ED388 / ESCPI PPMD

Thèse

Doctorat de l'Université Paris VI

Discipline : Physico-Chimie

Suspensions colloïdales concentrées sous contrainte

Instrumentation multispeckle, théorie et expériences

Réalisation d'un microscope confocal rapide

Auteur : **Régis SARCIA**

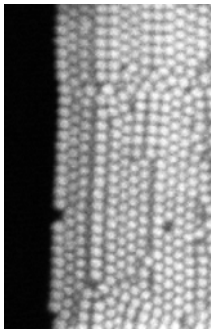
Thèse soutenue le 18 juin 2007

Jury composé de :

Mme	BROCHARD WYART Françoise	
M.	HEBRAUD Pascal	Directeur de thèse
M.	LEVITZ Pierre	Rapporteur
M.	MÜNCH Jean-Pierre	Rapporteur
M.	VAN DAMME Henri	

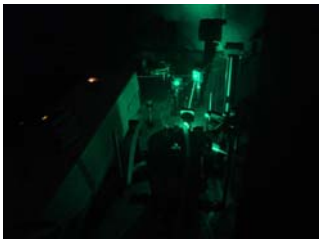
Concentrated colloidal suspensions under stress

Thesis Author: SARCIA Régis
Supervisor: HEBRAUD Pascal

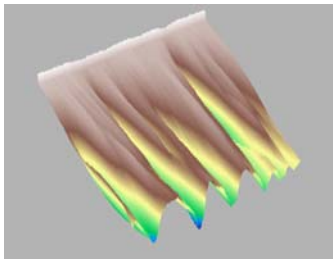


The dynamical response of a **concentrated colloidal suspension** under stress can be extremely non-linear. In this manuscript is described the experimental study of two concentrated suspensions which experience stresses from different origins:

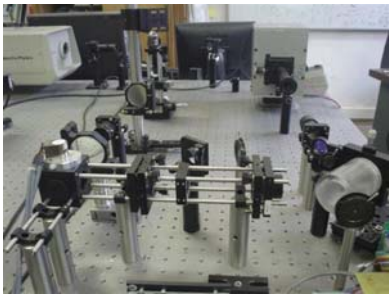
- a mechanical stress: the suspension is forced to flow,
- a stress with chemical origin: interactions between particles are slowly made attractive.



In both cases, the particles movements were monitored via multiple scattering diffusion phenomenon and multispeckle dynamics measurements. A theoretical formulation of multispeckle measures is introduced in the first chapter in order to clarify the differences from simple Diffusing Wave Spectroscopy. Then a new statistical analysis of the observed moments is presented, a method particularly suited to the characterization of the **intermittent dynamics** we observed in both cases. The analysis enabled us to get a better understanding of two very distinct phenomema : the **jamming** phenomena and the **particle gel** formation in concentrated suspensions.



The second part of the manuscript is dedicated to the construction of the **fast confocal microscope** which enabled us to observe directly concentrated colloidal systems, observation at 20 images per second and more.



Contact : **regis.sarcia@gmail.com**

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire de Physicochimie des Polymères et Milieux Disperses à l'ESPCI. Je tiens à remercier en premier lieu Pascal Hébraud, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné la chance de travailler avec lui pendant toutes ces années et fait bénéficier d'excellentes conditions de travail. Merci pour ta confiance et ta patience.

Je remercie le professeur Françoise Brochard-Wyart d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Toute ma reconnaissance va aussi à Pierre Levitz et Jean Pierre Münch qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce mémoire, ainsi qu'à Henri Van Damme qui a accepté d'en être examinateur. Ne serait ce que pour leurs réussites théoriques ou expérimentales j'admire sincèrement chaque membre de mon jury ; l'intérêt et l'enthousiasme qu'ils ont manifesté à propos de mon travail restera une des plus grandes fiertés de ma vie.

Merci à François Lequeux, directeur du laboratoire, et au Professeur Christian Amatore, directeur haut en couleur de mon école doctorale, pour leur soutien.

Même s'il a parfois été nécessaire de les arracher des confortables poignées du baby-foot pour venir travailler, l'encadrement des stagiaires ESPCI (Franceii, Isabelle, Benoit, Vincent) fut très intéressant. Merci à David Lasnes qui a travailé avec nous durant son master et qui m'a souvent ébaudit par son intelligence et sa gentillesse ; tes élèves ont bien de la chance. Travailler avec la très romaine Francesca Ianni a été une aventure réjouissante, même quand la salle d'optique prenait des airs de "guerre des étoiles". Comme David et Francesca, Didier Lootens a joué avec mes montages optiques et m'a introduit à l'étude de systèmes colloïdaux passionnants. Ta vision très positive des choses a failli par deux fois m'amener au Prozac mais c'était quand même très intéressant de travailler avec toi.

Merci à Denis Vallet pour m'avoir autorisé à passer des semaines à usiner dans ses ateliers et introduit au langage mystérieux de la mécanique ; rien de tel qu'une journée de chanfreinage, taraudage, alésage... pour vous relancer dans votre thèse !

La bonne ambiance au PPMD m'a bien aidé à supporter les passages difficiles inhérents à toute thèse. J'ai ainsi passé de grands moments avec le groupe "bourgogne aligoté", un grand merci à son noyau dur : Arnaud, Alex la tyran, Becka, Fanny, Fred, super Lulu, Nico, Régis, Sylvain. La nouvelle génération de doctorants (Francois, Tania, David, Diane, Karine, Mix...) vallait aussi le détour. J'ai partagé de nombreux fou-rire avec les anciens membres du laboratoire de neurophysiologie (Thomas Pons les yeux bleus,

Yann le Biquet, Mohamed la roulette, Laurent le grand et l'inénarrable Carcajou).

Mes parents et ma soeur, par leur soutien inébranlable et leur générosité de coeur sans limites, m'ont permis de faire au mieux dans mes études dont ce doctorat est l'aboutissement. Cette thèse leur est dédiée.

Merci à Géraldine d'avoir été à mes cotés, ton sourire et ton énergie m'ont beaucoup aidés.

Abstract

The dynamical response of a concentrated colloidal suspension under stress can be extremely non-linear. In this manuscript is described the experimental study of two concentrated suspensions which experience stresses from different origins :

- a mechanical stress : the concentrated suspension is forced to flow,
- a stress with chemical origin : interactions between particles are slowly made attractive.

In both cases, the particles movements were monitored via multiple scattering diffusion phenomenon and multispeckle dynamics measurements. A theoretical formulation of multispeckle measures is introduced in the first chapter in order to clarify the differences from simple Diffusion Wave Spectroscopy. Then a new statistical analysis of the observed moments is presented, a method particularly suited to the characterization of the intermittent dynamics we observed in both cases. The analysis enabled us to get a better understanding of two very distinct phenomena : the jamming phenomena and the particle gel formation in concentrated suspensions.

The second part of the manuscript is dedicated to the construction of the fast confocal microscope which enabled us to observe directly concentrated colloidal systems, observation at 20 images per second and more.

Résumé

Lorsqu'une suspension colloïdale concentrée est soumise à une contrainte sa réponse dynamique peut être extrêmement non-linéaire. Nous présentons dans cette thèse une étude expérimentale de deux suspensions concentrées, auxquelles nous appliquons deux contraintes d'origines différentes :

- une contrainte mécanique : on force la suspension concentrée à s'écouler,
- une contrainte d'origine chimique : les interactions entre particules sont progressivement rendues attractives.

Dans les deux cas, nous avons observé les mouvements des particules par diffusion multiple de la lumière multispeckle. Nous présentons aussi un nouveau traitement statistique des moments observés, adaptés à la caractérisation des dynamiques intermittentes qui apparaissent. Une reformulation théorique de la diffusion dynamique multispeckle est de plus proposée au premier chapitre.

La deuxième portion du manuscrit est consacrée à la construction du confocal rapide permettant l'observation directe des systèmes colloïdaux même à de très hautes concentrations, observation jusqu'à des fréquences supérieures à 20 images par seconde.

Keywords

Concentrated suspension / Colloidal suspension / Jamming / Particle gel / Intermittent dynamics / Multiple scattering / Diffusing Wave Spectroscopy / Speckle Visibility Spectroscopy / Multispeckle / Fast confocal microscope

Mot-clefs

Suspension concentrée / Suspension colloïdale / Transition d'encombrement / Jamming / Gel particulaire / Dynamique intermittente / Diffusion multiple / Multispeckle / Microscope confocal rapide

Table des matières

1 Diffusion multiple de la lumière **3**

1.1 Phénomène de diffusion multiple 3

1.1.1 Modélisation des coefficients de transdiffusion et de rétrodiffusion 4

1.2 Figure d'interférence : propriétés spatiales 6

1.2.1 Champ proche 8

1.2.2 Champ lointain 9

1.2.3 Décorrélation spatiale du champ lointain 10

1.3 Figure d'interférence : propriétés dynamiques 13

1.3.1 **M**ulti**S**peckle **D**iffusing **W**ave **S**pectroscopy (MSDWS) 13

1.3.2 Lien entre champ lointain et champ proche 15

1.3.3 Corrélation temporelle du champ. 16

1.3.4 Distribution des longueurs des chemins retrodiffusés . . 19

1.3.5 Corrélation temporelle des chemins 20

1.4 Applications du modèle 23

1.4.1 Agitation brownienne 23

1.4.2 Cisaillement à grandient uniforme 23

1.5 Comparaison MSDWS et DWS 25

1.6 Utilisation d'une caméra en MSDWS 28

1.7 **S**peckle **V**isibility **S**pectroscopy (SVS) 28

1.8 Conclusion 30

2 Transition d'encombrement étudiée par SVS **33**

2.1 Présentation générale du phénomène 33

2.1.1 Suspensions concentrées de silice 34

2.1.2 Rhéologie de la transition d'encombrement 35

2.2 Methode optique adaptée 38

2.2.1 Montage expérimental 39

2.2.2 Dispersion au repos 41

2.2.3 SVS 41

2.2.4 Dispersion sous faible cisaillement 43

2.3 Dispersion sous fort cisaillement 45
2.3.1 Mise en évidence de la transition d'encombrement . . . 46
2.3.2 Relaxation de l'état encombré 46
2.4 Conclusion 47

3 Coagulation de dispersions colloïdales 51
3.1 Coagulation d'une suspension concentrée 52
3.1.1 Dispersions concentrées d'alumine 53
3.1.2 Protocole de stabilisation 53
3.1.3 Protocole de déstabilisation 65
3.2 Etat de l'art 68
3.2.1 Mécanique et microstructure 68
3.2.2 Formation de la microstructure 69
3.3 Etude multispeckle de la coagulation 69
3.3.1 Méthode optique adaptée 71
3.3.2 Disparition des modes dynamiques individuels 73
3.3.3 Apparition d'intermittences étudiées par MSDWS . . . 79
3.4 Conclusions 88

4 Principes de microscopie confocale 95
4.1 Microcopie à large champ en transmission 96
4.2 Microscopie large champ en épi-illumination 100
4.3 Microscopie épi-fluorescente à large champ 102
4.4 Microscopie confocale 105
4.4.1 balayage de l'échantillon 109
4.5 Conclusion 111

5 Modélisation du microscope confocal 115
5.1 Modélisation de l'excitation 115
5.2 Modélisation de la détection 123
5.3 Fonction de détection du microscope 129
5.4 Déformation des images 136
5.5 Conclusion 138

6 Réalisation du microscope 143
6.1 Montage optique 144
6.1.1 Choix et disposition des éléments optiques dans le microscope 145
6.1.2 Choix et disposition des éléments optiques dans le microscope 149
6.2 Protocole de réglage 150

6.2.1 Réglage de la confocalité 150
6.2.2 Réglage des télescopes 154
6.2.3 Photographies du montage réel 155
6.3 Montage électronique et acquisition numérique 157
6.3.1 Synchronisation de la rotation des miroirs galvanométriques 157
6.3.2 Détection et acquisition synchronisée avec le balayage de l'échantillon 162
6.3.3 Interface informatique 170
6.4 Premières images obtenues avec le microscope confocal réalisé 172
6.4.1 Images d'une suspension colloïdale séchée 172
6.4.2 Séquences d'images avec translation axiale 174
6.5 Conclusion 177

Introduction

Nous proposons dans cette thèse plusieurs études de dynamique de suspensions colloïdales concentrées sous contrainte. Nous nous sommes intéressés à deux systèmes différents. Le premier système sous contrainte est une suspension de particules de silice sous fort taux de cisaillement. Il avait déjà été observé que ces particules s'auto-organisaient de façon à bloquer l'écoulement. L'idée de l'étude était d'observer en particulier la relaxation des structures formées sous écoulement lors de l'arrêt de l'application de la contrainte. Le deuxième système est une suspension colloïdale de particules d'alumine qui est lentement déstabilisée par écrantage des répulsions électrostatiques entre les particules, on passe d'une solution liquide à un solide élastique ; les contraintes sont ici internes au système.

Dans les deux problématiques nous avons cherché à mesurer les déplacements des particules en suspension. Les systèmes étudiés ont la propriété d'être très turbides. Nous avons utilisé la diffusion multiple de la lumière pour suivre le mouvement des particules en suspension. Les dynamiques à observer sont *a priori* non-stationnaires aussi bien dans la coagulation que dans le blocage sous fort cisaillement d'une suspension colloïdale concentrée. Dans de telles conditions seules des techniques de diffusion multiple dites multispeckle permettent d'observer indirectement la dynamique des particules en suspension. Les principes permettant d'appréhender les deux techniques multispeckle intitulées "**M**ultispeckle **D**iffusing **W**ave **S**pectroscopy" (MSDWS) et "**S**peckle **V**isibility **S**pectroscopy" (SVS) sont développés dans le chapitre 1 du manuscrit.

La technique SVS étudie le contraste de la figure d'interférence crée par diffusion multiple. Cette technique permet de mesurer la dynamique des particules de la suspension sur des distances bien inférieures à leur rayon en analysant une seule image de la figure d'interférence. Nous sommes parvenus à mesurer la dynamique des particules en suspension plusieurs fois par seconde. Nous avons donc réalisé un montage adapté à l'étude de la relaxation des structures formées par fort cisaillement des suspensions concentrées de silice. Cette étude est présentée dans le chapitre 2.

La technique MSDWS étudie l'évolution de la figure d'interférence créée par diffusion multiple, elle permet d'observer des dynamiques sur une très grande gamme temporelle. La présence d'intermittences dans le déplacement des particules nous a amené à développer une nouvelle méthode d'analyse des mesures obtenues par MSDWS. Cette méthode adaptée à l'étude de nos systèmes est présentée dans le chapitre 3 ; elle nous a permis d'analyser des dynamiques intermittentes et de décrire la coagulation d'une suspension concentrée.

Aucune des techniques de diffusion multiple n'est une observation de nos systèmes dans l'espace direct. Même si elles nous permettent de mesurer des mouvements extrêmements faibles sur une très large gamme dynamique, les informations spatiales ne sont pas accesssibles. Aussi nous avons été amenés à construire un microscope adapté à la dynamique rapide de nos échantillons et à leur concentration. Nous présentons la construction de ce microscope confocal rapide dans les trois derniers chapitres de ce manuscrit.

Chapitre 1

Diffusion multiple de la lumière

1.1 Phénomène de diffusion multiple

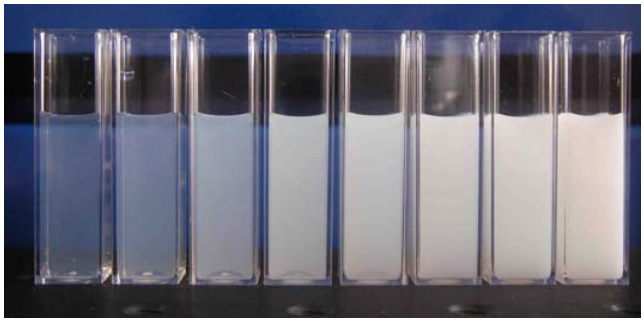


FIG. 1.1 – Diffusion multiple dans des suspensions aqueuses de latex. Chaque cellule contient une suspension deux fois plus concentrée que sa voisine de gauche

Les quatre cellules présentées dans la photographie (Fig. 1.1) sont remplies de dispersions colloïdales à des concentrations croissantes. La **turbidité** croît avec la concentration de particules en suspension. L'origine microscopique de ce phénomène est la diffusion de la lumière par les particules de la suspension [7].

On note (θ, ϕ) les angles distinguant la direction d'observation relativement à la direction d'illumination, et on appelle $I(\theta, \phi)$ l'intensité diffusée par une particule dans la direction d'observation. Dans le cas de particules sphériques $I(\theta, \phi)$ est une fonction qui ne dépend que de l'angle relatif entre le vecteur d'onde incident et le vecteur d'onde diffusé θ, les modèles de Rayleigh et de Mie permettent d'estimer ces grandeurs [13].

Pour un photon[1] pénétrant dans la suspension, la probabilité de parcourir une distance d sans être diffusé suit la loi de Lorentz $\frac{1}{l}\exp[-\frac{d}{l}]$, où l est la distance moyenne entre deux diffusions. Quand l'épaisseur L de la cellule est telle que $L \gg l$, la plupart des photons incidents sont diffusés un grand nombre de fois avant de s'échapper de l'échantillon. Ce phénomène de **diffusion multiple** est extrêmement complexe au niveau microscopique ; en effet, lors de chaque collision, le photon est diffusé d'un angle θ avec une probabilité proportionnelle à $I(\theta)$: le trajet d'un photon dans l'échantillon est par conséquent aléatoire.

Malgré la complexité microscopique de la diffusion multiple, il apparaîtra dans les sections suivantes que les grandeurs macroscopiques mesurables peuvent être modélisées avec peu de paramètres. Ainsi la fraction $T_D(L)$ de photons transmis par diffusion évolue en L^{-1} pour une cellule d'épaisseur L [2]. Dans la section suivante, nous allons présenter un modèle prédisant cette évolution. Ce modèle simple nous permet d'introduire les concepts de marche aléatoire de photons et les méthodes analytiques sur lesquelles nous nous baserons pour cerner ce qui se cache sous nos mesures de MSDWS.

1.1.1 Modélisation des coefficients de transdiffusion et de rétrodiffusion

L'évolution de la fraction de photons transmis est modélisée avec succès en considérant que le chemin suivi par chaque photon diffusé suit une **marche aléatoire** dans l'échantillon (Fig.1.2). Le pas de cette marche aléatoire n'est pas la distance moyenne entre deux diffusions, l, mais **la longueur de persistance** de l'information angulaire sur un trajet de diffusion multiple, notée l^* [10, 15]. Cette distance est définie par :

$$l^* = l * \frac{\int I(\theta)d\theta}{\int I(\theta)(1-\cos(\theta))d\theta} \tag{1.1}$$

Grâce à ces marches aléatoires, il est possible de prévoir la fraction $T_D(L)$ de photons transmis par diffusion avec une cellule d'épaisseur L. Il

[1]Dans la suite de cette thèse nous allons souvent parler de photons diffusés. Ces êtres étranges qui sembleront rebondir de diffuseur en diffuseur ne s'inquiètent pas de la dualité onde-corpuscule, des couplages quantiques onde-matière, ni de notion d'indiscernabilité. Bien que ces photons "bondissants" paraissent irréalistes, ils engendrent des images mentales de la diffusion multiple particulièrement fécondes. Nous verrons dans ce chapitre comment cette image de photon "bondissant" a permis dans la fin des années 1980 de construire un modèle de la diffusion multiple basé sur des raisonnements probabilistes [10]. Depuis, ce modèle a été vérifié expérimentalement de nombreuses fois.

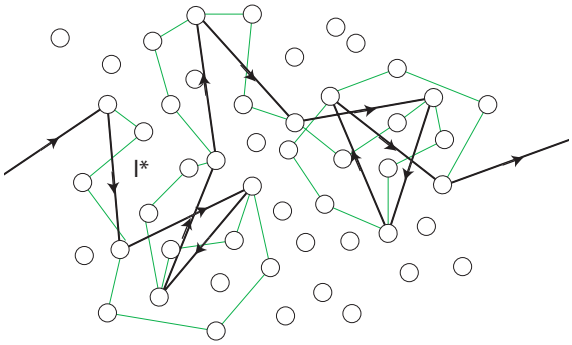


FIG. 1.2 – Schéma d'un chemin de diffusion (en vert) et de la marche aléatoire de pas l^* équivallente (en noir).

suffit de construire un grand nombre N de chemins aléatoires de pas l* et de compter le nombre N_T de chemins qui s'échappent de la cellule après l'avoir traversée[2], le rapport $\frac{N_T}{N}$ fournit alors une évaluation numérique de $T_D(L)$ [2].

Il existe un équivalent analytique à ces simulations : dans ce modèle continu, c'est la densité volumique de photons $\rho(r,t)$ qui est évaluée. Puisque les photons suivent une marche aléatoire de pas l^*, on suppose que la densité volumique de photons vérifie l'équation de la chaleur suivante :

$$D_p \, \triangle\rho(r,t) - \frac{\partial\rho}{\partial t}(r,t) = 0 \tag{1.2}$$

Où $D_p = v_c l^*$ est le coefficient de diffusion associé à la marche aléatoire des photons et où v_c est la vitesse de la lumière dans le milieu.

Pour une cellule aux dimensions latérales (selon y et z) très grandes devant son épaisseur L, le problème se ramène aux conditions aux limites et à l'équation différentielle à une dimension suivantes :

$$D_p \, \frac{\partial^2\rho}{\partial x^2}(x,t) - \frac{\partial\rho}{\partial t}(x,t) = 0 \tag{1.3}$$

$$\rho(0,t) = \rho(0,L) = 0 \tag{1.4}$$

Si on suppose l'existence d'un terme source $\rho(l^*)$ à la distance l^* de la

[2]Le point de départ de chaque chemin est à une distance z_0 de la paroi. Cette distance est une variable aléatoire dont la densité de probabilité est donnée par $P(z_0) = \frac{1}{l^*} \exp[-\frac{z_0}{l^*}]$. Les points suivants du chemin sont obtenus par marche aléatoire de pas l* jusqu'à ce que le chemin sorte de la cellule

paroi B, la solution du régime permanent est particulièrement simple :

$$\rho(x) = \frac{x}{l^*}\ \rho(l^*)\ ,\ \forall x \in [0, l^*]$$

$$\rho(x) = \frac{L-x}{L-l^*}\ \rho(l^*)\ ,\ \forall x \in [l^*, L]$$

Le coefficient de trans-diffusion T_D est proportionnel à la dérivée de $\rho(x)$ en 0 et L :

$$T_D = \frac{\frac{\partial \rho}{\partial x}(L)}{\frac{\partial \rho}{\partial x}(0) - \frac{\partial \rho}{\partial x}(L)} = \frac{l^*}{L}$$

En pratique, les conditions de réflexion aux parois de la cellule modifient les probabilités d'émergence des marches aléatoires dans l'échantillon ; cet effet est pris en compte en modifiant les conditions aux limites en $x = 0$ et $x = L$. L'expression obtenue dépend simplement de L, l^* et du coefficient de réflexion des parois de la cellule R :

$$T_D = \frac{1 + \frac{1-R}{1+R}}{\frac{L}{l^*} + \frac{1-R}{1+R}}$$

L'accord entre cette équation et les expériences est de l'ordre de 1% [2]. Ainsi, malgré la complexité microscopique de la diffusion multiple, **le mécanisme de diffusion n'intervient dans cette expression que sur un seul paramètre : l^*.**

La fraction de photons n'ayant pas tranversé l'échantillon s'échappe de la cellule par la paroi illuminée : ces photons sont *rétro-diffusés* alors que les photons transmis sont *trans-diffusés*. On peut considérer que les conditions de diffusion multiple sont réunies lorsque $L > 10l^*$.

A partir du chapitre suivant nous allons considérer le phénomène de diffusion multiple dans le cas particulier où la source d'illumination possède une grande longueur de cohérence.

1.2 Description et interprétation des propriétés spatiales de la figure d'interférence

Quand une dispersion colloïdale est éclairée par un faisceau laser (Fig.1.3), les diffuseurs de la dispersion deviennent des sources cohérentes de lumière. L'interférence de ces sources forme des **figures d'interférence** à l'extérieur de l'échantillon, parfois appelées figures de *speckle* (Fig.1.4). Dans

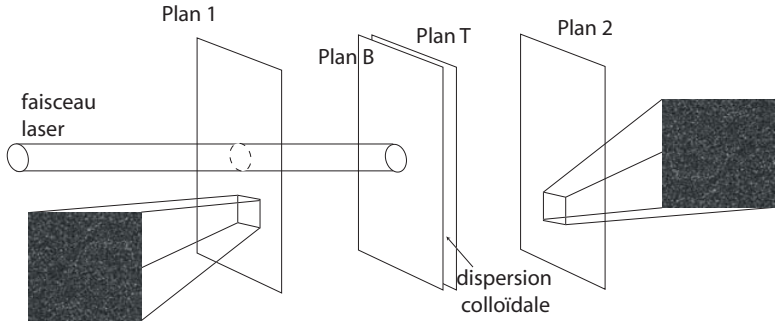


FIG. 1.3 – Phénomène de diffusion multiple de lumière cohérente obtenu en illumant un échantillon turbide avec un faisceau laser. L'interférence des photons émergeants de l'échantillon après diffusion multiple entraîne l'apparition de figures d'interférence.

la suite de cette section, nous allons décrire les propriétés spatiales de ces figures d'interférence[3] générées par diffusion multiple de lumière cohérente.

Dans les figures d'interférence obtenues, on observe un grand nombre de zones où les interférences sont constructives. Pour un échantillon éclairé par un faisceau laser de quelques millimètres de diamètre et une lumière diffusée observée à quelques dizaines de centimètres de l'échantillon, ces zones d'intensité élévée ont une taille caractéristique de quelques dizaines de microns et leur disposition sur la figure d'interférence semble complètement désordonnée [5]. De plus, quelle que soit la distance entre l'échantillon et la figure d'interférence, les valeurs de l'intensité sur la figure d'interférence présentent une distribution de type exponentielle (Fig.1.4).

Dès l'utilisation des premiers lasers, de telles figures d'interférence furent observées ; elles apparaissent par exemple lors de l'illumination cohérente d'une surface rugueuse [4]. Il est généralement admis que la figure d'interférence en champ lointain ne contient malheureusement pas d'informations spatiales exploitables pour évaluer les propriétés d'organisation microscopique de l'échantillon. Le modèle présenté dans la suite va nous permettre de mieux comprendre ce constat tout en posant toutes les bases nécessaires au traitement de la dynamique de la figure d'interférence.

[3]Grâce à un capteur CCD il est possible d'enregistrer des portions d'interférences à l'extérieur de l'échantillon. Nous verrons plus tard que cet enregistrement n'est possible que sous la condition d'une dynamique des diffuseurs très faible durant le temps d'acquisition de la caméra. Les figures d'interférence présentées ici sont obtenues à partir d'échantillons solides

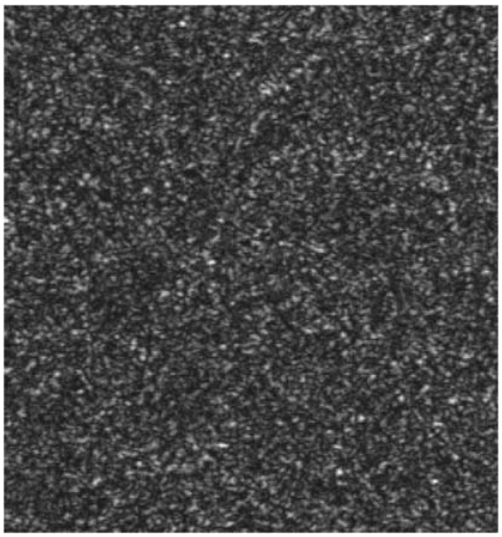


FIG. 1.4 – Exemple de figure d'interférence crée par un échantillon turbide éclairé par une faisceau laser. Ici on a utilisé un simple morceau de téflon comme matériau diffusif.

1.2.1 Champ proche

Soit ξ_B, respectivement ξ_T, l'ensemble des diffuseurs de l'échantillon situés à moins de l^* du plan B, respectivement du plan T. En tout diffuseur P de l'ensemble ξ_B ou ξ_T parvient un grand nombre de chemins (Fig.1.5). Nous considérons que le champ diffusé par P est le résultat de l'interférence de tous les chemins parvenant à P.

A chaque chemin est associé un facteur de phase φ_c, égal à la distance optique du chemin entre le plan B et le dernier diffuseur du chemin. Pour un chemin $(P_c^i)_{i\in[0,N]}$ composé de N segments[4] le facteur de phase est égal à :

$$\varphi_c = \frac{2\pi}{\lambda} \sum_{i=1}^{N} \|\overrightarrow{P_c^{i-1}P_c^i}\| + \overrightarrow{k_e}.\overrightarrow{OP_c^0} \tag{1.5}$$

où $\overrightarrow{k_e}$ et λ sont le vecteur d'onde et la longueur d'onde du faisceau laser illuminant la cellule.

En raison de la nature désordonnée des dispersions colloïdales, la différence de phase entre les chemins parvenant aux diffuseurs de ξ_B et

[4]Le premier diffuseur du chemin est positionné en un point $P_c^0 \in \xi_B$. Le dernier diffuseur du chemin est positionné en $P_c^N \in \xi_B$ pour un photon rétro-diffusé et en $P_c^N \in \xi_T$ pour un photon trans-diffusé.

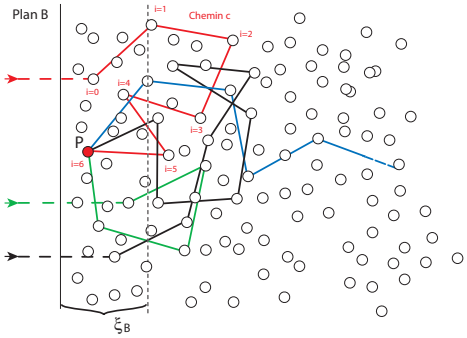


FIG. 1.5 – Représentation schématique de quelques chemins parvenant en un diffuseur P de ξ_B

ξ_T est aléatoire. Ainsi les champs diffusés par deux diffuseurs P et P' sont indépendants, et **les valeurs du champ** $E(P)$ sur l'ensemble ξ_B (ou ξ_T) **vérifient une distribution gaussienne**. Cette propriété du champ diffusé au voisinage des parois permet dans la suite d'expliquer de nombreuses propriétés de la figure d'interférence.

1.2.2 Champ lointain

Les figures d'interférence observées résultent directement du champ émis par les diffuseurs au voisinage de la paroi de la cellule (Fig.1.6). Ainsi le champ en un point M du plan 1 est égal à [5] :

$$E_M = \sum_{P \in \xi_B} E(P) e^{i[\frac{2\pi}{\lambda} \| \overrightarrow{PM} \|]} \tag{1.6}$$

On note R le rayon du faisceau laser, il illumine complètement la face de la cellule contenant l'échantillon. Nous considérons le champ sur une portion carrée du plan 1, le coté de cette portion est noté A (Fig1.6). Lorsque la distance $z = \|\overrightarrow{OC}\|$ entre la portion du plan 1 et la cellule est grande devant A et R, le facteur de phase de l'équation (1.6) peut être développé suivant l'approximation [16] :

$$\| \overrightarrow{PM} \| \approx z - \frac{\overrightarrow{OP}.\overrightarrow{CM}}{z} \tag{1.7}$$

[5] Dans ce chapitre nous ne considérerons que la figure d'interférence du champ rétro-diffusé. Notons tout de même que les mêmes raisonnements peuvent être appliqués au champ trans-diffusé.

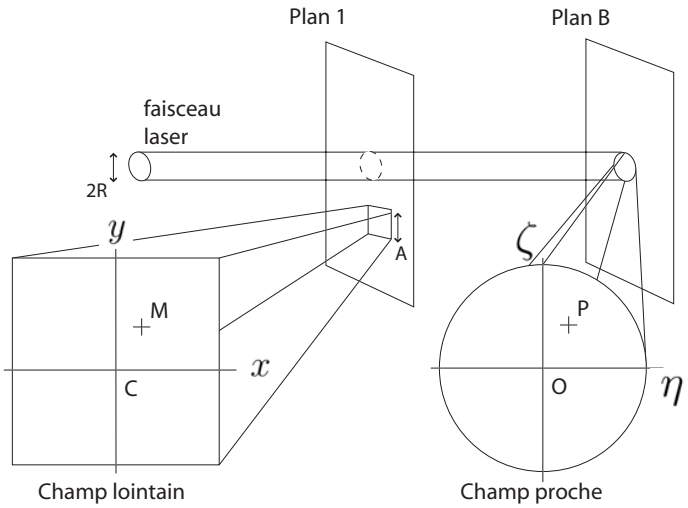


FIG. 1.6 – Présentation des notations introduites pour le calcul du champ lointain issu de la rétro-diffusion de lumière cohérente.

où C est un point arbitraire de la portion du plan 1 et O un point arbitraire de la paroi de la cellule (Fig.1.6). Dans le cadre de cette approximation le champ lointain est :

$$E_M = e^{i[\frac{2\pi z}{\lambda}]} \sum_{P\in\xi_B} E(P) e^{-i[\frac{2\pi}{\lambda z}\overrightarrow{OP}.\overrightarrow{CM}]} \tag{1.8}$$

Dans la suite, nous utiliserons cette expression du champ développée sur des coordonnées cartésiennes (Fig.1.6). Le champ lointain en un point M apparaît alors comme le produit de la transformée de Fourier du champ proche et d'un propagateur :

$$E_M = e^{i\frac{2\pi z}{\lambda}} \sum_{P\in\xi_B} E(P) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}(\eta^P x+\zeta^P y)} \tag{1.9}$$

où (x, y) repère le point M dans le plan 1, et (η^P, ζ^P) repère le point P dans le plan B.

1.2.3 Décorrélation spatiale du champ lointain

Grâce au résultat de la section précédente nous allons pouvoir clarifier le concept de speckle (souvent nommé, rarement expliqué). Considérons le champ en deux points M et M' du plan 1 (Fig.1.6). En ces deux points le champ est le résultat de l'interférence des mêmes sources, et il n'est pas

déraisonable de penser qu'il existe *a priori* un lien fort entre les valeurs E_M et $E_{M'}$. Nous allons montrer qu'il existe une distance $d_{speckle}$ à partir de laquelle cette idée est erronée : **pour une distance $MM' > d_{speckle}$ la valeur du champ E_M en un point M ne permet pas d'avoir une idée sur la valeur du champ $E_{M'}$ au point M'**. Pour évaluer la distance $d_{speckle}$ nous étudions la fonction d'autocorrélation spatiale du champ lointain sur la portion de plan 1 étudiée :

$$\mu_E(\Delta x, \Delta y) =< E(x,y)E^*(x+\Delta x, y+\Delta y) >_{x,y} \tag{1.10}$$

A la lumière de l'équation (1.8), la fonction μ_E peut être réécrite comme une corrélation spatiale du champ proche :

$$\mu_E(\Delta x, \Delta y) = \sum_{P\in\xi_B}\sum_{P'\in\xi_B} E_P E^*_{P'} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}(\eta^P \Delta x + \zeta^P \Delta y]} < e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}([\eta^P - \eta^{P'}]x + [\zeta^P - \zeta^{P'}]y)} >_{x,y} \tag{1.11}$$

Si les cotés de la zone du plan 1 sont égaux à $2A$ alors pour tout couple de diffuseur (P, P') on a :

$$< e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}[\eta^P - \eta^{P'}]x} >_x = \frac{1}{A}\int_{-A}^{A} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}[\eta^P - \eta^{P'}]x} dx \tag{1.12}$$

$$= \frac{2\sin[\frac{A}{\lambda z}(\eta^P - \eta^{P'})]}{\frac{A}{\lambda z}(\eta^P - \eta^{P'})} \tag{1.13}$$

Par conséquent on a :

$$< e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}([\eta^P - \eta^{P'}]x + [\zeta^P - \zeta^{P'}]y)} >_{x,y} = \frac{2\sin[\frac{A}{\lambda z}(\eta^P - \eta^{P'})]}{\frac{A}{\lambda z}(\eta^P - \eta^{P'})} \frac{2\sin[\frac{A}{\lambda z}(\zeta^P - \zeta^{P'})]}{\frac{A}{\lambda z}(\zeta^P - \zeta^{P'})} \tag{1.14}$$

Dans le cas où A est grand, l'expression précédente est non nulle dans un seul cas : $P = P'$. Ainsi la corrélation spatiale du champ s'exprime simplement :

$$\mu_E(\Delta x, \Delta y) \approx \sum_{P\in\xi_B}\sum_{P'\in\xi_B} E_P E^*_{P'} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}(\eta^P \Delta x + \zeta^P \Delta y)} \delta(P - P') \tag{1.15}$$

$$\approx \sum_{P\in\xi_B} E_P E^*_P e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}(\eta^P \Delta x + \zeta^P \Delta y)} \tag{1.16}$$

Où $\delta(..)$ correspond à une distribution de Dirac.

Ce résultat est en fait l'expression du théorème d'Orstein et Zernike [16] : **la fonction de corrélation spatiale du champ lointain est la transformée de Fourier de l'intensite du champ proche**. Soit plus précisément : la fonction de corrélation spatiale du champ lointain en

$(\Delta x, \Delta y)$ est la transformée de Fourier de l'intensité $I_P = E_P E_P^*$ du champ proche aux fréquences spatiales $\frac{1}{\lambda z}(\Delta x, \Delta y)$.

Nous avons remarqué précedemment que pour deux diffuseurs P et P', il n'y a pas de corrélation entre les valeurs des champs rétro-diffusés $E(P)$ et $E(P')$. Ainsi, au niveau du plan B, l'intensité du champ proche peut être approximativement décrite par le produit d'une fonction présentant des fluctuations aléatoires de taille caractéristique égale à la distance moyenne entre particules, notée d_{micro}, avec une fonction nulle en dehors de la cellule, et égale à 1 sur la paroi de la cellule. Dans l'espace de Fourier on aboutit à la convolution d'une fonction de support $\frac{1}{2R}$ avec la transformée de Fourier des fluctuations microscopiques de l'intensité du champ proche. La transformée des fluctuations microscopiques est un pic dont la largeur est de l'ordre de $\frac{1}{Kd_{micro}}$, où $K \propto \frac{R^2}{d_{micro}^2}$ est le nombre de diffuseurs de l'ensemble ξ_B. Il suffit alors de remarquer que $R \gg d_{micro}$ pour constater que les fluctuations microscopiques du champ local disparaissent dans la transformée de Fourier de l'intensité du champ proche où seule persiste la fonction de support $\frac{1}{2R}$. Ainsi, **la fonction de corrélation spatiale du champ lointain est independante de la disposition des particules de la dispersion colloïdale**, et la distance caractéristique de corrélation spatiale est égale à :

$$d_{speckle} \approx \frac{\lambda z}{4R} \tag{1.17}$$

Revenons aux propriétés de $d_{speckle}$: pour trois points (M, M_1, M_2) du plan 1 tels que $MM_1 \ll d_{speckle}$ et $MM_2 \gg d_{speckle}$, la valeur du champ en M est proche de celle du champ en M_1, mais elle ne donne aucune information sur la valeur du champ en M_2. En chacun des points M, un grand nombre de diffuseurs de phases indépendantes interfèrent : **le champ lointain présente** donc **une distribution gaussienne responsable de la distribution exponentielle de l'intensité** expérimentalement observée (Fig.1.4).

La particularité de la technique MSDWS qui va être présentée dans le chapitre suivant, est d'obtenir des informations sur la dynamique microscopique de la suspension à partir d'un détecteur mesurant l'intensité en différents points du plan 1. **C'est grâce à la longueur de cohérence spatiale finie $d_{speckle}$ en champ lointain que ces mesures multispeckle sont possibles**.

1.3 Description des propriétés dynamiques de la figure d'interférence

Revenons aux propriétés des figures d'interférence crées par diffusion multiple (Fig. 1.3). Lorsque les diffuseurs de l'échantillon sont mobiles, la figure d'interférence évolue dans le temps. Nous allons présenter dans la suite plusieurs techniques qui mesurent l'évolution des figures d'interférence afin d'en déduire la dynamique des diffuseurs de l'échantillon.

1.3.1 MultiSpeckle Diffusing Wave Spectroscopy (MSDWS)

Dans la technique **M**ulti**S**peckle **D**iffusing **W**ave **S**pectroscopy [1, 20], l'évolution temporelle de la figure d'interférence entre deux instants t et t', est mesurée par l'évaluation de la *corrélation temporelle de l'intensité moyennée sur le plan 1* (Fig.1.3,Fig.1.6) :

$$R_I(t,t') = \frac{< I_M(t) I_M(t') >_{M\in plan1}}{< I_M(t) >_{M\in plan1} < I_M(t') >_{M\in plan1}} = \frac{< I_{x,y}(t) I_{x,y}(t') >_{x,y}}{< I_{x,y}(t) >_{x,y} < I_{x,y}(t') >_{x,y}} \tag{1.18}$$

Nous avons montré la longueur de cohérence spatiale,$d_{speckle}$, en un plan lointain de l'échantillon est toujours finie, c'est pourquoi moyenner spatialement sur le plan 1 revient bien à faire une moyenne **multispeckle**.

Une autre technique de mesure appelée **D**iffusing **W**ave **S**pectroscopy [10] fait elle intervenir l'autocorrélation temporelle de l'intensité d'un point du plan 1 moyennée sur le temps. Cette mesure **monospeckle** repose sur le calcul de la moyenne temporelle suivante : $< I_M(t) I_M(t+\tau) >_t$. Nous souhaitons souligner que mesures DWS et MSDWS ne sont pas équivalentes. Pourtant, à l'heure actuelle, la MSDWS est présentée dans la littérature comme une simple variante de la DWS. Les mesures MSDWS sont interprétées grâce à la théorie DWS. Or la théorie DWS a été historiquement construite pour interpréter des mouvements de particules indépendantes, typiquement des déplacements dus à l'agitation brownienne. Pourtant nous verrons dans le chapitre 3 des mesures MSDWS peuvent être sensibles aux modes de déplacement collectifs des diffuseurs. De plus dans la théroie DWS on a toujours une moyenne temporelle qui intervient et qui n'a pas lieu d'être en MSDWS, la justification de l'utilisation de ces moyennes qui apparaît la plus souvent prend la forme d'un terme de physique statistique : l'ergodicité. Si les speckles du plan 1 ont des évolutions indépendantes alors on parle d'ergodicité. Les conditions d'indépendances des dynamiques des speckle n'ont pas

été clairement posées à ma connaissance. Si les courbes obtenues par MSDWS ne sont pas interprétables avec le modèle DWS, on lit souvent que l'on n'est pas dans des conditions ergodiques et les mesures ne sont pas traduites en termes de dynamique microscopique.

Voici le paradoxe auquel sont confronté actuellement les expérimentateurs qui tentent de faire des mesures MSDWS sur des systèms originaux : il est très facile d'obtenir des courbes expérimentales de bonne qualité mais il manque les outils théoriques pour les interpréter. La condition première pour interpréter les mesures multispeckle est d'avoir une idée assez précise sur les modes de déplacements des diffuseurs, pour cela chaque phénomène est particulier, **nous proposons dans la suite un modèle dédié aux mesures multispeckle qui permet de tenir compte de tout type de déplacements dans la suspension**. Grâce à ce modèle nous espérons que les expériences de MSDWS vont être plus faciles à interpréter et que les expérimentateurs pourront enfin interpréter plus facilement leur courbes. Dans notre modèle les moyennes temporelles disparaissent par rapport au modèle DWS, la problématique d'ergodicité disparaît. Nous verrons que ce modèle est compatible avec le modèle DWS, ce qui semble prouver que la problématique d'ergodicité est ici un faux problème et un détournement un peu malheureux du terme de physique statistique.

Paradoxalement, il nous est apparu au cours de ce travail de thèse que c'est dans des conditions non ergodiques qu'étaient particulièrement intéressantes les mesures de MSDWS. En nous inspirant du modèle DWS et en considérant la propagation du champ hors de l'échantillon, **nous sommes parvenus à un modèle dédié à la MSDWS**. Les concepts fondateurs de ce modèle ont été égrénés dans les sections précédentes. Nous allons, dans la suite, expliquer les mesures de corrélation temporelle MSDWS dans un cadre bien plus large que celui des conditions ergodiques.

Nous avons pris le parti de détailler les étapes analytiques du modèle, et de faire ressortir les méthodes de calcul permettant de traiter différents types de déplacements. Nous avons appliqué cette méthode à deux cas connus en DWS : l'agitation brownienne et déplacement sous cisaillement uniforme. Notre secret espoir est que les méthodes décrites permettent à la communauté scientifique, nous compris..., de traiter des déplacement toujours plus originaux.

Dans les sections suivantes, sauf mention contraire, les termes de *corrélation temporelle* correspondront à la corrélation temporelle moyennée sur le plan 1 (cf Eq.1.18). Nous nous intéressons aux mesures multispeckle.

1.3.2 Lien entre la corrélation temporelle de l'intensité du champ lointain et la corrélation temporelle du champ proche

La technique MSDWS tire parti du fait que les valeurs du champ sur le plan 1 possèdent à tout instant une distribution gaussienne [6]. Grâce à cette distribution gaussienne la relation de Siegert est vérifiée à tout instant (1.19). Cette relation permet de relier la corrélation temporelle de l'intensité à la corrélation temporelle du champ [5], dont on va montrer qu'elle peut être reliée à la dynamique des diffuseurs.

$$< I_M(t)I_M(t') >_M =< I_M(t) >_M < I_M(t') >_M + | < E_M(t)E_M^*(t') >_M |^2 \tag{1.19}$$

Grâce à l'expression (1.8) du champ lointain, la corrélation temporelle du champ peut se développer sous la forme :

$$< E_M(t)E_M^*(t') >_M = \sum_{P\in\xi_B}\sum_{P'\in\xi_B} E_P(t)E_{P'}^*(t') < e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}([\eta^P-\eta^{P'}]x+[\zeta^P-\zeta^{P'}]y)} >_{x,y}$$

Appliquées ici, les méthodes utilisées pour obtenir l'expression (1.16), permettent de constater que l**a corrélation temporelle du champ lointain est proportionnelle à la corrélation temporelle du champ proche** :

$$\begin{aligned} < E_M(t)E_M^*(t') >_{M\in Plan1} &= \sum_{P\in\xi_B}\sum_{P'\in\xi_B} E_P(t)E_{P'}^*(t')\delta(P-P') && (1.20)\\ &= \sum_{P\in\xi_B} E_P(t)E_P^*(t') && (1.21) \end{aligned}$$

Ainsi la corrélation temporelle de l'intensité est égale à

$$R_I(t,t') = 1 + \frac{|< E_P(t)E_P^*(t') >_{P\in\xi_B}|^2}{< I_P(t) >_{P\in\xi_B} < I_P(t) >_{P\in\xi_B}} \tag{1.22}$$

En comparant les expressions (1.16) et (1.22), on constate que les valeurs de la corrélation spatiale et de la corrélation temporelle filtrent les informations structurelles de manière opposée. Dans l'expression (1.16) de

[6] En fait et en pratique la distribution du champ mesuré est un peu plus complexe qu'une distribution gaussienne. Ce problème de statistique non gaussienne est abordée dans les articles ardus mais lumineux du professeur Shätzel [12]. Cet écart à l'idéalité se traduit en pratique par la nécessité d'introduire des coefficients scalaires dans l'équation de Siegert. Ces coefficients dépendent du montage mais pas de la dynamique des colloïdes, ainsi le lien analytique entre la corrélation du champ et le déplacement des colloïdes qui est établi dans ce chapitre n'est pas remis en cause par cet écart à l'idéalité.

la valeur de la corrélation spatiale, les informations microscopiques disparaissent au profit d'informations de propagation diffractive entre la cellule et le plan d'observation. **Dans l'expression de la corrélation temporelle** (1.22) nous observons le phénomène inverse : dans R_I **il n'y a plus de dépendance aux dimensions de la cellule ni à la distance entre la cellule et le plan 1**, on a directement accès à la corrélation temporelle du champ entre t et t' sur l'ensemble ξ_B des diffuseurs situés au voisinage de la paroi B. Dans la suite nous allons montrer que le modèle du photon en marche aleatoire permet de relier ce terme de corrélation temporelle du champ proche au déplacement des diffuseurs entre t et t'.

1.3.3 Corrélation temporelle du champ.

Pour tout diffuseur P de l'ensemble ξ_B, et en tout instant t, il existe un grand nombre de chemins de rétro-diffusion qui aboutissent en P (Fig.1.5). Si nous notons $\Omega(P)$ l'ensemble constitué de ces chemins, alors la valeur de E_P est donnée par l'interférence des chemins de $\Omega(P)$:

$$E_P(t) = \sum_{c\in\Omega(P)} \sqrt{\chi_c}\; e^{i\varphi_c(t)} \tag{1.23}$$

où χ_c est la probabilité que le chemin c soit suivi par un photon [11], et $\varphi_c(t)$ la phase de chaque chemin c liée à la position des diffuseurs du chemin suivant l'expression (1.5). L'évolution du champ rétro-diffusé par P entre t et t' se traduit dans le produit suivant :

$$E_P(t)E_P^*(t') = \sum_{c_1\in\Omega(P)} \sqrt{\chi_{c_1}}\; e^{i\varphi_{c_1}(t)} \sum_{c_2\in\Omega(P)} \sqrt{\chi_{c_2}}\; e^{-i\varphi_{c_2}(t')} \tag{1.24}$$

Si les chemins c_1 et c_2 sont un seul et même chemin, la différence de phase $\varphi_c(t) - \varphi_c(t')$ mesure le déplacement des colloïdes du chemin entre t et t'. Par contre si les chemins c_1 et c_2 sont distincts, la différence de phase $\varphi_{c_1}(t) - \varphi_{c_2}(t')$ est totalement aléatoire en raison de la nature désordonnée des suspensions. Afin de séparer les termes croisés des termes contenant une information microscopique, il est pratique de réécrire l'expression (1.24) sous la forme suivante :

$$E_P(t)E_P^*(t') = \sum_{c\in\Omega(P)} \chi_c\, e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} + \sum_{c_1\in\Omega(P)} \sum_{c_2\in\Omega(P)/c_1} \sqrt{\chi_{c_1}\chi_{c_2}}\; e^{i(\varphi_{c_1}(t)-\varphi_{c_2}(t'))} \tag{1.25}$$

Le terme le plus à droite dans l'expression précédente est particulièrement gênant dans notre recherche d'informations sur la dynamique

microscopique[7]. Nous allons voir dans la suite **la moyenne sur P introduite par la technique MSDWS** (cf Eq.1.22) **permet d'éliminer les termes gênants**.

Pour comprendre l'effet d'une moyenne sur P il est nécessaire de comprendre comment évolue l'ensemble des chemins $\Omega(P)$ lorsque l'on passe d'un diffuseur P à un autre diffuseur. Les chemins rétro-diffusés parvenant en P sont conditionnés par la disposition des diffuseurs autour de P (Fig.1.5) : ainsi les chemins de l'ensemble $\Omega(P)$ de chemins participant au champ en P ont des configurations particulières. Quand P décrit ξ_B dans l'expression (1.25), l'ensemble $\Omega(P)$ pave l'ensemble Ω de toutes les configurations possibles de chemins en raison du grand nombre d'éléments dans ξ_B et de la nature désordonnée des dispersions.

Grâce à ce constat on peut prouver que la moyenne de $e^{i[\varphi_{c_1}(t)-\varphi_{c_2}(t')]}$ sur $P \in \xi_B$ est nulle[8] alors que la moyenne de $e^{i[\varphi_c(t)-\varphi_c(t')]}$ sur $P \in \xi_B$ a des valeurs non nulles pour de petits déplacements dans la suspension. Par conséquent les termes croisés disparaissent de la corrélation temporelle du champ proche spatialement moyennée :

$$\begin{aligned} < E_P(t)E_P^*(t') >_{P\in\xi_B} &= < \sum_{c\in\Omega(P)} \chi_c \; e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} >_{P\in\xi_B} \\ &\propto \sum_{P\in\xi_B} \sum_{c\in\Omega(P)} \chi_c \; e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} \\ &\propto \sum_{c\in\Omega} \chi_c \; e^{i(\Delta\varphi_c(t,t'))} \end{aligned}$$

où Ω est l'ensemble de tous les chemins de rétro-diffusion, et $\Delta\varphi_c(t,t') = \varphi_c(t) - \varphi_c(t')$ mesure l'évolution de la longueur du chemin c entre t et t'.

L'expression de la corrélation temporelle du champ lointain se ramène donc à des sommes sur les chemins à l'intérieur de l'échantillon :

$$R_I(t,t') = 1 + \| \frac{\sum_{c\in\Omega} \chi_c \; e^{i(\Delta\varphi_c(t,t'))}}{\sum_{c\in\Omega} \chi_c} \|^2 \tag{1.26}$$

[7]Ce terme ne disparaît pas de lui même, il suffit de prendre $t = t'$ pour se convaincre que si c'était le cas alors la norme de E_P serait constante $\forall P \in \xi_B$ ce qui est absurde.

[8]Moyenner $e^{i[\varphi_{c_1}(t)-\varphi_{c_2}(t')]}$ sur $P \in \xi_B$ revient à moyenner sur le couple $(c_1, c_2) \in \Omega \bigotimes \Omega / c_1$. Or les chemins c_1 et c_2 sont indépendants, donc

$$< e^{i[\varphi_{c_1}(t)-\varphi_{c_2}(t')]} >_P = < e^{i\varphi_c} >^2_{c\in\Omega}$$

Quand le chemin c décrit Ω, il décrit toutes les configurations de chemin possibles. Par conséquent $< e^{i\varphi_c} >_{c\in\Omega} = 0$. Les termes croisés s'annulent grâce à la moyenne sur P.

C'est l'annulation des termes croisés par moyenne spatiale qui permet à la technique MSDWS de mesurer des informations de déplacement microscopique. Développons maintenant le lien entre l'expression (1.26) et la dynamique des diffuseurs.

Modélisation de l'ensemble des chemins de diffusion

L'expression (1.26) est une somme pondérée sur tous les chemins c de rétrodiffusion. Nous allons simplifier cette expression en faisant ressortir une moyenne sur les configurations de chaînes aléatoires. Pour ce faire nous allons modéliser l'ensemble des chemins de diffusion multiple, Ω, grâce au modèle du photon suivant une marche aléatoire de pas l^* dans l'échantillon. La probabilité χ_c de suivi d'un chemin c dépend uniquement du nombre de segments du chemin[9]. Notons $\chi(n)$ la probabilité de suivre un chemin de n segments, et $\Omega(n)$ l'ensemble des chemins de retrodiffusion de n segments. En regroupant les chemins par longueur dans l'expression (1.26) on obtient :

$$R_I(t,t') = 1 + \|\left(\frac{\sum_{n\geq 0}\left[\ \chi(n)\,\mathcal{N}(n) < e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} >_{c\in\Omega(n)}\right]}{\sum_{n\geq 0}\ \ \chi(n)\,\mathcal{N}(n)}\right)\|^2 \qquad (1.27)$$

Où $\mathcal{N}(n) = Card(\Omega(n))$.

