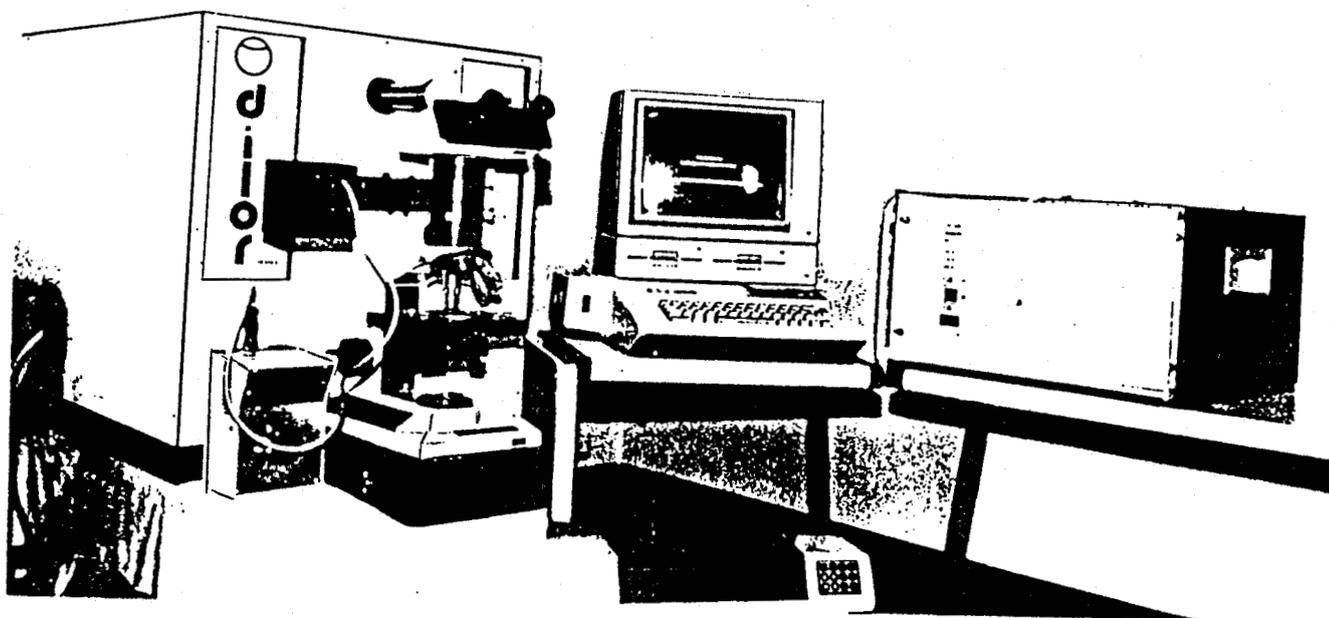
7. - Une électronique et une informatique de commande. Un coffret inclut les diverses alimentations du spectrographe, du dispositif optique de balayage ainsi que l'électronique associée au détecteur multicanal (échantillonneurs, convertisseurs analogique-digital, multiplexeurs, mémoires arithmétiques, etc...). Le temps d'intégration d'un spectre est ajustable de 0,1 à 99 secondes.

Différents programmes implantés sur Apple II permettent :

- Le positionnement du spectre en longueur d'onde (\AA) ou en nombre d'onde (cm^{-1}).
- L'ajustement des conditions d'enregistrement du spectre, avec visualisation de celui-ci en temps réel.
- L'acquisition du spectre avec calibration automatique en longueur d'onde ou en nombre d'onde .

- Le traitement des données : lissage, intégration, normalisation, comparaison, addition ou soustraction de deux spectres.

- Sortie du spectre sur table traçante.



CLICHE 1 : Vue générale du premier prototype de microspectrofluorimètre

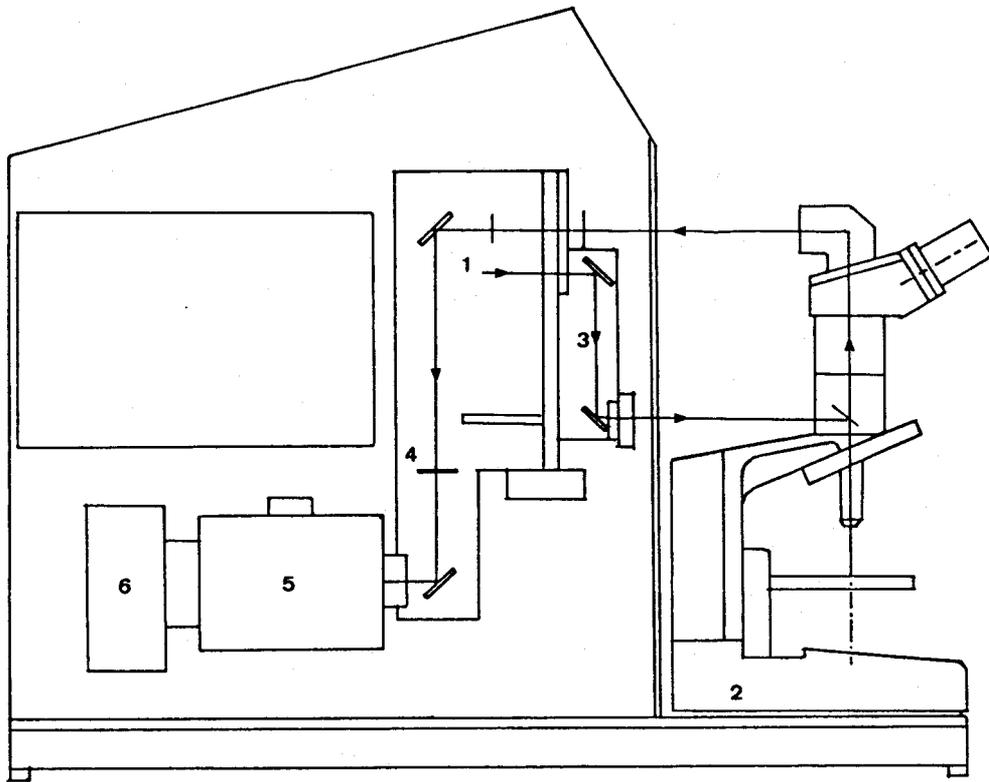


FIG.16 : Schéma d'ensemble du premier prototype

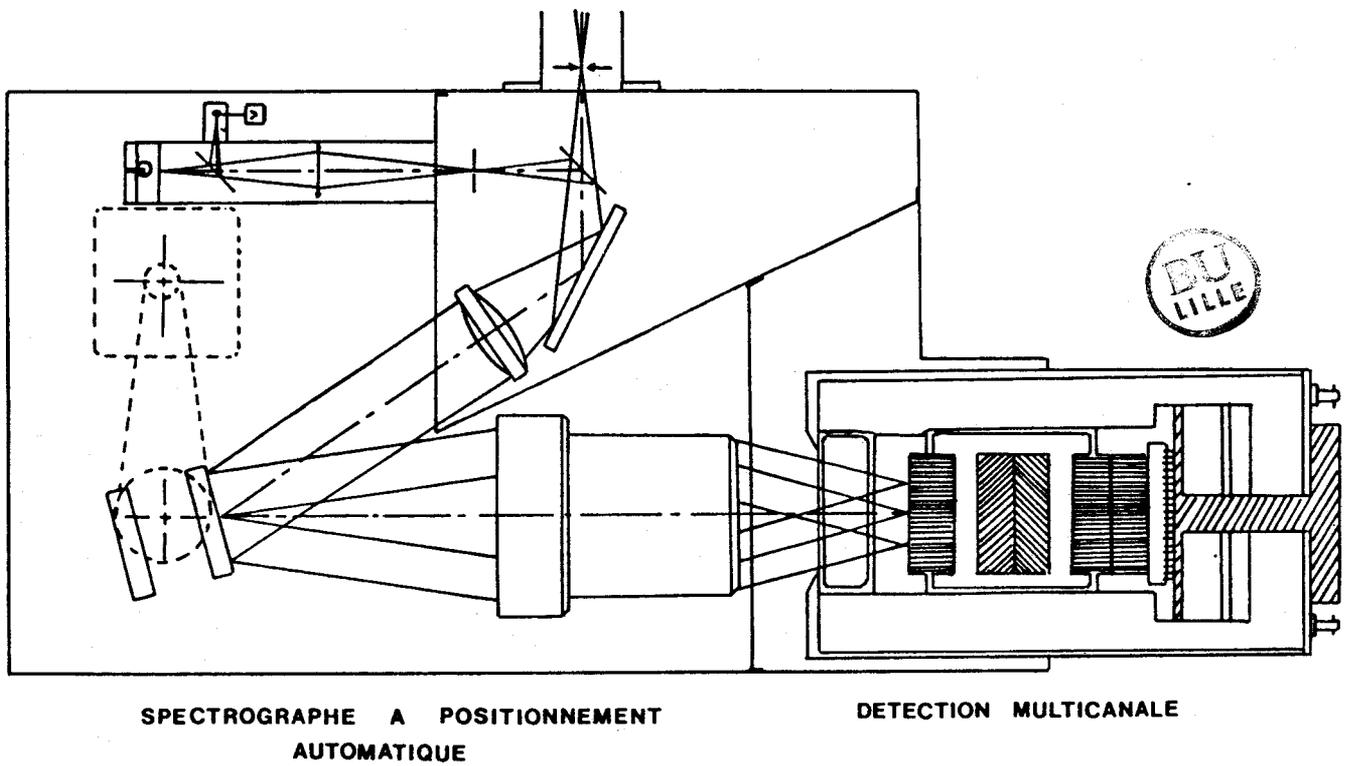


FIG.17 : Schéma du spectrinfo

Réseau traits/mm	Champ (nm) 512 diodes : 1024 diodes 12,5mm : 25mm	Plus petit élément pouvant être résolu par le détecteur (nm)
300	: 303 : 600	0,6
1200	: 64 : 120	0,12
1800	: 34 : 70	0,07
	: :	

TABLEAU 1 : Champs et résolution / diode obtenus avec le Spectrinfo

I.4.2. Performances et limitations de l'appareil

L'appareil que nous venons de décrire présente de nombreux avantages par rapport aux microspectrofluorimètres existants :

- L'excitation par faisceau laser remplace avantageusement le monochromateur d'entrée qui est à l'origine d'une perte importante d'énergie lumineuse.
- Le déplacement du faisceau laser sur la préparation évite de devoir bouger l'échantillon sur la platine.
- Le spectrographe possède deux dispersions différentes et permet d'analyser un large domaine spectral dans le spectre du visible.
- La détection multicanale permet de réduire sérieusement le temps d'acquisition d'un spectre.

De nombreux essais du microspectrofluorimètre ont été effectués dans divers domaines [46-47]. Quelques propriétés essentielles de l'émission de fluorescence telles que :

- *L'intensité de l'émission en fonction de la concentration*
- *L'extinction de fluorescence*
- *La polarisation de fluorescence*

ont été étudiées et les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus en analyse conventionnelle.

D'autres études ponctuelles ont permis d'une part de tester la sensibilité du spectrofluorimètre, et d'autre part de mettre en évidence le vaste champ d'applications de l'instrument [48], parmi ces études, on peut citer :

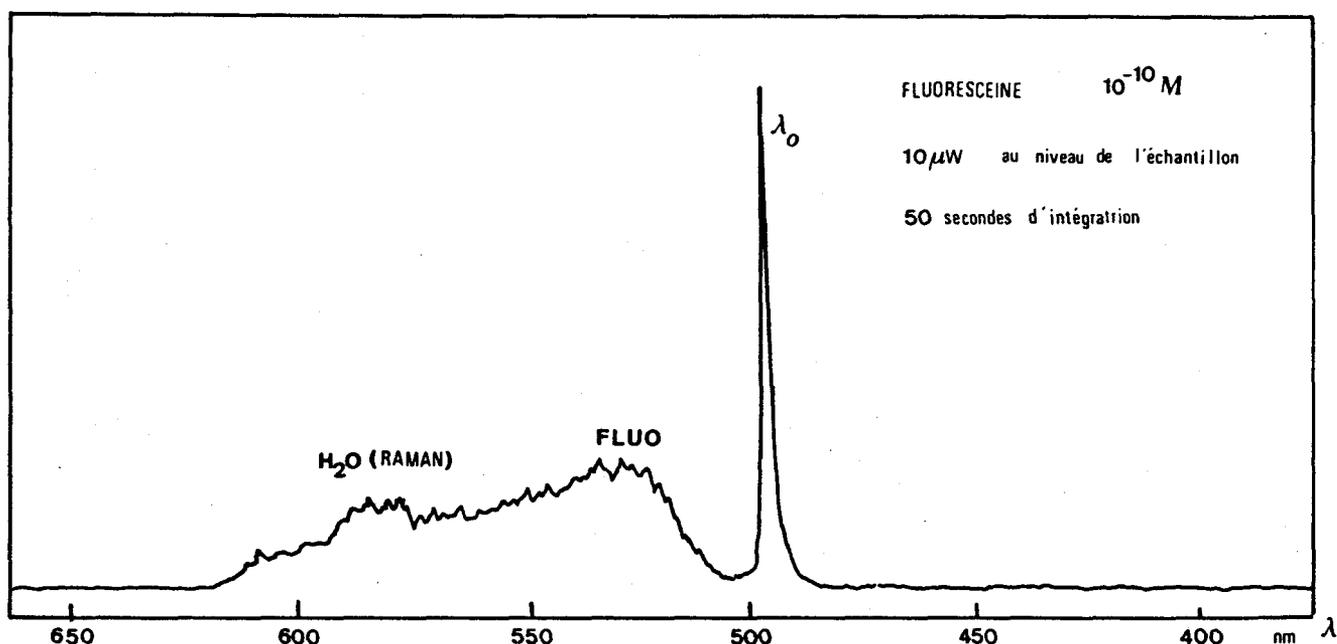
- *L'étude de tissus cellulaires traités par diverses drogues antitumorales*
- *L'interaction drogue-ADN cellulaire*
- *Les spectres de fluorescence sur plaques de chromatographie en couches minces*
- *L'étude de pigments (encres, ...)*
- *L'étude des anthocyanes à l'intérieur de vacuoles cellulaires.*

De cette évaluation, il ressort que l'appareil possède une excellente résolution spatiale et une sensibilité très élevée. Le spectre de la figure 18 illustre cette haute sensibilité ; il s'agit d'une solution de fluoresceïne de concentration 10^{-10} molaire dans l'eau. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- *Volume analysé : $10\mu\text{m}^3$*
- *Longueur d'onde d'excitation : 488nm*
- *Puissance au niveau de l'échantillon : $100\mu\text{W}$*

- Temps d'enregistrement : 50 secondes

- Objectif : 50X



· FIG.18 : Spectre de la fluorescéine $10^{-10} M$ dans l'eau

Près du spectre de fluorescence de la fluorescéine apparaît le spectre Raman de l'eau.

L'appareil est doté de deux disperseurs différents, un réseau de diffraction comprenant 300 traits/mm et un autre comprenant 1800 traits/mm. Le réseau de 300 traits/mm est bien adapté vu la configuration du spectrographe à l'obtention de spectres de fluorescence, il permet d'obtenir un champ spectral important couvrant plusieurs centaines de nanomètres. Le second réseau, beaucoup plus dispersif, permet l'enregistrement de spectres Raman.

Cependant, deux problèmes importants surgissent lors de l'obtention d'un spectre Raman ; d'une part l'utilisation de filtres d'arrêt interdit l'étude du domaine des basses fréquences. Le filtre Notch (Fig. 19) a une transmission de 3% à 200 cm^{-1} et de 60% à 1000 cm^{-1} , tandis que les filtres colorés (Fig. 20) coupent de 0 à 1200 cm^{-1} . Pratiquement il est impossible d'observer le spectre en dessous de 900 cm^{-1} , comme le montre le spectre Raman de l'aspirine (Fig. 21). D'autre part, les spectres de diffusion Raman présentent un fond continu parasite relativement intense, notamment lorsque l'on utilise des puissances d'excitation importantes (supérieures à $1,5\text{mW}$ au niveau de l'excitation).

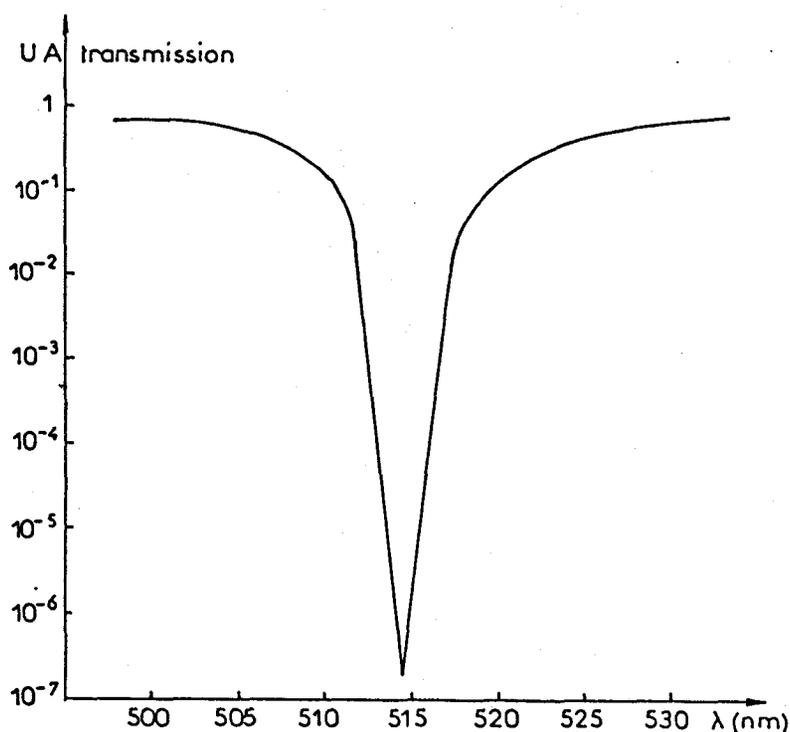


FIG.19 : Courbe de transmission du filtre Notch (514,5 nm)

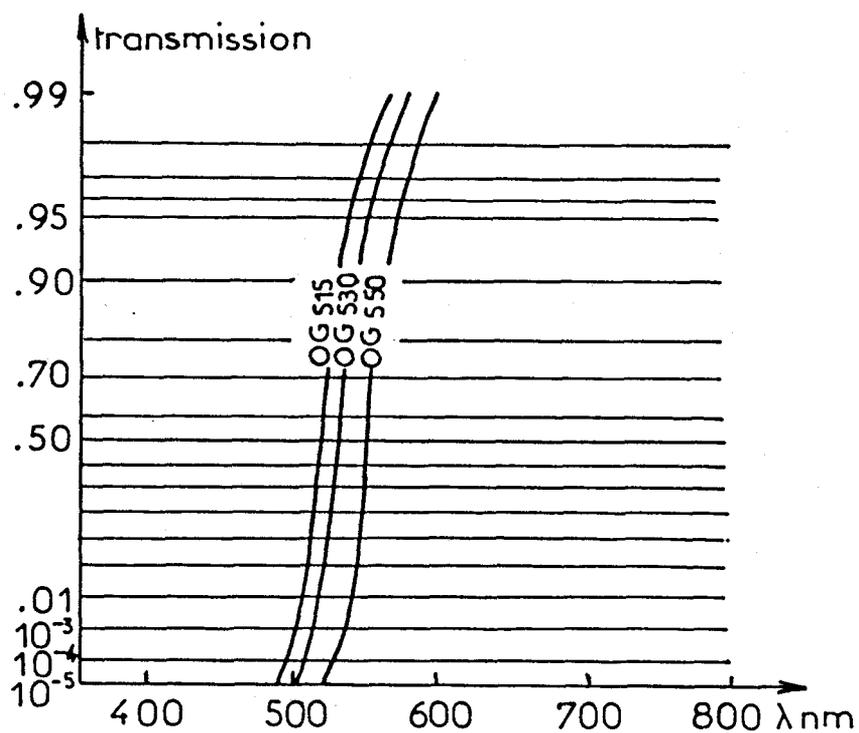


FIG.20 : Courbes de transmission des filtres colorés

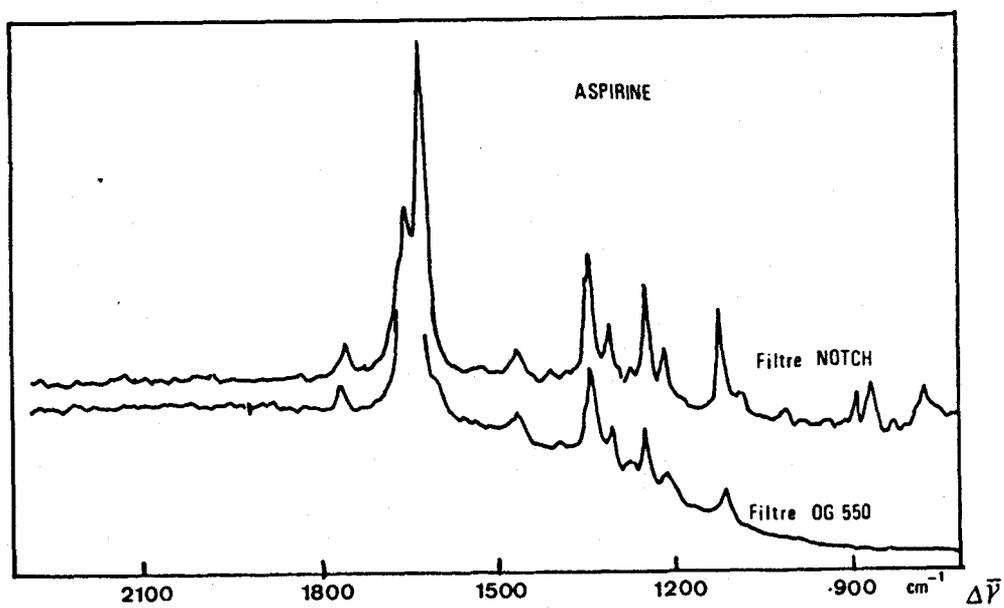


FIG.21 : Spectres Raman de l'aspirine

Ce fond parasite observé est dû essentiellement à la fluorescence du filtre d'arrêt, comme l'illustre la figure 22 qui représente le spectre de fluorescence d'un filtre OG 515 disposé à la place de l'échantillon, sous le microscope. On retrouve le profil de cette bande lors de l'étude de composés très réfléchissants, tel que le silicium par exemple ou lors de l'étude d'échantillons nécessitant des puissances d'excitation relativement élevées (1 à plusieurs mW).

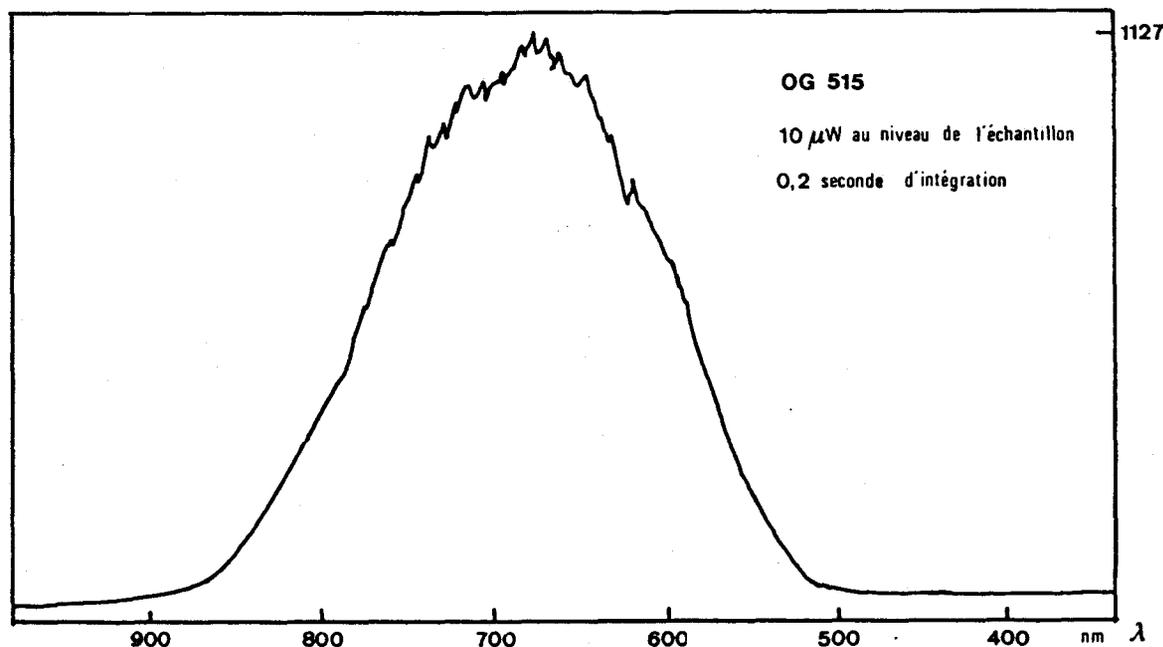


FIG.22 : Spectre de fluorescence d'un filtre OG 515



1.5. - CONCEPTION D'UN SECOND PROTOTYPE

Comme nous venons de le voir, malgré ses très bonnes performances et sa grande sensibilité, le premier prototype du microspectrofluorimètre est mal adapté à l'étude de la diffusion Raman.

Nous avons donc entrepris la réalisation d'un second prototype, totalement différent dans sa structure [49-50].

CHAPITRE II

CONCEPTION DU SYSTEME DISPERSIF DU MICROSPECTROFLUORIMETRE
ET DESCRIPTION DU DETECTEUR MULTICANAL

La présence de filtres d'arrêt sur le trajet des faisceaux diffusés, dans le premier prototype de microspectrofluorimètre (version 01) pose deux problèmes importants :

- l'impossibilité d'observer le domaine des basses fréquences en spectrométrie Raman (coupure des filtres de 0 à 1000 cm^{-1})

- l'apparition dans le spectre du composé chimique étudié d'une bande de fluorescence propre à l'appareil quand on travaille avec des puissances d'excitation relativement importantes (1 mW et plus au niveau de l'échantillon).

Ces diverses considérations nous ont conduits à concevoir et à réaliser un second prototype de microspectrofluorimètre (version 02).

Les objectifs que nous nous sommes fixés lors de la conception de cet appareil sont les suivants :

- diversité des fonctions de l'instrument, rendant possible l'enregistrement du spectre de fluorescence et du spectre Raman d'une même zone d'un échantillon, sous microscope, sans déplacement de l'échantillon entre les mesures

- sensibilité élevée permettant d'étudier des phénomènes à bas niveau lumineux

- enregistrement de spectres en un temps court

- excitation dans le proche ultraviolet afin de satisfaire la demande dans le domaine biologique. En effet, de nombreuses substances biologiques présentent une bande d'absorption intense dans le domaine des courtes longueurs d'onde.

Le cahier des charges que nous avons établi pour atteindre ces objectifs est le suivant :

- Equiper l'appareil d'un prémonochromateur afin de s'affranchir des filtres d'arrêt et de permettre l'observation du domaine des basses fréquences

- Développer un dispositif permettant l'obtention de deux dispersions :

- *une basse dispersion pour l'étude de l'émission de fluorescence, où il est intéressant d'observer le domaine complet du visible (400-800 nm)

- * Une dispersion moyenne, pour l'étude de la diffusion Raman, où le meilleur compromis entre la résolution et le champ spectral observé devra être obtenu.

- Utiliser un détecteur multicanal à réseau de photodiodes intensifiées, dont la sensibilité et la rapidité d'acquisition permettent d'éviter une destruction photochimique ou thermique de matériaux fragiles .

- Equiper l'appareil d'un ordinateur pour l'acquisition et le traitement des données. Ce ordinateur sera également chargé de contrôler les différentes fonctions de l'appareil : rotation et positionnement des disperseurs, calibration

- Exciter l'échantillon dans le domaine de l'ultraviolet au moyen d'un laser hélium-cadmium émettant une radiation à une longueur d'onde de 325 nm. L'utilisation d'une excitation dans l'ultraviolet nécessite un microscope adapté, mais aussi

une optique de couplage microscope-spectrographe totalement différente de celle fonctionnant sur la première version de l'appareil.

- Analyser ponctuellement tout point de l'échantillon situé dans le champ du microscope (exploration spatiale de l'échantillon) sans avoir à déplacer la préparation.

Nous aboutissons, compte-tenu de ces différentes considérations, au schéma synoptique de l'appareil qui est représenté sur la figure 23.

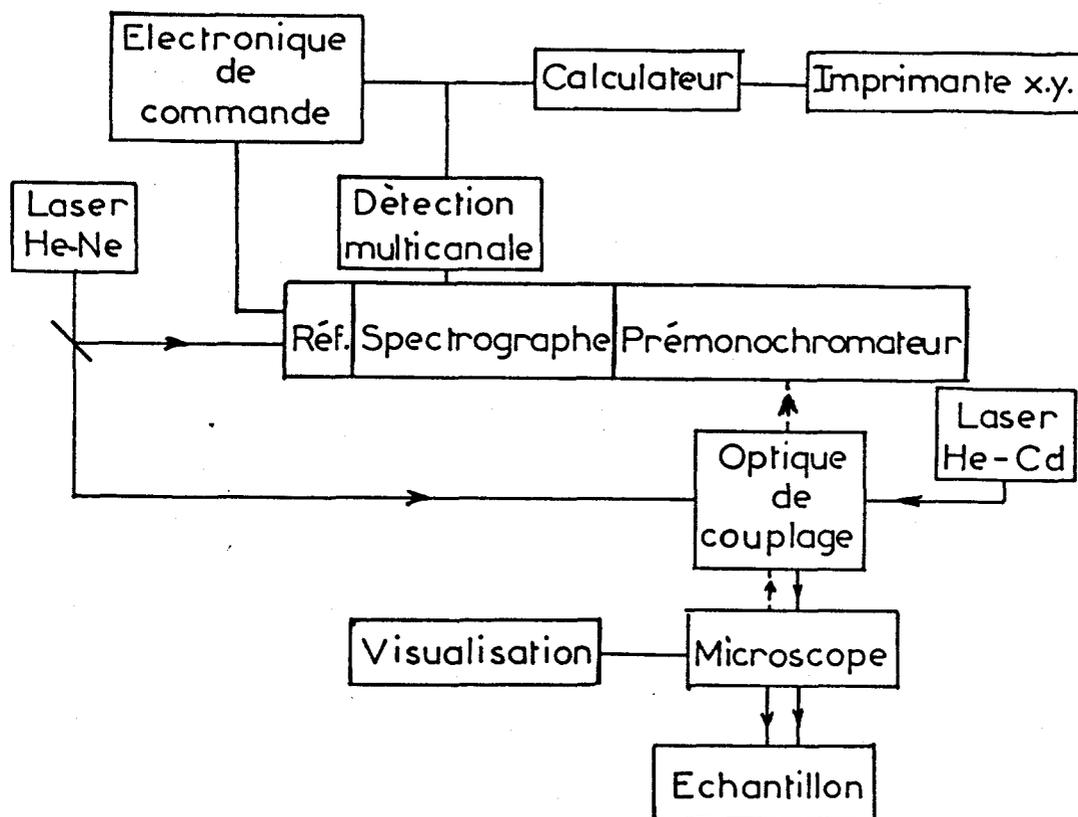


FIG.23 : Schéma synoptique du microspectrofluorimètre (version 02)

Les différents éléments de l'appareil seront détaillés ultérieurement .

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la conception du système dispersif constitué par le prémonochromateur et le spectrographe proprement dit. Nous aborderons d'une part le choix de la configuration du spectromètre, ainsi que celui des différents constituants optiques ; et d'autre part les choix technologiques qui ont été adoptés. Enfin nous décrirons le système de détection multicanale.

II.1- CONFIGURATION DU SPECTROGRAPHE

II.1.1. Caractéristiques d'un monochromateur

Un monochromateur est caractérisé par sa dispersion, sa résolution et sa luminosité.

- Dispersion et résolution

La dispersion angulaire $\frac{d\theta}{d\lambda}$ est le rapport de l'angle $d\theta$ que font deux radiations de longueurs d'onde différentes mais voisines, à l'écart en longueur d'onde $d\lambda$ de celles-ci. La dispersion angulaire est une propriété du disperseur, tandis que le monochromateur est caractérisé par sa dispersion linéaire $\frac{dl}{d\lambda}$ qui fait intervenir la longueur focale f de l'objectif de chambre.

$$\frac{dl}{d\lambda} = f \frac{d\theta}{d\lambda} \quad (16)$$

En pratique, on emploie plus souvent l'inverse de cette grandeur, appelée dispersion linéaire réciproque $D = \frac{d\lambda}{dl}$ qui traduit l'étalement du spectre dans le plan focal de l'objectif.

La résolution $\Delta\lambda$ est l'intervalle de longueurs d'onde que l'appareil peut séparer. Plus $\Delta\lambda$ est petit, plus le spectre est résolu. A la place de $\Delta\lambda$ on considère souvent la quantité $\frac{\lambda}{\Delta\lambda}$ appelée pouvoir de résolution ou résolvançe. La résolvançe intrinsèque d'un disperseur est donnée par la relation :

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = a \cdot \frac{d\theta}{d\lambda} \quad (17)$$

où a est la largeur du faisceau émergent du disperseur.

Avant de faire le choix d'une configuration d'appareil, nous avons pris en considération la résolution et la dispersion qui conviennent le mieux aux phénomènes à analyser.

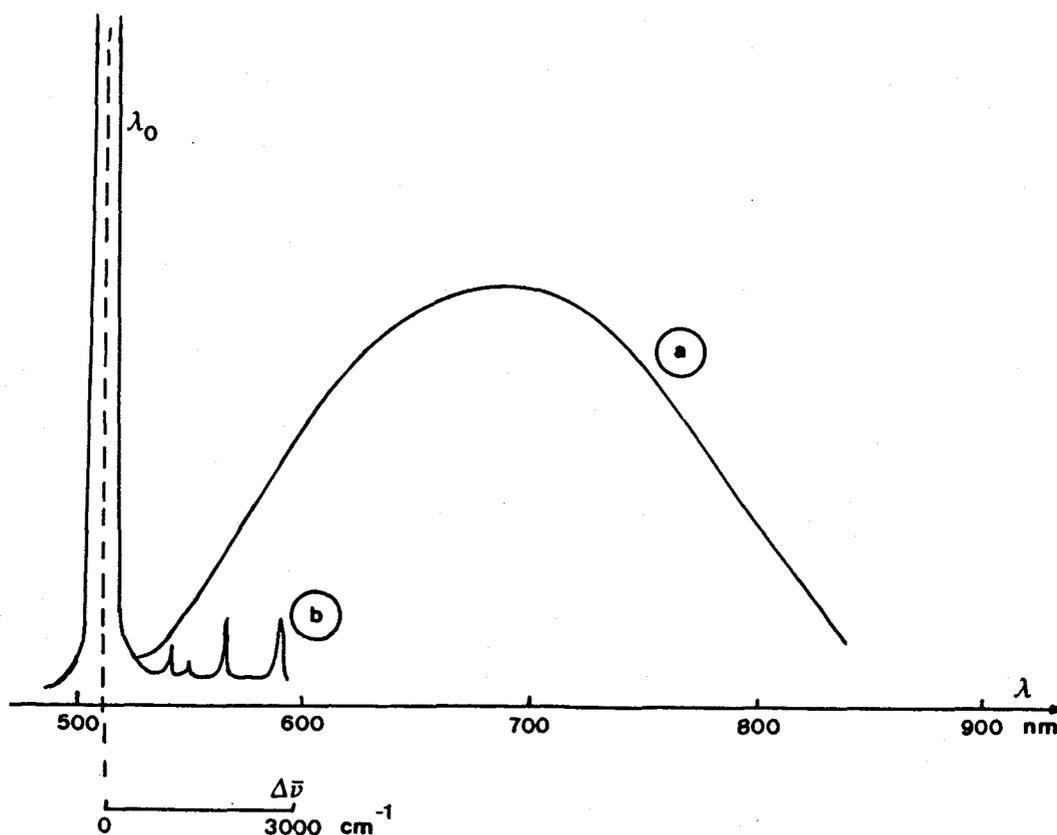


FIG.24 : Champ couvert par un spectre : a) de fluorescence
b) de diffusion Raman

Un spectre d'émission de fluorescence couvre en général plusieurs centaines de nanomètres, tandis que la partie Stokes d'un spectre de diffusion Raman ne dépasse guère 3000 cm^{-1} (ce qui correspond à 88 nm à une longueur d'onde de 500 nanomètres). Les champs spectraux analysés en fluorescence et en spectro-métrie Raman sont donc totalement différents (Fig.24).

L'émission de fluorescence ne présente généralement pas de structures fines, il n'est donc pas nécessaire de travailler à haute résolution. L'enregistrement



peut alors se faire avec une faible dispersion de manière que le champ spectral vu par le détecteur corresponde au spectre complet.

Par contre le spectre de diffusion Raman est constitué de raies. Si on veut résoudre ces raies, il est nécessaire d'avoir une dispersion importante, ce qui rend impossible l'observation du spectre complet au moyen d'un détecteur de petite taille.

- Luminosité

On peut montrer que pour une largeur de fente du spectromètre donnée, la luminosité L est proportionnelle au produit de quatre facteurs dont il convient de tenir compte lors de la construction d'un appareil :

* la transmission T qui est le produit de la transmission de tous les composants optiques

* le rapport entre la hauteur de fente h et la distance focale du collimateur f

* la section de faisceau S au niveau du disperseur

* la dispersion angulaire $\frac{d\theta}{d\lambda}$

$$L \approx T \cdot \left(\frac{h}{f}\right) \cdot S \frac{d\theta}{d\lambda} \quad (18)$$

La luminosité sera d'autant plus élevée que le nombre de surfaces optiques sera plus faible puisque la transmission sera améliorée. Il y a lieu également de choisir les composants optiques en fonction de la gamme des longueurs d'onde dans laquelle l'appareil devra travailler. La section S du faisceau peut être accrue en choisissant des disperseurs de grandes dimensions, les seules limites sont fixées par le prix de revient des disperseurs et l'encombrement mécanique. La dispersion angulaire dépend du choix du disperseur (nombre de traits du réseau).

Enfin, la luminosité sera plus grande en utilisant des optiques de focales courtes pour le collimateur.

Il résulte de ce que nous venons de voir qu'une grande dispersion (proportionnelle à f) s'accompagne d'une diminution de luminosité (proportionnelle à $\frac{1}{f}$). Il est alors nécessaire de faire un compromis optimum entre ces valeurs.

- Lumière parasite

Le monochromateur doit posséder non seulement une luminosité élevée, mais aussi un taux de lumière parasite extrêmement faible. Si un monochromateur est éclairé fortement par une radiation monochromatique (cas de l'excitatrice), toute la lumière ne va pas se rassembler dans l'image spectrale de la fente d'entrée, mais une partie ira constituer des images parasites. La lumière parasite a de nombreuses origines parmi lesquelles on peut citer :

- * les imperfections dans le tracé des réseaux de diffraction
- * les réflexions de la lumière sur les parois, les supports des composants optiques et sur l'optique même
- * la diffusion ou l'émission de fluorescence des composants optiques ou des poussières qui s'y déposent.

Cette lumière parasite peut être réduite. Les réflexions et diffusions accidentelles peuvent être limitées d'une part par l'interposition de caches sur le trajet optique afin de délimiter l'ouverture utile des faisceaux lumineux et d'autre part par la conception même du monochromateur. L'utilisation, devenue classique, des réseaux de diffraction holographiques, où l'imperfection du tracé est inexistante, diminue considérablement le taux de lumière parasite engendrée par les disperseurs.