$\mathcal{N}(n)$ est le nombre de chemin sde taille n et $\chi(n)$ est la probabilité de chaque chemin de taille n. Ainsi pour un photon pénétrant par la paroi B dans l'échantillon, la probabilité $\mathcal{P}(n)$ qu'il suive un chemin quelconque de taille n est :

$$\mathcal{P}(n) = \frac{\chi(n)\mathcal{N}(n)}{\sum_{k=1}^{k=\infty}\chi(k)\mathcal{N}(k)}$$

Ainsi **la corrélation temporelle multispeckle est fonction de la distribution de longueur des chemins**, $\mathcal{P}(n)$, suivant l'expression :

$$R_I(t,t') = 1 + \|\sum_n \mathcal{P}(n) < e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} >_{c\in\Omega(n)} \|^2 \qquad (1.28)$$

Dans la section suivante, les techniques d'estimation de $\mathcal{P}(n)$ seront expliquées. Ensuite nous décrirons une méthode permettant d'évaluer le terme $< e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} >_{c\in\Omega(n)}$ pour n'importe quel type de champ de vecteurs de déplacement entre t et t' à l'intérieur de l'échantillon.

[9]Pour justifier cette affirmation étudions des photons qui suivent des marches aléatoires 1D avec un pas de longueur l^*. Un photon est rétrodiffusé s'il revient à la paroi éclairée. Considérons deux photons rétrodiffusés après N pas : même si leur chemin diffère ils sont obligatoirement formés de $N/2$ pas à droite et $N/2$ pas à gauche. L'indépendance des sauts successifs impose donc l'équiprobabilité des deux chemins de même taille.

1.3.4 Distribution des longueurs des chemins retrodiffusés

Expérimentalement, il est possible de mesurer la distribution de longueur des chemins $\mathcal{P}(n) \propto \chi(n)\mathcal{N}(n)$ [10]. L'expérience consiste à soumettre l'échantillon à un pulse laser le plus bref possible, puis d'observer à quels instants les photons diffusés parviennent au détecteur : la durée t entre l'émission du pulse et la détection d'un photon particulier traduit la longueur s du parcours suivi dans l'échantillon. Le nombre de photons reçus en un instant t renseigne sur la proportion $\widetilde{\mathcal{P}}(s)$ de photons diffusés ayant suivi un chemin de longueur $s = v_c t$, où v_c est la vitesse de la lumière dans l'échantillon. Ainsi $\widetilde{\mathcal{P}}(s)$ permet de mesurer $\mathcal{P}(n)$. La mise en oeuvre de ces expériences est toutefois particulièrement délicate en raison de la résolution temporelle et de la sensibilité nécessaires.

Le succès du modèle du photon en marche aléatoire repose sur sa capacité de prédiction de la distribution $\widetilde{\mathcal{P}}(s)$. En s'appuyant sur l'idée de marche aléatoire de pas l*, il est possible d'estimer numériquement[10] $\mathcal{P}(n)$. Toutefois c'est surtout le pendant continu de ce modèle de marche aléatoire qui est utilisé. Ce modèle repose sur l'équation différentielle partielle (1.2) et sur les conditions aux limites (1.4). Le modèle reproduit exactement les expériences de pulse laser : le terme source dans l'équation (1.2) est ici $s(t,x) = \delta(t)\delta(x - l*)$. En résolvant les équations (1.2,1.4) pour ce terme source, la solution $\rho(x,t)$ donne la distribution $\widetilde{\mathcal{P}}(s)$ de chemins rétro-diffusés suivant l'expression :

$$\widetilde{\mathcal{P}}(s) = -\frac{\partial \rho}{\partial x}(x = 0, t = \frac{s}{v_c}) \tag{1.29}$$

où $\rho(x,t)$ est la densité de photons en x à l'instant t. Pour la distribution de chemins transdiffusés, il suffit de considérer l'expression précédente en $x = L$.

Le résultat de ce calcul est disponible dans la littérature pour plusieurs géométries de cellule et plusieurs conditions de réflexion aux parois [10, 15].

Typiquement, la distribution des chemins en trans-diffusion est maximale pour un nombre de segments n_T voisin de $(L/l^*)^2$ (fig.**??**). Autour de cette valeur, la distribution décroît rapidement, avec une décroissance de la forme $e^{-(n-n_T)^2}$. La distribution de chemins en retro-diffusion est maximale pour des chemins courts, et sa décroissance en fonction du nombre de segments tend asymptotiquement vers la loi de puissance $n^{-3/2}$.

[10] Il suffit de construire en premier temps un grand nombre N de chemins aléatoires de pas l* partant au voisinage de la paroi B, puis en comptant le nombre N_n de chemins qui émergent de la cellule par la paroi B, le rapport N_n/N donne une estimation de $\mathcal{P}(n)$ [Durian]

1.3.5 Corrélation moyenne des chemins de taille n entre deux instants

L'expression (1.28) montre que la corrélation temporelle dépend de la distribution $\mathcal{P}(n)$ et de l'expression $< e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} >_{c\in\Omega(n)}$. Ce dernier terme est la *corrélation moyenne des chemins de taille n entre deux instants t et t'*. La corrélation est conditionnée par le déplacement des diffuseurs entre t et t'. **Si nous connaissons le champ de déplacement dans l'échantillon entre t et t' nous sommes théoriquement capables d'estimer ce terme**. Nous allons montrer comment estimer ce terme dans les cas particuliers d'une agitation brownienne et d'un cisaillement uniforme de l'échantillon.

Notons tout d'abord que la différence de phase associée à chaque chemin c est proportionnelle à l'évolution de la longueur totale du chemin c reliant les diffuseurs $(P^i)_{i\in[0,n]}$ (Fig.1.5) :

$$\begin{aligned}\Delta\varphi_c(t',t)) &= \varphi_c(t') - \varphi_c(t) \\ &= \frac{2\pi}{\lambda}\sum_{i=1}^{n}(\|\overrightarrow{P^{i-1}(t)P^i(t)}\| - \|\overrightarrow{P^{i-1}(t')P^i(t')}\| + \overrightarrow{k_e}.\overrightarrow{P^0(t')P^0(t)})\end{aligned}$$

Si chaque particule P^i du chemin bouge d'une distance $\overrightarrow{\Delta r}_c^i(t,t') = \overrightarrow{P^i(t)P^i(t')}$ petite devant l^*, il existe une **approximation des petits déplacements**, très utile, de l'évolution de la phase associée à chaque chemin [9] :

$$\Delta\varphi^c(t',t) \approx \sum_{i=1}^{n}\overrightarrow{k}_{i-1}.(\Delta\overrightarrow{r}_i - \Delta\overrightarrow{r}_{i-1}) \tag{1.30}$$

avec $\overrightarrow{k}_i$ vecteur directeur du segment reliant P^{i-1} à P^i dans la marche aléatoire de pas l* :

$$\overrightarrow{k}_i = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{\overrightarrow{P^{i-1}(t)P^i(t)}}{\|\overrightarrow{P^{i-1}(t)P^i(t)}\|} \tag{1.31}$$

$$= \frac{2\pi}{\lambda}\frac{\overrightarrow{P^{i-1}(t)P^i(t)}}{l^*} \tag{1.32}$$

L'essence même du modèle de marche aléatoire est l'indépendance des directions des segments successifs. Par conséquent, **la corrélation moyenne des chemins peut se ramener à des moyennes sur les segments des chemins**, et ce, **quels que soient les déplacements des diffuseurs entre t et t'** :

$$< e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} >_{c\in\Omega(n)} = \prod_{i\in[1,n]} < e^{i(\overrightarrow{k}_{i-1}.(\Delta\overrightarrow{r}_i(t,t')-\Delta\overrightarrow{r}_{i-1}(t,t')))} >_{(P^i,P^{i-1})}$$

Si on pose $\vartheta_i = \overrightarrow{k}_{i-1}.(\Delta\overrightarrow{r}_i(t,t') - \Delta\overrightarrow{r}_{i-1}(t,t'))$, la corrélation des chemins de taille n est égale à :

$$< e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} >_{c\in\Omega(n)} = \prod_{i\in[1,n]} < e^{i\vartheta_i} > \tag{1.33}$$

Où la grandeur ϑ_i peut être interprétée comme une variable aléatoire, de densité de probabilité associée ϱ_{ϑ_i}. Dès lors, la moyenne $< e^{i\vartheta} >$ est la transformée de Fourier[11] de ϱ_{ϑ_i} en $-\frac{1}{2\pi}$. *Dans le cas où la distribution de ϱ_{ϑ_i} est une gaussienne centrée*, la moyenne $< e^{i\vartheta_i} >$ prend une forme simple[12] :

$$< e^{i\vartheta_i} >= e^{-\frac{<\vartheta_i^2>}{2}} \tag{1.34}$$

C'est une simplification importante, on est alors ramené au calcul de l'écart quadratique de ϑ_i moyenné sur toutes les configurations et évolutions accessibles au i^{eme} segments (P^i, P^{i-1}) des chemins de taille n :

$$< [\overrightarrow{k}_{i-1}.(\Delta\overrightarrow{r}_i(t,t') - \Delta\overrightarrow{r}_{i-1}(t,t'))]^2 >_{P^i,P^{i-1}}$$

Mathématiquement, cette moyenne sur les i^{emes} segments (P^i, P^{i-1}) se ramène au tirage de quatre positions (P,P',Q,Q') vérifiant (Fig.1.7) :

- le point P est à une distance de la paroi B inférieure[13] à $\sqrt[4]{i(n-i)}l^*$
- le point Q est à une distance l^* de P, la direction entre P et Q est totalement aléatoire
- P' traduit le déplacement de P entre t et t'
- Q' traduit le déplacement de Q entre t et t'

$$fig$$

Dans ces conditions :

$$< \vartheta^2(t,t') >= (\frac{2\pi}{\lambda l^*})^2 \ < [\overrightarrow{PQ}.(\overrightarrow{PP'} - \overrightarrow{QQ'})]^2 >_{P,P',Q,Q'}$$

[11] C'est aussi est la valeur de la fonction caractéristique de ϑ en 1

[12] En raison du théorème de la limite centrale, la formule (1.34) peut en fait être utilisée quand les chemins sont très longs même dans le cas où ϱ_{ϑ_i} n'a pas une distribution gaussienne.

[13] La distance à la paroi du i^{eme} point d'un chemin de n segments est une variable aléatoire difficile à décrire, le critère présenté n'est pas parfaitement exact, il n'est là que pour souligner qu'en rétrodiffusion les chemins courts sont particulièrement sensibles au déplacement des diffuseurs proches de la paroi B, toutefois nous allons voir dans la suite que ce critère n'a pas d'influence dans les deux types de déplacements considérés.

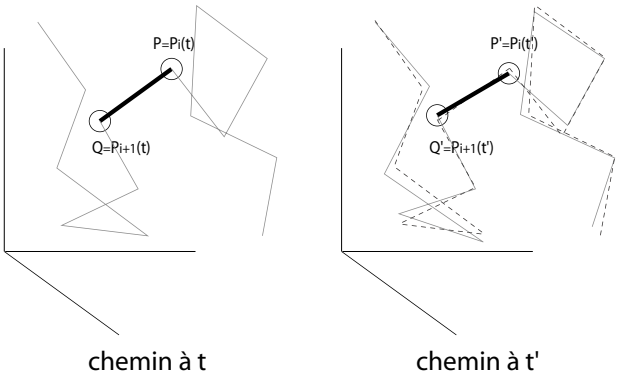


FIG. 1.7 – Evolution du i^{eme} segment d'un chemin entre deux instants t et t'.

Dans le cas particulier où les moyennes sur le i$^{\text{eme}}$ *segment d'un chemin de pas n ne dépendent ni de i ni de n*, la corrélation temporelle de l'intensité s'exprime simplement grâce aux expressions (1.33) et (1.34) :

$$R_I(t,t') = 1 + \| \sum_n \mathcal{P}(n) e^{-n[<\vartheta^2(t,t')>/2]} \|^2 \tag{1.35}$$

Dans ces conditions particulières de déplacement la corrélation temporelle multispeckle de l'intensité est donc liée à la transformée de Laplace de la distribution de chemins $\mathcal{P}(n)$ et cela sans aucune moyenne temporelle ni argument d'ergodicité.

La distribution de chemins $\mathcal{P}(n)$ est connue pour de nombreuses géométries [6]. Dans la *géométrie de rétrodiffusion* avec faisceau élargi, il existe par exemple une expression analytique complète de $R_I(t,t')$ [10]. Nous présentons ici l'approximation la plus crue de cette expression analytique[14] :

$$R_I(t,t') \approx 1 + \beta \exp[-\alpha \sqrt{< \vartheta^2(t,t') >}] \tag{1.36}$$

Cette approximation est valable au temps courts [3]. Les préfacteurs α et β permettent d'obtenir un bon accord avec les mesures expérimentales. Typi-

[14]Dans le cas de mesures en transdiffusion avec un faisceau élargi, on obtient une expression complètement différente :

$$R_I(t,t') \approx 1 + \beta' \exp[-\alpha' < \vartheta^2(t,t') \frac{L}{l^*} >]$$

où L est l'épaisseur de la cellule

quement la valeur de α se trouve dans l'intervalle $[1.5, 2.5]$, et β est de l'ordre de 1 et ne dépend pas de l'échantillon[15].

Dans les sections suivantes nous allons appliquer les résultats et les méthodes présentées à deux types de déplacement : l'agitation brownienne, le déplacement dans un cisaillement uniforme.

1.4 Applications du modèle

1.4.1 Agitation brownienne

Dans le cas où le déplacement des particules de l'échantillon entre t et t' est uniquement dû à l'agitation Brownienne des particules, les scalaires $\overrightarrow{PQ}.\overrightarrow{PP'}/l^*$ et $\overrightarrow{PQ}.\overrightarrow{QQ'}/l^*$ peuvent être considérés comme des variables aléatoires gaussiennes indépendantes de moyenne nulle, et d'écart quadratique moyen égal à $2D(t'-t)$, où D est le coefficient de diffusion des particules. On a donc :

$$< \vartheta^2(t,t') > = (\frac{2\pi}{\lambda l^*})^2 < [\overrightarrow{PQ}.(\overrightarrow{PP'} - \overrightarrow{QQ'})]^2 >_{P,P',Q,Q'} \quad (1.37)$$

$$= (\frac{2\pi}{\lambda})^2 \, 4D \mid t - t' \mid \quad (1.38)$$

Ainsi la moyenne sur le i^{eme} segment des chemins de taille n est indépendante de i et de n, et par conséquent la dernière approximation utilisée pour obtenir l'expression (1.35) est vérifiée. Au temps courts, on a, en rétrodiffusion :

$$R_I(t,t') \approx 1 + \beta \exp[-\alpha\sqrt{\frac{6\|t'-t\|}{\tau_0}}] \quad (1.39)$$

où

$$\tau_0 = (\frac{\lambda}{2\pi})^2 \frac{1}{D}$$

est le temps caractéristique pour qu'une particule diffuse sur une distance $\lambda/(2\pi)$.

1.4.2 Cisaillement à grandient uniforme

Nous nous sommes ici inspirés du traitement de la diffusion multiple de la lumière dans un milieu sous cisaillement présenté dans [9]. Considérons

[15] Si plusieurs modes de diffusion se superposent en chaque point du plan d'observation, le facteur β diminue. Ainsi, en sélectionnant la polarisation du champ détecté grâce à un polariseur, il est possible d'augmenter ce facteur β. Une discussion rigoureuse de ces facteurs est donnée dans [12]

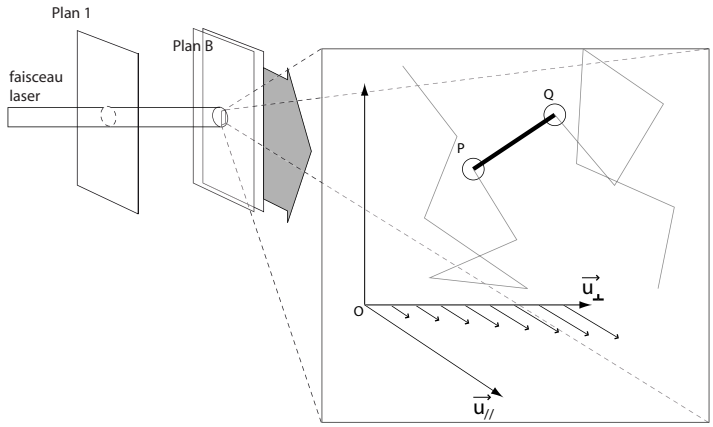


FIG. 1.8 – Schéma d'une expérience de MSDWS où l'échantillon est soumis à un cisaillement uniforme. Les points P et Q marquent les extrémités du i^{eme} segment d'un chemin de rétrodiffusion présenté en gris clair.

une cellule d'épaisseur L, soumise à un cisaillement plan parallèle au plan B décrit par le champ de vitesse suivant :

$$\overrightarrow{v}(P) = \dot{\gamma}\ (\overrightarrow{OP}.\overrightarrow{u}_\perp)\overrightarrow{u}_\parallel$$

où O est un point du plan B et $\overrightarrow{u}_\parallel$, respectivement $\overrightarrow{u}_\perp$, est un vecteur unitaire parallèle, respectivement perpendiculaire, au plan B (Fig.1.8).

Dans ces conditions le déplacement de P entre t et t' est donné par le vecteur suivant :

$$\overrightarrow{PP'} \approx \dot{\gamma}|t'-t|\ (\overrightarrow{OP}.\overrightarrow{u}_\perp)\overrightarrow{u}_\parallel$$

Par conséquent,

$$\vartheta(t,t') = (\frac{2\pi}{\lambda l^*})\ \overrightarrow{PQ}.(\overrightarrow{PP'} - \overrightarrow{QQ'}) \quad (1.40)$$

$$= -(\frac{2\pi\dot{\gamma}|t'-t|}{\lambda l^*})\ (\overrightarrow{PQ}.\overrightarrow{u}_\perp)(\overrightarrow{PQ}.\overrightarrow{u}_\parallel) \quad (1.41)$$

Or le point Q est à une distance l^* de P. Par conséquent si on pose $\vartheta = -\dot{\gamma}|t'-t|(l^*)^2\nu$ nous faisons apparaître la variable aléatoire $\nu = (\overrightarrow{PQ}.\overrightarrow{u}_\parallel)(\overrightarrow{PQ}.\overrightarrow{u}_\perp)/\|\overrightarrow{PQ}\|^2$. La direction entre P et Q est totalement aléatoire, ainsi l'interprétation géométrique de ν est simple : quand on choisit Q, c'est comme si on choisissait au hasard un point sur la sphère unité dans un référentiel cartésien (x,y,z). La valeur de ν pour ce tirage est $xy = \sin(\theta)^2\sin(\phi)\cos(\phi)$, où (θ,ϕ) sont les coordonnées sphériques.

La distribution de probabilité de la variable ν est difficile à calculer. Nous considèrerons dans la suite l'expression (1.34) est ici applicable, bien que la distribution de probabilité ne soit pas gaussienne[16]. Dans ce cas :

$$< \vartheta^2(t,t') > = < (\frac{2\pi}{\lambda l^*})^2 \ [\overrightarrow{PQ}.(\overrightarrow{PP'} - \overrightarrow{QQ'})]^2 >_{P,P',Q,Q'} \quad (1.42)$$

$$= (\frac{2\pi\dot{\gamma}\|t'-t\|}{\lambda l^*})^2 < (l^*)^4(\sin(\theta)^2\sin(\phi)\cos(\phi))^2 > \quad (1.43)$$

$$= (\frac{2\pi\dot{\gamma}l^*\|t'-t\|}{4\lambda})^2 \quad (1.44)$$

Ainsi, la moyenne sur le i$^{\text{eme}}$ segment des chemins de taille n est indépendante de i et de n. Par conséquent en rétrodiffusion on a, pour des valeurs $\|t-t'\|$ petites :

$$R_I(t,t') \approx 1 + \beta \exp[-\alpha \frac{\|t'-t\|}{\tau_1}] \quad (1.45)$$

où

$$\tau_1 = \frac{2\lambda}{l^*\dot{\gamma}}$$

est en fait le temps caractéristique pour qu'un segment de longeur l^* se soit allongé ou rétréci de $\lambda/(2\pi)$ sous l'effet du cisaillement.

1.5 Comparaison MSDWS et DWS

La technique DWS, que nous avons déjà brièvement introduite, fut la première à permettre de tirer des informations des fluctuations temporelles de la figure d'interférence ; elle repose sur la mesure de l'évolution de l'intensité $I_M(t)$ en un point M de la figure d'interférence[17] et sur le calcul de la **fonction d'autocorrélation temporelle monospeckle** liée à $I_M(t)$ suivant la formule :

$$g_2(\tau) = \frac{< I_M(t)I_M(t+\tau) >_{t\in[0,T_{exp}]}}{< I_M(t) >^2_{t\in[0,T_{exp}]}}$$

[16]Il est possible de montrer que les moments d'ordre impair de la variable ν sont nuls. D'autre part l'expression (1.34) est toujours valable pour les grands chemins. On retombe sur une des difficultées de ces théories de chemin : les chemins courts sont très difficiles à intégrer correctement dans les équations.

[17]Une autre configuration héritée des montages de DLS est de ne collecter les photons diffusés que suivant une direction donnée, en pratique on peut aisément vérifier que cette spécification n'a pas de justification profonde, l'important est de collecter les photons sur une zone de l'odre de la cohérence spatiale, ce qui est aisément obtenu par l'utilisation d'une fibre monomode placée entre le point M et le détecteur.

où T_{exp} est la durée d'enregistrement de la grandeur $I_M(t)$.

Dans l'étude des mouvements browniens, cette technique de mesure a permis de mesurer l'agitation moyenne des particules sur des durées de quelques nanosecondes à quelques millisecondes, avec une **sensibilité au déplacement moyen pouvant aller jusqu'à l'Angström** ! L'étude DWS des fluctuations de la figure d'interférence de la lumière transdiffusée par une suspension colloïdale a même permis de mettre en évidence le trajet balistique de colloïdes entre les chocs avec les particules de solvant [10, 15].

Afin d'obtenir le lien entre le déplacement des particules et la corrélation temporelle $R_I(t,t')$ mesurée par MSDWS, nous nous sommes inspirés de manière extensive de la théorie développée pour interpréter la DWS. Nous aimerions toutefois souligner que la mesure MSDWS n'est équivalente à la mesure DWS que pour certains types de déplacements très particuliers.

L'exemple le plus simple pour illustrer cette différence est de considérer un échantillon immobile. On peut aisément vérifier que la relation de Siegert est vérifiée en MSDWS alors qu'elle n'est pas vérifiée en DWS[18] ! Toutefois, dans certaines conditions de dynamique colloïdale, les expressions de corrélation de DWS et de MSDWS se rejoignent, ce que nous allons montrer dans la suite.

Le modèle DWS repose sur le concept de marche aléatoire de photons. Les notations déjà introduites vont nous permettre de présenter rapidement les points importants de ce modèle. Intéressons nous à la corrélation temporelle du champ en un point M moyennée dans le temps. Si on utilise l'expression (1.23) en négligeant les termes de retard entre P et M on obtient :

$$< E_M(t)E_M(t+\tau) >_t = < \sum_{P\in\xi_B} \sum_{P'\in\xi_B} E(P)E^*(P') >_t$$

Expression qui est fondamentalement différente de l'équation (1.22). Si on développe cette expression sur l'ensemble Ω des chemins diffusés, on a :

$$< E_M(t)E_M(t+\tau) >_t = < \sum_{c_1\in\Omega} \sum_{c_2\in\Omega} \sqrt{\chi_{c_1}\chi_{c_2}}\; e^{i(\varphi_{c_1}(t)-\varphi_{c_2}(t'))} >_t$$

[18] Si $E_M(t) = E_M^0$ alors la relation de Siegert n'est pas vérifiée :

$$< (I_M(t))^2 >_t = (I_M^0)^2 \neq 2(I_M^0)^2 = (< (I_M(t)) >_t)^2 + \| < E_M(t)E_M^*(t) >_t \|^2$$

La relation de Siegert repose sur le fait que la distribution des valeurs du champ sur l'ensemble de moyennage soit gaussienne. Sur le plan 1 nous avons montré que l'on a toujours un distribution gaussienne du champ E_M et ce indépendamment du mouvement des particules. C'est pourquoi la relation de Siegert est vérifiée en MSDWS quel que soit le déplacement des particules. Au contraire la distribution temporelle de $E_M(t)$ dépend du mouvement des particules, c'est une des limitations de la méthode DWS.

Dans la théorie DWS, une hypothèse très restrictive sur la dynamique des colloïdes est nécessaire : on suppose que le mouvement des diffuseurs durant $[0, T_{exp}]$ permet de vérifier, pour tous chemins $c1$ et $c2$ distincts :

$$< e^{i(\varphi_{c_1}(t)-\varphi_{c_2}(t'))} >_t = < e^{i\varphi_{c_1}(t)} >_t < e^{-i\varphi_{c_2}(t')} >_t = 0 \tag{1.46}$$

Ainsi les termes croisés disparaissent, et on obtient une formule analogue à l'expression (1.26), où intervient une moyenne temporelle non présente dans la théorie MSDWS présentée :

$$< E_M(t)E_M(t+\tau) >_t = \sum_{c\in\Omega} \chi_c \ < e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t'))} >_t$$

En reprenant les arguments qui nous ont permis de passer de (1.26) à (1.28) et en supposant que la relation de Siegert est valable en DWS, on obtient au final une expression analogue à l'expression :

$$g_2(\tau) = < 1 + \| \sum_n \mathcal{P}(n) < e^{i(\varphi_c(t)-\varphi_c(t+\tau))} >_{c\in\Omega(n)} \|^2 >_{t\in[0,T_{exp}]} \tag{1.47}$$

Cette expression ressemble à l'expression multispeckle (1.28), toutefois en MSDWS nous n'avons pas à faire l'hypothèse (1.46), par conséquent **la théorie MSDWS proposée permet d'aborder beaucoup plus de types de déplacements que la théorie DWS**[19]

Pour conclure cette comparaison entre MSDWS et DWS, on peut tirer des expressions (1.28) et (1.47), le lien formel entre les mesures de MSDWS et de DWS :

$$g_2(\tau) = < R_I(t, t+\tau) >_{t\in[0,T_{exp}]} \tag{1.48}$$

Notons de plus que la mesure de g_2 en τ n'est possible que sur des expériences de durée T_{exp} grande devant τ [20]. En évitant de faire une moyenne temporelle sur des durées longues devant le temps caractéristique des dynamiques à observer, **la technique MSDWS permet de plus d'observer des phénomènes non-stationnaires**.

[19]Loin de nous de penser que les expériences MSDWS et la théorie proposée suffiront à étudier toutes les dynamiques colloïdales. Même s'il est facile d'obtenir des courbes expérimentales de bonne qualité qui traduisent bien la dynamique des particules, la plupart du temps ces courbes seront compatibles avec plusieurs types de déplacements. Nous conseillons aux expérimentateurs qui souhaitent utiliser le modèle proposé d'étudier leur système avec d'autres techniques afin d'en déduire le type de déplacement impliqué. Les expériences MSDWS permettront alors de suivre l'évolution des grandeurs caractéristiques du déplacement.

[20]En pratique, si la fonction g_2 est obtenue en utilisant l'algorithme multi-tau, on peut grossièrement estimer que l'erreur relative sur la valeur de $g_2(\tau)$ est de l'ordre de $\sqrt{\frac{T_{exp}}{\tau}}$

1.6 Utilisation d'une caméra en MSDWS

Pour calculer $R_I(t,t')$ grâce à une caméra il suffit de prendre deux images monochromatiques en t et t' puis de faire une moyenne sur les produits pixels à pixel des deux images :

$$R_I^{mes}(t,t') = \frac{\frac{1}{M}\sum_{pixel} I_p(t)I_p(t')}{\frac{1}{M}\sum_{pixel} I_p(t)\ \frac{1}{M}\sum_{pixel} I_p(t')}$$

Où M est le nombre de pixels des images et $I_p(t)$ est l'intensité du p^{ieme} pixel de l'image prise en t.

Quand la figure d'interférence est enregistrée par une caméra, deux temps caractéristiques propres à l'appareil interviennent : la durée minimale entre deux images T_F et le temps d'intégration par image $T_{shutter}$.

Une première limitation pratique de la technique MSDWS est que l'on ne peut calculer les valeurs $R_I(t,t')$ que pour des intervalles $\mid t'-t \mid$ multiples de T_F, inverse de la fréquence d'acquisition de la caméra. **On ne peut pas, en MSDWS, mesurer des déplacement colloïdaux se déroulant sur des durées inférieures à** T_F. Dans nos expériences, nous avons utilisé des caméras $30Hz$, la mesure de $R_I(t,t+\tau)$ ne peut donc se faire que pour des $\tau > 33ms$. En DWS, par contre, les capteurs sont si rapides (tubes photomultiplicateurs), qu'ils permettent de calculer $g_2(\tau)$ pour des τ allant jusqu'à $100ns$.

La deuxième limitation pratique de la technique MSDWS apparaît lorsque l'on rencontre des systèmes à dynamique très rapide devant le temps d'exposition $T_{shutter}$ des images. **Si les diffuseurs se déplacement notablement pendant** $T_{shutter}$ **alors les images sont floues** et on ne peut plus utiliser directement les expressions trouvées pour $R_I(t,t')$ afin d'interpréter $R_I^{mes}(t,t')$.

Nous allons voir dans la suite comment la technique SVS permet paradoxalement de tirer avantage de cette deuxième limitation pour contourner la première limitation présentée. A partir des mêmes images utilisées pour faire le calcul MSDWS, le traitement SVS permet, en mesurant le contraste des images, de mesurer des déplacements colloïdaux se déroulant sur des durées inférieures à T_F.

1.7 Speckle Visibility Spectroscopy (SVS)

Le principe de la technique Speckle Visibility Spectroscopy proposée par le professeur Durian [3] est de quantifier l'impact de la dynamique colloïdale

sur le "flou" de la figure d'interférence[21] et d'obtenir des **informations sur la dynamique des particules à des temps intermédiaires entre les techniques DWS et MSDWS**. Revenons aux équations pour présenter quantitativement cette mesure. En un point M de la figure d'interférence, l'intensité $\widetilde{I}_M(t_0)$ enregistrée par la caméra en un instant t_0 est proportionnelle à l'intégrale de l'intensité immédiate $I_M(t)$:

$$\widetilde{I}_M(t_0) = \int_{t_0}^{t_0+T_{shutter}} I_M(t)dt$$

La grandeur mesurée expérimentalement est nommée *variance normée*, V_2, elle est égale au contraste de l'image renormé par le coefficient β introduit dans la relation de Siegert (1.36) :

$$V_2 = \frac{1}{\beta}(\frac{< [\widetilde{I}_M(t_0)]^2 >_M}{[< \widetilde{I}_M(t_0) >_M]^2} - 1)$$

L'interprétation du lien entre cette grandeur et le déplacement des particules est simple : si les diffuseurs sont fixes durant $[0, T_{shutter}]$ la figure d'interférence est fixe et son contraste est élevé, par contre si les diffuseurs bougent la figure d'interférence est modifiée et l'image présente un faible contraste. Bien que nous soyons en champ lointain la moyenne sur M dans V_2 permet comme pour R_I d'avoir une expression sensible au déplacement microscopique de l'échantillon plutôt qu'à la taille de la cellule ou la distance à la cellule.

Si $< I_M(t) >_M$ est stationnaire sur $[t_0, t_0 + T_{shutter}]$ alors

$$V_2 = \frac{1}{{T_{shutter}}^2} \int_{t_0}^{t_0+T_{shutter}} \int_{t_0}^{t_0+T_{shutter}} \frac{1}{\beta}(R_I(t,t') - 1)dtdt' \quad (1.49)$$

Dans le cas où $R_I(t,t') = R_I(\mid t' - t \mid)$ l'expression précédente se simplifie :

$$V_2 = \frac{1}{T_{shutter}} \int_0^{T_{shutter}} \frac{2}{\beta}(1 - \frac{\tau}{T_{shutter}})(R_I(\tau) - 1)d\tau \quad (1.50)$$

En jouant sur $T_{shutter}$ il est donc théoriquement possible d'obtenir $R_I(t,t')$ sur la gamme de temps accessible à $T_{shutter}$. Cette gamme de temps accessibles permet d'accéder à des informations sur la dynamique colloïdale à des temps bien plus courts que ne peuvent le faire les mesures MSDWS. De plus **la SVS "hérite" de la MSDWS sa capacité d'étudier des phénomènes non stationnaires**.

[21] Avant le développement des correlateurs rapides, une version "monospeckle" de ce principe fut utilisée [8].

1.8 Conclusion

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre au phénomène de diffusion multiple de la lumière cohérente par une dispersion colloïdale.

Depuis le début des années 1990, la théorie DWS permet d'interpréter les mesures monospeckle [10]. Dans les expériences DWS, on enregistre les fluctuations temporelles d'un point de la figure d'interférence pour réaliser ensuite l'autocorrélation temporelle du signal enregistré. La théorie DWS a été historiquement développée pour étudier des déplacement de type agitation brownienne, elle permet typiquement de déduire un coefficient de diffusion à partir d'une courbe d'autocorrélation temporelle.

Depuis le début des années 2000, plusieurs équipes réalisent des mesures multispeckle où la figure d'interférence est enregistrée à différents instants grâce à une caméra. Dans cette technique appelée MSDWS, l'évolution de la figure d'interférence est calculée en comparant point à point les images. La méthode de calcul permet dans le cas de déplacement brownien d'avoir des mesures MSDWS qui se rapprochent analytiquement des mesures DWS. Dans ce cas particulier de déplacement brownien les courbes MSDWS peuvent être interprétées grâce à la théorie DWS. Cette équivallence a été démmontrée analytiquement dans ce chapitre, à notre connaissance c'est la première fois que ce travail est publié avec ce niveau de détail.

Aux temps considérés en MSDWS et aux concentrations couramment rencontrés, peu de systèmes ont des déplacments browniens. Le plus souvent, les courbes MSDWS ne sont pas interprétables par la théorie DWS. C'est d'autant plus frustrant pour l'expérimentateur que l'on obtient assez "facilement" des courbes en MSDWS. Ayant réalisé un grand nombre d'expériences et de montages MSDWS durant le travail de doctorat, nous avons été naturellement amenés à développer une théorie spécifique à la MSDWS. Cette théorie s'est bien évidemment inspirée de la théorie DWS [10], nous avons tenté de développer les calculs pas à pas pour bien faire ressortir les ressemblances et les différences avec la théorie DWS. Afin de sortir du cadre limité des déplacements browniens, nous proposons une méthode détaillée permettant de faire le lien entre un modèle de déplacement quelconque et les mesures MSDWS. Un article scientifique est en cours de rédaction afin de valoriser ce travail théorique.

Bibliographie

[1] L.Cipelletti, D.A.Weitz Ultralow-angle dynamic light scattering with a charge coupled device camera based multispeckle, multitau correlator . *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, **70**, *8*, 3214-3221, 1999.

[2] D.J.Durian Influence of boundary reflection and refraction on diffusive photon transport. *PHYSICAL REVIEW E*, **50**, *2*, 857-866, 1994.

[3] P.K.Dixon, D.J.Durian Speckle visibility spectroscopy and variable granular fluidization. *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, **90**, *18*, 184302, 2003.

[4] J.C.Dainty Laser Speckle and related phenomena. *Ed. Springer Verlag*, 1975.

[5] J.W.Goodman Statistical Optics. *Ed. Wiley-Interscience*, 1985.

[6] H.S.Carslaw, J.C.Jeager Conduction of heat in solids. *Ed. Oxford University Press*, 1955.

[7] A.Kastler La diffusion de la lumière par les milieux troubles. *Ed. Hermann*, 1952.

[8] E.Jakeman, C.J.Olivier, E.R.Pike A measurement of optical linewidth by photon-counting statistics. *JOURNAL OF PHYSICS PART A*, **1**, 406-408, 1968.

[9] X.L.WU, D.J.Pine, P.M.Chaikin Diffusing wave spectroscopy in a shear-flow. *JOURNAL OF THE OPTICAL SOCIETY OF AMERICA B*, **7**, *1*, 15-20, 1990.

[10] D.A.Weitz, D.J.Pine Dynamic Light Scattering : the methods and some applications. *Ed. Oxford University Press*,652-720, 1993.

[11] J.Ricka Neutron, X-rays and Light : Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter. *Ed. North Holland Delta Series*, 481-515, 2002.

[12] K.Schätzel Noise in Photon Correlation and Photon Structure Functions. *Journal of Modern Optics*, **30**, *2*, 155-166, 1983.

[13] H.L.Van de Hulst Light scattering by small particles. *Ed. John Wiley*, 1957.

[14] V.Viasnoff, F.Lequeux, D.J.Pine Multispeckle diffusing-wave spectroscopy : A tool to study slow relaxation and time-dependent dynamics. *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, **73**, *6*, 2336-2344, 2002.

[15] D.A.Weitz, D.J.Pine, J.X.Zhu, D.J.Durian, H.Gang Diffusing Wave Spectroscopy : the technique and some applications. *PHYSICA SCRIPTA*, **49**, 610-621, 1993.

[16] M.Born, E.Wolf Principles of Optics. *Ed. Cambridge University Press*, 1959.

Chapitre 2

Transition d'encombrement dans une dispersion colloïdale concentrée étude multispeckle

L'étude qui suit découle du travail amont réalisé par Didier Lootens et Pascal Hébraud en 2005 [1, 2]. Ce chapitre présente le montage expérimental que j'ai réalisé et les résultats des expériences menées par David Lasne et Francesca Ianni.

2.1 Présentation générale du phénomène

Les propriétés rhéologiques des suspensions concentrées diffèrent fortement de celles des suspensions diluées [3]. En effet, on peut aisément imaginer que lorsqu'on se rapproche de la fraction volumique maximale[1] ϕ_m , les effets stériques vont dominer les autres interactions et modifier le comportement du fluide [4]. Lorsqu'une suspension concentrée est sous contrainte, elle peut cesser de s'écouler au-delà d'une contrainte critique. Ce phénomène particulier est appelé **transition d'encombrement** ou "jamming". Nos expériences ont pour but d'étudier la suspension colloïdale concentrée dans cet état "coincé" [2]. Ce phénomène de jamming est bien connu d'un point de vue pratique mais ses origines et ses caractéristiques physiques sont encore imprécises. Des simulations numériques prédisent, sous écoulement, la formation d'agrégats responsables du coïncement des systèmes [5, 6, 7]. L'organisation des particules sous écoulement a été confirmée par des mesures rhéologiques [9] et des observations de la structure par les techniques de diffusion du rayonnement [10].

[1]Pour un empilement aléatoire, la fraction volumique est proche de 0,63)

L'objectif de notre étude fut de parvenir à recréer le phénomène de transition d'encombrement sur un système modèle, à savoir une suspension de billes micrométriques de silice, afin de pouvoir mesurer le temps de vie de cet état "coincé" . En pratique, on observe que si l'on applique une forte contrainte à l'aide d'une spatule, la suspension se bloque, et il lui faut quelques secondes pour retrouver son état fluide [11].

L'idée était donc d'utiliser un rhéomètre à contrainte imposée afin de se placer dans cet état, puis de relâcher cette contrainte et d'observer la relaxation de la suspension par des méthodes de diffusion multiple.

2.1.1 Suspensions concentrées de silice

Pour toutes les expériences, les suspensions sont préparées au laboratoire, afin d'obtenir des particules parfaitement identifiées, de taille choisie, et monodisperses. Les billes de silice sont synthétisées selon la méthode de Stöber [12, 13], à partir du tétraéthoxysilane (TEOS) de formule $Si(OEt)_4$, en milieu basique dans un mélange d'éthanol, d'eau et d'ammoniaque.

On forme lors de la première injection des nuclei dont la taille varie, notamment avec la température [14]. Lors des ajouts suivants, la réaction a lieu à la surface de ces noyaux et on ne forme pas de nouvelles particules. Ce phénomène est essentiel car il nous garantit une très faible polydispersité (Fig.2.1).

La distribution des diamètres des billes de la suspension synthétisée est mesurée par des mesures de diffusion de la lumière (DLS), la fraction volumique des dispersions est obtenue par une mesure d'extrait sec.

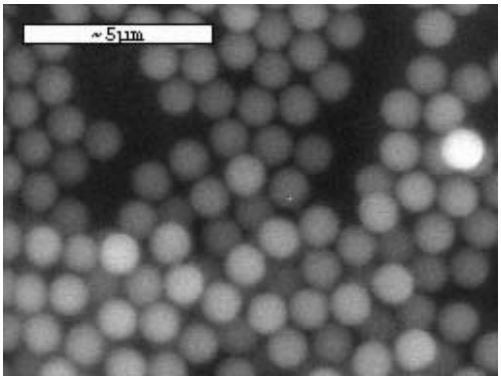


FIG. 2.1 – Billes de silice de $0,5\mu m$ de rayon, synthétisées suivant le protocole de Stöber [12]. Cliché pris au microscope électronique à balayage.

2.1.2 Rhéologie de la transition d'encombrement

Les comportements rhéologiques des suspensions colloïdales concentrées sont étudiés depuis une trentaine d'années. Les principales constatations sont [11] :

- un comportement rhéo-fluidifiant ou "shear thinning" (la viscosité diminue avec la contrainte) pour les faibles taux de cisaillement ;
- aux forts taux de cisaillement, selon la concentration et la nature des interactions entre les particules, soit un comportement rhéo-épaississant (ou "shear thickening"), soit une transition vers un état "pâteux" appelée transition d'encombrement (ou "jamming") au delà d'un certain seuil.

Le dispositif expérimental est constitué d'un rhéomètre à contrainte imposé (Carrimed) relié à un ordinateur. Un logiciel permet de piloter le système, de collecter les données, à savoir le déplacement de la géométrie, et de calculer ainsi toutes les grandeurs caractéristiques de l'écoulement de Couette... Les mesures ont été faites avec une cellule de Couette à cuve en plexiglas dont transparence est nécessaire pour les études optiques et à cylindre central en Duraluminium.

Dans le graphe (Fig.2.2) est présentée la réponse en taux de déformation ($\dot{\gamma}$) du système à une rampe de contrainte (σ) allant de 0 à 50 Pa en 2 min, suivie d'un pallier à 50 Pa pendant 30 s et conclu par une rampe de contrainte décroissante. On observe bien les comportements attendus, à savoir :

- un comportement rhéo-fluidifiant entre 0 et 20 Pa ;
- une transition d'encombrement au-delà d'un seuil : à contrainte donnée, le gradient de cisaillement fluctue énormément.

On peut retrouver ces effets en traçant la viscosité relative $\eta = \sigma/\dot{\gamma}$ en fonction de la contrainte (Fig.2.3).

Enfin, on peut regarder un peu plus en détail les fluctuations du gradient de vitesse, et donc de la viscosité, en fonction du temps, pour une contrainte donnée (ici, 50 Pa) ; on est cependant limité par la fréquence d'échantillonnage du rhéomètre qui est de 1 Hz (Fig.2.4). On remarque que la vitesse fluctue énormément.

Les premiers travaux effectués au sein de l'équipe ont consisté à étudier cette transition d'encombrement en fonction du cisaillement, au moyen d'un rhéomètre à vitesse imposée et ont été réalisées par Didier Lootens au cours de sa thèse. Ils ont en particulier mis en évidence des fluctuations de contrainte qui deviennent très importantes au-delà d'un seuil de cisaillement. Lorsque l'on continue à augmenter la vitesse, la contrainte moyenne continue à évoluer avec $\dot{\gamma}$. La distribution statistique de la contrainte a été

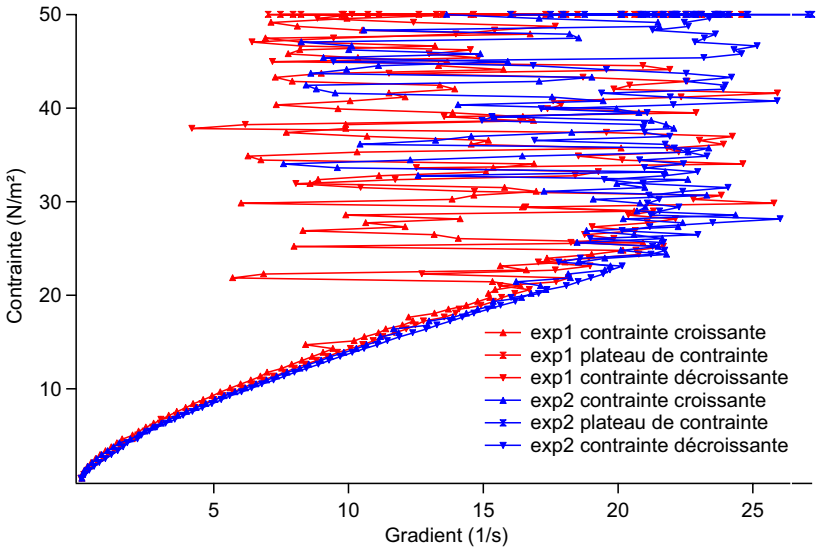


FIG. 2.2 – Relation contrainte-gradient pour une suspension aqueuse de billes de silice soumise à une rampe de contrainte. Le rayon des billes est de $a = 0,5\ \mu$ et la fraction volumique de la suspension est de $\phi = 0.5$

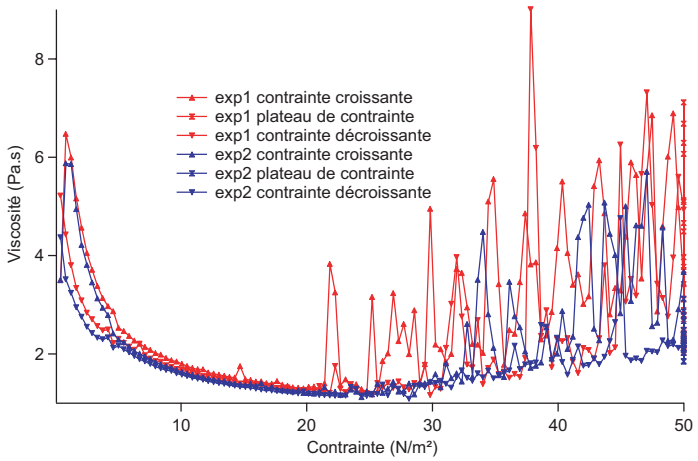


FIG. 2.3 – Relation viscosité-contrainte pour une suspension de particules de silice dans de l'eau, $a = 0,5\ \mu$m, $\phi = 0.5$

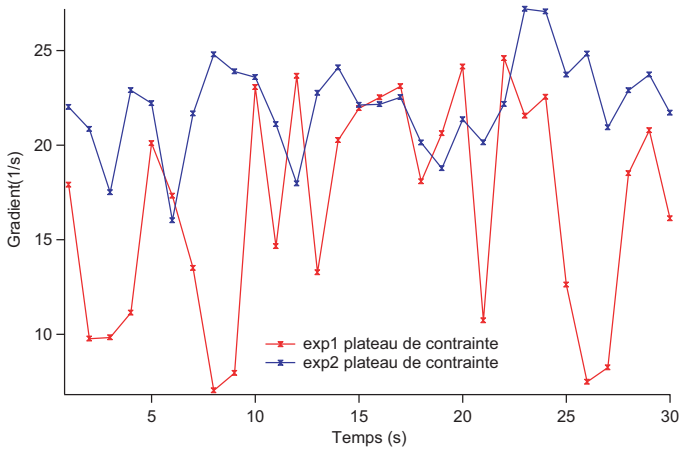


FIG. 2.4 – Fluctuations de vitesse à contrainte constante (50 Pa) : "jamming"

étudiée et les phénomènes observés rappellent bien ceux que l'on trouve lors d'une transition de phase, mais aussi dans certains systèmes granulaires [2]. Ce n'est d'ailleurs pas un hasard, le système étudié est à la frontière entre les suspensions colloïdales et les milieux granulaires.

Il a été mis en évidence que cette transition écoulement plastique/encombrement ne dépend pas des effets thermiques et ne résulte pas d'une compétition entre ces effets et le cisaillement. En particulier, la contrainte seuil dépend peu de la taille des particules mais la fraction volumique joue un rôle central.

Par ailleurs, l'état de surface des particules est un paramètre critique dans le phénomène. Ceci à été vérifié en modifiant l'état de surface des particules de silice au moyen de traitements secondaires. Les billes de silice ont été rendues rugueuses par l'addition de soude qui attaque la surface de silice (la rugosité passe alors de 1 nm à 5 nm environ après traitement à la soude, d'après de observations au microscope à force atomique [1]. En comparant des suspensions de billes de rugosités différentes mais de fraction volumique voisines, on constate que le seuil de la transition est fortement abaissé pour des billes à forte rugosité : il est d'environ 3 Pa.

L'interprétation microscopique de ce phénomène est encore sujette à débat. On trouve essentiellement deux modèles. Le premier, proposé par Hofmann [15], considère que sous l'effet du cisaillement, les particules s'organisent en couches qui glissent les unes sur les autres, ce qui explique le comportement rhéo-fluidifiant. A fort cisaillement, une transition ordre-désordre, dans laquelle les couches se mélangent, expliquerait le rhéo-épaississement.

Une seconde théorie suppose que sous l'effet du cisaillement se forment des agrégats réversibles qui grossissent [5, 16, 17] et rendent la suspension plus visqueuse (les agrégats étant des objets fractaux, donc très "creux", ils se comportent comme de grosses particules dont le volume est bien supérieur à la somme des volumes des billes agrégées, d'où une fraction volumique effective plus importante).

Le projet initial consistait à étudier la relaxation du système après l'avoir complètement figé sous une contrainte imposée. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à bloquer le système pendant des temps longs comme nous l'espérions car lorsque le système se bloque, le glissement aux parois fait diminuer brusquement la contrainte et le système relaxe. De plus, le dispositif de Couette ne permet d'appliquer qu'une contrainte de cisaillement, et il semble qu'une contrainte de compression entraîne des effets beaucoup plus importants.

Nous avons donc choisi d'étudier la relaxation des agrégats qui se forment dès que la contrainte est supérieure à la contrainte seuil de la suspension, qui vaut dans notre cas environ 20 Pa. Le blocage ou non de la suspension dépend des agrégats, de leur nombre et de leur taille : s'ils parviennent à percoler sur toute l'épaisseur de la cellule de cisaillement, on observe le phénomène d'encombrement. Le principe des expériences menées (sur une suspension de billes de silice de 0,54 μm de rayon et à une fraction volumique $\phi = 50\%$) reposera donc principalement sur l'application d'une contrainte importante ($\sigma > \sigma_c$) pendant un certain temps, puis un retour à une contrainte faible ou nulle ($\sigma < \sigma_c$ ou $\sigma = 0$), en observant cette relaxation par des méthodes optiques.

2.2 Methode optique adaptée

Afin de pouvoir observer la suspension sous cisaillement nous utilisons un rhéomètre avec une géométrie couette où le stator d'origine (le cylindre extérieur) est remplacé par un stator en plexiglass. L'indice optique des billes de silice étant voisin de 1.44, les suspensions aqueuses concentrées de billes de silice sont turbides et permettent les études par diffusion de la lumière. La distance de persistance l^* étant typiquement de l'ordre de $100\mu m$, un entrefer de $5mm$ suffit largement pour se placer dans des conditions de diffusion multiple.

La dynamique de la figure d'interférence crée par la lumière rétrodiffusée peut être étudiée par les trois techniques de diffusion multiple présentées dans le chapitre 1 : DWS, MSDWS et SVS. La technique monospeckle DWS va nous permettre d'étudier la dynamique des particules

dans la suspension au repos. C'est toutefois les techniques multispeckle SVS

Deux ordres de grandeur déterminent la technique qui sera la plus adaptée à notre problématique :

- une première estimation[2] du temps caractéristique mis par une particule pour se déplacer de λ donne $1ms$ pour des billes de silice de $500nm$ de rayon.
- le temps caractéristique de l'évolution des fluctuations de contrainte qui passer en dessous de la seconde d'après les mesures de rhéologie.

Le premier temps caractéristique indique la sensibilité temporelle nécessaire à la mesure. En raison de la faible fréquence d'image permise par les caméras disponibles pour le montage expérimental, cette sensibilité ne peut être atteinte en pratique par la technique MSDWS, par contre les techniques SVS et la technique DWS en sont capables. Toutefois pour mesurer un temps caractéristique correspondant à $1ms$ la technique DWS nécessite typiquement la réalisation d'une moyenne temporelle sur $10^4 * 10^{-3} = 10s$, intervalle supérieur à la durée de la plupart des fluctuations de contrainte observées. A contrario **la technique SVS** ne fait pas intervenir de moyenne temporelle, elle est particulièrement adaptée à la mesure de phénomènes non stationnaires, c'est cette technique de nous utilisons.

2.2.1 Montage expérimental

Le montage présenté dans la figure 2.5 permet de soumettre un échantillon turbide à un cisaillement et de mesurer simultanément sa réponse mécanique et sa dynamique microscopique grâce à la technique de Speckle Visibility Spectroscopy (SVS). L'avantage de ce montage est d'offrir des informations sur la dynamique microscopique des diffuseurs de l'échantillon en complément des mesures mécaniques macroscopiques. Dans les sections suivantes nous allons décrire les expériences faites sur des suspensions concentrées de latex et des suspensions concentrées de silice. Toutes ces expériences sont réalisées dans la même géométrie de Couette.

Le point clef du **réglage** est d'avoir un grand nombre de zones de cohérences sur le capteur CCD de la caméra. Il suffit de disposer la caméra à une distance suffisante de la cellule ou de réduire la taille du volume illuminé par le laser (cf Eq.1.17). Ce réglage est insensible à la nature de l'échantillon, il suffit d'utiliser un échantilon à dynamique très lente et de jouer sur les éléments du montage afin d'optimiser la taille des zones de cohérence. Le

[2]Cette estimation repose sur une hypothèse de régime de diffusion brownienne des particules dans de l'eau, en régime concentré les particules ressentiront en fait rapidement l'encombrement du à leur voisines, le temps donné est une surestimation du temps réel.

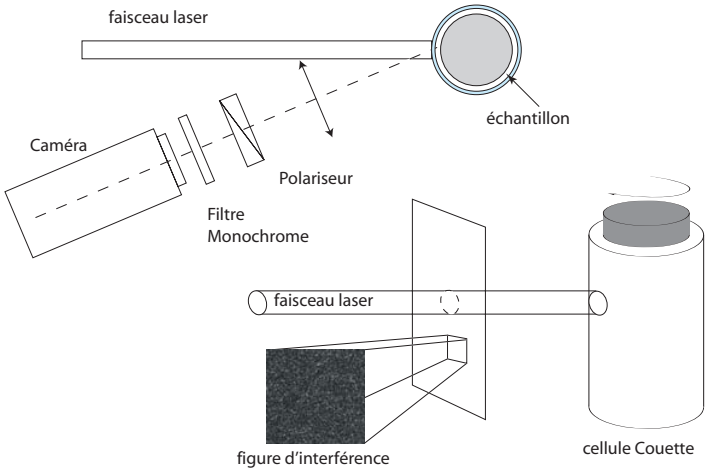


FIG. 2.5 – Vue schématique de dessus et de côté du montage expérimental permettant d'utiliser la technique SVS sur un échantillon sous cisaillement contrôlé. L'échantillon turbide est illuminé par un faisceau laser et la caméra du montage nous permet d'étudier la dynamique de la figure d'interférence crée par la suspension sous contrainte.

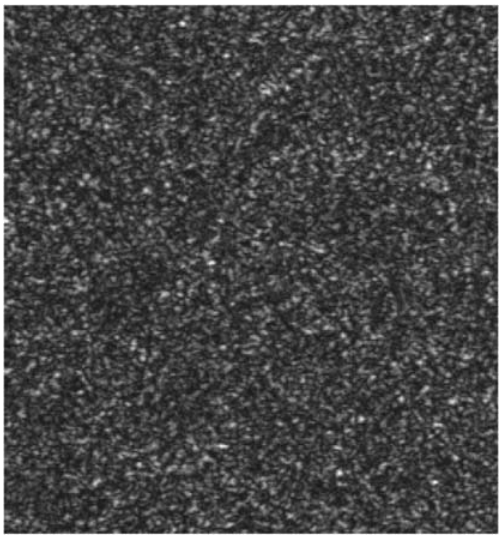


FIG. 2.6 – Figure d'interférence crée par un échantillon turbide solide

programme développé par nos soins[3] permet d'observer en temps réel cette grandeur grâce au calcul de la corrélation spatiale des images reçues. L'affichage de l'histogramme de distribution des niveaux de gris sur la figure d'interférence permet d'affiner ce réglage, grâce au polariseur il est possible de s'approcher de la décroissance exponentielle prévue par la théorie. Enfin il est nécessaire de s'assurer que la figure d'interférence enregistrée n'est pas perturbée par les réflexions du faisceau laser qui interviennent au niveau de la cellule. Le plus pratique est d'utiliser un échantillon dont la dynamique est rapide devant le temps caractéristique de la caméra et de s'assurer que l'intensité est uniforme sur toute l'image.

2.2.2 Dispersion au repos

DWS

Suite à des mesures de flux transmis et à un étalonnage grâce à des suspensions de latex diluées, nous avons pu mesurer la longueur de persistence optique l^* de la suspension étudiée :

$$l^* = 93 \pm 4 \ \mu m \tag{2.1}$$

Cette grandeur nous permet d'interpréter les mesures de DWS faites sur la suspension au repos (Fig.2.7). A petite échelle, on trouve une pente 1/2, caractéristique d'un mouvement brownien. On peut en déduire un coefficient de diffusion à petite échelle : $D_{SiO_2,\ \phi=0.5} = 6,1.10^{-14}$ m^2.s^{-1}. Celui-ci est beaucoup plus faible que pour une suspension diluée : $D_{SiO_2,\ \phi\to 0} = 3,9.10^{-13}$ m^2.s^{-1}. Ceci est valable jusqu'à une dizaine de nanomètres. Au-delà, le système est sous-diffusif, avec une pente qui diminue (elle vaut environ 0,2 sur la dernière décade observable). On a donc un **effet de "cage"** [8]. Pour les petits déplacements, une particule diffuse librement, mais sa dynamique est ralentie par la présence de ses voisines. Par contre, sur des temps plus longs (de l'ordre de la ms, pour des déplacements d'une dizaine de nm), elle explore des distances suffisamment grandes pour être fortement perturbée par les billes qui l'entourent.

2.2.3 SVS

Même dans une suspension au repos, le contraste de la figure d'interférence varie avec le temps d'exposition de la caméra en raison de l'agi-

[3]L'acquisition se fait par une caméra Pulnix 9701 et une carte National Instrument PCI-1422. Le programme d'interfaçage a été développé sous l'environnement Labwindows.

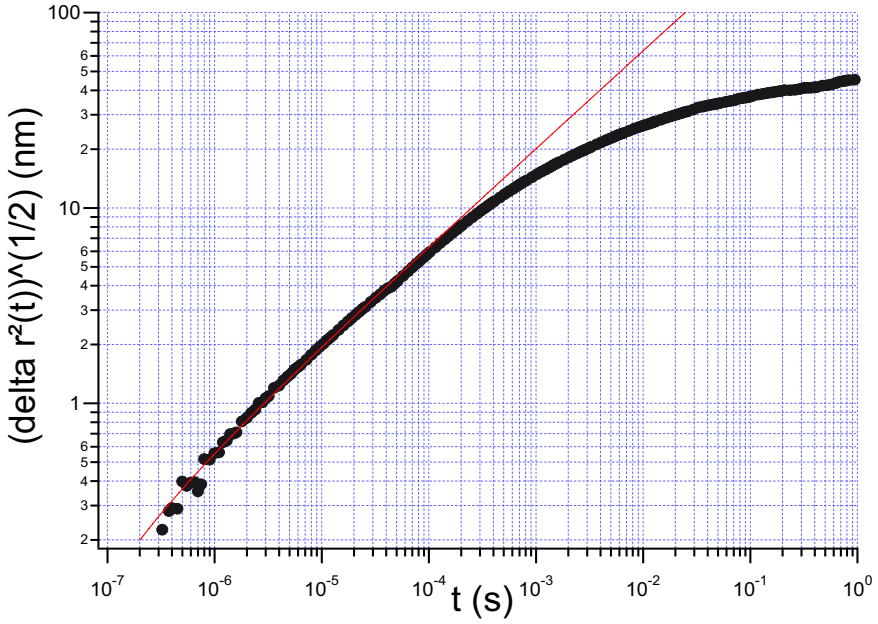


FIG. 2.7 – Déplacement quadratique moyen des diffuseurs d'une suspension aqueuse de silice de fraction volumique voisine de 54%. Ce déplacement quadratique Δrest obtenu à partir de mesures de DWS sur la suspension au repos, au temps courts le déplacement suit une loi de puissance 1/2 tracée en rouge.

tation thermique des diffuseurs dans l'échantillon et de leur dynamique microscopique (Fig.2.5,Fig.2.8). Dans le chapitre consacré à la théorie de la diffusion multiple multispeckle nous avons montré que la variance normée $V_2(T)$ mesuré par la technique SVS est une forme intégrée de la fonction d'autocorrélation MSDWS :

$$V_2(T_{shutter}) = \frac{1}{T_{shutter}} \int_0^{T_{shutter}} \frac{2}{\beta}(1 - \frac{\tau}{T_{shutter}})(R_I(\tau) - 1)d\tau \qquad (2.2)$$

Ici on peut même montrer que la variance normée est une forme intégrée de la fonction d'autocorrélation que l'on peut mesurer en DWS [3] :

$$V_2(T_{shutter}) = \frac{1}{T_{shutter}} \int_0^{T_{shutter}} \frac{2}{\beta}(1 - \frac{\tau}{T_{shutter}})(g_{DWS}(\tau) - 1)d\tau \qquad (2.3)$$

On peut ainsi tester la cohérence des mesures SVS avec la mesure DWS, il suffit d'intégrer numériquement la fonction d'autocorrelation $g_{DWS}(\tau)$ pour obtenir pour obtenir des valeurs $V2_{THEO}$ (2.3). Dans la figure 2.8, nous avons confrontées ces valeurs $V2_{THEO}$ avec les mesures de variance $V2$ obtenues en calculant le contraste de la figure d'interférence pour des temps de pose différents. Cependant, afin d'aligner ces points théoriques avec les résultats expérimentaux, il faut leur appliquer un facteur multiplicatif (qui se justifie par le rapport des facteurs Siegert entre les deux dispositifs), mais aussi ajouter une constante qui n'a pas de justification évidente. On obtient alors un bon accord avec les points à temps courts et un peu moins bon aux temps longs[4].

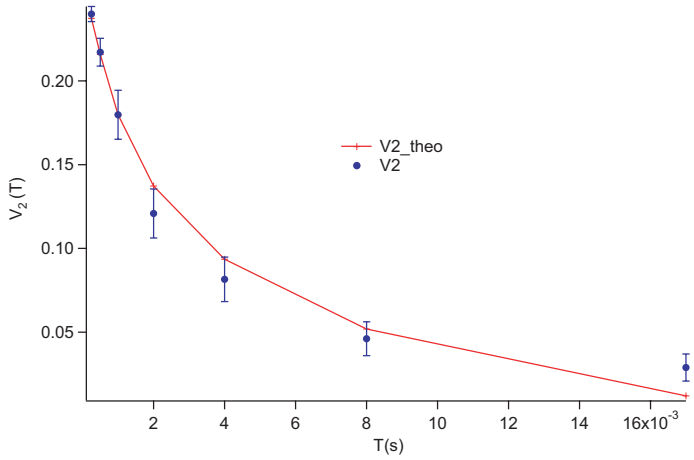


FIG. 2.8 – En bleu : mesure de variance normée de la figure d'interférence crée par une suspension au repos pour différentes durées d'exposition. En rouge : contraste calculé à partir des mesures de DWS (Eq.2.3).

2.2.4 Dispersion sous faible cisaillement

On peut appliquer la technique de SVS dans le cas d'une suspension sous faible cisaillement, afin de vérifier la validité de l'étude proposée. Pour ces faibles contraintes on n'observe pas d'encombrement de la suspension qui s'écoule à un gradient de vitesse $\dot{\gamma}$ stationnaire. Dans ces **conditions**

[4]Ce décrochage est compréhensible car l'incertitude sur $g_{DWS}(t)$ est beaucoup plus importante aux temps longs).

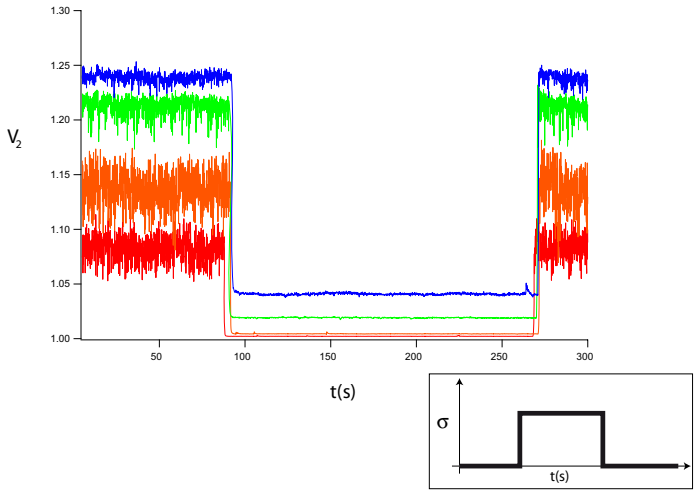


FIG. 2.9 – Evolution du contraste en réponse à un créneau de cisaillement de $5Pa$ schématiquement décrit en insert. Les courbes diffèrent par le temps d'exposition des images (1/4000s,1/2000s,1/1000s, 1/500s) ; plus le temps d'exposition est court plus le contraste est élevé. Au repos les courbes sont beaucoup plus bruitées que sous cisaillement.

d'écoulement stationnaire, le contraste de la suspension, V_2, diminue pour atteindre une valeur stable durant l'application de la contrainte (Fig.2.9).

Pour différents temps de pose T (de 1/4000 à 1/250 s) et différents taux de cisaillements connus (le rhéomètre impose la contrainte de 5, 10, 15 ou 20 Pa on a mesuré le $\dot{\gamma}$), nous avons mesuré le contraste V_2 pendant le cisaillement.

Dans la partie théorique nous avons modélisé le contraste MSDWS d'une suspension sous cisaillement uniforme, on a par conséquent en SVS [3] :

$$V_2(T) = 2B\frac{\exp(-2\chi\dot{\gamma}T) - (1 - 2\chi\dot{\gamma}T)}{(2\chi\dot{\gamma}T)^2} \tag{2.4}$$

où $\chi = \alpha\frac{k_0 l^*}{\sqrt{10}}$.

Dans la pratique, on utilisera pour V_2 une expression sous la forme :

$$V_2(\dot{\gamma}, T) = A + 2B\frac{\exp(-2\chi\dot{\gamma}T) - (1 - 2\chi\dot{\gamma}T)}{(2\chi\dot{\gamma}T)^2} \tag{2.5}$$

où A et B sont des constantes liées au dispositif expérimental. Nous pouvons réunir toutes les mesures sur une **courbe maîtresse** en traçant

V_2 en fonction de $\dot{\gamma}T$ (Fig2.10). On constate que les points expérimentaux s'accordent très bien avec la fonction (2.5, une procédure d'optimisation des paramètres nous donne $\chi = 729$. En prenant $\alpha = 1.7$, on trouve $l^* = 83$ μm, ce qui est en bon accord avec les mesures effectuées précédemment par une méthode complètement différente ($l^* = 93$ μm). Outre l'incertitude sur α, on peut attribuer la petite différence à de faibles hétérogénéités de $\dot{\gamma}$, et notamment un glissement aux parois : le gradient mesuré par le rhéomètre est légèrement supérieur à celui qui existe réellement dans la suspension, d'où une valeur de l^* trop faible. Cependant, ces effets restent faibles, et cette expérience valide le raisonnement précédent.

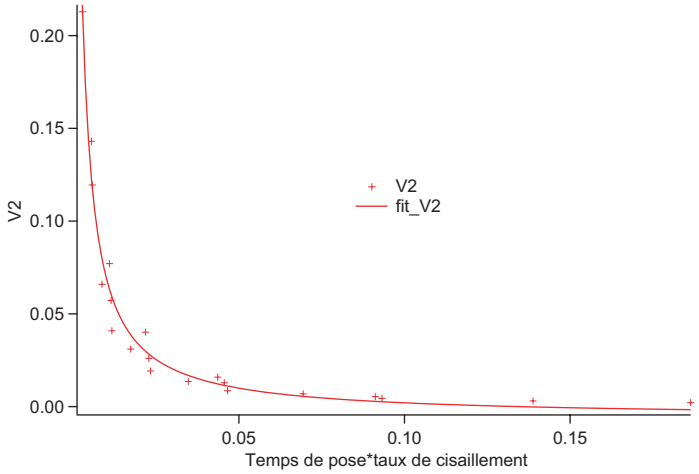


FIG. 2.10 – Courbe maîtresse permettant de vérifier que la mesure SVS mesure bien le déplacement des particules sous cisaillement.

2.3 Dispersion sous fort cisaillement

Intéressons nous à la réponse de la suspension à un créneau où la suspension est soumise à un cisaillement de $250Pa$ pendant une durée T de $65s$ (Fig.2.11). Les mesures sont effectuées en fixant $Tshutter$, les variations de V_2 sont donc dues à des variations de la dynamique des particules pour ce temps caractéristique.

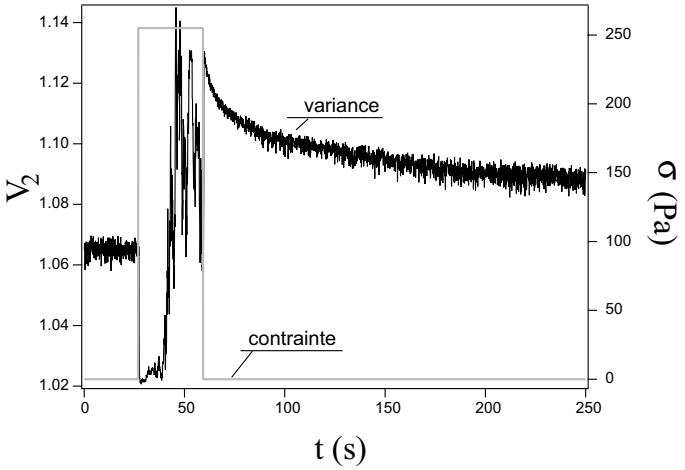


FIG. 2.11 – Evolution de la variance de la figure d'interférence pour une suspension concentrée soumise à un fort cisaillement.

2.3.1 Mise en évidence de la transition d'encombrement

Soumise à des contraintes importantes, la suspension s'oppose fortement à son écoulement, la réponse à la contrainte n'est plus un écoulement stationnaire : l'écoulement devient saccadé. Pendant le cisaillement la visibilité fluctue énormément. Un phénomène particulièrement surprenant est l'apparition de valeurs de visibilités supérieures à celles avant l'application de la contrainte (Fig.2.11). En ces instants la suspension est dans un état encombré et l'écoulement mesuré est nul, par conséquent le contraste mesuré traduit principalement l'agitation des particules dans la suspension sous le seul effet de l'agitation thermique. Ces pics de visibilité supérieurs à la visibilité à l'état dispersé montrent qu'au moins une partie des particules de la suspension de l'état encombré appartiennent à des zones de dynamique gelée, ces zones sont appelés *agrégats dynamiques*. Le blocage de l'écoulement est interprété comme le signe qu'un agrégat dynamique de la suspension s'étend sur tout l'entrefert de la cellule de Couette.

2.3.2 Relaxation de l'état encombré

Dans la courbe 2.11 on observe clairement une relaxation de la variance normée quand on relâche la contrainte appliquée à la suspension. Nous avons

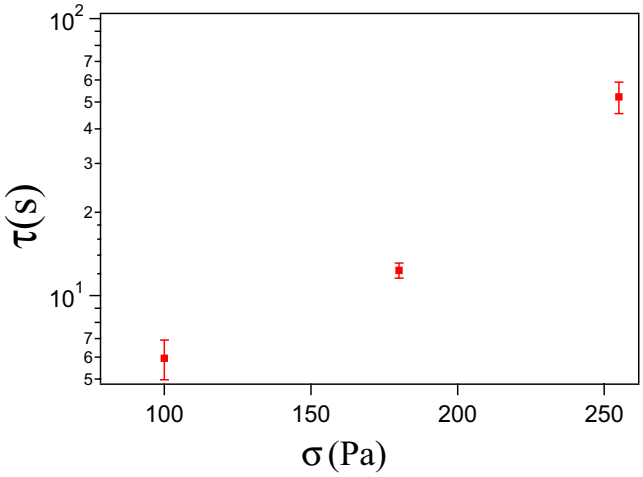


FIG. 2.12 – Evolution du temps de relaxation de l'état jammé en fonction de la contrainte responsable de l'encombrement

tenté d'étudier la relaxation de ces agrégats dynamiques en considérant la visibilité après le créneau de cisaillement. La valeur de la visibilité après le créneau et son évolution se révèlent complexes à analyser quantitativement car les profils de visibilités obtenus sont très variables. Nous attribuons cette variabilité au fait que les agrégats dynamiques créés lors de l'encombrement ne se trouvent pas forcément dans la zone illuminée par le laser. En ne retenant que les relaxations significatives et en moyennant les temps de relaxation mesurés [18], nous avons pu observer que le temps de relaxation augmente fortement avec la contrainte responsable de l'encombrement.

2.4 Conclusion

Grâce à une approche expérimentale originale, couplant rhéologie et diffusion multiple multispekle, nous sommes parvenus à mettre en évidence la formations d'agrégats réversibles lors du phénomène de transition d'encombrement. Dans ces suspensions colloïdales concentrées les mesures optiques multispeckle ont permis d'étudier non-invasivement la relaxation des agrégats formés. Ce travail a donné lieu à deux publications [18, 19].

Bibliographie

[1] D.Lootens, H.van Damme, Y.Hémar, P.Hebraud Dilatation flow of concentrated suspensions of rough particles. *Physical Review Letters*, **ç(**, 268302, 2005.

[2] D.Lootens, H.van Damme, P.Hebraud Giant stress fluctuations at the jamming transition. *Physical Review Letters*, **90**, *17*, 178301, 2003.

[3] J.Bergenholtz Theory of rheology of colloïdal suspensions. *Currrent Opinion in Colloid and Interface Science*, **6**, *5-6*, 484-488, 2001.

[4] B.J.Maranzano, N.J.Wagner The effects of particle size on reversible shear thickening of concentrated colloidal dispersions. *Journal of Chemical Physics*, **441**, *23*, 10514-10527, 2001.

[5] R.S.Fall, J.R.Melrose, R.C.Ball Kinetic theory of hard spheres startup flows. *Physical Review E*, **55**, *6*, 7203-7211, 1997.

[6] J.R.Melrose, J.H.van Vliet, R.C.Ball Continuous shear thickening and colloïd surfaces. *Physical Review Letters*, **77**, *22*, 4660-4663, 1996.

[7] J.R.Melrose, R.C.Ballz Continuous shear thickening transitions in model concentrated colloids. The role of interparticle forces. *Journal of Rheology*, **48**, *5*, 937-960, 2004.

[8] P.N.Segrè ,S.P.Meeker, P.N.Pusey, W.C.K.Poon Viscosity and structural relaxations in suspensions of hard-spheres colloids. *Physical Review Letters*, **75**, *5*, 958-961, 1995.

[9] F.Gadala, A.Acrivos Shear-induced structure in a concentrated suspension of solid spheres. *Journal of Rheology*, **24**, *6*, 799-814, 1980.

[10] B.J.Maranzano, N.J.Wagner Flow-small angle neutron scattering measurements of colloidal dispersion microstructure evolution through the shear thickening transition. *Journal of Chemical Physics*, **117**, *22*, 10291-10302, 2002.

[11] E.Bertrand, T.Bibette, V.Schmitt From shear thickening to shear-induced jamming. *Physical Review E*, **66**, *1*, 060401, 2002.

[12] W.Stöber, A.Fink Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloïds and Interface ScienceL*, **26**, 62-69, 1968.

[13] T.Sugomot Fine Particles : Synthesis, Characterization, and Mechanisms of Growth. *Surfactant Science Series*, **92**, 2000.

[14] D.Lootens Ciments et dispersions concentrées modèles. Ecoulement, encombrement et floculation. *Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie*, 2004.

[15] R.L.Hofmann Discontinuous and dilatant viscosity behavior in concentrated suspensions.I. Observation of a flow instability. *Transactions of the Society of Rheology*, **16**, *1*, 155-173, 1972.

[16] B.J.Maranzano, N.J.Wagner The effects of particle size on reversible shear thickening of concentrated colloidal dispersions. *Journal of Chemical Physics*, **441**, *23*, 10514-10527, 2001.

[17] B.J.Maranzano, N.J.Wagner The effects of interparticle interactions and particle size on reversible shear-thickening : hard-sphere colloidal dispersions. *Journal of Rheology*, **45**, *5*, 1205-1222, 2001.

[18] F.Ianni, D.Lasne, R.Sarcia, P.Hebraud Relaxation of jammed colloidal suspensions after shear cessation. *Physical Review E*, **74**, *1*, 2006. Physical Review E, vol. 74, Issue 1

[19] F.Ianni, D.Lasne, R.Sarcia, P.Hebraud Relaxation of Aggregates in a Jamming Colloidal Suspension After Shear Cessation. *Materials Research Society*, **9**, 0942, 2006.

Chapitre 3

Coagulation de dispersions colloïdales concentrées

Dans ce chapitre nous allons à nouveau étudier des suspensions colloïdales cocentrées sous contrainte. Contrairement à l'étude du chapitre précédent, où la contrainte était mécaniquement imposée, nous allons étudier des suspensions où l'augmentation de contrainte est interne au systèmes : nous allons étudier des suspensions colloïdales où les interactions entre particules sont de plus en plus attractives.

Si une suspension concentrée est déstabilisée, elle peut former un gel particulaire qui soutient sous propre poids. Pour des déstabilisations lentes et spatialement uniformes on parle de *coagulation*. Les gels particulaires formés sont omni-présents dans la vie courante (boues, sols) et la maîtrise du phénonème de coagulation de suspensions concentrées intervient dans de nombreux procédés industriels.

Si la coagulation des suspensions diluées est maintenant bien connue au niveau microscopique [11], la coagulation des suspensions concentrées reste à l'heure actuelle un domaine de recherche riche en mystères. D'un point de vue théorique on se retrouve rapidement dans des problématiques de systèmes à N-corps et au niveau expérimental ce n'est que récemment que des protocoles ont été développés pour obtenir des déstabilisations uniformes.

Notre étude se concentre sur une coagulation utilisée dans l'industrie des céramiques de haute technologie [3, 10]. Le système concerné présente l'avantage d'avoir déjà été étudié sous différents angles expérimentaux au cours de la précédente décennie. La somme de ces études dépasse le cadre de l'application industrielle et a permis d'améliorer la compréhension fondamentale de la déstabilisation de dispersions concentrées. Grâce aux techniques non invasives de diffusion multiple de la lumière que nous maîtrisons bien, nous avons tenté d'ajouter notre pierre à l'édifice en étudiant l'évolution de

l'agitation des particules de la suspension.

En mesurant l'agitation des particules, nous nous attendions à observer un ralentissement de progressif de leur dynamique au cours de la coagulation de la suspension [13]. Bien que nous ayons observé ce ralentissement global **nous avons eu la surprise d'observer que, lors de la coagulation, les particules peuvent se déplacer rapidement pendant de courtes périodes**. Ces déplacement interviennent ici de manière intermittente. La complexité de ce phénomène nous a poussé à dépasser les traitements classiques MSDWS, nous proposons donc une méthode orignale d'interprétation des données multispeckle. Cette méthode, intitulée 2D **M**ultispeckle **D**iffusing **W**ave **S**pectroscopy (2DMSDWS), nous a permis de caractériser la statistique temporelle du phénomène.

Nous avons fragmenté ce chapitre en trois sections : *la première section* décrit le procédé physico-chimique utilisé dans nos coagulations. Dans cette section est présentée un modèle thermodynamique simple permettant de faire ressortir quelques propriétés spécifiques aux suspensions concentrées. Nous présentons dans la *deuxième section* des articles publiés avant le début de ma thèse, grâce à ce bilan nous verrons en quoi les méthodes optiques de diffusion multiple de la lumière sont adaptées à l'étude du phénomène de coagulation. Le montage expérimental utilisé pour nos études est présenté dans la *troisième section*, où nous exposerons les résultats expérimentaux obtenus, notamment l'évolution du contraste des images enregistrées par la caméra (SVS) et l'évolution de la figure d'interférence au cours de la coagulation (MSDWS).

3.1 Coagulation d'une suspension concentrée

L'évolution microscopique des suspensions concentrées au cours d'une coagulation diffère fortement de celle des suspensions diluées. Dans une suspension stable où la fraction volumique est supérieure à 15% la distance entre particules voisines est inférieure à leur diamètre (pour une suspension à 50%, la distance moyenne entre les surfaces de particules de 300nm est de l'ordre de 10nm) ; ainsi chaque particule rencontre très souvent ses voisines sous l'effet de l'agitation thermique, on a ici un effet de cage. *A contrario*, dans une suspension diluée chaque particule doit se déplacer sur de grandes distances avant de rencontrer une autre particule.

Au cours de la coagulation d'une suspension, les interactions entre particules deviennent attractives. Dans les suspensions concentrées, de chaque particule forme rapidement un réseau compact avec ses voisines. Il y a peu de sédimentation et on n'observe pas de structure fractale "aérée" comme on

peut trouver dans les flocs obtenus à partir de suspensions diluées [11]. La stabilisation d'une suspension colloïdale est un art complexe [1]. Nous verons dans le chapitre suivant comment la charge surfacique des particules permet cette stabilisation. Nous expliquerons ensuite pourquoi l'introduction d'un sel peu soluble dans la suspension entraîne la coagulation du système. Afin de souligner la différence entre la déstabilisation d'une suspension concentrée et une dispersion diluée nous présenterons aussi un modèle thermodynamique simple de la stabilité des suspensions concentrées.

3.1.1 Dispersions concentrées d'alumine

Les expériences de coagulation réalisées concernent des suspensions d'alumine. Le protocole de stabilisation et de déstabilisation a été développé par des équipes de recherche en matériaux céramiques, leur but était de proposer une solution novatrice dans la réalisation de pièces céramiques complexes [3, 10].



FIG. 3.1 – Exemple de pièces de céramiques de haute technologie.

Après avoir obtenu une suspension colloïdale stable et fluide, le process de fabrication des pièces de céramique par DCC implique de remplir le moule de la suspension, d'enclencher la coagulation in situ, de sécher le gel particulaire obtenu puis d'effectuer le frittage à haute température [3].

3.1.2 Protocole de stabilisation

Les dispersions sont obtenues suivant le protocle proposé par C.Pagnoux [10], à partir de trois composants :

- une poudre industrielle d'alumine (AKP30, Sumimoto). Le diamètre moyen des grains est de 350nm, la surface spécifique de $7m^2/g$ et la densité de 4,1.

– de l'eau purifiée (Millipore)
– un sel organique dérivé du cathechol dont la formule est $4,5-(OH)_2-C_6H_2-1,3-(SO_3Na)_2$ et que nous nommerons dans la suite *tiron*.

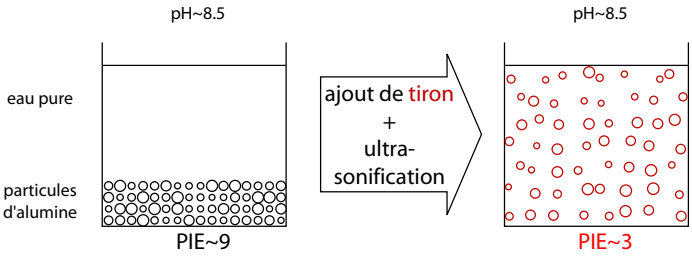


FIG. 3.2 – Schéma illustrant la stabilisation des suspensions par l'ajout de tiron. L'ajout de faibles quantités de tiron permet de changer le PIE des colloïdes.

Si on mélange simplement la poudre d'alumine à de l'eau pure, on n'obtient pas une suspension stable. Le *point iso-électrique* (PIE) des particules d'alumine est de 9. Or, lorsque ces particules sont immergées dans de l'eau, les groupements de surface réagissent avec l'eau pure pour aboutir à un pH voisin de 8,5. Avec un pH naturel si près du PIE des particules, la suspension n'est pas stable.

Une première solution pour stabiliser de telles suspensions est d'ajouter un acide fort à la suspension afin d'éloigner le pH de la suspension du PIE des particules [3]. La solution proposée par Pagnoux est différente : l'ajout de l'agent stabilisant, le tiron, permet changer le PIE des particles de la suspension (Fig.3.2¡).

Le sel organique est l'agent stabilisant, son dosage doit être adapté à la surface développée des particules, une stabilisation optimale correspond à $1,3 \times 10^{-6}$ mol.m^2. Pour une suspension de fraction volumique ϕ, on prépare tout d'abord une solution eau-tiron adaptée à la valeur de ϕ. On verse ensuite la poudre d'alumine dans la solution obtenue. La suspension est finalement soumise à des pulses ultrasonores afin d'assurer une bonne dispersion des particules. **Ce protocle de stabilisation permet d'obtenir aisément des suspensions concentrées, leur fraction volumique peut aller jusqu'à** 54%.

La forte adsorption du tiron sur colloïdes d'alumine est attribuée à la formation d'un complexe entre les ions métalliques (...Al-OH), présents à la surface des particules, et les groupes alcools de la molécule de tyron suivant la réaction présentée dans la figure (3.3). Les particules d'alumine

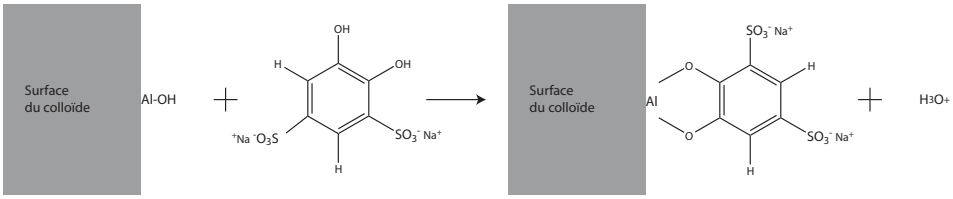


FIG. 3.3 – Réaction responsable de la forte asorption du tiron à la surface des colloïdes d'alumine.

sont alors couvertes de groupes sulfonates qui sont chargés négativement. La répulsion des particules chargées en milieu aqueux est le plus souvent modélisée par la célèbre théorie DLVO dont nous rappelons dans la suite les résultats principaux.

Potentiel d'interaction de deux particules chargées en milieu aqueux

Entre deux molécules non polaires de même nature distantes de l, les interactions de polarisation mutuelle induisent un potentiel d'interaction attractif en $1/l^6$. Ces forces intermoléculaires sont intitulées *forces de Van Der Waals*, elles existent même entre molécules ne portant pas de dipôle permanent et permettent d'expliquer la cohésion de la plupart des liquides moléculaires. Les forces universelles entre deux particules colloïdales furent modélisées en sommant les forces de Van Der Waals sur tous les couples de molécules participant aux interactions entre les deux colloïdes. Ces forces portent le nom de **forces de Hamaker**, dans le cas de deux sphères de rayon R le potentiel d'interaction de Hamaker décroit très lentement par rapport à la distance d entre les surfaces de colloïdes :

$$U_{Hamaker} = -\frac{AR}{6d} \tag{3.1}$$

où A est une constante dépendant des propriétés diélectriques de la phase solide composant les particules et de la phase dans laquelle baignent les particules.

Ce terme d'attraction d'origine électrostatique est indépendant des propriétés de surface des particules et tend vers l'infini lorsque l'écart entre les particles tend vers zero. Les mesures expérimentales de la force d'interaction entre colloïdes dans le vide pour différentes distances interparticulaires ont confirmé l'existence et la forme de ces forces de Van Der Waals [12]. Ainsi,

dans la vide, le travail W nécessaire pour séparer deux particules sphériques au contact est grand devant kT.

Que ce soit dans les boues ou dans un pot de peinture, les dispersions colloïdales solide/liquide interviennent couramment dans les activités humaines. Un état particulièrement recherché est l'état dit *dispersé*, où le système est liquide et stable. Les forces de Hamaker s'opposent à la stabilité de l'état dispersé, elles tendent à floculer la dispersion, l'existence de forces répulsives entre particules est nécessaire afin de s'opposer aux forces de Hamaker. *En milieu aqueux* la force d'interaction entre particules peut prendre des formes très éloignées des forces de Hamaker [12]. Intéressons nous aux différentes conditions physico-chimiques qui permettent d'obtenir un état dispersé ou bien un état floculé.

Dans le cas d'une phase solide inorganique (céramiques), le simple fait de placer une poudre colloïdale de particules dans de l'eau pure permet le plus souvent d'obtenir un état dispersé. A l'origine de ce phénomène intervient la dissociation partielle des groupements chimiques en surface des particules, ces réactions aboutissent à la formation d'une charge surfacique non nulle. La neutralité électrique de la suspension est alors assurée par les contre ions libérés dans le milieux aqueux. Toutefois, dans notre cas nous avons du ajouter artificiellement des groupements à la surface ds particules d'Alumine afin d'obtenir des surfaces chargées. La célèbre théorie **D**erjaguin **L**andau **V**erwey **O**verbeek (DLVO) considère que **seuls les contre-ions s'opposent à l'attraction de Hamaker** et permettent la stabilité colloïdale. Dans cette théorie le profil de concentration des ions entre deux particules est modélisé par l'équation différentielle de Poisson-Boltzmann. Les conditions aux limites associées à cette équation dépendent de la charge surfacique des particules et de la distance d entre les surfaces des deux particules. Les contres ions se concentrent au voisinage des particules, la distance caractéristique de cette couche de contre-ions est donnée par la longueur de Debye κ^{-1} qui vérifie, dans le cas simple où un seul type de contre-ions prédomine :

$$\kappa^2 = \frac{4\pi}{\epsilon kT}\, n_0\, q_0 \tag{3.2}$$

où ϵ est la permittivité diélectrique du milieu, n_0 la concentration des contre-ions libérés par les groupes de surface et q_0 la charge portée par chaque contre ion.

L'énergie potentielle des contre-ions en solution en fonction de la distance d est interprétée comme un potentiel d'interaction répulsif entre colloïdes chargés :

$$U_{ions} = -T\Delta S_{ions} = \frac{64\pi k_B T R n^{\infty}\gamma^2}{\kappa^2} k_B T e^{-\kappa d} \tag{3.3}$$

où γ est lié au potentiel de surface ψ_0 des particules par $\gamma \approx \tanh(\psi_0/103mV)$ et où n^∞ est la concentration en contre-ions à grande distance des particules. L'interaction répulsive n'est pas due à une répulsion électrostatique entre les particules, **l'origine fondamentale de la répulsion est l'interpénétration des couches de contre-ions des deux surfaces, c'est un terme répulsif d'origine entropique**. En plus des contre-ions provenant des groupes de surface des particules il existe des ions libres en milieux aqueux. Ainsi dans un milieu aqueux salin contenant des ions en concentrations importante, le potentiel d'interaction des particules est modifié. Afin de tenir compte de cette modification il faut utiliser dans l'expression (3.3) la longueur de Debye κ^{-1} vérifiant :

$$\kappa^2 = \frac{4\pi}{\epsilon kT}\Sigma_i n_i q_i^2 \tag{3.4}$$

où n_i et q_i représentent les concentrations et les charges des ions dans la phase liquide de la dispersion. Dans le cas d'un sel se dissociant en deux ions monovalents et lorsque la concentration molaire C de sel dissous est dominante par rapport aux autres ions, une valeur approchée de la longueur de Debye est :

$$\kappa^{-1} \approx \frac{0.3}{\sqrt{C}}\ nm \tag{3.5}$$

Si la concentration en sel dissous augmente par exemple de $10^{-4}M$ à $10^{-1}M$ alors la longueur de Debye diminue de 30 nm à 1 nm. La somme du potentiel attractif de Hamaker et du potentiel répulsif dû aux contre-ions est couramment appelé *potentiel DLVO* et offre un modèle analytique d'interaction de deux particules chargées en milieu aqueux :

$$U_{DLVO} = U_{Hamaker} - T\Delta S_{ions} = \frac{64\pi k_B T R n^\infty \gamma^2}{\kappa^2} e^{-\kappa d} - \frac{AR}{6d} \tag{3.6}$$

Interprétation classique du potentiel DLVO

Ce potentiel de paire est classiquement interprété en termes de stabilité colloïdale, dans les graphes (Fig.3.4) et (Fig.3.5) sont tracés des potentiels de paire pour différentes concentrations de sel dans le cas d'une dispersion de particules d'alumine dans de l'eau[1] :

[1]Dans le cas de particules d'alumine fortement chargées et en utilisant l'approximation (3.5) avec $C \approx n^\infty$, on obtient une expression simplifiée de l'énergie d'interaction :

$$\frac{U_{DLVO}}{k_B T} = U_{Hamaker} - T\Delta S_{ions} = 18\ \widetilde{R}\ e^{-\kappa d} - \frac{\widetilde{A}R}{6d} \tag{3.7}$$

- Dans le cas de particules très chargées dans un milieu aqueux peu salin apparaît une forte répulsion à longue portée, cette répulsion atteint son maximum à une distance typiquement située entre 1nm et 4nm, à la **barrière énergétique** (Fig.3.4).
- Pour un milieu aqueux plus salin apparaît un **deuxième minimum** (Fig.3.5), typiquement situé au-delà de 3nm après la barrière énergétique. L'énergie potentielle au contact est appelée le **premier minimum**. Si la barrière énergétique est grande devant k_BT alors les particules ne peuvent atteindre le premier minimum. Alors les particules vont soit rester dans le deuxième minimum soit rester complètement dispersées. Dans ce dernier cas la dispersion est dite cinétiquement stable.
- si la charge des particles est faible ou la concentration en sel plus élevée, la barrière énergétique ne suffit plus à endiguer la floculation irréversible au premier minimum. A l'extrême le terme répulsif disparaît et seules persistent les forces attractives de Hamaker.

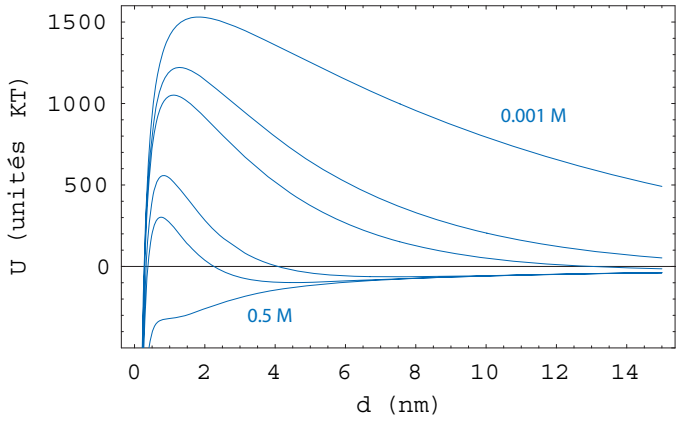


FIG. 3.4 – Potentiel DLVO à **courte portée** pour des sphères d'alumine de 100 nm de rayon et pour des concentrations en sel dissous de 0.001M, 0.05M, 0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.5M. La barrière énergétique est très grande en milieu peu salin, elle disparait lorsque la concentration en sel dissous devient importante

où $\widetilde{A} = \frac{A}{k_BT} \approx 35$ [12] et $\widetilde{R} = \frac{R}{1\ nm}$.

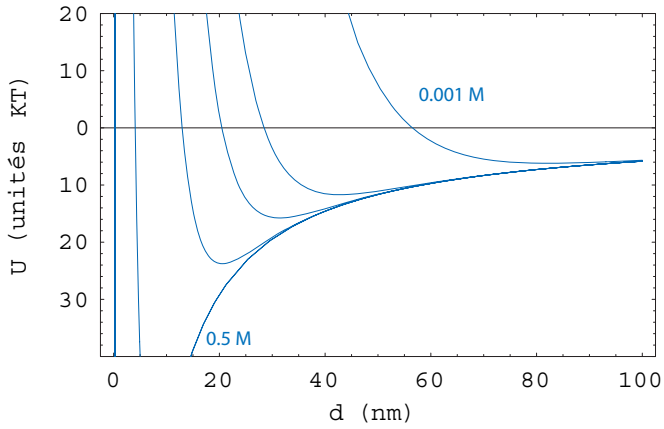


FIG. 3.5 – Potentiel DLVO à **longue portée** pour des sphères d'alumine de 100 *nm* de rayon et pour des concentrations en sel dissous de 0.001M, 0.05M, 0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.5M. Le minimum secondaire se creuse et se rapproche des courtes distances à mesure que la concentration en sel dissous augmente

Un point clef dans ces interprétations est l'existence du *premier minimum* très profond à une distance de l'ordre du nm, la floculation est ici *irréversible*. Dans les suspensions que nous allons étudier nous avons toutefois constaté que la floculation était réversible malgré de hautes concentrations finales en sel[2]. Ce phénomène est rencontré dans d'autres systèmes [12] et le modèle DLVO est connu pour ne plus être valable en dessous de quelques nm en raison de forces répulsives à très courtes portée telles que les forces d'hydratation, les forces liées à la couche de Stern, les forces d'extraction des ions adsorbés...**Dans nos systèmes nous supposerons qu'il n'y a pas de premier minimum du potentiel DLVO et que la floculation est surtout liée à l'évolution du deuxième minimum de** U_{DLVO}.

Modèle simple de la floculation de dispersions concentrées

Dans ce chapitre nous proposons un modèle simple permettant d'appréhender l'évolution de l'état macroscopique d'une dispersion en fonction de sa fraction volumique et de la salinité de la suspension. Ce modèle est tellement simple qu'il ne supporterait certainement pas la confrontation

[2]il nous a suffit de rediluer les dispersions floculées dans de l'eau pure pour retrouver un état dispersé

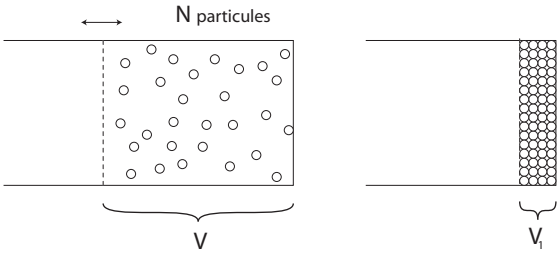


FIG. 3.6 – Présentation de l'expérience de pensée. La suspension est confinée dans un volume V. Elle est séparée d'un réservoir de solution saline par une paroi perméable ne laissant pas passer les particules. La paroi perméable est mobile et le plus petit volume de confinement est noté V_1

directe avec des mesures de pression osmotique, mais il présente l'avantage de décrire un peu plus en avant la floculation due au minimum secondaire de U_{DLVO}. Le modèle thermodynamique repose sur l'**expérience de pensée** suivante : une dispersion colloïdale de N particules est enfermée dans un cylindre thermostaté de très grand volume rempli d'un milieux aqueux salin, une paroi hémiperméable confine les particules dans un volume V variable (Fig.3.6). Nous nous proposons d'étudier l'évolution de l'enthalpie libre du système en fonction de la fraction volumique ϕ occupée par les particules :

$$G = -TS_{colloides} + G_{colloides} - TS_{ions}$$

Les N colloïdes sont assimilés à un gaz de billes de rayon R qui s'attirent suivant des forces de Hamaker. Nous considérons que l'entropie du gaz de billes est déterminée par le volume accessible aux colloïdes. Si V_1 est le volume correspondant à un confinement total des particules, on a :

$$S_{colloides} = -Nk_B \ln(\frac{V_1}{V}) \ = -Nk_B \ln(\phi^*)$$

où $\phi^* = \frac{V_1}{V} \approx 0.52\phi$ est[3] la fraction volumique effective de la suspension. Cette grandeur converge vers 1 quand toutes les particules sont au contact.

L'energie potentielle d'attraction entre les colloïdes et de l'enthalpie libre des ions en solution est décrite dans le cas de deux particules par la

[3]Le lien entre la fraction volumique effective ϕ^* et la fraction volumique ϕ dépend de notre modélisation de V_1. Dans le cas où l'état encombré est modélisé par un empilement cubique on a $V_1 = N(2R)^3$ et $\phi/\phi^* = 4\pi R^3/3(2R)^3 = 0.52$. L'hypothèse la plus "osée" du modèle ne réside pas ici, mais plutôt dans la modélisation des interactions entre voisins.

théorie DLVO. Si l'on suppose que pour chaque particule suffit de considérer les interactions avec les p premiers voisins, dont les surfaces sont à une distance moyenne $\widetilde{d}$ on obtient :

$$G_{colloides} - TS_{ions} \approx \frac{pN}{2} U_{DLVO}(\widetilde{d})$$

Or la fraction volumique effective ϕ^* est liée à la distance moyenne entre surfaces, $\widetilde{d}$, par :

$$\phi^* \approx \frac{(2R)^3}{(\ 2R + \widetilde{d}\ )^3}$$

Ainsi l'évolution de l'enthalpie libre du système peut s'exprimer en fonction de ϕ^*, fraction volumique effective qui tend vers 1 quand toutes les particules sont au contact :

$$G(\phi^*) = Nk_BT\ln(\phi^*) + \frac{pN}{2}\{\frac{64\pi k_BTRn^\infty\gamma^2}{\kappa^2} e^{-4\kappa R(\frac{1}{\sqrt[3]{\phi^*}}-1)} - \frac{A}{6}\frac{1}{\frac{1}{\sqrt[3]{\phi^*}}-1}\}$$

Le graphe (Fig.3.7) présente l'évolution de $G(\phi^*)$ pour des concentration croissantes de sel dissous dans le cas d'une dispersion aqueuse de sphères d'alumine[4] de 100 nm de rayon. . Pour des sphères de 100 nm de rayon les valeurs $G(\phi^*)$ sont importantes et le terme entropique du gaz de bille est négligeable pour les fractions volumiques supérieures à 1 pourcent. L'interprétation [5] des courbes d'enthalpie libre pour différentes concentrations de sel dissous repose sur l'examen des dérivées premières et secondes de $G(\phi^*)$.

Conséquences du modèle

Grâce à ce modèle très simple nous allons traiter la floculation comme une séparation de phase entre une phase concentrée dont la concentration correspond à un minimum de $G(\phi)$ et une phase extrêmement diluée.

[4]Pour tracer ces graphes nous utilisons l'expression (3.7) et l'approximation $p = 20$, ainsi :

$$\frac{G(\phi^*)}{Nk_BT} = \ln(\phi^*) + 10\{18\ \widetilde{R}\ e^{-4\kappa R(\frac{1}{\sqrt[3]{\phi^*}}-1)} - \frac{\widetilde{A}}{6}\frac{1}{\frac{1}{\sqrt[3]{\phi^*}}-1}\} \tag{3.8}$$

où $\widetilde{A} = \frac{A}{k_BT} \approx 35$ [12] et $\widetilde{R} = \frac{R}{1\ nm}$.

[5]Aux valeurs de ϕ^* proches de 1 apparaît en fait un minimum qui correspond au premier minimum du modèle DLVO. Nous avons précédemment supposé que l'influence de ce premier minimum était non pertinente dans notre système, nous ferons donc de même avec les variations de G pour des valeurs de ϕ^* proches de 1 (A de si courtes distances de nouvelles forces répulsvies apparaissent, par exemple la force d'hydratation des surfaces)

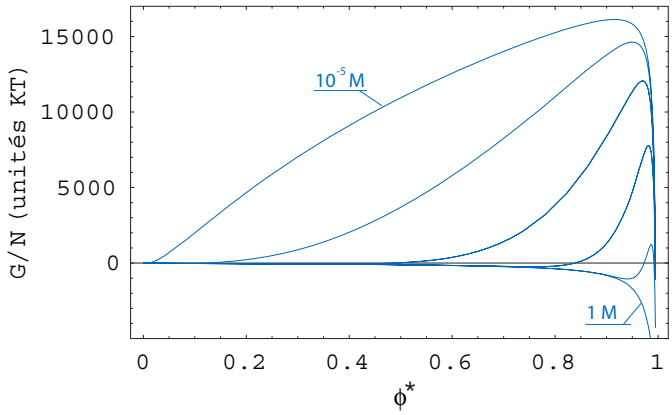


FIG. 3.7 – Evolution de l'enthalpie libre du système pour différentes concentrations de sel dissous :10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, 0.1 M, 1 M.

Dans le cas d'un milieu peu salin, il n'y a pas de position d'équilibre stable dans G, les dispersions ont naturellement tendance à diminuer leur fraction volumique. Une telle situation est rencontrée dans les premières courbes de Fig.3.7. Dans la pratique la paroi perméable de la Fig.3.6 n'existe pas et les suspensions ont accès à un volume fini de liquide. Ainsi cette tendance à diminer leur fraction volumique se traduit pour une suspension peu saline par une stabilité de l'état dispersé à tout ϕ.

Au dela d'une concentration de sel dissous C_{seuil} apparaît un minimum stable. Pour des suspensions de salinité $C > C_{seuil}$ il existe un état d'équilibre, de concentration $\phi_{eq}(C)$. Toutefois, cet état n'est pas toujours accessible. D'un point de vue thermodynamique, le comportement de la suspension dépend de la position de sa fraction volumique ϕ par rapport à $\phi_{eq}(C)$ et à la fraction volumique $\phi_{meta}(C)$ correspondant au point d'inflexion de la courbe d'enthalpie :

- Pour $\phi > \phi_{eq}(C)$ la suspension est **stable** car elle ne peut pas diminuer sa fraction volumique afin de s'approcher de $\phi_{eq}(C)$. (le volume liquide de chaque suspension est contant)
- Pour $\phi_{meta}(C) < \phi < \phi_{eq}(C)$ la suspension est **métastable** en raison de la convexité de $G(\phi)$ en ϕ.
- Pour $\phi < \phi_{meta}(C)$ la suspension est **instable** en raison de la concavité de $G(\phi)$ en *phi*, il y a formation d'un agrégat de fraction volu-

mique $\phi_{eq}(C)$.
Dans le schéma Fig.3.8 est explicité le rôle de la convexité de la courbe en terme de séparation de phase[6]. Dans les graphes de la figure 3.9 on peut voir l'évolution des zones de stabilité pour des concentrations en sel croissantes.

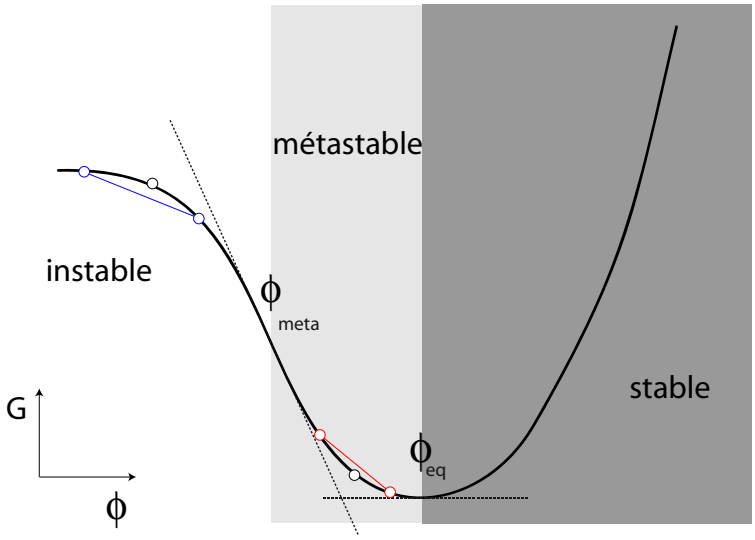


FIG. 3.8 – Domaines de stabilité obtenus grâce à l'étude d'une courbe d'enthalpie libre tracée en fonction de ϕ. Dans le *domaine métastable* la séparation en deux phases de concentration différente est défavorable d'un point de vue thermodynamique car l'enthalpie du système biphasé (symbolisé en rouge) sera toujours supérieure à celui du système de départ (symbolisé par le rond noir) en raison de la convexité de la courbe. Dans la zone d'instabilité la séparation en deux phases est favorable en raison de la concavité de la courbe.

Le modèle simple présenté ici a l'avantage de mettre en avant le fait suivant : **la déstabilisation macroscopique des suspensions dépend de la fraction volumique de la suspension de départ**. Pour des suspensions diluées vérifiant $\phi \ll \phi_{meta}(C_{seuil})$, augmenter la concentration en sel dissous au-delà de C_{seuil} entraîne l'apparition dans la suspension d'un aggrégat turbide marquant la floculation. Par contre pour une suspension concentrée telle que $phi > \phi_{eq}(C_{seuil})$ dépasser la concentration en sel C_{seuil} n'aura pas d'effet

[6]L'équilibre de la phase diluée est très proche de $\phi = 0$ et son enthalpie libre est le plus souvent négligeable par rapport à l'enthalpie libre de la position d'équilibre concentrée. La proportion de la phase diluée est prédite comme infiniment faible dans les estimations numériques faites avec ce modèle.