II.1.2. Principaux types de monochromateurs à réseaux plans

Montage Littrow

Le montage le plus simple est très certainement le montage de Littrow. La lentille joue le rôle de collimateur et d'objectif de chambre (Fig. 25-a) : c'est donc un montage fonctionnant en autocollimation. La lentille peut être remplacée par un miroir concave (Fig.25-b)

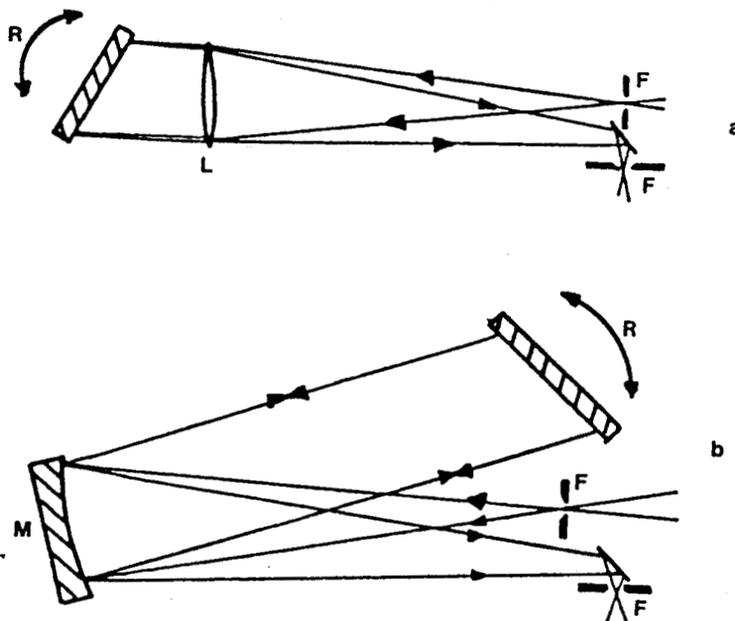


FIG.25 : Montage de Littrow : a) avec lentille
b) avec miroir



Ce montage présente des aberrations et un taux de lumière parasite important dû au fait que c'est le même miroir qui sert de collimateur et d'objectif de chambre.

Montage Ebert Fastie

Dans le montage d'Ebert Fastie (Fig.26) les fentes d'entrée F_1 et de sortie

F_2 sont disposées symétriquement de part et d'autre de l'axe passant par les centres du réseau R et du miroir sphérique M . Ce miroir travaille hors axe et joue à la fois le rôle de collimateur pour donner un faisceau lumineux parallèle sur le réseau, et de miroir de chambre pour refocaliser les images monochromatiques dans le plan de la fente de sortie. L'appareil est rendu stigmatique par l'emploi de fentes courbes (Fig.27). L'inconvénient de ce montage réside dans le fait qu'il ne possède qu'un seul miroir, ce qui rend le réglage délicat.

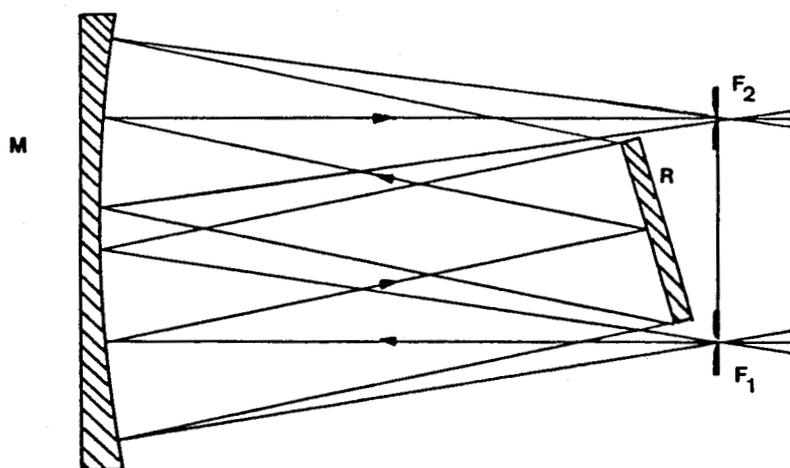


FIG.26 : Schéma de montage d'Ebert-Fastie

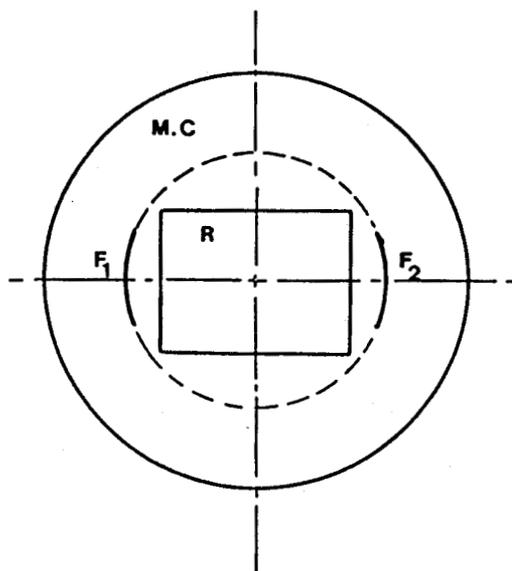


FIG.27 : Courbure des fentes dans le montage d'Ebert-Fastie

Montage Sergent-Rozey

Dans le montage Sergent-Rozey [51], les fentes sont disposées au dessus et au dessous du réseau (Fig.28). Ce montage présente l'avantage d'avoir un taux de lumière parasite faible, les images spectrales ne pouvant pas être rediffractées par le réseau. Cependant ce type de montage est, d'un point de vue mécanique, relativement complexe.

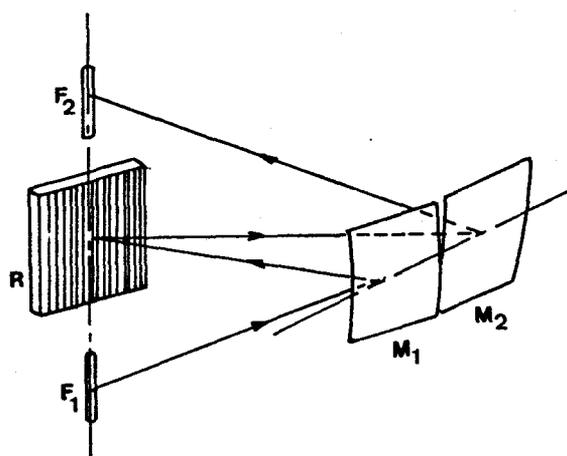


FIG.28 : Montage Sergent-Rozey

Montage Czerny-Turner

Le montage de Czerny-Turner [52] utilise deux miroirs séparés pour le collimateur et l'objectif (Fig.29). Ce montage présente deux variantes selon que les faisceaux d'entrée et de sortie sont parallèles ou non. Il présente l'avantage d'une réalisation mécanique relativement simple, et est de réglage aisé.

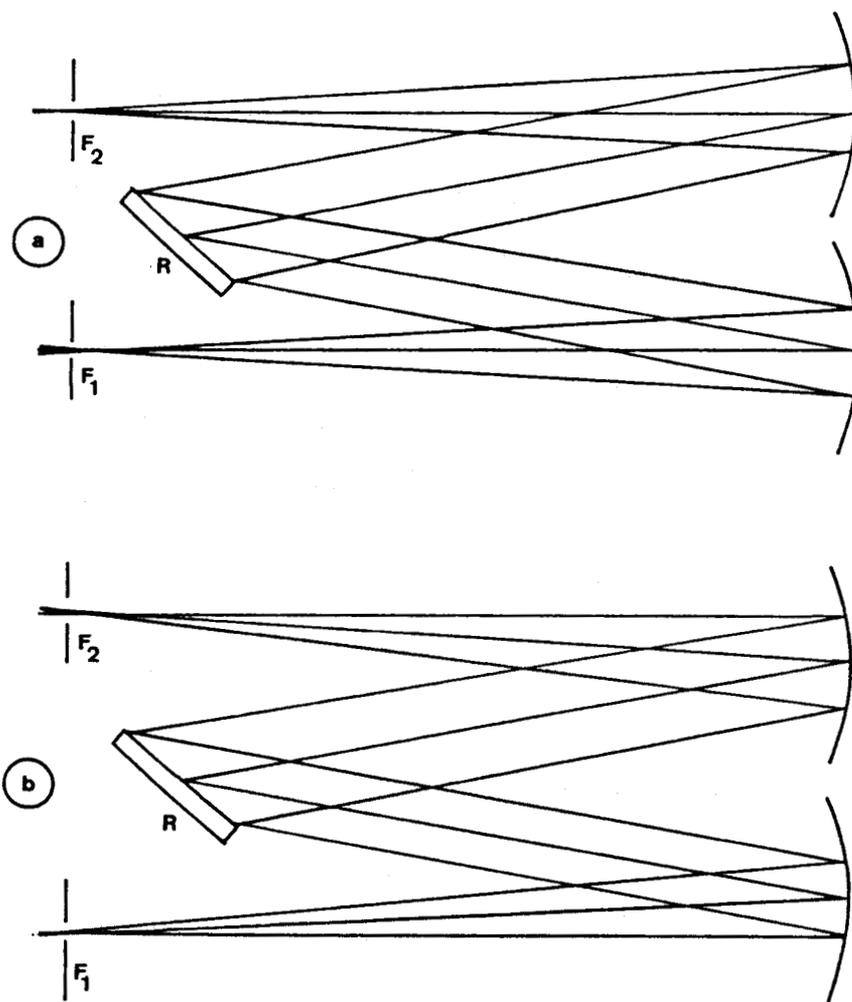


FIG.29 : Montages du type Czerny-Turner a) à faisceaux parallèles
b) à faisceaux non parallèles



II.1.3. Association de monochromateurs

L'appareil étant entre autre destiné à l'étude de la microdiffusion Raman, l'utilisation d'un spectrographe comportant un seul étage dispersif se trouve rapidement limité au niveau de la lumière parasite.

En spectrométrie Raman, le domaine des basses fréquences est particulièrement important pour l'étude de solides. Mais l'exploitation de ce domaine exige

une atténuation suffisante de la raie Rayleigh qui sinon empêche l'observation des raies Raman dans son voisinage.

La solution la plus satisfaisante pour la réjection de la diffusion parasite consiste, comme le montre la figure 30, à associer plusieurs monochromateurs [53]. En spectrométrie multicanale, l'association de deux monochromateurs est insuffisante pour une bonne réjection de la lumière parasite. En effet, un tel appareil serait dépourvu de fente de sortie et posséderait une fente intermédiaire large. Il est préférable de réaliser un triple monochromateur. Les deux premiers étages constituent un prémonochromateur, jouant le rôle de filtre optique, tandis que le troisième étage est le spectrographe proprement dit.

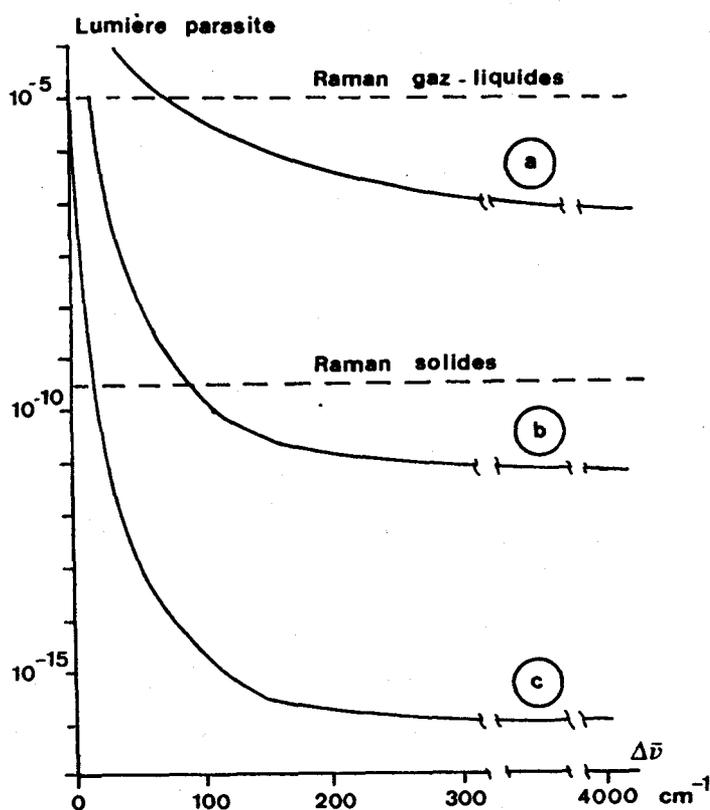


FIG.30 : Taux de lumière parasite en fonction du nombre d'onde Raman
a) simple , b) double , c) triple monochromateurs additifs

Un prémonochromateur est constitué de deux étages identiques disposés à la suite l'un de l'autre, la fente de sortie du premier étage joue le rôle de fente d'entrée pour le second.

Deux types de montages sont alors envisageables :

* un montage additif où la dispersion due au second monochromateur s'ajoute à celle du premier

* un montage soustractif où la dispersion due au second monochromateur se retranche de celle du premier, la dispersion en sortie du prémonochromateur est alors nulle.

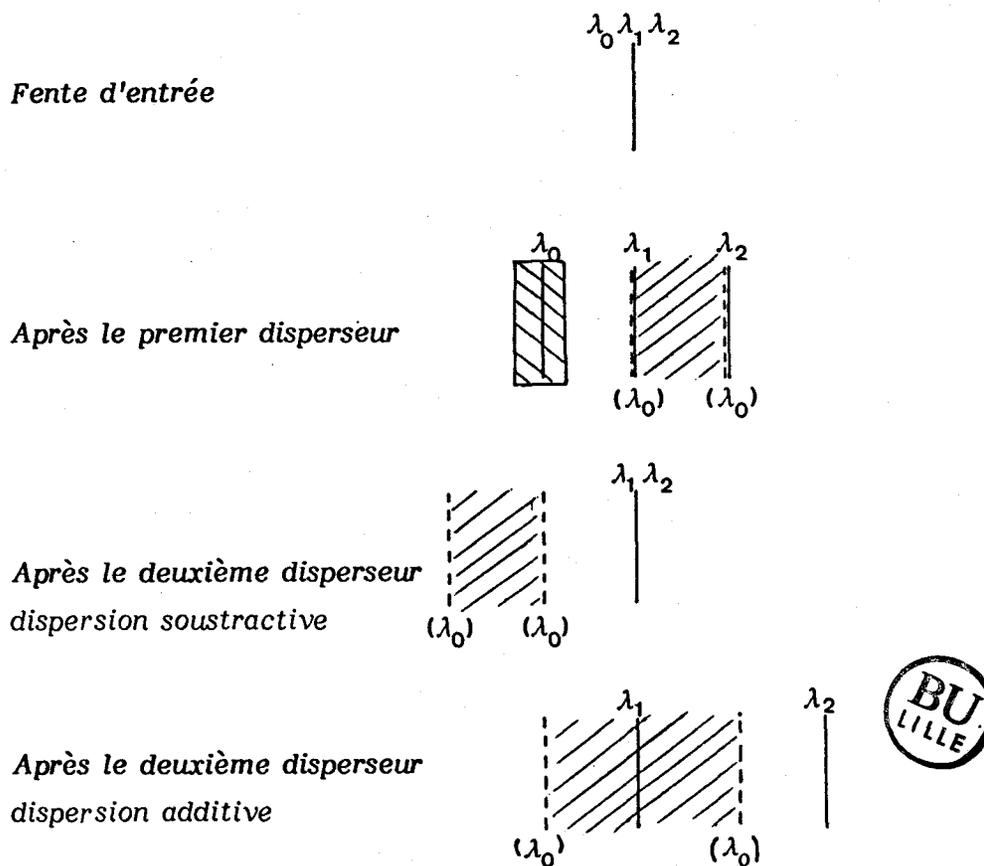


FIG.31. : Comparaison entre un montage soustractif et un montage additif

La réjection de la lumière parasite est illustrée par la figure 31 où l'on compare le résultat obtenu avec un montage soustractif à celui obtenu avec un montage additif.

Soit λ_0 la longueur d'onde d'excitation et λ_1 , λ_2 les longueurs d'onde à chaque extrémité du champ spectral étudié. Après le premier disperser λ_0 , λ_1 , λ_2 sont dispersées. Pour éliminer λ_0 il suffit de mettre cette longueur d'onde hors du champ observé par le détecteur, elle est alors interceptée au moyen d'un cache (lèvre de fente). On utilise une fente large qui détermine la bande passante. Une faible partie de λ_0 due à la lumière parasite de l'instrument est superposée aux autres radiations s'étalant de λ_1 à λ_2 .

Dans le cas d'un montage soustractif, après le second disperser toutes les longueurs entre λ_1 et λ_2 sont recombinaées dans le plan focal du deuxième étage au niveau d'une fente fine. La lumière parasite résiduelle dispersée par le second disperser ne se superpose plus aux longueurs d'onde du champ, et est éliminée de nouveau. Il existe, toutefois une faible quantité de lumière parasite issue du second étage due aux imperfections des surfaces optiques.

Si le montage est additif, l'écart géométrique entre λ_1 et λ_2 double, il faut utiliser une fente large et une partie de la lumière parasite qui n'a pas été éliminée par le premier étage se retrouve dans le champ du second.

Le taux de lumière parasite étant proportionnel au produit des surfaces des trois fentes, on montre que le rapport du taux de lumière parasite d'un montage additif τ_+ à celui d'un montage soustractif τ_- est donné par la relation :

$$\frac{\tau_+}{\tau_-} = \frac{2l_2}{l_1} \quad (19)$$

où l_1 est la largeur de la fente d'entrée du prémonochromateur et l_2 celle de la fente large intermédiaire délimitant la bande passante du prémonochromateur.

L'utilisation d'un système soustractif (Fig.32) donne donc, pour le même

domaine spectral analysé, un taux de lumière parasite beaucoup plus faible qu'un montage additif (Fig.33).

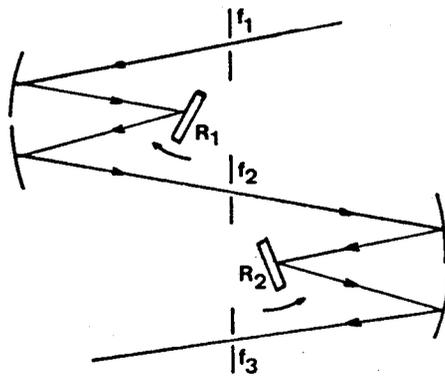


FIG. 32 : Association de deux monochromateurs à dispersion soustractive

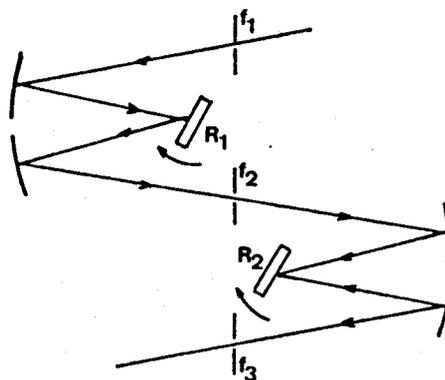


FIG.33 : Association de deux monochromateurs à dispersion additive

II.1.4. Choix de la configuration du spectrographe

Au vu des considérations précédentes, la configuration que nous avons finalement retenue pour la version 02 de l'appareil consiste en l'association de trois étages identiques du type Czerny-Turner. Les deux premiers étages constituent un prémonochromateur à dispersion nulle (montage soustractif), jouant le rôle de filtre passe bande. La fente de sortie du spectrographe sert également de fente d'entrée pour le spectrographe.

L'obtention d'une basse dispersion nécessaire pour analyser le domaine complet du spectre visible sans rotation du système dispersif impose l'usage de prisme, les réseaux de diffraction possédant un faible nombre de traits étant mal adaptés.

En effet, les prismes ont pour avantage :

- * de ne pas poser de problème de recouvrement d'ordres
- * de posséder une transmission meilleure que l'efficacité des réseaux de diffraction
- * de fournir un champ spectral important, un grand choix de substance ou d'angle au sommet du prisme permet d'obtenir la dispersion désirée.

Par contre, la dispersion moyenne est obtenue en utilisant des réseaux de diffraction. Le choix des disperseurs sera défini ultérieurement de manière plus précise.

Afin de conserver la même configuration optique avec les deux disperseurs, nous avons choisi d'utiliser un prisme possédant une face réfléchissante (Fig.34). Les faisceaux lumineux effectuent alors un double passage dans chacun des prismes, la dispersion est multipliée par un facteur 2.

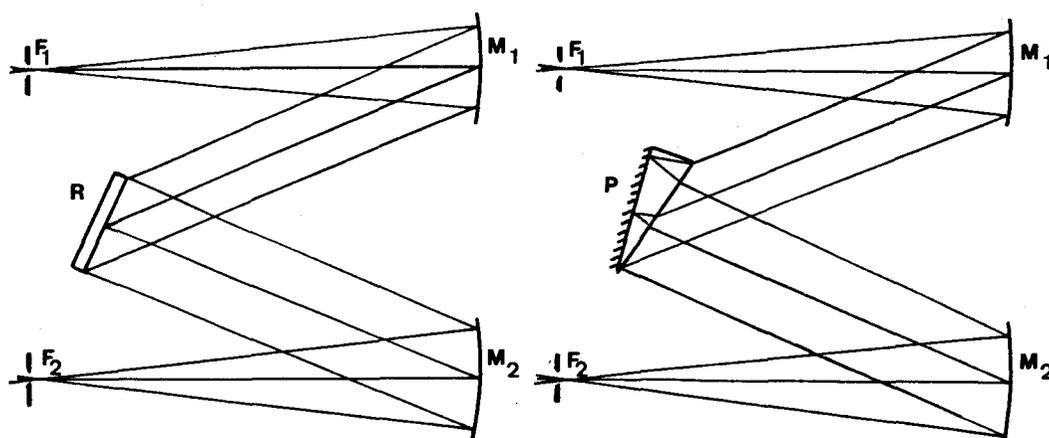


FIG.34 : Conservation de la configuration optique pour les deux dispersers
(F : fente ; P.F. plan focal ; R réseau de diffraction ; P prisme)

Le spectrographe comporte donc un ensemble de trois réseaux et un autre de trois prismes. La rotation permettant le positionnement angulaire des dispersers doit être synchronisée pour les trois étages. D'autre part, un système mécanique doit permettre le passage d'une dispersion à l'autre.

Une solution envisageable était de monter prismes et réseaux dos à dos sur un arbre unique, le passage de l'un à l'autre se faisant par une rotation de 180° de l'arbre. Nous avons écarté cette solution, l'axe de rotation devant correspondre simultanément à la face de diffraction des réseaux et à la face réfléchissante des prismes, ce qui nécessitait un mécanisme très complexe.

La solution originale que nous avons adoptée est la suivante : prisme et réseaux sont montés alternativement du même côté d'un seul arbre possédant deux degrés de liberté :

* une rotation permettant d'amener le domaine spectral étudié dans le champ de détecteur

* une translation suivant le même axe permettant le passage d'un ensemble de disperses à un autre

Une seule commande est donc nécessaire pour le spectrographe et le prémonochromateur.

La figure 35 représentant le schéma optique simplifié de l'appareil montre la disposition alternée des disperses.

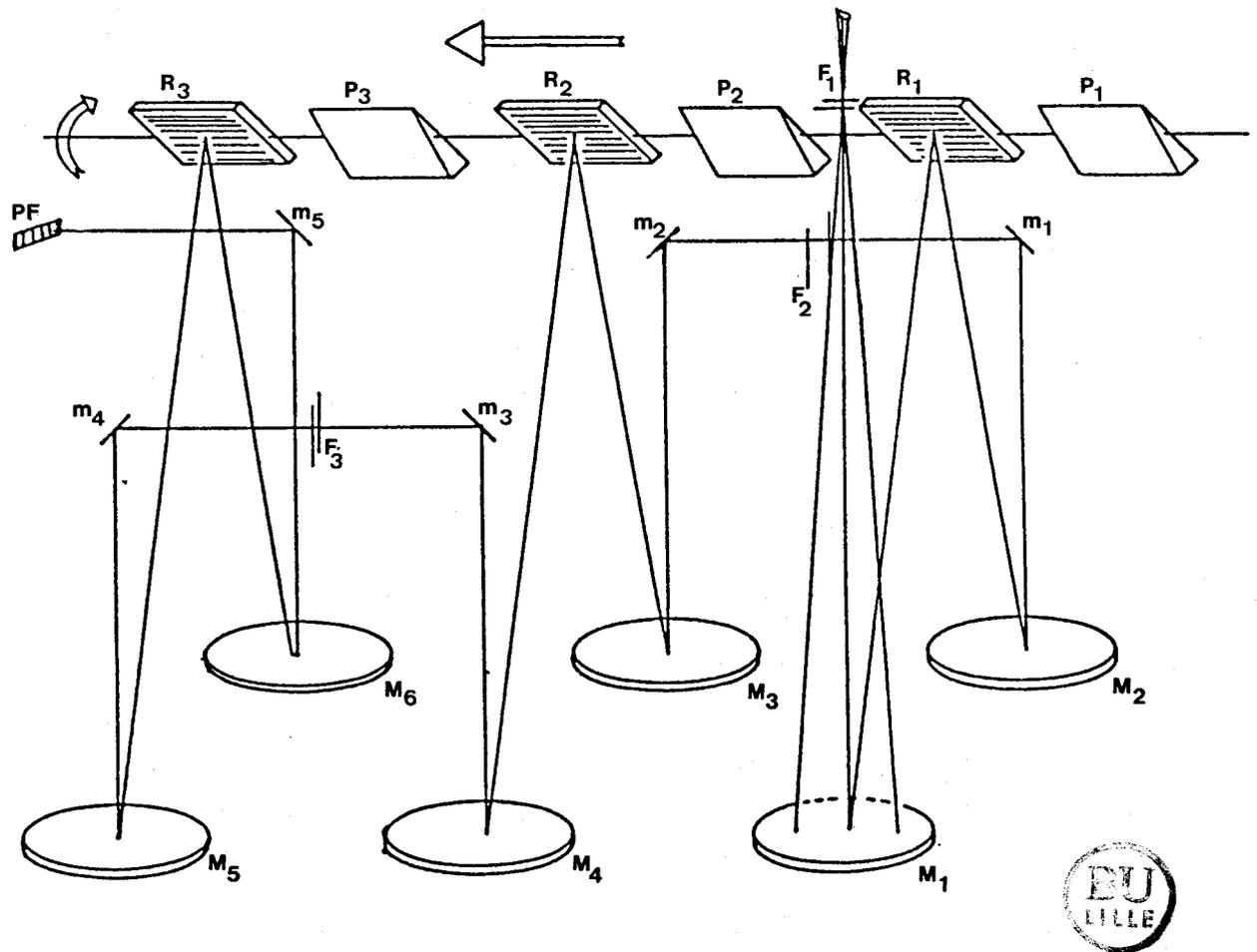


FIG.35 : Schéma optique de l'appareil

(M_i : miroirs concaves ; m_i : miroirs de renvoi ; F_i : fentes
 P_i : prismes ; R_i : réseaux de diffraction ; P.F. : plan focal)

Les caractéristiques optiques de l'instrument sont les suivantes :

* les miroirs sphériques collimateur et de focalisation du spectre ont une longueur focale de 500 mm

* l'ouverture numérique du spectrographe est de $f/8,6$

* l'angle du spectrographe, correspondant à l'angle entre le faisceau incident et la normale au réseau dans l'ordre 0, est déterminé par les dimensions des différentes pièces optiques, il est dans notre cas de $8,84^\circ$.

Il peut être intéressant, pour augmenter la résolution lors de l'utilisation des réseaux de rendre le prémonochromateur additif. Nous avons étudié, dans ce but, une solution qui consiste à inverser l'image une première fois au niveau de l'entrée du second monochromateur et une seconde fois en sortie de ce même étage. En effet, rendre le prémonochromateur additif ne suffit pas, il faut que la dispersion du spectrographe s'ajoute à celle des deux premiers étages. La fente fine d'entrée du spectrographe doit alors être remplacée par une fente large possédant une ouverture double de la fente intermédiaire du prémonochromateur.

Un dispositif optique permettant le retournement de l'image au niveau des fentes est schématisé sur la figure 36. Il est composé de deux miroirs plans escamotables (m'_1 et m'_2) et d'un miroir concave (M'_1). L'appareil que nous avons réalisé ne comporte pas de dispositif permettant de rendre le prémonochromateur additif, mais peut très facilement en être équipé.

Rendre le prémonochromateur additif présente cependant deux inconvénients

* l'augmentation de la résolution se fait au détriment du champ spectral observable

* le fait d'augmenter considérablement la surface de la fente d'entrée du spectrographe provoque une augmentation de la lumière parasite.

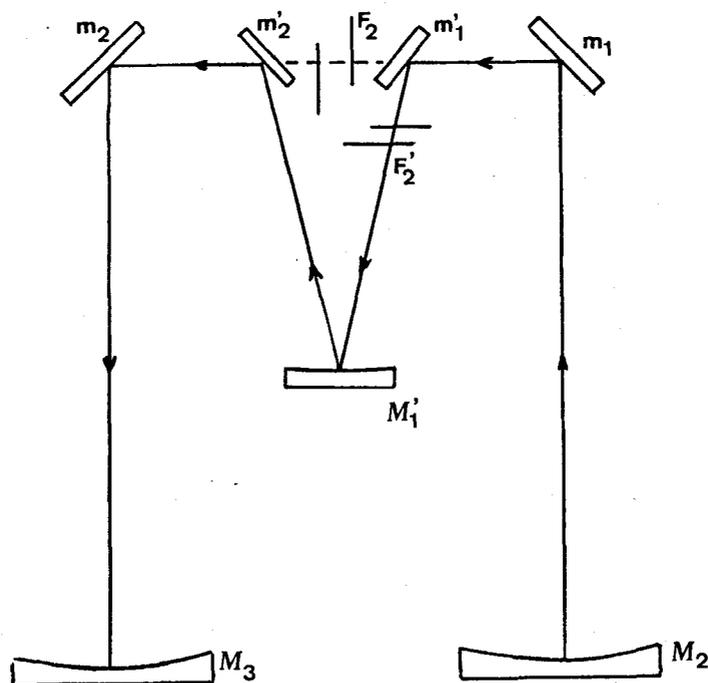


FIG.36 : Dispositif de retournement d'image

II.2.- CHOIX DES DISPERSSEURS

II.2.1. Réseaux de diffraction

Le choix des réseaux de diffraction dépend directement du domaine spectral à analyser et de la dimension de celui-ci au niveau du détecteur. Pour des raisons de commodité, le prototype du spectrographe que nous avons réalisé est destiné à travailler uniquement dans le domaine du visible .

Afin de déterminer le nombre de traits des réseaux, nous avons calculé les dispersions et les champs spectraux obtenus pour différents types de réseaux dans la configuration de notre montage (Fig.37).

Si les faisceaux incident et diffracté sont du même côté de la normale au réseau, l'équation fondamentale de la diffraction s'écrit :

$$k \cdot \lambda = d (\sin i + \sin r) \quad (20)$$

avec k = ordre de diffraction

λ : longueur d'onde

d : distance entre deux traits du réseau

i : angle d'incidence

r : angle de diffraction

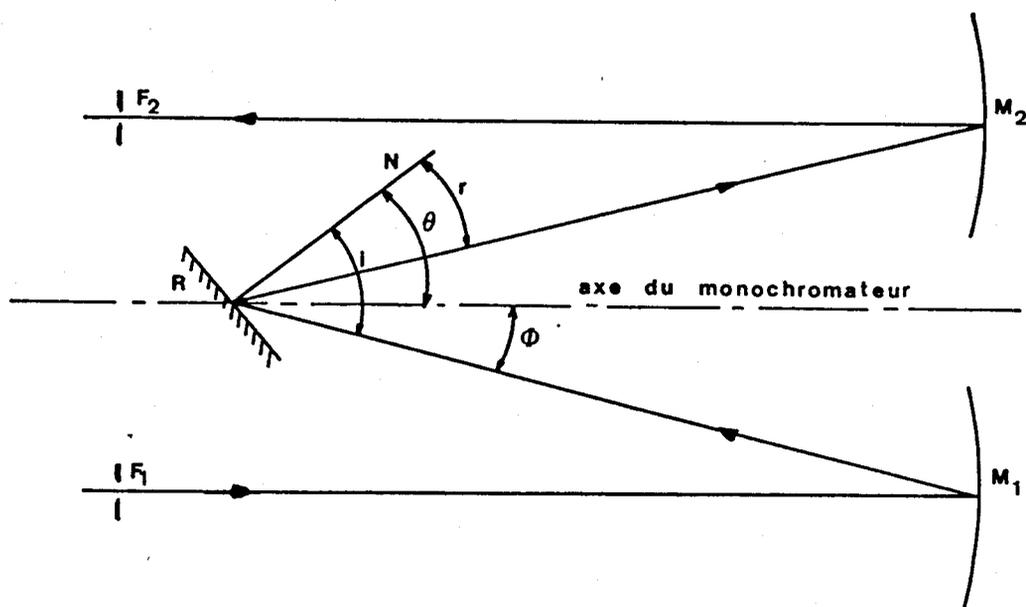


FIG.37 : Angles intervenant dans la diffraction

Les angles i et r peuvent être exprimés en fonction de l'angle de rotation θ du réseau par rapport à sa position dans l'ordre 0 et de l'angle du spectrographe ϕ qui est fixe

$$i = \theta + \phi \quad (21)$$

$$r = \theta - \phi \quad (22)$$

L'équation (9) devient alors

$$k \cdot \lambda = 2 d \cdot \sin \theta \cdot \cos \phi \quad (23)$$

Pour une longueur donnée, on peut donc calculer facilement l'angle que fera le réseau avec sa position dans l'ordre 0

$$\theta = \arcsin \left(\frac{k \cdot \lambda}{2d \cdot \cos \phi} \right) \quad (24)$$

La dispersion linéaire réciproque en nombre d'onde est donnée par :

$$\frac{d\bar{\nu}}{dx} = \frac{\bar{\nu}^2 \cdot \cos r}{n \cdot k \cdot f} \quad (25)$$

f étant la longueur focale de l'objectif et $n = \frac{1}{d}$ représente le nombre de traits du réseau par unité de longueur.

En combinant les équations (22) et (24) cette expression devient :

$$\frac{d\bar{\nu}}{dx} = \frac{\bar{\nu}^2 \cdot \cos \left(\arcsin \frac{n \cdot k \cdot \lambda}{2 \cos \phi} - \phi \right)}{n \cdot k \cdot f} \quad (26)$$

A partir de cette équation, nous avons calculé la dispersion dans l'ordre 1 pour différents réseaux en fonction de la longueur d'onde (Fig.38). Ainsi que les champs observés, en considérant la largeur du détecteur égale à 12,7 mm, ce qui correspond à la dimension d'une barrette comportant 512 photodiodes.

Nous avons estimé que le meilleur compromis entre la résolution et le champ spectral observé, pour l'étude de la diffusion Raman ou encore de l'émission de fluorescence présentant des raies fines, est obtenu en utilisant un réseau de diffraction comportant 1800 traits / mm. Celui-ci permet l'obtention d'un champ de 500 cm^{-1} à 500 nm et de 240 cm^{-1} à 700 nm , ce qui correspond respectivement à 1 cm^{-1} et à $0,47 \text{ cm}^{-1}$ par diode.

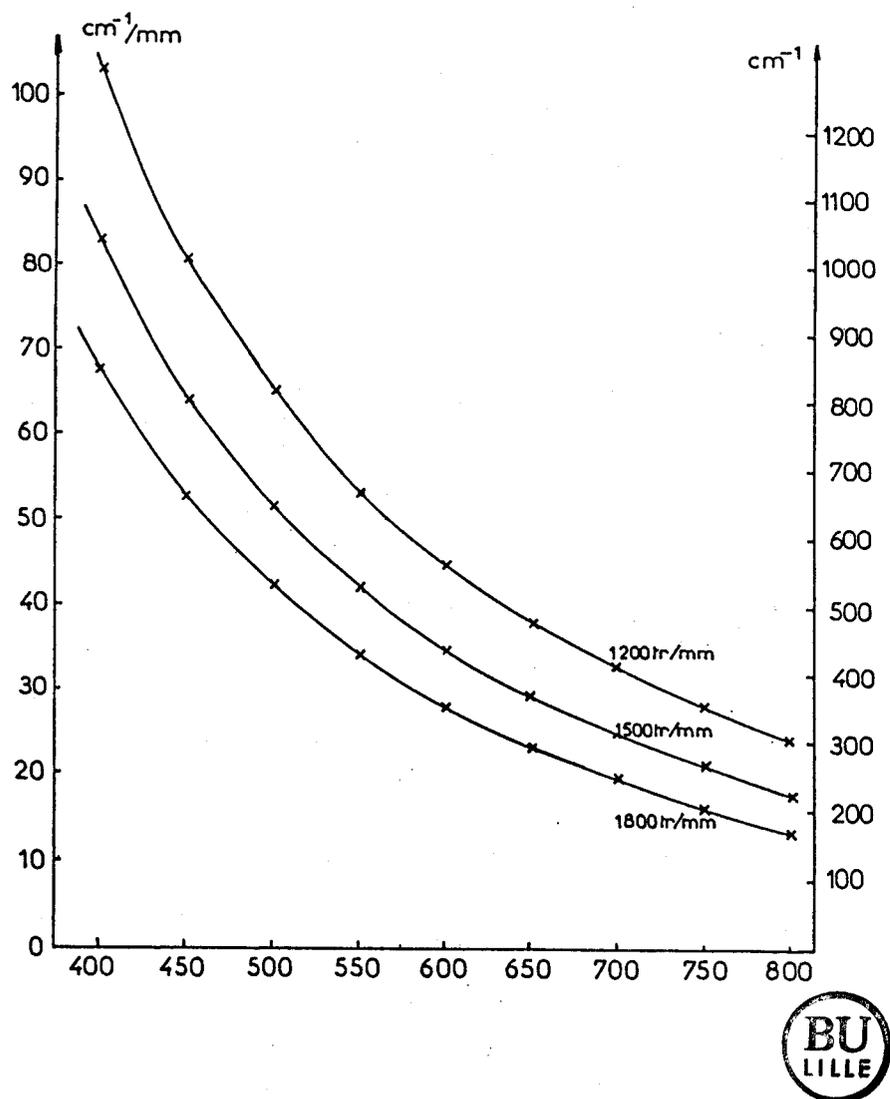


FIG.38 : Dispersion et champs observés en fonction de la longueur d'onde au centre du détecteur

Ainsi nous avons équipé le spectrographe de trois réseaux holographiques présentant un maximum d'efficacité à 500 nm, comportant 1800 traits/mm .

La résolution intrinsèque R_0 d'un disperseur est proportionnelle au nombre total N de traits du réseau, donc à la dimension l de celui-ci

$$R_0 = k.N = k. l. n \quad (27)$$

Pour obtenir une luminosité et une résolution intrinsèque élevées, il y a lieu d'utiliser des réseaux de grande dimension. Toutefois nous sommes limités par le fait de devoir disposer six disperses sur le même axe. La dimension des réseaux est donc réduite à $58 \times 58 \text{ mm}^2$.

L'intervalle spectral résolu $\Delta\bar{\nu}$ dans le cas d'un spectrographe est donné par l'expression

$$\Delta\bar{\nu} = \frac{f_o}{f_c} \cdot \frac{d\bar{\nu}}{dx} \cdot \Delta x \quad (28)$$

avec $\frac{f_o}{f_c}$ le grandissement des optiques égal à l'unité dans notre cas et Δx l'ouverture mécanique de la fente d'entrée.

La courbe de la figure 39 donne l'intervalle spectral résolu en fonction de la longueur d'onde, en considérant une largeur de la fente d'entrée égale à $200 \mu\text{m}$.