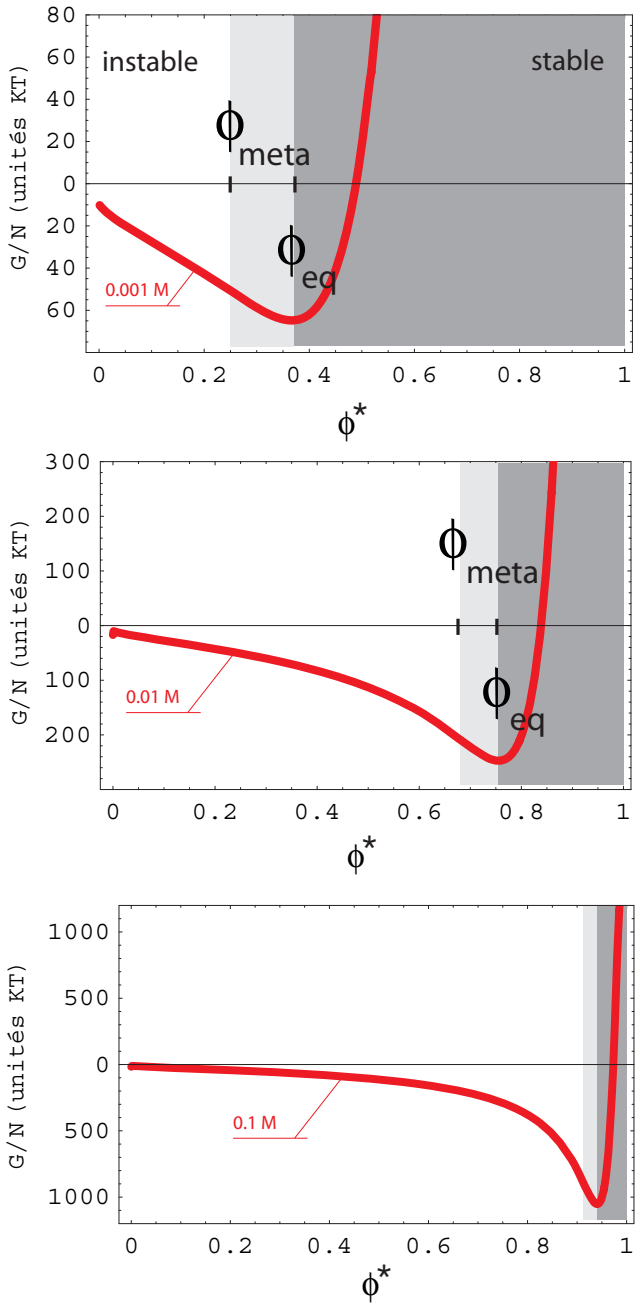


FIG. 3.9 – Stabilité d'une suspension de sphères d'alumine de 100 nm de rayon pour des concentrations en sel dissous de 10^{-3}M, 10^{-2}M, 10^{-1}M. La zone gris foncé indique le domaine de stabilité, la zone gris clair indique le domaine de métastabilité. A mesure que la concentration en sel augmente le minimum devient de plus en plus profond et sa position se rapproche de 1.

sur l'apparence de la suspension : le confinement des particules aboutit à les placer à des distances où les répulsions dominent encore à C_{seuil}. Il n'y a pas de contradiction avec le modèle DLVO, nous avons ici supposé que le premier minimum ne pouvait être atteint ce qui implique une **stabilité régie par le minimum secondaire du potentiel DLVO**. Dans une suspension diluée deux particules peuvent s'éloigner et se rapprocher à loisir. C'est pourquoi l'appartion d'un minimum secondaire peut entraîner un changement brutal dans la physionomie de la suspension, on peut observer macroscopiquement la déstabilisation. Par contre, dans une suspension concentrée, tout ce que fait ressortir le modèle c'est que les particules de la suspension ne peuvent pas s'éloigner à loisi¡r les unes des autres, elles sont gênées par leur voisines, ainsi à l'apparition du minimum secondaire la distance d'équilibre est inaccessible aux particules. Contrairement au suspensions diluées, **l'apparition d'un minimum secondaire n'entraîne pas de déstabilisation brutale de la suspension concentrée**.

La zone d'instabilité délimitée par $\phi_{meta}(C)$ gagne les fortes concentrations à mesure que C augmente (Fig.3.9), *on peut donc déstabiliser les suspensions concentrées en augmentant la concentration en sel dissous*, autrement dit en augmentant la force ionique de la suspension (Fig.3.10). On pourrait montrer de même que diminuer la charge de surface des particules peut aboutir à la déstabilisation de la suspension. Cette diminution de charge peut avoir deux origines :

- la désorbtion du Tiron de la surface des particules.
- la protonation des groupements de surface des particules suite à un changement du pH de la suspension.

Dans la section suivante nous allons décrire les difficultés inhérentes à la déstabilisation de suspensions concentrées et présenter le protocole que nous avons choisi d'utiliser. Nous verrons que la déstabilisation de nos suspensions repose à la fois sur l'augmentation de la force ionique et sur le rapprochement du pH et du PIE de la suspension.

3.1.3 Protocole de déstabilisation

La déstabilisation d'une suspension concentrée est plus complexe que dans le cas dilué. En effet, la déstabilisation des suspensions peu concentrées se fait typiquement par ajout de faibles volumes d'une solution saline ou acido/basique[7]. Dans le cas de suspensions colloïdales concentrées, cette méthode aboutit malheureusement à une déstabilisation inhomogène en rai-

[7]La solution saline permet de diminuer la longueur de Debye de la dispersion alors que les solutions acido/basique permettent le plus souvent de modifier la charge surfacique des particules.

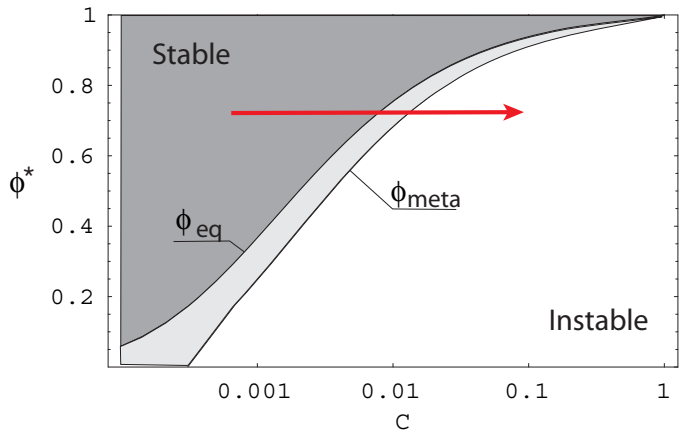


FIG. 3.10 – Stabilité d'une suspension de sphères d'alumine de 100 nm. La zone gris foncé indique le domaine de stabilité, la zone gris clair indique le domaine de métastabilité. La flêche représente la déstabilisation par ajout de sel. Les courbes ϕ_{eq} et ϕ_{meta} ont été obtenues par la méthode de Newton appliquée à l'expression (3.8).

son de la vitesse d'agrégation rapide dans ces systèmes. Une forte agrégation a localement lieu avant que les agents déstabilisant soient distribués dans la dispersion par diffusion ou mélange. Deux facteurs interviennent dans cette vitesse d'agrégation rapide :

- dans une suspension colloïdale concentrée les surfaces des particules sont très proches. Ainsi dans une dispersion de particules de 100 nm de rayon dont la fraction volumique est proche de 50% la distance moyenne entre la surfaces est de l'ordre de quelques nm.
- les solutions salines utilisées sont nécessairement très concentrées afin de minimiser la diminution de fraction volumique induite par l'ajout de solution saline dans la suspension.

Dans le monde industriel des céramiques, **la nécessité d'obtenir des déstabilisations homogènes de dispersions concentrées de céramiques a entraîné la réalisation de diverses méthodes de déstabilisation dites *in situ***. Le principe commun à toutes ces méthodes de "*Direct Casting Coagulation*" (DCC) est de libérer les agents déstabilisants de manière uniforme dans la phase aqueuse de la dispersion. **La réaction de libération des agents déstabilisants est choisie pour être particulièrement lente, elle permet un mélange homogène des précurseurs de la réaction bien avant tout phénomène de coagulation**. Il existe typiquement deux méthodes pour obtenir une réaction de déstabilisation qui s'étende sur plusieurs heures :

- la réaction de libération des agents déstabilisants est catalysée par une enzyme dont l'activité est contrôlée par la température de la dispersion. Le mélange avec les précuseurs et l'enzyme est fait à froid où l'activité de l'enzyme est nulle [3, 6, 5].
- la réaction de libération des agents déstabilisants est le résultat de la dissolution d'un crystal salin peu soluble. La lenteur de la dissolution du sel permet de mélanger une fine poudre de sel dans la suspension sans avoir de floculation inhomogène [10, 7].

Dans notre étude nous utilisons un protocole où l'**agent déstabilisant est un sel peu soluble** : le diacétate d'aluminium ($Al(CH_3C00)_2OH$) qui se dissout dans l'eau très lentement.

Le sel est ajouté à la suspension à la concentration de 0.45 moles par litre de phase aqueuse. La dissolution du sel est lente [10]. Les gels que nous avons obtenus par cette méthode ne sédimentent pas, contrairement à la suspension dispersée, qui sédimente elle en quelques jours. L'état final de la suspension concentrée déstabilisée est un gel qui soutient sous propre poids. Des mesures de pH et de conductimétrie permettent d'observer que la déstabilisation est due à l'augmentation de la force ionique de la suspension ainsi qu'à la baisse du pH de la suspension (Fig.**??**). Les ions Al^{3+} libérés par

la dissolution du sel sont trivalent, ce qui favorise grandement l'écrasement de la longueur de Debye dans le système. Il a été montré d'autre part que ces ions Al^{3+} induisent une désorption partielle du tiron. Ainsi le PIE de la suspension passe de 3 à 4 en présence d'une forte concentration en Al^{3+} et il suffit que le pH de la suspension se rapproche de 4 pour grandement favoriser la déstabilisation.

En conclusion, **la déstabilisation des suspensions concentrées est lente et progressive, elle est due à la fois à une forte augmentation de la force ionique de la solution et au rapprochement du pH et du PIE de la solution.**

3.2 Etat de l'art

3.2.1 Mécanique et microstructure

Différentes études rhéologiques de ces gels particulaires obtenus par DCC ont montré que les propriétés mécaniques de ces gels dépendent principalement de la manière dont ils ont été déstabilisés [8]. L'équipe du professeur Gauckler s'est particulièrement intéressée à deux méthodes de déstabilisation appliquées à la même suspension :

- une première méthode où c'est l'augmentation de la force ionique de la suspension, donc la diminution de la longueur de Debye qui est responsable de la coagulation.
- une deuxième méthode où c'est la diminution de la charge de surface des particules, par rapprochement du pH et du PIE, qui est responsable de la déstabilisation.

Les gels particulaires obtenus par ces métodes de coagulation présentent des modules élastiques qui diffèrent de plusieurs décades, et ce bien que l'on parte de la même suspension [18]. La tentative d'interprétation microscopique de ces différences s'est heurtée à un fait contre-intuitif : si l'on compare les forces d'interaction colloïdale des gels obtenus par déstabilisation ΔI avec ceux obtenus par déstabilisation ΔpH, on constate que les gels ayant le module élastique le plus élevé présentent les interactions de paires les plus faibles ! [15]. Au final **c'est moins l'attraction finale entre les particules que la *microstructure* du gel qui définit la réponse mécanique du gel** [16] . Toutefois c'est bien l'évolution des interactions colloïdales au cours de la coagulation qui permet la mise en place d'une microstructure dont les propriétés mécaniques sont reproductibles. Un autre fait expérimental qui souligne l'importance de la microstructure est le changement drastique et irréversible des propriétés des gels particulaires

après un cisaillement important.

L'étude de la microstructure finale a été conduite par Wyss grâce à des expériences de Cryo SEM [14]. Le milieu final est bien un milieu désordonné, au dela de quelques rayons de particules la fonction de corrélation de paire devient stationnaire [17] . **Plusieurs indices tendent à montrer que plus la microstructure finale présente d'hétérogénéités plus sa réponse mécanique est forte** [16].

En raison de la fragilité des gels particulaires (domaine de réponse linéaire très court) différentes méthodes optiques non invasives ont été appliquées à l'étude de la formation de la microstructure du gel particulaire [17, 13]. En réalisant réalisant des expériences de diffusion multiples multispeckle et en développant une technique de traitement des données originale (2DMSDWS), nous avons de même pu étudier l'évolution de ces gels particulaires de manière non invasive.

3.2.2 Formation de la microstructure

L'article [17] présente les résultats obtenus par des mesures de diffusion de la lumière aux petits angles faites sur une dispersion de billes colloïdales où la phase continue conçue pour que la différence d'indice optique soit très proche de celui de la phase solide. En mesurant le profil de d'intensité diffusé, $I(q)$, sur des vecteurs de diffusion q compris entre $10^{-3}\ nm^{-1}$ et $1.4\ 10^{-2}\ nm^{-1}$ la microstructure locale est indirectement observée au cours de sa formation. Il apparaît qu'**aux échelles de distance sondées (entre** $100nm\ 1\mu m$**), la microstructure locale évolue vers une organisation stationnaire bien avant que la transition sol-gel se produise. La microstructure moyenne à l'échelle de quelques rayons de particules ne change plus, le nombre de voisins par particule est fixé bien avant la transition sol-gel**.

3.3 Etude multispeckle de la coagulation

Dans le chapitre précédent, nous avons rapporté que les hétérogéniétés spatiales à des échelles supérieures au micron sont probablement responsables des propriétés mécaniques des gels particulaires. Afin de sonder la microstructure sur ces gammes de distance, l'imagerie par microscopie est une solution attrayante. Après deux années de conception et de réalisation nous sommes parvenus à réaliser un microscope confocal rapide. Malheureusement nous n'avons pas eu le temps d'appliquer cette méthode au phénomène de coagulation de suspensions concentrées dans la durée impartie à mes études

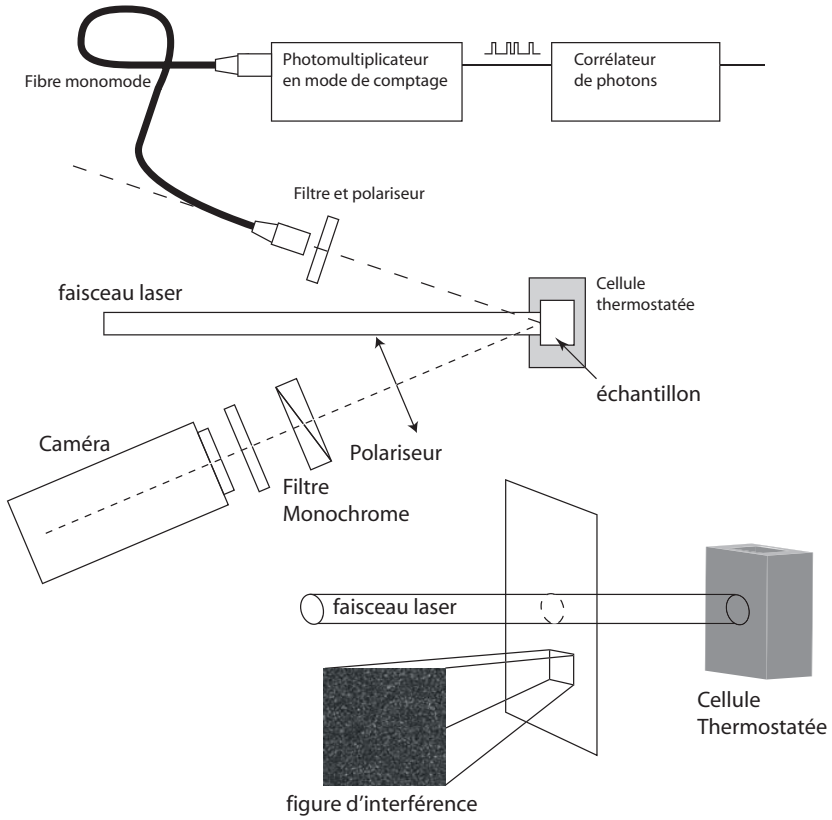


FIG. 3.11 – Vue schématique de dessus et de côté du montage expérimental permettant d'utiliser les techniques multispeckle DWS, SVS et MSDWS sur un échantillon thermalisé. L'échantillon turbide est illuminé par un faisceau laser, la fibre optique et la caméra du montage nous permettent d'étudier la dynamique de la dynamique de la figure d'interférence crée par l'échantillon turbide.

doctorales. Nous avons toutefois étudié la formation de la microstructure par des expériences de diffusion multiple dynamique de la lumière.

Les mesures de DWS, SVS et MSDWS permetent d'appréhender la formation d'une microstructure cohésive en observant indirectement l'agitation des colloïdes qui forment cette microstructure. Nous avons étudié la coagulation de suspensions d'alumine suivant le protocole proposé par C.Pagnoux décrit en amont, les études ont été conduites pour des fractions volumiques allant de 32% à 44%.

3.3.1 Méthode optique adaptée

Avec un indice optique $n = 1,65$ et un diamètre moyen de $360nm$ les suspensions aqueuse d'alumine utilisées sont turbides dès de faibles fractions volumiques. La turbidité de l'échantillon peut être caractérisée par la distance de persistance de diffusion multiple dans l'échantillon l^*. En comparant l'intensité transmise du système avec celle de suspensions de latex de l^* connus nous sommes parvenus à mesurer l^* pour des suspensions concentrées d'alumine. Pour des suspensions dont la fraction volumique est comprise entre 30% et 54% on a une turbidité très importante :

$$l^* = 5 \pm 0,5\mu m$$

Au cours de la coagulation les suspensions passent d'un état fluide à un état pâteux, les temps caractéristiques d'agitation évoluent sur plusieurs décades au cours de la coagulation. Afin d'observer ces évolutions sur une large gamme dynamique nous avons effectué des mesures de DWS, de SVS et de MSDWS. Grâce à ces trois méthodes **nous sommes capable d'observer des informations dynamiques sur des durées allant de** $10^{-7}s$ **à** $1000s$**.** Le montage décrit dans la figure (3.11) permet d'obtenir ces trois mesures en parallèle.

Montage expérimental (Fig.3.11)

L'échantillon est placé dans une cellule de $1mm$ d'épaisseur et éclairée par un faisceau laser élargi (argon, SpectraPhysics). Comme nous l'avons déjà expliqué dans le chapitre 1, si un échantillon turbide est illuminé par un faisceau laser alors les photons diffusés par l'échantillon crée dans tout le voisinage de l'échantillon des figures d'interférence. Dans le montage présenté en figure (3.11), le capteur CCD de la caméra (Pulnix TM9701) permet d'enregistrer une figure d'interférence crée par les photons rétrodiffusés, des calculs sur l'image enregistrée permettent ensuite de faire les mesures SVS et

MSDWS. Le montage présenté intègre d'autre part une fibre optique monomode reliée à un photo-détecteur. Cet ensemble permet d'observer les fluctuations rapides de la figure d'interférence en un point de l'espace, ces fluctuations étant ensuite traitées par un corrélateur de photons(ALV) qui permet d'obtenir les courbes DWS d'autocorrélation temporelle.

Les particules de la suspension diffusent les photons apportés par le laser. Les positions des diffuseurs de la suspension définissent la figure d'interférence enregistrée par la caméra et la valeur d'intensitée vue par la fibre optique. La dynamique des particules de la suspension est liée à l'évolution de la figure d'interférence. **Les mesures DWS, SVS et MSDWS permettent de mesurer l'agitation des particules de la suspension en étudiant l'évolution de la figure d'interférence**. Dans le cas d'un mouvement brownien, la plus petit déplacement moyen auquel peut être sensible le dispositif est égal à $3\mathring{A}$ [26].

Quand on fait des mesures de MSDWS on est parfois amené à comparer des images prises à quelques minutes d'intervalle, ce qui nécessite une stabilité du montage améliorée [2]. Dans notre montage plusieurs éléments assurent cette stabilité :

- l'échantillon est thermostaté.
- la hauteur et la direction de sortie du laser est contrôlée par un système à boucle de rétroaction (Spectra Z lock)
- le montage est placé sur une table anti-vibration.
- la stabilité du montage a été périodiquement mesurée par des expériences de MSDWS sur des échantillons solides.

Les systèmes concentrés désordonnées présentent généralement **deux modes caractéristiques d'agitation** : un mode individuel qui est typiquement rapide et un mode collectif qui est *a priori* plus lent. Dans nos expériences, nous pensons que le mode individuel correspond principalement à l'agitation thermique des particules en réponse au chocs avec les molécules de la solution, et que le mode collectif correspond à l'évolution microscopique du gel particulaire (relaxation de contraintes, vieillissement,...). Grâce aux techniques SVS,DWS et MSDWS nous avons cherché à étudier l'évolution de l'importance relative de ces deux modes ainsi que l'évolution de leur temps caractéristiques.

Réalisation du montage

Le montage optique en lui même est assez simple, il a été réalisé en utilisant des éléments de montage optique standards (Thorlabs). Le plus difficile a été de comprendre comment acquérir et traiter numériquement les images d'interférence avec la caméra. Nous avons utilisé une caméra numérique per-

mettant d'obtenir directement la valeur de gris de chaque pixel (Pulnix 9701), l'erreur à éviter étant d'utiliser une caméra intégrant une compression destructive des images. Pour capturer les données en provenance de la caméra, nous avons utilisé une carte d'acquisition (Nationnal Instruments PCI-1422) insérée dans un ordinateur classique. Pour piloter la caméra et la carte d'acquisition j'ai développé plusieurs programmes en langage C sous l'environnement Labwindows particulièrement pratique pour travailler avec les cartes d'instrumentation National Instruments.

Afin de thermostater l'échantillon, j'ai dessiné les plans puis usiné le bac et le porte échantillon. C'est grâce à une formation assurée par monsieur Denis Vallet au début de ma thèse que j'ai eu l'opportunité d'apprendre les bases d'usinage par extrusion de matière. La conception et la réalisation des pièces spécifiques du montage m'ont pris plus de dix jours complets.

Réglage du montage

Les mesures SVS et MSDWS sont obtenues via la caméra. Le point clef du réglage est d'avoir un grand nombre de zones de cohérences sur le capteur CCD de la caméra. Il suffit de disposer la caméra à une distance suffisante de la cellule ou de réduire la taille du volume illuminé par le laser (cf Eq.1.17). Ce réglage est insensible à la nature de l'échantillon, il suffit d'utiliser un échantilon à dynamique très lente et de modifier le montage afin d'optimiser la taille des zones de cohérence. De même que dans le montage du chapitre 2, le programme développé par nos soins permet d'observer en temps réel cette grandeur grâce au calcul de la corrélation spatiale des images reçues. L'affichage de l'histogramme de distribution des niveaux de gris sur la figure d'interférence permet d'affiner ce réglage, grâce au polariseur il est possible de s'approcher de la décroissance exponentielle prévue par la théorie. Enfin il est nécessaire de s'assurer que la figure d'interférence enregistrée n'est pas perturbée par les réflexions du faisceau laser qui interviennent au niveau de la cellule. Le plus pratique est d'utiliser un échantillon dont la dynamique est rapide devant le temps caractéristique de la caméra et de s'assurer que l'intensité est uniforme sur toute l'image.

3.3.2 Disparition des modes dynamiques individuels

Mesures DWS

Pour faire une mesure de DWS il suffit d'éclairer l'extrémité d'une fibre monomode par la lumière diffusée, de relier l'autre extrémité de la fibre à un détecteur de photons (ALV). Ensuite les pulses électroniques marquant

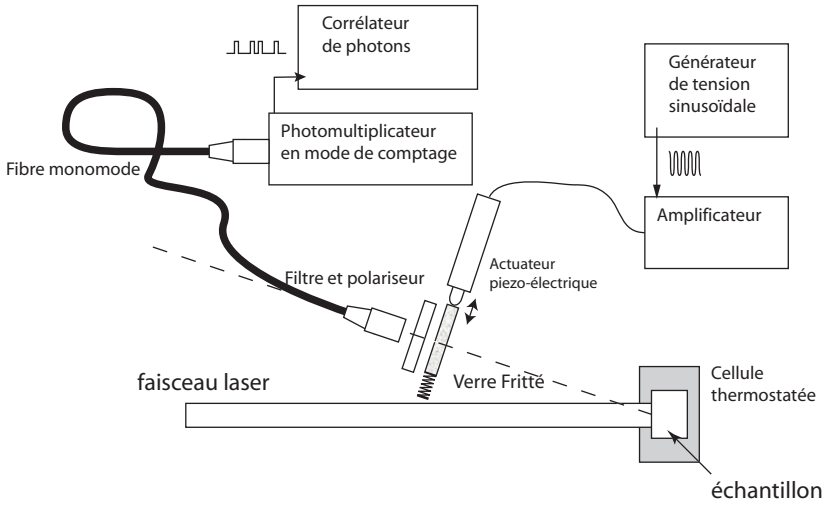


FIG. 3.12 – Montage DWS amélioré où un verre fritté en mouvement devant l'entrée de la fibre optique permet de faire disparaître artificiellement les modes dynamiques lents de la mesure faite par le corrélateur de photons.

l'arrivée des photons sur le détecteur sont traités par une carte électronique de correlation de photons (ALV, calcul utilisant l'algorithme multi-tau). Au final les fonctions de corrélation de l'intensité calculées par la carte, $g_2(\tau)$, sont accesssibles à l'expérimentateur via une interface informatique. Le seul paramètre accessible à l'utilisateur est la durée d'acquisition T_{exp} fournissant les données nécessaires au calcul de $g_2(\tau)$.

En raison de la méthode de calcul de $g_2(\tau)$, la technique DWS n'est pas adaptée à l'étude de dynamiques non stationnaires (cf chapitre 1). Toutefois la cinétique de coagulation s'étend sur plusieurs heures et on peut considérer que le phénomène est quasi-stationnaire sur une durée T de l'ordre de 100 s. *A priori* seules les valeurs $g_2(\tau)$ pour τ inférieur à 10^{-4} $T = 10^{-2}$ s sont fiables à plus de 1%. En pratique, cette prédiction n'est vérifiée qu'au début de la coagulation, rapidement les fonction calculées présentent des intercepts et des lignes de bases aléatoires. Ce phénomène apparaît lorsque les modes individuels rapides perdent de l'importance vis à vis des modes lents qui ont des temps caractéristiques supérieurs à $10ms$.

En introduisant un verre fritté entre l'entrée de la fibre optique et l'échantillon il est possible de contourner ce problème grâce à un mouvement mécanique. Le support du verre fritté est mobile, son déplacement est assuré par un système piezo électrique (Physik Instrument). L'utilisateur peut

contrôler l'amplitude et la fréquence des oscillations du verre fritté via le générateur de fonction relié au système électromécanique. Ce procédé décrit dans [20] est une amélioration de la technique de la double cellule proposée par dans l'article [21]. Ce procédé permet d'effacer artificiellement les modes lents de la dynamique mesurée.

Afin d'obtenir des mesures de l'agitation des particules sur des temps caractéristiques inférieurs à une valeur τ_{max} voici le protocole de réglage et d'utilisation d'un tel système :

- Placer un échantillon solide dans la cellule. Régler la fréquence et l'amplitude du déplacement du fritté afin d'obtenir une fonction de corrélation g_2^{piezo} qui soit corrélée à plus de 90% à τ_{max} et qui soit complètement décorrélée à 10 τ_{max}.
- Placer l'échantillon à étudier dans la cellule et mesurer la fonction de corrélation g_2^{mesure}
- Les valeurs correspondant à l'agitation des particules à tout temps caractéristique $\tau < \tau_{max}$ est donné par le rapport de $g_2^{mesure}(\tau)$ sur $g_2^{piezo}(\tau)$

Evolution des fonctions d'autocorrélation

Grâce au système électromécanique introduit dans le montage de DWS nous sommes capables de mesurer l'évolution des fonctions de corrélation au cours de la coagulation. Comme on peut s'y attendre on observe un ralentissement de l'agitation des particules au cours de la coagulation (Fig.3.13). Dans le faisceau de courbes présentée dans la figure seules les valeurs de corrélation pour des τ inférieurs à $10^{-3}s$ sont liées au déplacement des particules, au-delà les décorrélation sont définies par le mouvement du verre fritté. Au cours de la coagulation, les fonctions de corrélation atteignent l'enveloppe définie par g_2^{piezo}, il n'y a plus de déplacement mesurable par ce montage DWS. Ce résultat expérimental peut être interprété à la lumière de l'expression (1.39) : à cet instant, la cohésion des particules du gel particulaire est telle que le déplacement moyen des particules sur 1 ms est petit devant $\lambda \approx 500\ nm$.

Ce ralentissement a été observé par l'équipe du professeur Gauckler avec un montage comparable [22], et ce avant le début de ma thèse. Nous proposons la même interprétation du phénomène : les courbes DWS permettent de mesurer l'agitation des particules dans les cages définies par leur voisines, a mesure que la suspension coagule, la cage diminue de taille pour finalement bloquer l'agitation brownienne des particules ; les particules sont de plus en plus fortement liées à leur voisines.

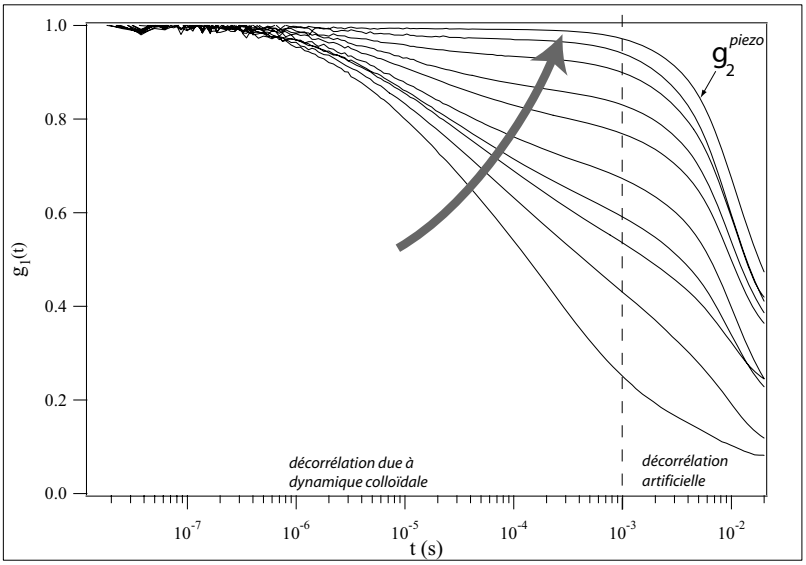


FIG. 3.13 – Fonctions de corrélation calculées lors de la coaguation d'une suspension d'alumine. La fraction volumique de la suspension est de 44% et la température du thermostat est de 45°C, les fonctions affichées sont distantes de 8 minutes et la courbe la plus rapide correspond à l'état . La décorrélation de la dernière courbe n'est due qu'au mouvement du verre fritté introduit dans le montage pour faire disparaître les modes lents au niveau de la détection.

Mesures SVS (Fig.3.14)

La mesure de la variance V_2 de la figure d'interférence enregistrée avec un temps d'exposition $T_{shutter}$ de 10 ms permet aussi d'observer le ralentissement de l'agitation des diffuseurs dans les cages. D'une variance V_2 faible au début de la coagulation on évolue vers un plateau de variance élevée (Fig.3.14).

Au moment du mélange avec l'agent déstabilisant, les images enregistrées sont uniformes, ce qui se traduit par une variance nulle : les colloïdes diffusent sur des distances bien supérieures à $\lambda \approx 500\ nm$ en 10 ms. La variance atteint ensuite un plateau proche de 1 : en 10 ms les diffuseurs se déplacent sur une distance petite devant 500 nm. Les valeurs intermédiaires de V_2 nous renseignent sur le ralentissement de la dynamique locale dans la suspension et sont cohérentes avec les mesures faites en DWS.

Nous avons effectué des mesures rhéologiques sur les suspensions en cours de coagulation. Les modules élastiques et visqueux de la suspension on été mesurés dans une géométrie cône-plan avec un cisaillement à contrainte imposée sinusoïdale d'amplitude égale à $1Pa$ et de fréquence égale à $1Hz$ (Fig.3.14). Au cours de la coagulation ces modules augmentent sur plusieurs décades. Il y a formation d'un gel particulaire à mesure que le sel se dissou. Nous avons cherché à comparer ces mesures macroscopiques avec les mesures microscopiques effectuées par diffusion multiple. On constate que **la disparition de l'agitation des particules dans les cages formées par leurs voisines intervient en même temps que la formation du gel particulaire élastique**.

Si nous modélisons le déplacement des particules par une agitation brownienne dans un milieu de viscosité η_{svs} , nous pouvons déduire des mesures de V_2 l'évolution de la viscosité effective[8] $\eta_{svs}(t)$ grâce à l'expression :

$$\begin{aligned} V_2 &= \frac{2}{T_{shutter}} \int_0^{T_{shutter}} (1 - \frac{t}{T_{shutter}}) \exp[-2\sqrt{\frac{t}{\tau}}] dt \\ &= x^{-2}\{x - \frac{3}{2} + \exp[-2\sqrt{x}](2x + \frac{3}{2} + 6\sqrt{x})\} \end{aligned}$$

où, avec les notations introduites dans le chapitre 1

$$x = \frac{T_{shutter}}{\tau} = \frac{6\sqrt{\alpha}(2\pi)^2 D T_{shutter}}{\lambda^2}$$

[8]De par la nature de V_2 la viscosité effective η_{svs} traduit en fait la viscosité vue par les particules dans une cage de 2λ de coté.

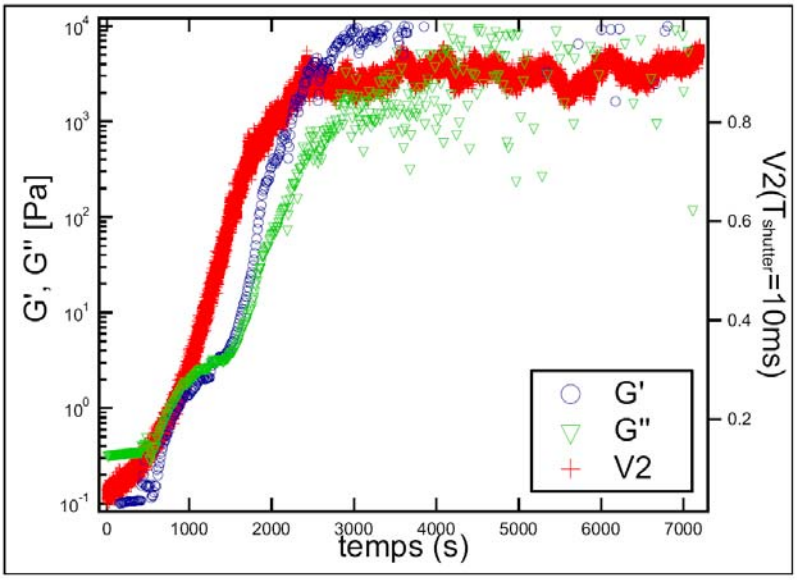


FIG. 3.14 – Suivi de la déstabilisation d'une dispersion d'alumine de fraction volumique 44% à 50°C. Modules élastique et module de perte mesurés à 1Hz avec une amplitude de $1Pa$. En rouge on peut observer l'évolution de la variance normée V_2 mesurée avec $T_{shutter} = 10ms$

Or la relation d'Einstein nous permet d'exprimer le coefficient de diffusion effectif D en fonction de la viscosité effective η_{svs} et le rayon R des diffuseurs :

$$D = \frac{1}{6\pi}\frac{1}{R}\frac{k_B T}{\eta_{svs}}$$

Ainsi le facteur x est proportionnel à la viscosité, on a $x = \frac{\eta_{svs}}{\eta_0}$ en définissant la grandeur η_0 comme il suit :

$$\eta_0 = \frac{1}{6\pi}\frac{6\sqrt{\alpha}k_B T(2\pi)^2 T_{shutter}}{R\ \lambda^2}$$

On constate que la viscosité effective sentie par les particules diverge bien au cours de la formation du gel particulaire (Fig.3.15). Il est intéressant de noter que cette viscosité effective augmente sur un grand nombre de décades comme c'est aussi le cas pour les modules élastiques et visqueux de la suspension. On peut estimer qualitativement l'évolution de la viscosité effective par ces méthodes non invasives de diffusion multiple, toutefois on ne peut pas obtenir de mesures absolues. Au cours de la coagulation nous avons observé macroscopiquement que le gel particulaire soutenait son propre poids et n'expulsait pas d'eau. En fait, dans le cadre des fractions volumiques étudiées le volume d'eau expulsé lors de la coagulation a été mesuré par γ-densimétrie, nous avons constaté qu'il est inférieur à 2% du volume total de l'échantillon.

3.3.3 Apparition d'intermittences étudiées par MSDWS

Par les mesures SVS et DWS nous avons constaté un phénomène prévisible : l'agitation brownienne des particules de la suspension disparaît peu à peu au cours de la coagulation en même temps que la suspension liquide se transforme en gel particulaire. Afin de comprendre les propriétés mécaniques à basse fréquence du système, nous devons étudier les modes de réorganisation sur des temps caractéristiques supérieurs à $10ms$. Ni la technique standard DWS, qui fait intervenir des moyennages temporel rédhibitoires pour ces durées, ni la technique SVS, principalement limitée par le temps d'exposition maximum de $10ms$ de la caméra, ne permettent de mesurer ces modes de réorganisation "lents". La technique MSDWS permet de dépasser ces limitations en comparant les images de la figure d'interférence prises à différents instants de la coagulation, **on peut ainsi étudier des réorganisations microscopiques sur des durées allant de** $30ms$ **à plusieurs minutes**.

Quand la variance V_2 atteint son maximum, la comparaison d'images de la figure d'interférence prises en deux instants t, t' permet d'être sensible

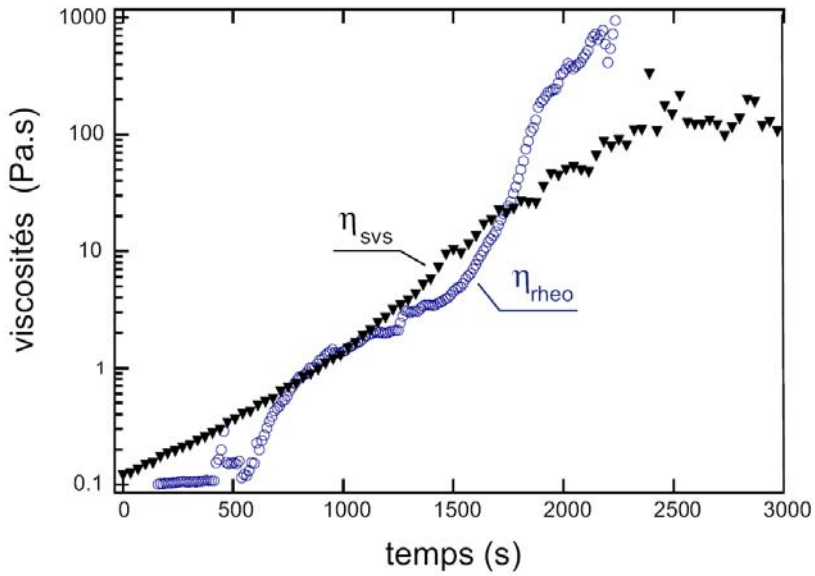


FIG. 3.15 – Comparaison de la viscosité effective tirée des mesures SVS avec la viscosité déduite des mesures rhéologiques. La viscosité η_0 qui intervient dans l'expression de la viscosité effective est de l'ordre de 50 centipoise pour $\alpha = 3$ et $R = 100nm$. L'accord des valeurs est mauvais, surtout en régime élastique, mais on obtient bien une évolution des valeurs sur plusieurs décades.

au déplacement des particules entre t et t'. Dans le chapitre 1 est présenté la valeur de corrélation $R_I(t,t')$ qui permet la comparaison des images. Par analogie avec la DWS, la manière la plus naturelle de présenter les données est de construire des fonctions de corrélations $G_2^{t0}(t) = R_I(t0,t)$ suivant le protocole suivant :

- l'image prise à $t0$ est choisie comme *image de référence.*
- on calcule $G_2^{t0}(t) = R_I(t0,t)$ pour toutes les images qui suivent l'image de réfèrence, jusqu'à ce que l'on définisse une nouvelle image de référence.

Cette méthode de traitement des données a été implémentée sous l'environnement Labwindows, grâce à ce programme et au système d'acquisition décrit en amont il est possible de suivre en temps réel la coagulation et d'obtenir des faisceaux de courbes de corrélation successives. Nous nous attendions à observer un ralentissement progressif de la dynamique des particules mais nous avons eu la surprise d'observer des phases de réaccélération soudaine de la dynamique.

Ces phases de réaccélération rendent le choix des images de référence problématique et la méthode de présentation des données par fonctions de corrélation successives peu adaptée à l'étude du système. En étudiant le vieillissement de phases lamellaires concentrées par MSDWS, le professeur L. Cipeletti a été confronté à un phénomène d'intermittence analogue. Afin de prouver l'existence de ces intermittence il a introduit une nouvelle façon de traiter les données de corrélation et a appelé cette méthode la "Time Resolved Correlation" (TRC) présentée dans la suite [23] .

Timed Resolved Correlation et intermittences

Au lieu d'étudier des fonctions de corrélation G_2^{t0}, la méthode TRC consiste à construire des fonctions $C_I^\tau(t) = R_I(t,t+\tau)$. La fonction $C_I^\tau(t)$ renseigne en tout t sur le déplacement des particules entre t et $t+\tau$. Pour une dynamique stationnaire, la décorrélation entre deux images distantes de τ est stationnaire ce qui se traduit en pratique par une distribution des valeurs de $C_I^\tau(t)$ proche d'une distribution gaussienne.Dans notre cas par contre on observe des distribution de valeurs de $C_I^\tau(t)$ asymétriques (Fig.**??**).

Afin de calculer les fonctions $C_I^\tau(t)$ nous avons choisi d'enregistrer les figures multispeckle pendant les 4 premières heures de la coagulation avec une fréquence de $6Hz$. Le calcul des fonctions est fait *a posteriori* grâce à un programme développé sous C++Builder afin d'optimiser les durées de calculs. Pour des τ supérieurs à 1 s, la distribution des valeurs de $C_I^\tau(t)$ est clairement non gaussienne (Fig.3.16).

De telles statistiques non gaussiennes ont déjà été observées dans

d'autres systèmes [27, 28, 29]. Ce phénomène suggère que la la dynamique des systèmes concentrés est intermittente. L'évolution du système fait intervenir des phases de réorganisation brutales de durées variables, qui font penser à des "tremblements de terre" à l'échelle de la suspension. Afin d'étudier la distribution temporelle de ces périodes de réarrangement brutal nous avons élaboré une technique de traitement des données présenté dans la suite.

Surfaces de corrélation et statistique des intermittences

Après avoir établi grâce aux courbes de TRC l'existence d'intermittences dynamiques lors de la coagulation du gel particulaire nous avons tenté de caractériser ces intermittences. L'idée était de chercher à repérer le début et la fin de chaque phase de dynamique rapide, pour ce faire nous avons utilisé les distributions de probabilité de la figure (3.16) afin d'obtenir un critère permettant de repérer les *valeurs de corrélation anormales*. Partant de deux images prises en t et en t' voici le protocole à suivre pour savoir si la valeur $R_I(t,t')$ est une *valeur de corrélation anormale* :

- calculer la fonction $C_I^\tau(t)$ sur toute l'expérience avec $\tau = t' - t$
- caculer la probabilité de distribution P_C^τ des valeurs prises par $C_I^\tau(t)$ pendant la coagulation
- mesurer la largeur $\sigma(\tau)$ de la gaussienne caractéristique du bruit de l'appareil
- définir comme valeur seuil $C_{I0}^\tau - 2\sigma(\tau)$, toute valeur $C_I^\tau(t)$ inférieure à ce seuil sera considérée comme une valeur de corrélation anormalement basse, caractéristique des intermittences.

Nous avons ensuite construit des surfaces de corrélation en remarquant que les scores de corrélation $R_I(t,t')$ est une fonction à deux variables, nous avons donc tracé des surfaces vérifiant :

- sur l'axe X on trouve le temps écoulé t depuis le début de l'expérience
- sur l'axe Y on trouve un temps τ, durée qui sépare les images dont la corrélation est traduite sur l'axe Z
- sur l'axe Z on trouve la corrélation entre l'image prise en t et celle prise en $t - \tau$

Afin de représenter cette surface dans des graphes nous avons traduit la corrélation exprimée par Z en code de couleur. On peut noter que la valeur de corrélation entre deux images séparées par une durée fixée est lue en suivant la droite parallèle à l'axe des abscisses, c'est une fonction TRC. Par contre, si on veut lire la fonction de corrélation partant de l'image de référence prise à t, il suffit de lire le graphe en suivant une droite parallèle à l'axe des ordonnées et coupant l'axe des abscisses en t.

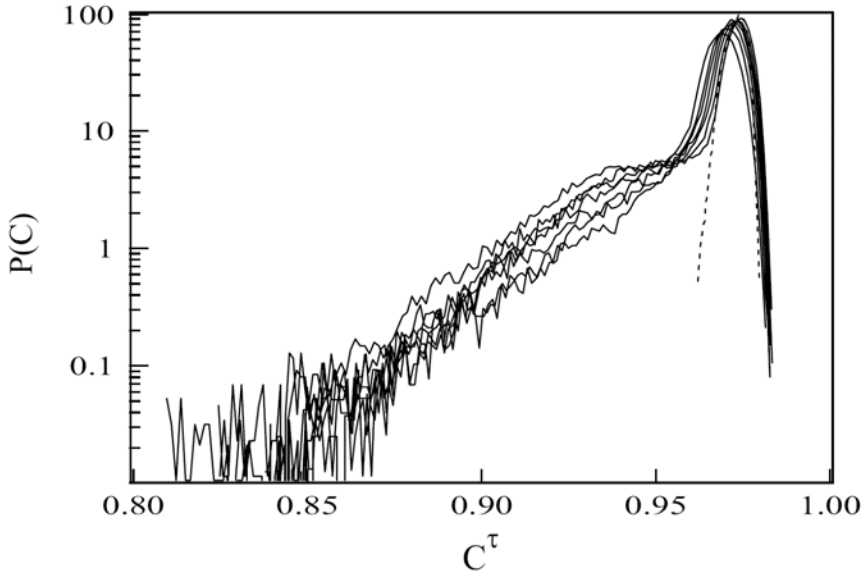


FIG. 3.16 – Densité de probabilité des fonctions TRC $C_I^\tau(t)$, pour une coagulation où $\phi = 34\%$ et différentes valeurs de délai inter-images τ. Quand le délai inter-images augmente, les courbes sont déplacées vers des valeurs de corrélation plus faibles. De droite à gauche : $\tau = 10s$,$\tau = 14s$,$\tau = 18s$,$\tau = 20s$,$\tau = 24s$,$\tau = 27s$, $\tau = 33s$. La courbe en pointillé est obtenue grâce à un échantillon ayant les même propriétés optiques mais qui ne présente pas de dynamique, cette courbe montre le bruit gaussien intrinsèque à la mesure.

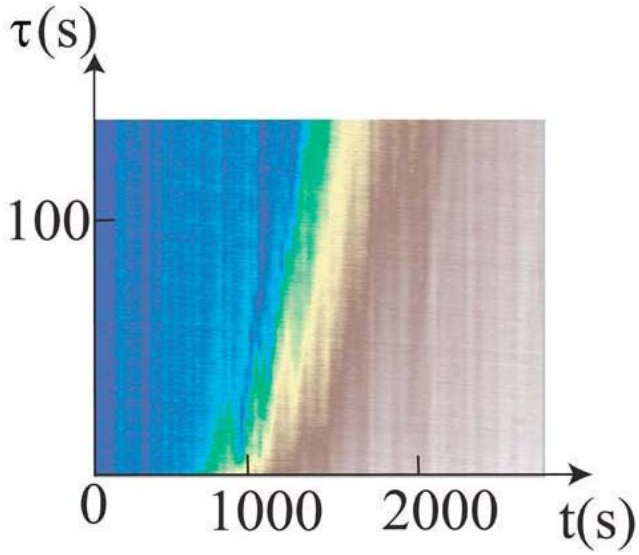


FIG. 3.17 – Surface de corrélation de la déstabilisation à 45°C d'une suspension de fraction volumique de 34%. La corrélation augmente de bleu à marron. Cette première surface retrace le début de la déstabilisation quand la transition d'un fluide vers un comportement élastique se produit.

Quand on considère la surface de corrélation pendant le début de l'expérience on observe le ralentissement de la dynamique du système (Fig.3.17). Le plus intéressant est d'observer les surfaces de corrélation quand le gel particulaire est formé et que l'agitation brownienne des particules a disparu (Fig.3.18). On constate que la surface présente des irrégularités marquées et que des zones de décorrélation triangulaires apparaissent. Grâce aux seuils de corrélation anormales calculés précedemment nous avons pu tirer des informations sur la distribution statistique des intermittences dans l'échantillon.

Dans les surfaces de corrélation, les périodes de dynamique rapide apparaissent sous la forme de zones de scores de corrélation anormaux. La particularité de ces zones est d'être délimitées à gauche par des droites de pente -1 et à gauche par des droites verticales. Quand en un instant t la dynamique s'accélère fortement tous les scores de corrélation calculés avec cette image sont anormaux, les scores de corrélation entre l'image prise en t et les images qui la précèdent sont lus suivant la droite de pente -1 coupant l'axe des abcisses en t alors que les scores de corrélation avec les images qui suivent t sont lus suivant la droite verticale coupant l'axe des abscisses en t.

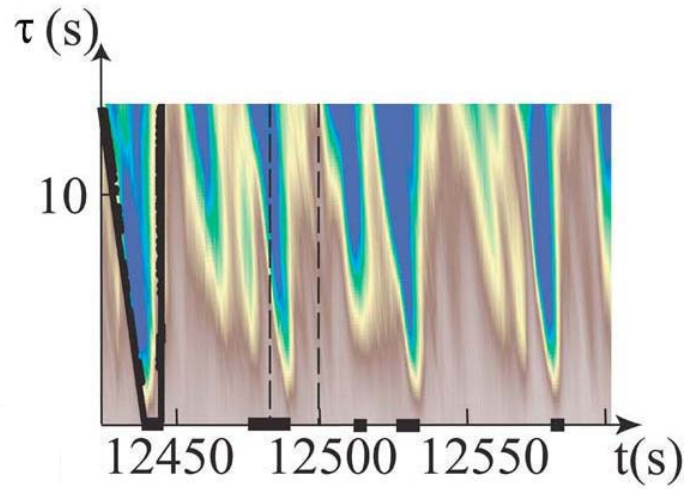


FIG. 3.18 – Surface de corrélation de la déstabilisation à 45°C d'une suspension de fraction volumique de 34%. La corrélation augmente de bleu à marron. Quand la suspension est devenue un gel particulaire, on observe des séquences d'intermittence. Ces intermittences apparaissent ici sous la forme de triangles bleus, couleur associée à de faibles corrélations entre images. La présente surface est typique de ces intermittences. La durée des intermittences les plus longues à été soulignée par des lignes épaisses le long de l'axe des abcisses. Les droites de pente -1 et inf marquent les limites des zones bleues, déterminées comme ayant des valeurs de corrélation anormales grâce aux distributions de probabilité présentées en amont.

C'est grâce à cette redondance de l'information que l'observation des surfaces de corrélation permet de repérer précisément les zones de dynamique rapide.

La **première image d'une intermittance** est repérée par le fait qu'elle soit décorrélée avec plus de 90% des images prises dans les $5s$ qui la précèdent. Ces instants sont facilement repérables dans la surface de corrélation : ils sont au pied des droites (xy) de pente -1 (Fig.3.18). **La dernière image** d'une intermittence est de même repérée par le fait qu'elle soit décorrélée avec plus de 90% des images prises dans les $5s$ qui la suivent. Dans la surface ces moments se trouvent au pied des droites (xy) de pente infinie.

Une fonction TRC permet en théorie de repérer ces zones de dynamique rapide mais en pratique le bruit expérimental limite cette approche. Le mérite principal de notre méthode de traitement des données est de **tirer partie de la redondance** des informations de corrélation.

Distributions temporelles des intermittences

Une série d'échantillon présentant des fractions volumiques comprises entre 32% et 44% a été étudiée. La méthode d'analyse décrite ci-dessus a été appliquée au cours de la coagulation de ces suspensions. Chaque expérience se déroule sur 5 heures et le nombre total de zones de dynamique rapide est de l'ordre de 10^3. Nous observons tout d'abord que la durée moyenne des intermittences ainsi que la durée d'attente entre deux intermittences successives reste constant au cours de la coagulation. La densité de probabilité de la durée des zones rapides est en fait une propriété de la suspension en train de coaguler. Dans la figure (3.19) cette densité de probabilité est tracée, elle recouvre une grande gamme temporelle et présente une distribution en loi de puissance avec un exposant compris entre $-1,9$ et $-2,1$.

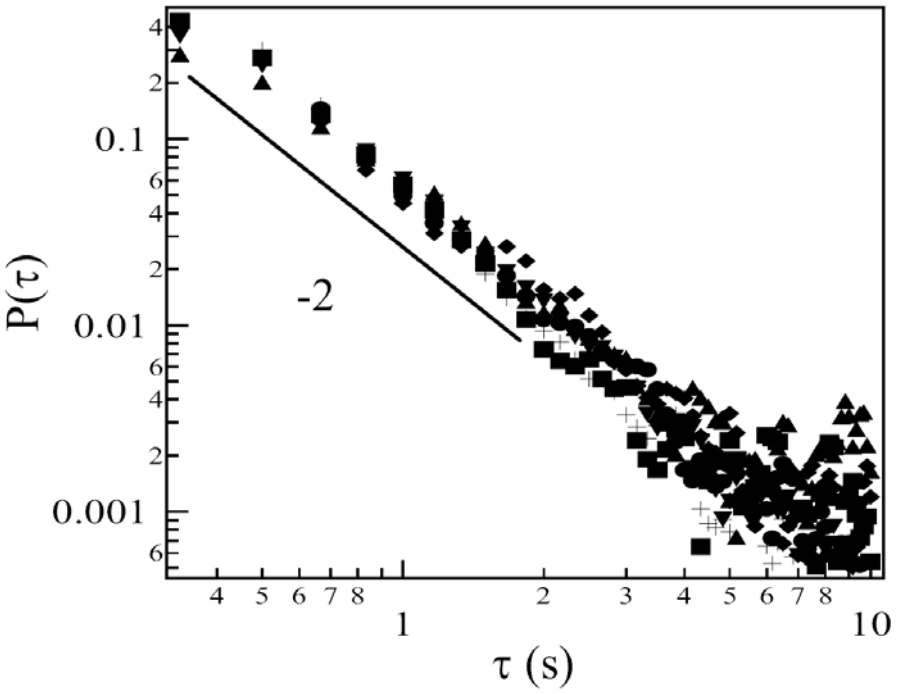


FIG. 3.19 – Densité de probabilité de la durée des intermittences pour différentes fractions volumiques ($\phi = 32\%$ ($\bullet$), $\phi = 34\%$ ($\star$), $\phi = 36\%$ ($\triangle$), $\phi = 38\%$ (∇), $\phi = 42\%$ ($\diamond$), $\phi = 44\%$ ($+$))

3.4 Conclusions

Nous avons étudié dans ce chapitre la floculation de suspensions de particules concentrées, où nous avons lentement augmenté la forces des interactions entre particules au cours du temps. D'un point de vue mécanique, chaque particule et sa voisine participe à un dipôle de force, on peut ainsi décrire le système comme un réseau de contacts que l'on met progressivement sous tension. Ce réseau est aléatoire, l'augmentation des tensions locales peut de plus être hétérogène. La floculation revient donc à faire apparaître des contraintes internes dans la suspension. On observe que la dynamique de ce système est très lente à l'exception d'instants de dynamique rapide pendant lesquel de nombreuses réorganisations microscopiques se produisent. La réponse du système à l'augmentation de la tension locale est très non-linéaire. Nos observations ne nous permettent pas de remonter à l'origine de ces non-linéarités. On peut cependant faire plusieurs hypothèses :

- En mettant le réseau de force sous tension, les contraintes locales de compression sont modifiées et conduire à la rupture de paires de particules : localement un seuil de flambage a pu être dépassé ou les contacts les plus faibles sont rompus [Bouchaut 13].
- La dissolution non-homogène du sel d'aluminium crée des hétérogénéités spatiales des forces locales ce qui aboutit à la rupture des contacts les plus faibles.
- Enfin, la suspension est très concentrée, et comme cela a été observé dans l'écoulement de suspensions colloïdales les forces de contact solide solide peuvent jouer un rôle important et être à l'origine de seuil de déplacements.