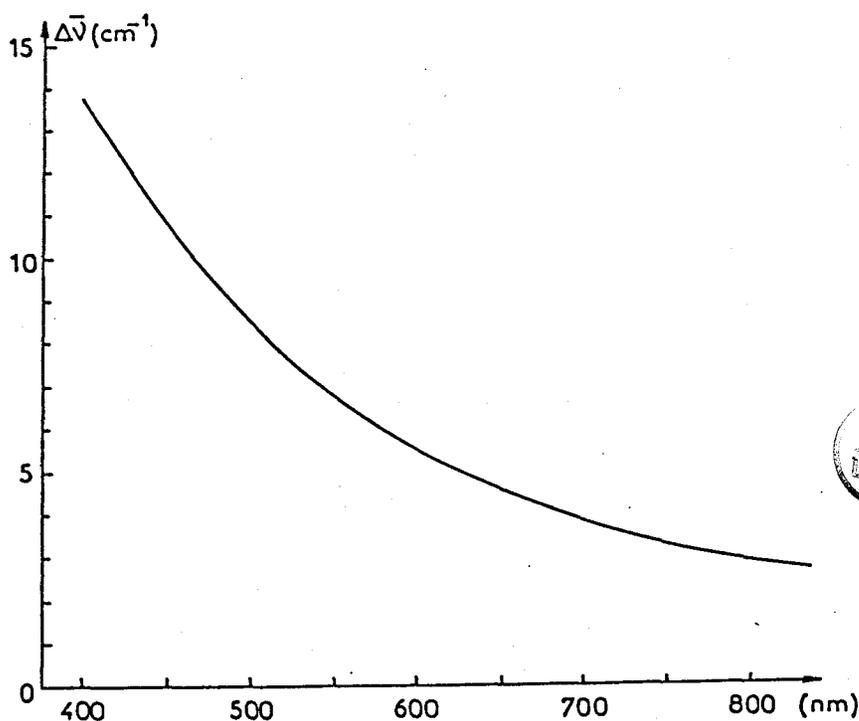


FIG.39 : Intervalle spectral résolu en fonction de la longueur d'onde pour le réseau de 1800 traits/mm

La luminosité du spectrographe dépend également de l'efficacité des réseaux.
La figure 40 montre l'efficacité absolue (le rapport de l'intensité lumineuse diffractée à l'intensité lumineuse incidente à une longueur d'onde donnée) .

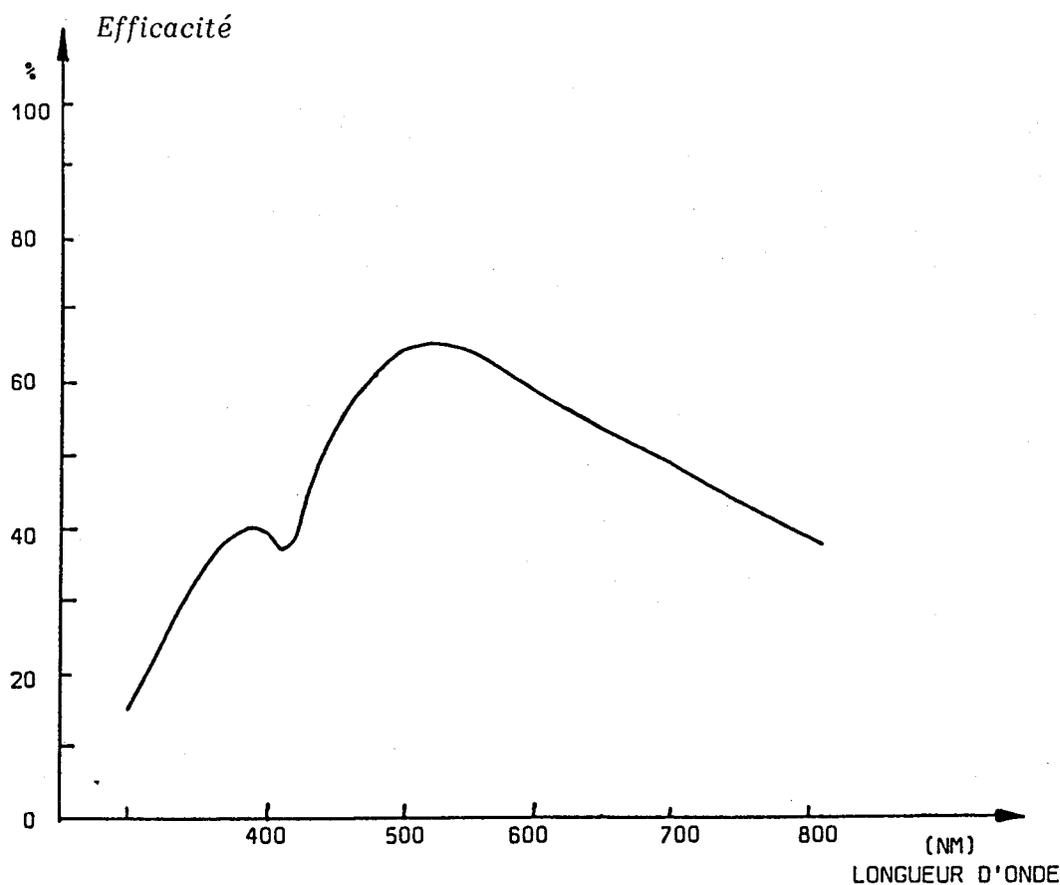


FIG.40 : Efficacité absolue en fonction de la longueur d'onde pour un réseau holographique de 1800 traits/mm mesurée pour un montage Littrow



La luminosité totale de l'appareil sera proportionnelle au cube de l'efficacité du réseau et dépendra également du facteur de transmission de chaque miroir, dont la valeur est voisine de 98 % dans le domaine du visible .

II.2.2. Prismes

II.2.2.1. Etude du prisme

En différentiant les formules classiques du prisme, on montre que la dispersion angulaire $\frac{d\theta}{d\lambda}$ est donnée par la relation :

$$\frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{(e_1 - e_2)}{a} \cdot \frac{dn}{d\lambda} \quad (29)$$

e_1 et e_2 étant les épaisseurs de matériau traversées par les rayons marginaux comme le montre la figure 41, tandis que a représente la largeur du faisceau diffracté.

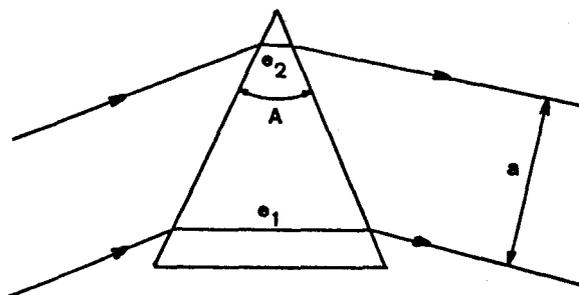


FIG.41 : Mode d'éclairage d'un prisme

Dans le cas où l'on travaille au minimum de déviation avec un prisme d'indice de réfraction n et d'angle au sommet A , la relation peut encore s'écrire :

$$\frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{2 \cdot \sin \frac{A}{2}}{\sqrt{1 - n^2 \sin^2 \frac{A}{2}}} \cdot \frac{dn}{d\lambda} \quad (30)$$

La dispersion est une fonction de l'angle du prisme et de l'indice de réfraction du matériau le constituant, deux paramètres sur lesquels nous pouvons influencer pour obtenir le champ spectral désiré.

La configuration de l'appareil, ainsi que la multiplication du nombre de prismes conduisant à des pertes importantes de lumière par absorption dans le matériau et par réflexion sur les surfaces optiques, nous imposent l'utilisation d'un prisme de faible angle au sommet, nécessitant donc un matériau très dispersif. Ce prisme a comme nous l'avons vu précédemment une surface réfléchissante.

Considérons un prisme dont la face arrière est métallisée et d'angle au sommet A ; le trajet des faisceaux lumineux, imposé par la configuration de chaque monochromateur et par les lois de la réflexion et de la réfraction, est schématisé par la figure 42.

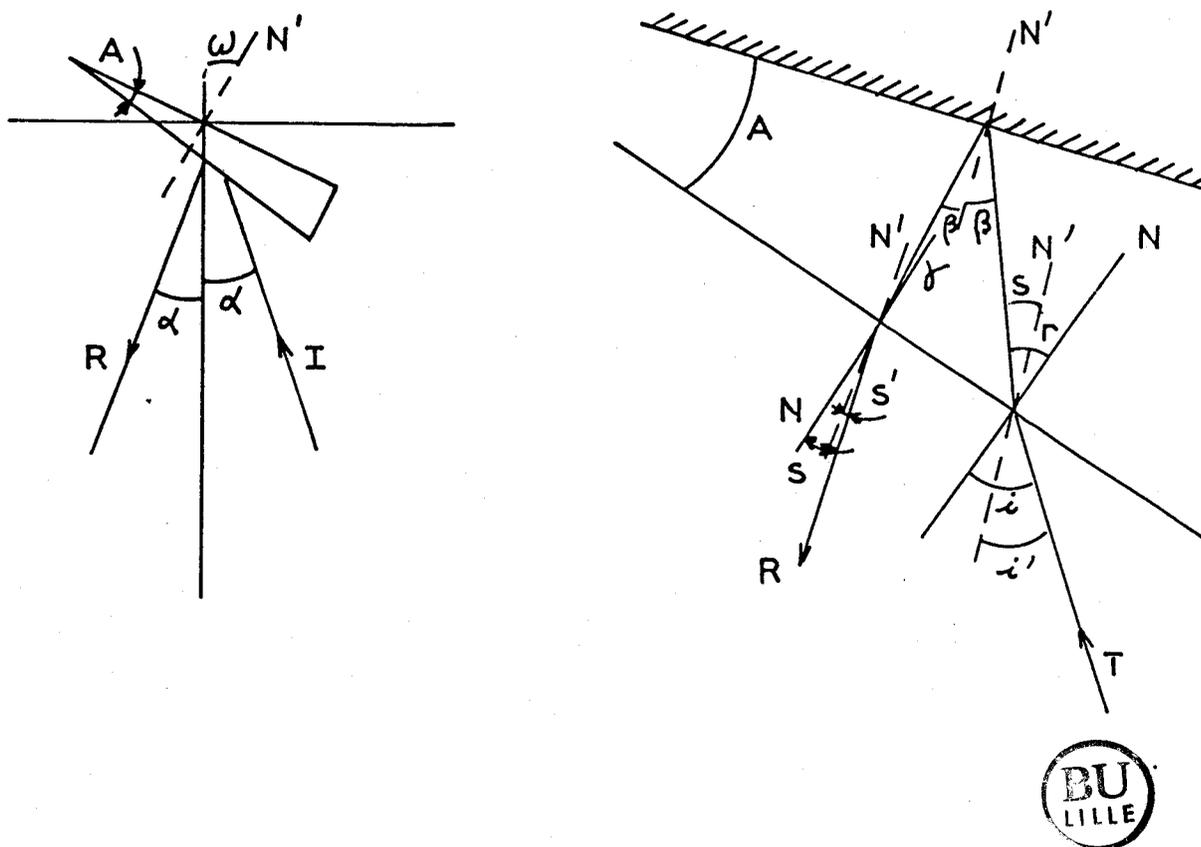


FIG.42 : Trajet d'un rayon lumineux au travers d'un prisme

La signification des différents symboles utilisés est la suivante :

I : rayon monochromatique incident

R : rayon réfracté par le prisme

N : normale à la face avant du prisme

N' : normale à la face réfléchissante du prisme

i : angle entre le faisceau incident et la normale N

i' : angle entre le faisceau incident et la normale N'

r : angle entre le rayon réfracté lors du premier passage et la normale N

β : angle de réflexion entre le rayon réfracté et la normale N'

γ : angle entre le rayon réfléchi et la normale N

s : angle entre le rayon émergent et la normale N

s' : angle entre le rayon émergent et la normale N'

A : angle au sommet du prisme

ω : angle de rotation du prisme par rapport à l'horizontale (position de l'ordre 0 pour les réseaux)

α : angle du spectrographe égal à $8,84^\circ$

Les relations géométriques existant entre ces différents angles sont les suivantes :

$$r = \beta + A \quad (31)$$

$$A = \gamma + \beta \quad (32)$$

La combinaison des relations (31) et (32) donne :

$$r + \gamma = 2 A \quad (33)$$

D'autre part, on a également

$$i = i' + A \quad (34)$$

$$s = s' + A \quad (35)$$

$$i' = \omega + \alpha \quad (36)$$

$$s' = \omega - \alpha \quad (37)$$

La loi de réfraction de Descartes s'écrit :

$$\sin i = n. \sin r \quad (38)$$

$$\text{et } \sin r = n. \sin \gamma \quad (39)$$

Ces relations permettent d'obtenir

$$r = \text{Arc sin} \left[\frac{\sin (A + \omega + \alpha)}{n} \right] \quad (40)$$

$$\gamma = \text{Arc sin} \left[\frac{\sin (A + \omega - \alpha)}{n} \right] \quad (41)$$

Les relations (35), (40) et (41) imposent comme condition au système :

$$\text{Arc sin} \left[\frac{\sin (A + \omega + \alpha)}{n} \right] + \text{Arc sin} \left[\frac{\sin (A + \omega - \alpha)}{n} \right] = 2A \quad (42)$$

L'angle du spectrographe α est fixe, l'angle du prisme A et l'indice de réfraction n du matériau sont les paramètres qu'il faut définir, ω l'angle de rotation du prisme jouant le rôle de variable.

Comme nous allons le voir, nous avons utilisé cette condition pour calculer les champs spectraux observés en considérant différentes valeurs pour A et n . Nous avons considéré les champs et non la dispersion, cette dernière variant considérablement avec la longueur d'onde.

II.2.2.2. Choix de la substance constituant les prismes

Le choix du matériau constituant les prismes est guidé par sa transparence et sa variation d'indice dans le domaine spectral où il sera utilisé.

Chaque type de matériau est caractérisé par son indice de réfraction.

Dans les catalogues de verre, on donne généralement l'indice de réfraction pour le milieu du spectre du visible ; n_d représente l'indice de réfraction à 587,56 nm, longueur d'onde correspondant à une raie spectrale du sodium. Les autres indices ne sont donnés que par leurs différences que l'on appelle dispersions partielles. Ainsi la dispersion partielle moyenne est la différence $n_F - n_C$ où n_F et n_C sont les indices de réfraction pour les raies F et C de l'hydrogène respectivement à 486,1 nm et 656,3 nm.

La variation d'indice d'une substance en fonction de la longueur d'onde est représentée dans le visible par le nombre d'Abbe v_d encore appelé constringence

$$v_d = \frac{n_d - 1}{n_F - n_C} \quad (43)$$

La constringence mesure l'aptitude du verre à réduire la dispersion des différentes couleurs. L'inverse de cette quantité est le pouvoir dispersif du matériau.

Nous avons étudié cinq verres différents dont les caractéristiques figurent dans le tableau 2.

Verre	Catégorie	n_d	$n_F - n_C$	v_d
SF 56	flint extra dense	1,7848	0,03009	26,08
SF 55	flint extra dense	1,7618	0,02826	26,95
SF 8	flint extra dense	1,6889	0,02209	31,18
BK 7	crown	1,5168	0,00806	64,17
silice fondue	—	1,4584	0,00676	67,80

TABLEAU 2 : Caractéristiques des différents verres étudiés

La condition relative aux angles imposée par la relation (42), nous a permis de calculer les champs observables pour des prismes de verre différent en fonction de la longueur d'onde au centre du champ. La procédure de calcul est la suivante nous avons fixé un angle A faible de 15° pour le prisme ; pour différentes longueurs d'onde, donc différents indices de réfraction, nous avons calculé l'angle de rotation ω du prisme. La connaissance de cet angle nous a permis de retrouver, en utilisant la même formule (42), les indices de réfraction à chaque extrémité du champ. Pour cela nous avons fait varier l'angle du faisceau émergeant avec la verticale, c'est à dire α dans la seconde partie de la relation.

L'indice de réfraction pour les différents verres est donnée par la formule

$$n^2 = A_0 + A_1 \lambda^2 + A_2 \lambda^{-2} + A_3 \lambda^{-4} + A_4 \lambda^{-6} + A_5 \lambda^{-8} \quad (44)$$

La longueur d'onde λ s'exprimant en μm et $A_0 \dots A_i$ sont les constantes de la formule de dispersion données par le fabricant. Toutefois pour la silice fondue l'équation est différente de celle utilisée pour les verres et la variation de l'indice de réfraction en fonction de la longueur d'onde peut être exprimée par une relation du type de celle établie par Malitson [54].

$$n^2 - 1 = \frac{0,6961663 \lambda^2}{\lambda^2 - (0,0684043)^2} + \frac{0,4079426 \lambda^2}{\lambda^2 - (0,116241)^2} + \frac{0,8974794 \lambda^2}{\lambda^2 - (9,896161)^2} \quad (45)$$

Ces deux relations ont été utilisées pour calculer les longueurs d'onde aux extrémités du champ connaissant l'indice de réfraction.

La figure 42 regroupe les courbes de champs spectraux observables sur une longueur de 12 mm, correspondant à la dimension du détecteur, en fonction de la longueur d'onde au centre du détecteur pour un prisme de 15° d'angle au sommet et pour un réseau de diffraction comportant 300 traits/mm.

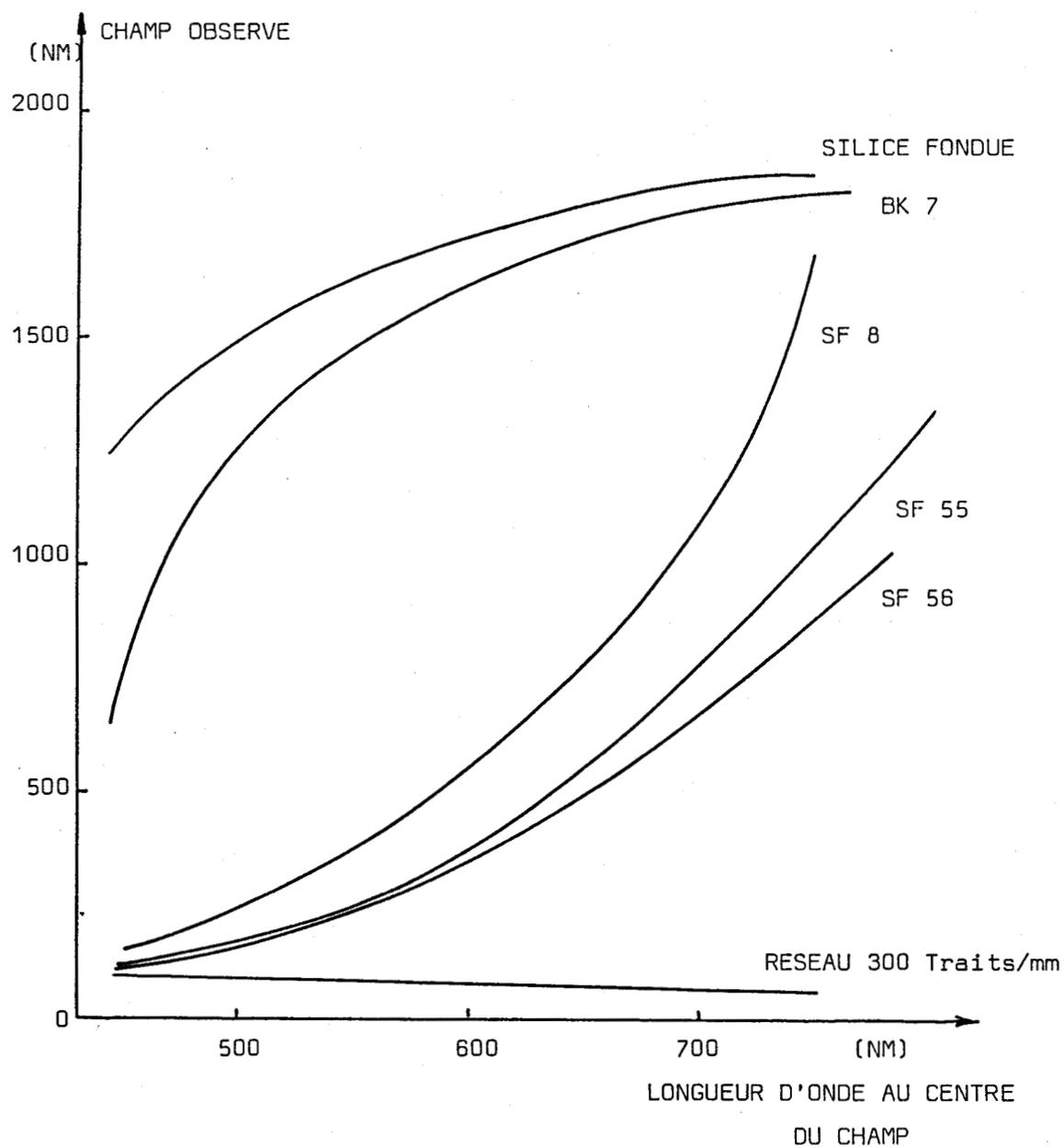


FIG.43 : Champs observés en fonction de la longueur d'onde au centre du détecteur, pour différents prismes et pour un réseau de diffraction (300 traits/mm)

Plusieurs constatations peuvent être faites à partir de ces courbes :

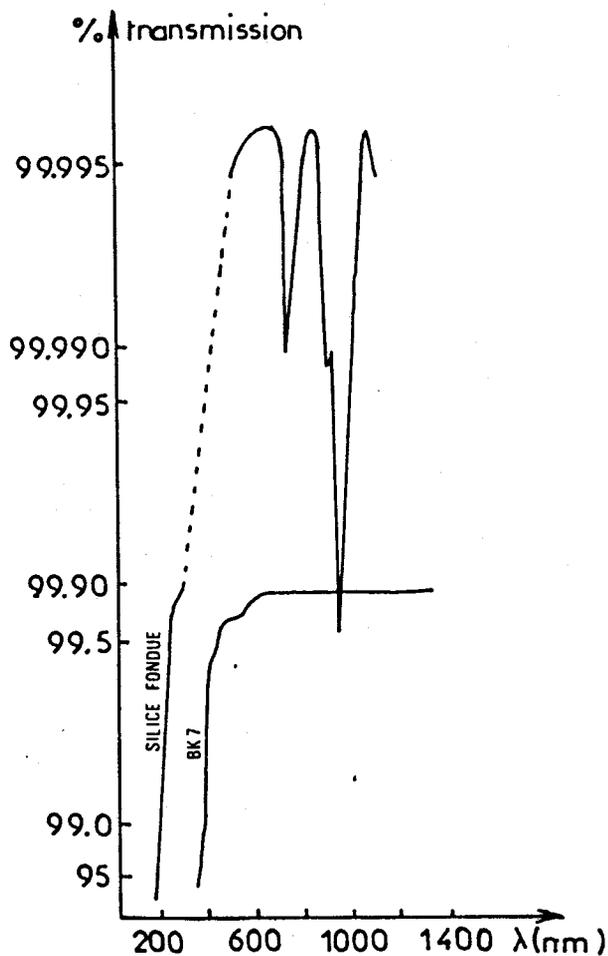


FIG.44 : Courbes de transmission du BK7 et de la silice fondue

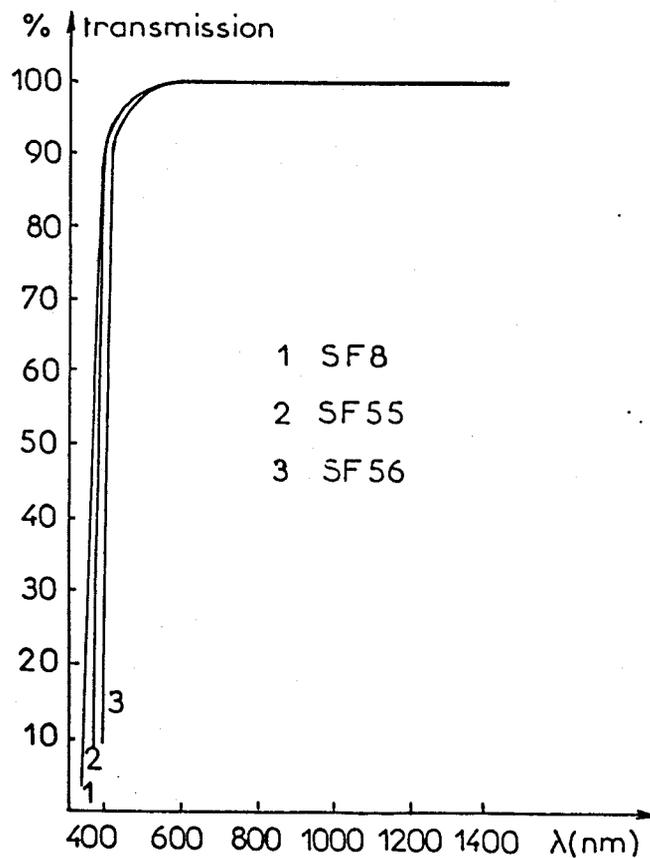


FIG.45 : Courbes de transmission des flints SF8 - SF55 et SF56

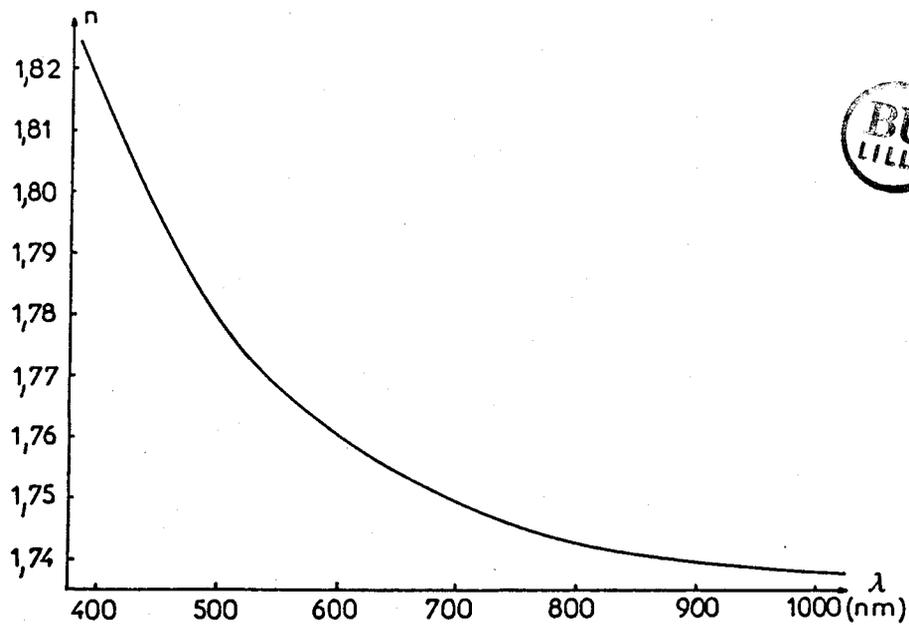


FIG.46 : Variation de l'indice en fonction de la longueur d'onde



- Comme nous l'avions prévu, un réseau de diffraction est tout à fait inadapté pour l'obtention d'un champ spectral important, couvrant tout le domaine du visible.

- Le BK7 est également inutilisable pour un prisme de faible angle au sommet, sa dispersion étant trop faible.

- La silice fondue qui convient très bien pour l'étude du domaine de l'ultra-violet est très nettement inférieure au verre classique dans celui du visible du point de vue du pouvoir dispersif. Ainsi, il sera impossible d'explorer avec le même prisme les domaines du proche ultra-violet et du visible. Si toutefois, il était nécessaire de réaliser un appareil fonctionnant successivement dans ces deux domaines, il serait possible d'envisager deux disperseurs, un prisme en silice fondue pour travailler dans l'ultra-violet et un second prisme de constitution différente pour explorer le domaine du visible.

- Les deux matériaux convenant le mieux à notre étude sont les flints extra denses référencés SF 56 et SF 55 (Fig.43).

Notre choix s'est porté sur le matériau SF 55, celui-ci possédant une transmission légèrement meilleure dans le domaine des courtes longueurs d'onde (Fig.44-45).

Le pouvoir dispersif élevé du verre SF 55 est dû aux variations importantes de son indice de réfraction en fonction de la longueur d'onde dans le domaine du visible (Fig.46).

Les constantes de la formule de dispersion sont les suivantes :

$$\begin{aligned}
 A_0 &= 2,9810972 \\
 A_1 &= - 1,0106105 \cdot 10^{-2} \\
 A_2 &= 3,7725376 \cdot 10^{-2} \\
 A_3 &= 2,1692831 \cdot 10^{-3} \\
 A_4 &= - 9474397 \cdot 10^{-5} \\
 A_5 &= 1,6404455 \cdot 10^{-5}
 \end{aligned}$$

II.2.2.3. Choix de l'angle du prisme

En considérant toujours la relation (42), les champs spectraux observés sur 12 mm ont été calculés pour le verre SF 55 en faisant varier l'angle du prisme de 10° à 25° .

Nous avons reporté sur la figure 47 les champs calculés en fonction de la longueur d'onde au centre du champ pour des prismes d'angle au sommet différent.

Nous avons choisi un angle de 12° , celui-ci permettant d'observer tout le domaine du visible lorsque le spectrographe est centré sur une longueur d'onde de 550 nm.

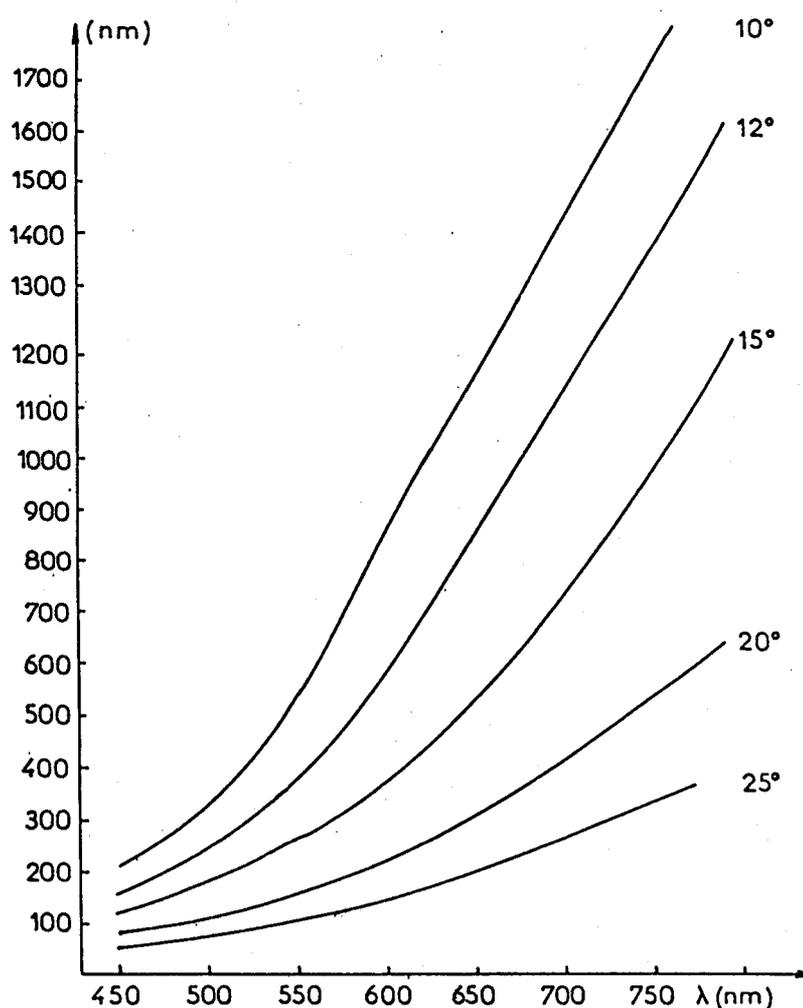


FIG.47 : Champs observés sur 12 mm en fonction de la longueur d'onde au centre du détecteur pour différents angles de prismes en SF55

II.2.2.4. Perte de flux lumineux provoquée par l'utilisation des prismes

Comme nous l'avons vu dans le premier paragraphe, la luminosité d'un spectrographe dépend des dimensions des pupilles d'entrée et de sortie, qui rigoureusement conjuguées l'une de l'autre, règlent l'admission et la sortie du flux lumineux. Mais la luminosité dépend également d'autres paramètres. En effet, la traversée d'un prisme s'accompagne inévitablement de pertes de flux dues à l'absorption et à la réflexion.

a) L'absorption

Tout corps transparent absorbe en partie le flux qui le traverse et le facteur de transmission suit une loi exponentielle de la forme :

$$\tau = e^{-mx} \quad (46)$$

x désignant l'épaisseur traversée et m une constante caractéristique du verre utilisé qui représente le facteur de transmission de la substance pour l'unité d'épaisseur et pour une longueur d'onde donnée.

L'avantage d'utiliser un prisme d'angle faible est que le trajet lumineux, même après un double passage dans la substance, est réduit. Les dimensions du prisme étant les mêmes que celles du réseau, soit 58 x 58 mm, la longueur du trajet lumineux est de 6 mm dans la substance à une extrémité du prisme et elle est de 29 mm à l'autre extrémité après un double passage.

La figure 48 donne les courbes de transmission du verre SF 55 pour chaque extrémité du prisme. Le facteur de transmission τ est de 99 % pour le domaine spectral s'étendant de 500 à 1500 nm ; et l'absorption après la traversée des trois prismes reste négligeable puisqu'elle atteint 3 % dans le domaine du visible.

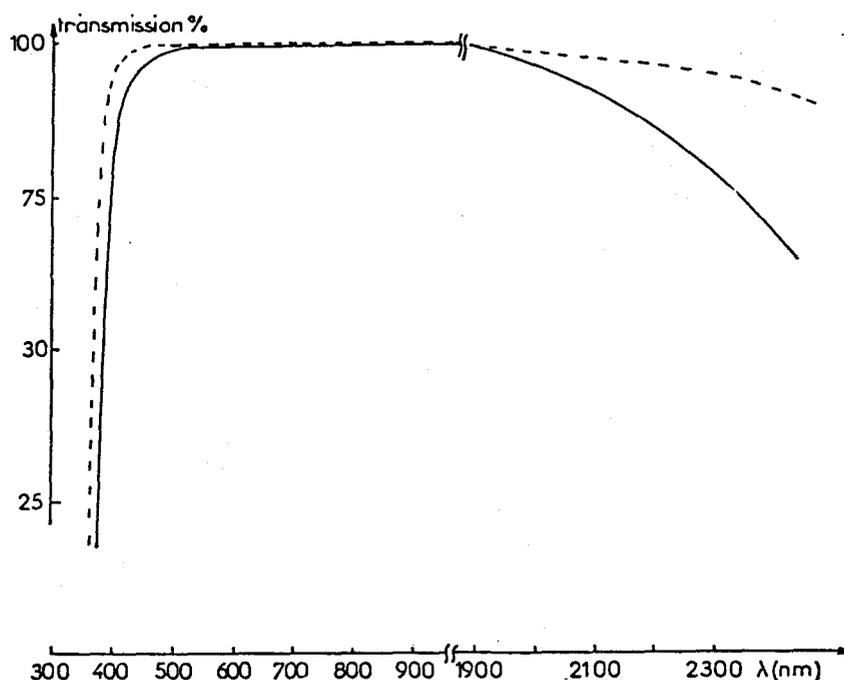


FIG.48 : Transmission du SF55 en fonction de la longueur d'onde
 pour 29 mm de substance traversée —
 pour 6 mm de substance traversée ----

b) Réflexion

Lorsqu'un faisceau lumineux tombe sur la surface de séparation de deux milieux d'indice différent, une partie de la lumière est réfléchiée tandis que l'autre est transmise.

Dans le cas particulier de l'incidence normale sur un verre d'indice n en contact avec l'air, le facteur de réflexion identique pour un rayon incident sur le dioptre verre-air ou air-verre est donné par la formule de Fresnel :

$$R = \left(\frac{n - 1}{n + 1} \right)^2 \quad (47)$$

avec n : indice de réfraction

Si on néglige comme nous l'avons vu la lumière absorbée par le verre SF55

et la lumière diffusée due à la rugosité de la surface et aux poussières qui s'y déposent, on obtient alors le facteur de transmission d'un prisme.

$$\tau_{\text{prisme}} = 1 - R \quad (48)$$

Notre système optique, comportant trois prismes à double passage, présente six surfaces de séparation air-verre. Le facteur de transmission du spectrographe est alors :

$$\tau_{\text{spectrographe}} = (\tau_{\text{prisme}})^6 \quad (49)$$

La réflexion pour une surface à incidence normale étant voisine de 7,6 % à 587,5nm, la transmission du train de trois prismes est de 62 %.

Sous incidence oblique, le problème est plus complexe, le faisceau incident non polarisé se réfléchit en donnant deux ondes polarisées à angle droit sans cohérence de phase. On définit alors deux facteurs de réflexion $R_{//}$ et R_{\perp} correspondant à la direction du vecteur champ électrique parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence. Le facteur de réflexion global est alors :

$$R = 1/2 (R_{//} + R_{\perp}) \quad (50)$$

R croît lentement à mesure que l'angle d'incidence augmente jusque vers 70° , puis croît plus rapidement pour atteindre comme limite l'unité sous incidence rasante (Fig.49).

Devant ces considérations, on voit que sans tenir compte de l'absorption et de la diffusion, les pertes de lumière dues aux six surfaces de séparation air-verre sont importantes, d'autant plus que les angles d'incidence sont voisins de 60° . Il est donc nécessaire de faire subir aux faces avant des prismes un traitement anti-reflet. Ce traitement anti-reflet a de plus l'avantage de limiter les réflexions multiples sur les diverses surfaces, donc d'éviter la formation d'images parasites nuisibles à la qualité de l'instrument.

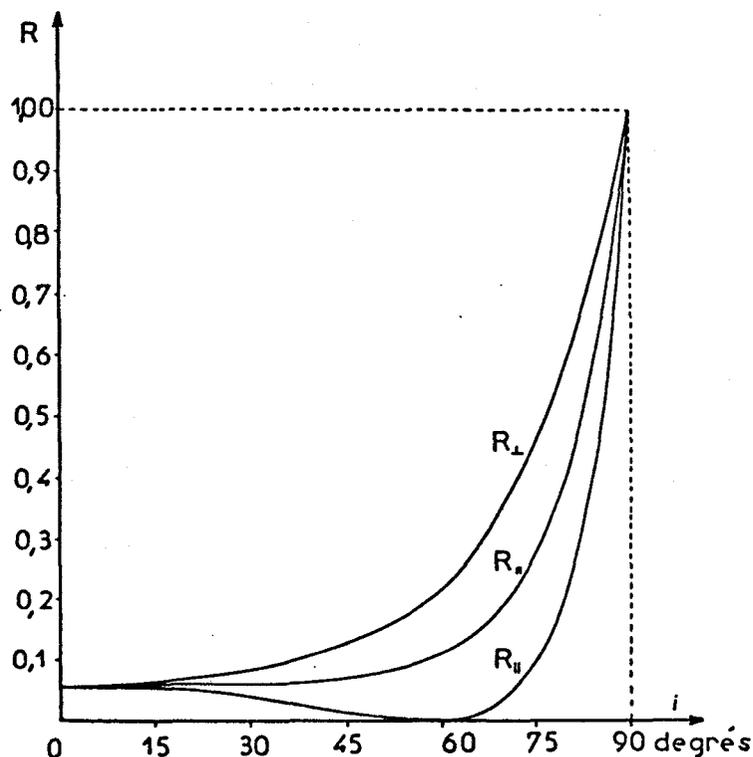


FIG.49 : Variation en fonction de l'angle d'incidence, du facteur de réflexion d'une surface air-flint

Le traitement est obtenu en déposant sur le verre d'indice n , un matériau d'indice n_1 et d'épaisseur e , transparent aux radiations lumineuses utilisées, le facteur de réflexion pour une incidence normale devient alors :

$$R = \left(\frac{n_1^2 - n}{n_1^2 + n} \right)^2 \quad (51)$$

pour une longueur d'onde λ_0 qui dépend de l'épaisseur et de l'indice de la substance déposée

$$\lambda_0 = 4 \cdot n_1 \cdot e \quad (52)$$

Il est donc possible théoriquement d'annuler le facteur de réflexion pour cette longueur d'onde si les indices de réfraction satisfont à la relation $n_1 = \sqrt{n}$. Cependant dans de nombreux cas, cette relation est impossible à satisfaire, ne disposant pas de matériau adéquat d'indice voisin de n_1 ; il est alors possible de déposer sur le verre plusieurs couches minces d'indice et d'épaisseur différents.

Dans le cas de deux couches la condition à satisfaire devient :

$$\frac{n_2}{n_1} = \sqrt{n}$$

Ces couches sont obtenues par évaporation sous vide d'oxyde, de sulfure ou encore de fluorure. La tolérance sur l'épaisseur d'une couche ainsi obtenue est de quelques angströms.

La figure 50 montre la réduction du facteur de réflexion par l'application sur la surface de séparation d'un traitement anti-reflet.

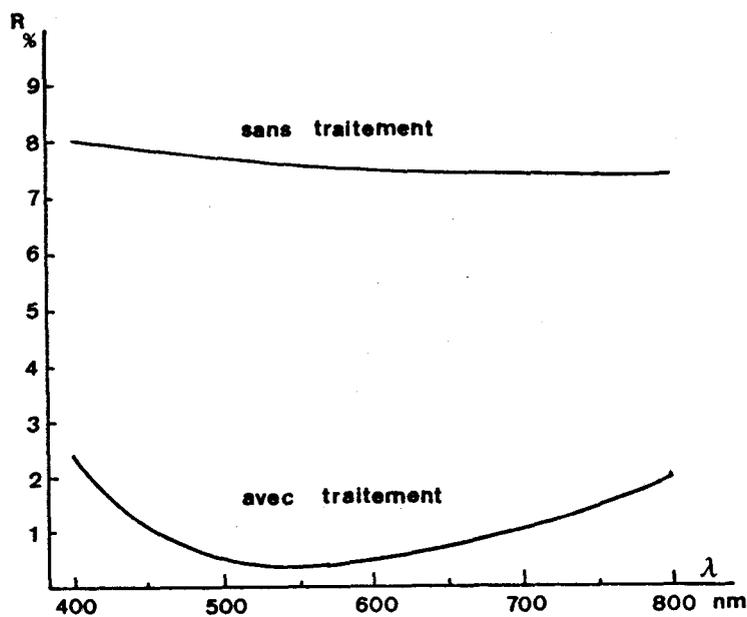


FIG.50 : Réduction du facteur de réflexion par traitement anti-reflet

Les mesures faites sur un prisme à 514,5 nm donnent après traitement anti-reflet un facteur de réflexion de 0,8 % et une transmission égale à 96,5%.

II.2.2.5. Performances du spectrographe équipé de prismes

Les longueurs d'onde théoriques aux extrêmités du champ observé en fonction de la longueur d'onde au centre du champ sont données sur la figure 51.

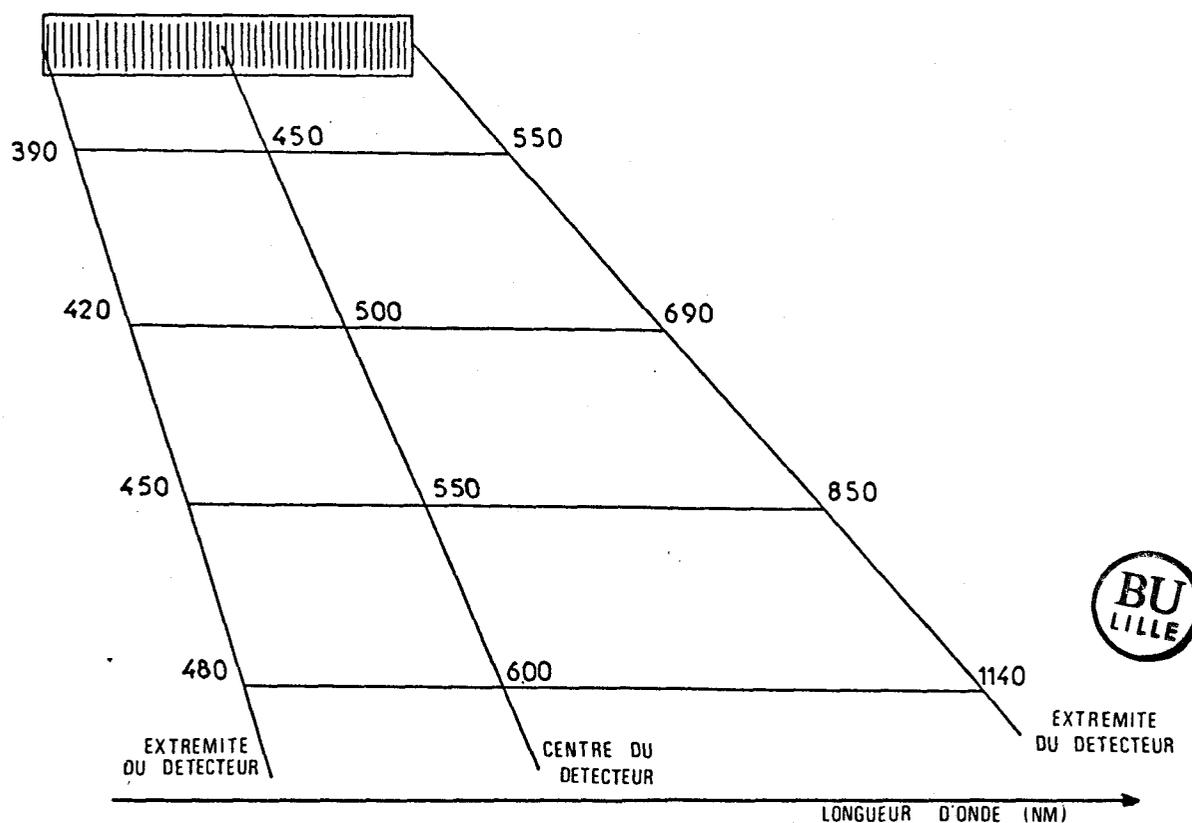


FIG.51 : Champs observés en fonction de la longueur d'onde au centre du détecteur (exprimée en nm)

On s'aperçoit qu'une excitation à 325 nm fournie par un laser hélium-cadmium permet de visualiser le domaine complet du spectre visible en calant une longueur d'onde voisine de 550 nanomètres au centre du détecteur.

Par contre, dans le cas de l'utilisation d'un laser à argon ionisé émettant à 488 ou 514,5 nm, il faut décaler vers le rouge la longueur d'onde au centre du détecteur, afin d'éliminer la radiation excitatrice et une partie du champ observé couvrira inévitablement le domaine du proche infrarouge.

La résolution obtenue lors de l'utilisation des prismes est donnée par la relation

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = \frac{(e_1 - e_2) \cdot \frac{dn}{d\lambda}}{\frac{a \cdot l}{\lambda \cdot f}} \quad (53)$$

où l représente l'ouverture mécanique de la fente, les autres symboles ont été définis précédemment.

Le pouvoir de résolution $\Delta\lambda$ calculé pour le spectrographe est voisin de 3,2 nm à une longueur d'onde de 500 nm.

Les variations de dispersion en fonction des changements de température ont été calculées. Le coefficient thermique de réfraction $\frac{dn}{dT}$ varie suivant le domaine spectral analysé et suivant la gamme de température à laquelle on travaille.

Nous avons calculé le déplacement de la longueur d'onde $\Delta\lambda$ au centre du champ à deux longueurs d'onde différentes pour une élévation de température de 10°C. (tableau 3)

λ (nm)	n	$\Delta n/\Delta T$ (K ⁻¹)	$\Delta\lambda$ (nm)
643,8	1,75493	7,2. 10 ⁻⁶	0,7
435,8	1,79908	12,7. 10 ⁻⁶	0,3

TABLEAU 3 : Variation de la longueur d'onde au centre du détecteur pour une élévation de température de 10°C

Les variations ainsi calculées sont faibles et le déplacement de la longueur d'onde dans le plan focal du spectrographe est inférieur à 25 μm , dimension d'une photodiode.

II.3.- REALISATION MECANIQUE

II.3.1. Bâti et support miroir

Le bâti de l'appareil réalisé en alliage d'aluminium a les dimensions suivantes : 685 x 685 x 360 mm. Il est pourvu de deux ouvertures latérales permettant l'accès aux différentes pièces optiques ; la fermeture hermétique est obtenue au moyen de plaques en caoutchouc.

L'appareil est équipé de pieds réglables assurant une bonne stabilité, et lui permettant d'être posé sur une table.

Des séparations constituées de caches métalliques assurent l'étanchéité au point de vue de la lumière parasite entre les différents monochromateurs.

Les miroirs concaves sont fixés dans des berceaux montés sur trois vis de réglage, solidaires de la plaque de base. Les miroirs de renvoi dans les différents étages sont collés sur des supports eux-mêmes montés sur point-trait-plan .

Nous avons fait subir aux différentes pièces mécaniques une oxydation anodique suivie d'une fixation d'un colorant noir mat afin de limiter au maximum les réflexions intempestives de lumière pouvant atteindre le détecteur.

II.3.2. Fentes

Dans un souci de simplification nous avons opté pour des fentes de largeur fixe. L'ouverture mécanique de la fente a une influence sur la luminosité et sur la résolution de l'appareil.

Généralement, en spectroscopie Raman, la largeur des fentes est faible

de manière à obtenir une très bonne résolution, tandis qu'en spectroscopie de fluorescence la résolution ayant moins d'importance pour l'enregistrement de spectres présentant des bandes qui couvrent un domaine spectral étendu, on utilise des fentes plus larges.

Un compromis entre ces deux situations a été fait, le prémonochromateur est équipé de fentes d'entrée et de sortie de largeur 200 μm . Toutefois, lors d'une phase industrielle ultérieure, il sera possible d'équiper l'appareil de fentes réglables.

La fente intermédiaire du prémonochromateur, délimitant la bande passante de l'instrument a une largeur égale à la dimension du détecteur, soit 12,5 mm.

Les trois fentes sont montées sur des supports mécaniques réglables en orientation de manière à pouvoir amener les lèvres de fente parallèles aux traits des réseaux, c'est à dire à l'axe de rotation de l'arbre supportant les disperseurs.

II.3.3. Mécanisme de balayage

Les trois prismes et les trois réseaux sont montés sur des supports orientables dans trois directions permettant un positionnement précis. Les supports sont fixés sur un arbre unique, ce qui assure une rotation rigoureusement identique des disperseurs et apporte une simplification au mécanisme de positionnement.

L'arbre comporte aux deux extrémités des parties rectifiées prenant appui sur des douilles à billes, qui autorisent des mouvements linéaires et de rotation. Les douilles sont fixées au bâti par l'intermédiaire de rotules qui ont pour but de rattraper un écart angulaire éventuel entre les paliers du bâti (Fig.52). Ce dispositif possède une excellente reproductibilité en translation.

Il est nécessaire, pour le positionnement angulaire du disperseur, de concevoir un mécanisme extrêmement précis. Dans le cas des prismes par exemple, un déplacement en longueur d'onde de 100 nm dans le plan focal du spectrographe, nécessite une rotation de 2/10 de degré seulement. En plus d'une grande précision, ce dispositif doit posséder une bonne reproductibilité.

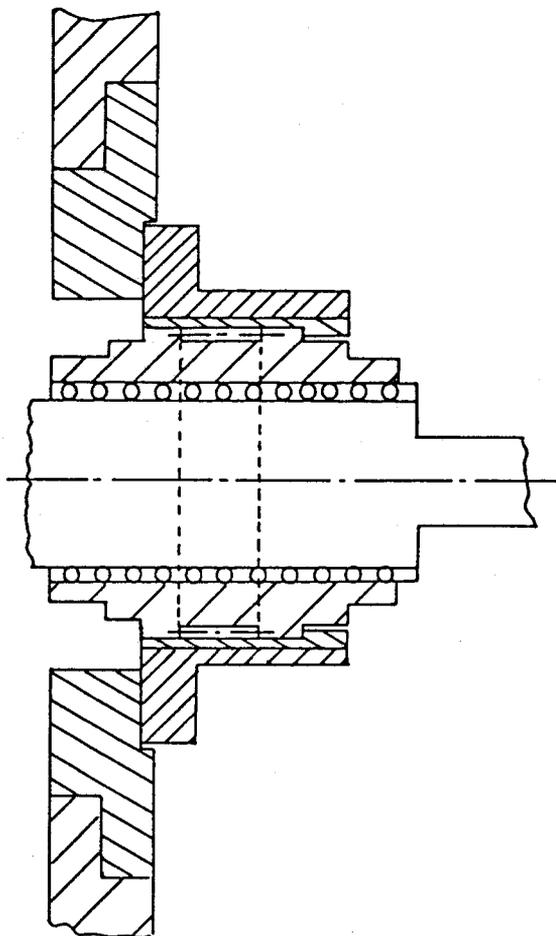


FIG.52 : Mécanisme permettant la rotation et la translation de l'arbre porte-disperseur



Le système du bras cosécant, qui avec les réseaux, a l'avantage de donner un défilement linéaire en nombre d'onde lors du balayage d'un spectre, pourrait être utilisé. Cependant ce mécanisme ne présente aucun avantage pour la rotation des prismes et, est de plus relativement complexe sur le plan de la réalisation mécanique. Nous nous sommes portés sur des dispositifs plus simples.

La solution la plus simple pour entraîner un arbre en rotation est de coupler celui-ci à un moteur pas à pas. Mais il n'existe pas sur le marché de moteur pas à pas possédant la résolution recherchée. Il est alors nécessaire d'utiliser un codeur optique de grande résolution, ce qui a pour inconvénient majeur d'augmenter le coût du dispositif. Une autre solution consiste à relier le moteur à l'arbre, par l'intermédiaire de courroies et de pignons de rapport adéquat, de manière à obtenir

une grande précision ; nous avons également écarté cette solution, compte-tenu du jeu introduit par la transmission.

Nous avons réalisé et testé plusieurs mécanismes relativement simples. Dans un premier temps, nous avons muni l'arbre d'une roue dentée, qui est entraînée au moyen d'une vis sans fin, couplée à un moteur pas à pas. Le nombre de dents de la roue tangente est alors égal au facteur de démultiplication.

Le premier test a été réalisé sur un dispositif comportant une roue tangente en nylon de 90 dents entraînée par une vis sans fin. L'accouplement entre l'axe du moteur et celui de la vis est assuré par un joint d'Oldham.

Nous avons utilisé un moteur pas à pas d'angle de pas $1,8^\circ$, piloté par calculateur. Par l'intermédiaire de l'horloge interne de ce calculateur il est possible de décomposer un tour moteur en 4000 micropas. Compte-tenu de la démultiplication, on peut imposer aux disperseurs une rotation de $1/1000^{\text{ème}}$ de degré correspondant à un déplacement du spectre de $8 \mu\text{m}$ dans le plan focal du spectrographe.

La bonne précision du positionnement n'est pas l'unique qualité que doit posséder le dispositif, il faut également qu'il soit reproductible . Or les tests de reproductibilité montrent que le système n'est pas fiable ; en effet le positionnement après rattrapage du jeu se fait à plus ou moins 10μ pas près ; cette erreur de $3/1000$ est trop importante.

Pour palier l'élasticité éventuelle de la roue en nylon, nous avons apporté des modifications au système . Une roue tangente en laiton comportant 100 dents a été testée, ce qui nous a permis d'obtenir une bonne précision dans la rotation mais une reproductibilité encore médiocre.

Nous avons alors conçu et adopté un autre dispositif qui comporte :

- * un bras tangent fixé à l'extrémité de l'arbre supportant les disperseurs
- * un écrou fixe
- * une vis mobile en translation couplée au moteur au moyen d'un manchon rigide

Comme le montre la figure 53, lors du fonctionnement du moteur, la vis est animée d'un mouvement de translation ; cette dernière exerce une poussée sur le bras tangent solidaire de l'arbre, qui subit alors une rotation. Un contre-poids impose au bras un contact permanent avec une bille fixée à l'extrémité de la vis.

La précision de ce dispositif est importante. La rotation du moteur lors d'une impulsion déplace le spectre dans le plan focal de $10 \mu\text{m}$, lors de l'utilisation des réseaux dans l'ordre 1 et de $7 \mu\text{m}$ pour les prismes. Les tests de reproductibilité donnent également de bons résultats, le positionnement se fait à $\pm 2 \mu\text{pas}$.

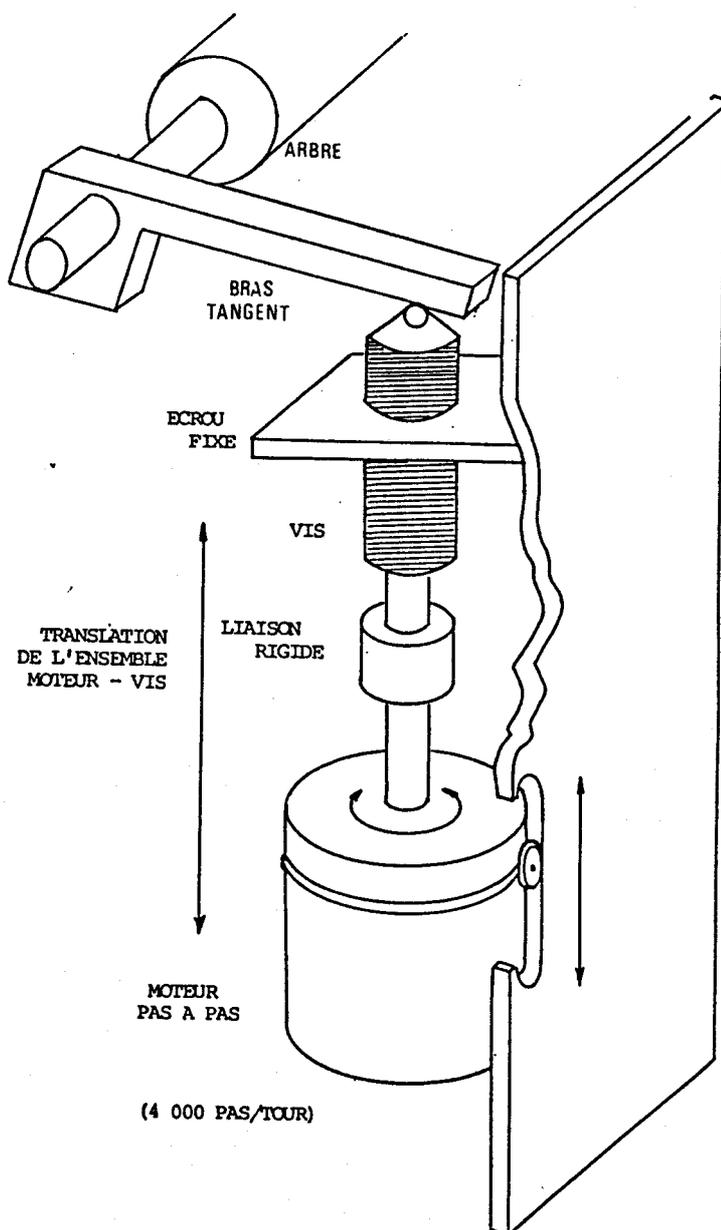


FIG. 53

Dispositif de positionnement

en longueur d'onde



des diffracteurs

L'angle ω de rotation du disperseur peut être exprimé en fonction du déplacement x de la vis par une relation de la forme :

$$\omega = \text{Arc tg } \frac{x}{60} \quad (54)$$

La vis possédant un pas de 2,5 mm, nous pouvons facilement calculer l'angle effectué par l'arbre lors de la rotation du moteur de N micro-pas (un tour moteur correspond à 4000 micro-pas). On obtient :

$$\omega = \text{Arc tg } (1,04 \cdot 10^{-5} \cdot N) \quad (55)$$

Ainsi lorsque le moteur effectue 1 micro-pas, l'arbre subit une rotation de 2 secondes d'arc.

Nous avons adapté la vitesse de rotation du moteur de manière à minimiser les vibrations lors de la translation du système moteur-vis.

Le dispositif complet de la mécanique de balayage est animé d'un mouvement de translation permettant le passage des prismes aux réseaux. Le guidage s'effectue à l'aide d'un axe rectifié, fixé au bâti, et parallèle à l'arbre supportant les disperseurs.

Actuellement, le passage d'un disperseur à l'autre se fait manuellement; mais il sera possible d'envisager un dispositif permettant une translation automatisée de l'arbre .

Le mécanisme que nous avons retenu pour entraîner l'arbre en rotation a l'avantage d'être très simple sur le plan de la réalisation mécanique, mais ne constitue par forcément la meilleure solution ; et devra dans une version définitive de l'appareil être totalement modifié . Cependant, il sera très difficile de le remplacer par un dispositif permettant une loi de variation du nombre de micro-pas moteur, en fonction de la longueur d'onde désirée au centre du détecteur, simple pour les deux disperseurs (prismes et réseaux) .

II.4.- DISPOSITIF DE CALIBRATION EN LONGUEUR D'ONDE

La calibration du spectre exige, pour chaque position du disperseur, de connaître avec une grande précision la longueur d'onde au centre du détecteur multicanal. Connaissant la longueur d'onde centrale et la loi de dispersion du disperseur considéré, exprimée en fonction des paramètres du spectrographe, l'ordinateur peut calculer pour chaque photodiode du détecteur, la longueur d'onde ou le nombre d'onde de la radiation qu'elle reçoit.

Un codeur optique rotatif monté sur l'arbre des disperseurs indiquerait la position angulaire de celui-ci ; cependant les codeurs incrémentaux possèdent une résolution insuffisante ou un coût trop élevé.

Nous avons adopté une solution qui consiste à avoir une référence fixe en longueur d'onde à partir de laquelle le comptage des micro-pas peut être effectué. Il est alors nécessaire pour obtenir le positionnement de l'arbre, de se fixer la longueur d'onde au centre du détecteur.

Le dispositif que nous avons réalisé (Fig.54), qui s'inspire du mécanisme du Spectrinfo, est le suivant : le faisceau d'un laser hélium-néon Spectra Physics est envoyé dans le troisième étage du spectrographe, dans le sens inverse de propagation du spectre. Une lentille L de focale 20 mm focalise le faisceau sur un trou calibré S de 200 μm , conjugué de la fente de sortie du prémonochromateur.

Le faisceau laser couvre toute la surface des disperseurs. Pour une position unique des prismes et des réseaux dans l'ordre 0 ou dans l'ordre 1, le faisceau passe par la fente F_3 , et est détecté au moyen d'un photo-transistor P.T. Cette position de l'arbre sera considéré comme origine des déplacements, et le positionnement pourra s'effectuer à partir de la longueur d'onde 6328,16 \AA utilisée comme référence.

Connaissant les différents paramètres de l'appareil, ainsi que la longueur d'onde désirée au centre du détecteur, le calculateur pourra calculer le nombre de micro-pas que devra effectuer le moteur . Pour les réseaux de diffraction, la loi exprimant le nombre de micro-pas en fonction de la longueur d'onde peut être facilement calculée par l'ordinateur . Par contre, dans le cas des prismes cette relation est plus complexe.



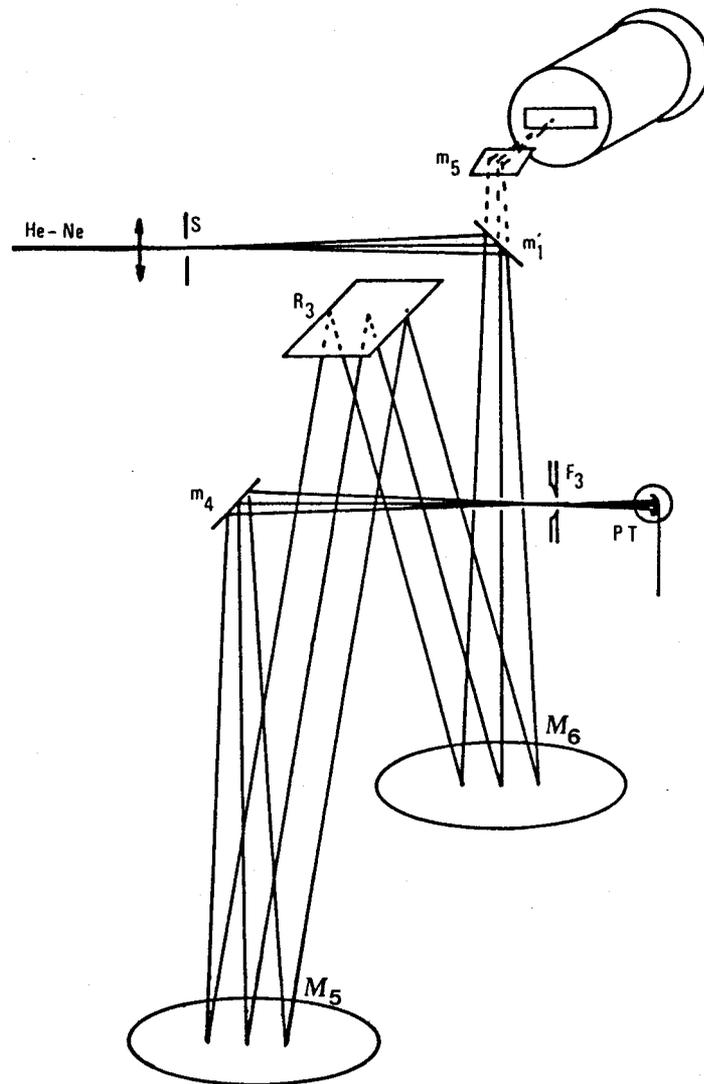


FIG.54 : Dispositif permettant l'obtention d'une référence de positionnement

Pratiquement, pour rattraper le jeu de la vis de la mécanique de balayage, il faut, lors de la recherche de la référence, dépasser celle-ci et modifier ensuite le sens de rotation de l'arbre. Le fait d'avoir une référence dans le rouge permet le positionnement de la longueur d'onde centrale en faisant une rotation de l'arbre toujours dans le même sens.

L'arbre pouvant subir une rotation jusque dans l'ordre 0, il est possible d'imaginer un test permettant, lors de la mise sous tension de l'appareil, de s'assurer

du bon fonctionnement du dispositif : il suffit que le calculateur compte le nombre de micro-pas qu'il faut imposer au réseau, pour détecter le faisceau laser dans l'ordre 0 puis dans l'ordre 1 ; ce nombre de micro-pas devant être constant.

Le miroir de renvoi m'_1 et le photodétecteur sont fixés sur des supports montés sur rails de guidage . Des moteurs électriques permettent de les escamoter lors de l'utilisation de l'appareil. Il faut également noter qu'un cache escamotable vient se positionner devant le détecteur multicanal avant d'envoyer le faisceau laser dans le spectrographe, évitant ainsi toute réflexion du faisceau laser pouvant atteindre la photocathode du tube intensificateur.

Le phototransistor utilisé a sa réponse spectrale étendue dans le proche infrarouge (Fig.55) mais possède suffisamment de sensibilité pour détecter une partie du faisceau laser hélium-néon ; en effet le faisceau laser est envoyé dans le spectrographe au moyen d'une lame séparatrice pour la référence. L'autre partie du faisceau est acheminée vers le microscope, nous expliquerons dans le chapitre III les raisons de sa double utilisation .

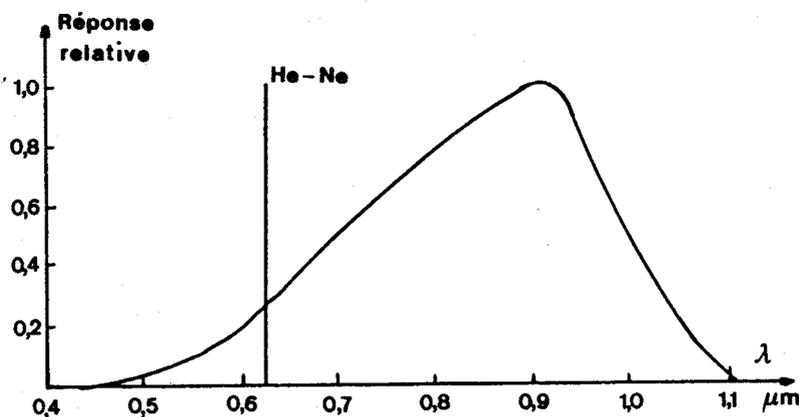


FIG.55 : Réponse spectrale du phototransistor

Le logiciel de positionnement et de calibration qui n'a pas encore été réalisé pourrait inclure le calcul du champ observé par le détecteur pour chaque position des disperseurs et vérifier que la radiation excitatrice se trouve bien hors du champ. Pour éviter d'endommager le détecteur, l'exploration du domaine des très basses fréquences pourrait alors se faire manuellement, sous le contrôle de l'utilisateur.

II.5.- DETECTION MULTICANALE ET INFORMATIQUE ASSOCIEE

Nous avons équipé le spectrographe d'une détection multicanale constituée d'une barrette de photodiodes couplée à un tube intensificateur d'images.

II.5.1. Tube intensificateur d'images [43-55-56-57-58]

L'enregistrement de phénomènes très peu lumineux nécessite une intensification préalable, au moyen d'un dispositif électro-optique, de manière à détecter le spectre avec un bon rapport signal/bruit .

Le tube intensificateur d'images utilisé est un tube à galette de microcanaux à double focalisation de proximité, commercialisé par la Société RTC . Ce type d'intensificateur, fréquemment utilisé, présente de nombreux avantages par rapport aux tubes intensificateur électrostatiques comportant plusieurs étages en cascade

- * l'encombrement du tube est très réduit
- * la tension d'alimentation nécessaire est inférieure à 6 kV
- * la limite de résolution est meilleure et uniforme
- * les distorsions d'images sont quasi nulles

Le fonctionnement du tube intensificateur est le suivant :

L'image photonique primaire est focalisée sur la photocathode du tube qui la convertit en une image électronique. Les photoélectrons ainsi créés sont accélérés par un champ électrique et pénètrent dans la galette de microcanaux placée aussi près que possible de la photocathode. Chaque choc d'un photoélectron avec la paroi interne d'un canal donne naissance, par émission secondaire, à un certain nombre d'électrons. Ce processus intervient un grand nombre de fois et les électrons émergeant des microcanaux sont accélérés par un champ électrique et viennent frapper l'écran phosphorescent qui redonne une image photonique amplifiée.

Les caractéristiques de l'intensificateur utilisé sont les suivantes :

- * photocathode S20 de diamètre utile 17,5 mm
- * fenêtre d'entrée en saphir
- * écran du type P20
- * fenêtre de sortie en fibres optiques droites
- * grandissement 1
- * résolution de 32 pl/mm

Le tube est équipé d'une fenêtre d'entrée en saphir de manière à pouvoir, dans une phase de développement ultérieur de l'appareil, pouvoir obtenir des spectres dans le domaine du proche ultra-violet (Fig.56)

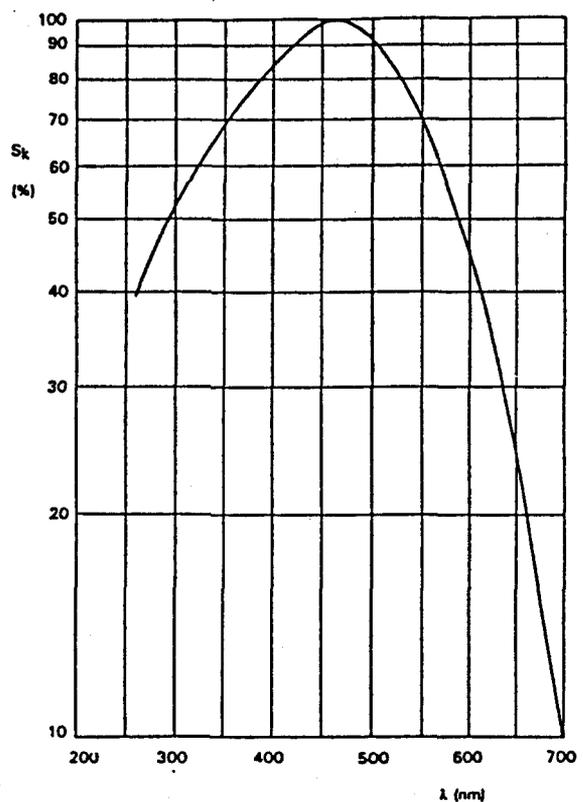


FIG.56 : Courbe de sensibilité spectrale de la photocathode S 20 déposée sur une fenêtre en saphir

II.5.2. Barrette de photodiodes et électronique associée

Le système de détection, proprement dit, est une barrette de photodiodes Reticon, composée de 512 détecteurs élémentaires de $25 \mu\text{m} \times 2,5 \text{ mm}$ et est couplée au tube intensificateur d'images par fibres optiques .

Ce détecteur possède en plus une deuxième rangée de photodiodes "aveugles" dont le but est d'éliminer par différence les bruits apparaissant lors de la lecture séquentielle des diodes . Nous ne reviendrons pas sur le fonctionnement de la barrette qui a été décrite longuement [59-60] .

La barrette ainsi que l'électronique analogique d'amplification, sont montées dans un boîtier scellé, refroidi à -28°C par effet Peltier, ce qui a pour effet de limiter le bruit thermique.

L'électronique de lecture comprend (Fig.57) :

- * une carte vidéo qui, après amplification et filtrage, convertit les signaux analogiques sous forme digitale

- * une carte logique génératrice des signaux nécessaires à l'échantillonnage, au multiplexage et à la conversion A/D

- * une carte mémoire et de contrôle du temps d'intégration réglable entre 10 ms et 99 s .

Un obturateur mécanique permet d'enregistrer successivement le signal lumineux de fluorescence ou Raman et le courant noir de la barrette . Ces signaux sont stockés dans deux blocs mémoire, puis soustraits de manière à éliminer le courant d'obscurité.

Cet obturateur mécanique peut être placé sur les trajets lumineux à deux endroits différents :

- * sur le faisceau laser
- * sur le faisceau diffusé

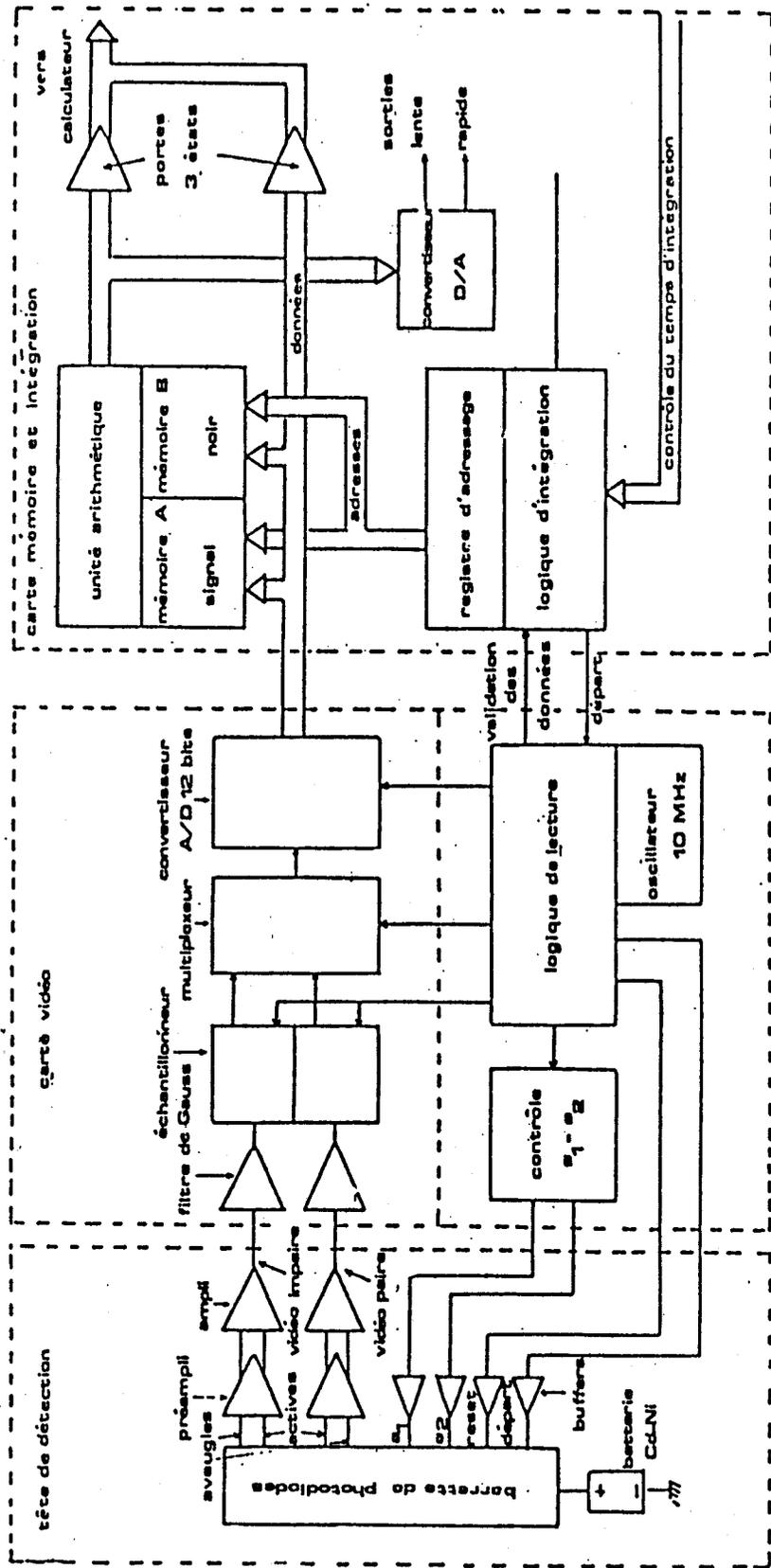


FIG.57 : Electronique de lecture de la barrette de photodiodes

Afin de diminuer le fond de fluorescence éventuel d'un échantillon, lors de l'enregistrement d'un spectre Raman, une technique consiste à irradier la préparation un certain temps avant d'effectuer la mesure ; on bénéficie alors de la décroissance de la fluorescence . Si l'obturateur est placé au niveau du faisceau laser, l'échantillon est éclairé de manière intermittente ; on n'a plus l'avantage cité précédemment, et on observe des fluctuations de l'intensité du fond de fluorescence. En effet pour chaque cycle d'intégration du signal, le niveau de fluorescence est plus important en début qu'en fin de cycle.

Mais lors de l'enregistrement d'un spectre de fluorescence, il est préférable de mettre l'obturateur sur le faisceau laser, la décroissance de l'émission de fluorescence est limitée, et cela évite d'irradier continuellement des échantillons fragiles.

Dans le cas de notre prototype, nous avons placé l'obturateur sur le faisceau diffusé . Mais il est envisageable d'équiper l'appareil de deux obturateurs, l'un sur le faisceau laser pour l'étude de l'émission de fluorescence, l'autre sur le faisceau diffusé pour enregistrer des spectres Raman de composés fluorescents.

II.5.3. Informatique

L'acquisition et le traitement des données se fait au moyen d'un IBM PC AT (630 Koc).

Les programmes développés par la Société DILOR pour leurs spectromètres Raman multicanaux peuvent être utilisés pour l'acquisition des spectres ; ils permettent :

- * l'ajustement . En temps réel, il est possible d'ajuster les différents paramètres tels que mise au point du microscope, modification du temps d'intégration ou de la puissance du faisceau laser de manière à obtenir un spectre avec le meilleur rapport signal/bruit possible

- * l'enregistrement du spectre, avec possibilité d'accumulation

* le traitement mathématique du spectre (lissage, addition, soustraction de deux spectres ...etc)

* la sortie du spectre sur papier

CHAPITRE III

COUPLAGE OPTIQUE DU MICROSCOPE AU SYSTEME DISPERSIF

Nous avons exposé au chapitre précédent la conception du système dispersif ainsi que la détection du spectre Raman ou de fluorescence.