Dans le gel particulaire nous avons montré que les particules étaient solidaires de leur voisines, par conséquent les intermittences observées sont dues à la réorganisation de flocs denses qui laissent de larges vides responsables de la fragilité du gel particulaire. Le déplacement de ces flocs denses peut être responsable des durées longues des intermittences.

Les mesures multispeckle permettent de prouver l'existence des intermittences mais pas d'en déterminer les mécanismes microscopiques. Nous avons tenté d'étudier nos systèmes par microscopie confocale pour avoir une idée directe des déplacements impliqués dans nos systèmes. Pour des raisons particulières, nous avons nous même réalisé un microscope confocal rapide, les trois chapitres qui suivent présentent cette aventure dans le monde de l'instrumentation qui a occupée la moitié de ma thèse.

Bibliographie

[1] B.Cabanne, S.Hénon Liquides : solutions, dispersions, émulsions,gels. *Ed. Belin*, 2002.

[2] A. Duri, P. Ballesta, L. Cipelletti, H. Bissig, V. Trappe Fluctuations and noise in time-resolved light scattering experiments : measuring temporally heterogeneous dynamics. *Fluctuation and Noise Letters*, **5**, *1*, L1-L15, 2005.

[3] B.Balzer, M.K.M.Hruschka, L.J.Gauckler Coagulation kinetics and mechanical behavior of wet alumina green bodies produced via DCC. *Journal of Colloïds and Interface Science*, **216**, *2*, 379-386,1999.

[4] B.Balzer, M.K.M.Hruschka, L.J.Gauckler In situ rheological investigation of the coagulation in aqueous alumina suspensions. *Journal of the American Ceramic Society*, **84**, *8*, 1733-1739,2001.

[5] A.R.Studart, V.C.Pandolfelli, E.Tervoort, L.J.Gauckler Direct coagulation casting of alumina suspensions using jack bean as urease source. *Journal of the American Ceramic Society*, **85**, *7*, 1695-1698, 2002.

[6] A.R.Studart, V.C.Pandolfelli, E.Tervoort, L.J.Gauckler Ceramic forming using enzyme catalysed reactions. *Ceramic Bulletin*, 21-36,2002.

[7] A.R.Studart, V.C.Pandolfelli, E.Tervoort, L.J.Gauckler Gelling of alumina suspensions using alginic acid salt and hydroxyaluminum diacetate. *Journal of the American Ceramic Society*, **85**, *11*, 2711-2718, 2002.

[8] E.Tervoort, T.A.Tervoort, L.J.Gauckler Chemical aspects of direct coagulation casting of alumina suspensions . *Journal of the American Ceramic Society*, **87**, *8*, 1530-1535, 2004.

[9] J.A.Lewis Colloidal processing of ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, **83**, *10*, 2341-2359, 2000.

[10] R.Laucournet, C.Pagnoux, T.Chartier, J.F. Baumard Coagulation method of aqueous concentrated alumina suspensions by thermal

decomposition of hydroxyaluminum diacetate. *Journal of the American Ceramic Society*, **83**, *11*, 2661-2667, 2000.

[11] M.Giglio Salt-induced fast aggregation of polystyrene latex *Physical Review A*, **42**, *12*, 7347-7354, 1990.

[12] J.Israelachvili Intermolecular and surface forces. *Ed. Academic Press*, 1991.

[13] H.M.Wyss, S.Romer, F.Scheffold, P.Schurtenberger, L.J. Gauckler Diffusing Wave Spectroscopy of concentrated alumina suspensions during gelation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **240**, *1*, 89-97, 2001.

[14] H.M.Wyss, M.Hütter, M.Müller, L.P. Meier, L.J. Gauckler Quantification of microstructures in stable and gelated suspensions from Cryo-SEM. *Journal of Colloid and Interface Science*, **248**, 340-346, 2002.

[15] H.M.Wyss, A.M. Deliormanti, E.V. Tervoort, L.J. Gauckler Influence of microstructure on the rheological behavior of dense particle gels. *AICHE Journal*, **51**, *1*, 134-141, 2004.

[16] H.M.Wyss, M. Muller, E.V. Tervoort, L.J. Gauckler Relation between microstructure and mechanical behavior of concentrated silica gels. *Journal of Colloid and Interface Science*, **273**, *2*, 455-462, 2004.

[17] H.M.Wyss, J. Innerlohinger, L.P. Meier, L.J. Gauckler,O. Glatter Small-angle static light scattering of concentrated silica suspensions during *in situ* destabilization. *Journal of Colloid and Interface Science*, **271**, 388-399, 2004.

[18] H.M.Wyss, E.V. Tervoort, L.J. Gauckler Mechanics and microstructures of concentrated particle gels. *Journal of the American Ceramic Society*, **88**, *9*, 2337-2348, 2005.

[19] H.Z.Cumming and E.R. Pike Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy. *Plenum Press*, 1974.

[20] V.Viasnoff, F.Lequeux, D.J.Pine Multispeckle diffusing-wave spectroscopy : A tool to study slow relaxation and time-dependent dynamics. *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, **73**, *6*, 2336-2344, 2002.

[21] F.Scheffold, S.E.Skipetrov, S.Romer, P.Schurtenberger Diffusing-wave spectroscopy of nonergodic media . *Physical Review E*, **63**, *6*, 061404-061415, 2001.

[22] H.M.Wyss, S.Romer, F.Scheffold, P.Schurtenberger, L.J.Gauckler Diffusing Wave Spectroscopy of concentrated alumina suspensions during gelation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **240**, *1*, 89-97 , 2001.

[23] A.Durian, H.Bissig, V.Trappe, L. Cipelletti Time Resolved Correlation measurements of temporally heterogeneous dynamics. *Physical Review E*, **72**, *5*, 051401 , 2005.

[24] A.Duri, P.Ballesta, L.Cipelletti, H.Bissig, V.Trappe Fluctuations and noise in time-resolved light scattering experiments : measuring temporally heterogeneous dynamics. *Fluctuation and Noise Letters*, **5**, *1*, L1-L5 , 2005.

[25] D.El Masri, M.Pierno, L.Berthier, L.Cipelletti Ageing and ultra-slow equilibration in concentrated colloidal hard spheres. *Journal of Physics : Condensed Matter*, **17**, *1*, S3543-S3549 , 2005.

[26] D.A.Weitz, D.J.Pine Dynamic Light Scattering : the methods and some applications. *Ed. Oxford University Press*,652-720, 1993.

[27] H.Bissig, S.Romer, L.Cipelletti, V.Trappe, P.Schurtenberger Intermittent Dynamics and Hyper-Aging in Dense Colloidal Gels. *Phys. Chem. Commun*, **6**, *21*, 2003.

[28] P.A.Lemieux, D.J.Durian From Avalanches to Fluid Flow : A Continuous Picture of Grain Dynamics Down a Heap. *Phys. Rev. Lett.* ,**85** ,4273 , 2000.

[29] J.P.Sethna , K.A.Dahmen, Ch.R.Myers Crackling noise. *Nature*, **410**, 242, 2001.

Introduction aux chapitres de microscopie

Les études de suspensions colloïdales concentrées précédente démontrent l'intérêt d'étudier l'évolution de la microstructure de ces suspensions au cours de leur évolution. Dans le système coagulé, nous avons observé l'apparition d'intermittences dynamiques mais nous ne sommes pas parvenus à déduire des mesures le mécanisme microscopique responsable de ces intermittences. Cette impossibilité est due à une propriété des grandeurs mesurées lors des expériences de MSDWS : chaque grandeur dépend d'un grand nombre de grandeurs microscopiques. **Ainsi le déplacement d'un grand nombre de particules sur une petite distance peut aboutir à la même mesure que le déplacement d'un petit nombre de particules sur une grande distance**.

Pour mieux comprendre l'évolution de la microstructure de ces suspensions il semble que l'utilisation d'une technique d'observation directe soit nécessaire. Notre objectif fut donc de trouver une technique permettant de suivre la position de quelques centaines de colloïdes au coeur de la suspension concentrée. Les techniques de microscopie optique permettent de localiser des particules micrométriques de manière non invasive. Pour des échantillons ayant des épaisseurs de l'ordre de quelques microns, la qualité des images obtenues par un microscope optique classique et par un **microscope confocal** à balayage sont comparables. Par contre dans le cas d'échantillons épais de plusieurs dizaines de microns le gain en visibilité obtenu par l'usage d'un microscope confocal est spectaculaire [3]. L'origine de cette amélioration est qualitativement décrite dans la partie 4, où est de plus expliqué en quoi le mode d'illumination épifluorescent est adapté à imager des suspensions. Afin de nous aider dans le choix des éléments optiques du montage, la partie 5 décrit de manière plus quantitative le rôle des éléments clefs du montage. L'engouement de la communauté scientifique pour la microscopie confocale lors des trente dernières années a abouti à un grand nombre de variations autour du montage initial, nous expliquerons dans la partie 6 notre choix de

montage particulier.

Chapitre 4

Principes de microscopie confocale

Avant d'aborder les principes de microscopie confocale, nous tenons à présenter en premier temps le type d'échantillon à étudier. Cette priorité est représentative de notre démarche par rapport à la microscopie : nous n'allons pas inventer une nouvelle technique de microscopie mais nous allons nous inspirer de méthodes optiques existantes afin d'obtenir une solution technique de microscopie adaptée à nos problématiques expérimentales (physico-chimie de suspensions colloïdales concentrées). Notre démarche peut se résumer en une phrase : nous tentons d'élaborer le microscope en fonction des échantillons.

Nous souhaitons étudier l'évolution de la microstructure de suspensions colloïdales concentrées composées de particules solides sphériques. Notre intérêt se porte principalement sur l'évolution des positions des particules et sur leur nombre de proches voisins. D'autre part dans le cas d'échantillons minces, l'influence des flux hydrodynamiques de séchage et le confinement perturbent fortement le comportement des suspensions. Nous souhaitons donc travailler sur des échantillons épais et imager le plus loin possible des parois. Enfin il nous faut tenir compte de la dynamique de réorganisation des particules. Ainsi, les réorganisations rapides observées lors de la floculation peuvent durer d'une fraction de seconde à quelques secondes. Il nous faut donc pouvoir caractériser la microstructure en moins d'une seconde. Pour avoir des informations statistiquement intéressantes il faut de plus avoir au moins 1000 particules dans le volume sondé. Les critères de performance nécessaires pour des particules de $1\mu m$ ont été réunis dans le tableau 4.1.

En résumé nous souhaitons imager des plans de $900\mu m^2$ avec une résolution inférieure au micron, pénétrer à plus de $40\mu m$ dans l'échantillon et faire plus de 40 images par seconde. Nous allons voir dans la suite comment la technique de microscopie confocale en épi-illumination nous permet

Type d'échantillon	Suspension colloïdale
Fraction volumique de la suspension	1% à 50%
Ordre de grandeur du diamètre des colloïdes	$1\mu m$
Nombre de particules à visualiser dans le volume accessible	~ 1000
Profondeur max d'imagerie dans l'échantillon	$> 40\mu m$
Dimension minimum d'une image	$> 30\mu m$
Fréquence d'acquisition par image	$> 40Hz$

TAB. 4.1 – Propriétés optiques des échantillons à observer.

d'atteindre ces objectifs.

4.1 Microcopie à large champ en transmission

Le principe fondamental de tout microscope optique [2] est d'associer trois plans particuliers par un système de lentilles :

- un plan contenant des sources lumineuses (**plan S**)
- le plan de l'échantillon que l'on veut imager (**plan E**)
- un plan contenant le détecteur, par exemple un capteur CCD ou notre rétine (**plan D**)

Ces trois plans ainsi que la position des éléments principaux d'un microscope de transmission sont présentés dans la figure (4.1). Le système de lentilles qui conjugue les plans S et E est appelé **condenseur**. Les plans E et D sont eux conjugués grâce à l'objectif et à la lentille de tube. Un **objectif de microscope** [1] est un ensemble de lentilles conçu pour être équivalent à une lentille ayant une distance focale de quelques mm. La distance focale de la lentille de tube est de l'ordre de 200 mm. Ainsi pour un objet diffusant dans le plan E on obtient donc une image agrandie dans le plan D, le facteur de grandissement latéral est égal au rapport de la distance focale de la lentille de tube et de la distance focale effective de l'objectif[2]. Les conditions d'éclairement optimum pour ce montage ont été définies au début du siècle par Kohler (Fig.4.2). Ces conditions permettent d'obtenir la meilleure

[1] Les objectifs dits "infinis" associent leur plan focal avant à l'infini.

[2] les objectifs commerciaux affichent une donnée de grandissement, pour connaître leur distance focale équivalente il faut connaître la focale de la lentille de tube. Pour chaque constructeur tous les appareils ont la même distance focale de tube, pour Olympus par exemple on a toujours 180mm.

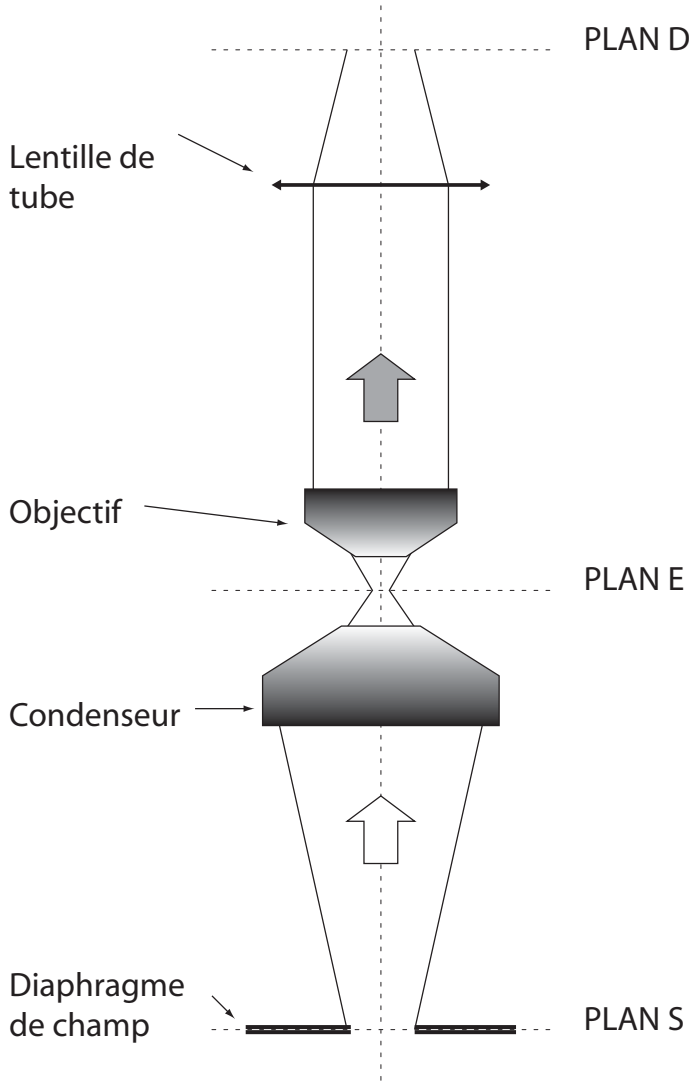


FIG. 4.1 – Schéma de principe d'un microscope large champ à transmission utilisant un objectif infini. Les flèches indiquent le sens de l'illumination et de la collection. Nous pouvons considérer que le plan S est constitué d'un ensemble uniforme de sources de lumière non cohérentes devant lequel est placé un diaphragme réglable appelé diaphragme de champ. L'échantillon diffusant est placé au plan E et la détection de l'image agrandie peut se faire au plan D. Les différents éléments optiques sont alignés sur un même axe. Le diaphragme de champ permet de régler la dimension de la zone illuminée dans l'échantillon.

résolution possible avec un microscope optique à large champ. Le plan S peut alors être considéré comme constitué d'un ensemble uniforme et compact de sources de lumière non cohérentes.

La luminosité locale de l'image formée en D traduit les propriétés optiques locales de l'échantillon. Tout point P de l'image est associé à un point P' dans l'échantillon. Si au voisinage de ce point P' l'échantillon absorbe ou diffuse fortement la lumière alors le signal sera nul au point P de l'image.

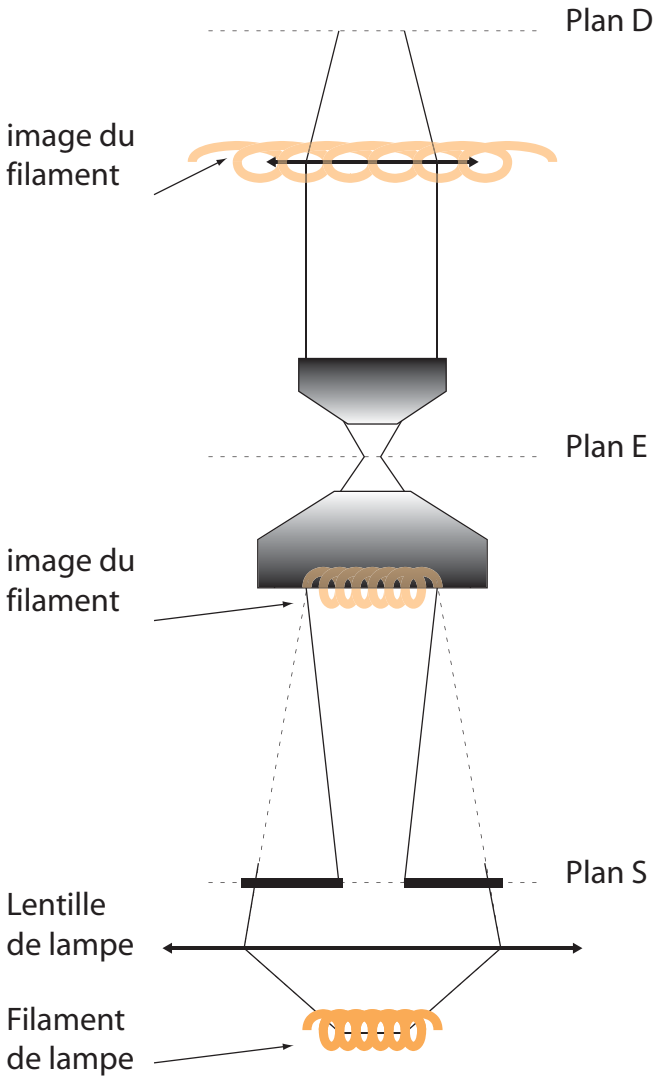


FIG. 4.2 – Schéma d'un microscope à large champ réglé suivant le protocole de Kohler.

4.2 Microscopie large champ en épi-illumination

Un autre type de montage est présenté dans la figure (4.3), c'est un microscope à épi-illumination. Dans ce montage **l'objectif joue aussi le rôle de condenseur**. Ceci est rendu possible par l'utilisation d'une lame semi-transparente qui réfléchit une fraction de l'illumination et qui est partiellement transparente à la lumière émise par l'échantillon illuminé comme l'indiquent les flèches du schéma (Fig.4.3). Ainsi **le trajet d'illumination et le trajet de détection se superposent entre la lame et l'échantillon**. Les éléments optiques sont placés de telle manière à ce que les plans S, E et D soient conjugués, ce qui permet comme dans le microscope à transmission d'obtenir dans le plan D un agrandissement de l'échantillon. L'avantage principal de l'épi-illumination est de faciliter la vie de l'opérateur du microscope quand il tente d'observer des échantillons épais diffusants ou absorbants.

Dans de tels échantillons turbides la lumière qui se propage sur une distance supérieure à l_0 n'est plus détectable. Cette distance l_0 est caractéristique de l'échantillon et de la sensibilité du montage, sa connaissance à priori est le plus souvent totalement inaccessible à l'expérimentateur. S'il utilise un microscope à transmission la visualisation de l'échantillon d'épaisseur supérieure à l_0 ne donnera pas des images assez claires pour être utilisables. En microscopie à transmission il faut adapter l'épaisseur de l'échantillon à la distance l_0, qui est *a priori* inconnue. Par contre, l'utilisation d'un microscope à épi-illumination permet d'imager l'échantillon jusqu'à une profondeur de $l_0/2$ quelle que soit l'épaisseur de l'échantillon.

Le signal mesuré en épi-illumination est la capacité locale de l'échantillon à réfléchir la lumière d'illumination. Les inconvénients d'un tel signal sont d'être perturbé par la réflexion à la surface de l'échantillon et d'être dépendant de l'inclinaison locale des interfaces à imager (Fig.4.4). Le montage présenté dans le schéma suivant permet de passer outre ces inconvénients.

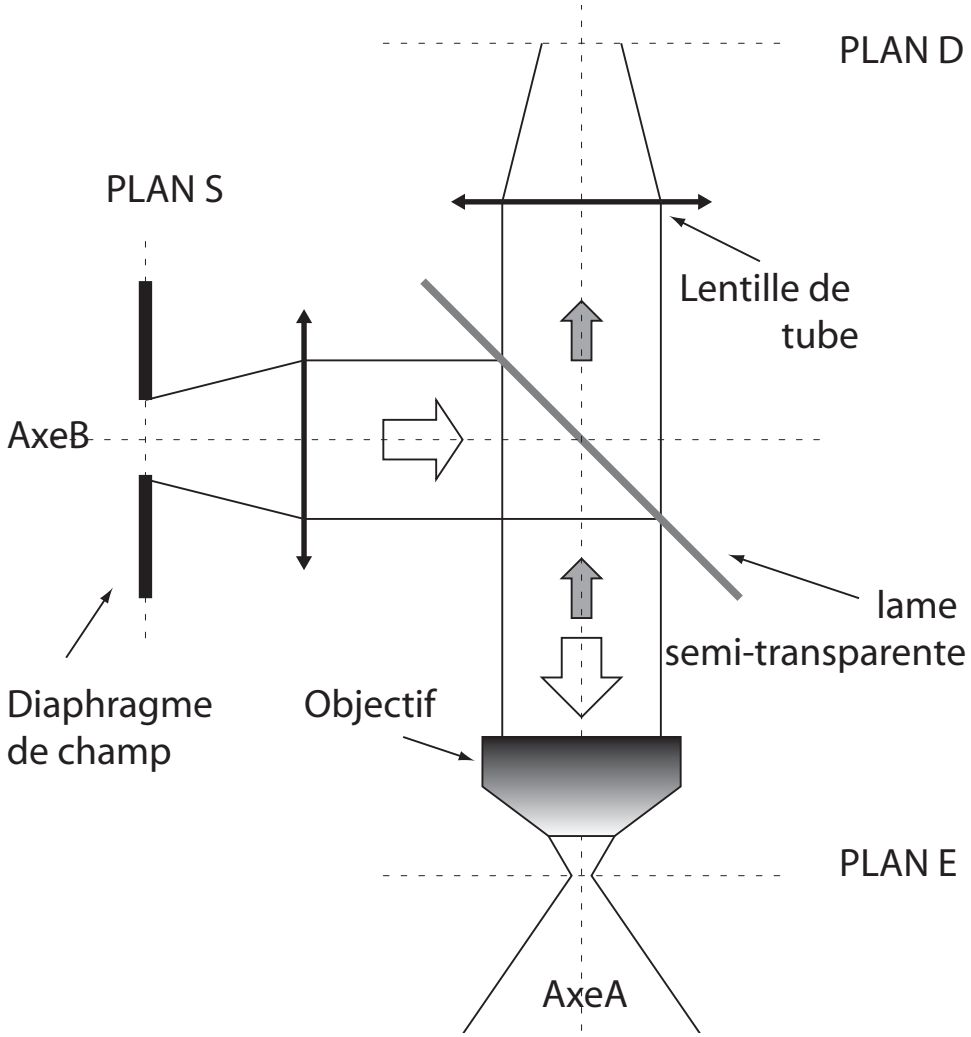


FIG. 4.3 – Schéma de principe d'un microscope large champ à épi-illumination utilisant un objectif infini. Les flèches indiquent le sens de propagation de la lumière dans le trajet d'illumination et dans le trajet de détection. Les plans S, E et D ont des fonctions identiques à celles décrites dans le schéma du microscope à transmission. Les différents éléments optiques sont alignés sur l'axe A ou sur l'axe B. L'image de l'axe B par le plan défini par la lame semi-réfléchissante est confondue avec l'axe A. Le diaphragme de champ permet de régler le diamètre de la zone illuminée dans l'échantillon.

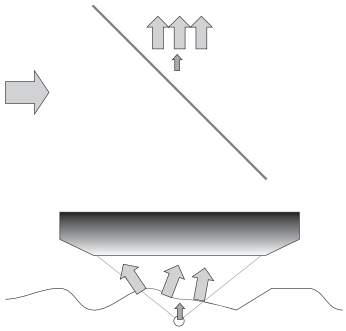


FIG. 4.4 – Importance de la réflexion à la surface de l'échantillon. Cette réflexion n'est pas filtrée par la lame semi réfléchissante et parvient au détecteur en parallèle du signal de réflexion généré par une particule présente dans l'échantillon.

4.3 Microscopie épi-fluorescente à large champ

La microscopie à épi-fluorescence est adaptée à l'imagerie d'échantillons épais dont les objets fluorescents sont séparés d'au moins quelques dizaines de microns. Le montage optique est schématisé dans la figure (4.5).

Par contre pour des objets fluorescents séparés de quelques microns les images deviennent floues. Cette détérioration des images n'existe que dans le cas d'échantillons épais et elle est due à la fluorescence des objets qui sont au voisinage du plan que l'on cherche à imager. La qualité des images s'amenuise rapidement en fonction de l'épaisseur de l'échantillon. Cette détérioration de l'image est due aux marqueurs hors focus, dont les images ne se trouvent pas dans le plan d'observation, mais qui contribuent cependant à l'intensité détectée (Fig.4.6). Puisque les différents marqueurs se comportent comme des sources non cohérentes, l'intensité locale du champ dans le système de détection est la somme des contributions en intensité des différents marqueurs. Ainsi le niveau de gris du pixel associé à une position dans le plan focal peut être contaminé par les marqueurs hors plan focal. La microscopie confocale permet de réduire considérablement ce phénomène. Ainsi, il devient possible d'éliminer l'information provenant des marqueurs hors du plan E.

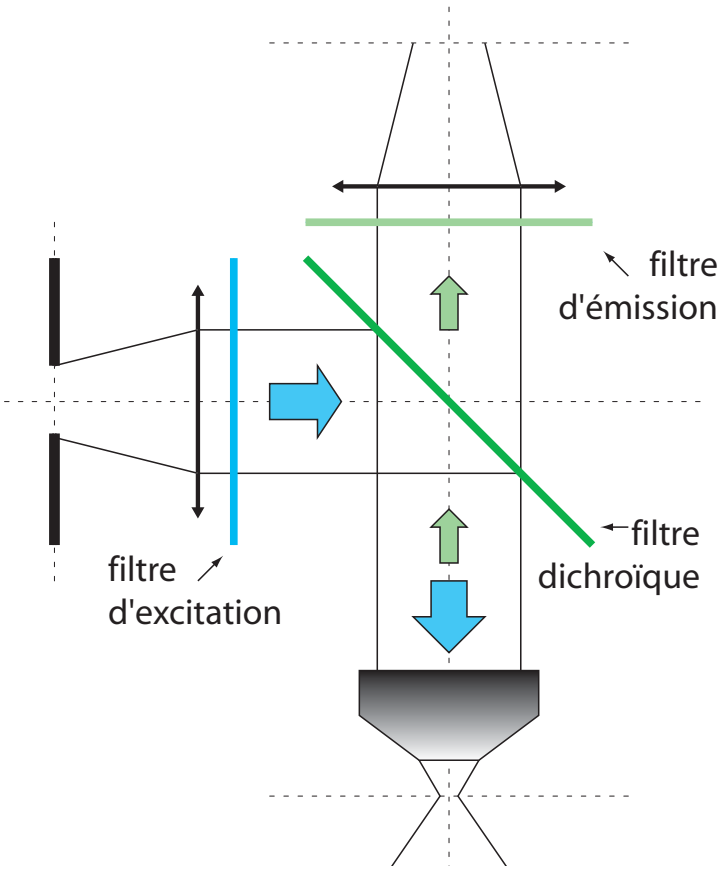


FIG. 4.5 – Microscope large champ à épi-fluorescence. Les seules différences avec Fig.4.3 sont liées à l'introduction de trois filtres chromatiques dans le montage, dont un remplace la lame semi-réfléchissante du microscope à épi-illumation.

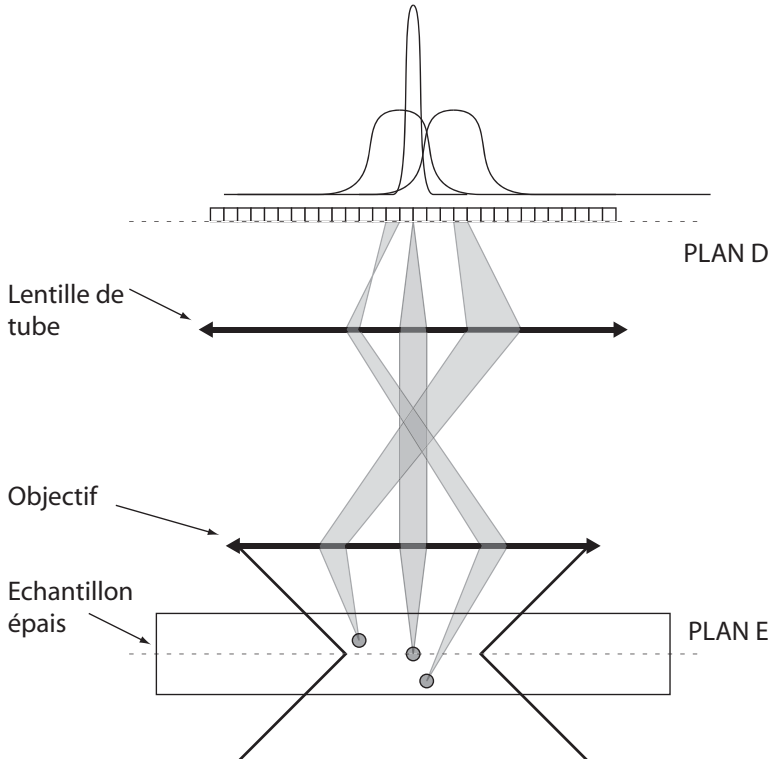


FIG. 4.6 – Détérioration de l'image par des particules hors focus dans un microscope à large champ. Les courbes tracées au-dessus du détecteur représentent les contributions en intensité de chaque marqueur dans le plan D. Les faisceaux gris émergeant de chaque particule représentent une partie arbitraire des rayons qui relient les particules à leurs images dans l'espace de détection.

4.4 Microscopie confocale, rejet de l'information hors focus

Le schéma (4.7) présente un montage de microscopie confocale à épifluorescence. Si l'on compare avec le montage à large champ (Fig.4.5) on constate que l'arrangement et la disposition des lentilles sont identiques dans les deux montages. Les changements principaux concernent la dimension de l'ouverture du diaphragme du plan S et l'introduction d'un diaphragme dans le plan D. Ces deux diaphragmes, celui d'excitation et celui de détection, permettent conjointement de résoudre le problème de détérioration de l'image par les marqueurs hors focus (Fig.4.8).

Rôle du diaphragme d'excitation

Grâce au **diaphragme d'excitation** de faible ouverture, le volume illuminé dans l'échantillon est grandement diminué par rapport à la microscopie classique : dans le plan E la section d'illumination passe typiquement d'un diamètre de 200 μm à un diamètre inférieur au μm. L'intérêt principal de cette modification est de permettre de **concentrer l'excitation lumineuse au voisinage du plan E**. Cet effet peut être grossièrement évalué en remarquant tout d'abord que le flux de photons d'excitation est constant au travers de chaque plan parallèle au plan E. Si on considère que le faisceau des trajets d'excitation présente la forme décrite dans la figure (4.9), la conservation du flux de photon entraîne que l'intensité volumique du champ d'excitation dans le cône est inversement proportionnelle à $\pi(r + aZ)^2$ où les notations sont expliquées dans le schéma (4.9). Ainsi, l'intensité volumique d'excitation décroît à mesure de l'éloignement au plan E. Elle devient inférieure au quart de celle au plan E quand la côte z devient supérieure à $z_{1/4} = r$. La grandeur a est proportionnelle à l'ouverture numérique de l'objectif, et r est proportionnel à l'ouverture du diaphragme de champ (ou diaphragme d'excitation). Ainsi $z_{1/4}$ passe d'une valeur de l'ordre de 100 μm pour un microscope à large champ à une valeur de l'ordre du micron dans un montage confocal typique.

Rôle du diaphragme de détection

L'émission photonique par les marqueurs de l'échantillon étant proportionnelle à l'intensité locale d'excitation, le diaphragme d'excitation de petite taille permet de réduire la contribution des marqueurs non compris dans le plan E. Toutefois dans un échantillon concentré en marqueurs, la somme des

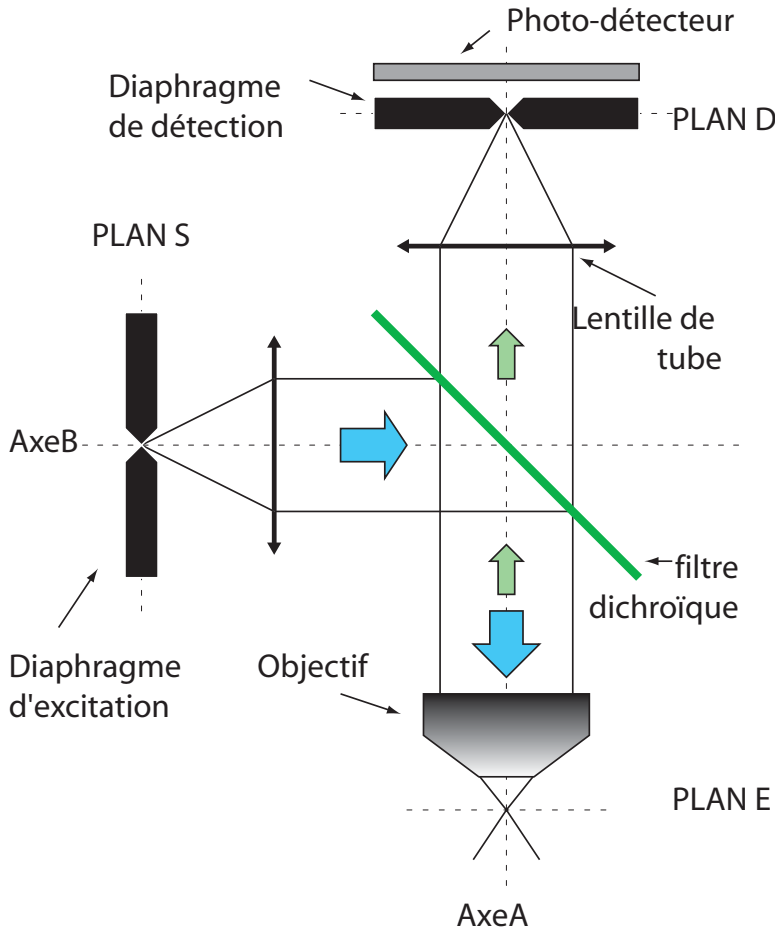


FIG. 4.7 – Microscope confocal en épi-fluorescence utilisant un objectif infini. Les plans S, E et D ont des fonctions identiques à celles décrites dans le schéma du microscope à large champ. Le diaphragme de champ est remplacé par un diaphragme de taille réduite, appelé diaphragme d'excitation. Dans le plan D se trouve un autre diaphragme de taille réduite : le diaphragme de détection. Les différents éléments optiques sont alignés sur l'axe A ou sur l'axe B. L'image de l'axe B par le plan défini par le filtre dichroïque est confondue avec l'axe A.

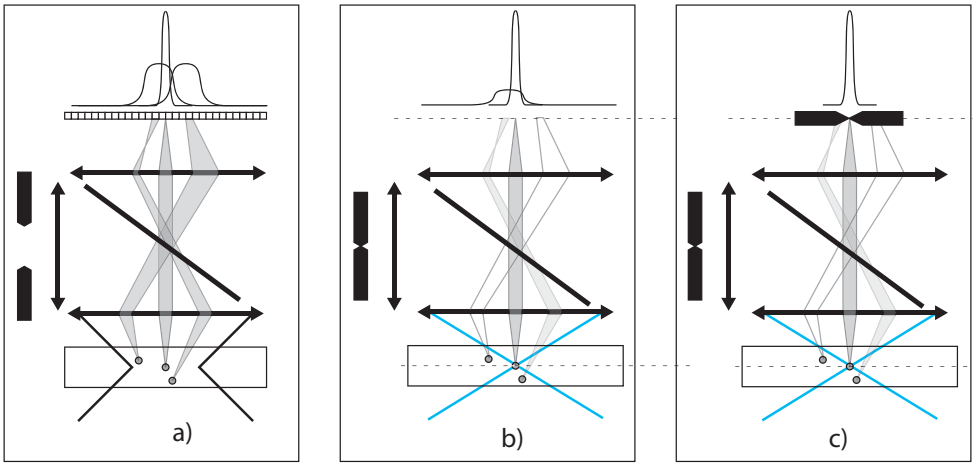


FIG. 4.8 – **a)** Rappel du problème de détérioration de l'image par des marqueurs hors focus. **b)** Présentation schématique de l'effet de la réduction du champ d'excitation. Les courbes tracées au-dessus du détecteur représentent les contributions en intensité de chaque marqueur dans le plan D, leur intégrale sur D est proportionnelle à l'intensité lumineuse émise par les marqueurs. **c)** Rejet par le diaphragme de détection de l'intensité provenant de marqueurs hors focus.

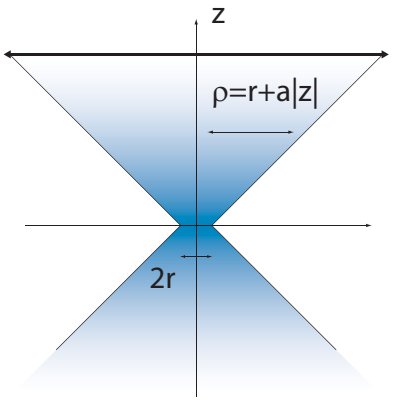


FIG. 4.9 – Notations utilisées pour décrire la propagation de la lumière dans l'échantillon.

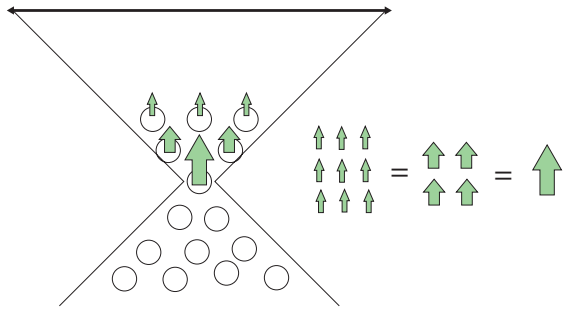


FIG. 4.10 – Les intensités totales réémises par tous les plans, quelle que soit leur position par rapport au focus de l'objectif, sont identiques.

photons émis par tous les marqueurs d'un même plan varie peu avec la distance z au plan E (Fig.4.10). Ainsi dans un échantillon épais et concentré le nombre de photons émis par les marqueurs hors plan E est largement supérieur aux photons émis par les marqueurs situés dans le plan E. C'est le rôle du diaphragme de détection de faire le tri entre ces photons émis.

Le **diaphragme de détection** est centré sur l'image du **focus d'excitation**, point où les rayons d'excitation convergent. Ainsi pour un marqueur placé en ce point, l'excitation est maximale et les photons de fluorescence émis seront collectés par le photo-détecteur ; par contre pour des marqueurs situés en des plans distincts du plan E la plupart ou la totalité des photons émis seront bloqués par le diaphragme avant d'arriver au détecteur. Le rôle du diaphragme de détection est donc de couper le trajet des photons provenant de marqueurs hors focus, cette fonction appelée " sectionning " en anglais est caractérisée par l'angle solide sous lequel est vu le diaphragme de détection depuis chaque point de l'échantillon. Par rapport à la microscopie large champ, les marqueurs hors du plan E sont individuellement moins excités, grâce au diaphragme d'excitation de petite taille.

De plus les photons de fluorescence émis par ces marqueurs hors plan E sont en grande partie stoppés par le diaphragme de détection. L'usage du diaphragme d'excitation de taille réduite et l'utilisation d'un diaphragme de détection judicieusement placé permettent donc de rejeter l'information provenant des marqueurs ayant une distance au plan E supérieure au μm. Un tel montage présente toutefois un inconvénient important par rapport à la microscope à large champ : à l'intérieur du plan E il y a un rejet to-

tal de l'information de marqueurs ayant une distance au focus d'excitation supérieure à une fraction de μm. La microscopie confocale ne permet donc d'imager qu'un seul point de l'échantillon. Pour reconstituer une image d'une section de l'échantillon, il est nécessaire de balayer le focus d'excitation dans le plan E, et d'enregistrer le signal mesuré par le photodétecteur au cours du balayage.

4.4.1 balayage de l'échantillon

La première image obtenue par microscopie confocale est due à `Marvin Minsky`, concepteur du **premier microscope confocal** dont il déposa le brevet en 1956 [3]. Afin d'obtenir l'image d'une tranche d'un échantillon solide, l'échantillon est fixé sur un support mobile dont le déplacement parallèle au plan focal de l'objectif est assuré par deux diapasons. La synchronisation des diapasons à des fréquences multiples l'une de l'autre permet d'obtenir un balayage de l'échantillon par le point focal de l'objectif. L'affichage en temps réel [3] des images se fait sur un oscilloscope dont le spot lumineux se déplace sur l'écran de manière synchrone avec le déplacement de l'échantillon, et dont l'intensité du spot est proportionnelle au flux de photons mesuré en aval du pinhole de détection. Le choix de l'amplitude des déplacements détermine les dimensions de la zone sondée dans l'échantillon. L'image obtenue à l'écran peut correspondre à une extension dans l'échantillon de quelques microns ou de plusieurs centaines de microns de côté. Pour un écran d'une dizaine de centimètres, le grandissement effectif [4] est ici compris entre 10^3 et 10^5. La technique d'imagerie confocale par déplacement de l'échantillon présente toutefois l'incovénient de soumettre l'échantillon à de fortes accélérations [5]. Cet inconvénient rend rédhibitoire le déplacement rapide de l'échantillon dans l'imagerie confocale de suspensions aqueuses. Ce problème peut *a priori* être contourné simplement en déplaçant l'objectif du microscope au lieu de déplacer l'échantillon. Cependant la masse des objectifs utilisés induit des difficultés technologiques importantes ; ainsi dans le cas d'un déplacement assuré par une platine piezo-électrique performante, j'ai constaté une limitation de la vitesse de déplacement à 100 nm/ms, vitesse incompatible

[3] La visualisation d'images complètes repose dans ce premier microscope confocal sur la persistence rétinienne de l'observateur.

[4] Avant l'apparition des caméras à capteur CCD ce grandissement effectif en temps réel représentait en lui-même un gain instrumental décisif. Actuellement la possibilité de changer le grandissement du microscope sans changer d'objectif reste un avantage unique de la microscopie confocale par rapport à la microscopie à large champ.

[5] À titre d'exemple un déplacement de l'échantillon à 10 kHz sur une amplitude de 100 μm entraîne des accélérations de l'ordre de 100g .

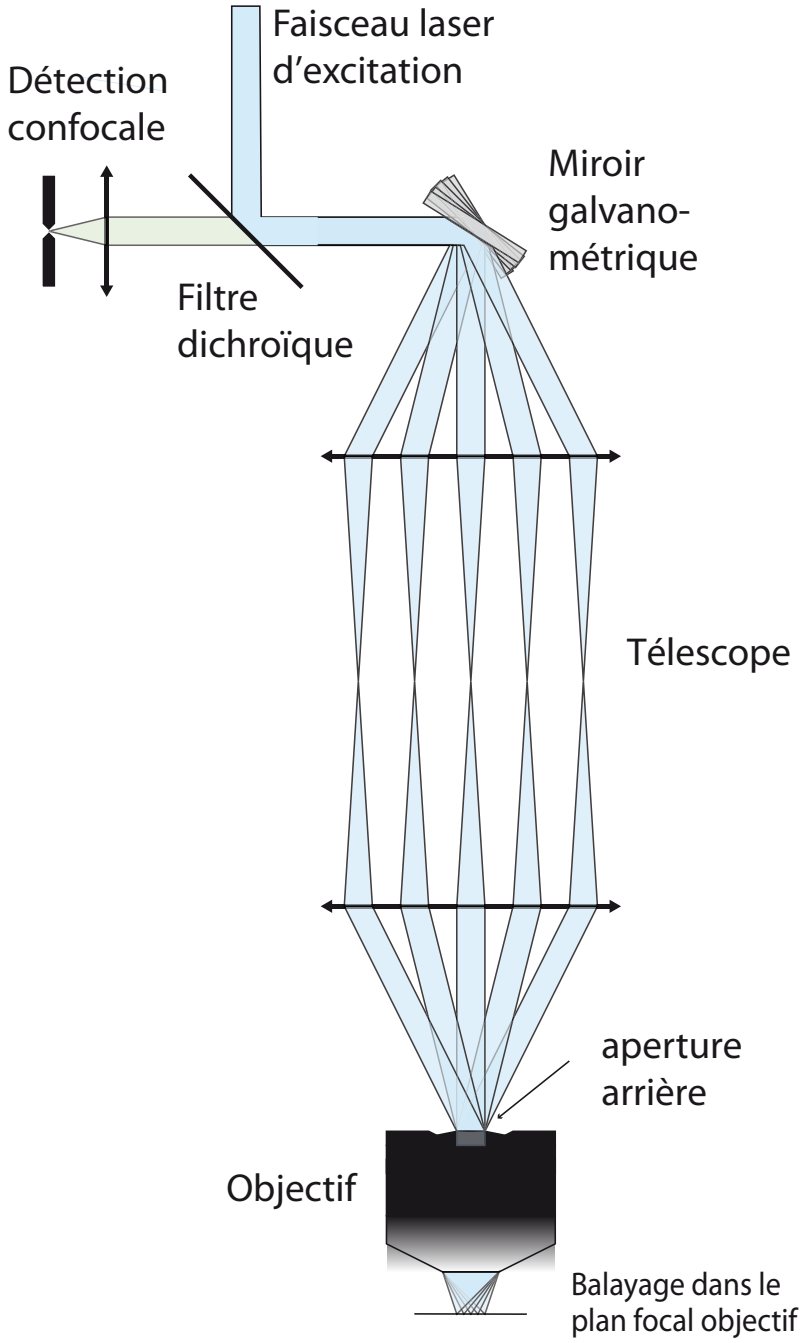


FIG. 4.11 – Montage permettant la translation du focus d'excitation dans le plan focal de l'objectif.

avec l'obtention d'images aux fréquences recherchées [6]. La solution retenue dans notre montage pour imager une tranche d'échantillon sans déplacer ni l'échantillon, ni l'objectif, est de modifier le trajet optique en amont de l'objectif (Fig.4.11). Grâce à l'introduction d'un miroir et de deux lentilles judicieusement disposées [7], il est possible de déplacer le maximum d'excitation dans le plan focal de l'objectif en changeant l'inclinaison du miroir [4, 5]. Afin de contrôler le déplacement du maximum d'excitation dans l'échantillon, nous utiliserons des miroirs galvanométriques. Dans ces systèmes, la rotation du miroir suivant un axe parallèle à sa surface est contrôlée par l'utilisateur. Afin de déplacer le maximum d'excitation dans deux directions nous avons introduit dans notre montage deux couples de lentilles et deux miroirs galvanométriques conjugués, dont l'emplacement au sein du montage confocal est décrit dans le schéma complet du montage confocal.

Dans le cas d'un montage confocal à épi-fluorescence, la conjugaison du centre du diaphragme de détection avec le maximum d'excitation dans l'échantillon est maintenue quelle que soit l'inclinaison des miroirs-galvanométriques. Cette propriété [8], dite de "déscannage" par le trajet retour de la lumière dans les montages à épi-illumination, permet d'obtenir un signal en aval du diaphragme de détection qui traduit la présence de marqueurs fluorescents au maximum d'excitation, et ce, quelle que soit la position de ce point dans le plan focal, position électroniquement contrôlée au travers de l'inclinaison des miroirs-galvanométriques.

4.5 Conclusion

A ce point du manuscrit, nous espérons avoir éclairci les principes sous-jascents du microscope confocal à épi-fluorescence. Nous avons souligné l'importance du diaphragme d'excitation et du diaphragme de détection. Tou-

[6] Par contre ces vitesses sont compatibles avec la visualisation tridimensionnelle de l'échantillon : le déplacement de l'objectif parallèlement à l'axe optique synchronisé avec une prise d'images à 40 Hz nous permet d'obtenir une structure tridimentionnelle de l'échantillon en une seconde

[7] Les lentilles sont placées de façon à conjuguer le centre du miroir avec l'aperture arrière du microscope tout en maintenant une faible divergence en amont de l'objectif

[8] Dans un montage à épi-fluorescence l'émission et l'excitation se déroulent à des longeurs d'ondes différentes. Maintenir une achromaticité optimale sur les parties communes du trajet d'excitation et de détection est nécessaire pour obtenir la précieuse propriété de "déscannage" et c'est pourquoi les lentilles et les objectifs utilisés sont les plus achromatiques possibles. C'est pourquoi nous avons utilisé des miroirs galvanométriques pour dévier le faisceau plutôt que d'utiliser des déflecteurs acousto-optiques.

tefois le fossé est grand entre la compréhension des principes du montage et le choix raisonné de composants optiques adéquats. Pour comprendre les grandeurs clefs du montage et comment choisir la taille des diaphragmes en fonction des échantillons à observer, nous introduisons un modèle simple du microscope confocal dans le chapitre suivant.

Dans le chapitre 6 seront décrites les caractéristiques des miroirs galvanomètres, des procédures d'acquisition et de synchronisation nécessaires au fonctionnement effectif de la méthode d'imagerie précédemment décrite.

Bibliographie

[1] T.B. Pawley and al. Handbook of biological confocal microscopy. *Ed. Plenum Press*, 1995.

[2] S. Inoue and al. Video microscopy. *Ed. Plenum Press*, 1997.

[3] M. Minsky Memoir on Inventing the confocal Scanning Microscope. *Scanning*, **10**, 128-138, 1988.

[4] N. Callamaras I. Parker Construction of a confocal microscope for real-time x-y and x-z imaging. *Cell Calcium*, **26**, *6*, 271-279, 1999.

[5] Q-T. Nguyen, N. Callamaras, C. Hsieh, I. Parker Construction of a two photon microscope for video rate Ca^{2+}. *Cell Calcium*, **30**, *6*, 383-393, 2001.

Chapitre 5

Modélisation du microscope confocal

Dans ce paragraphe, nous proposons une description analytique du champ d'excitation et de l'intensité collectée dans un microscope confocal en nous inspirant de l'ouvrage du professeur Gu [1].

La modélisation du microscope confocal a pour but de trouver les expressions qui permettent de comprendre quels sont les paramètres importants dans le montage et comprendre la signification du signal détecté.

5.1 Modélisation de l'excitation dans l'échantillon

Nous nous intéressons ici à la propagation de la lumière cohérente le long du trajet d'excitation du montage confocal (Fig.5.1). La théorie de l'optique diffractive permet de prédire le champ en tout point d'un trajet lumineux [1]. Dans le plan S, une source sphérique ponctuelle monochromatique est placée au point focal de la lentille d'excitation. Dans la suite, nous allons considérer l'amplitude du champ créé par cette source en divers plans perpendiculaires à l'axe optique et coupant ce dernier en différents points O_i. Dans chacun de ces plans, nous repérons la position d'un point K par $\overrightarrow{\rho_i} = \overrightarrow{O_iK}$. Tout au long de ces calculs nous supposerons que les approximations de Fresnel sont valables.

Dans le **plan 1** qui suit immédiatement la lentille d'excitation, l'amplitude complexe du champ s'exprime simplement en fonction de $\overrightarrow{\rho_1}$ [1] :

$$U_1(\overrightarrow{\rho_1}) = 1 \ , \ \forall \rho_1 \leq R_{Lex} \tag{5.1}$$

$$U_1(\overrightarrow{\rho_1}) = 0 \ , \ \forall \rho_1 > R_{Lex} \tag{5.2}$$

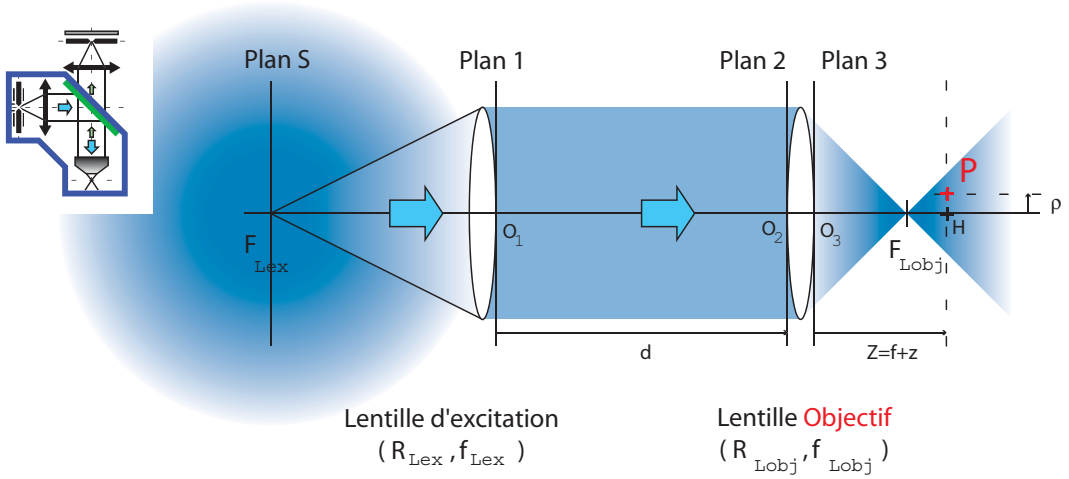


FIG. 5.1 – **Trajet d'excitation** dans le microscope confocal. La source sphérique placée au point focal de la lentille d'excitation a son image au point focal de la lentille objectif. *Insert* : vue d'ensemble du montage confocal et mise en relief du trajet d'excitation dans le montage.

On observe qu'il n'y a pas de déphasage entre les points du plan 1 car la source est placée au point focal de la lentille.