Nous allons maintenant nous intéresser d'une part à l'excitation de l'échantillon sous microscope et à la collection de la lumière réémise, et d'autre part à l'acheminement de celle-ci vers le spectrographe au moyen d'un système optique de couplage.

III.1. - CONSTITUTION DU MICROSCOPE

III.1.1. Généralités

Le microscope le mieux adapté pour équiper un microspectrofluorimètre à excitation dans le domaine de l'ultra-violet est bien sûr un microscope à fluorescence. Dans ce type de microscope, l'échantillon est éclairé par une radiation ultra-violette passant au travers d'un filtre d'excitation, et la fluorescence traverse le microscope qui est muni d'un filtre d'arrêt transmettant uniquement les longueurs d'onde supérieures à celle du rayonnement d'excitation.

La microscopie de fluorescence est une technique utilisée dans de nombreux domaines, tels que la biologie, la virologie, la bactériologie, etc... Il existe donc de nombreux microscopes à fluorescence commerciaux, et notre choix s'est porté sur le microscope Olympus, modèle BH 2.

Ce microscope modulable comprend :

- Un statif muni d'un dispositif d'éclairage par transmission.
- Une platine porte-échantillon à commandes coaxiales.
- Un dispositif, que nous avons modifié, permettant d'introduire le faisceau laser et de renvoyer la lumière diffusée vers le spectrographe.
- Un épi-illuminateur ultra-violet et visible.
- Une trinoculaire qui peut être équipée d'une caméra vidéo permettant de visualiser l'échantillon, et le cas échéant, l'impact du faisceau laser sur la préparation.

La figure 58.a illustre l'agencement des différents constituants du microscope.

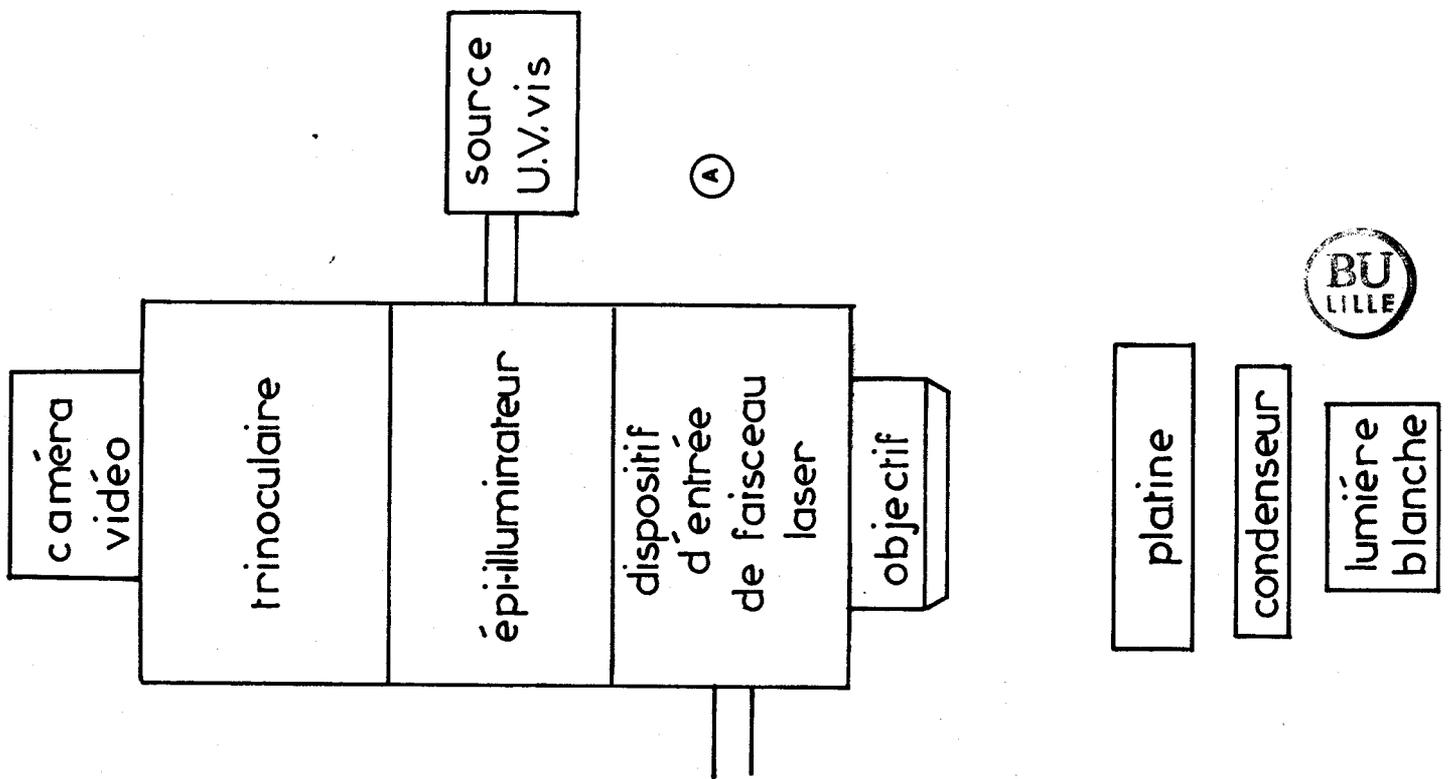


FIG.58 : Schéma du microscope

- a) Agencement des différents constituants
- b) Optique du corps du microscope

Le dispositif permettant l'introduction du faisceau laser dans le microscope a été placé le plus près possible de la tourelle porte-objectifs de manière à ce que les faisceaux ultra-violetts ne traversent pas les filtres d'arrêt ni les miroirs dichroïques de l'épi-illuminateur. Il est d'ailleurs impossible de faire entrer le faisceau laser au niveau de la trinoculaire, celle-ci étant pourvue de prismes constitués d'un verre qui n'est pas transparent aux radiations ultra-violettes.

III.1.2. Différents constituants optiques du microscope

On distingue deux types d'objectifs de microscope :

- Ceux qui sont corrigés pour former une image réelle de la préparation à une distance finie, dans le plan objet de l'oculaire.
- Ceux corrigés pour donner une image à l'infini ; une lentille complémentaire ramène alors l'image dans le plan objet de l'oculaire. Ce système présente les avantages de pouvoir insérer dans les faisceaux parallèles, des éléments optiques telles que les lames semi-transparentes, sans provoquer de déformations de l'image, et de ne pas imposer la longueur mécanique du corps du microscope.

III.1.2.1. Optique du corps du microscope

La configuration optique du microscope Olympus, utilisant des objectifs transmettant les radiations ultra-violettes est du premier type.

Il est nécessaire d'introduire dans le corps du microscope une lame séparatrice faisant un angle de 45° avec l'axe de celui-ci permettant d'envoyer le faisceau laser sur la préparation, d'observer l'impact de celui-ci, et de renvoyer la lumière collectée vers le spectromètre (Fig. 58.b).

Quand le faisceau laser est positionné sur la zone de l'échantillon à analyser, on utilise pour enregistrer le spectre, non plus la lame séparatrice, mais un miroir totalement réfléchissant. Les pertes de flux, aussi bien au niveau du laser d'excitation, qu'au niveau de la lumière collectée, sont ainsi limitées. La lame séparatrice et le miroir sont montés sur un même axe, le passage de l'un à l'autre se faisant par translation.

Le dispositif d'entrée du faisceau laser, ainsi que le tiroir de l'épi-illuminateur présentent l'inconvénient de modifier la longueur mécanique du tube. Deux lentilles de tube déplacent alors l'image intermédiaire de la préparation d'une distance égale à la hauteur des tiroirs (Fig. 58.b).

La présence, dans le tube du microscope, de ces deux lentilles réduit le champ, visualisé au niveau des oculaires, d'un facteur 1,5.

III.1.2.2. Objectifs

- Objectifs utilisés

C'est le même objectif qui est utilisé pour focaliser le faisceau laser sur l'échantillon et pour recueillir la lumière Raman diffusée (Rétro-Raman) ou l'émission de fluorescence.

Les objectifs de microscope sont des optiques à grande ouverture, corrigés des aberrations, donc très bien adaptés à la collection de la lumière diffusée sous un grand angle solide.

Le tableau 4 donne les principales caractéristiques des trois objectifs montés sur la tourelle revolver du microscope.

Grandissement	Ouverture numérique	Distance frontale (mm)
20 x à sec	0,65	1,03
40 x à sec	0,85	0,25
100 x à immersion	1,30	0,14

TABLEAU 4: Caractéristiques des objectifs Olympus

Ces objectifs apochromatiques sont spécialement destinés à l'étude de la fluorescence, ils sont composés d'optique en fluorine, transparents dans l'ultra-violet et non fluorescents.

- Avantages des objectifs à immersion

D'une manière générale, l'utilisation d'objectifs à immersion apporte un gain appréciable du point de vue de la collection de la lumière émise.

En microscopie optique, l'utilisation d'objectifs à immersion permet de compenser la présence du couvre-objet. Un film d'huile, d'indice de réfraction voisin du verre utilisé, est placé entre l'objectif et le couvre-objet. On évite ainsi les phénomènes de réfraction aux dioptries air-verre.

En microspectrométrie, une autre méthode consiste à immerger directement l'échantillon dans le liquide d'immersion (huile ou eau) sans utiliser le couvre-objet, cette technique présente deux avantages :

- une augmentation de l'angle de collection
- le milieu d'immersion joue le rôle de radiateur thermique qui permet de dissiper une partie de la chaleur due à l'irradiation.

Lors de l'observation, au microscope, d'un échantillon émettant de la lumière, soit par fluorescence, soit par diffusion Raman, le nombre de photons N que l'on peut obtenir pour une longueur d'onde λ est donné par la relation :

$$N_{\lambda} = K_{(\lambda,t,v)} \cdot 2 (1 - \cos \alpha) \quad (55)$$

K est un facteur qui tient compte de l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde λ , des dimensions du volume analysé ainsi que de la durée d'analyse.

$2 (1 - \cos \alpha)$ représente l'angle solide dans lequel les rayons émis par l'échantillon sont collectés par l'objectif.

L'angle α peut être exprimé en fonction de l'ouverture numérique O.N de l'objectif et de l'indice de réfraction du milieu dans lequel le rayon lumineux se propage, entre l'objet et la lentille frontale.

$$\alpha = \text{Arc sin } \frac{ON}{n} \quad (56)$$

L'équation 56 devient alors :

$$N_{\lambda} = K(\lambda, t, v) \cdot 2\pi \cdot [1 - \cos(\text{Arc sin } \frac{ON}{n})] \quad (57)$$

Ainsi pour deux objectifs de grandissement identique, l'un à sec ($O.N = 0,65$) et l'autre à immersion à eau ($O.N = 1,30$), on obtient :

Objectif à sec : $N_{\lambda} = K \times 0,48\pi$

Objectif à immersion : $N_{\lambda} = K \times 1,58\pi$

III.1.3. Modes d'éclairage

Comme nous l'avons vu précédemment, le microscope Olympus est équipé de deux dispositifs d'éclairage :

- un éclairage par transmission en lumière blanche
- un dispositif d'excitation de la fluorescence en lumière réfléchie.

III.1.3.1. Eclairage par transmission

Il s'agit d'un éclairage classique de type Koehler comportant un condenseur d'Abbe, d'ouverture numérique 1,25.

III.1.3.2. Dispositif d'excitation de la fluorescence en lumière réfléchie

Le microscope est équipé d'un épi-illuminateur permettant d'exciter les molécules de la préparation en lumière ultra-violette ou visible.

La source lumineuse utilisée est un arc au mercure haute pression d'une puissance de 100W. Le mercure donne un spectre comportant un grand nombre de

raies d'émission entre 300 et 600 nanomètres. Il est éventuellement possible de remplacer l'arc au mercure par un arc au xénon qui présente un spectre d'émission plus uniforme.

L'excitation de la fluorescence se fait au moyen de miroirs diviseurs dichroïques, qui réfléchissent la lumière de courte longueur d'onde envoyée sur la préparation, tandis qu'ils transmettent avec une très faible atténuation la lumière de plus grande longueur d'onde qui est émise.

Les courbes de transmission et de réflexion des miroirs dichroïques présentant une intersection (Fig. 59), il est nécessaire d'utiliser une combinaison d'un filtre d'excitation et d'un filtre d'arrêt en conjugaison avec chaque miroir dichroïque (Fig. 60).

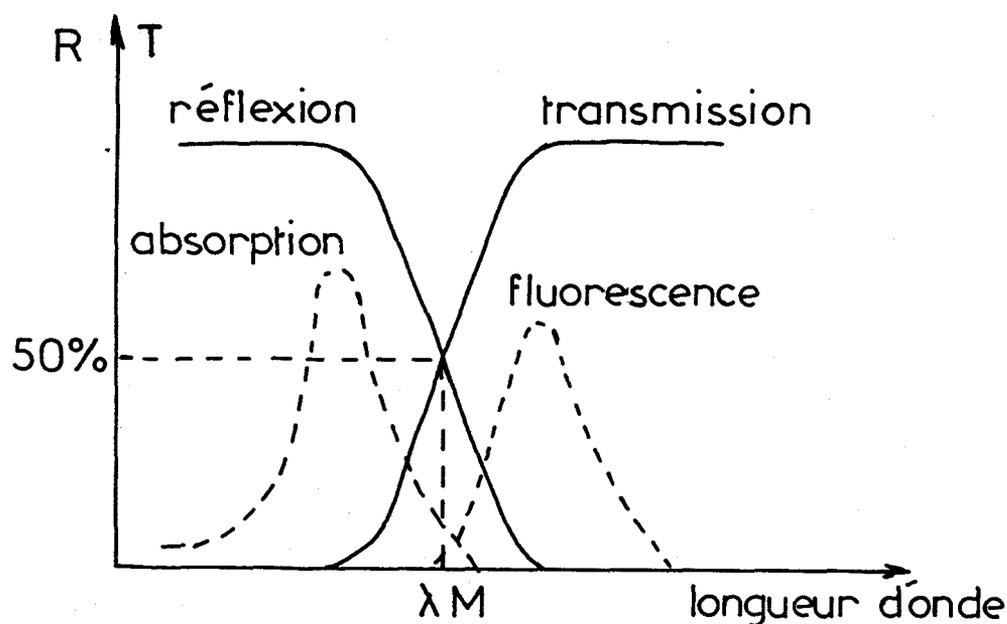


FIG.59 : Réflexion et transmission des miroirs dichroïques

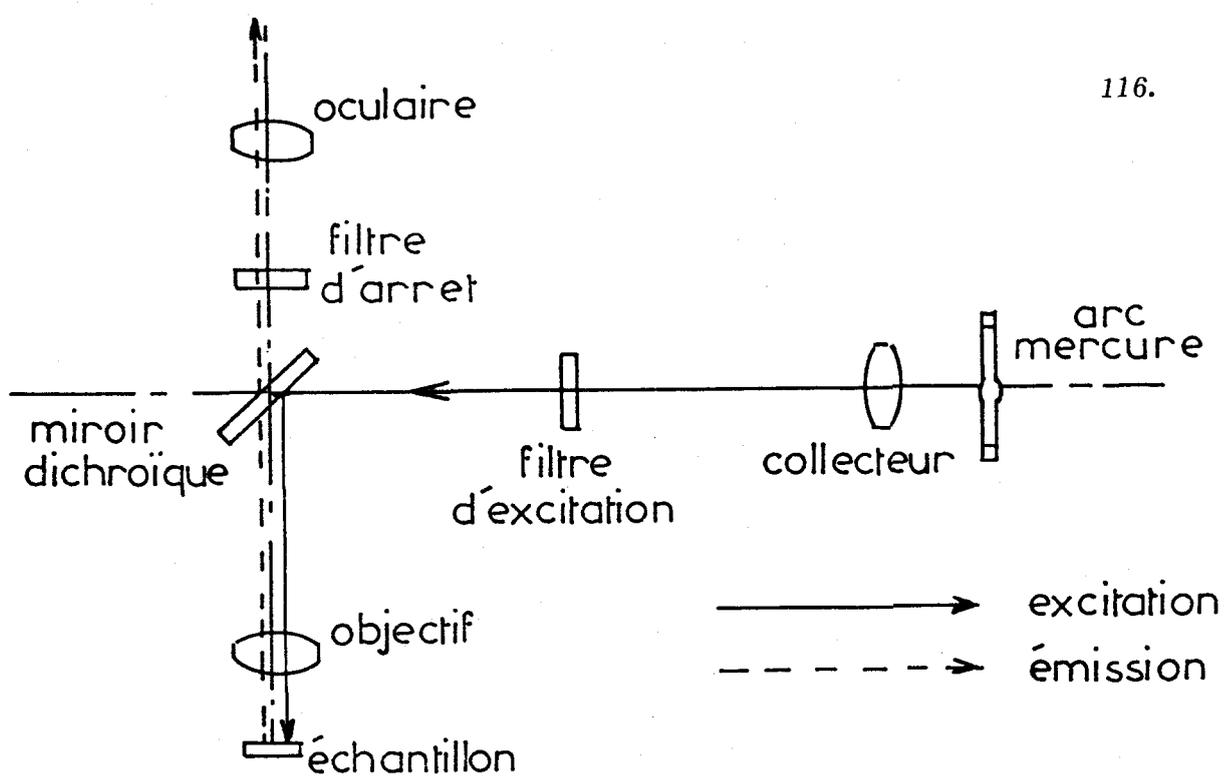


FIG.60 : Principe de l'illumination de fluorescence

On obtient ainsi une image contrastée en excitant la préparation à la longueur d'onde désirée, et en absorbant les longueurs d'onde réfléchies par l'échantillon.

Le microscope est équipé de deux modules interchangeables, par simple translation, comprenant le filtre dichroïque, ainsi que les filtres d'excitation et d'arrêt correspondant, permettant une excitation dans l'ultra-violet (Fig. 61) ou dans le domaine du violet (Fig. 62).

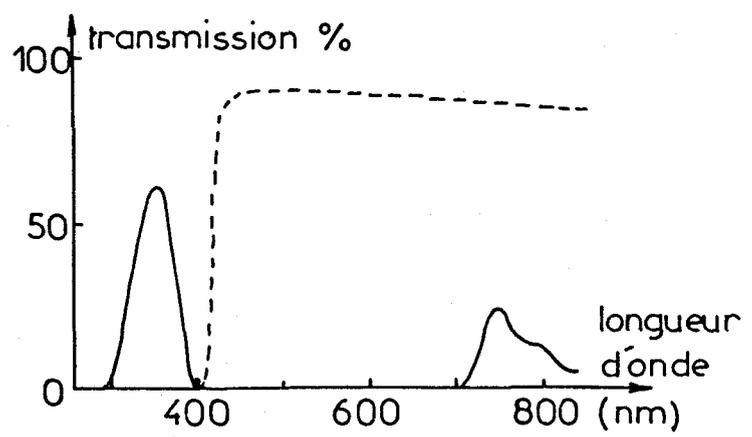


FIG.61 : Excitation ultra-violette — Filtre d'excitation --- Filtre d'arrêt

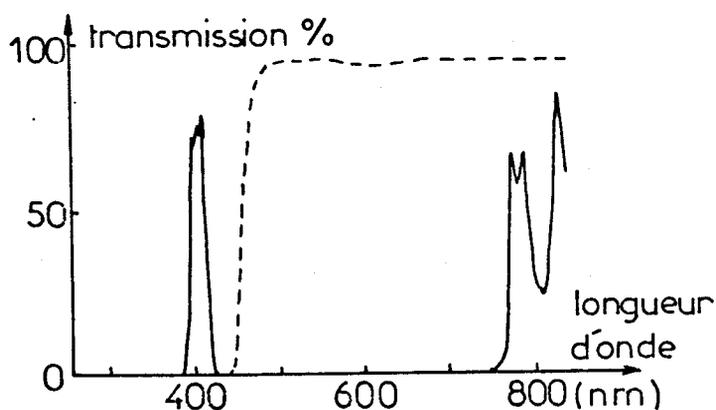


FIG.62 : Excitation dans le violet — Filtre d'excitation
 ---- Filtre d'arrêt

L'intérêt de l'éclairage par lampe émettant des radiations ultra-violettes est de permettre le repérage d'une zone fluorescente de l'échantillon, qui pourrait être difficilement discernable en éclairage conventionnel.

III.2. - LASER D'EXCITATION

Nous avons choisi comme source d'excitation un laser hélium-cadmium de marque Omnichrome (modèle 365) émettant une seule radiation à 325 nanomètres d'une puissance de 2,7 milliwatts. Ce laser est équipé d'un système de refroidissement à air.

Il faut noter, qu'il est possible de le remplacer par un autre laser émettant dans le domaine du visible (laser à argon ionisé par exemple).

III.3. - ROLE DU DISPOSITIF OPTIQUE DE COUPLAGE

Le dispositif optique du couplage doit assurer deux fonctions essentielles (Fig. 63) :

- acheminer le faisceau laser d'excitation dans le microscope ;
- transférer l'image polychromatique du point analysé de la préparation sur la fente d'entrée du prémonochromateur, en ayant le minimum de pertes de flux, ce qui implique d'adapter les ouvertures du microscope et du système dispersif.

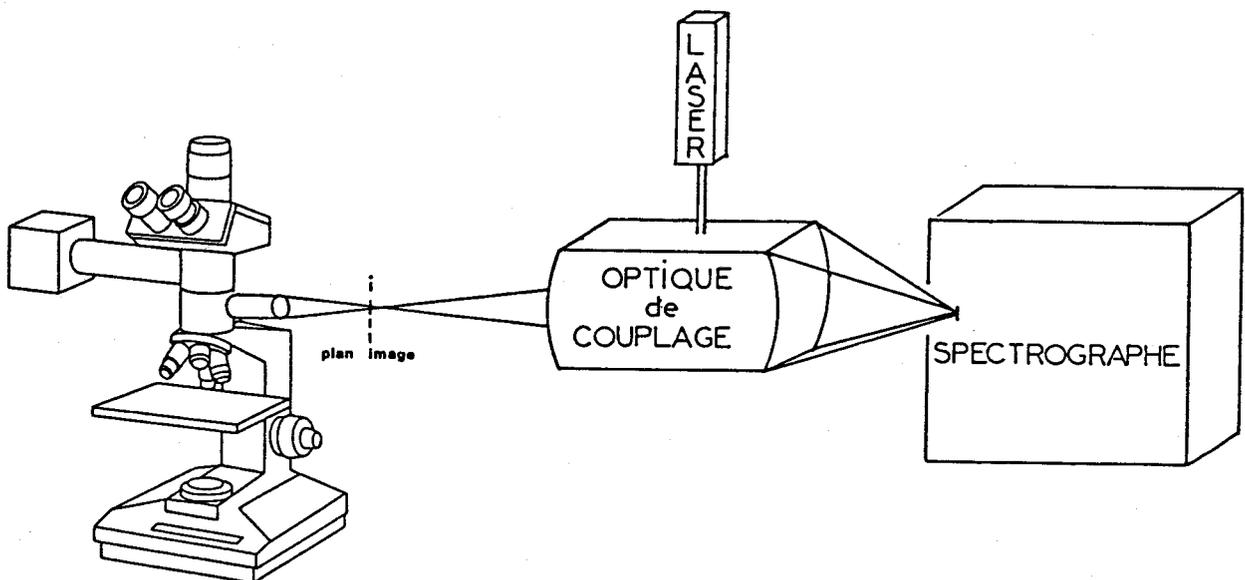


FIG.63 : Rôle de l'optique de couplage

III.4. EXPLORATION SPATIALE DE L'ECHANTILLON

III.4.1. Intérêt de l'exploration spatiale

Le faisceau laser d'excitation focalisé par l'objectif du microscope, n'éclaire pas globalement, mais ponctuellement la préparation. On obtient par conséquent le spectre d'un micro-volume de matière de l'échantillon.

Nous avons jugé intéressant de pouvoir étudier le spectre Raman ou le spectre de fluorescence de n'importe quelle zone de la préparation située dans le champ objet sans avoir à déplacer l'échantillon.

L'un des avantages de la détection multicanale étant de permettre l'enregistrement d'un spectre en un temps très court, il devient possible, dans le cas d'un échantillon hétérogène, d'enregistrer successivement les spectres de différents points du champ microscopique. On obtient ainsi les variations spatiales de la composition chimique de la préparation.

III.4.2. Mode d'exploration de l'échantillon

Il existe différentes possibilités d'exploration de l'échantillon.

III.4.2.1. Analyse séquentielle de différents points de la préparation

Nous avons envisagé la possibilité d'effectuer une analyse spatiale en enregistrant successivement les spectres d'un certain nombre de points de la préparation. Il est alors nécessaire de définir les coordonnées (x_i, y_j) des points que l'on veut analyser (Fig. 64).

Le repérage dans le champ du microscope peut se faire par visualisation, de l'impact du faisceau laser, directement dans la binoculaire, ou encore au moyen de l'image donnée par un moniteur TV par l'intermédiaire d'une caméra vidéo.

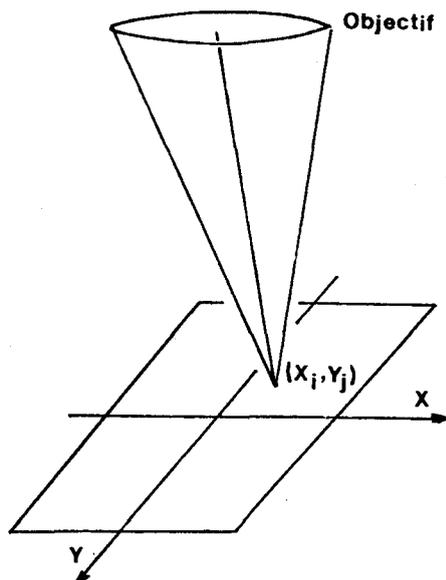


FIG.64 : Analyse d'un point quelconque (x_j, y_j) du champ objet

III.4.2.2. Analyse selon une ligne

Il est également envisageable d'enregistrer le spectre de fluorescence ou Raman de différents points successifs d'une ligne de l'échantillon. Il est ainsi possible par cette technique d'obtenir des profils d'intensité qui reproduisent la distribution spatiale d'une espèce moléculaire, le long de la ligne analysée, à des fréquences optiques déterminées.

III.4.2.3. Reconstruction d'images bidimensionnelles

L'extension à deux dimensions de la technique d'analyse suivant une ligne, obtenue en déplaçant la ligne ou la platine porte-échantillon, permet de reconstruire des images de la zone analysée à des longueurs d'onde données. Les différents points successifs du champ, irradiés par le faisceau laser, sont repérés par leur position sur une ligne et par le rang de celle-ci, et sont affectés d'une valeur représentative de leur intensité lumineuse (Raman ou fluorescence).

La reconstitution d'une image point par point présente deux avantages importants :

- Une amélioration du contraste. En microscopie conventionnelle, l'illumination complète du champ conduit à un fond de lumière parasite, dû aux interférences

provoquées par les particules voisines, alors que l'on ne rencontre pas ce phénomène en balayage.

- La possibilité d'obtenir un grandissement variable, en modifiant l'amplitude du balayage (distance entre deux points successifs analysés) sans changer d'objectif ou d'optique intermédiaire.

Cependant il faut remarquer que de telles études par balayage de l'échantillon nécessitent des circuits électroniques complexes afin de contrôler le dispositif de déplacement mais aussi d'un ordinateur très performant pour stocker et traiter les différentes données.

D'autre part, la reconstitution point par point d'une image de fluorescence (512 x 512 pixels par exemple) nécessiterait une durée de 36 heures en admettant que le temps d'intégration pour chaque pixel soit égal à 500 millisecondes (temps d'acquisition d'un spectre de fluorescence d'intensité moyenne).

Si la construction d'une image de fluorescence par cette technique semble d'utilisation limitée, il est par contre tout à fait imaginable d'obtenir une information spatiale en se limitant à un petit nombre de points (ligne ou séquence de points programmées à l'avance).

III.4.3. Techniques d'exploration

L'exploration spatiale de l'échantillon peut se faire au moyen de deux techniques distinctes :

- par déplacement de la platine porte-échantillon ;
- par déplacement du point de focalisation du laser sur l'objet.

III.4.3.1. Déplacement de la platine porte-échantillon

Le déplacement de la platine [61-62] est généralement limité par la vitesse et la précision des éléments mécaniques. De plus des mouvements rapides de la platine peuvent engendrer des vibrations de l'objet.

Certains systèmes d'entraînement [63] n'autorisent qu'un balayage de l'échantillon et ne permettent pas l'analyse d'un point prédéterminé de celui-ci.

Enfin les platines de déplacement micrométrique sont toujours très coûteuses.

III.4.3.2. Déplacement du faisceau laser

Le déplacement du faisceau laser sur la préparation est une technique plus flexible et généralement plus rapide que la précédente mais nécessite un système optique plus élaboré.

La déflexion du faisceau laser dans le champ microscopique peut être obtenue de différentes manières [64] :

- Déflexion acousto-optique [65]

Cette technique très rapide nécessite un dispositif optique très complexe. En effet, les défecteurs acousto-optiques doivent être associés à des lentilles destinées d'une part à augmenter la section du faisceau au niveau du cristal, et d'autre part à conjuguer la pupille de sortie du premier cristal (déflexion suivant x) à celle d'entrée du second (déflexion suivant y).

- Déflexion galvanométrique [66-67-68]

La déflexion du faisceau laser dans deux directions perpendiculaires peut être obtenue au moyen de miroirs montés sur galvanomètres. La Société Zeiss a conçu un microscope à balayage utilisant ce principe [69].

- Déplacement de l'objectif du microscope [70-71]

L'objet et le faisceau laser entrant dans le microscope sont fixes, l'objectif peut être animé d'un déplacement permettant de balayer l'échantillon. Ce dispositif présente plusieurs inconvénients. La pupille de l'objectif n'est pas couverte correctement lors du déplacement de celui-ci ; l'utilisation d'un microscope conventionnel n'est plus envisageable.

- Déplacement d'une lentille [43-72]

Les spectromètres Microdil, commercialisés par la Société DILOR, ainsi que la version 01 du microspectrofluorimètre, sont équipés d'un dispositif de déflexion du faisceau laser assurée par le déplacement d'une lentille placée dans l'espace image, sur le trajet commun au faisceau laser et au faisceau diffusé.

Ce dispositif a l'avantage d'être précis et peu coûteux.

III.4.3.3. Dispositif de couplage permettant une exploration spatiale, employé dans le premier prototype

Le schéma optique du dispositif de couplage microscope-spectrographe du premier prototype est représenté sur la figure 65.

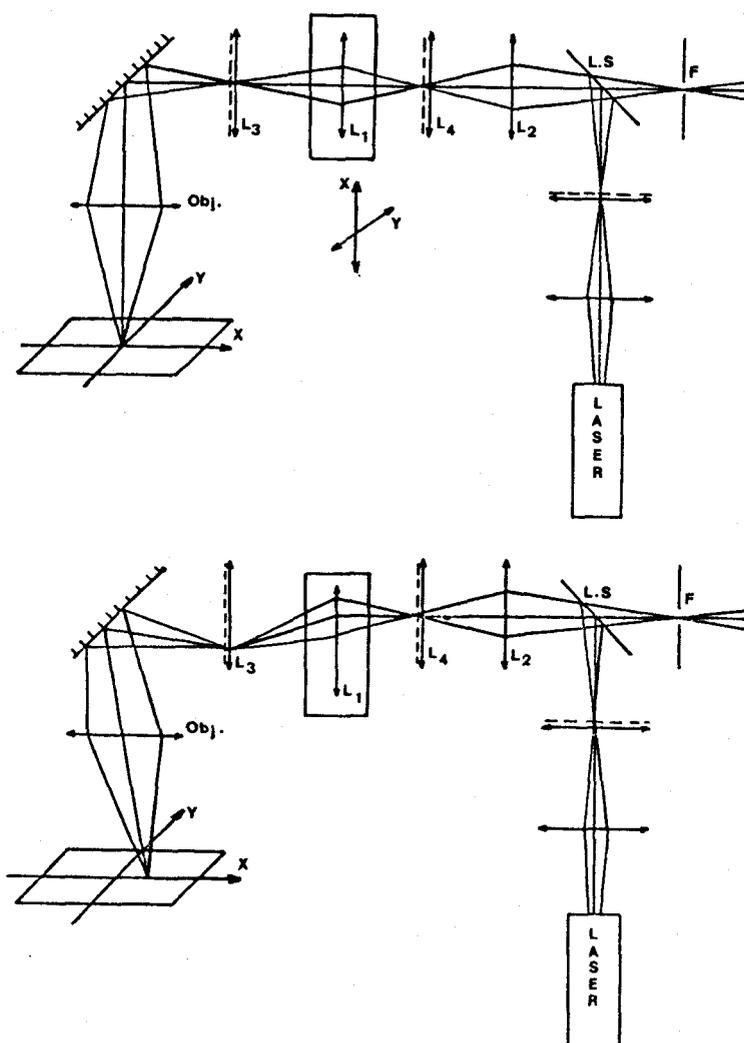


FIG.65 : Schéma optique de couplage à lentille mobile
 a) Focalisation au centre du champ
 b) Focalisation en un point quelconque du champ

BU
LILLE

Le faisceau laser d'excitation est introduit dans le trajet optique de couplage au moyen d'une lame séparatrice (L.S). La lentille L_1 focalise le faisceau dans le plan image du microscope, cette même lentille mobile en translation suivant deux axes orthogonaux permet la déflexion du faisceau laser et ainsi l'analyse de tout point du champ microscopique. La lentille de champ L_3 placée au niveau de l'image de la préparation permet de couvrir correctement la pupille de l'objectif lors du déplacement de la lentille L_1 .

La lumière collectée par l'objectif suit le même trajet que le faisceau d'excitation. Elle traverse la lame séparatrice et est focalisée sur la fente d'entrée du spectrographe au moyen de la lentille L_2 . La lentille L_4 permet de conjuguer les pupilles du microscope et du spectrographe.

Le déplacement mécanique de la lentille s'effectue au moyen de moteurs pas à pas assurant une bonne reproductibilité.

L'avantage de ce dispositif est qu'il possède une très grande précision. En effet, compte-tenu du grandissement de l'objectif, le déplacement du faisceau laser dans le plan image est nettement supérieur à celui du spot sur la préparation. Par exemple, pour un objectif de grandissement 100X et pour un déplacement du faisceau de $1\mu\text{m}$ au niveau de la préparation, il faut déplacer la lentille de $25\mu\text{m}$; ce qui correspond à 275 micro-pas du moteur. Nous obtenons ainsi une précision de positionnement bien inférieure au micromètre.

III.5. - CHOIX DE L'OPTIQUE DE COUPLAGE

III.5.1. Problèmes posés par les aberrations chromatiques

Le dispositif que nous venons de décrire comporte un grand nombre de lentilles. Or si les aberrations chromatiques sont négligeables lorsque l'on travaille dans une gamme réduite de longueurs d'onde, elles deviennent importantes sur un domaine spectral très étendu, ce qui est notre cas (325 à 800nm).

L'aberration chromatique longitudinale peut ainsi atteindre une valeur supérieure à 30mm lorsque l'on utilise une seule lentille travaillant simultanément dans les domaines du visible et de l'ultra-violet.

III.5.2. Recherche de l'achromatisme

Plusieurs solutions peuvent être apportées aux problèmes de correction des aberrations chromatiques.

Dans la majorité des instruments optiques, les lentilles sont remplacées par des achromats, c'est à dire une combinaison de deux lentilles accolées, de verres différents. Les achromats n'éliminent pas les aberrations mais les réduisent notablement.

Dans le cas du couplage optique microscope-spectrographe, où un grand nombre de lentilles sont nécessaires, l'utilisation d'achromats aurait pour inconvénients :

- de diminuer fortement le taux de transmission de l'optique de couplage
- d'augmenter le coût de l'appareil
- d'avoir des aberrations chromatiques résiduelles.

Une autre méthode permettant d'éliminer totalement les aberrations chromatiques est d'utiliser des miroirs concaves ; la radiation ne traversant pas le verre, le phénomène de dispersion disparaît. De plus, un dispositif optique à miroirs possède un taux de transmission nettement supérieur au dispositif à lentilles.

C'est la solution que nous avons retenue pour le couplage microscope-spectrographe qui comportera uniquement des optiques à miroirs.

III.5.3. Principe du balayage au moyen de l'optique à miroirs

Nous avons, à partir du système de couplage à balayage, décrit précédemment, modifié le schéma optique de manière à n'utiliser que des miroirs.

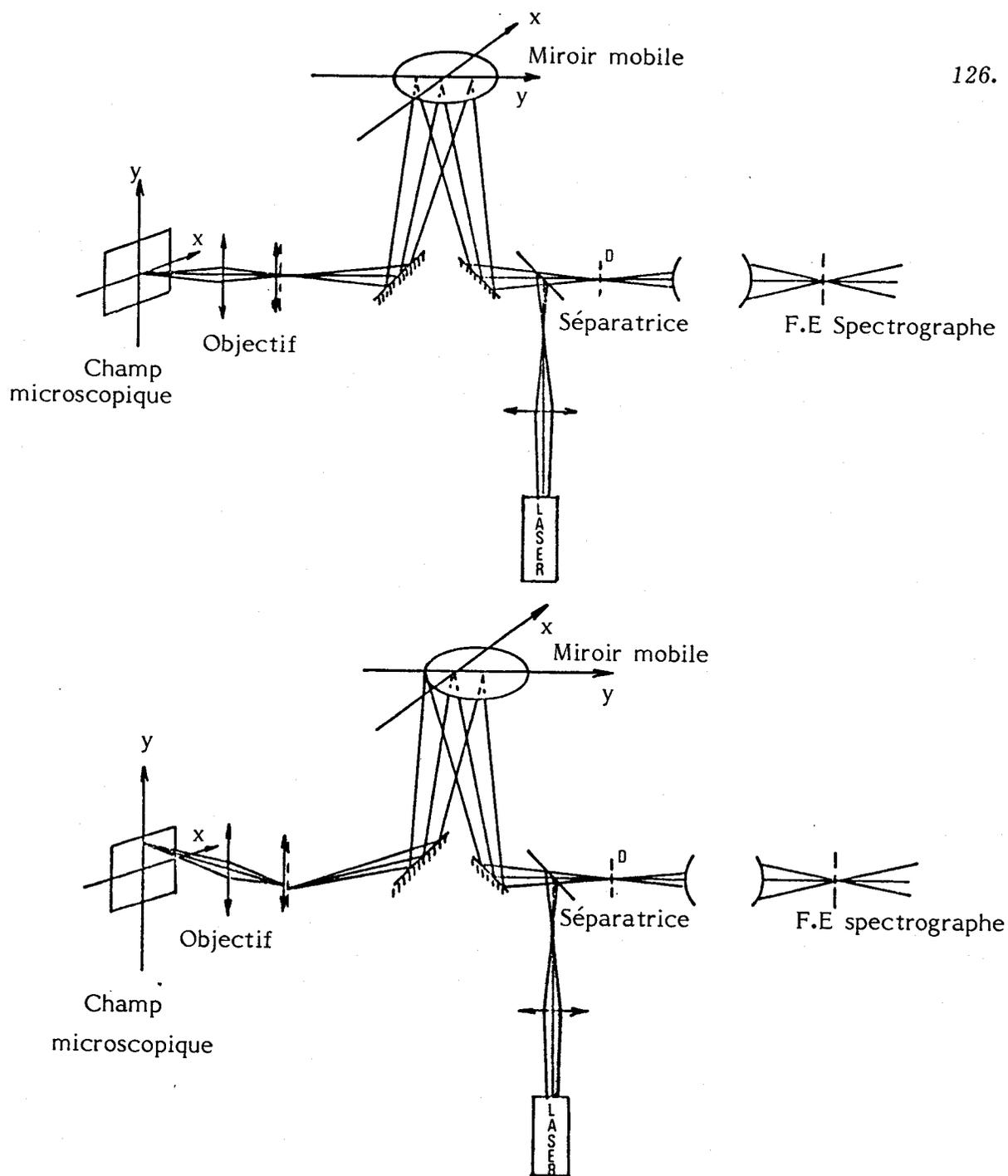


FIG.66 : Principe du balayage de l'échantillon par déplacement
d'un miroir concave

- a) Focalisation au centre du champ microscopique
- b) Focalisation en un point quelconque du champ

Le faisceau laser est focalisé dans le plan image de la préparation au moyen d'un miroir concave (Fig. 66) ; l'objectif reprend alors l'image du faisceau laser et la focalise, sur la préparation, en un spot dont la dimension est limitée par les phénomènes de diffraction.

Le miroir concave, mobile en translation dans les deux directions du plan perpendiculaire à l'axe des faisceaux, permet de déplacer le point de focalisation du laser dans le plan image, donc dans le plan objet.

Un déplacement coordonné suivant les axes x et y permet ainsi d'effectuer un balayage des points successifs de la préparation.

Une lentille de champ, située au niveau du plan image de la préparation permet, d'utiliser l'ouverture complète de l'objectif, quelle que soit l'amplitude de balayage.

La lumière émise, par fluorescence ou encore par diffusion Raman, du point analysé est recueillie par l'objectif et suit le même trajet que le faisceau laser.

III.6. - REALISATION DE L'OPTIQUE DE COUPLAGE

Nous avons tenu compte, pour la réalisation de l'optique de couplage, de considérations optiques, telles que la conjugaison des pupilles du microscope et du spectrographe et l'adaptation des ouvertures, mais aussi mécaniques (encombrement, passage des faisceaux, fixation du laser).

Pour des raisons de stabilité, nous avons fixé le laser hélium-cadmium directement sur la face arrière du spectrographe, tandis que nous avons relié le statif du microscope à la face avant du bâti.

Le couplage a été effectué au moyen de trois miroirs concaves montés en "Z". En effet, le "schéma en Z" a pour avantage de corriger l'aberration de coma. L'abberation due à l'inclinaison du premier miroir est compensée par le second [73] (Fig. 67).

Le miroir M_1 ($F=150\text{mm}$), destiné au balayage du faisceau laser, reforme une image de la préparation, au grandissement 1, au niveau d'un diaphragme D . Ce diaphragme permet d'étudier la fluorescence d'un point du champ, en éliminant la fluorescence parasite due à l'environnement.

Ce diaphragme d'un diamètre de $200\mu\text{m}$ permet d'observer, lors de l'utilisation d'un objectif de grossissement $100\times$, et compte tenu du grandissement de 1,25 de la lentille du tube, une zone circulaire de $1,6\mu\text{m}$ de diamètre au niveau de la préparation, diamètre légèrement supérieur à celui de la tache de focalisation du faisceau laser.

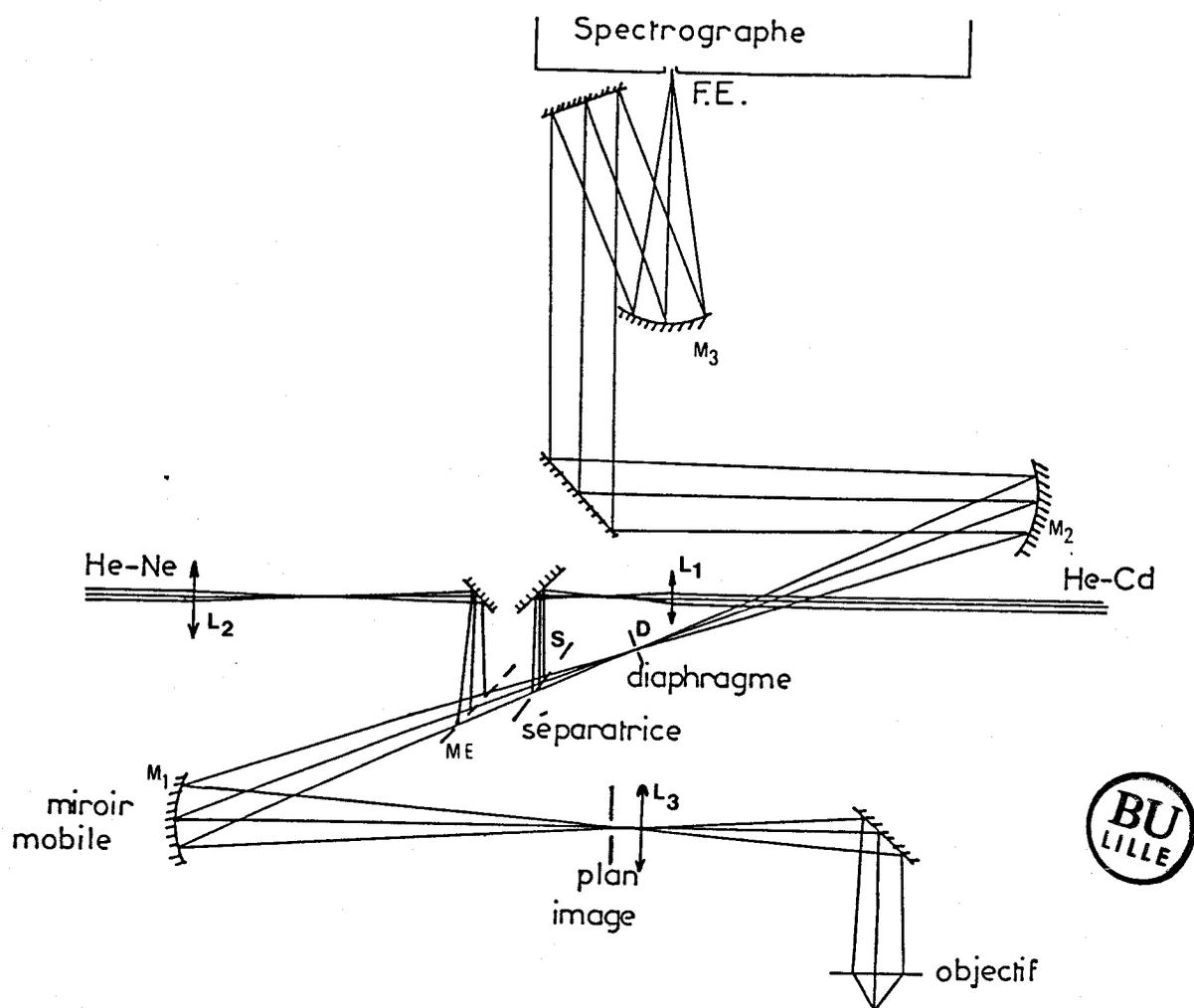


FIG.67 : Schéma optique du couplage microscope-spectrographe

Le diaphragme est placé dans le plan focal du second miroir concave M_2 ($F=300\text{mm}$) qui permet l'obtention d'un faisceau parallèle. Celui-ci est acheminé vers le prémonochromateur, au moyen d'un jeu complexe de miroirs plans et est focalisé au moyen du troisième miroir concave M_3 ($F=100\text{mm}$) sur la fente d'entrée du premier étage du système dispersif. Un schéma simplifié de l'ensemble des optiques est représenté par la figure 67.

Les miroirs ont subi un traitement Amplivex, consistant à déposer une couche diélectrique de fluorure de magnésium (MgF_2) qui évite l'oxydation de l'aluminium ; les courtes longueurs d'onde étant absorbées par l'alumine.

Afin d'utiliser, quel que soit l'angle de déflexion du laser, l'ouverture complète de l'objectif, une lentille de champ L_3 a été introduite dans le trajet optique au niveau du plan image de la préparation. Cette lentille en silice fondue reporte l'image de la pupille de l'objectif sur le miroir concave M_1 (Fig. 68). Cette lentille sera remplacée par un doublet achromatique lors d'une nouvelle version de l'appareil.

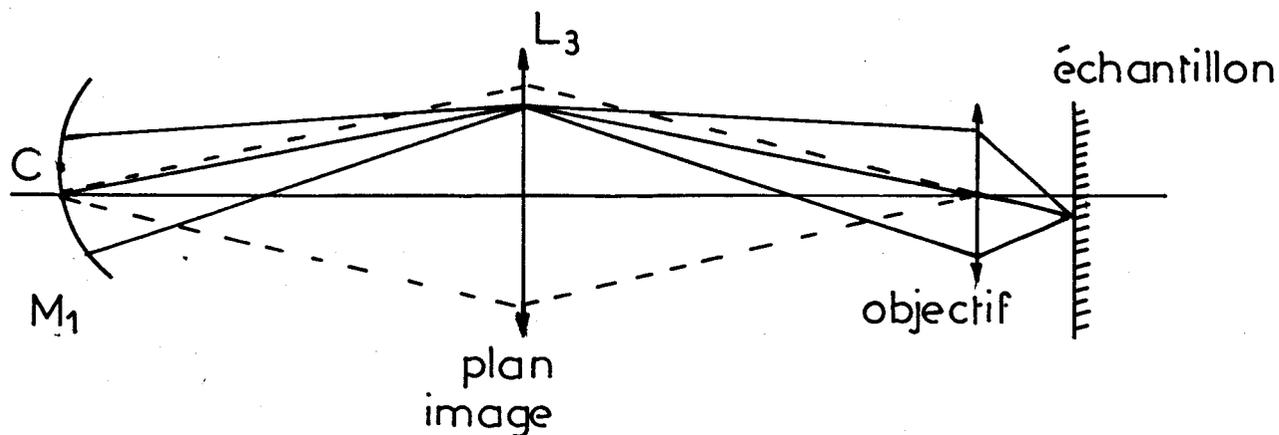


FIG.68 : Report de l'image de la pupille de l'objectif sur le miroir concave

Généralement, la face frontale de la première lentille de l'objectif constitue la pupille d'entrée, tandis que la pupille de sortie se trouve au voisinage de la monture de la dernière lentille. Le diamètre de celle-ci est donné par l'expression :

$$d = 2.n.f.\sin \alpha \quad (58)$$

où f : distance focale de l'objectif

$n.\sin \alpha$: ouverture numérique

Nous avons mesuré la taille, ainsi que la position de la pupille pour les trois objectifs du microscope. Suivant l'objectif utilisé, le diamètre de la pupille est différent et nous avons considéré une valeur intermédiaire correspondant à l'objectif de grandissement 40X, soit 10mm, en tenant compte du grossissement de la lentille du tube. On obtient ainsi par calcul une distance focale de 150mm pour la lentille de champ L_3 .

Le faisceau laser ultra-violet, focalisé dans un plan conjugué de celui de l'image de la préparation, au moyen de la lentille L_1 ($F=30\text{mm}$) est envoyé dans le trajet optique du couplage au moyen d'une lame semi-transparente S . La lumière émise par fluorescence devant traverser la séparatrice, celle-ci possède un coefficient de transmission voisin de 70% de manière à obtenir le minimum de perte de flux (Fig. 69).

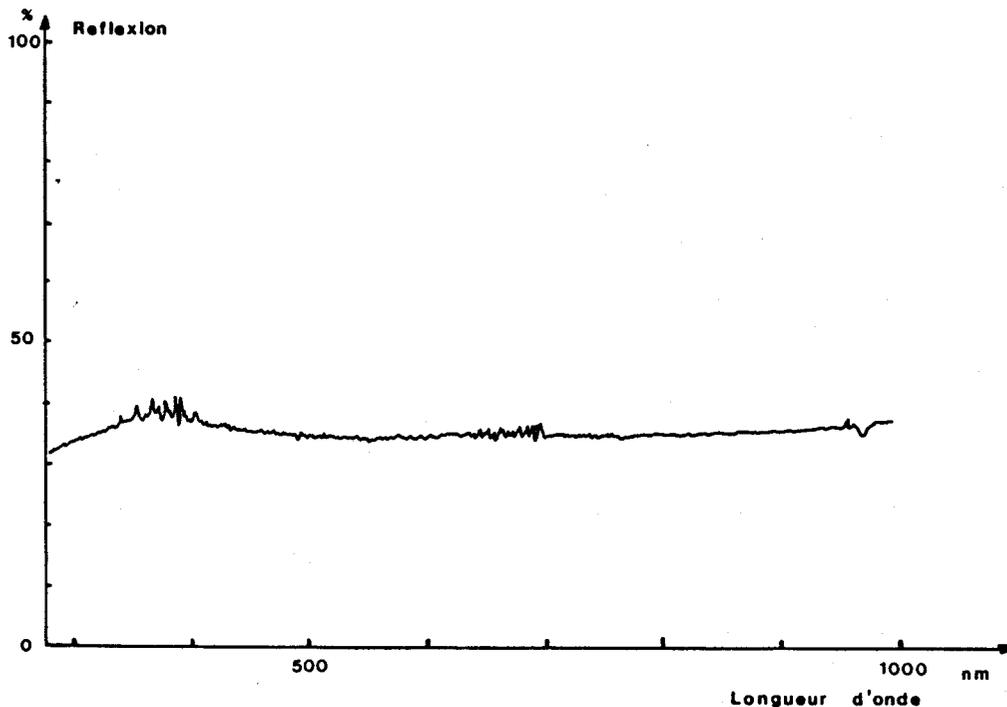


FIG.69 : Coefficient de réflexion de la lame séparatrice en fonction de la longueur d'onde

Cependant, l'introduction d'une lame semi-transparente dans un faisceau convergent risque d'entraîner un dédoublement de l'image (Fig. 70) plus ou moins important suivant l'épaisseur de la lame.

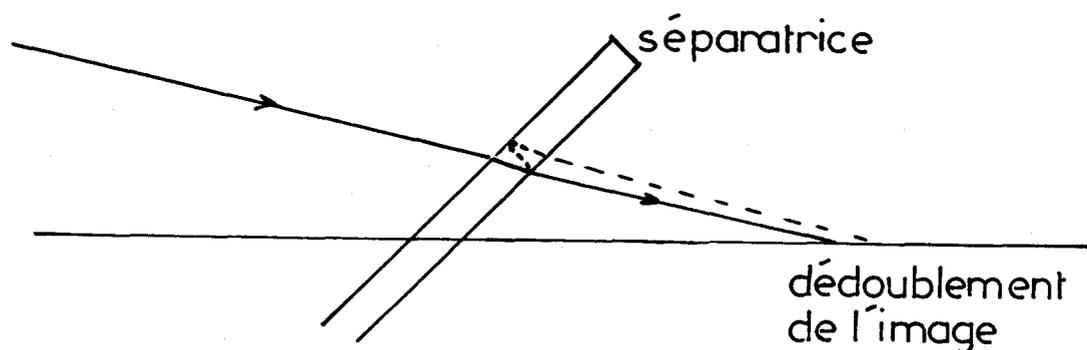


FIG.70 : Dédoublement de l'image par interposition d'une lame séparatrice dans un faisceau convergent

La lame séparatrice située dans le corps du microscope se trouve également sur un faisceau convergent dont l'ouverture est identique à celle du faisceau du couplage optique.

Nous avons pris des clichés photographiques dans le plan focal de la trinoculaire ; ceux-ci ne font pas apparaître d'images "fantômes". La lame ayant une très mince épaisseur (1mm), le dédoublement de l'image est très faible, et nous avons conservé ce montage.

D'autre part, la lame séparatrice est située devant le diaphragme, de manière à n'avoir aucune réflexion directe du faisceau laser sur ce dernier ; ces réflexions parasites, si elles existaient, seraient envoyées vers le spectrographe.

Pour des raisons de sécurité, l'impact du faisceau d'excitation sur la préparation, n'est pas observé au travers des oculaires, mais un faisceau laser hélium-néon fortement atténué et colinéaire au faisceau d'excitation est envoyé dans le microscope. Ce faisceau, issu du même laser que celui utilisé pour la référence en longueur d'onde dans le spectrographe (cf. Chapitre II. paragraphe 4), pénètre dans le trajet optique au moyen d'un miroir escamotable M.E., monté sur glissière à billes. Lorsque le miroir est en position haute, il coupe le faisceau d'excitation et permet la visualisation du faisceau hélium-néon focalisé sur la préparation et dont la position est rigoureusement la même que celle du faisceau d'excitation.

CHAPITRE IV

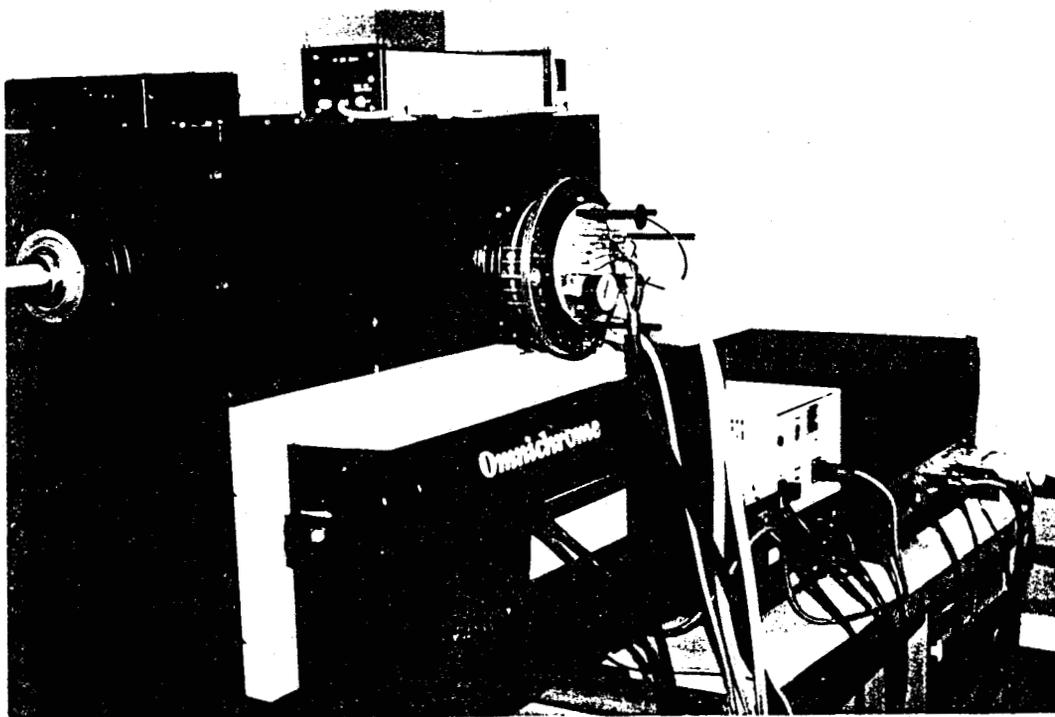
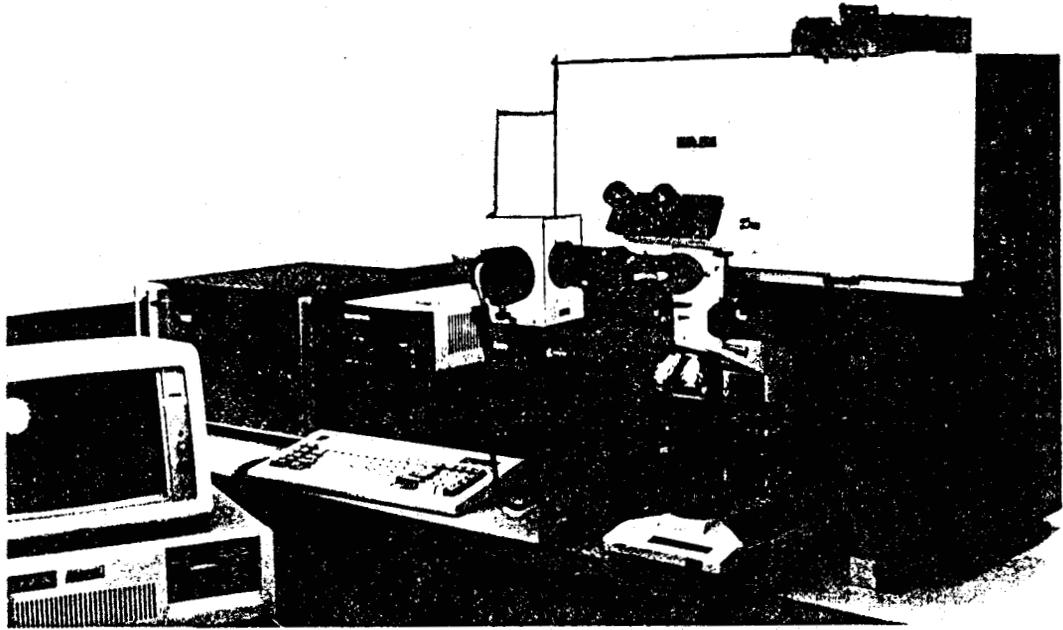
ETUDE DES PERFORMANCES DE L'APPAREIL

La réalisation mécanique et l'alignement optique de la version 02 du microspectrofluorimètre ont été terminés en février 1987.

Les clichés 2 représentent des vues d'ensemble de l'appareil qui a fait l'objet d'une présentation à la "Pittsburgh Conference and exposition" (Atlantic City 9 au 13 mars 1987) .

De nombreux tests ont ensuite été effectués sur le microspectrofluorimètre, de manière à étudier ses performances au point de vue de la sensibilité et de la réjection de la lumière parasite en vue de son utilisation en spectroscopie Raman. Nous avons comparé ce nouvel instrument au premier prototype réalisé dans le cadre du G.I.P., et également à d'autres appareils conventionnels de spectrométrie de fluorescence et de spectrométrie Raman .

Nous avons aussi étudié l'avantage qu'apporte l'emploi de laser focalisé au moyen de l'objectif du microscope du point de vue de l'efficacité de l'excitation



*CLICHE 2 : Vue d'ensemble du microspectrofluorimètre version 02
Vue de face et vue de derrière*

IV.1.- EVALUATION DU SYSTEME DISPERSIF

IV.1.1. Clichés photographiques du plan focal du spectrographe

Dans un premier temps, afin de vérifier la qualité des images spectrales dans le plan focal du spectrographe, nous avons effectué des enregistrements photographiques du spectre d'une lampe à vapeur de mercure basse pression .

Sans utiliser le microscope ni l'optique de couplage, la source est focalisée au moyen d'un objectif sur la fente d'entrée du prémonochromateur, de manière à éclairer la totalité de la surface du disperseur .

Un support de plaques photographiques est monté sur une platine à déplacement micrométrique, fixée sur le bâti du spectrographe . Il est ainsi possible de déplacer le film de part et d'autre du plan focal afin d'observer l'allure et l'évolution des raies spectrales, et ceci sans report d'image au moyen d'optique intermédiaire. Le temps de pose réglable est obtenu en plaçant devant la fente d'entrée du prémonochromateur un obturateur d'appareil photographique .

Les clichés ont été enregistrés avec une pellicule de sensibilité moyenne (125 ASA) .

La figure 71-a montre le doublet jaune du mercure (576,9 et 579 nm) dispersé avec les réseaux de diffraction (1800 traits/mm) et la figure 71-b un champ spectral plus important, obtenu avec le prisme, s'étalant du doublet jaune non résolu à la raie violette (404,6 nm)

Ces différents clichés montrent que les images spectrales sont parfaitement rectilignes dans le plan focal ; d'autre part ils ont permis de mettre en évidence que le réglage en tirage des miroirs concaves est très critique .

Le fait d'utiliser deux types de disperseurs différents (prismes et réseaux), dont l'un nécessite la traversée d'une épaisseur de verre, rend le réglage plus délicat que dans le cas d'un appareil ne comportant qu'un seul disperseur (prisme ou réseau) . En effet, un léger défaut de collimation entraîne l'obtention de deux plans focaux distincts suivant que l'on utilise les prismes ou les réseaux de diffraction .

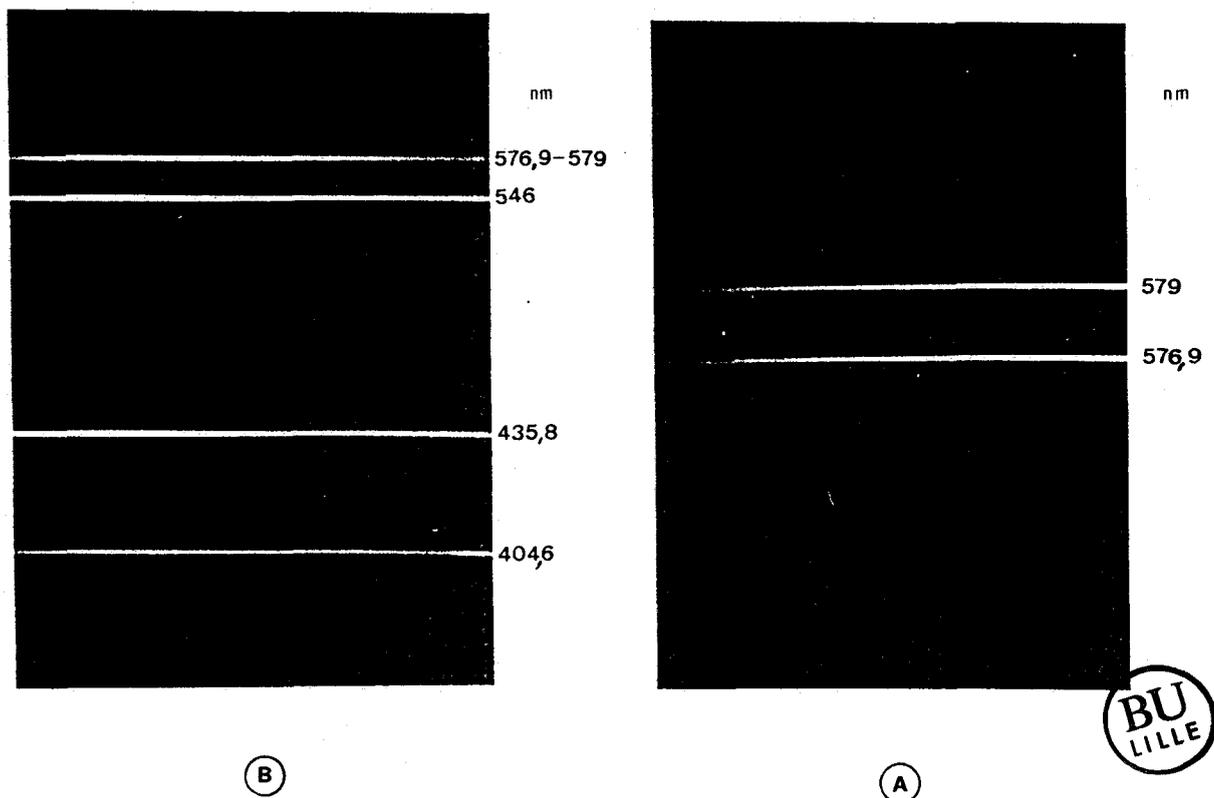


FIG.71 : Clichés photographiques obtenus dans le plan focal
du spectrographe (grandissement 5)

- a) En utilisant les réseaux (temps de pose : 2 secondes)
b) En utilisant les prismes (temps de pose : 1/8 de seconde)

Nous avons mesuré la largeur des raies spectrales au niveau du film, à l'aide d'un montage comportant une lunette de fort grossissement et une platine à déplacement micrométrique sur laquelle est fixé le cliché.

La largeur des raies est, quelque soit le disperseur utilisé, inférieure à la largeur mécanique de la fente d'entrée du prémonochromateur (200 μm). Ce phénomène peut être expliqué par l'anamorphose introduite par le système dispersif.

Dans le cas des réseaux, la largeur de l'image spectrale ΔX_s et la largeur de la fente d'entrée ΔX_e sont liées par la relation :

$$\Delta X_s \doteq \frac{f_c}{f_o} \cdot \frac{\cos i}{\cos r} \cdot \Delta X_e \quad (59)$$

Le rapport des distances focales du collimateur et de l'objectif de chambre est égal à l'unité, tandis que le coefficient d'anamorphose $\cos i / \cos r$ qui traduit, pour une longueur d'onde donnée, le rapport des ouvertures du collimateur et de l'objectif de chambre est différent de un . Ainsi, par exemple, pour le doublet jaune du mercure, ce facteur vaut 0,82 .

De même, dans le cas des prismes, il existe une expression reliant la largeur d'une image monochromatique de la fente d'entrée à la largeur mécanique de celle-ci :

$$\frac{L_o \cdot X_o}{f_o} = \frac{L_c \cdot X_e}{f_c} \quad (60)$$

où les termes L_o et L_c représentent la largeur des faisceaux parallèles qui respectivement atteignent le prisme (collimateur) et en ressortent (objectif de chambre). (Fig.72)

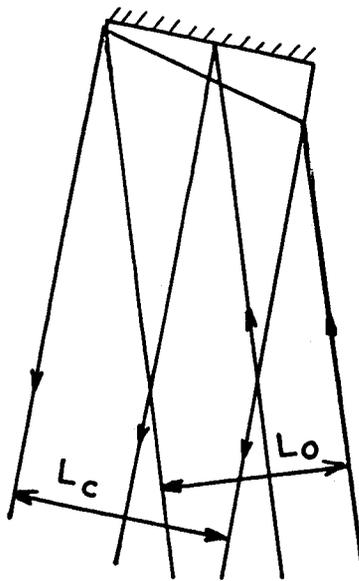


FIG.72 : Géométrie des faisceaux lumineux incidents et dispersés par le prisme

Ainsi pour le doublet jaune du mercure, le rapport d'anamorphose $\frac{L_c}{l_0}$ vaut 0,83, ce qui correspond au rapport entre la largeur mesurée des raies et la largeur mécanique de la fente.

IV.1.2. Enregistrement du spectre d'une lampe néon

Toujours sans utiliser le microscope, ni l'optique de couplage, nous avons enregistré le spectre d'une lampe au néon qui présente l'avantage de fournir une multitude de raies d'émission dans le domaine du visible et du proche infrarouge.

La figure 73-a représente une partie du champ vu par le détecteur multi-canal ; le spectre de la source néon atténuée au moyen de filtres neutres, étant dispersé par les prismes.

Le champ observé couvre le domaine complet du visible, et présente un grand nombre de raies non résolues à partir de 550 nm. En diminuant la densité des filtres neutres, il est encore possible d'enregistrer des raies d'émission suffisamment intenses au delà de 850 nm, domaine où la sensibilité de la photocathode du détecteur devient très faible.

Le même spectre a été enregistré à moyenne résolution avec les réseaux de diffraction de 1800 traits/mm. Le champ vu par le détecteur étant alors très étroit (15 à 20 nm), le spectre a été obtenu pour plusieurs positions successives des disperseurs.

Les raies spectrales de la figure 73-b illustrent la résolution des massifs 1 et 2 du spectre précédent obtenu au moyen des prismes.

IV.2.- SPECTRES DE FLUORESCENCE

IV.2.1. Spectres de fluorescence de molécules excitées dans le domaine du visible

Dans un premier temps, nous avons comparé les sensibilités des deux prototypes de microspectrofluorimètres réalisés.

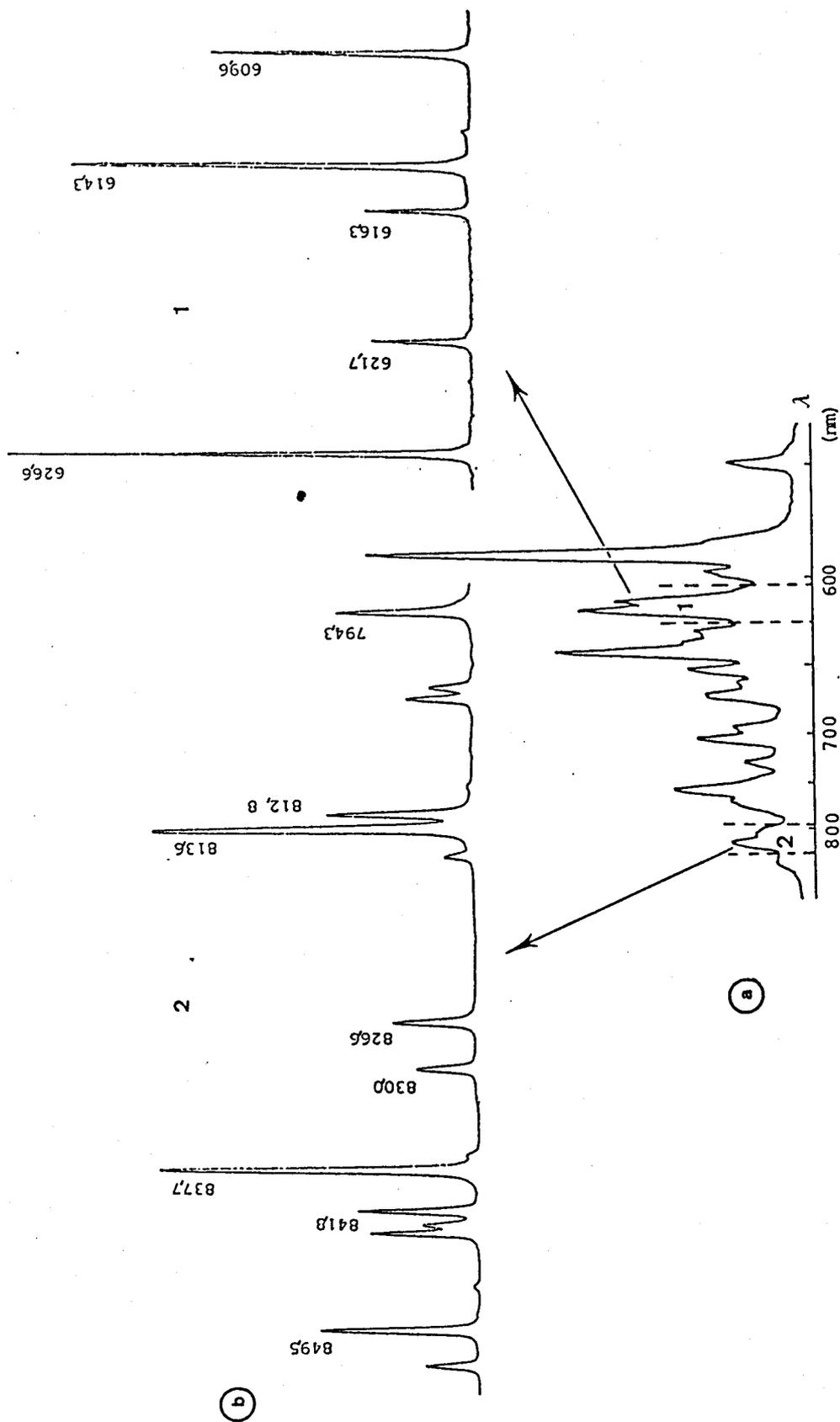


FIG.73 : Spectres d'une source néon obtenus : a) avec les prismes b) avec les réseaux



Quand on compare la sensibilité de deux instruments, il est habituel de parler en terme de seuil de détection pour une substance donnée . On considère alors que la limite de détection est conditionnée uniquement par le bruit des appareils.

Dans de nombreuses applications en fluorescence, la sensibilité instrumentale n'est pas limitée par le bruit du système de détection mais par le fond de lumière parasite qui comprend généralement plusieurs composantes : émission de fluorescence ou diffusion Raman du solvant, fluorescence des optiques ou du verre des lames et lamelles de microscope .

Le choix du composé à étudier est généralement important ; il est nécessaire de considérer une espèce chimique dont l'absorption et l'émission de fluorescence correspondent à la région spectrale dans laquelle l'appareil est destiné à être utilisé .

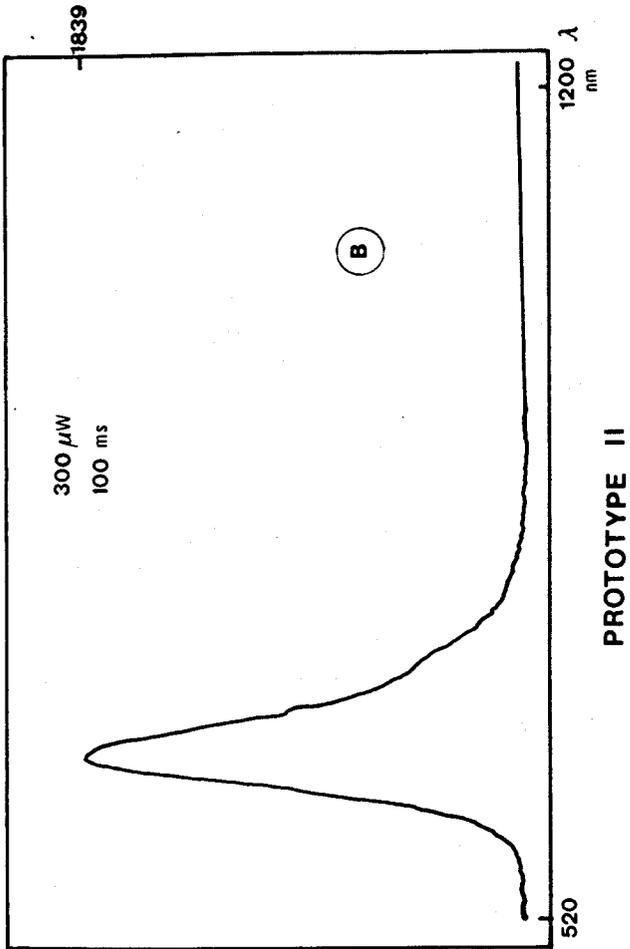
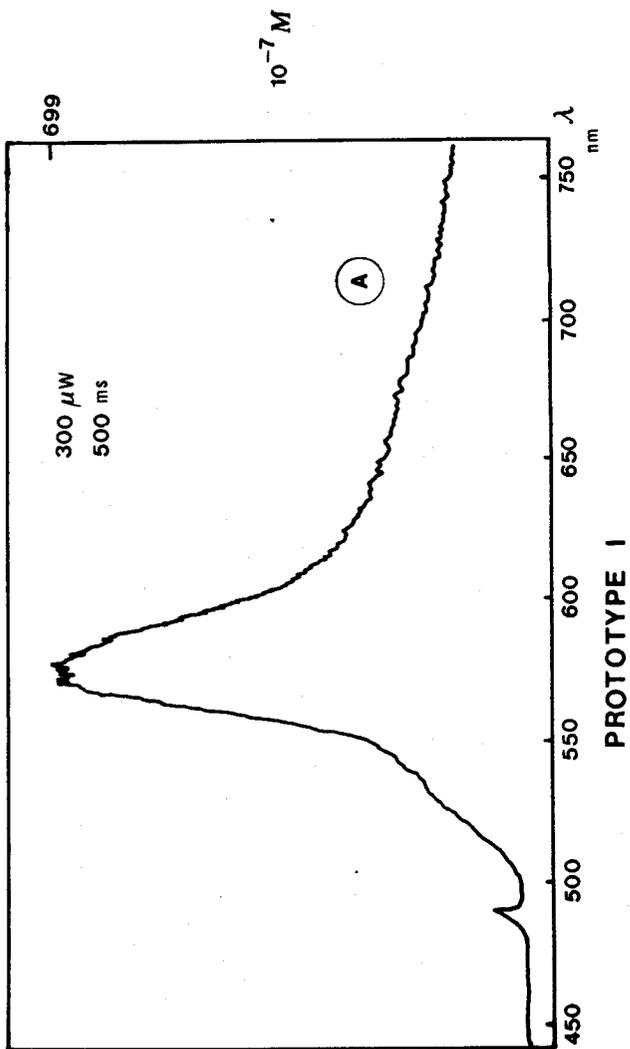
La version 01 du microspectrofluorimètre exigeant une excitation dans le domaine du visible, nous avons choisi comme substance test la rhodamine B, qui possède un rendement quantique de fluorescence élevé (0,89) , et présente une bande d'émission centrée à 590 nm .