Nous cherchons ensuite à connaître l'amplitude du champ dans le **plan 2** précédant la lentille objectif. La distance de propagation entre les plans 1 et 2 est notée d. En raison de la forme du champ dans le plan 1, le problème posé est analogue au problème de diffraction d'un front d'onde uniforme, de longueur d'onde λ_{ex}, par un diaphragme circulaire de rayon R_{Lex}. Ainsi, pour une distance d petite devant R_{Lex}^2/λ_{ex} [1], l'amplitude du champ dans le plan 2 est identique à celle du champ 1 à un facteur de phase près :

$$U_2(\overrightarrow{\rho_1}) = \exp(-ik_{ex}d), \ \forall \rho_1 \leq R_{Lex} \quad (5.3)$$

$$U_2(\overrightarrow{\rho_1}) = 0 \quad , \ \forall \rho_1 > R_{Lex} \quad (5.4)$$

où

$$k_{ex} = \frac{2\pi}{\lambda_{ex}}$$

La traversée de l'objectif de rayon R_{Lobj} et de focale f_{Lobj} introduit un déphasage qui dépend de manière quadratique de la distance à l'axe optique,

[1] Ainsi, en prenant $R_{Lex} = 5$ mm, on a $R_{Lex}^2/\lambda_{ex} = 50$ m lorsque $\lambda_{ex} = 500$ nm. On constate que dans notre microscope on vérifie toujours la condition $d \ll R_{Lex}^2/\lambda_{ex}$

ρ. Ainsi dans le plan 3 qui suit immédiatement l'objectif on a :

$$U_3(\overrightarrow{\rho_3}) = \exp(-ik_{ex}d)\exp(\frac{ik_{ex}}{2f_{Lobj}}\rho_3^2), \forall \rho_3 \leq \min(R_{Lex}, R_{Lobj}) \quad (5.5)$$

$$U_3(\overrightarrow{\rho_3}) = 0 \qquad , \forall \rho_3 > \min(R_{Lex}, R_{Lobj}) \quad (5.6)$$

Dans la suite, le terme *zone échantillon* désigne le demi-espace situé après l'objectif dans le trajet d'excitation. Intéressons nous au champ en un point P de la zone échantillon (Fig.5.1). Soit H la projection orthogonale de P sur l'axe optique, on repère P par les coordonnées cylindriques suivantes : $\overrightarrow{\rho} = \overrightarrow{HP}$ et Z la distance de P au **plan 3**. En vertu du principe de Huyghens-Fresnel, l'amplitude du champ en P est la somme des champs créés par un ensemble de sources sphériques dans le plan 3. Dans le cadre des approximations de Fresnel il est alors possible d'exprimer le champ en un point P de l'échantillon en fonction du champ dans le plan 3 :

$$U(P) = \frac{i\exp(-ik_{ex}Z)}{Z^2}\int\int U_3(\overrightarrow{\rho_3})\exp(-\frac{ik_{ex}}{2Z}[\| \overrightarrow{\rho} - \overrightarrow{\rho_3} \|^2])d^2\rho_3 \quad (5.7)$$

En utilisant les expressions (5.5), (5.6) et (5.7) on obtient l'expression analytique du champ d'excitation en tout point P de la zone échantillon :

$$U(P) = \frac{i\exp(-ik_{ex}(Z+d))}{Z^2}\int_{Disque(R_{min})} exp(\frac{ik_{ex}}{2f_{Lobj}}\rho_3^2)\exp(-\frac{ik_{ex}}{2Z}[\| \overrightarrow{\rho} - \overrightarrow{\rho_3} \|^2])d^2\rho_3$$

Où $R_{min} = \min(R_{Lex}, R_{Lobj})$ et $Disque(R_{min})$ est un disque inclus dans le plan 3, centré sur l'axe optique et de rayon R_{min}. En developpant $\| \overrightarrow{\rho} - \overrightarrow{\rho_3} \|^2$ et en considérant le module au carré de l'expression précédente on obtient l'intensité du champ d'excitation en un point P de la zone échantillon :

$$\begin{aligned} I_{ex}(P) &= U(P)U(P)^* \\ &= \frac{1}{Z^4} \mid \int_{Disque(R_{min})} \exp[\frac{ik_{ex}\rho_3^2}{2}(\frac{1}{f_{Lobj}} - \frac{1}{Z})]\exp[\frac{ik_{ex}}{Z}\overrightarrow{\rho}\overrightarrow{\rho_3})d^2\rho_3 \mid^2 \end{aligned}$$

Des arguments liés à la symétrie cylindrique du trajet d'excitation permettent d'exprimer l'intensité d'excitation en P en fonction d'une intégrale portant sur une seule variable :

$$I_{ex}(P) = \frac{4\pi^2}{Z^4} \mid \int_0^{R_{min}} \exp[\frac{ik_{ex}\rho_3^2}{2}(\frac{1}{f_{Lobj}} - \frac{1}{Z})]J_0(\frac{2\pi\rho_3\rho}{\lambda_{ex}Z})\rho_3 d\rho_3 \mid^2 \quad (5.8)$$

où J_0 est la fonction de Bessel d'ordre 0.

Réponse impulsionnelle et coordonnées optiques

En optique diffractive il est courant d'utiliser des coordonnées réduites pour simplifier les expressions. Ainsi, si on pose :

$$\overrightarrow{v} = \frac{2\pi R_{min}}{\lambda_{ex} Z} \overrightarrow{\rho} \tag{5.9}$$

et

$$u = \frac{2\pi R_{min}^2}{\lambda_{ex}} (\frac{1}{f_{Lobj}} - \frac{1}{Z}) = \frac{2\pi R_{min}^2}{\lambda_{ex} f_{Lobj}} (1 - \frac{1}{1 + (Z - f_{Lobj})/f_{Lobj}}) \tag{5.10}$$

et

$$\Psi(\overrightarrow{v}, u) = \int_0^1 exp(\frac{iur^2}{2}) J_0(vr) r dr \tag{5.11}$$

alors l'intensité d'excitation en P s'exprime simplement en fonction des coordonnées réduites $(\overrightarrow{v}, u)$:

$$I_{EX}(P) = 4\pi^2 (\frac{R_{min}}{Z})^4 \mid \Psi(\overrightarrow{v}, u) \mid^2 \tag{5.12}$$

La fonction $\Psi(\overrightarrow{v}, u)$ est la **réponse impulsionnelle** du montage optique au voisinage du plan focal, appelée dans la littérature anglo-saxonne "point-spread function" (PSF). Cette fonction est analytique, elle ne dépend pas des paramètres du montage optique alors que I_{EX} en dépend fortement au travers des coordonnées réduites et du préfacteur de l'expression (5.12).

L'intérêt de l'introduction des variables réduites $(\overrightarrow{v}, u)$ apparaît clairement lorsque l'on s'intéresse à la forme de $I_{EX}(P)$ pour des points P proches du plan focal. Si on repère le point P par sa distance $z = Z - f$ au plan focal alors le changement de coordonnée entre $(\overrightarrow{\rho}, z)$ et $(\overrightarrow{v}, u)$ revient au premier ordre en z/f à une simple homothétie suivant chacun des deux axes. Dans le cas où la lentille objectif est plus petite que la lentille d'excitation, les coefficients de ces homothéties ne dépendent plus que du rapport $\frac{R_{Lobj}}{f_{Lobj}}$ et de λ_{ex}. Or une bonne approximation du rapport $\frac{R_{Lobj}}{f_{Lobj}}$ est donnée par une caractéristique importante des objectifs, leur **ouverture numérique**. Cette ouverture numérique est définie par $NA_{Lobj} = n \sin(\theta)$ (Fig.5.2). Ainsi les homothéties liées au changement de coordonnées entre $(\overrightarrow{\rho}, z)$ et $(\overrightarrow{v}, u)$ dépendent uniquement de l'ouverture numérique de l'objectif et de la longueur d'onde sur le trajet d'excitation (*cf* les équations 5.14 et 5.15).

En conclusion, pour une ouverture arrière de l'objectif plus petite que la lentille d'excitation, **la forme de l'intensité d'excitation au voisinage**

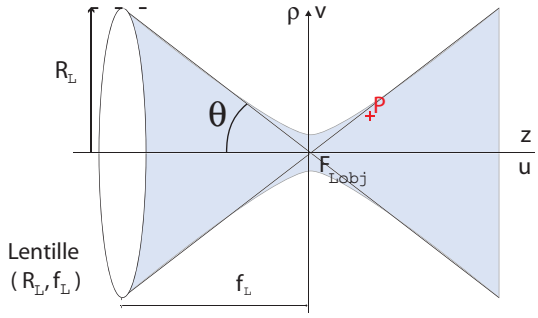


FIG. 5.2 – Notations utilisées pour la définition de l'ouverture numérique d'une lentille et des coordonnées optiques associées.

du plan focal ne dépend que de l'ouverture numérique de l'objectif et de la longueur d'onde d'excitation! Ce constat est repris dans les expressions suivantes :

$$I_{EX}(P) \approx 4\pi^2 (NA_{Lobj})^4 \mid \int_0^1 exp(\frac{iur^2}{2}) J_0(vr) r dr \mid^2 \tag{5.13}$$

où

$$\overrightarrow{v} \approx \frac{2\pi NA_{Lobj}}{\lambda_{ex}} \overrightarrow{\rho} \tag{5.14}$$

et

$$u \approx \frac{2\pi (NA_{Lobj})^2}{\lambda_{ex}} z \tag{5.15}$$

Les coordonnées introduites sont nommées **coordonnées optiques**, elles sont exprimées en unités optiques adimensionnelles. Au premier ordre en z/f, une unité optique le long de l'axe optique, ou unité optique axiale, correspond dans l'espace réel à la distance $\frac{1}{2\pi}\frac{\lambda}{NA^2}$; une unité optique dans un plan perpendiculaire à l'axe optique, ou unité optique radiale, correspond dans l'espace réel à la distance $\frac{1}{2\pi}\frac{\lambda}{NA}$. Ainsi, pour NA=1 et une longueur d'onde de 500 nm, les unités optiques radiale et axiale dans la zone échantillon valent toutes deux 80 nm. Dans la suite nous verrons que dans la valeur des unités optiques de la zone de détection se déduisent simplement des valeurs des unités optiques de la zone échantillon et du grandissement α du microscope.

Conservation et concentration du flux lumineux

Les expressions précédentes ont été obtenues grâce à la théorie d'optique diffractive, ce qui ne doit pas nous faire perdre de vue des résultats

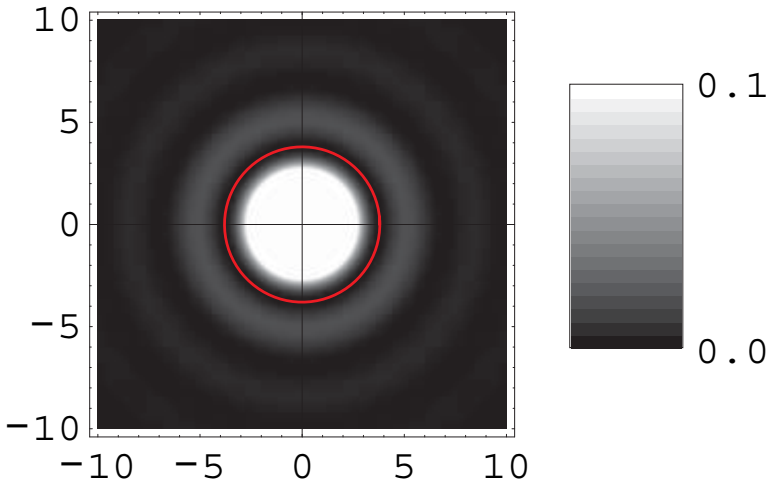


FIG. 5.3 – Intensité théorique du champ d'excitation dans le plan focal de l'objectif en coordonnées optiques. L'intensité s'annule sur le pourtour du disque d'Airy qui est tracé ici en rouge. Le rayon d'Airy est voisin de 3,81 unités optiques radiales.

simples comme le fait que le flux de photons traversant des plans parallèles est conservé. Ainsi l'intégrale de $I_{EX}(P)$ pour P appartenant à un plan normal à l'axe optique est indépendante de la position du plan, ce qui se vérifie bien numériquement. Intéressons-nous à la localisation du flux dans les plans normaux à l'axe optique.

Dans le plan focal de l'objectif (Fig.5.3), le flux de photons n'est pas concentré en un seul point comme le prédit l'optique géométrique. Les interférences sont constructives au point focal de l'objectif. Lorsque l'on s'éloigne du point focal, les interférences deviennent destructives. Il est même possible d'observer des interférences totalement destructives sur un cercle de rayon 3.83 unités optiques radiales [2]. Ce cercle définit le disque d'Airy [2], dont le rayon appelé **rayon d'Airy** correspond approximativement à la distance $0.60\frac{\lambda}{NA}$. En intégrant l'intensité d'excitation sur des disques centrés sur l'axe optique on constate plus que 80% du flux de photons passe par le disque d'Airy (Fig.5.4). Ce constat constitue un des résultats les plus frappants de l'optique diffractive : dans le plan focal **le flux de photons focalisé par**

[2]Dans le plan focal, la réponse impulsionnelle (PSF) Ψ a la forme suivante :

$$\Psi(u) = 4e^{iu/4}\mathsf{sinc}(u/4) \tag{5.16}$$

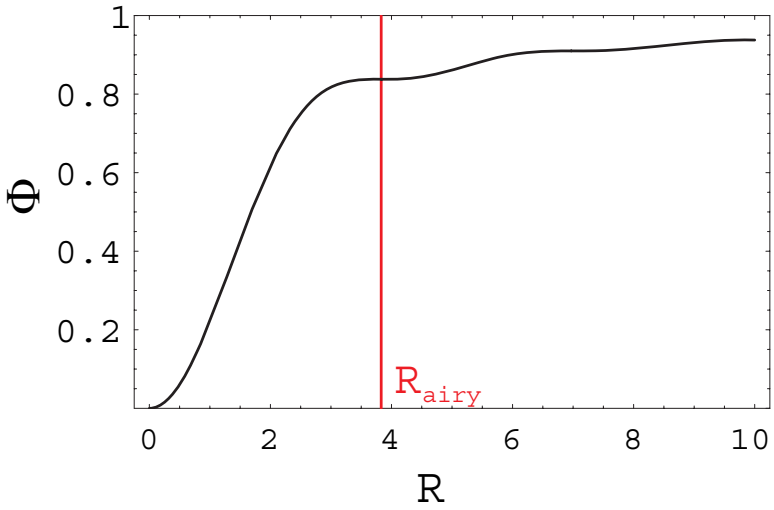


FIG. 5.4 – Evolution du flux d'excitation traversant le disque inclu dans le plan focal centré sur l'axe optique en fonction du rayon R du disque, rayon exprimé en unités optiques radiales. On constate que dans le disque d'Airy passe plus de 80% du flux lumineux d'excitation.

l'objectif est d'autant plus concentré autour du focus d'excitation que l'ouverture numérique de l'objectif est grande et que la longueur d'onde d'excitation est petite.

Grâce à l'expression (5.13), nous savons calculer numériquement les intensités d'excitation dans des plans de l'échantillon distincts du plan focal. En intégrant dans chaque plan l'intensité sur des disques centrés sur l'axe il est possible d'évaluer la localisation du flux dans chacun de ces plans. Pour les plans dont la coordonnée optique u est comprise entre -40 et 40 , nous avons déterminé le rayon $v_{Lim}(u)$ du disque centré sur l'axe optique par lequel passe plus de 80% du flux de photons (Fig.5.5). En $u = 0$ le flux est concentré dans le disque de Airy, à partir de $|u| \sim 4$, l'évolution du rayon devient affine avec une pente unitaire. Ce comportement asymptotique est cohérent avec les prédictions de l'optique géométrique : la pente unitaire en coordonnées optiques $(\overrightarrow{v}, u)$ correspond à la pente $NA \approx R_{Lobj}/f_{Lobj}$ du cône de focalisation de l'optique géométrique (Fig.5.2).

Grâce à l'évolution de $v_{Lim}(u)$ nous pouvons connaître l'évolution globale de l'intensité volumique d'excitation dans la zone échantillon. En effet à l'intérieur du cône évasé défini par $v < v_{Lim}(u)$ l'intensité moyenne dans chaque plan u est constante. De plus la section de ce cône évasé avec un plan

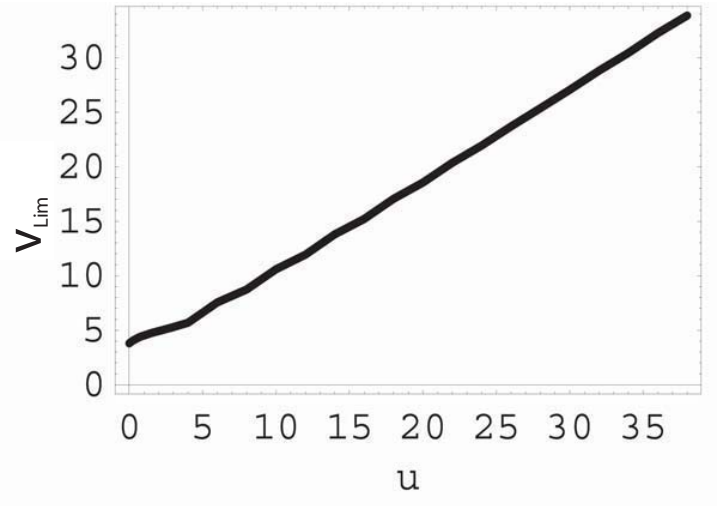


FIG. 5.5 – Evolution de $v_{Lim}(u)$, rayon du disque qui concentre 80% de l'intensité lumineuse dans le plan situé à une distance u du plan focal. Nous avons déjà remarqué que dans le plan focal 80% du flux lumineux passe par le disque de Airy, on retrouve bien ce résultat car $v_{Lim}(0) \sim 3,81$.

u est, par définition, un disque de rayon $v_{Lim}(u)$. Ainsi l'intensité *volumique* moyenne à l'intérieur du cône évasé évolue en $\frac{1}{2\pi(v_{Lim}(u))^2}$. A partir de $|u| \sim 4$ l'intensité volumique moyenne à l'intérieur du cône évasé évolue donc en $1/u^2$, comportement asymptotique cohérent avec les prédictions de l'optique géométrique. Toutefois à l'intérieur du cône évasé l'intensité volumique n'est pas uniforme en raison des phénomènes interférentiels. Il est même possible d'observer sur l'axe optique une multitude de points où les interférences sont complètement destructives, résultat peu intuitif. Ces interférences ont pour résulat de concentrer la zone d'excitation forte près du point focal. Tracer le graphe normé de $I_{EX}(P)$ suivant les coordonnées optiques de P $(||\overrightarrow{v}||, u)$ permet, en raison de la symétrie cylindrique du problème, de visualiser *dans tout l'échantillon* les zones où l'intensité volumique d'excitation est forte (Fig.5.6).

Ces calculs permettent de répondre à la question capitale : quels points de l'échantillon vont-ils être les plus excités ? On observe ici que **les points d'excitation forte constituent un volume de forme ellipsoïdale centré sur le focus d'excitation** $F = F_{Lobj}$. Afin d'étudier l'extension du volume d'excitation forte, définissons, le long de chacun de ces axes, la distance au point focal correspondant à une intensité égale à 25% de l'intensité maximale. Le grand axe de ce volume est orienté selon l'axe

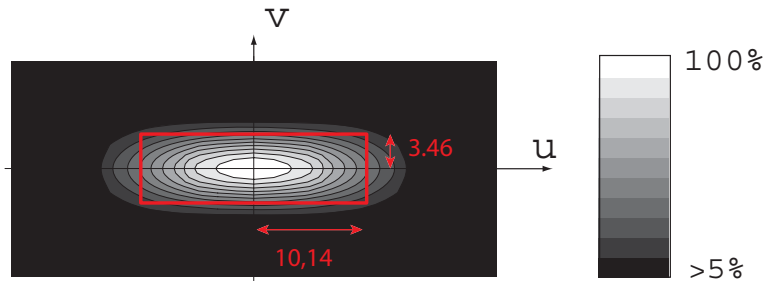


FIG. 5.6 – Distribution de l'intensité volumique d'excitation autour du focus en coordonnées optiques $(u, \|\vec{v}\|)$. La zone d'excitation forte ressemble à un ellipsoïde qui est plus allongé suivant l'axe optique que suivant le plan focal. Sur ce graphe on arrive à voir une excitation à partir de $\approx 5\%$ du maximum d'excitation, c'est pourquoi on ne peut pas observer les lobes secondaires.

optique d'illumination et vaut 10.14 unités optiques axiales. Le petit axe, perpendiculaire à l'axe optique, vaut 3.46 unités optiques radiales, soit 91% du rayon de Airy. Ainsi la région d'excitation forte est 2.9 fois plus étendue suivant l'axe des coordonnées u que suivant l'axe des coordonnées v. Si nous revenons maintenant aux coordonnées métriques le grand axe correspond à $1.6\frac{\lambda_{ex}}{NA^2_{Lobj}}$ et le petit axe à $0.55\frac{\lambda_{ex}}{NA_{Lobj}}$. Le rapport de ces extensions est égal à $\frac{2.9}{NA_{Lobj}}$, la zone d'excitation forte est donc plus allongée suivant l'axe optique que suivant les axes dans le plan focal. **La forme de la zone d'excitation est contrôlée par l'ouverture numérique de l'objectif alors que son extension est contrôlée par l'ouverture numérique de l'objectif et la longueur d'onde d'excitation**.

Maintenant que nous savons évaluer l'excitation d'un marqueur en un point P de l'échantillon il nous faut évaluer la fraction de photons émis qui parviendra au détecteur en tenant compte de l'ouverture du diaphragme de détection. L'évaluation de la fonction de collection du trajet d'émission pour une source unitaire [3] en un point P de l'échantillon est le thème de la section suivante.

5.2 Modélisation de la collection par le diaphragme de détection

Pour évaluer la collection de l'appareil considérons le trajet d'émission dans

[3]Par source unitaire on entend source dont l'intensité est telle que le flux de photons parvenant au détecteur est unitaire quand la source est placée au point focal de l'objectif.

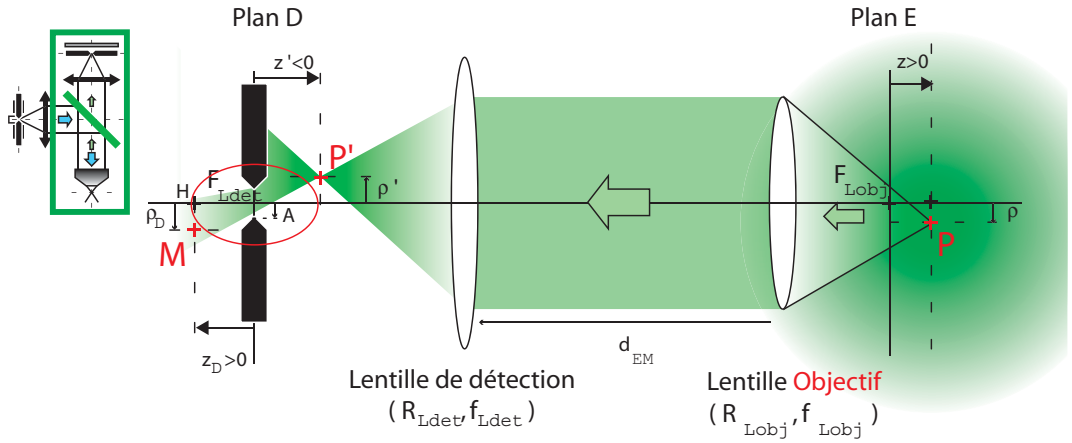


FIG. 5.7 – **Trajet de détection** dans le microscope confocal. Le marqueur P de la zone échantillon émet une lumière de fluorescence qui est partiellement transmise par le diaphragme de détection. Grâce à ce système, le capteur de photons situé derrière le diaphragme de détection n'est sensible qu'aux marqueurs proches du focus de l'objectif. *Insert* : vue d'ensemble du montage confocal et mise en relief du trajet de détection dans le montage.

le microscope (Fig.5.7). Ce trajet fait intervenir un ensemble de lentilles analogue à celui du trajet d'émission. Il faut toutefois noter que l'objectif ne joue plus ici le même rôle, il collecte la lumière de fluorescence qui est ensuite focalisée par une autre lentille, la lentille de détection. D'autre part les sources excitées dans l'échantillon ne sont pas uniquement positionnées au point focal de la première lentille du trajet comme c'était le cas pour la source du trajet d'excitation.

Nous nous intéresserons ici à la propagation de la lumière le long du trajet d'émission pour une source monochromatique ponctuelle placée en $P = (\overrightarrow{\rho}, z)$ qui peut être distinct du point focal de l'objectif. L'image géométrique de P par le système de deux lentilles est notée $P' = (\rho', z')$ et la longueur d'onde de la source est notée λ_{em}. ρ et ρ' mesurent la distance à l'axe optique de P et de P' alors que z mesure la distance de P au plan focal de l'objectif et que z' mesure la distance de P' au plan focal de la lentille de détection (Fig.5.7). La position de l'image de P dans l'espace de détection dépend du rapport de magnification du montage $\alpha = f_{Ldet}/f_{Lobj}$ et de la distance d_{EM} entre les deux lentilles ; les coordonnées de P dans la zone échantillon sont liées aux coordonnées de P' dans la zone de détection par les expressions

suivantes :

$$\overrightarrow{\rho}' = -(\alpha + \frac{d_{EM} - f_{Ldet} - f_{Lobj}}{f_{Lobj}^2} z)\overrightarrow{\rho} \quad (5.17)$$

$$z' = -\frac{\alpha^2}{1 + \frac{d_{EM} - f_{Ldet} - f_{Lobj}}{f_{Lobj}^2} z} z \quad (5.18)$$

Dans le cas particulier où $d_{em} = f_{Ldet} + f_{Lobj}$ les coordonnées de P' s'expriment simplement :

$$\overrightarrow{\rho'} = -\alpha \overrightarrow{\rho} \quad (5.19)$$

$$z' = -\alpha^2 z \quad (5.20)$$

Considérons une source de fluorescence d'intensité unitaire placée au point P de l'espace échantillon (Fig.5.7). La fraction de lumière collectée par l'objectif est à l'origine d'un flux de photons suivant le trajet d'émission du montage. Ce flux est finalement focalisé sur P' par la lentille de détection, ce qui se traduit en tout point M de l'espace de détection par une intensité volumique d'illumination notée $I_{em}(P, M)$, c'est l'expression de cette intensité qui nous intéresse. M est repéré par les coordonnées cylindriques suivantes : $\overrightarrow{\rho_D} = \overrightarrow{HM}$ et $z_D = F_{Ldet}H$, où H est la projection orthogonale de M sur l'axe optique et F_{Ldet} le point focal de la lentille de détection.

Pour une source de fluorescence unitaire placée en $P = F_{Lobj}$ l'analogie totale avec le trajet d'excitation permet de connaître l'intensité volumique en tout point M de l'espace de détection, il nous suffit de reprendre l'expression (5.12) en utilisant les variables adaptées au trajet d'émission :

$$I_{EM}^0(M) = 4\pi^2 N A_{em}^4 \mid \Psi(\overrightarrow{v_D}, u_D) \mid^2 \quad (5.21)$$

où Ψ est la "point spread function du système de deux lentilles", identique à celle du trajet d'excitation ; u_D et $\overrightarrow{v_D}$ sont les coordonnées optiques de M dans l'espace de détection, près du plan focal de la lentille de détection on a :

$$\overrightarrow{v_D} \approx \frac{2\pi N A_{em}}{\lambda_{em}} \overrightarrow{\rho_D} \quad (5.22)$$

$$u_D \approx \frac{2\pi (N A_{em})^2}{\lambda_{em}} z_D \quad (5.23)$$

avec

$$NA_{//} = \frac{Min[R_{Lobj}, R_{Ldet}]}{f_{Ldet}}$$

Considérons maintenant une source de fluorescence d'intensité unitaire placée en en $P \neq F_{Lobj}$. Afin d'estimer l'intensité volumique engendrée par

cette source en tout point M de l'espace de détection, nous supposerons qu'en bonne approximation $I_{em}(P,M)$ correspond à l'intensité de l'expression (5.21) au point $\widetilde{M} = F_{Ldet} + \overrightarrow{P'\,M}$. Grâce à cette hypothèse d'invariance par translation de la "point spread function", on trouve une expression de l'intensité, maximale en $M = P'$ pour tout point P de l'échantillon :

$$I_{EM}(P,M) \approx I^0_{EM}(\widetilde{M}) =\mid \Psi(\overrightarrow{v_D} - \overrightarrow{v_D^{P'}}, u_D - u_D^{P'}) \mid^2 \tag{5.24}$$

$(\overrightarrow{v_D}, u_D)$ et $(\overrightarrow{v_D^{P'}}, u_D^{P'})$ sont les coordonnées optiques de M et de P' dans l'espace de détection (*cf* les équations 5.22 et 5.23).

Dans le cas particulier où $d_{EM} = f_{Ldet} + f_{Lobj}$ et où $R_{Lobj} < R_{Ldet}$ ces dernières coordonnées s'expriment simplement en fonction des coordonnées optiques $(\overrightarrow{v}, u)$ de P dans l'espace échantillon :

$$\overrightarrow{v_D^{P'}} \approx \frac{2\pi N A_{em}}{\lambda_{em}} \overrightarrow{\rho'} = -\frac{2\pi N A_{em}}{\lambda_{em}} \alpha \overrightarrow{\rho} = -\frac{2\pi N A_{Lobj}}{\lambda_{em}} \overrightarrow{\rho} \approx -\overrightarrow{v} \tag{5.25}$$

$$u_D^{P'} \approx \frac{2\pi N A^2_{em}}{\lambda_{em}} z' = -\frac{2\pi (N A_{Lobj})^2}{\lambda_{em}} z \approx -u \tag{5.26}$$

Ainsi on a

$$I_{EM}(P,M) \approx\mid \Psi(\overrightarrow{v_D} + \overrightarrow{v}, u_D + u) \mid^2 \tag{5.27}$$

où $(\overrightarrow{v_D}, u_D)$ sont les coordonnées optiques de M dans l'espace de détection alors que $(\overrightarrow{v}, u)$ sont les coordonnées optiques de P dans l'espace échantillon[4].

Collection de la lumière par le diaphragme de détection

Pour évaluer la **fonction de collection** du système de détection, $G(P)$, pour une source unitaire placée en P, il faut évaluer le flux de photons émis par la source unitaire en P qui parvient à traverser le diaphragme circulaire de détection de rayon A (Fig.5.7). Il suffit donc d'intégrer l'intensité du champ émis sur le diaphragme :

$$G(P) = \int_{M \in Disque(A)} I_{EM}(P,M) dS_M \tag{5.28}$$

$$= \int_{M \in Disque(a)} \mid \psi(\overrightarrow{v_D} + \overrightarrow{v}, 0 + u) \mid^2 d^2 v_D \tag{5.29}$$

avec $a = \frac{2\pi N A_{em}}{\lambda_{em}} A$ le rayon du diaphragme de détection en coordonnées optiques radiales dans la zone de détection [5].

[4] Lorsque l'ouverture numérique NA vaut 1 et avec $\lambda = 500nm$ pour une focale de détection $f_{Ldet} = 200 f_2$, on trouve que, dans l'espace de l'échantillon, l'unité optique axiale vaut 80 nm, alors qu'elle vaut $8\mu m$ dans l'espace de détection.

[5] Ici, nous sommes intéressés par les variations de la collection des photons émis par rapport à la position des sources dans l'échantillon, c'est pourquoi nous n'avons pas stipulé les préfacteurs dans les expressions précédentes.

Si le montage est tel que $d_{EM} \approx f_{Ldet} + f_{Lobj}$ et $R_{Lobj} \leq R_{Ldet}$ les valeurs de la fonction de collection $G(P)$ au voisinage du plan focal ne dépendent plus que des coordonnées de P dans l'espace échantillon et de : NA_{Lobj}, λ_{em} et $a = A\frac{2\pi NA_{em}}{\lambda_{em}} = A\frac{2\pi NA_{Lobj}}{\alpha\lambda_{em}}$. Ainsi la fonction de collection ne dépend[6] que de quatre paramètres du montage : l'ouverture numérique de l'objectif NA_{Lobj}, le grandissement du microscope α, la longueur d'onde d'émission λ_{em} et le rayon du diaphragme de détection A.

Grâce à l'expression (5.29) nous pouvons évaluer numériquement la fonction G en différents points de l'échantillon. Dans les graphes suivants (Fig.5.8) sont présentées les évolutions de la fonction de collection dans le plan focal et le long de l'axe optique pour différentes ouvertures de diaphragme de détection. Ces évaluations numériques ont été réalisées grâce au programme Mathematica, et plusieurs graphes ont demandé en pratique plusieurs jours de calculs numériques.

Dans la figure 5.8 sont présentées des fonctions de collection calculées pour différentes ouvertures de diaphragme de détection. On constate que la fonction de collection est bien maximale lorsque la source est placée au point focal de l'objectif, $P = F_{Lobj}$. Lorsque la source P est distincte du point focal, le diaphragme de détection effectue une sélection des photons émis par P et la fonction de collection décroît rapidement.

Dans le plan focal (Fig.5.8.a), la fonction de collection montre que les photons des marqueurs inclus dans l'image du diaphragme de détection sont bien détectés. On voit que nos résultats suivent bien la théorie de l'optique géométrique pour des rayons de diaphragmes, a, supérieurs à 2 unités optiques. On constate que la zone de collection ne tend pas vers zero quand a tend vers zero. On constate la même chose si on trace les fonctions de

[6]La fonction de collection ne dépend de f_{Ldet} qu'au travers du coefficient de grandissement α. Ce résultat, *a priori* surprenant, peut être qualitativement retrouvé par le raisonnement suivant. Soit une source unitaire P qui se déplace dans le plan focal de l'objectif. On obtient dans le plan du diaphragme une intensité concentrée dans un disque lumineux dont le rayon est le rayon de Airy dans l'espace de détection et dont le centre est situé à $\alpha\rho$ du centre du diaphragme, où ρ est la distance à l'axe optique du point P dans l'échantillon (Fig.5.7). Dès que le disque lumineux sort du diaphragme, la lumière émise par P n'est pas collectée. La distance ρ_{Lim} à partir de laquelle la lumière émise par P n'est pas collectée par le diaphragme de rayon A correspond donc à $\alpha\ \rho_{Lim} = A + R_{AiryDet}$. Or

$$R_{AiryDet}/\alpha = 0.60\lambda\frac{Min(R_{Lobj}, R_{Ldet})}{f_{Ldet}}/\alpha = 0.60\lambda\frac{R_{Lobj}}{f_{Ldet}}/\alpha = 0.60\lambda\frac{R_{Lobj}}{f_{Lobj}} \qquad (5.30)$$

ainsi $\rho_{Lim} = A/\alpha + R_{AiryObj}$, on retrouve bien l'indépendance à f_{Ldet} qui est liée ici au fait que $R_{airyDet}/R_{airyObj} = \alpha$.

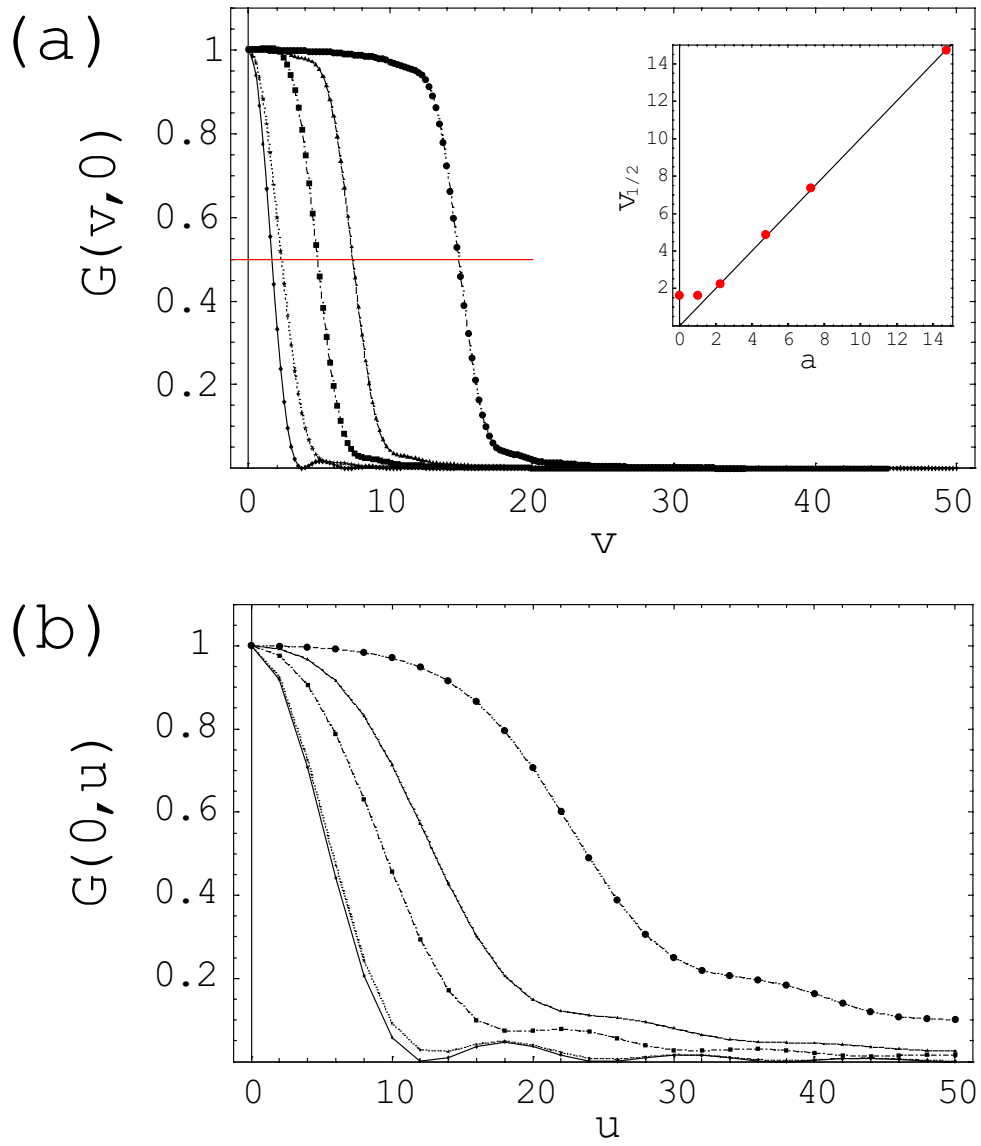


FIG. 5.8 – **Fonction de collection** G pour différents rayons de diaphragme de détection $a \in \{0,\ 2.25,\ 4.75,\ 7.75,\ 14.25\}$ **(a)** Décroissance de la fonction de collection perpendiculairement à l'axe optique. *Insert* Abcisse à mi-hauteur de la fonction $G(v,0)$ en fonction du rayon a du diaphragme. **(b)** Evolution de la fonction de collection selon l'axe optique.

collection suivant l'axe optique (Fig.5.8.b). Un résultat peu intuitif est l'annulation de la fonction de collection en $P = (0, 4\pi)$ pour des diaphragmes de petite ouverture. Cette étrangeté est élucidée quand on remarque que pour une source unitaire en $P = (0, 4\pi)$ les interférences sont destructives en F_{Ldet}, sur lequel est centré le diaphragme de détection. Pour des ouvertures de diaphragme croissantes cette annulation disparaît peu à peu (Fig.5.8.c). En plus d'augmenter le domaine de la zone de collection maximale, augmenter l'ouverture du diaphragme de détection entraîne donc un lissage des fluctuations de la fonction de collection. Ce constat obtenu en considérant les valeurs de G suivant l'axe optique est encore valable en dehors de l'axe optique.

Ces représentations numériques nous apprennent que l'extension de la zone de collection maximale peut être obtenue par un simple raisonnement géométrique quand les diaphragmes de détections ont un rayon supérieur à deux unités optiques radiales dans la zone de détection.

En pratique **il est inutile de choisir un diaphragme de détection plus petit que** 2 **unités optiques**, car la résolution du microscope ne s'en trouve pas améliorée alors que l'intensité collectée est en revanche réduite.

5.3 Fonction de détection du microscope

Grâce aux expressions de $I_{EX}(P)$ (eq. 5.12) et de $G(P)$ (eq. 5.29) nous connaissons en tout point P de la zone échantillon l'intensité volumique d'excitation et la fraction de photons émis qui parvient au détecteur, dans l'hypothèse d'un diaphragme d'excitation infiniment petit[7]. La fonction de détection tridimentionnelle est maintenant accessible. En tout point P de l'échantillon, elle est égale au produit de l'intensité volumique d'excitation en P avec la fonction de collection du montage pour une source unitaire placée en P :

$$F(P) \propto I_{EX}(P)G(P) \tag{5.31}$$

$$\propto \mid \psi(\overrightarrow{v}, u) \mid^2 \int_{M \in Disque(a)} \mid \psi(\overrightarrow{v_D} + \overrightarrow{v}, u) \mid^2 d^2 v_D \tag{5.32}$$

Cette fonction est caractéristique du montage réalisé et son expression va nous permettre de mieux appréhender le choix des paramètres de notre montage optique, le but étant d'adapter notre montage aux échantillons à observer.

[7]En fait dans notre montage nous remplaçons le diaphragme d'excitation et la lentille d'excitation par un système laser à faisceau gaussien de très bonne qualité, je pense que cela justifie notre hypothèse de diaphragme d'excitation quasi-nul

Les propriétés de I_{EX} et de G permettent de prévoir que F est évidemment maximum au focus d'excitation. De plus, dans les conditions $R_{Lobj} < R_{Lex}$, $R_{Lobj} < R_{Ldet}$ et $d_{EM} \approx f_{Ldet} + f_{Lobj}$, la fonction F ne dépend que de quatre paramètres :

- l'ouverture numérique de l'objectif (NA_{Lobj}),
- les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission (λ_{em} et λ_{ex}),
- l'ouverture du diaphragme de détection en unités optiques radiales dans l'espace de détection ($a = \frac{2\pi NA_{Lobj}}{\lambda_{em}} \frac{A}{\alpha}$).

Résolution suivant le critère de Rayleigh

Intéressons-nous à la résolution de l'appareil en utilisant le **critère de Rayleigh**. Introduit au XIX^{eme} siècle afin de caractériser la résolution de microscopes à large champ, ce critère permet de définir à partir de quelle distance minimum on peut distinguer deux marqueurs ponctuels situés dans le plan focal de l'objectif. Pratiquement cette distance seuil est la largeur à quart-hauteur de la fonction $F(v, u = 0)$ (Fig.5.10.a). Grâce à nos calculs numériques nous sommes parvenus à tracer la résolution radiale du microscope en fonction du rayon a du diaphragme de détection (Fig.5.10.b). De plus, nous sommes capables de calculer les valeurs de F sur tout le volume de l'échantillon, nous pouvons donc appliquer ce critère de Rayleigh suivant l'axe optique. Ainsi en mesurant la largeur à quart-hauteur de la fonction $F(0, u)$ (Fig.**??**.a) on obtient la résolution axiale du microscope (Fig.**??**.b).

Le premier constat qui s'impose est que la décroissance de $F(P)$ au voisinage du focus d'excitation est dominée par les variations de $I_{EX}(P)$. Il est donc important de choisir un objectif particulièrement bien corrigé pour la longueur d'onde d'excitation. D'autre part on observe que la résolution axiale est toujours moins bonne que la résolution latérale. A mesure que l'on ouvre le diaphragme de détection on constate que les résolutions latérales et axiales du montage confocal tendent rapidement vers les résolutions d'un microscope à large champ[8]. Même quand le diaphragme de détection est petit, le gain en résolution radiale est de 35%, et de 38% en résolution radiale.

[8]Pour un confocal à diaphragme de détection ouvert la fonction de détection tend vers $F_{ouvert}(P) \rightarrow Iex(P) =\mid \psi(\overrightarrow{v}, u) \mid^2$. Pour un microscope à large champ la fonction de détection est égale à $F_{WF} = G(P)$ calculé précedemment, ici la dimension a est le coté des pixels de la caméra placée au plan focal de la lentille de détection. Pour des pixels assez petits, c'est à dire pour a inférieur à deux unités optiques, nous avons remarqué que $G(P) \rightarrow \mid \psi(\overrightarrow{v}, u) \mid^2$. Ainsi la fonction de détection d'un microscope confocal à diaphrage ouvert est égale à celle d'un microscope à large champ ! NB : En fait ceci n'est pas parfaitement exact car les longueurs d'ondes d'excitation et de détection sont différentes.

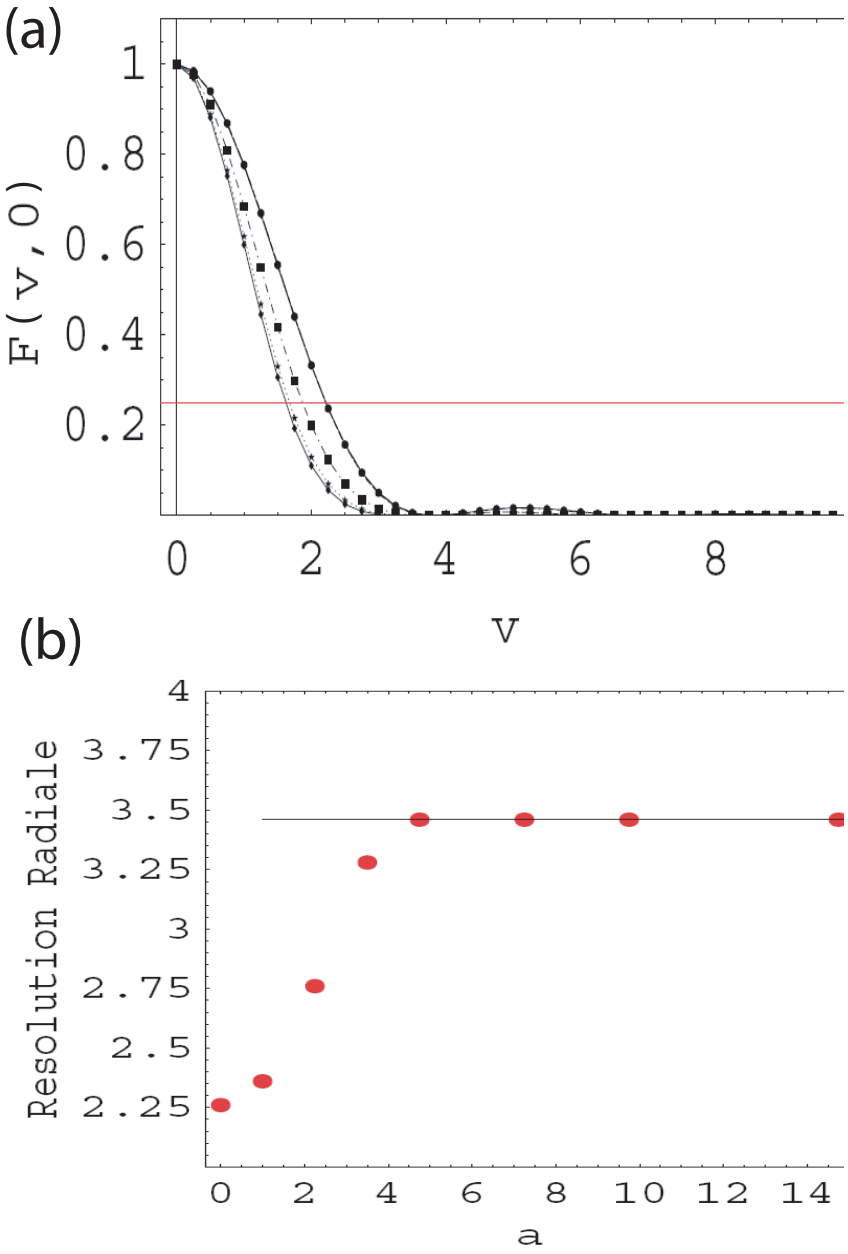


FIG. 5.9 – **(a)**Fonction de détection du microscope perpendiculairement à l'axe optique, pour différents diamètres a du diaphragme. De la hauteur à quart-hauteur de cette fonction, nous déduisons la résolution radiale du montage(**b**).

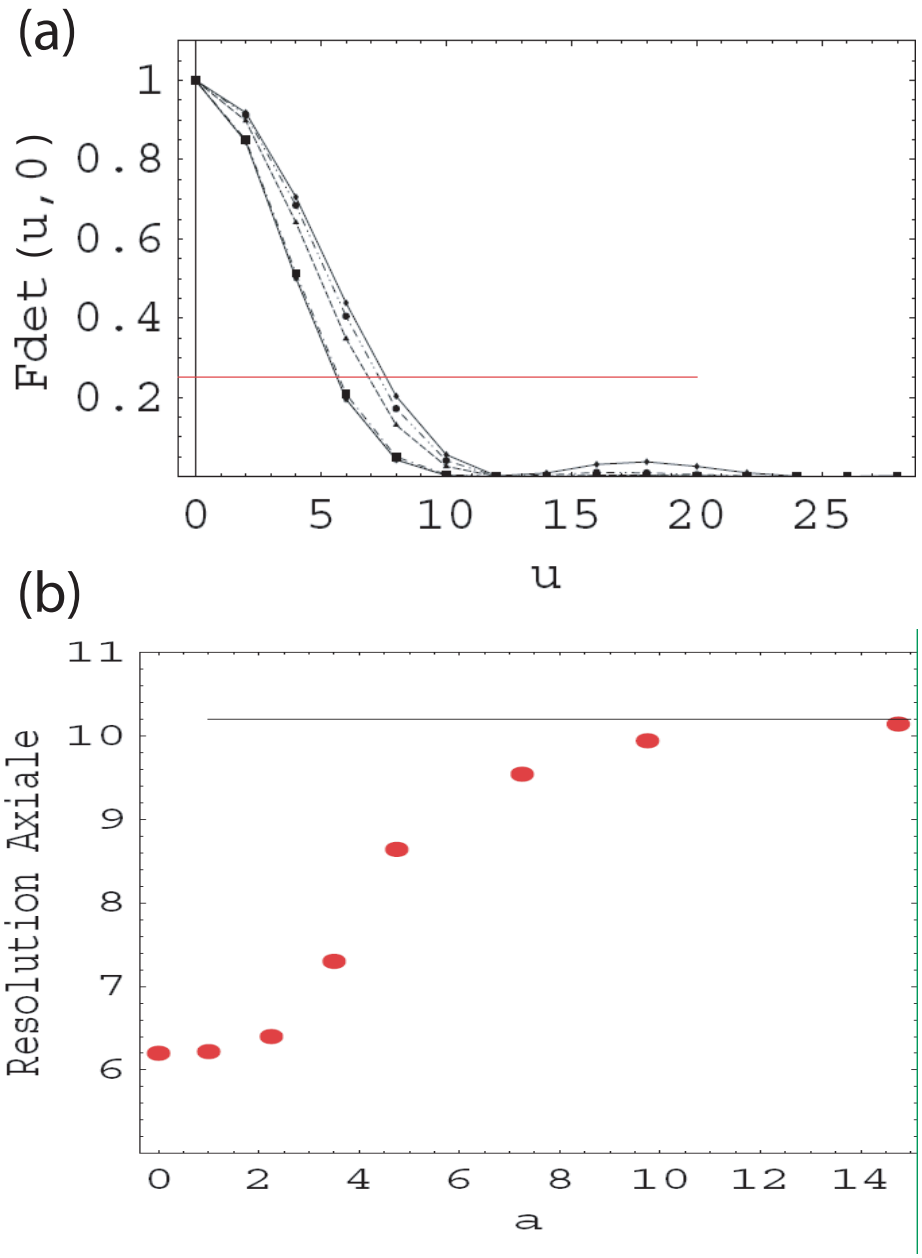


FIG. 5.10 – **(a)**Fonction de détection du microscope suivant l'axe optique, pour différents diamètres a du diaphragme. De la hauteur à quart-hauteur de cette fonction, nous déduisons la résolution axiale du montage(**b**).

Suivant les critères de Rayleigh **la résolution d'un microscope confocal et d'un microscope à large champ sont comparables**, ce résultat surprend la plupart des personnes qui découvrent la microscopie confocale. Les expressions des unités optiques dans l'espace métrique (Eq.5.15 et Eq.5.14) montrent de plus que **diminuer les longueur d'ondes d'excitation et d'émission permet d'améliorer les résolutions axiales et radiales**. Ces calculs nous permettent de remarquer que la résolution d'un microscope

confocal est meilleure que celle d'un microscope à large champ à partir de $a < 10$ pour la résolution axiale (Fig.**??**.b) et de $a < 4$ pour la résolution radiale (Fig.5.10.b). Nous verrons dans la suite que ce n'est pas ce critère qui est important dans le choix du diaphragme de détection.

Par contre c'est bien en considérant ces résolutions que nous choisissons l'ouverture numérique NA_{Lobj} adaptée. Prenons le cas d'un échantillon épais constitué de particules colloïdales sphériques marquées en leur centre ; si on veut pouvoir distinger deux particules en contact il suffit que[9] :

$$2R > \frac{10.14}{2\pi} \frac{\lambda_{ex}}{NA_{Lobj}^2} \tag{5.33}$$

Pour $R = 1\mu m$, et $\lambda_{ex} = 500nm$ il faut théoriquement que l'ouverture numérique de l'objectif NA_{Lobj} soit supérieure à $0,6$. Dans le cas d'un échantillon mince où les particules sont dans le plan focal objectif c'est le critère de résolution radiale qui intervient, et il suffit alors d'un objectif d'ouverture numérique supérieure à $0,14$ pour distinguer deux particules au contact. Le cas des sphères uniformément marquées sera traité plus loin mais tout d'abord nous allons montrer quel est le critère qui guide dans le choix de l'ouverture du diaphragme de détection.

Epaisseur de la zone de sensibilité

Afin d'analyser quantitativement le rejet de l'information hors plan focal dans le cas d'échantillons épais concentrés, observons le cas extrême d'un échantillon épais uniformément marqué et peu absorbant. En vertu de la conservation du flux d'excitation, chaque plan normal à l'axe optique est traversé par le même flux. Par conséquent, dans chacun de ces plans la somme des photons émis par les marqueurs du plan est identique pour tous les plans (dans l'approximation d'une réponse linéaire des marqueurs). Seule une partie des photons émis parvient au détecteur. Nous nous intéressons à la la contribution au signal de chaque plan normal à l'axe optique. Pour connaître

[9]Nous avons pris pour ce critère les pires conditions : un diaphragme de détection ouvert et des particules en contact alignées suivant l'axe optique.

la contribution par plan il suffit d'intégrer $F(D)$ sur chacun des plans. Nous avons effectué le calcul numériquement et présentons l'évolution de la contribution par plan de l'échantillon concentré en fonction de leur distance au plan focal pour différentes ouvertures de diaphragme dans la figure 5.11.

C'est dans ces graphes qu'apparaît l'intérêt réel de la microscopie confocale par rapport à la microscopie classique. Rappelons en premier temps que dans un microscope à large champ la contribution des plans excités est la même pour tous les plans. Par contre, en microscopie confocale, seuls les plans au voisinage du plan focal participent au signal (Fig.5.11), l'extension de ce voisinage peut être réglée via le diaphragme de détection. La microscopie à large champ n'est pas adaptée à l'étude d'échantillons épais concentrés [10], contrairement à la microscopie confocale.

La contribution par plan tend asymptotiquement vers la fonction $(u_{Cut}/u)^2$ où u est la distance du plan excité au plan focal et (u_{Cut} est une distance caractéristique qui dépend du rayon du diaphragme de détection (Fig.5.11.a). La distance $2u_{Cut}$ peut être interprétée comme l'épaisseur de la tranche d'échantillon qui contribue de manière prédominante au signal. Le minimum de u_{Cut} est proche de 9 unités optique axiales, elle même voisine de l'extension axiale de la zone d'excitation forte étudiée en début de ce chapitre (Fig.5.6). Au delà de $a = 2$ il semble que $u_{Cut}(a)$ tende asymptotiquement vers une droite de pente voisine de 5.