La version 02 de l'appareil a donc également été équipée d'un laser à argon ionisé Spectra Physics modèle 162 à refroidissement à air .

La longueur d'onde d'excitation qui a été retenue est celle à 488 nm, qui permet d'observer le spectre de fluorescence de la rhodamine sans être gêné par la radiation excitatrice .

Nous avons enregistré successivement sur les deux microspectrofluorimètres avec la même puissance laser au niveau de l'échantillon et avec le même objectif de grandissement X 20, le spectre de fluorescence de la rhodamine B, en solution dans l'eau, à différentes concentrations .

Un exemple des résultats obtenus est illustré par la figure 84 qui présente les spectres des solutions de rhodamine placées entre lame et lamelle sous microscope, à des concentrations de 10^{-7} et 10^{-10} molaire .



NON DETECTE

10^{-10} M

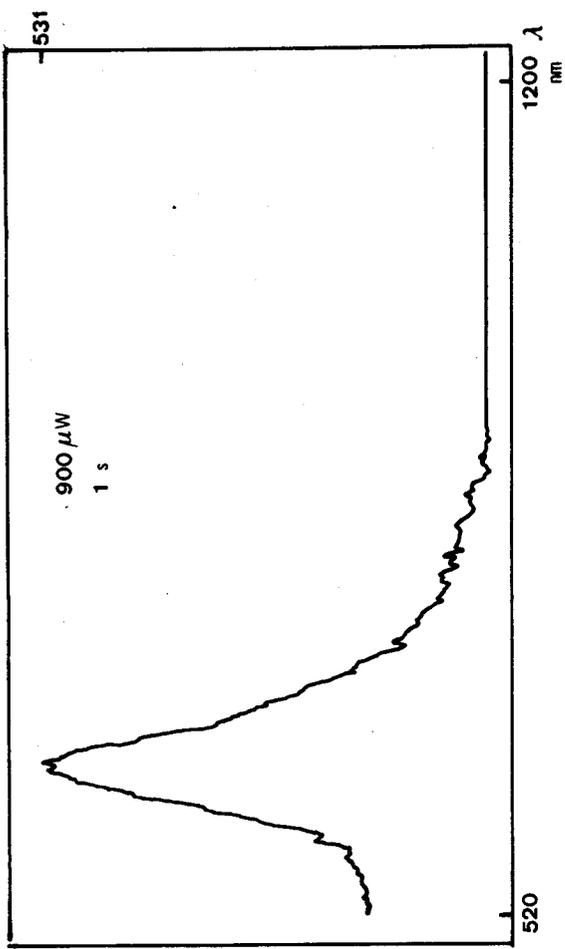


FIG.74 : Spectres de fluorescence de la rhodamine B



Pour la solution de concentration 10^{-7} mole/litre, le spectre enregistré au moyen de la version 01 de l'appareil, travaillant avec le réseau de diffraction de 300 traits/mm, a été obtenu avec une puissance au niveau de l'échantillon voisine de 300 μ W et un temps d'intégration de 500 millisecondes (Fig.74-a) .

La même solution analysée au moyen de la version 02 du microspectrofluorimètre, en utilisant les prismes, présente une intensité de fluorescence plus importante pour une même puissance d'excitation, et un temps d'intégration plus faible (100 millisecondes) .

La concentration de 10^{-9} molaire constitue la limite de détection pour l'analyse d'une solution de rhodamine B avec le premier appareil ; en effet au delà de cette concentration, on ne voit apparaître que le spectre du filtre d'arrêt ainsi que celui du verre .

Le second prototype de microspectrofluorimètre permet encore l'enregistrement d'une solution 10^{-10} molaire de rhodamine (Fig.74-b) . Le spectre présente toutefois un fond de fluorescence dû au verre (lame et lamelle), ainsi qu'une bande Raman de l'eau qui se superpose à la bande de fluorescence possédant une largeur spectrale plus importante .

La meilleure sensibilité de la version 02 s'explique essentiellement par une meilleure élimination de la lumière parasite (fluorescence intrinsèque des filtres d'arrêt, lumière parasite du spectrographe) . De plus, il faut remarquer que ce second prototype possède une bonne transmission ; il est totalement dépourvu de lentille et les prismes utilisés présentent une transmission élevée, supérieure à l'efficacité des réseaux de diffraction .

IV.2.2. Spectres de fluorescence de molécules excitées dans le domaine de l'ultra-violet

L'appareil étant destiné à étudier l'émission de fluorescence dans le domaine du visible de molécules excitées dans l'ultra-violet, nous avons donc enregistré

des spectres de différents composés dans ces conditions, en utilisant comme source d'excitation, le laser hélium-cadmium ($\lambda = 325$ nm).

Deux exemples sont donnés par les spectres des figures 75 et 76 qui correspondent respectivement aux spectres de fluorescence du benzopyrène et du sulfate de quinine.

La faible puissance émise par le laser hélium-cadmium (2,7 mW) est encore fortement atténuée par un filtre placé sur le faisceau, avant l'entrée dans le microscope, de façon à éliminer les radiations visibles du plasma du laser. Il ne reste ainsi qu'une dizaine de microwatts au niveau de l'échantillon.

Spectre du benzo-pyrène

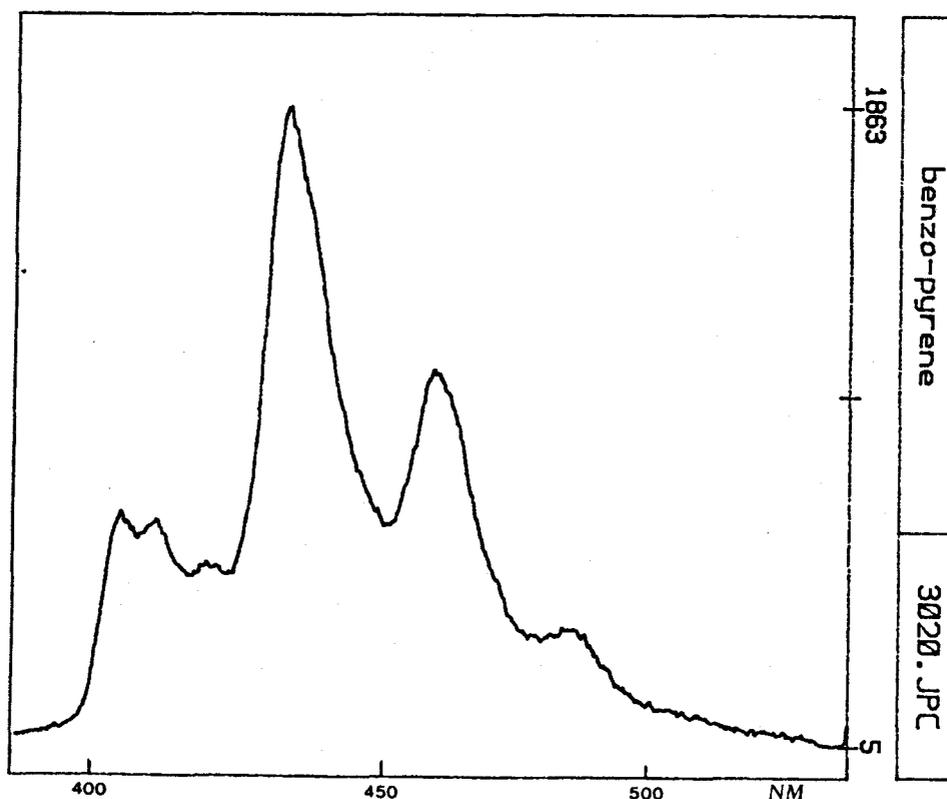


FIG.75 : Spectres du benzo-pyrène (excitation : 325 nm, $8 \mu\text{W}$ au niveau de l'échantillon, temps d'intégration : 200 ms)

Le spectre du benzo-pyrène (Fig.75) à une concentration de 10^{-5} molaire dans le méthanol, présente plusieurs bandes de fluorescence dans le domaine 400-500 nm . Les conditions d'enregistrement de ce spectre sont les suivantes :

- * Objectif 40 X
- * Puissance d'excitation au niveau de l'échantillon : $8 \mu\text{W}$
- * Temps d'intégration : 200 millisecondes
- * 40 accumulations

Spectre du sulfate de quinine

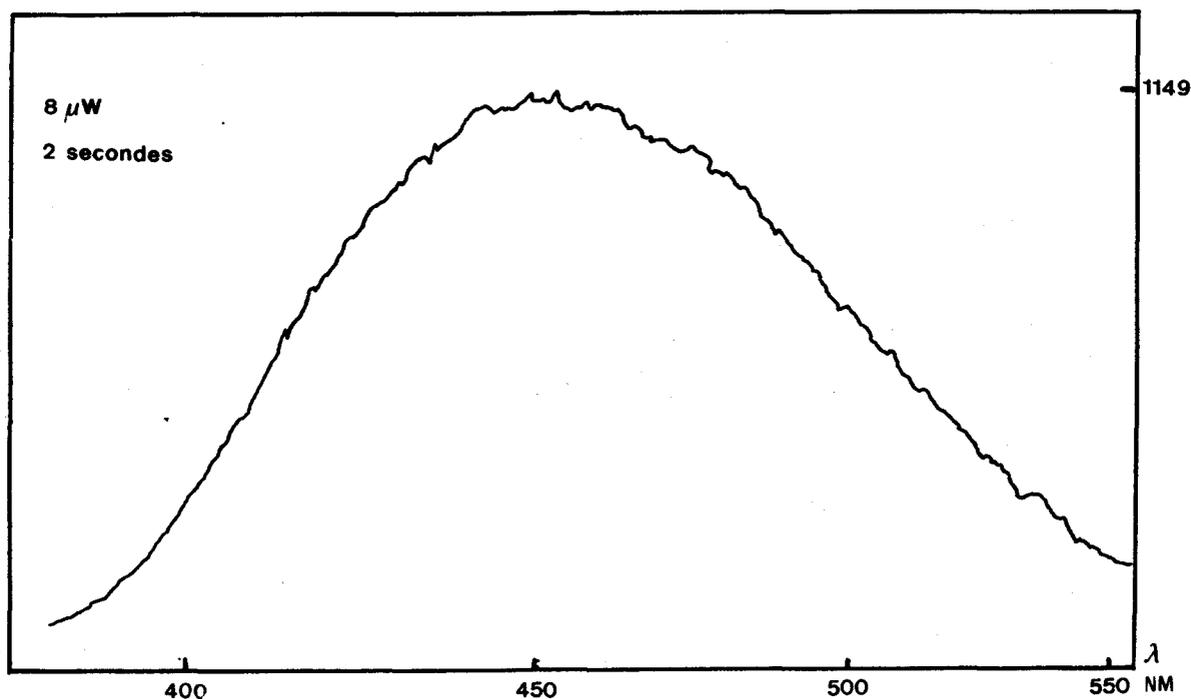


FIG.76 : Spectre de fluorescence du sulfate de quinine (10^{-7} M)
excité à 325 nm

Le sulfate de quinine est un composé bien connu pour ses propriétés de fluorescence . Il est souvent utilisé comme standard pour la calibration des instruments ou encore la détermination de rendement quantique relatif .

Nous avons enregistré le spectre du sulfate de quinine en milieu acide (H_2SO_4 , 1N) à une concentration de 10^{-7} molaire . Le spectre (Fig.76) présentant une bande large qui s'étale de 375 à 600 nanomètres a été obtenu avec une puissance de 8 μW au niveau de l'échantillon et un temps d'intégration de deux secondes.

IV.3.- SPECTRES RAMAN

Nous avons enregistré une série de spectres Raman, en utilisant comme source d'excitation, les radiations 514,5 ou 488 nm du laser à argon ionisé . L'analyse spectrale est effectuée par les réseaux afin d'observer un champ voisin de 550 cm^{-1} à 500 nanomètres .

IV.3.1. Etude du domaine des basses fréquences

L'impossibilité d'observer le domaine des basses fréquences en spectroscopie Raman, avec le premier prototype, fut à l'origine l'une des raisons de la conception du second microspectrofluorimètre .

Nous avons étudié certains composés qui présentent des raies Raman proches de la radiation excitatrice . L'exemple le plus significatif de la possibilité d'explorer le domaine des basses fréquences au moyen du second prototype est donné par le spectre Raman d'un cristal de soufre S_8 (Fig.77) . Ce spectre a été obtenu avec l'objectif de grandissement 100 X, une puissance au niveau de l'échantillon de 0,3 mW et un temps d'intégration de une seconde ; il présente une raie Raman à 27 cm^{-1} avec un taux de lumière parasite relativement faible, puisque l'on n'observe pas de remontée de la ligne de base à proximité de l'excitatrice .

D'autres exemples d'étude Raman en basses fréquences sont illustrés par les figures 78 et 79 qui représentent les spectres de l'oxyde de molybdène (MoO_3) et de l'aspirine .

Le spectre de l'aspirine a été enregistré directement sur un comprimé

de couleur blanche qui renvoie une grande partie de la radiation excitatrice vers le spectrographe, ce qui se traduit par une légère remontée de la ligne de base dans le domaine des très basses fréquences .

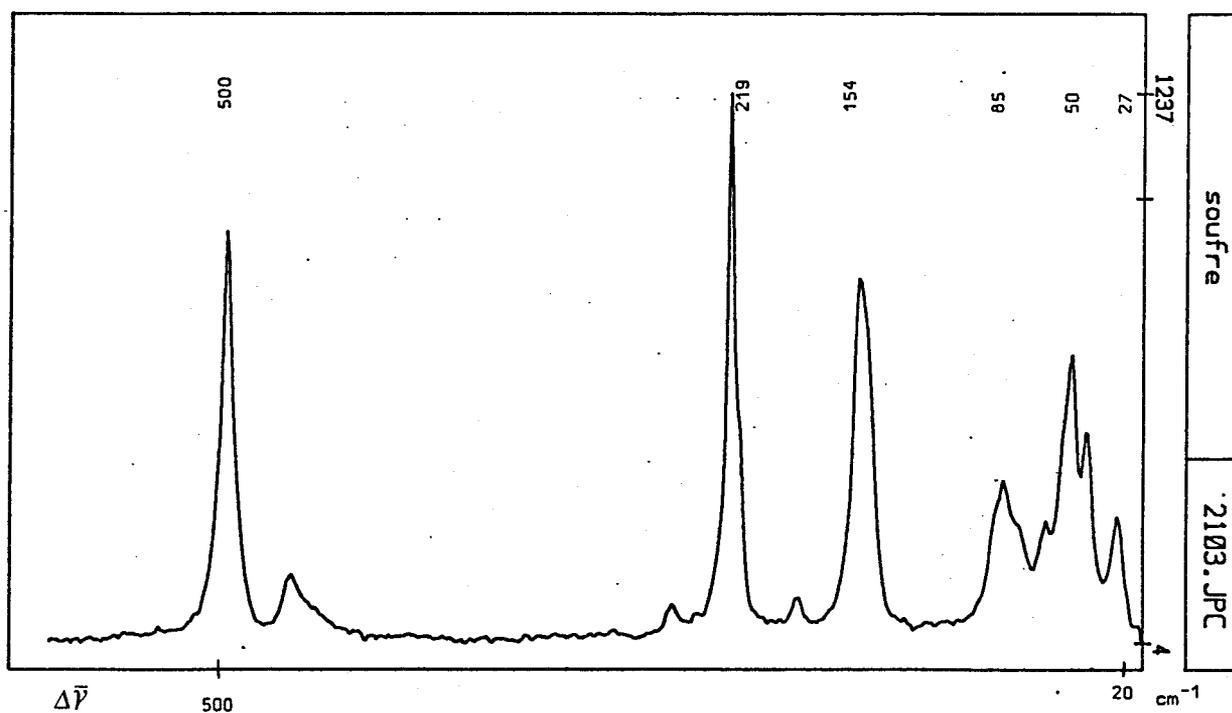


FIG.77 : Spectre Raman basses fréquences du soufre S_8
(0,3 mW à l'échantillon - temps d'intégration : 1 s)



Il faut remarquer que tous ces spectres ont été obtenus avec des puissances d'excitation au niveau de l'échantillon très faibles, toujours inférieures au milliwatt.

Du point de vue de la sensibilité, ces spectres sont comparables à ceux obtenus au moyen d'un spectromètre multicanal de conception identique, tel que l'OMARS commercialisé par la Société DILOR .

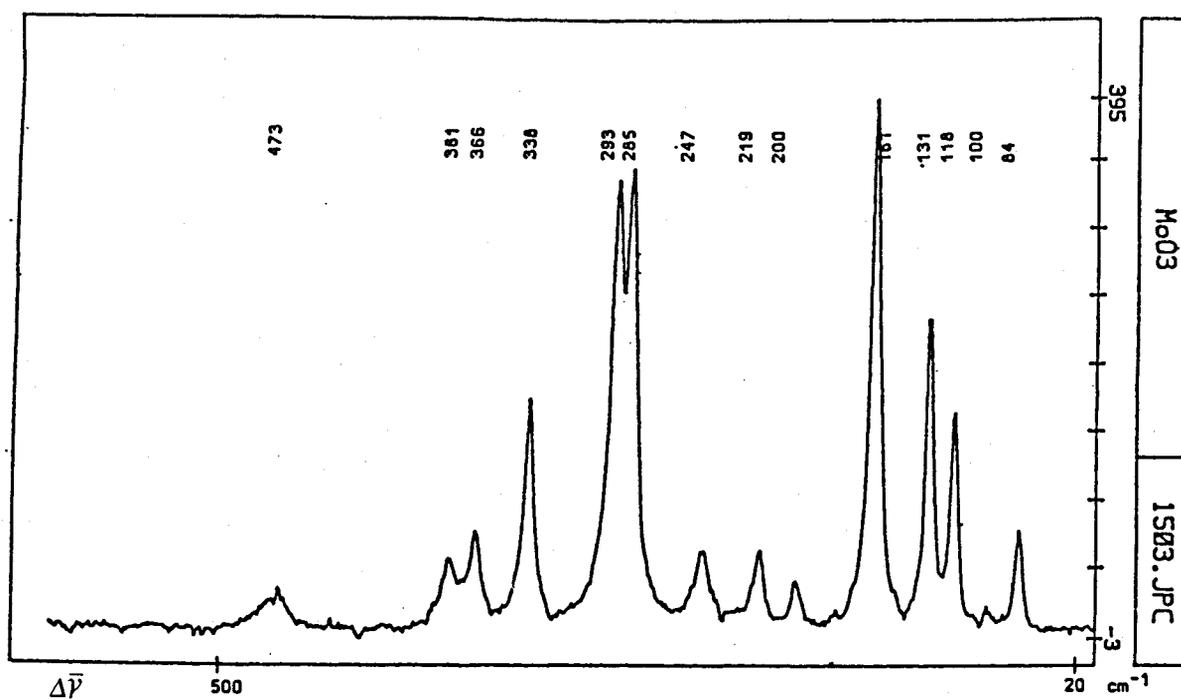


FIG.78 : Spectre Raman de MoO₃ (objectif : 20 X ; 0,9 mW au niveau de l'échantillon ; 0,3 s d'intégration ; 20 accumulations)

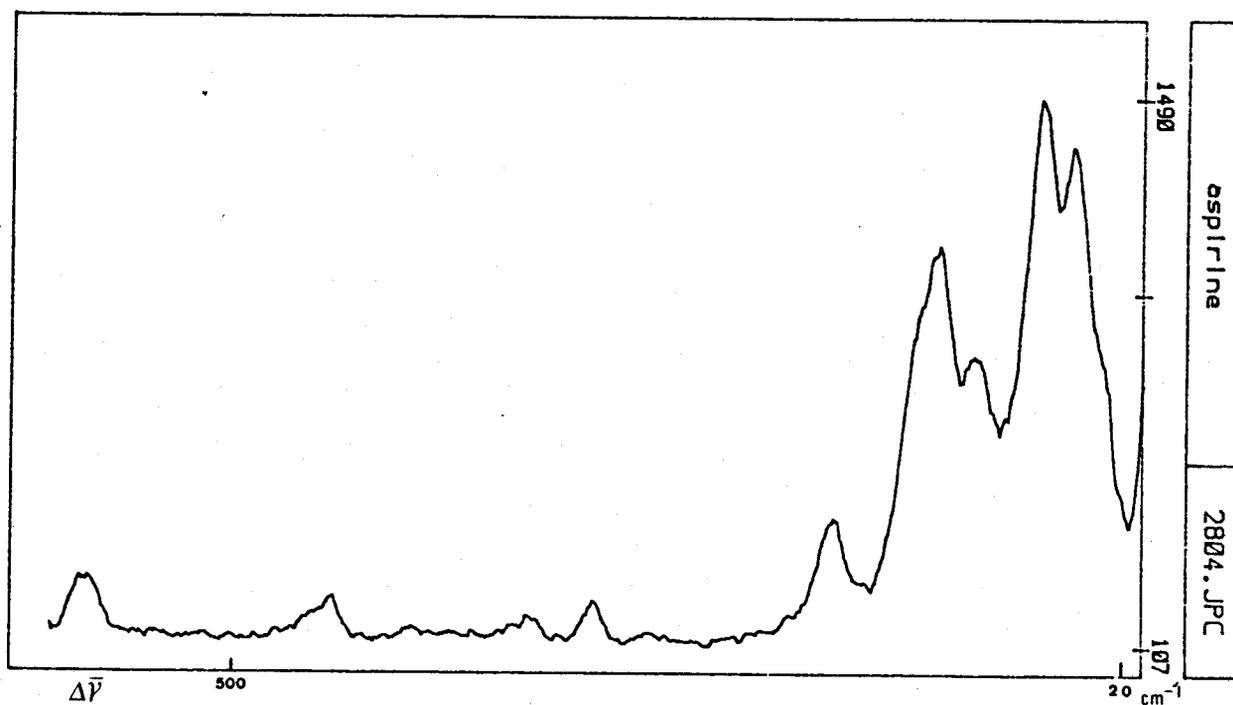


FIG.79 : Spectre Raman de l'aspirine (objectif : 20 X ; 0,7 mW au niveau de l'échantillon ; 2 s d'intégration)

IV.3.2. Influence du temps d'intégration

Pour certains composés, la dynamique du système de détection est insuffisante pour enregistrer dans le même champ des signaux intenses, proches de la saturation du détecteur, et des signaux faibles. Il est alors possible, après enregistrement des signaux intenses, de déplacer le champ de manière à n'observer que les signaux faibles et d'augmenter le temps d'intégration pour obtenir des intensités plus importantes.

C'est le cas par exemple du spectre Raman de l'anatase (TiO_2) (Fig.80) qui est composé d'une raie très intense voisine de 144 cm^{-1} et de raies moins intenses à 399 , 516 et 639 cm^{-1} .

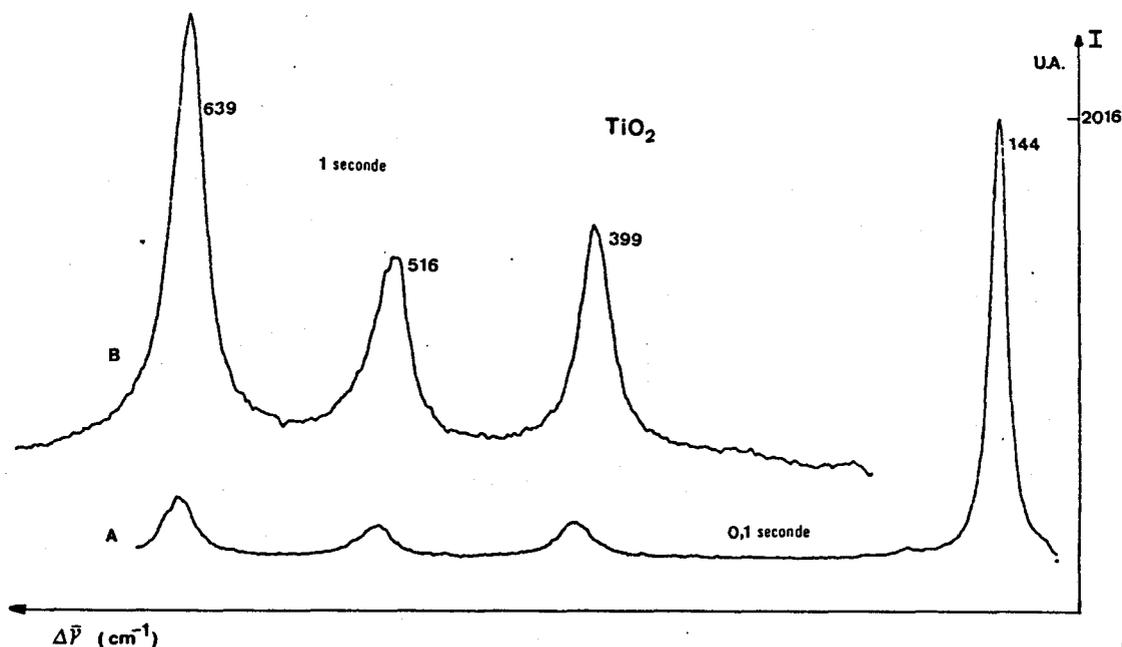


FIG.80 : Spectres Raman de TiO_2 (objectif : 20 X ; 0,9 mW au niveau de l'échantillon) a) temps d'intégration : 0,1 s
b) temps d'intégration : 1 s

De plus, on constate que l'augmentation du temps d'intégration permet d'augmenter le rapport signal/bruit .

IV.3.3. Spectre Raman de l'eau

L'enregistrement du spectre Raman de l'eau constitue, pour certains constructeurs, un test d'évaluation de la sensibilité des spectrofluorimètres . Le spectre Raman de l'eau présente une bande très large s'étalant sur un champ de 500 cm^{-1} , et centrée à 3400 cm^{-1} . Cette bande est due aux modes d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons O-H .

Le spectre de la figure 81 est le spectre Raman de l'eau enregistré au moyen d'un spectrofluorimètre classique du type SLM 4800 commercialisé par la Société AMINCO [72] dans les conditions suivantes :

- * longueur d'onde d'excitation : 360 nm avec un arc xénon
- * acquisition monocanale : 2,5 secondes par point
- * un point tous les 0,5 nm
- * 35 accumulations
- * bande passante des deux monochromateurs : 0,5 nm

L'enregistrement d'un champ spectral s'étalant de 380 à 400 nanomètres a donc nécessité un temps total de 3500 secondes .

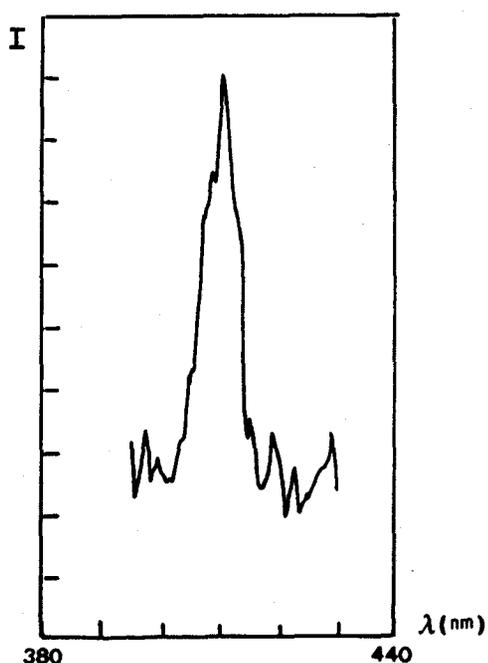


FIG. 81

Spectre Raman de l'eau obtenu au moyen d'un spectrofluorimètre classique (SLM 4800 Aminco)

Nous avons également enregistré le spectre Raman de l'eau au moyen du microspectrofluorimètre version 02, en utilisant les prismes, afin de comparer l'instrument aux fluorimètres traditionnels mais également pour confirmer le résultat obtenu par rapport au premier prototype .

Ce spectre (Fig.82-a) présente un rapport signal/bruit nettement plus important, et a été obtenu avec un temps d'intégration de 1 seconde et 20 accumulations, soit un temps total d'enregistrement de 20 secondes .

Il faut remarquer que si la puissance d'excitation lors de l'utilisation d'un laser est plus importante que celle d'une excitation par arc xénon, le volume analysé sous microscope, lui est très faible (quelques μm^3) comparé à celui analysé en spectrométrie de fluorescence conventionnelle (de l'ordre du cm^3) .

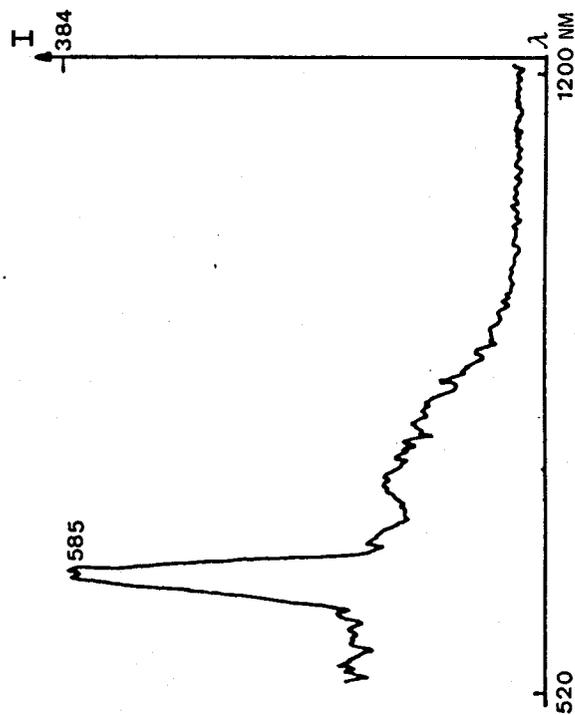
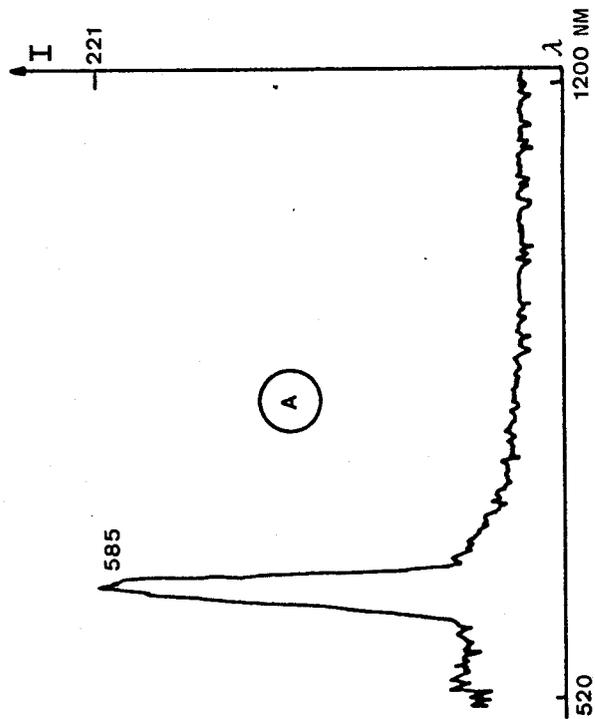
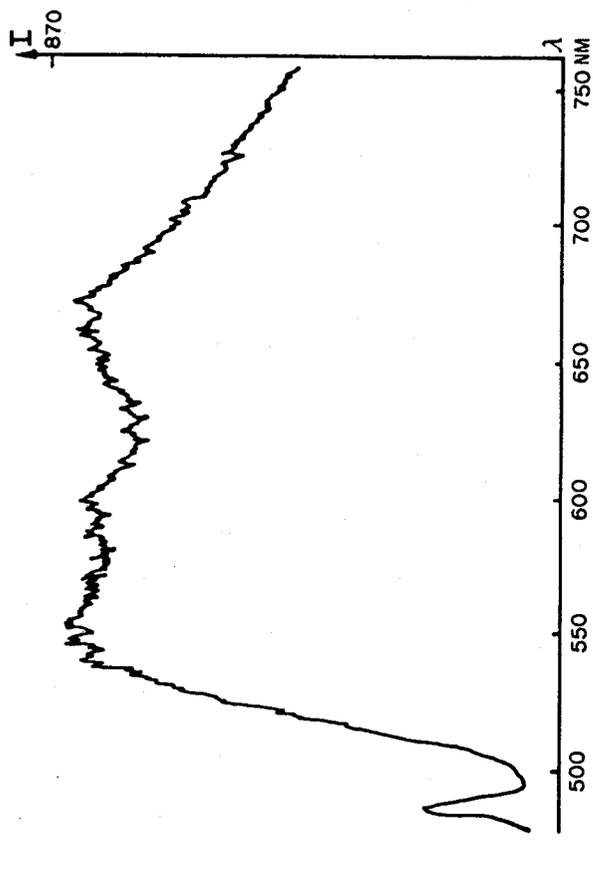
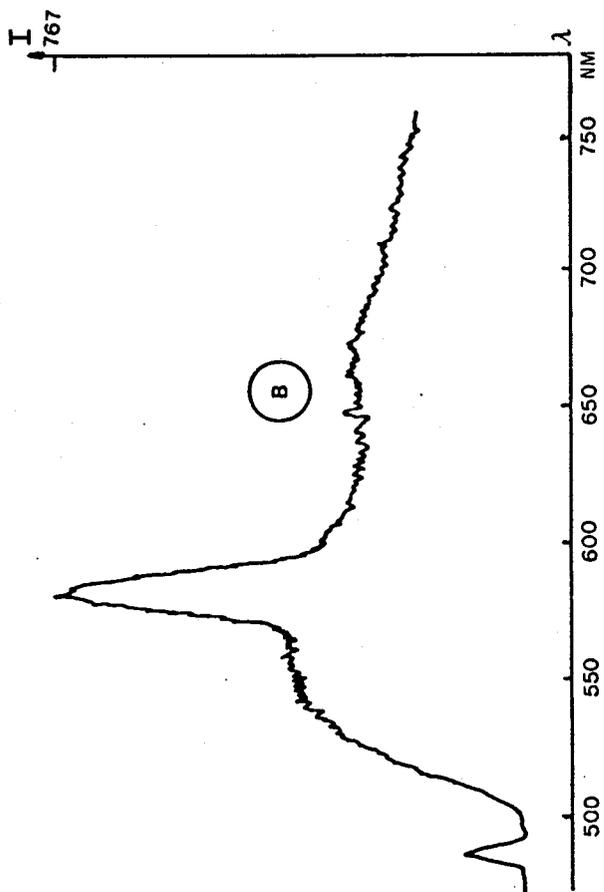
La figure 82 représente les spectres Raman de l'eau enregistrés avec les deux versions de microspectrofluorimètre, dans deux configurations différentes:

- * sur une goutte déposée sur une lame
- * sur de l'eau entre lame et lamelle

Le spectre d'une goutte d'eau, obtenu avec le premier prototype, donne une raie perchée sur un fond de fluorescence (filtre d'arrêt) ; tandis que celui de l'eau entre lame et lamelle ne fait plus apparaître la bande Raman de l'eau, mais présente une fluorescence importante du filtre d'arrêt, ainsi que du verre.

L'explication de ce phénomène réside dans le fait que la profondeur de champ de l'instrument est nettement supérieure à l'épaisseur de la pellicule d'eau analysée . Le signal Raman devient alors très faible par rapport à la fluorescence du verre et du filtre, et n'est plus détectable .

Les deux spectres enregistrés au moyen du second prototype présentent un faible fond de fluorescence dû au verre, mais conservent une intensité relative de la raie Raman, identique quelque soit le mode d'obtention (goutte ou entre lame et lamelle) . La taille du diaphragme de champ de l'appareil est plus faible que dans le premier cas ; par conséquent la profondeur de champ est réduite .



A) Prototype II B) Prototype I

FIG.82 : Spectres Raman de l'eau



Nous n'analysons qu'une très faible tranche de matériau, inférieure, dans ce cas précis, à l'épaisseur de la pellicule d'eau se trouvant entre la lame et la lamelle de microscope .

IV.4.- ETUDE DE LA PROFONDEUR DE CHAMP VUE PAR LE SPECTROGRAPHE

Les constatations faites sur les spectres Raman de l'eau, nous ont amenés à faire une estimation de la profondeur de champ de l'instrument .

La profondeur de champ dépend de la taille du diaphragme de champ situé dans le couplage optique, au niveau d'un plan conjugué de l'image de la préparation fournie par le microscope . Tout ce qui est dans le plan de netteté de l'objectif passe par le diaphragme, alors que les signaux issus des tranches de matériau située de part et d'autre du plan de netteté contribuent pour une faible partie au signal vu par le détecteur .

IV.4.1. Mesure de la profondeur de champ

Afin d'évaluer la profondeur de champ, nous avons utilisé une plaquette de silicium ; échantillon qui donne une raie Raman à 520 cm^{-1} , et présente l'avantage de permettre l'analyse d'une très faible épaisseur de matériau . En effet, la pénétration du faisceau laser dans le silicium est très faible, de l'ordre de quelques angströms et est très inférieure à la profondeur de matériau analysé .

Nous avons enregistré les spectres Raman du silicium en faisant varier la position de l'échantillon par rapport au plan de netteté de l'objectif . Ceci a été obtenu en modifiant la hauteur de la platine porte-échantillon sans modifier l'orientation du silicium par rapport au plan de polarisation du faisceau laser .

Les spectres ont été enregistrés avec et sans diaphragme et les résultats sont reportés sur la figure 83 qui présente les courbes de l'intensité du signal

Raman (hauteur relative de la raie à 520 cm^{-1}) en fonction de la distance d par rapport au plan de netteté où l'intensité du signal est maximale .

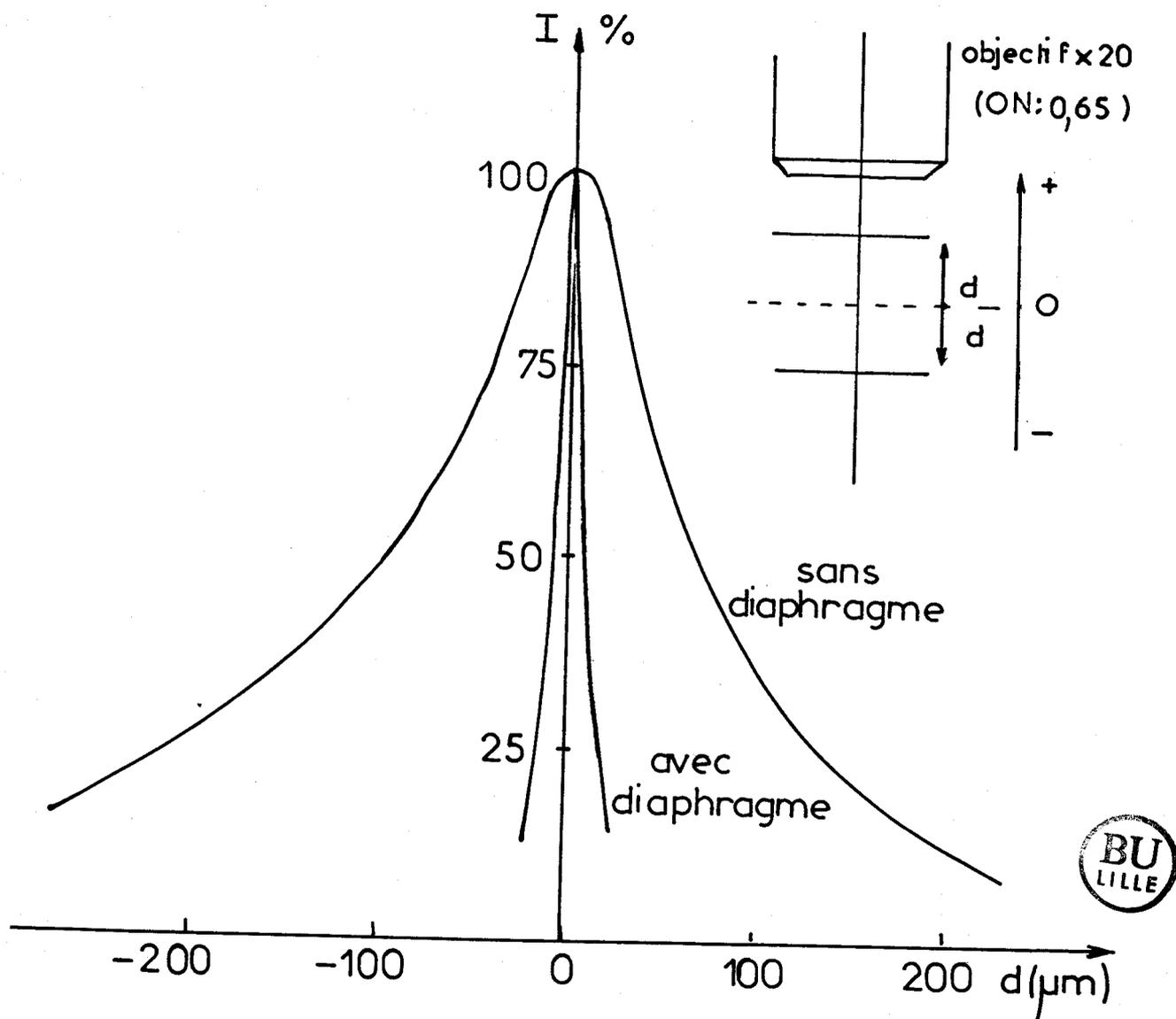


FIG. 83 : Intensité relative de la raie Raman du silicium en fonction de la position de l'échantillon par rapport au plan de netteté de l'objectif

On remarque que les courbes ne sont pas symétriques par rapport à l'axe des intensités relatives ; en effet pour une même distance d de part et d'autre du plan de netteté de l'objectif, le signal Raman est plus faible lorsque l'échantillon est plus éloigné de l'objectif . Ceci s'explique par le fait que l'angle solide de collection de la diffusion Raman diminue lorsque l'on s'éloigne de la lentille frontale de l'objectif (Fig.84) .

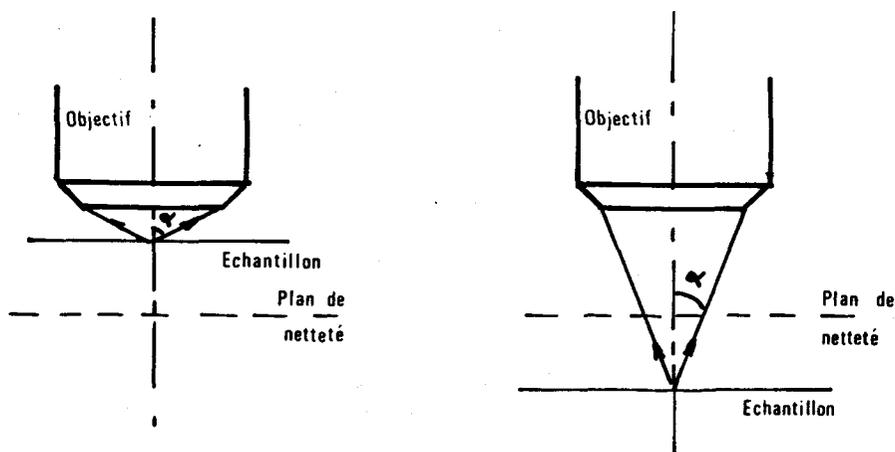


FIG.84 : Influence de la position de l'échantillon par rapport au plan de netteté de l'objectif, sur l'angle de collection

D'autre part, ces courbes montrent que le flux au niveau du détecteur varie très rapidement lorsque l'on s'éloigne du plan de netteté .

En déplaçant la lame de silicium de part et d'autre du plan de netteté de l'objectif, on matérialise la contribution des différentes couches, perpendiculaires au faisceau d'excitation, à l'intérieur d'un échantillon transparent hypothétique.

La figure 85 représente la contribution de chaque couche analysée au flux total collecté pour l'échantillon hypothétique, ceci avec et sans diaphragme en fonction de l'épaisseur de la couche . Ces résultats ont été obtenus par intégration

des courbes de la figure 83 entre deux bornes symétriques du plan de netteté représentant les extrémités de la couche analysée .

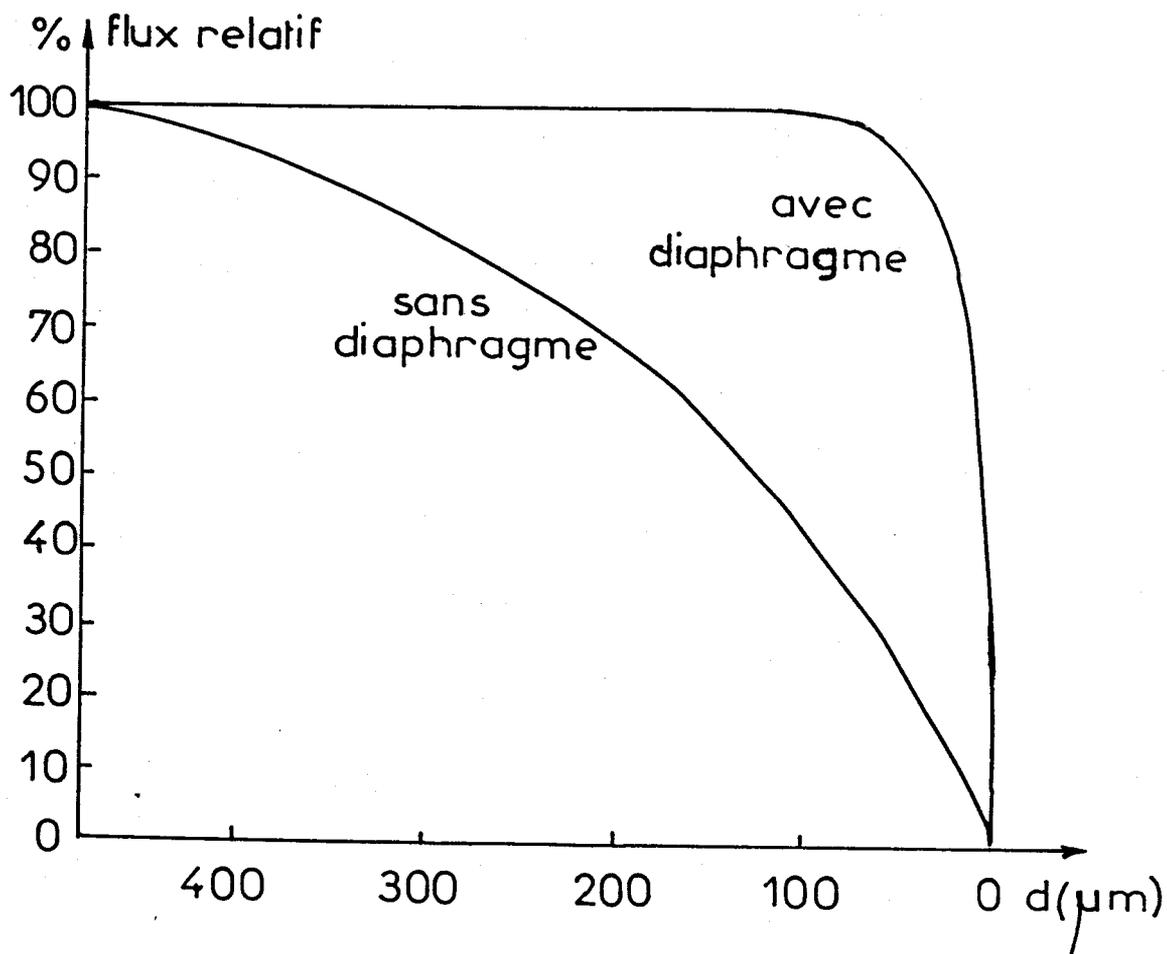


FIG.85 : Variation du flux en fonction de l'épaisseur de la couche de matériau analysé, centrée sur le plan de netteté de l'objectif



Si on estime que la profondeur de champ correspond à l'épaisseur de la tranche de matériau qui fournit 90 % du signal collecté, on obtient les valeurs suivantes :

- * profondeur de champ avec diaphragme : 32 μm
- * profondeur de champ sans diaphragme : 360 μm

Il existe ainsi un facteur 11 entre les profondeurs de champ, lorsque l'on effectue la mesure avec ou sans diaphragme .

IV.4.2. Influence du diaphragme sur la profondeur de champ

La différence de volume analysé n'intervient pas lorsque l'on étudie un échantillon opaque pour lequel la pénétration du faisceau laser d'excitation est faible . C'est le cas du silicium (Fig.86) pour lequel l'image de la zone éclairée n'est pas limitée par le diaphragme, et seule la surface de la lame de silicium intervient .

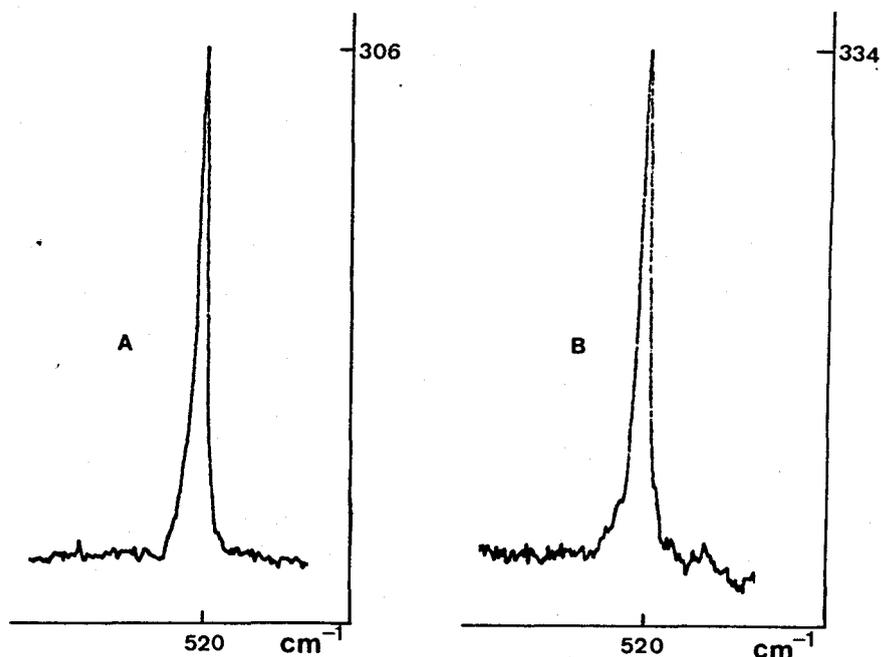


FIG.86 : Spectres Raman du silicium (temps d'intégration : 1 s,
 puissance laser : 0,9 mW ; objectif : 20 X)
 A) avec diaphragme B) sans diaphragme

Par contre, dans le cas de matériaux transparents, la présence du diaphragme réduit considérablement la profondeur de champ vue par l'appareil et entraîne une perte importante de signal. Un exemple est donné par les spectres du tétrachlorure de carbone représentés sur la figure 87. Les spectres obtenus avec et sans diaphragme montrent une différence d'intensité non négligeable.

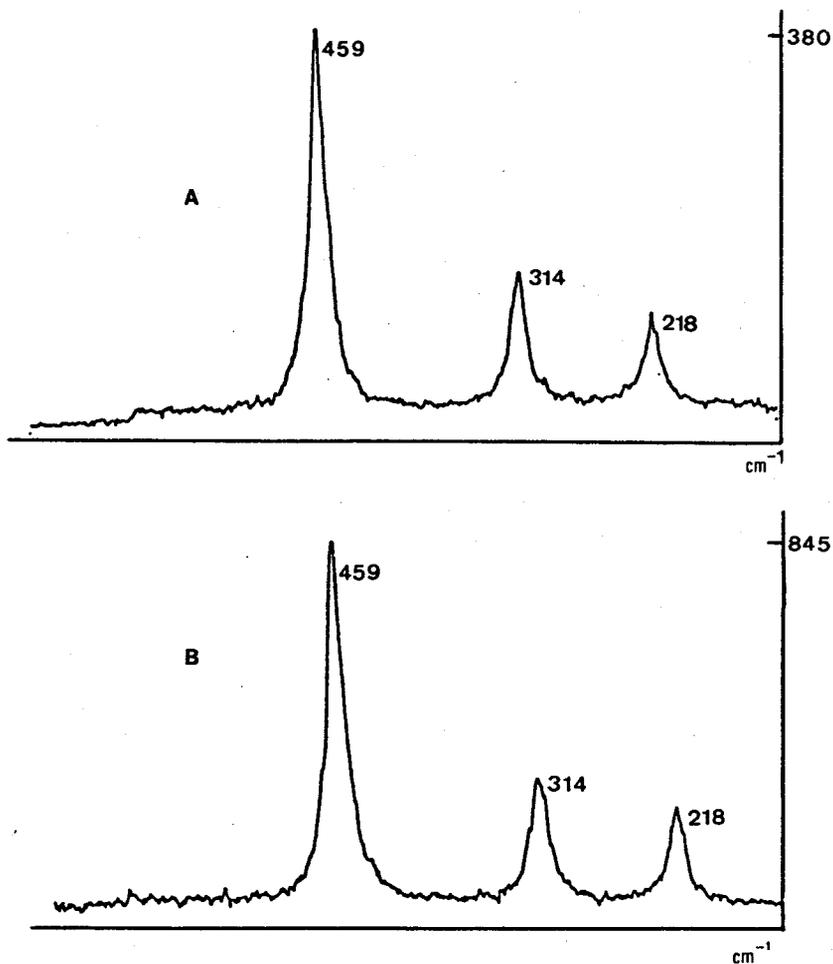


FIG.87 : Spectres Raman de CCl_4 (puissance laser : 0,7 mW ;
objectif : 20 X)

A) avec diaphragme, temps d'intégration : 4s

B) sans diaphragme, temps d'intégration : 1s



Il n'est cependant pas envisageable de supprimer le diaphragme . En effet, celui-ci trouve tout son intérêt lors de l'étude d'échantillons hétérogènes, d'inclusions ou de cellules biologiques par exemple . Il permet une discrimination spatiale aussi bien pour l'analyse d'une surface, que pour l'analyse en volume (Figure 88). On analyse alors uniquement la zone souhaitée de l'échantillon , le fond de lumière parasite de la matrice étant éliminé .

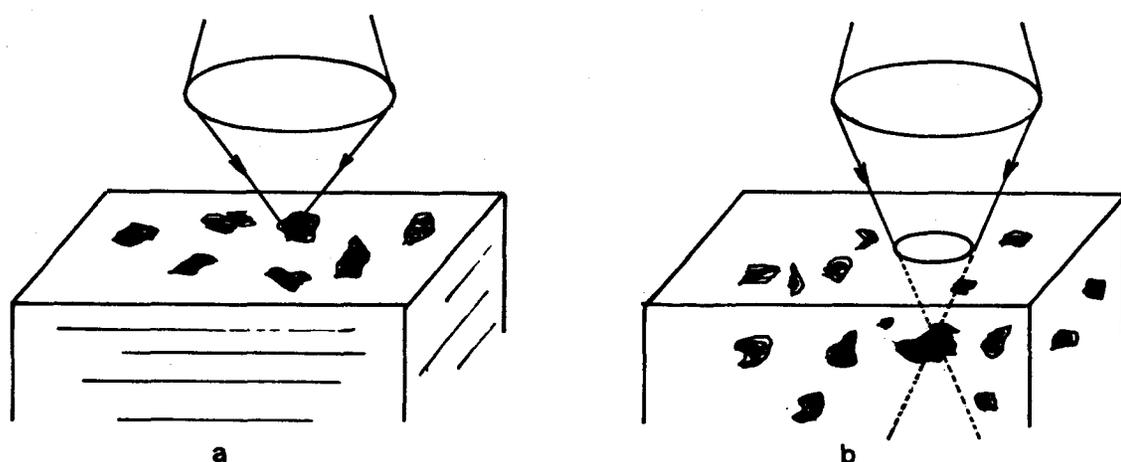


FIG.88 : Analyse en surface (a) ou en volume (b) rendue possible par la présence du diaphragme de champ

Une solution permettant d'éviter une perte de signal lors de l'étude d'échantillons homogènes consisterait à concevoir un diaphragme réglable en ouverture. On utiliserait alors l'ouverture minimale pour l'étude d'échantillons hétérogènes, de manière à limiter volontairement le volume analysé, et une ouverture plus importante dans le cas d'échantillons homogènes, afin d'avoir une grande profondeur de champ .

IV.5.- COMPARAISON DE L'EXCITATION LASER AVEC L'EXCITATION PHOTONIQUE PAR ARC

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous avons cité les différents avantages qu'apporte l'excitation laser par rapport à l'excitation par arc au mercure ou au xénon . D'autre part dans le paragraphe IV.3.3., nous avons comparé le spectre Raman de l'eau obtenu au moyen d'un spectrofluorimètre classique à excitation par arc au xénon, avec celui obtenu avec le microspectrofluorimètre équipé d'une excitation laser, et avons noté que la puissance d'excitation fournie par le faisceau laser est supérieure à celle obtenue avec une source lumineuse classique .

Nous allons essayer maintenant, de comparer quantitativement ces deux sources d'excitation dans le cas d'une illumination d'un échantillon sous microscope.

IV.5.1. Eclairage global du champ microscopique

Kaufman et al. [36] ont effectué des mesures de densité de puissance au niveau de la préparation lors de l'excitation par différentes sources lumineuses

- * Arc au xénon d'une puissance électrique de 150 W
- * Laser argon ionisé
- * Laser hélium-cadmium

et en illuminant le champ total du microscope (220 μm)

Source	Puissance	Densité de puissance à l'échantillon
Arc xénon		2,4 W/cm ²
Laser Ar ⁺	200 mW	500 W/cm ²
Laser He-Cd	32 mW	80 W/cm ²

TABEAU 6 : Densité de puissance mesurée lors de l'illumination complète du champ microscopique par différentes sources

Les résultats de leurs mesures figurent dans le tableau 6 et font apparaître un facteur 210 entre une illumination par faisceau laser à argon ionisé et une illumination par arc au xénon, et un facteur 34 lors de l'excitation par laser hélium-cadmium.

IV.5.2. Eclairement ponctuel du champ microscopique

Dans la configuration optique du microspectrofluorimètre, le faisceau laser n'est pas focalisé sur l'ensemble du champ microscopique, mais sur une tache de faible diamètre, limité par les phénomènes de diffraction.

Nous avons calculé quelle serait la puissance si l'on focalisait l'image d'un arc au xénon d'une puissance électrique de 150 W au niveau de la préparation.

Nous avons considéré le schéma optique représenté sur la figure 89.

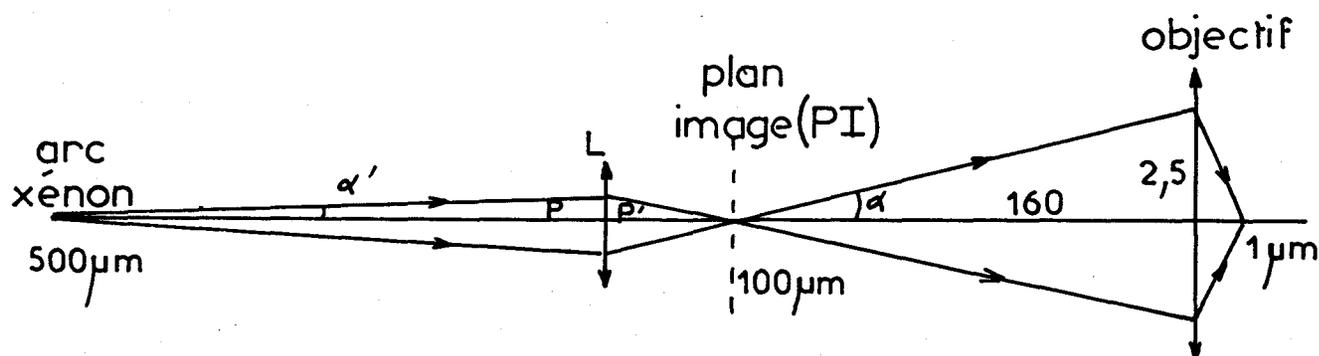


FIG.89 : Schéma optique hypothétique de la focalisation de l'image d'une source au xénon, au niveau de la préparation

L'utilisation d'un objectif de grossissement 100 X conduit à l'obtention d'une tache de focalisation d'un diamètre voisin de $1\ \mu\text{m}$, soit dans le plan image de l'objectif à une tache de $100\ \mu\text{m}$. En considérant les dimensions du cratère de l'arc au xénon ($500\ \mu\text{m} \times 2\ \text{mm}$) il est nécessaire d'avoir un grossissement

de 5 entre l'image de l'arc dans le plan P.I. et la source . On ne considère alors qu'une surface circulaire de l'arc, d'un diamètre de $500 \mu\text{m}$. La lentille en quartz L doit avoir une ouverture adéquate pour permettre aux faisceaux lumineux issus de l'arc au xénon de couvrir totalement la pupille de sortie de l'objectif (5mm).

On obtient les relations suivantes :

$$P = 5 P' \quad (61)$$

$$\text{et } \text{tg } \alpha = 5. \text{tg } \alpha' \quad (62)$$

En admettant une distance image-objectif typique de 160 mm, il est possible de calculer α , et donc α'

$$\alpha' = 0,179^\circ$$

D'où un angle solide de collection très faible, égal à :

$$\Omega = 2\pi(1 - \cos 0,179) = 3,06 \cdot 10^{-5} \text{ stéradian} \quad (63)$$

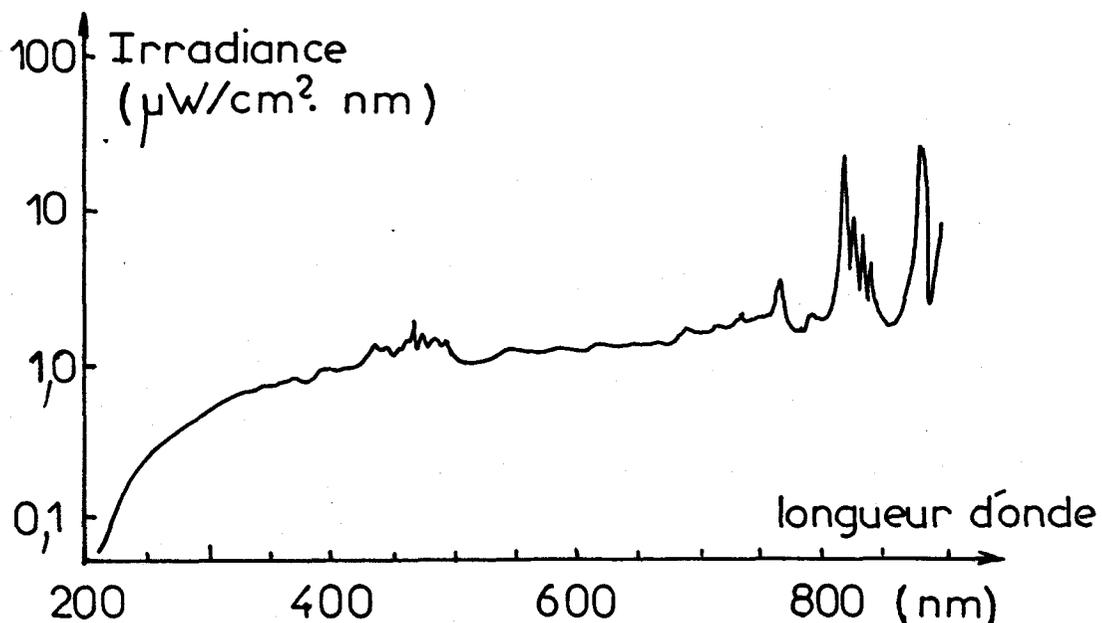


FIG.90 : Irradiance d'un arc au xénon (à 50 cm de la source)
en fonction de la longueur d'onde

L'arc au xénon émet, dans le domaine du visible, un fond continu d'une irradiance de l'ordre de $1 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \cdot \text{nm}$ à 50 cm de distance de la source (Fig.90); il est ainsi possible, connaissant l'angle α' , de calculer la surface de base du cône de lumière issue de la source, à une distance de 50 cm et de déduire la puissance lumineuse collectée. On trouve : $0,1 \mu\text{W}/\text{nm}$

Si l'on considère que l'on utilise un monochromateur d'excitation ayant une bande passante de 1 nm, et en négligeant les pertes de flux dues à celui-ci; l'intensité de l'arc au xénon focalisé en un point du champ microscopique sera de $0,1 \mu\text{W}$, ce qui correspond en densité de puissance à une valeur de $14 \text{ W}/\text{cm}^2$. Cette valeur est 10^2 à 10^4 fois plus faible que la puissance généralement utilisée sous microscope avec les lasers (quelques dizaines à quelques centaines de μW).

Théoriquement, pour que la comparaison soit correcte, il faudrait ramener la largeur spectrale d'excitation à la largeur spectrale d'émission d'un laser, qui est voisine de $5 \cdot 10^{-3} \text{ nm}$. En admettant qu'il soit possible d'atteindre cette valeur, en ayant un monochromateur d'excitation suffisamment dispersif, on obtient une puissance lumineuse de $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{W}$ (densité de $7 \cdot 10^{-2} \text{ W}/\text{cm}^2$), valeur tout à fait dérisoire comparée à celle de l'excitation laser (facteur 10^4 à 10^6).

D'une manière générale, on peut donc dire que l'utilisation récente en fluorescence, d'un laser comme source d'excitation sous microscope, constitue un avantage indéniable. Il permet d'atteindre des densités de puissance importantes au niveau de l'échantillon, tout en étant réglable à volonté.

Les différents tests que nous avons présentés dans ce chapitre montrent que les objectifs fixés lors de l'élaboration du cahier des charges sont atteints.

En effet, l'appareil possède une sensibilité élevée qui permet d'étudier des espèces moléculaires à faible concentration, (nous avons enregistré le spectre de la rhodamine à une concentration de 10^{-10} molaire), mais aussi des espèces de concentration plus élevée, mais fragiles, en limitant la puissance d'excitation. Les spectres enregistrés en spectrométrie Raman montrent que l'instrument présente un faible taux de lumière parasite, ce qui permet d'observer le domaine des basses fréquences .

La profondeur de champ d'analyse étant limitée par le diaphragme, il sera possible d'étudier des inclusions, ou encore des échantillons hétérogènes .

Des essais plus approfondis, dans les différents domaines d'application de la microspectrofluorimétrie sont en cours, ils ne figurent pas dans ce mémoire, mais feront l'objet d'une thèse qui sera soutenue prochainement par B.LENAIN.

CONCLUSION

Dans le cadre du Groupement d'Intérêt Public "Instrumentation et Spectrométrie", nous avons conçu et réalisé un prototype de microspectromètre susceptible de fournir en un temps court, et avec une sensibilité élevée, le spectre de fluorescence ou le spectre Raman d'un très faible volume de matière, placée sous microscope .

Afin de répondre aux besoins dans le domaine biologique, le microspectrofluorimètre a été équipé d'une source d'excitation laser émettant dans le proche ultra-violet .

Le système dispersif de l'instrument est constitué d'un triple monochromateur équipé d'une détection multicanale .

Sur le plan instrumental, la grande originalité de l'appareil réside en deux points :

* La possibilité d'obtenir deux dispersions différentes, l'une pour observer l'émission de fluorescence sur un large domaine spectral, l'autre pour l'étude de la diffusion Raman . Les disperseurs (prismes et réseaux) sont, pour cela, fixés du même côté d'un arbre unique ; le passage d'une dispersion à l'autre se faisant par simple translation de cet arbre .

* L'optique de couplage entre le microscope et le spectromètre qui comporte uniquement des miroirs, permet de travailler simultanément dans les domaines

du proche ultra-violet et du visible .

Les différents tests d'évaluation du microspectrofluorimètre montrent qu'il possède une très bonne sensibilité, et présente un taux de lumière parasite très faible, permettant l'étude du domaine des basses fréquences en spectrométrie Raman .

Dans un article de 1985 [75] , concernant les méthodes éventuelles de couplage de différentes techniques analytiques, T.HIRSCHFELD envisageait la possibilité d'étudier l'émission de fluorescence ainsi que la diffusion Raman au moyen d'un seul appareil, mais précisait que celui-ci n'existait pas encore . Aujourd'hui, une étape a été franchie vers cette voie .

Toutefois, si l'appareil réalisé possède les caractéristiques d'un appareil commercial, il ne s'agit que d'un prototype qui a permis le choix de solutions technologiques (dispositif de positionnement des disperseurs, couplage optique à miroirs...).

Le faisceau laser d'excitation est actuellement focalisé au centre du champ objet du microscope, mais pourra dans un proche avenir être focalisé en tout point de ce champ sans déplacement de l'objet ; et permettra ainsi d'obtenir une analyse spatiale de l'échantillon .

Il est également envisageable d'équiper l'appareil, non plus de trois réseaux et de trois prismes, mais de deux ensembles de trois prismes différents . Cette version permettrait alors, l'obtention d'un spectre d'émission de fluorescence soit dans le domaine du visible, soit dans celui du proche ultra-violet . Il serait, aussi, possible de munir le système dispersif de deux jeux de réseaux comportant un nombre de traits différent, ce qui permettrait d'accéder à une moyenne et à une haute résolution, en spectrométrie Raman .

BIBLIOGRAPHIE

1. - G.K. TURNER
Science, Vol. 146, 183 (1964).
2. - J.M. SALMON
Thèse, Perpignan (1980).
3. - D.A. WALKER
Sci. Instrum., Vol. 20, 217 (1987).
4. - G.M. HEIFTJE, G.R. HAUGEN
Anal. Chem. Vol. 53, N° 6, 755 (1981).
5. - V.J. KOESTER, R.M. DOWBEN
Rev. Sci. Instrum., Vol. 49, N°8, 1186 (1978).
6. - U.P. WILD, A.R. HOLZWARTH, MP. GOOD
Rev. Sci. Instrum., Vol. 48, N° 12, 1621 (1977).
7. - T. IWADA, T. UCHIDA, S. MINAMI
Appl. Spectr. Vol. 39, N° 1, 101 (1985).
8. - H.P. HAAR, M. HAUSER
Rev. Sci. Instrum., Vol. 49, N° 5, 632 (1978).
9. - J.M. HARRIS, F.E. LYTLE
Rev. Sci. Instrum., Vol. 48, N° 11, 1469 (1977).
- 10 - M. BRIDOUX, M. DELHAYE
Bull. Soc. Chim., 10, 813 (1963).

- 11 - M. BRIDOUX
Thèse, Lille (1966).
- 12 - M. BRIDOUX, M. DELHAYE
Nouv. Rev. d'Optique Appliquée, 1, 23-24, (1970).
- 13 - M. DELHAYE, M. BRIDOUX, F. WALLART
J. of Molecular Structure, 79, 51-66 (1982).
- 14 - R.L. BOWMAN, P.A. CAULFIELD, S. UDENFRIEND
Science, Vol. 122, 32 (1955).
- 15 - V. DINH TUAN, U.P. WILD
Applied Optics, Vol. 12, N° 6, 1286 (1973).
- 16 - V. DINH TUAN, U.P. WILD
Applied Optics, Vol. 13, N° 12, 2899 (1974).
- 17 - G.R. HAUGEN, B.A. RABY, L.P. RIGDON
Chem. Instrum., Vol. 6, N° 3, 205 (1975).
- 18 - D.M. JAMESON, R.D. SPENCER, G. WEBER
Rev. Sci. Instrum., Vol. 47, N° 9, 1034 (1976).
- 19 - I.M. WARNER, J.B. CALLIS, E.R. DAVIDSON, M. GOUTERMAN,
G.D. CHRISTIAN
Anal. Lett., Vol. 8, N° 9, 665 (1975).
- 20 - D.W. JOHNSON, J.B. CALLIS, G.D. CHRISTIAN
Anal. Chem., Vol. 49, N° 8, 747 A (1977).
- 21 - D.W. JOHNSON, J.A. GLADDEN, J.B. CALLIS, G.D. CHRISTIAN
Rev. Sci. Instrum., Vol. 50 N° 1, 118 (1979).
- 22 - J.F. HOLLAND, R.E. TEETS, A. TIMNICK
Anal. Chem., Vol. 45, N° 1, 145 (1973).

- 23 - E.H. RATZLAFF, R.G. HARFMANN, S.R. CROUCH
Anal. Chem., Vol. 56, 342 (1984).
- 24 - R.E. ANACREON, Y. OHNISHI
Applied Optics, Vol. 14, N° 12, 2921 (1975).
- 25 - J. GUERIN, A. SEGUI
Spectra 2000, N° 61, 37 (1980).
- 26 - R.A. OLSON
Rev. Sci. Instrum., Vol. 31, N° 8, 844 (1960).
- 27 - S.S. WEST, C.N. LOESER, M.D. SCHOENBERG
I.R.E. Trans. on Med. Elect., Vol. 7, 138 (1960).
- 28 - E. KOHEN, C. KOHEN, B. THORELL
Biochim. Biophys. Acta, 286, 189 (1972).
- 29 - E. KOHEN, B. THORELL, C. KOHEN, J.M. SALMON
Tech. of Biochem. and Biophys. Morphology, Vol. 2, 157.
- 30 - J.M. SALMON, J. VIGO, P. VIALLET
Innov. Tech. Biol. Med., Vol. 2, N° 6, 679 (1981).
- 31 - J.M. SALMON, P. VIALLET
Spectra 2000, N° 73, 21 (1982).
- 32 - J.M. ALLEGRE, J.M. SALMON, J. COMMALONGA, M. SAVELLI, P. VIALLET
Innov. Tech. Biol. Med., Vol. 6, N° 6, 743 (1985).
- 33 - F. DOCHIO, R. RAMPONI, C.A. SACCHI, G. BOTTIROLI, I. FREITAS
J. of Microscopy, Vol. 134, 151 (1984).
- 34 - F. VAN GEEL, B.W. SMITH, B. NICOLAISSEN, J.D. WINEFORDNER
J. of Microscopy, Vol. 133, 141 (1984).

- 35 - J.C. MURRAY, R.B. CUNDALL, C.G. MORGAN, G.B. EVANS, C. LEWIS
Sci. Instrum., 19, 349 (1986).
- 36 - KAUFMAN, NESTER, WASSERMAN
J. of Mistochem, Cytochem, Vol. 19, N° 8, 469 (1971).
- 37 - B. LENAIN
DEA, Lille (1985).
- 38 - M. DELHAYE, P. DHAMELINCOURT, J.C. MERLIN, B. LENAIN, L. BOUSSEKEY,
F. DELPLACE-DELHAYE, J. MONTREUIL
*Proceeding of the First European Conference on the Spectroscopy of Biological
Molecules (John Wiley and Sons) 51* (1985).
- 39 - M. DELHAYE, P. DHAMELINCOURT
J. Raman Spectrosc., Vol. 3, 33 (1975).
- 40 - P. DHAMELINCOURT
Thèse, Lille (1979).
- 41 - J.C. MERLIN
Spectros, Int. J., 2, 52 (1983).
- 42 - M. DELHAYE
Spectrosc. Biol. Mol.,
Ed. Sandorfy and Theophanides, Vol. 139, 587 (1984).
- 43 - J. BARBILLAT
Thèse, Lille (1983).
- 44 - P. DHAMELINCOURT, M. DELHAYE, J. BARBILLAT, L. BOUSSEKEY,
E. DA SILVA, B. ROUSSEL
Spectroscopy of biological Molecules (Reims),
Ed. AJ. ALIX, L. BERNARD, M. MANFAIF (1985).

- 45 - Documentation technique : "Multichannel Spectroscopy"
Société DILOR.
- 46 - M. DELHAYE, P. DHAMELINCOURT, J.C. MERLIN, B. LENAIN, L. BOUSSEKEY
Spectroscopy of biological Molecules (Reims),
Ed. AJP. ALIX, L. BERNARD, M. MANFAIT, J. WILEY, 51 (1985).
- 47 - J.C. MERLIN, M. DELHAYE
Laser scattering spectroscopy of biological objects (Pragues),
Ed. J. STEPANEK, P. ANZENBACHER, B. SEDLACEK, 49 (1986).
- 48 - C. BREMARD, P. DHAMELINCOURT, J. LAUREYNS, J.C. Merlin
Spectroscopy of biological Molecules (Reims),
Ed. AJP. ALIX, L. BERNARD, M. MANFAIT, J. WILEY, 48 (1985).
- 49 - P. DHAMELINCOURT, M. DELHAYE, E. DA. SILVA, J.P. CORNARD, B. LENAIN
International Conference on Raman Spectroscopy, (Eugène U.S.A.)
Ed. W. PETICOLAS, B. HUDSON, 20, 29 (1986).
- 50 - J. BARBILLAT, P. DHAMELINCOURT, J.P. CORNARD, B. LENAIN,
Microbeam Analysis (Honolulu),
Ed. R.H.GEISS San Francisco Press, 210 (1987).
- 51 - M. SERGENT, ROZEY
Rev. Opt., 44, 193 (1965).
- 52 - M. CZERNY, AF. TURNER
Z. Physik. 61, 792 (1930).
- 53 - R. DEMOL
D.E.S. (1974).

- 54 - I. H. MALITSON
J. Opt. Soc. Amer. 55, 10 (1965).
- 55 - M. DELHAYE, M. BRIDOUX, E. DA. SILVA
Spectra 2000, N° 77 Vol. 10, 30 (1982).
- 56 - *Acta Electronica* 14, 1 et 2 (1973).
- 57 - I. CSORBA
Applied Optics, Vol. 18, N° 14 (1979).
- 58 - *Documentation R.T.C.*, TP 6.
- 59 - Y. TALMI, R.W. SIMPSON
Applied Optics, Vol. 19, N° 9 (1980).
- 60 - *Notice technique Reticon*.
- 61 - I. COX
Journal of microscopy, Vol. 133, Pt 2, 149 (1983).
- 62 - I. COX, C. SHEPPARD
Applied Optics, Vol. 22, N° 10, 1474 (1983).
- 63 - Y. ICHIOKA, T. KOBAYASHI, H. KITAGAWA, T. SUZUKI
Applied Optics, Vol. 24, N° 5, 691 (1985).
- 64 - J.D. ZOOK
Applied Optics, Vol. 13, N° 4, 875 (1974).
- 65 - T. SUZUKI, Y. HORIKAWA
Applied Optics, Vol. 25, N° 22, 4115 (1986).



- 66 - K.R. CASTLEMAN
Digital image processing,
Ed. A.V. OPPENHEIM (1979).
- 67 - G. ROBLIN, L. BERNSTEIN, M. PREVOST, G. SLUCKI
J. Optics, Vol. 17, N° 6, (1986).
- 68 - E. MANSEN, R. ALLEN, J. STROHBEHN, M. CHAFFEE, D. FARRINGTON,
W. MURRAY, T. PILLSBURY, M. RILEY
Journal of Microscopy, Vol. 140, 3, 371 (1985).
- 69 - V. WILKE
Scanning, Vol. 7, 88 (1985).
- 70 - P. DAVIDOVITS, M. EGGER
Applied Optics, Vol. 10, N° 7, 1615 (1971).
- 71 - D. HAMILTON, T. WILSON
J. Phys. E 19, 52 (1986).
- 72 - Brevet ANVAR N° 812 332 (1981).
- 73 - P. BOUŠQUET
Spectroscopie instrumentale, Dunod (1969).
- 74 - *Documentation Commerciale : SLM-AMINCO.*
- 75 - T. HIRSCHFELD
Science, Vol. 230, 286 (1985).