Comme nous l'avons déjà remarqué dans notre étude de la fonction de collection et des résolutions, il est inutile de prendre des tailles de diaphragmes inférieures à 2 unités optiques radiales dans l'espace de détection. Ce qui donne en coordonnées non réduites :

$$A \; > \; 2 \, \frac{\alpha}{2\pi} \frac{\lambda}{N A_{Lobj}} \tag{5.34}$$

En fait le choix de A dépend beaucoup de la luminosité du marquage des particules, de la concentration de particules, de la fluorescence résiduelle du

[10] Pour un microscope à large champ l'excitation est à peu près uniforme sur une épaisseur de $100\mu m$, ainsi la contribution des plans au signal mesuré par un pixel de taille A peut être calculée à partir de l'approximation $F(P) = I_{EX}(P)G(P) \approx G(P)$. Ce calcul permet bien d'observer que la microscopie à large champ est limitée à l'étude d'échantillons concentrés minces : tous les plans de l'échantillon concentré contribuent à la même hauteur au signal. Ainsi, bien que la sensibilité d'un pixel soit maximale dans le plan focal et que dans ce plan elle soit localisée dans un disque de petite taille, le signal provenant de cette zone réduite n'est pas du tout perturbé par d'autres marqueurs du plan focal mais il est complètement noyé quand d'autres marqueurs sont présents au desssus et en dessous du plan focal ; plus la fraction volumique de marqueurs est grande plus le signal d'intérêt est noyé, ce que l'on retrouve bien expérimentalement.

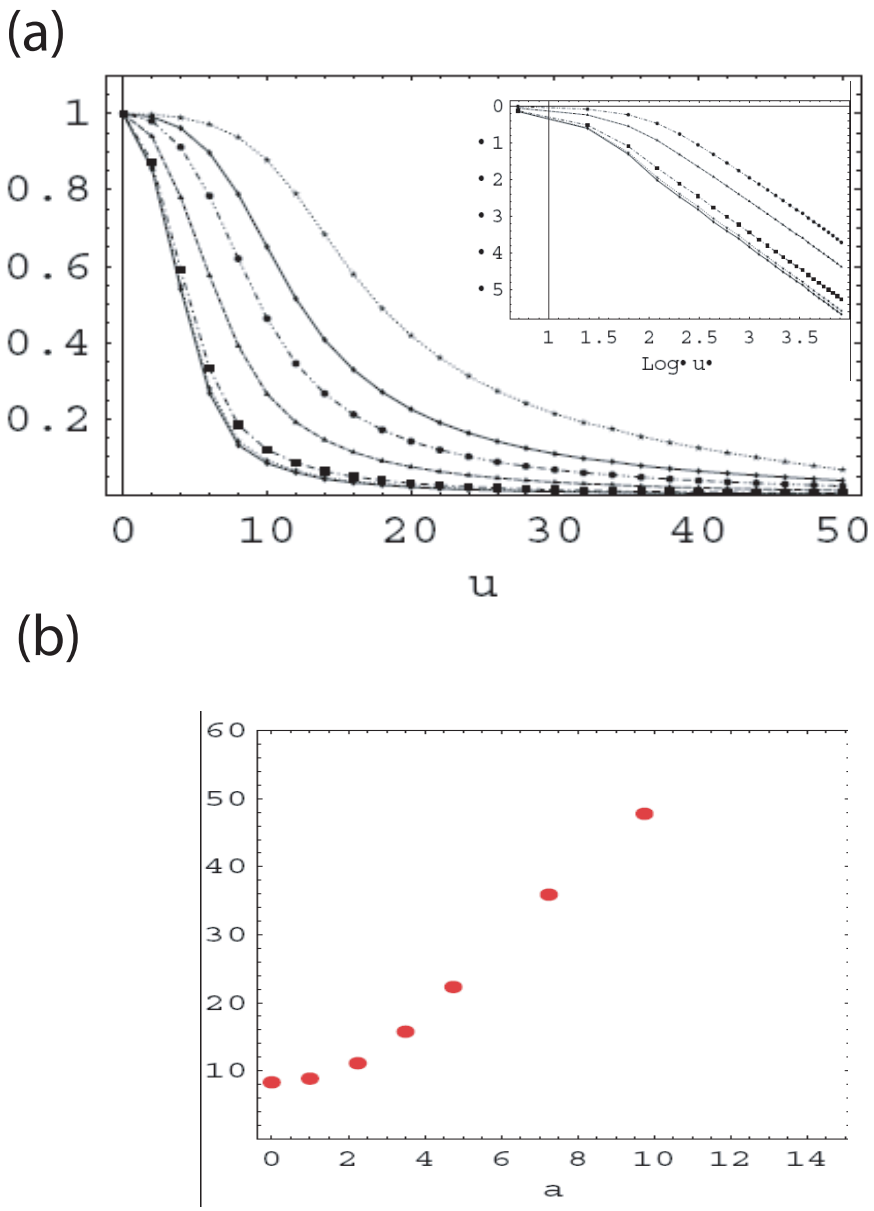


FIG. 5.11 – **(a)**Contribution des plans normaux à l'axe, situés à la distance u du focus, pour différentes valeurs du diamètre du trou de détection. *Insert* Représentation bilogartighmique, dans laquelle nous voyons apparaître une distance de coupure, que nous reportons en fonction de la taille du diaphragme dans la figure **(c)**.

milieu interstitiel et du bruit intrinsèque de détection. Augmenter a améliore toujours le rapport signal sur bruit du détecteur. Cependant nous venons de voir qu'augmenter a augmente la contribution des plans hors focus et diminue par conséquent le rapport signal sur bruit de fond. Le choix de A ne peut se faire qu'au cas par cas et par des essais successifs. Les graphes des figures 5.11, **??** et 5.10 permettent de déterminer les diamètres limites pour chaque échantillon, et aussi de comprendre l'interdépendance du choix de l'ouverture numérique et de l'ouverture du diaphragme de détection.

Le critère le plus souvent proposé dans la littérature est de prendre un diaphragme de détection égal au disque de Airy dans l'espace de détection [3], ce qui correspond à prendre $a = 3.8$. Grâce aux graphes des figures **??** et 5.10 on constate que ce choix aboutit à un montage où la résolution radiale est la même que celle d'un microscope à large champ. On a par contre une amélioration de 30% de la résolution axiale. L'épaisseur u_{Cut} correspondante est voisine de 15 unités optiques axiales. Si les particules ont un rayon supérieur à 15 unités optique axiales, soit $1.2\mu m$ pour $NA = 1$ et $\lambda = 500nm$, le bruit de fond des images ne proviendra que du détecteur, par contre si les particules sont plus petites on observera un bruit de fond supplémentaire aux endroits de concentration des particules.

5.4 Déformation des images

Grâce à une évaluation numérique de la fonction de détection F et au principe de supperposition des intensités pour des sources incohérentes, il est possible d'émuler le balayage d'un microscope confocal et de construire numériquement des images trimensionnelles de particules marquées .Ces reconstructions numériques permettent de répondre à deux questions suivantes : dans quelles conditions les images obtenues grâce au microscope confocal traduisent-elles directement la réalité ? Dans quelles conditions est il possible de distinguer deux particules de la suspension ?

On observe que l'image des sphères est parfois déformée. Afin d'estimer cette déformation de la réalité géométrique, il suffit de mesurer la distance au point focal à partir de laquelle le signal a diminué de moitié. Le rayon effectif des sphères suivant l'axe optique est noté R_u et leur rayon effectif suivant un axe v_x inclus dans le plan focal est noté R_v. Ces rayons effectifs ont été calculés pour différentes tailles de billes (Fig.5.12). Les calculs ont été faits grâce au logiciel Mathematica et sont demandeurs en ressources informatiques. Les rayons effectifs R_u et R_v ont des limites non nulles pour R_{geom} tendant vers zéro. Ainsi l'**image de sphères uniformément marquées peut s'avérer extrêmement trompeuse quand le rayon de la sphère**

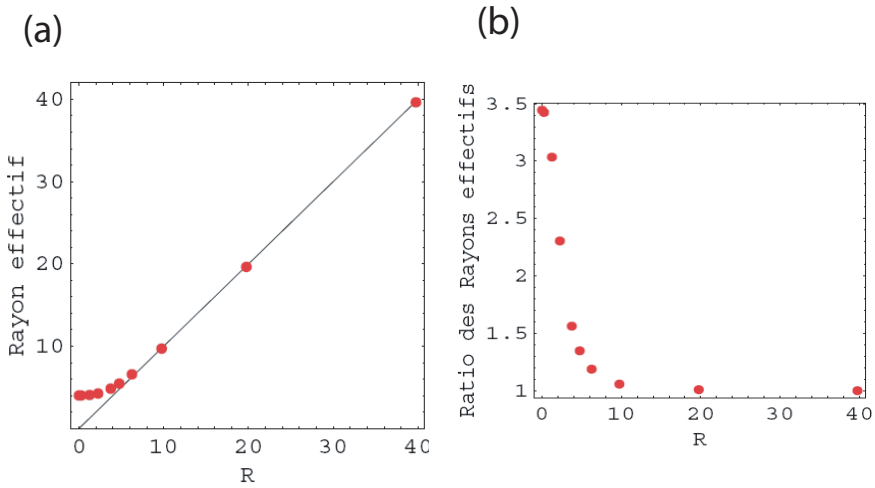


FIG. 5.12 – **(a)**Rayon axial effectif en fonction du rayon des particules observées **(b)** Rapport des rayons effectifs observés en fonction du rayon des particules .

est de l'ordre de quelques unités optiques ou plus petit. Le rapport R_u/R_v est supérieur à 1 ; il tend vers 1 lorsque le rayon géométrique de la sphère, R_{geom}, augmente. Ainsi l'image des sphères est étirée suivant l'axe optique. Toutefois **cette distorsion disparaît pour des billes dont le rayon est important**. A titre indicatif, on peut noter que la déformation relative de l'image suivant l'axe u par rapport à l'axe v est inférieure à 6% pour des sphères dont le rayon supérieur à 10 unités optiques radiales. [11]

[11]Un résultat *a priori* surprenant est que l'ouverture A du diaphragme de détection n'a pas d'influence drastique sur les diamètres effectifs que nous avons calculés. Nous avons déjà observé cela dans le calcul des résolutions de Rayleigh pour différentes ouvertures de diaphragme. Tout cela est dû au fait que les variations de la fonction de détection F au voisinage du point focal sont dominées par les variations de I_{EX} qui ne dépendent pas du diaphragme de détection (Fig.**??** et Fig.5.10).

5.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons tenté d'illustrer et de quantifier les concepts clefs du fonctionnement du microscope confocal. Notre but avoué est d'obtenir des critères permettant de trouver quel choix de paramètres du montage sera adapté à nos échantillons.

Grâce aux expressions de l'intensité volumique d'exitation dans la zone échantillon, de la fonction de collection du trajet de détection et des coordonnées optiques, on constate qu'il suffit de respecter les critères $R_{Lobj} < R_{Lex}$,$R_{Lobj} < R_{Ldet}$ et $d_{EM} \approx f_{Ldet} + f_{Lobj}$ pour obtenir un montage dont les performances ne dépendent plus que de cinq paramètres :

- les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission (λ_{em} et λ_{ex})
- l'ouverture numérique de l'objectif (NA_{Lobj})
- le grandissement de l'objectif (α)
- le rayon d'ouverture du diaphragme de détection (A)

Le choix du marqueur fluorescent utilisé impose **les longueurs d'ondes** λ_{em} et λ_{ex} à considérer. Notons que plus ces longueurs d'onde sont petites, meilleures sont les résolutions axiales et radiales du microscope. Ensuite vient le choix de l'objectif à utiliser. Un point primordial est de prendre un objectif corrigé pour un indice optique proche du milieu liquide à étudier. Dans les suspensions aqueuses le mieux est d'utiliser un objectif "eau", c'est à dire corrigé pour un indice optique voisin de 1.33 dans la zone échantillon. L'objectif doit de plus être achromatique vis à vis des longueurs d'ondes λ_{em} et λ_{ex}. Si l'objectif est bien adapté les aberrations optiques sont minimisées et la concentration de l'intensité d'excitation autour du point de focalisation s'approche des limites théoriques.

Il est primordial de choisir un objectif dont l'**ouverture numérique** permette de bien distinguer les particules. Pour ce faire on peut s'aider des critères de Rayleigh évoqués plus haut. Une démarche pragmatique est d'observer des échantillons minces de ses suspensions en microscopie "classique" (à large champ). L'objectif qui permet de distinguer au mieux les particules offrira une résolution radiale suffisante pour la microscopie confocale.

L'objectif choisi détermine les deux paramètres[12] α et NA_{Lobj}. On sait

[12]Il faut bien distinguer le grandissement α du montage confocal de l'indice de magnification M inscrit sur l'objectif choisi. On a

$$\alpha = \frac{f_{Ldet}}{f_{Lobj}} = M\ \frac{f_{Ldet}}{f_{const}}$$

où f_{Ldet} est la distance focale de la lentille de détection et f_{const} est la distance focale de la lentille de tube. Pour des objectifs à correction infinie chaque fabricant a choisi une

alors que le **rayon du diaphragme de détection** doit vérifier :

$$A \ > \ 2 \ \frac{\alpha}{2\pi} \frac{\lambda}{NA_{Lobj}} \tag{5.35}$$

Si on se place à cette limite on s'approche des limites théoriques du montage. Cela n'est pas toujours nécessaire et il est souvent pertinent de prendre des ouvertures de diaphragmes plus grandes pour améliorer le rapport signal sur bruit de mesure. En pratique, une grande difficulté dans ces réglages est de régler la puissance de la source laser d'illumination afin d'améliorer le rapport signal sur bruit de mesure sans dépasser des intensités lumineuses néfastes aux marqueurs fluorescents ("photobleaching").

Pour **traiter les images** obtenues, il faut tenir compte des déformations introduites par la fonction de détection du confocal (Fig.**??**). Pour une particule sphérique uniformément marquée dans son volume, on peut considérer que les images obtenues sont directement interprétables dès que le rayon R des particules est supérieur à dix unités optiques radiales, c'est à dire :

$$2R > \frac{10}{2\pi} \frac{\lambda_{ex}}{NA_{Lobj}} \tag{5.36}$$

Même dans ces conditions les points de contacts entre deux particules sphériques ne seront pas bien résolus. Pour des particules qui ne vérifient pas le critère précédent on peut utiliser des traitements d'image afin de corriger les déformations[3]. Ces traitements sont toutefois complexes.

A la suite de ce chapitre théorique nous allons présenter comment nous avons choisi les composants du montage de confocal à balayage rapide, comment fonctionne notre système de détection, et enfin comment régler le montage confocal.

---

distance standardisée, on a $f_{Lobj} = 200mm$ pour Leica et Nikon, $180mm$ pour Olympus et $165mm$ pour Zeiss.

Bibliographie

[1] M. Gu Advanced Optical Imaging Theory. *Ed. Springer Verlag*, 2000.

[2] M. Born, E. Wolf Principles of Optics. *Cambridge University Press*, 1999.

[3] T.B. Pawley and al. Handbook of biological confocal microscopy. *Ed. Plenum Press*, 1995.

Chapitre 6

Réalisation d'un microscope confocal à balayage rapide

On peut trouver sur le marché actuel des microscopes confocaux rapides extrêmement performants et bien conçus. Ces microscopes permettent de choisir entre plusieurs sources d'excitations, ils sont équipées de diaphragmes à ouverture réglable numériquement et sont conçus par des équipes très compétentes en optique. Pourquoi fabriquer son propre confocal rapide ? La première raison est d'ordre pécunier : à l'heure actuelle, les microscopes confocaux rapides du commerce valent plusieurs centaines de milliers d'euros et nous ne disposions pas de ce budget. Nous avons ensuite trouvé des articles [1, 2] démontrant que réaliser un confocal rapide soi-même n'était pas du tout irréaliste et qu'un budget matériel de 20000 euros était suffisant. Bien que le microscope réalisé n'offre pas toutes les fonctionnalités des superbes microscopes commerciaux, par exemple le réglage automatique des diaphragmes et la possibilité de basculer très simplement vers un montage de microscope classique. Notre montage présente toutefois quelques avantages de taille : il nous faut moins d'une heure pour passer d'un montage microscope inverse, où l'échantillon est observé par le dessous, à un montage microscope normal, où l'échantillon est observé par le dessus. Les microscopes commerciaux ne proposent qu'une des deux possibilités. Nous pouvons même facilement modifier notre montage pour disposer l'échantillon verticalement et l'observer de côté, je crois bien qu'aucun microscope commercial ne propose cela, cela peut pourtant s'avérer intéressant pour étudier des phénomènes de sédimentation. L'inconvéniant d'un microscope confocal fait "maison" pourrait être sa difficulté d'utilisation, j'ai fait mon maximum pour rassembler tous les réglages du microscope sous une interface informatique simple d'utilisation et j'espère que le présent manuscrit éclaire l'utilisation du microscope et décrit un protocole de réglage pratique. Je suis parvenu à réaliser le microscope après deux

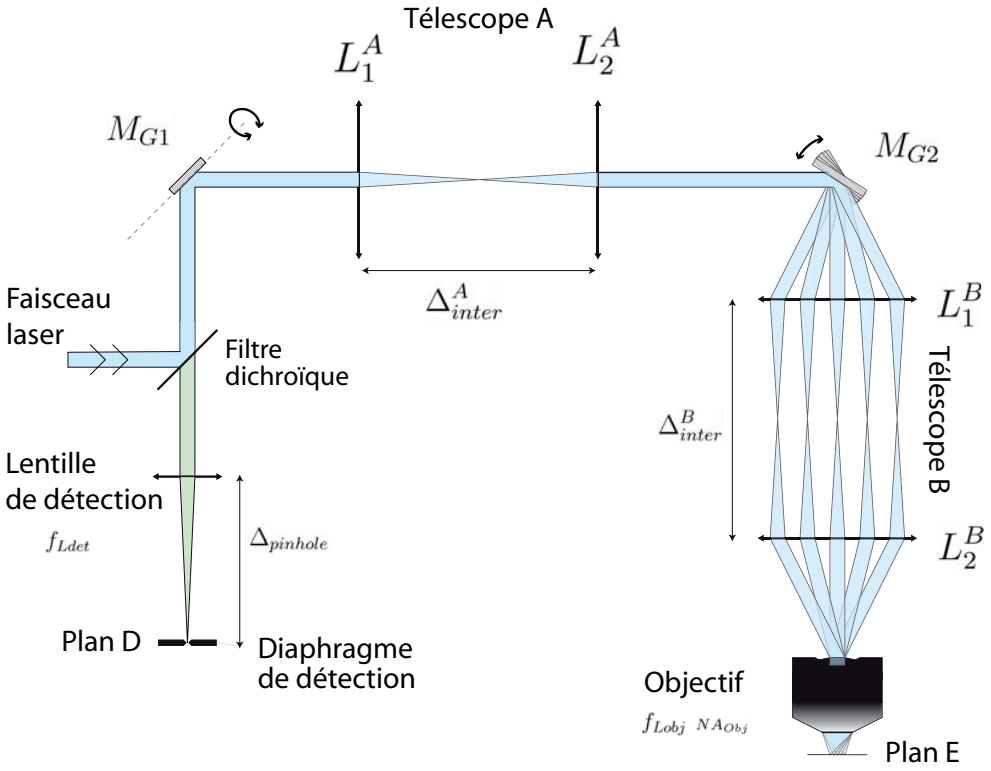


FIG. 6.1 – Schéma complet du microscope confocal à balayage.

ans de travail, ce qui coïncidait malheureusement avec la fin de mon contrat de thèse. Je n'ai pas eu le temps d'utiliser le microscope pour observer la floculation de suspension colloïdales concentrées mais la réalisation de ce montage c'est révélée être une expérience passionnante où j'ai été amené à travailler dans plusieurs spécialités : optique, électronique, informatique, mécanique et usinage. Le montage est actuellement à Strasbourg où il est utilisé pour l'imagerie confocale rapide mais aussi pour la réalisation de pièges optiques.

6.1 Montage optique

Nous présentons dans la suite le détail du montage optique de notre microscope confocal.

6.1.1 Choix et disposition des éléments optiques dans le microscope

La première tâche difficile dans la réalisation pratique du montage optique est de choisir plusieurs dizaines d'éléments optiques et mécaniques dans les catalogues des fournisseurs de matériel scientifique. Chaque lentille, chaque support doit s'intégrer de manière cohérente dans le montage afin de rendre possible un réglage aisé de l'appareil et un fonctionnement optimum. Plutôt que de donner directement la liste des éléments optiques qui ont été choisis dans notre montage, il nous a paru utile de mettre en avant les critères qui déterminent ce choix. Ces conditions d'harmonie entre les composants du montage confocal seront présentées sous forme d'inégalités entre les paramètres présentés dans la figure (6.1).

Utilisation d'un laser comme source

En raison de la faible divergence du laser la distance entre le diaphragme de détection et la lentille de détection vérifie :

$$\Delta_{pinhole} = f_{Ldet} \tag{6.1}$$

Introduction de deux télescopes dans le montage

Dans un montage confocal le signal mesuré traduit la présence de marqueurs fluorescents au focus d'excitation. Afin d'imager la fluorescence dans le plan focal de l'objectif il est nécessaire de déplacer le focus d'excitation dans le plan focal suivant un scan de Raster [3]. Grâce à deux miroirs rotatifs, M_{G1} et M_{G2}, il est possible d'incliner le faisceau laser qui parvient à l'aperture arrière de l'objectif. Si la faible divergence du faisceau laser est maintenue, l'inclinaison du faisceau incident se traduit bien évidemment par un déplacement du focus d'excitation dans la plan focal. Dans notre montage nous avons choisi d'introduire deux télescopes (couple de lentilles distants de la somme de leur distance focale) afin de maintenir la faible divergence du faisceau laser quelle que soit l'inclinaison des miroirs mais aussi pour assurer que le faisceau dévié par les miroirs parvienne bien à l'objectif en bout de montage.

La technique d'imagerie confocale retenue nécessite une conjugaison du centre des miroirs-galvanomètres et de la pupille arrière de l'objectif. De plus, si l'on souhaite confiner le balayage de l'échantillon dans le plan focal de l'objectif[1] il est nécessaire d'avoir un faisceau d'excitation peu divergent en

[1] Avoir un balayage dans le plan focal de l'objectif permet d'utiliser au mieux les correc-

amont de l'objectif. Il est donc nécessaire de vérifier les égalités suivantes[2] :

$$\Delta^A_{MG1} = f_{L^A_1} \quad (6.2)$$
$$\Delta^A_{MG2} = f_{L^A_2} \quad (6.3)$$
$$\Delta^B_{MG2} = f_{L^B_1} \quad (6.4)$$
$$\Delta^B_{Lobj} = f_{L^B_2} \quad (6.5)$$
$$f_{L^A_1} + f_{L^A_2} = \Delta^A_{inter} \quad (6.6)$$
$$f_{L^B_1} + f_{L^B_2} = \Delta^B_{inter} \quad (6.7)$$
$$L^A_1 \; parallele \; L^A_2 \quad (6.8)$$
$$L^B_1 \; parallele \; L^B_2 \quad (6.9)$$

Critères concernant le trajet d'excitation et le trajet d'émission

A partir du moment où le choix de l'objectif a été fait en fonction de l'échantillon à observer, deux paramètres importants sont alors fixés : la distance focale de l'objectif [3], f_{Lobj}, et le rayon de sa pupille arrière[4], R_{Lobj}. La distance focale de l'objectif définit le grandissement total du montage confocal et intervient dans le choix du diamètre du diaphragme de détection. La formule du grandissement dans le montage confocal à balayage est :

$$\alpha = \frac{f_{Ldet}}{f_{Lobj}} \frac{f_{L^A_1}}{f_{L^A_2}} \frac{f_{L^B_1}}{f_{L^B_2}} \quad (6.10)$$

La forme simple de la fonction de détection obtenue dans le chapitre de modélisation nécessite un éclairage complet et uniforme[5] la pupille arrière de l'objectif. Il est de plus nécessaire de s'assurer que les photons émis par les marqueurs présents dans la zone d'excitation forte ne soient pas bloqués au

tions de l'objectif et son ouverture numérique, il est toutefois important de noter d'emblée qu'un balayage hors du plan focal de l'objectif obtenu par exemple en décallant une des lentilles L^B reste dans le cadre de l'imagerie confocale

[2]Ces relations ont été obtenues dans le cas de lentilles minces, dans la pratique il faut faire les corrections nécessaires pour les lentilles épaisses, c'est assez facile.

[3]Rappel : le lien entre la distance focale de l'objectif et le paramètre de grandissement affiché sur sa bague est donné au chapitre traitant de la modélisation analytique du microscope.

[4]Le plus souvent le rayon de la pupille arrière d'un objectif n'est pas donnée dans sa notice. De toute manière ce rayon est vérifie l'expression $R_{Lobj} = f_{Lobj} \tan(\arcsin(\frac{NA_{Obj}}{n}))$ où n est l'indice de refraction pour lequel l'aberration asphérique de l'objectif est corrigée.

[5]En fait on peut montrer en optique diffractive que l'excitation dans l'échantillon peut supporterdes fluctuations spaciales dans l'intensité du champ d'excitation sur l'aperture arrière sans grand dommage sur la qualité de la mesure

cours du trajet d'émission avant d'arriver au diaphragme de détection. Ainsi les éléments du montage se doivent de vérifier les relations[6] :

$$\Delta_{Ldet} = f_{Lobj} + f_{Ldet} \tag{6.11}$$

$$R_{Laser} > R_{Lobj}\frac{f_{L_1^A}}{f_{L_2^A}}\frac{f_{L_1^B}}{f_{L_2^B}} \tag{6.12}$$

$$R_{Ldet} < R_{Lobj}\frac{f_{L_1^A}}{f_{L_2^A}}\frac{f_{L_1^B}}{f_{L_2^B}} \tag{6.13}$$

$$R_{DC} > R_{Laser}\sqrt{2} \tag{6.14}$$

$$R_{MG1} > R_{Laser}\sqrt{2} \tag{6.15}$$

$$R_{MG2} > R_{Laser}\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^A}}\sqrt{2} \tag{6.16}$$

Critères liés à l'extension du balayage laser

Au cours du balayage de l'échantillon, le trajet d'excitation et d'émission est modifié par la rotation des miroirs-galvanométriques. Si le balayage dans l'échantillon se fait sur des zones dont l'extension latérale maximale est $2 * \delta$, les miroir-galvanomètres doivent permettre d'atteindre les angles optiques suivantes[7] :

$$\Theta_{MG2} > \arctan(\frac{f_{L_2^B}}{f_{L_1^B}}\frac{\delta}{f_{Lobj}}) \tag{6.17}$$

$$\Theta_{MG1} > \arctan(\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^A}}\frac{f_{L_2^B}}{f_{L_1^B}}\frac{\delta}{f_{Lobj}}) \tag{6.18}$$

L'inclinaison variable du faisceau d'excitation nécessite des lentilles intermédiaires dont les rayons[8] vérifient les inégalités suivantes afin de ne pas sectionner le flux d'excitation au cours du balayage de l'échantillon :

[6]Les trois premières inégalités traduisent directement les hypothèses qui ont permis de simplifier l'expression de F_{det} pour aboutir à une fonction de détection qui ne dépend plus que de très peu de paramètres du montage : l'ouverture numérique de l'objectif, l'ouverture du diaphragme de détection, le grandissement du microscope ainsi que les longeurs d'onde d'excitation et d'émission. On peut montrer que la précision sur la première équation n'est pas critique.

[7]L'amplitude angulaire d'inclinaison du faisceau est le double de l'amplitude optique d'inclinaison du miroir responsable de la déviation.

[8]le rayon considéré est en fait le rayon utile des lentilles, qui représente le plus souvent 90% de leur rayon géométrique

$$R_{L_2^B} > \delta \frac{f_{L_2^B}}{f_{Lobj}} + R_{Laser}\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^A}}\frac{f_{L_2^B}}{f_{L_1^B}} \quad (6.19)$$

$$R_{L_1^B} > \delta \frac{f_{L_2^B}}{f_{Lobj}} + R_{Laser}\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^A}} \quad (6.20)$$

$$R_{L_2^A} > \delta\frac{f_{L_2^B}}{f_{Lobj}}\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^B}} + R_{Laser}\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^A}} \quad (6.21)$$

$$R_{L_1^A} > \delta\frac{f_{L_2^B}}{f_{Lobj}}\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^B}} + R_{Laser} \quad (6.22)$$

Nous allons maintenant présenter le choix lentilles de notre montage à la lumière des critères présentés.

Choix des lentilles intermédiaires

Dans notre cas, le premier facteur limitant s'est trouvé être la taille des miroirs-galvanométriques. Avec $R_{MG1} = 1.5mm$ et $R_{MG2} = 2mm$ nous sommes limités à $R_{Laser} < 1mm$ (Eq. 6.15) et à $\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^A}} < 1.9$ (Eq. 6.16).

D'autre part nous utilisons préférentiellement un objectif Olympus achromatique 60x à immersion eau d'ouverture numérique 1. Ainsi sa distance focale vérifie $f_{Lobj} = 180mm/60 = 3mm$ et sa pupille arrière vérifie $R_{Lobj} = 3mm\tan(\arctan(1/1.33)) \sim 3.5mm$. Pour cet objectif et pour $R_{Laser} = 1mm$ l'équation (6.12) qui régit le grandissement des télescopes nous donne la contrainte suivante : $\frac{f_{L_2^A}}{f_{L_1^A}}\frac{f_{L_2^B}}{f_{L_1^B}} > 3.5$.

Un deuxième facteur limitant dans notre montage est la place disponible sur la table optique, l'ensemble des éléments optiques doit tenir dans un carré de 80 cm de côté. Ce critère donne trois nouvelles conditions : $2(f_{L_2^B} + f_{L_1^B}) + f_{Lobj} < 80cm$, $2(f_{L_2^A} + f_{L_1^A}) < 80cm$ et $2 * f_{Ldet} + f_{Lobj} < 80cm$.

Le choix de distances focales ($f_{L_1^A} = 75mm$, $f_{L_2^A} = 100mm$,$f_{L_1^B} = 75mm$, $f_{L_2^B} = 250mm$) nous a permis de vérifier les conditions développées en amont.

De plus le choix de rayons de lentilles ($R_{L_1^A} = R_{L_2^A} = 20mm$, $R_{L_1^B} = R_{L_2^B} = 20mm$) permet d'avoir une zone sondée dans l'échantillon dont la dimension latérale peut aller jusqu'à $200\mu m$ (cf Eq 6.19, 6.20, 6.21, 6.22).

Choix de la lentille de détection

Nous avons utilisé un doublet achromatique adapté à la longueur d'onde d'émission afin de minimiser les aberrations optiques introduites par la len-

tille. Le diamètre de lentille de détection est égal à $20mm$ ce qui est largement suffisant pour vérifier Eq. 6.13. Le choix le plus délicat concerne la distance focale de la lentille. Quand l'objectif et les lentilles intermédiaires sont définies, c'est f_{Ldet} qui détermine le grandissement du microscope (Eq. 6.10). Nous avons choisi de prendre f_{Ldet} égal à 500 mm, ainsi le grandissement du microscope est de $\alpha = 37.5$ pour un objectif de focale 3 mm. Ce choix aboutit à une unité optique radiale égale à $\frac{\lambda_{em}}{2\pi} \frac{\alpha}{NA_{Lobj}} \sim 3\ \mu\ m$ dans l'espace de détection. Ce qui permet d'utiliser des diaphragmes dont les diamètres sont compris dans la gamme $[10\mu m, 50\mu m]$ [9]. Avec une telle distance focale on parvient à avoir une unité optique axiale égale à $\frac{\lambda_{em}}{2\pi} \frac{\alpha^2}{{NA_{Lobj}}^2} \sim 110\ \mu\ m$ dans l'espace de détection, ce qui facilite le réglage de la position du diaphragme comme nous le verrons plus loin.

6.1.2 Choix et disposition des éléments optiques dans le microscope

Quand les distances focales des lentilles ont été définies, la position sur l'axe optique principal des lentilles, des miroirs-galvanométriques et du diaphragme de détection est donnée par les égalités suivantes :

$$\Delta_{pinhole} = f_{Ldet} \tag{6.23}$$
$$\Delta^A_{MG1} = f_{L^A_1} \tag{6.24}$$
$$\Delta^A_{MG2} = f_{L^A_2} \tag{6.25}$$
$$\Delta^B_{MG2} = f_{L^B_1} \tag{6.26}$$
$$\Delta^B_{Lobj} = f_{L^B_2} \tag{6.27}$$
$$f_{L^A_1} + f_{L^A_2} = \Delta^A_{inter} \tag{6.28}$$
$$f_{L^B_1} + f_{L^B_2} = \Delta^B_{inter} \tag{6.29}$$
$$L^A_1 \quad parallele \quad L^A_2 \tag{6.30}$$
$$L^B_1 \quad parallele \quad L^B_2 \tag{6.31}$$

Afin d'avoir un balayage suivant deux directions orthogonales dans l'échantillon, l'axe de rotation du miroir M_{G1} est parallèle au plan de la table optique et coupe le rayon provenant du filtre dichroïque avec un angle de 45 degrés, alors que l'axe de rotation du miroir M_{G2} est normal au plan

[9] Cette gamme d'ouverture se révèle être une gamme facilement accessible sur le marché de l'instrumentation et permet le confort d'avoir des diaphragmes bien plus grands que la longueur d'onde d'émission des marqueurs.

de la table. Une conséquence pratique de cette disposition des miroirs galvanométriques est que tous les éléments optiques du montage ont leur centre dans un plan parallèle à la table optique[10].

6.2 Protocole de réglage

Avant de décrire le protocole de réglage choisi nous voulons mettre en avant un propriété particulière du montage confocal à épi-illumination : aussi surprenant que cela puisse paraître de prime abord, la conjugaison confocale n'est pas modifiée par toute la partie du microscope entre le filtre dichroïque et l'échantillon ! Par exemple, dans le cas d'un montage à confocalité préalablement réglé, le déplacement d'une lentille des télescopes ou un changement d'objectif[11] ne modifie pas le fait que que les photons émis par la zone d'excitation forte de l'échantillon forment un faisceau passant par le centre du diaphragme de détection. Cette propriété d'**indépendance de la position du diaphragme de détection par rapport à la position de tous les éléments optiques entre le filtre dichroïque et l'échantillon** et typique du confocal en épi-illumination. Dans ce montage le trajet d'émission de fluorescence est forcément confondu avec le trajet d'excitation.

Il est donc possible de régler indépendamment trois ensembles d'éléments du montage repérés sur le schéma (6.1). Le bloc 1 assure la confocalité du microscope alors que les blocs 2 et 3 assurent un éclairement complet et uniforme de l'aperture arrière de l'objectif tout en permettant un balayage bidimensionnel de l'échantillon dans le plan focal de l'objectif.

6.2.1 Réglage de la confocalité

Le réglage de la "confocalité" du montage ne dépend que de la direction du faisceau laser en amont du dichroïque, de l'inclinaison et de la position du filtre dichroïque, de la lentille de détection et enfin de la position du diaphragme d'excitation. Ces élements constituent ce que nous appelons le bloc 1 du montage (Fig.6.2).

[10] J'ai trouvé cela pratique au moment de la construction du microscope, cela présente toutefois l'inconvénient de réduire la surface utile du miroir M_{G1} qui est déjà bien petit...

[11] La seule conséquence que peut avoir un changement d'objectif au niveau des éléments du montage est la modification de l'ouverture optimum du diaphragme de détection.

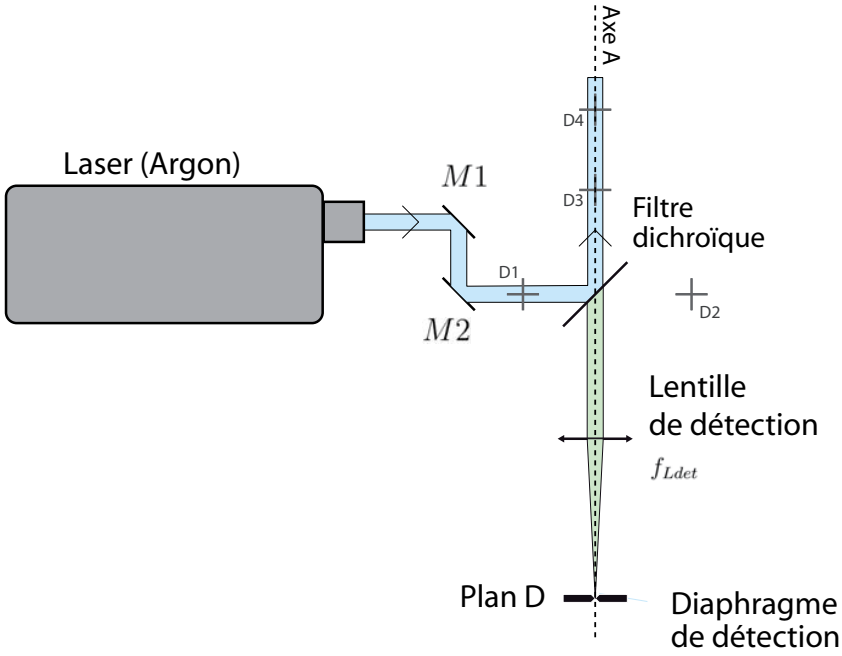


FIG. 6.2 – Bloc 1, partie du microscope qui permet le réglage de la confocalité.

Réglage grossier

L'introduction temporaire dans le montage de quatre diaphragmes ($D1$, $D2$, $D3$, $D4$) de faire un premier réglage grossier de la confocalité. Ces quatre diaphragmes sont montés sur des supports qui permettent d'avoir tous les centres de diaphragmes à la même hauteur et de placer facilement ces centres à la verticale des pas de vis de la table optique. Le faisceau laser est redirigé vers le dichroïque grâce aux miroirs $M1$ et $M2$. En jouant sur l'inclinaison et sur la positions des miroirs $M1$ et $M2$, la première étape du réglage grossier est de s'assurer que le faisceau laser suit l'axe défini par la droite reliant les deux diaphragmes $D1$ et $D2$. Les positions des diaphragmes $D1$ et $D2$ sur la table ne sont pas très importantes, c'est la hauteur identique de leur centre qui est ici utilisée. Quand le faisceau laser passe par les centres de D1 et de D2 nous sommes certains que le rayon en sortie de M1 est parallèle à la table optique. Nous plaçons ensuite le filtre dichroïque sur le trajet du rayon. La deuxième étape du réglage grossier, la plus importante , est de régler la position et l'inclinaison du filtre dichroïque afin d'obtenir un faisceau réfléchi par le dichroïque passant par le centre des diaphragmes $D3$ et $D4$. Ces diaphragmes sont placés à la verticale de trous taraudés d'une ligne de

la table optique où sont aussi disposés les supports de la lentille de détection et du diaphragme de détection, cette ligne suit l'axe A dans la figure 6.2. Les photons émis qui parviendront de la zone d'excitation maximale suivront exactement le même trajet que les photons d'excitation, ce réglage permet donc *in fine* de faire suivre à ces photons le trajet A avant d'arriver au dichroïque qu'ils traverseront en raison de leur longueur d'onde. La lentille de détection focalise ensuite ces photons vers son point focal, où doit être placé le centre du diaphragme de détection. Grâce au réglage grossier on s'assure que le trajet d'excitation passera par le miroir M_{G1} et surtout que le trajet retour sera focalisé près de l'axe A. Si on ne fait pas ce réglage, si par exemple on se contente de s'assurer que le laser passe par le miroir M_{G1}, on est souvent bloqué dans la suite du réglage car le trajet d'émission se trouve focalisé à plus de $20mm$ de l'axe A, en dehors de la course des platines de translation qui permettent le positionnement fin du diaphragme de détection.

La traversée du dichroïque entraîne un léger décallage du trajet des photons émis. En raison de ce décalage et de l'imprécision $+/-1\ mm$ sur la position du centre de la lentille de détection. La lentille de détection est montée sur un support permettant de la recentrer sur le trajet des photons émis et le diaphragme de détection est monté sur un système de translation suivant trois axes orthogonaux. La sous section suivante indique la technique utilisée pour positioner le diaphragme précisément.

Réglage fin

Grâce à une lentille[12] L temporairement introduite sur le trajet A le faisceau d'excitation est focalisé sur un échantillon fluorescent fin (Fig.6.2).

La lentille L focalise la lumière dans une zone d'excitation forte, c'est une ellipsoïde dont le grand axe est égal à $10\frac{\lambda}{2\pi}(\frac{f_L}{R_{laser}})^2$ et le petit axe est égal à $3.5\frac{\lambda}{2\pi}\frac{f_L}{R_{laser}}$ (chapitre 5). Utiliser une lentille de distance focale importante, par exemple de 75mm [13], rend plus aisé le positionnement de l'échantillon fin. La faible épaisseur par rapport à $10\frac{\lambda}{2\pi}(\frac{f_L}{R_{laser}})^2$ de l'échantillon assure alors que les photons émis proviennent bien de la zone d'excitation forte. Ces photons émis par l'échantillon traversent le dichroïque et sont focalisés par la lentille de détection. Il suffit alors de jouer sur les platines de translations afin de maximiser le signal enregistré en aval du diaphragme, quand le signal est maximum la position du centre du diaphragme de détection est telle que le montage est confocal.

[12] Afin de minimiser les aberrations, on utilise une lentille de type doublet achromatique.

[13] Dans le cas ($f_L = 75mm, \lambda = 500nm, R_{laser} = 1.$) on obtient une zone d'excitation forte dont l'extension suivant l'axe A vaut 4.5 mm

Il peut paraître étonnant que le réglage fait avec une lentille de focale importante soit suffisant pour régler finement la confocalité du montage. A vrai dire, j'ai été le premier surpris. J'avais introduit cette étape de réglage pour me faire la main sur le positionnement du diaphragme, j'utilisais une lentille de grande focale plutôt qu'un objectif de peur de salir mon unique et précieux objectif à eau. Quelle ne fut pas ma surprise d'observer que si je remplaçais la lentille de réglage L par mon objectif, la position optimale du diaphragme était déjà atteinte et que bouger le diaphragme à ce moment était plutôt néfaste qu'autre chose. En réfléchissant à l'influence de la focale de la lentille L nous allons élucider ce paradoxe.

Voici une interprétation simple du réglage de confocalité : l'ouverture du diaphragme de détection doit inclure l'image géomtrique de la zone d'excitation forte. Or cette image formée par le couple de lentille L_{det} et L ne dépend ni de la position de la lentille L, ni de sa distance focale f_L, ni même de l'inclinaison[14] de L par rapport à l'axe du laser ! Bien que les dimensions de la zone d'excitation forte soient liées à la focale de L, le grandissement latéral f_{Ldet}/f_L et axial f_{Ldet}/f_L font que l'image de la zone d'excitation forte ressemble à une ellipsoïde dont le grand axe κ_z et le petit axe κ_r vérifient :

$$\kappa_z = 10.14\frac{\lambda}{2\pi}(\frac{f_{det}}{R_{laser}})^2 \tag{6.32}$$

$$\kappa_r = 3.46\frac{\lambda}{2\pi}\frac{f_{det}}{R_{laser}} \tag{6.33}$$

La position du centre de ce volume ne dépend que de l'incidence du faisceau laser sur le dichroïque car le trajet d'émission suit le trajet d'excitation à rebours.

Ainsi, bien que la zone d'excitation forte soit conditionnée par la position et la focale de la lentille L, la position de son image et son extension en sont indépendantes ! Le réglage de la confocalité avec une lentille de grande focale permet donc de régler le système avec une précision optimale.

Tolérance sur la position du centre du diaphragme de détection

A partir du calcul de l'extension de l'image de la zone d'excitation forte, il est possible d'évaluer la tolérance[15] sur le centrage du diaphrage de

[14] Pour autant que l'inclinaison de la lentille n'induise pas d'aberrations optiques.

[15] Pour la tolérance en z nous avons considéré le deux cônes ayant pour base l'ouverture du diaphragme, pour hauteur $A\frac{f_{det}}{R_{laser}}$ et une symétrie de révolution autour de l'axe optique. Pour une source P placée dans l'échantillon, si son image P' est dans un des cônes évoqués, alors tous les rayons optiques qui quittent P et qui traversent l'objectif sont sûr de traverser le diaphragme de détection sans être bloqués.

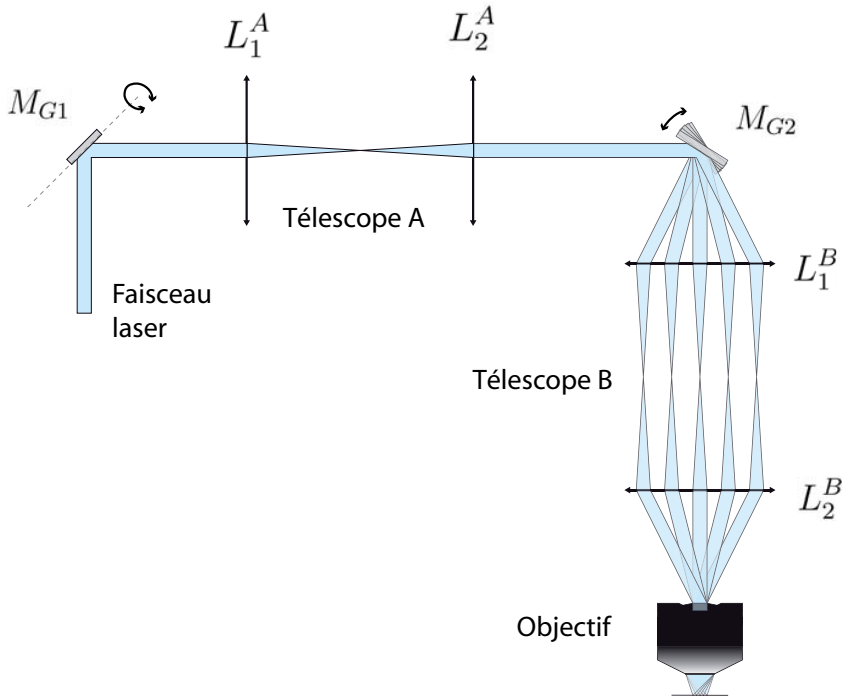


FIG. 6.3 – Blocs 2 et 3, télescopes qui permettent d'obtenir un balayage du plan focal de l'échantillon par la rotation des miroirs M_{G1} et M_{G2}.

détection de rayon d'ouverture égal à A :

$$tolerance_r = 2 \mid A - \kappa_r \mid \tag{6.34}$$

$$tolerance_z = 2 \mid A\frac{f_{det}}{R_{laser}} - \kappa_z \mid \tag{6.35}$$

Dans le cas d'un objectif dont l'illumination du plan arrière est plus grande que l'ouverture de la pupille arrière il faut substituer le rapport $\frac{f_{det}}{R_{laser}}$ par $\frac{\alpha}{NA_{Lobj}}$ dans les expressions précédentes[16].

6.2.2 Réglage des télescopes

Après avoir réglé la confocalité du montage, la lentille L est supprimée du montage et on règle les télescopes formés par couples de lentilles (L_1^A,L_2^A)

[16]pour ($NA_{Lobj} = 1, \alpha = 66, A = 30\mu m, \lambda = 500nm$) on obtient ($\kappa_r = 18\mu m, \kappa_z = 3.5mm, tolerance_r = 24\mu m, tolerance_z = 3mm$), on a une tolérance de 3mm pour un diaphragme de $30\mu m$! Dans ces conditions la tolérance sur la position en z du centre du diaphragme de détection est très grande comparée à l'ouverture du diaphragme.

et (L_1^A,L_2^A) (Fig.6.3). Le miroir MG_1 est placé sur le trajet du laser afin de renvoyer le laser vers le premier télescope ; après s'être assuré que le faisceau réfléchi par M_{G1} passe bien par le centre des lentilles du premier télescope, la première étape du réglage est de régler la distance et le parallélisme des lentilles L_1^A et L_2^A afin d'obtenir un balayage de l'échantillon dans le plan focal de l'objectif.

La deuxième étape du réglage consiste en une translation globale des deux lentilles afin d'assurer la conjugaison du centre du miroir M_{G1} avec le centre du miroir M_{G2}. Le réglage du deuxième télescope suit une démarche identique.

Tolérances dans le réglage des télescopes

Si le réglage de la planéité et de la distance entre lentilles vérifie les critères 6.6 à 6.9 alors la rotation des miroirs M_{G1} et M_{G2} entraîne un déplacement du maximum d'excitation dans le plan focal de l'objectif. Tout autre réglage des télescopes fait que le plan imagé par le microscope n'est plus le plan focal de l'objectif.

Si une lentille des télescopes est inclinée de l'angle ε alors le plan de balayage dans l'échantillon sera lui aussi incliné. Dans la pratique la grande taille des lentilles permet un réglage visuel de la planéité entre les lentilles, on obtient facilement $\varepsilon < 1^o$.

Pour régler la distance entre les lentilles je retire l'objectif du microscope, il est alors possible de localiser la distance à laquelle le faisceau émergeant du deuxième télescope converge. Dans la suite la distance la distance entre ce point de convergence et le plan focal de L_2^B et noté D_{div}. Pour un réglage idéal des télescopes, D_{div} tend vers l'infini et le plan imagé est le plan focal, dans le cas contraire le plan de balayage est translaté dans l'échantillon de la distance $-\frac{f_{obj}^2}{D_{div}}$. Dans la pratique nous réglons les télescopes pour que la distance D_{div} soit supérieure à 3 m, pour un objectif de focale de 3 mm nous sommes alors assurés que le plan de balayage est à moins de 3 μm du point focal de l'objectif.

La tolérance sur le réglage de conjugaison des miroirs et de la pupille arrière de l'objectif est définie par les relations 6.12, 6.15 et 6.16, en pratique il suffit de bien vérifier que le faisceau laser élargit éclaire complètement la pupille arrière de l'objectif durant la rotations des miroirs M_{G1} et M_{G2}.

6.2.3 Photographies du montage réel

Deux photographies du montage sont présentées dans la figure (6.4).

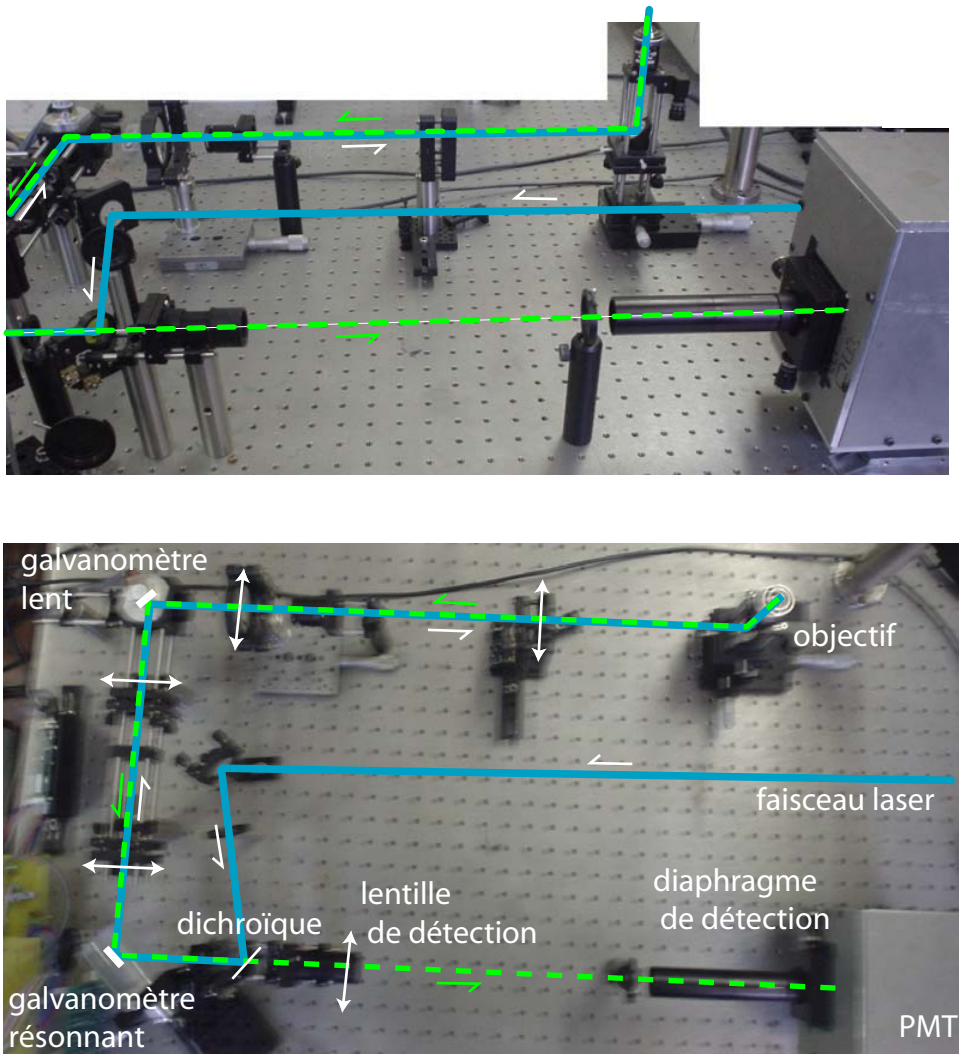


FIG. 6.4 – Vue de côté et de dessus du microscope confocal réalisé. Le trajet d'excitation a été retracé en bleu sur les photographies. Le trajet d'émission apparaît lui aussi, il été retracé en pointillés verts.

6.3 Montage électronique et acquisition numérique

Une fois la confocalité du montage réglée, les miroirs galvanométriques permettent de déplacer le volume sondé dans l'échantillon sans perturber la confocalité du montage. Afin de reconstituer des images bidimensionnelles de l'échantillon il est nécessaire d'effectuer deux tâches :

- Effectuer un balayage de l'échantillon sur N lignes parallèles. Ce balayage de Raster est possible si l'on synchrone le déplacement des deux galvanomètres.
- Effectuer une acquisition du signal de fluorescence synchronisée avec le balayage de Raster

Dans notre montage, nous avons repris le principe de Parker pour la synchronisation de l'acquisition et du balayage de Raster [1, 2] , nous avons toutefois utilisé des cartes d'instrumentation programmables afin d'obtenir une plus grande flexibilité d'utilisation du microscope. Il est ainsi possible de choisir le nombre de lignes balayées et obtenir des fréquences d'images supérieures à $200Hz$. Autre différence avec l'équipe de Parker : tout le code pour l'instrumentation du montage à réalisé par nos soins. Cela nous a permis de contrôler tout le microscope via une interface informatique unique, interface que nous avons tenté de rendre la plus simple possible. Nous avons de plus utilisé une carte oscilloscope pour l'acquisition des signaux alors qu'ils ont utilisé une carte d'acquisition vidéo.

Le schéma (6.5) décrit le montage complet et les blocs fonctionnels qui permettent de réaliser des images microscopiques à grande vitesse. Les deux sections suivantes décrivent plus en détail les solutions développées afin de réaliser le balayage de Raster de l'échantillon (avec les difficultés inhérentes à l'utilisation d'un galvanomètre résonnant) et l'acquisition synchronisée.

6.3.1 Synchronisation de la rotation des miroirs galvanométriques

Description des miroirs galvanométriques

La rotation du miroir galvanométrique M_{G1} induit un déplacement rectiligne du focus d'excitation dans le plan focal de l'objectif, dans la suite nous nommerons ces types de déplacement des *parcours de ligne*. De même la rotation du miroir galvanométrique M_{G2} induit un déplacement rectiligne dans le plan

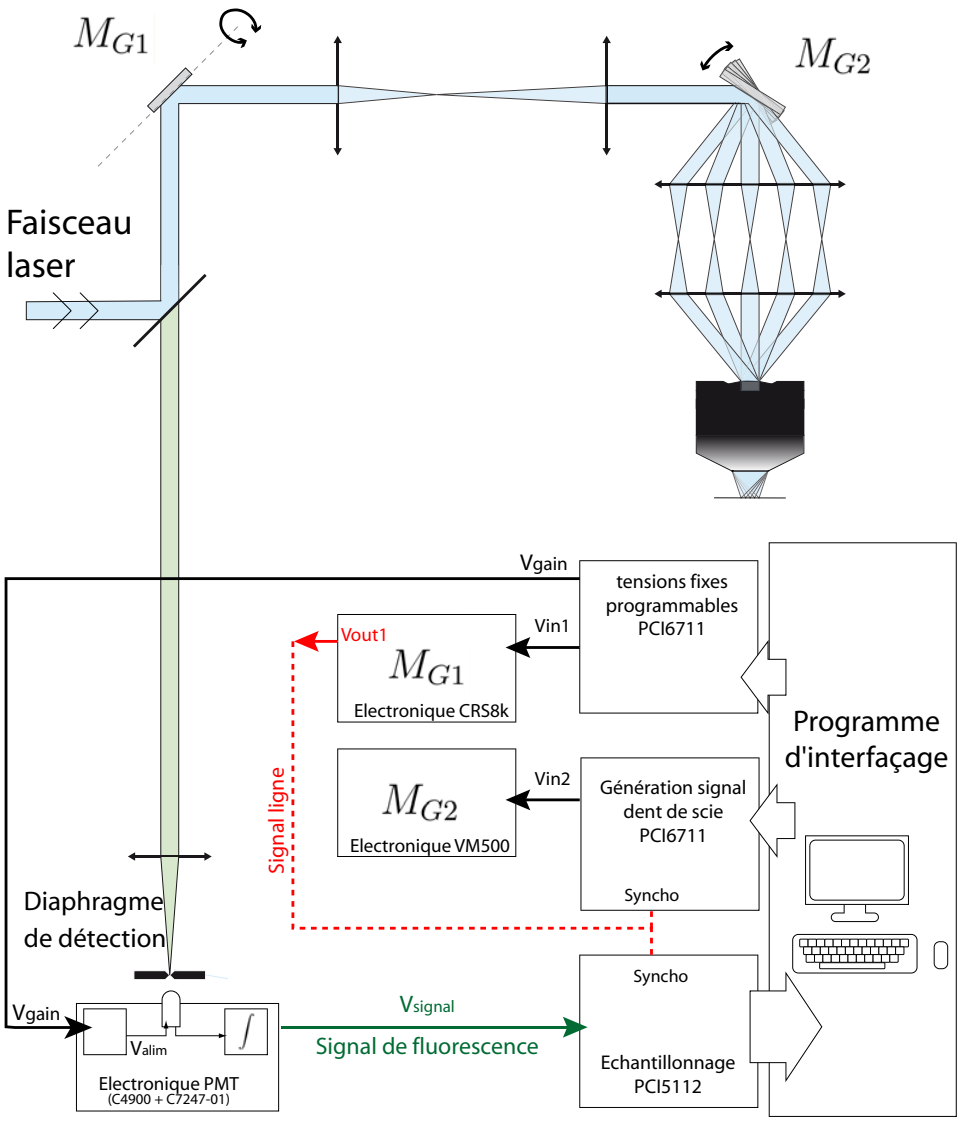


FIG. 6.5 – Schéma complet du microscope avec blocs électroniques.

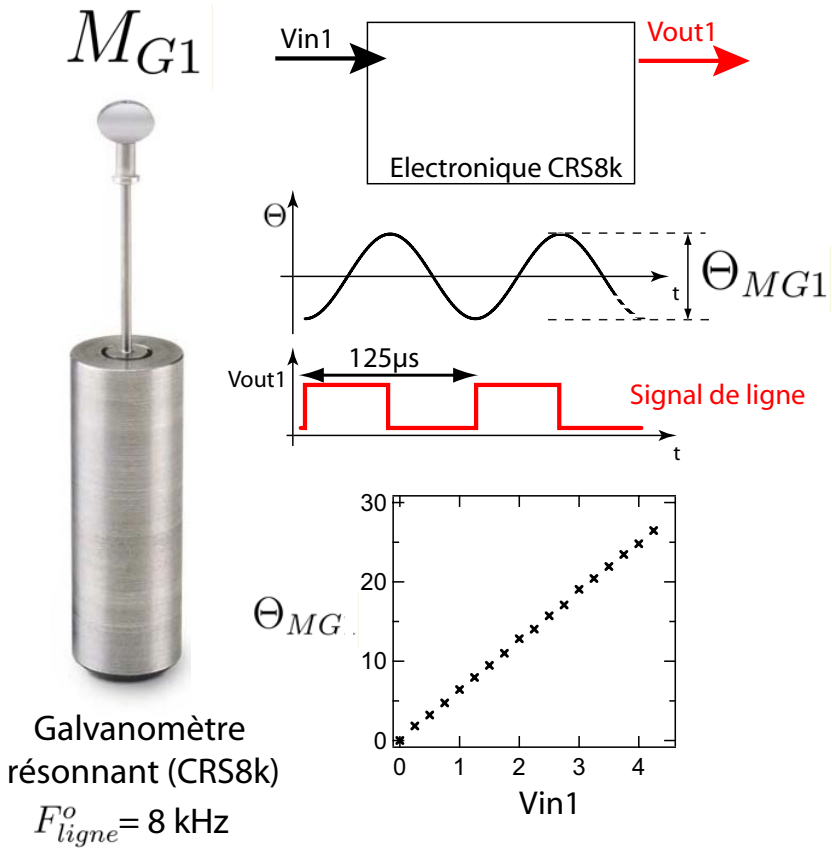


FIG. 6.6 – Miroir M_{G1}. Ce miroir est un galvanomètre résonnant (CRS8K) qui permet de balayer *in fine* des lignes du plan focal suivant un déplacement sinusoïdal à $8kHz$. L'électronique de ce système électro-mécanique permet de contrôler l'amplitude θ_{MG1} des oscillations angulaires. Le graphe en bas à droite de la figure a été obtenu en mesurant θ_{MG1} pour différentes tensions de consigne $Vin1$.

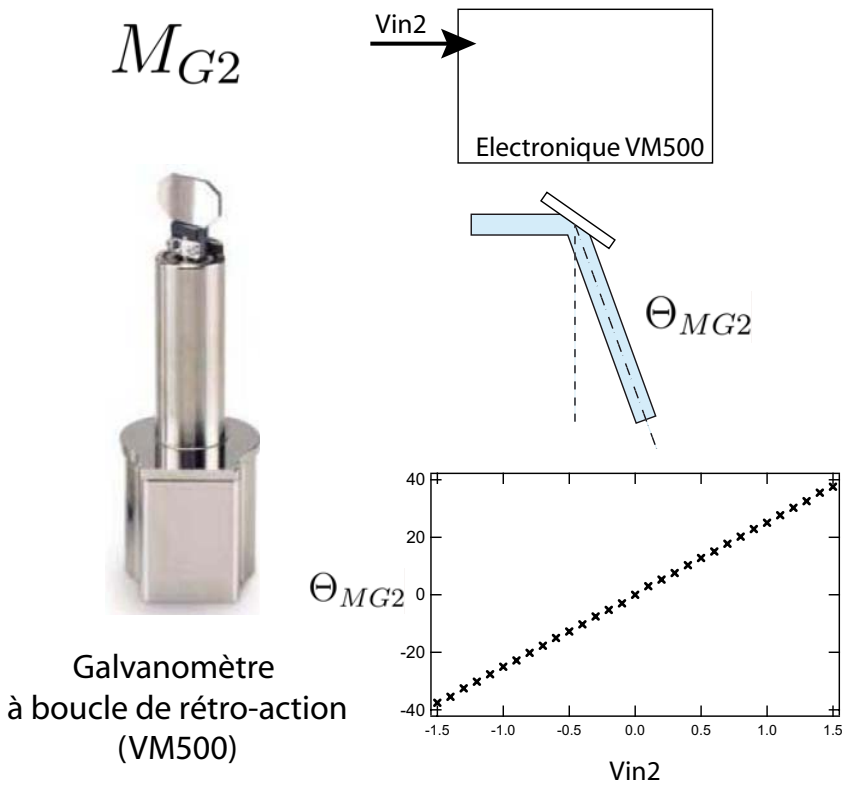


FIG. 6.7 – Miroir M_{G2}. Ce miroir est un galvanomètre à boucle de rétro-action (VM500) qui permet *in fine* de fixer les positions et l'espacement des lignes balayées dans le plan focal grâce au miroir M_{G1}. L'électronique de ce système électro-mécanique permet de contrôler l'angle θ_{MG2} via la tension de consigne $Vin2$ avec une résolution pouvant atteindre le micro-radian. Le graphe en bas à droite de la figure a été obtenu en mesurant θ_{MG2} pour différentes tensions de consigne $Vin1$.

focal de l'objectif, déplacement que nous nommerons parcours de colonne ou encore un changement de ligne pour des déplacements rapides et finis. Afin d'obtenir une fréquence d'image importante, il est nécessaire d'avoir un parcours de ligne beaucoup plus rapide que le parcours des colonnes. Ainsi pour obtenir une séquences d'image de 200 lignes à une fréquence de 30 images par secondes, il est nécessaire d'avoir un balayage des lignes à une fréquence supérieure à 6kHz et un balayage des colones ayant une fréquence supérieure à 30Hz. Afin de vérifier ces conditions, les miroirs galvanométriques M_{G1} et M_{G2} reposent sur des technologies différentes : M_{G1} est un miroir galvanométrique résonnant alors que M_{G2} est un miroir galvanométrique à angle imposé par boucle de rétro-action.

Le miroir **galvanométrique résonnant** est constitué d'un système électromécanique entraînant un déplacement angulaire sinusoïdal du miroir à une fréquence F^o_{ligne} de plusieurs kHz, dans le cas du matériel choisi la fréquence d'oscillation angulaire du miroir M_{G1} est proche de 8Khz (Fig6.6). La fréquence de l'oscillation est fixée par la résonnance mécanique du système et ne peut malheureusement pas être contrôlée par l'utilisateur ; par contre l'amplitude du déplacement angulaire est contrôlée par l'application d'une tension continue sur une des entrées du miroir galvanométrique. La partie électronique et informatique du microscope est conçue de manière à ce que l'utilisateur aie directement accès au réglage de l'amplitude du déplacement sinusoïdal via l'interface graphique du progamme de controle.

Le miroir **galvanométrique à** angle imposé par **boucle de rétro-action** est un système électromécanique qui permet de connaître à tout instant l'angle du miroir M_{G2} mais surtout de contrôler la rotation du miroir (Fig6.7). Une consigne en tension permet d'imposer un angle donné au miroir M_{G2}, le système de régulation intégré est si performant que la résolution en position de cet appareil est de l'ordre du microradian. Pour de grands déplacements angulaires, ce type de système ne permet pas actuellement d'effectuer des balayages à des fréquences supérieures à 1kHz c'est pourquoi nous l'utilisons pour le changement de ligne mais pas pour le balayage des lignes.

Afin de faire le lien entre l'électronique des galvanomètres et les cartes d'instrumentation utilisées nous avons réalisé des circuits électroniques simples grâce au programme de tracé PCB Metor Graphics.

Signal de ligne

Le miroir galvanométrique résonnant possède l'inconvénient de présenter des fluctuations dans sa fréquence de balayage. Le temps nécessaire pour parcourir une ligne fluctue, la grandeur relative des fluctuations est proche de 0.5%. Toutefois le système électronique intégré dans le miroir gal-

vanométrique résonnant propose une sortie de tension numérique renseignant en temps réel le sens de rotation du miroir (Fig.**??**). Ce signal que nous appellerons dans la suite *signal de ligne* va nous permettre de synchroniser le saut de ligne avec le balayage des lignes et de synchroniser l'acquisition numérique du signal avec le balayage des lignes de façon a pouvoir reconstituer des images réalistes de l'échantillon.

Balayage de Raster par synchronisation des miroirs

La synchronisation du balayage des lignes et du saut de ligne se fait en modifiant l'inclinaison du miroir M_{G2} à chaque front descendant du signal de ligne. Pour ce faire nous utilisons une carte programmable de génération de tension dont la sortie tension est reliée à l'entrée de consigne du miroir galvanométrique à angle imposé par boucle de rétro-action (National Instruments). Cette carte électronique comporte une mémoire programmable dans laquelle peut être stocké un tableau cyclique de valeurs de tension. La tension en sortie analogique correspond toujours à une valeur dans le tableau cyclique en mémoire et la carte est paramétrée pour qu'à chaque front descendant du *signal de ligne* la tension en sortie soit rafraîchie à la valeur suivante dans le tableau cylclique. Cette synchronisation de la carte avec le *signal ligne* est possible car une des entrées logiques de la carte est connectée au *signal de ligne*. Afin d'obtenir un balayage de Raster de l'échantillon les valeurs du tableau sont telles que le mouvement angulaire résultant au niveau de M_{G2} suive une fonction en forme de dent de scie (Fig.6.8). Pour l'utilisateur du microscope le réglage de ce balayage se fait au travers de trois paramètres accessibles via l'interface du progamme : l'amplitude totale θ_{MG2} de l'exploration angulaire de M_{G2}, le nombre de lignes N_{lignes} par image et la fraction φ de temps consacré au retour. De ces choix découlent la fréquence moyenne d'image obtenues par seconde, F_{img} :

$$F_{img} = \frac{F^o_{ligne}}{N_{lignes}(1+\varphi)} \tag{6.36}$$

où F^o_{ligne} est la fréquence de balayage du galvanomètre résonnant, fréquence non ajustable par l'utilisateur, et ϕ la fraction de temps consacrée au retour.

6.3.2 Détection et acquisition synchronisée avec le balayage de l'échantillon

Signal de fluorescence

Les marqueurs fluorescents sont excités grâce à un laser à gaz Argon. L'avantage principal de ce type d'appareil est la possibilité offerte de changer

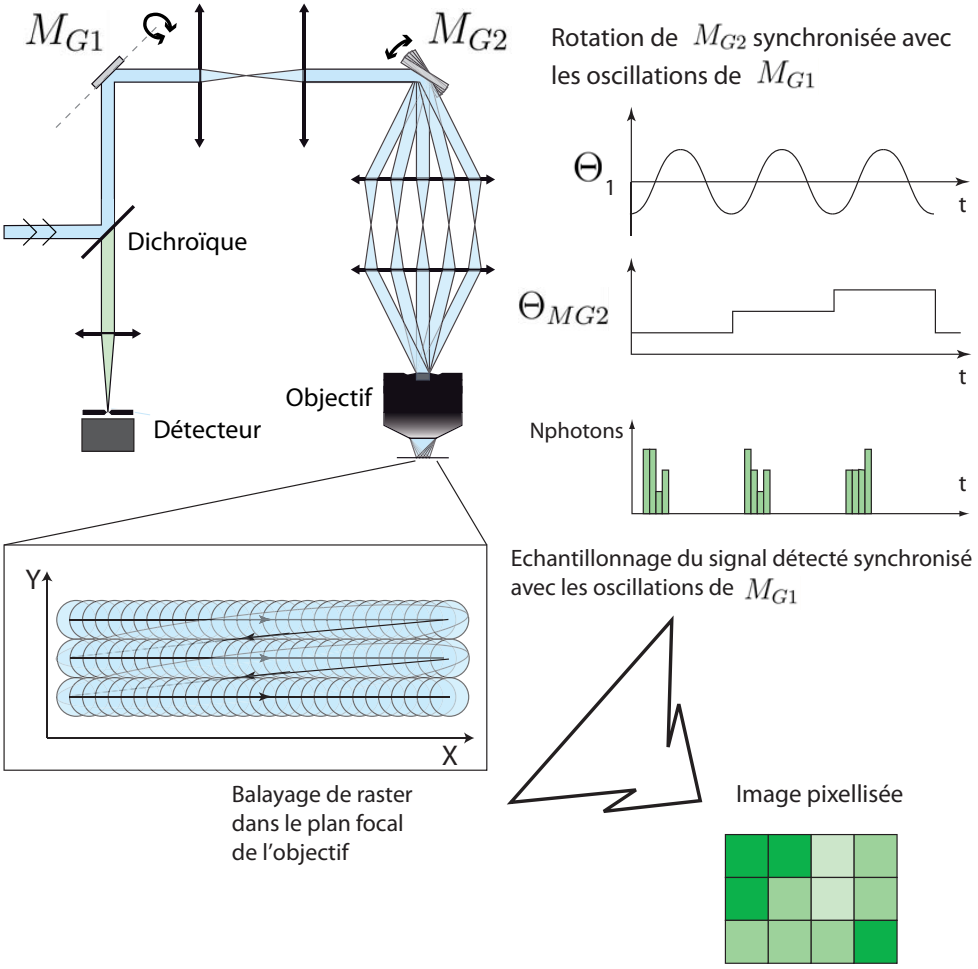


FIG. 6.8 – Balayage de Raster du plan focal de l'objectif obtenu par synchronisation de la rotation des miroirs M_{G1} et M_{G2}. Obtention d'une image microscopique par l'échantillonnage du signal de fluorescence détecté synchronisé avec le balayage de Raster de l'échantillon.

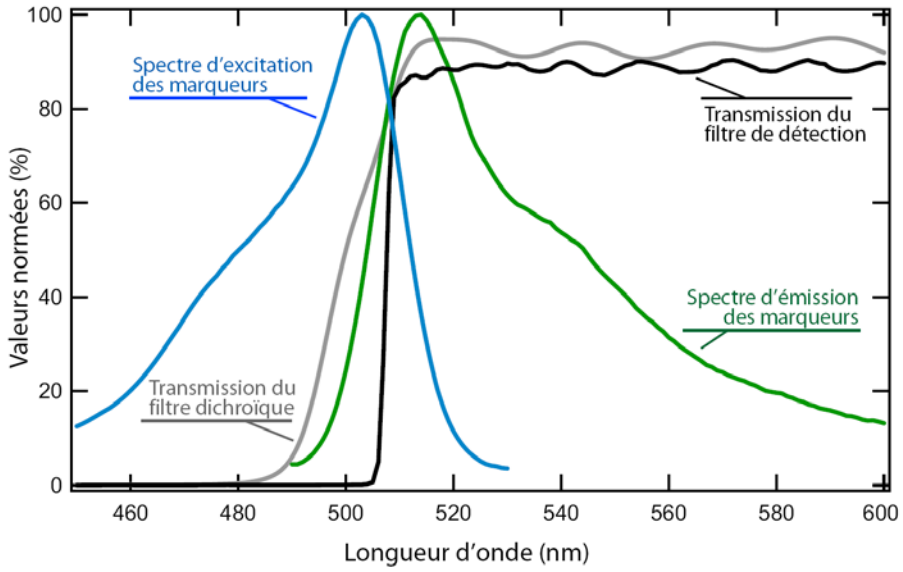


FIG. 6.9 – Spectres d'excitation et d'émission du marqueur fluorescent "yellow-green fluorospheres" (Invitrogen). Spectre de transmission du filtre dichroïque et du filtre de détection adapté (Omega Optical).

la longueur d'onde d'émission en jouant sur la longueur de la cavité principale du laser. De plus grâce à une cavité secondaire il est possible de sélectionner une seule raie d'émission en sortie de la cavité principale.

Il est nécessaire d'adapter la longueur d'onde en sortie du laser en fonction au spectre d'excitation des marqueurs choisis, d'autre part il est aussi nécessaire d'utiliser un filtre dichroïque et le filtre d'émission adaptés au spectre d'émission des marqueurs (Fig.6.9). Pour exciter les marqueurs présentés dans la figure nous utilisons la raie d'émission à $488nm$. Un critère limitant dans l'observation de marqueurs fluorescent est l'apparition des phénomènes de saturation et de photo-blanchiment pour des puissances d'excitation trop élevées[3]. Il est malheureusement difficile de prévoir à priori la puissance de laser à partir de laquelle apparaissent ces phénonèmes, dans la pratique nous avons remarqué que pour les marqueurs fluorospheres utilisés, ces phénomènes n'apparaissaient pas de manière notable lorque l'on se limite à des puissances de laser de l'ordre du milliWatt pour un objectif ($NA_{obj} = 1, f_{Lobj} = 3mm$).

Pour un échantillon uniformément marqué par des molécules fluorescentes de section efficace σ et une concentration volumique $C_{marqueur}$ de marqueurs le signal détecté en aval du diaphragme de détection est de l'ordre de :

$$P_{detect} \approx P_{laser}\ C_{marqueur}\ \sigma\ 20 * 3.5^2\ (\frac{\lambda_{ex}}{2\pi\ NA_{Lobj}})^3 \tag{6.37}$$

où P_{laser} est la puissance du laser.

En pratique je n'ai malheureusement jamais réussi à trouver des données sur les sections efficaces des marqueurs fluorescents. La technique habituelle des expérimentateurs consiste à essayer différentes concentrations de marqueurs et différentes puissances lasers jusqu'à ce qu'ils obtiennent des images convenables avec leur microscope.

Détecteur

Le signal optique en aval du diaphragme de détection est typiquement compris entre $1pW$ et $1nW$, d'autre part la fréquence d'échantillonnage nécessaire à l'acquisition du signal avec un balayage rapide des lignes est de l'ordre de 10 MHz. Cette contrainte d'échantillonnage rapide nous a conduit à réaliser un montage de détection composé d'un tube photomultiplicateur, d'un générateur de haute tension programmable et d'un bloc électronique permettant un prétraitement électronique du signal émergeant du tube photomultiplicateur (Fig.6.10).

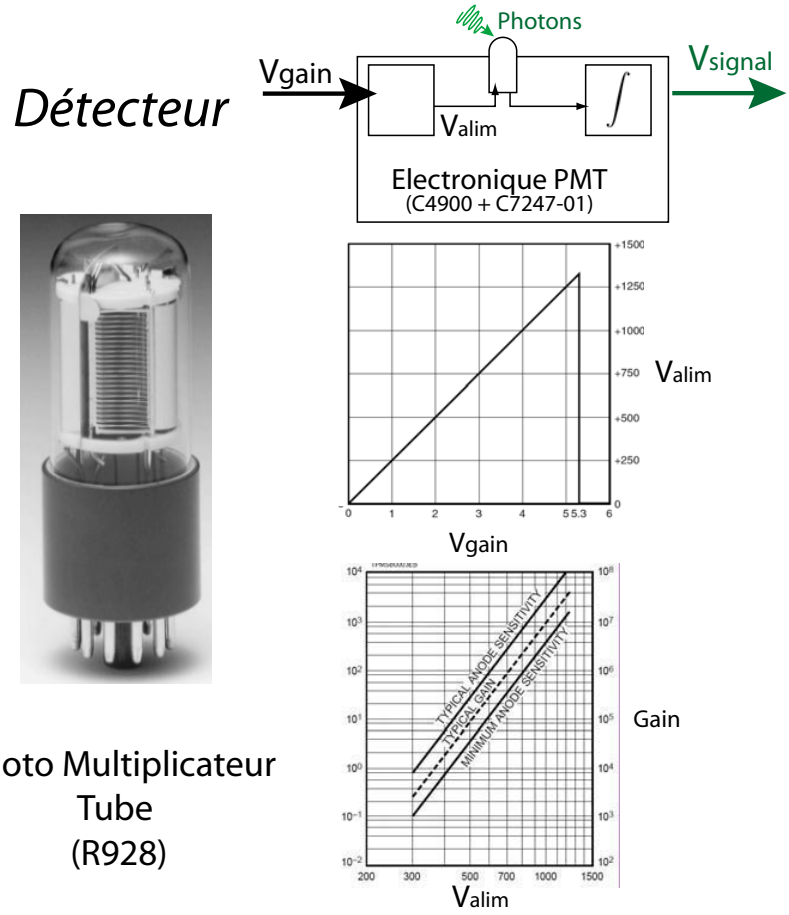


FIG. 6.10 – Photodétecteur (R928, Hamamatsu) et montage utilisé pour la détection du signal de fluorescence.

Le tube du photomultiplicateur libère pour chaque photon détecté un pulse de courant[17]. Le nombre moyen d'électrons libérés par photon détecté est proportionnel à $(V_{HV})^K$, où V_{HV} est la tension imposée aux entrées du tube de photodétection et K le nombre de dynistor du tube. La tension V_{HV}, comprise entre 100 Volts et 1100 Volts, est fournie au tube par un générateur de tension ayant la particularité de posséder une entrée analogique V_{gain} via laquelle la tension V_{HV} peut être contrôlée.

En sortie du tube de détection, le bloc électronique du détecteur permet de convertir le courant électrique émis par le tube en une tension V_{signal} avec un gain de 10^5 V/A et une impédence de sortie nulle. [18]. Pour un photon isolé détecté par le tube photomultiplicateur le pulse de courant en sortie du tube est de l'ordre de 10ns, grâce au bloc électronique en sortie du tube le pulse de courant induit au niveau de V_{signal} un pulse en tension dont la largeur temporelle est de l'ordre de $200ns$ [19]. Cet élargissement temporel des pulses permet d'avoir une tension V_{signal} dont la hauteur à tout instant t traduit le nombre de photons détectés par le tube photomultiplicateur sur la durée [t-200ns,t][20]. Via la tension de contrôle V_{gain} directement réglable à partir

[17]La probabilité de détection d'un photon est par le rendement quantique du tube photomultiplicateur dont la valeur est donnée par le constructeur. Dans notre cas le rendement quantique du tube choisi est de l'ordre de 70% pour des photons de longueur d'onde est proche de 500 nm

[18]Pour une tension $V_{HV} = 400V$ le gain moyen du tube est proche de 10^5 electrons par photon, dans ce cas un flux optique de 1pW constitué de photons de 4eV induit un courant moyen en sortie du tube de $\frac{10^{-12}}{4}10^5 = 25\mu A$, la valeur moyenne du signal en sortie du détecteur est alors égale à 2.5V.

[19]Cette propriété est obtenue par l'utilisation d'un filtre intégrateur dont la fréquence caractéristique est 5MHz

[20]Il existe en fait une autre manière de quantifier le flux de photon à partir des pulses de courant émis par le tube à chaque photon détecté : la technique de comptage de photons. Dans cette technique la tension V_{HV} est réglée à son maximum et un compteur de pulses remis à zéro pour chaque nouveau pixel compte le nombre de photons reçus. Cette technique est limitée par la largeur temporelle des pulses de courant, la largeur temporelle des pulses est de l'ordre de $50ns$. Or pour faire de l'imagerie confocale rapide il est nécessaire d'avoir des durées d'intégration par pixel de l'ordre de 100ns, la méthode de comptage utilisée avec ce tube ne donnerait un maximum de 2 photons comptés par pixel ! Les images ainsi obtenues seraient inexploitables car très peu contrastées. Même pour des tubes photomultiplicateurs dont la largeur temporelle des pulses de courant serait plus faible, les limitations technologiques des compteurs de pulses rentrent en compte et rendent à l'heure actuelle cette méthode de détection peu pratique pour l'imagerie confocale rapide. Compter les photons est par contre adapté pour des microscopes confocaux lents, où on fait typiquement une image $200x200$ toute les deux secondes. On peut alors avoir jusqu'à 1000 photons par pixel et avoir des images très contrastées. Le système de comptage de photons permet d'autre part d'améliorer grandement le rapport signal sur bruit, il est de plus facile à réaliser d'un point de vue instrumental, c'est bien dommage que cette technique soit actuellement utilisable que dans des confocaux à balayage lent.

de l'interface informatique du microscope, l'utilisateur du microscope peut régler le gain du détecteur.

Système d'acquisition numérique des lignes synchronisé avec le balayage des lignes

La tension en sortie du détecteur V_{signal} est échantillonnée grâce à une carte programmable comportant une mémoire de stockage des données numérisées. La mémoire de stockage de la carte peut être organisée en blocs successifs de N_{Col} éléments, ces blocs mémoires seront appelés dans la suite des *blocs lignes*. Le nombre $Ncol$ ainsi que la fréquence d'échantillonnage F_{Pixel} sont des paramètres programmables avec le départ de l'acquisition. Le remplissage de chaque *bloc ligne* est synchronisé sur le *signal de ligne*. A chaque front montant du *signal de ligne* la tension V_{signal} est échantillonnée $Ncol$ fois à la fréquence F_{Pixel}, le bloc de donnnées numériques correspondant est enregistré dans un *bloc ligne*, au front montant suivant les nouvelles données numérisées seront enregistrées dans le *bloc ligne* suivant. Il est possible d'introduire un délai réglable, T_{delai} entre le front montant du signal et l'échantillonnage des $Ncol$ valeurs de la tension. Grâce à ce delais il est possible de choisir la position des instants d'échantillonnage à l'intérieur de la ligne balayée (Fig.6.8). En prenant des valeurs $(N_{Col}, F_{Pixel}, T_{delai})$ vérifiant l'inégalité suivante on peut s'assurer que les valeurs de chaque bloc ligne correspondent à des échantillonnages faits sur la même ligne.

$$T_{delai} + \frac{N_{Col}}{F_{Pixel}} < \frac{1}{2F^o_{ligne}} \tag{6.38}$$

L'utilisation du miroir galvanométrique résonnant dans le balayage des lignes entraîne malheureusement une vitesse de déplacement angulaire variable au cours du balayage de chaque ligne ; la vitesse de balayage est maximale au centre de la ligne et s'annule en extrémité de ligne. Par conséquent le signal V_{signal} correspond à un volume sondé de dimension variable dans l'échantillon. En choisissant les valeurs $(N_{Col}, F_{Pixel}, T_{delai})$ de manière à vérifier les inégalités suivantes on s'assure que les fluctuations du volume associé à chaque pixel sont inférieures à 30%. Si ces inégalités ne sont pas respectées les images sont déformées.

Reconstitution des séquences d'images

Une fois que le système de saut de ligne et que l'acquisition sont lancés par l'utilisateur en cliquant sur un bouton de l'interface informatique, la carte d'acquisition et la carte contrôlant le saut de ligne attendent le premier pulse du *signal de ligne* pour s'activer. Grâce à cette synchronisation

électronique, le premier bloc mémoire de la carte d'acquisition correspond bien à la valeur minimale de l'angle de M_{G2}, il suffit donc d'assembler les N_{lignes} premiers blocs mémoires de la carte d'acquisision sous la forme d'une image de N_{Col} colonnes et de N_{lignes} lignes afin d'avoir une image microscopique de l'échantillon. Il est même possible d'utiliser le signal de ligne et un diviseur de fréquence de facteur $N_{Col} * N_{lignes} * (1 + \phi)$ pour synchroniser un déplacement en z de l'objectif avec chaque nouvelle image. J'ai réalisé un tel système avec une platine PI, grâce à cela le système microscope peut imager des séquences de tranches d'échantillon régulièrement espacées en z. Cette synchronisation du balayage et d'un déplacement en z ouvre la porte à des reconstitutions $3D$ des échantillons.

Choix des paramètres pour avoir une image réaliste

Le signal mesuré dans chaque pixel traduit la concentration en marqueurs dans un volume de l'échantillon appelé *vessel* [3]. Ce vessel correspond au volume balayé par la zone d'excitation forte pendant la durée $1/F_{integ}$ où F_{integ} et la fréquence typique d'intégration du système formé par le détecteur et la carte d'acquisition. Dans notre montage F_{integ} est déterminé par le module électronique du détecteur, elle vaut 5Mhz. La profondeur du *vessel* d_Z suivant l'axe optique de l'objectif et son extension perpendiculairement au balayage des lignes d_Y sont indépendants du balayage et déterminés par l'objectif utilisé :

$$d_Z \sim \frac{20}{2\pi}\frac{\lambda}{NA_{obj}^2} \tag{6.39}$$

$$d_Y \sim \frac{7}{2\pi}\frac{\lambda}{NA_{obj}} \tag{6.40}$$

En raison du balayage continu des lignes à la vitesse angulaire typique de $2\Theta_{MG1}F^o_{ligne}$, l'extension du *vessel* d_X suivant le balayage des lignes dépend des paramètres de balayages et de la :

$$d_X \sim d_Y + f_{obj}\Theta_{MG1}\frac{f_{L_1^A}}{f_{L_2^A}}\frac{f_{L_1^B}}{f_{L_2^B}}\frac{2F^o_{ligne}}{F_{integ}} \tag{6.41}$$

La distance entre les centres des pixels successifs suivant une ligne, δ_X, et une colonne, δ_Y, sont elles conditionnées par la fréquence d'échantillonnage F_{pixel}, le nombre de lignes par image N_{lignes} et l'amplitude angulaire totale du déplacement du miroir M_{G2}, Θ_{MG2} :

$$\delta_X = f_{obj}\Theta_{MG1}\frac{f_{L_1^A}}{f_{L_2^A}}\frac{f_{L_1^B}}{f_{L_2^B}}\frac{2F^o_{ligne}}{F_{pixel}} \tag{6.42}$$

$$\delta_Y = f_{obj}\frac{\Theta_{MG2}}{N_{lignes}}\frac{f_{L_1^B}}{f_{L_2^B}} \tag{6.43}$$

Afin d'avoir une zone sondée de l'échantillon qui soit entièrement pavée de vessels il est nécessaire de vérifier $\delta_X < d_X$ et $\delta_Y < d_Y$. La deuxième inégalité impose alors $F_{pixel} > F_{integ}$ et la première inégalité nécessite d'avoir un miroir galvanométrique à boucle de rétroaction capable d'une précision angulaire supérieure à $\frac{7}{2\pi}\frac{f_{L_2^B}}{f_{L_1^B}}\frac{\lambda}{R_{Lobj}}$ où R_{Lobj} est le rayon de la pupille arrière de l'objectif.[21]

Dans le plan focal la dimension de la zone sondée est de $N_{col}\delta_X$ suivant l'axe de balayage rapide et de $N_{lignes}\delta_Y = f_{obj}\Theta_{MG2}\frac{f_{L_1^B}}{f_{L_2^B}}$ suivant l'axe perpendiculaire au balayage rapide. L'épaisseur de la zone sondée est égale à d_Z.

6.3.3 Interface informatique

L'utilisateur du microscope n'a besoin que d'allumer l'alimentation du système, d'allumer son ordinateur et lancer l'interface informatique que nous avons développée en langage C avec l'environnement de développement Labwindows. Grâce à cette interface (Fig.6.11), l'utilisateur peut tout d'abord régler simplement le nombre de lignes et de colonnes de l'image à prendre ainsi que la fréquence d'acquisition des pixels. Il peut aussi régler les amplitudes d'exploration latérales du balayage dans le plan focal. Il lui suffit alors de cliquer sur le bouton séquence pour acquérir une suite d'images qui respectent les réglages précédent. Les images acquises sont affichées à l'écran et il est possible d'enregistrer la séquence sur le disque dur. En cochant un simple bouton l'acquisition devient continue et l'image affichée à l'écran est rafraîchie toutes les secondes, cela s'avère particulièrement utile pour les réglages. Pour que chaque figure de la séquence corresponde à une profondeur différente il suffit de mettre sous tension le système de translation PI et de le programmer via une autre interface pour le déplacement souhaité, un saut en z sera déclenché à chaque nouvelle image de la séquence.

[21] Pour un objectif d'ouverture numérique 1 et de distance focale de 3mm le rayon de la pupille arrière est proche de 3.5mm ; la précision angulaire nécessaire est alors de 5.3 10^{-3} radians dans notre montage pour une longueur d'onde de $500nm$. Les galvanomètres à boucle de rétro-action peuvent atteindre des résolutions allant jusqu'au microradian. En fait il faut surtout faire attention à ce que le signal de consigne soit le moins bruité possible, ce qui impose une bonne conception du montage électronique et bon blindage des câbles.

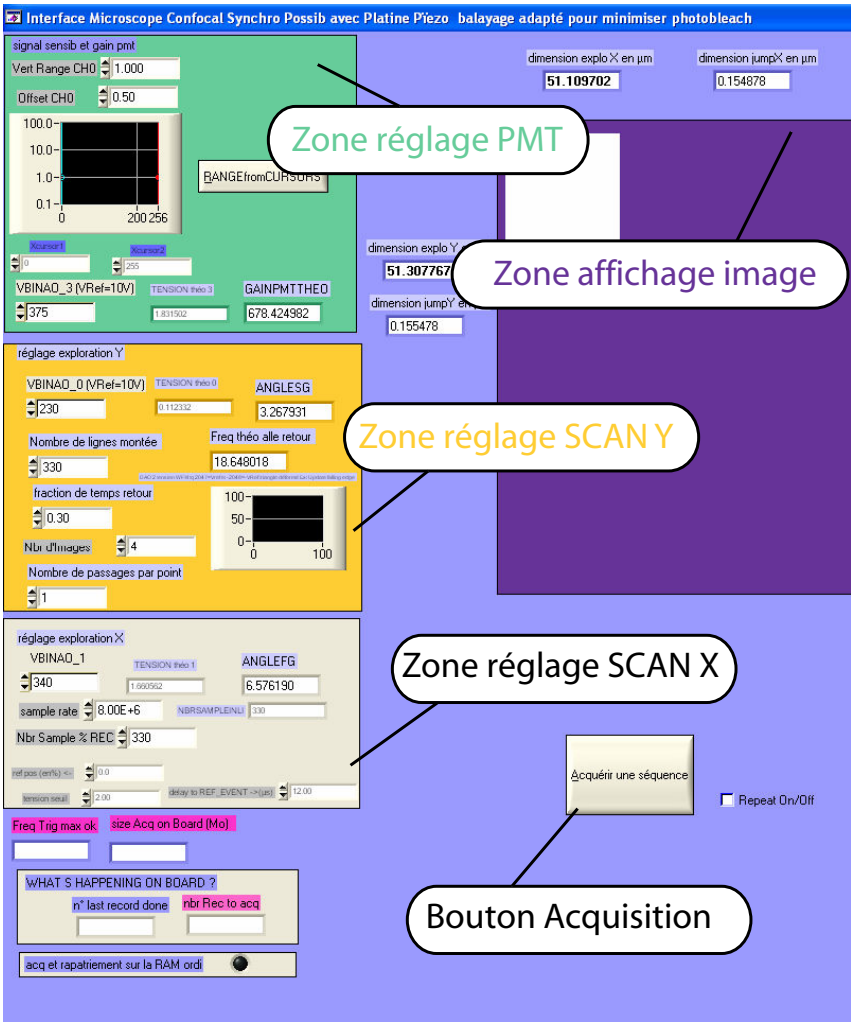


FIG. 6.11 – Interface visuelle proposée à l'utilisateur. A partir d'un seul ordinateur et de cette fenêtre nous sommes parvenus à rassembler toutes les commandes nécessaires au fonctionnement du microscope

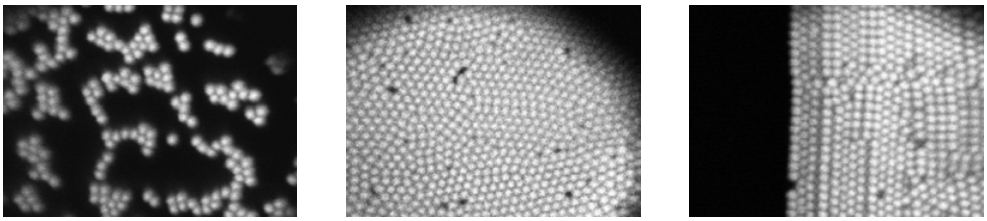


FIG. 6.12 – Images d'une suspension monodisperse de spheres de $1\mu m$ de diamètre après séchage sur une lamelle de verre (excitation $488nm$, objectif $60X$ à immersion à eau, d'ouverture numérique de 1).

Dans la section suivante sont présentées quelques images obtenues avec des suspensions de particules monodisperses de polystyrène uniformément marquées en volume par de la fluorescéine.

6.4 Premières images obtenues avec le microscope confocal réalisé

6.4.1 Images d'une suspension colloïdale séchée

Nous avons laissé sécher une suspension de sphères colloïdales monodisperses sur un substrat hydrophile. Les sphères de polystyrène utilisées ont un diamètre de $1\mu m$ et sont uniformément traitées avec des molécules fluorescentes (FluoSpheres-yellow green, Molecular Probes). Grâce au microscope confocal, nous avons observé le résultat du séchage en diverses zones du substrat (excitation $488nm$, objectif $60X$ à immersion à eau, d'ouverture numérique de 1).

Les images présentées en figure (6.12) sont constituées de 350 lignes. Ainsi, il a suffi de $44ms$ pour réaliser chaque image. On peut noter que les images sont légèrement dilatées horizontalement sur leur bordures droites et gauches. Cette déformation est due au balayage sinusoïdal des lignes par le galvanomètre résonnant. Il suffit de se régler l'acquisition pour ne retenir que la zone quasi-linéaire du balayage des lignes pour obtenir des images où la déformation est négligeable[22] (6.13). Sous l'effet des forces capillaires, les colloïdes monodisperses s'auto-organisent et forment des cristalllites au cours du séchage. L'image présentée en figure (6.13) permet de constater que la résolution latérale du microscope est suffisante pour étudier des sphères

[22]De plus les déformations étant de nature sinusoïdale connue, les images peuvent aussi être numériquement retraitées pour compenser l'étirement latéral

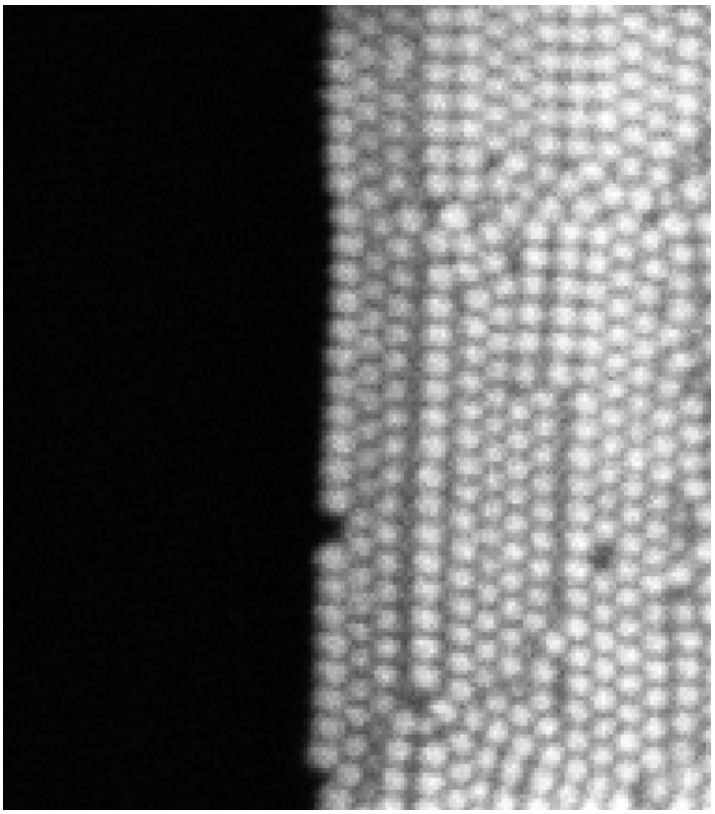


FIG. 6.13 – Bordure d'une zone d'empilement compact des sphères monodisperses de $1\mu m$ de diamètre (excitation $488nm$, objectif $60X$ à immersion à eau, d'ouverture numérique de 1).

de 1 micron de diamètre (excitation $488nm$, objectif $60X$ à immersion à eau, d'ouverture numérique de 1).

Par ailleurs, on peut noter que les images sont complètement noires dans les points de l'échantillon dépourvus de marqueurs. Le contraste entre ces zones noires et les zones de fluorescence traduit la bonne sensibilité du système de détection ainsi que l'efficacité du rejet des photons à la longueur d'onde de excitation.

6.4.2 Séquences d'images avec translation axiale

Afin de pouvoir imager des tranches à différentes profondeurs, nous avons introduit dans le montage une platine de translation piezo-électrique à résolution nanométrique (P-733, Physik Instrumente) de manière à pouvoir translater finement l'objectif perpendiculairement à la surface imagée. Le programme du microscope a été amélioré afin de lui permettre de communiquer avec l'électronique de contrôle de la platine (E-710, Physik Instrumente). Au final nous avons obtenu un système capable de réaliser des séquences d'images successives où l'objectif est translaté entre chaque image d'une distance réglable entre quelques nanomètres et quelques dizaines de microns.

La séquence présentée dans la figure (6.14) a été obtenue en imageant la suspension monodisperse séchée présentée dans la section précédente. Dans la séquence chaque changement d'image correspond à une translation de 250 nm. Les images présentées correspondent chacune à un balayage de 200 lignes. La durée nécessaire à l'acquisition d'une image est donc de 25 ms. De plus, entre chaque image le déplacement synchronisé de l'objectif nécessite un temps total de $30ms$ afin d'être certain de la stabilisation de la position de l'objectif. Cette séquence de 18 images espacées de 250 nm a donc été enregistrée en seulement 900 ms.

La courbe présentée en figure (6.15) a été obtenue en calculant l'intensité moyenne des images de la séquence en fonction de la position de l'objectif. Si on considère que la couche de sphères est infiniment fine nous retombons sur les conditions d'évaluation du rejet de l'information hors focus décrite dans le chapitre 5. Comme il a été prévu par la modélisation, la contribution du plan est maximale lorsque le plan est dans le plan focal de l'objectif. Ces images les plus lumineuses correspondent bien aux images les mieux résolues. On observe une décroissance rapide de l'intensité mesurée, en moins de 2 μm de la position optimale la contribution du plan est divisée par deux. Cet effet est typique d'un montage confocal (Fig.5.11.a). La courbe n'est cependant pas symétrique, et la décroissance de l'intensité est plus rapide lorsque le

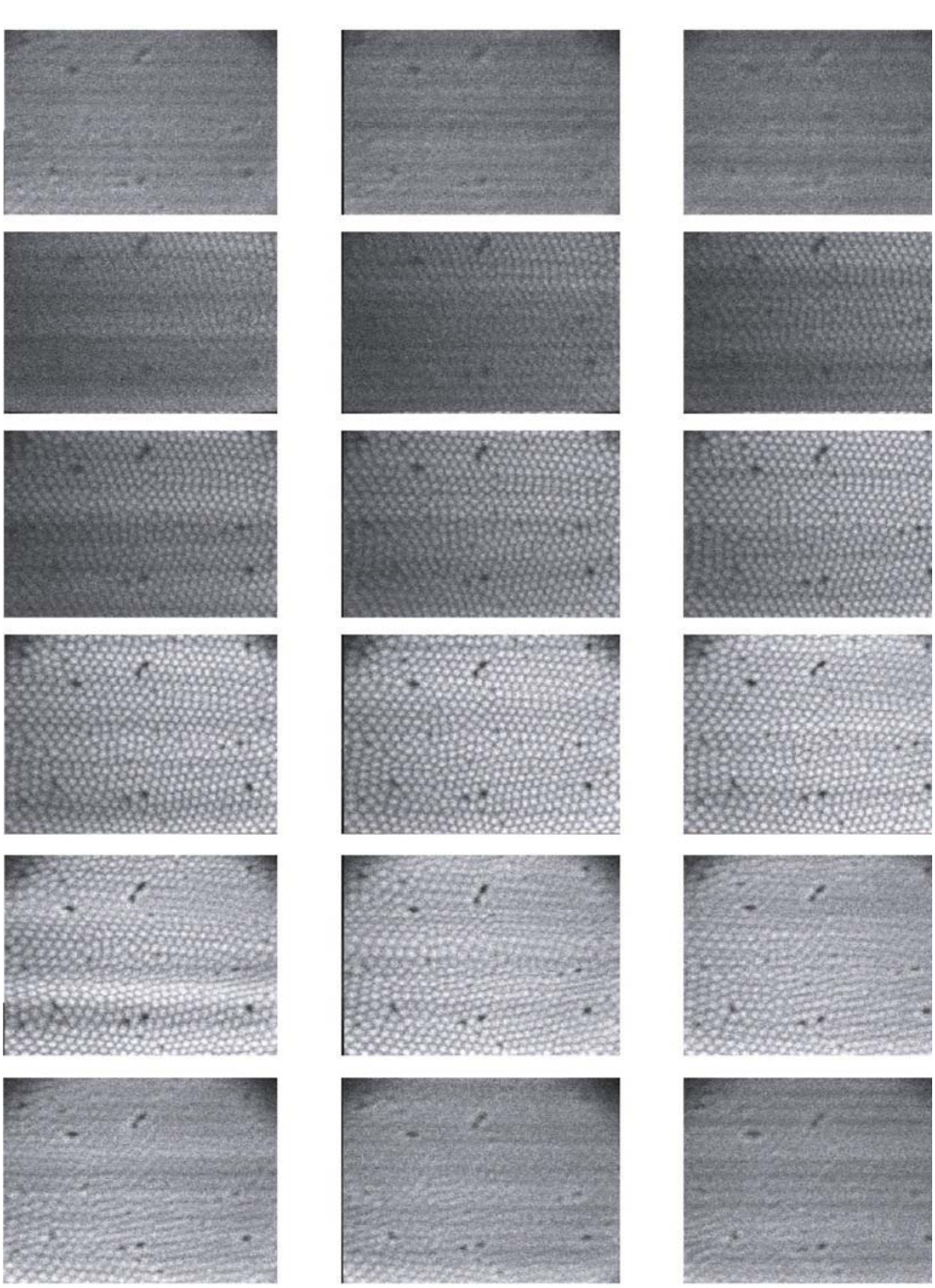


FIG. 6.14 – Séquence d'images d'une suspension colloïdale séchée (lecture de gauche à droite et de haut en bas). Au cours de la séquence l'objectif a été translaté de 250nm entre chaque image. (excitation $488nm$, objectif $60X$ à immersion à eau, d'ouverture numérique de 1).

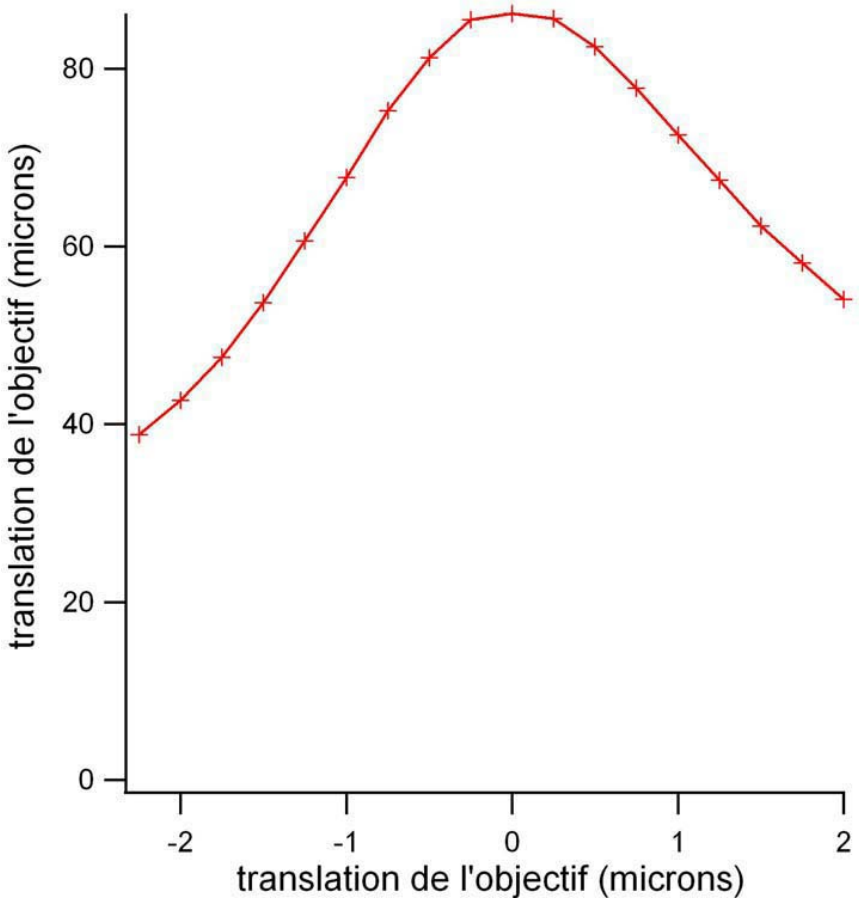


FIG. 6.15 – Intensité moyenne des images de la séquence présentée en figure (6.14) en fonction de la position de l'objectif

plan focal de l'objectif se trouve en amont du plan de billes. Il est possible que les détails internes de l'optique de l'objectif soient à l'origine de cette asymétrie.

6.5 Conclusion

Grâce à une compréhension et modélisation du microscope confocal, nous sommes parvenus à réaliser un microscope confocal rapide pour un faible coût matériel (25000 euros). En plus du travail de réflexion nécessaire au choix pertinent des composants du montage, la réalisation de ce microscope a fait intervenir des activités très variées : programmation de cartes embarquées, conception et réalisation de pièces mécaniques (maintient des galvanomètres et ensemble de détection), réalisation de circuits électroniques simples et obtention d'un protocole de réglage optique qui soit pratique et adapté à notre montage. Nous avons abouti à un montage qui nous a permis d'observer des suspensions colloïdales concentrées, et avons présenté ici les premières images. Le point clé de ce montage est la possibilité d'acquérir des images avec une fréquence supérieure à 50 images par seconde.

Bibliographie

[1] N.Callamaras , I.Parker Construction of a confocal microscope for real-time x-y and x-z imaging. *Cell Calcium*, **26**, *6*, 271-279 , 1999.

[2] Q-T.Nguyen ,N.Callamaras, C.Hsieh, I.Parker Construction of a two photon microscope for video rate Ca^{2+}. *Cell Calcium*, **30**, *6*, 383-393 , 2001.

[3] T.B. Pawley and al. Handbook of biological confocal microscopy. *Ed. Plenum Press*, 1995.

Conclusion

Nous avons décrit dans ce manuscrit le développement d'outils expérimentaux permettant l'observation de dynamiques de suspensions colloïdales concentrées sous contrainte.

Nous avons étudié la coagulation de suspensions colloïdales par des techniques de diffusion multiple multispeckle. Au cours de la coagulation, nous avons observé que les modes de déplacements individuels disparaissent au profit de modes de déplacements collectifs. Ces modes colllectifs présents au sein du gel particulaire formé font intervenir des dynamiques intermittentes. De bref mouvements microscopiques se produisent, temporellement séparés par des moments pendant lesquels les particules ne bougent presque pas. Nous avons mesuré les distributions de durée des intermittences, elles obéissent à des lois de puissance. Ces observations ont été rendues possibles par l'introduction d'une nouvelle méthode d'interprétation des valeurs de corrélation obtenues par MSDWS, nous intitulons cette méthode MSDWS2D.

Nous avons ensuite utilisé la mesure SVS de la visibilité d'une figure d'interférence pour en déduire la dynamique de relaxation des agrégats formés par l'application d'un fort cisaillement, après l'arrêt de l'écoulement. Nous avons ainsi pu montrer que, sous fortes contraintes, se formaient des agrégats de particules. Nos mesures montrent qu'après l'arrêt de la contrainte, le temps de redissolution de ces agrégats est d'autant plus long que la contrainte appliquée lors de l'écoulement est élevée.

Dans les deux études, coagulation ou bien cisaillement, nous n'avons pas pu obtenir une description spatiale précise des mouvements des particules. C'est la raison pour laquelle nous avons été amenés à construire un microscope confocal rapide dont nous espérons qu'il permettra, dans le futur, de décrire plus finement les mécanismes microscopiques à l'origine des dynamiques observées.