



HAL
open science

Nanospectroscopie infrarouge avancée : développements instrumentaux et applications

Jérémie, Mathurin

► **To cite this version:**

Jérémie, Mathurin. Nanospectroscopie infrarouge avancée : développements instrumentaux et applications. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS188 . tel-02273795

HAL Id: tel-02273795

<https://theses.hal.science/tel-02273795>

Submitted on 29 Aug 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Nanospectroscopie infrarouge avancée: développements instrumentaux et applications

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 27/06/2019, par

Jérémie MATHURIN

Composition du Jury :

Paul Dumas Directeur de Recherche, Synchrotron Soleil	Président du Jury
Sophie Lecomte Directrice de Recherche, CNRS	Rapporteur
Renaud Bachelot Professeur, Université de Troyes	Rapporteur
Eric Lesniewska Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
Cécile Engrand Directrice de Recherche, CNRS	Examineur
Emmanuel Maisonhaute Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Alexandre Dazzi Professeur, Université Paris-Sud	Directeur de thèse
Ariane Deniset-Besseau Maitre de Conférence, Université Paris-Sud	Co-Encadrante de thèse

Titre : Nanospectroscopie infrarouge avancée : développements instrumentaux et applications

Mots clés : Spectroscopie, Infrarouge, Microscopie, Nanosciences, Instrumentation

Résumé : Depuis une dizaine d'années, les technologies de champ proche appliquées à la spectroscopie infrarouge ont connu de rapides progrès permettant d'atteindre maintenant l'échelle du nanomètre. Dans le cadre de ma thèse, l'une de ces techniques, appelées AFM-IR et qui consiste à un couplage entre la microscopie à force atomique (AFM) et un laser accordable dans le domaine de l'infrarouge, va être présenté plus en détail.

Le but de ma thèse va être de présenter les différents développements qui ont eu lieu dans le domaine de cette technique, comme l'AFM-IR en résonance forcée, l'AFM-IR en mode tapping ou les débuts du développement de l'AFM-IR avec des sources spectralement continues. Ces développements majeurs ont eu pour conséquence de populariser la technique et de voir une rapide augmentation du nombre d'utilisateurs.

Cependant l'AFM-IR reste une technique récente et non triviale à maîtriser, car elle demande à la fois des connaissances en AFM, mais aussi en spectroscopie infrarouge.

Les dernières avancées technologiques ont permis de s'approcher de la résolution nanométrique. Les conséquences sont multiples et notamment cela permet d'ouvrir la technique à de nouveaux champs d'applications. Or qui dit nouveaux domaines dit nouvelles problématiques, mais surtout nouveaux challenges expérimentaux. Il est donc important d'identifier les verrous technologiques et limitations associés à ces développements pour garder un esprit critique sur ce qui peut être ou non obtenu en AFM-IR et éviter des erreurs d'interprétation et/ou d'analyse qui pourraient avoir des conséquences néfastes dans les champs d'applications étudiés.

Title: Advanced infrared nanospectroscopy: instrumental developments and applications

Keywords: Spectroscopy, Infrared, Microscopy, Nanosciences, Instrumentation

Abstract: For 10 years, near-field technologies applied to infrared spectroscopy have reached milestones and now are able to make analysis at nanoscale. In my PhD thesis, I will focus on one of these techniques: the so-called AFM-IR technique which combined an atomic force microscope (AFM) with a pulse laser tunable in the infrared spectral range.

The main goal of my PhD thesis will be to present the last developments which appears for this technique such as resonance enhanced AFM-IR, tapping mode AFM-IR or the first measurements of AFM-IR with broadband sources. These developments are major in the field of the technique and have led to high increase of the numbers of users.

However, AFM-IR remains a recent and complicated technique where user has to master in the same time atomic force microscopy and infrared spectroscopy.

The last technological developments allow measurements at the nanoscale. This has multiple consequences, especially it opens new applications fields. It also generates new problematic and new experimental challenges. As a consequence, it is necessary to understand new technological limitations created by these new developments in order to stay critical of the results obtained with an AFM-IR measurement and avoid analysis and interpretation errors which can have bad consequences on the different fields of study.





Remerciements

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été effectués au Laboratoire de Chimie Physique (LCP) au sein du groupe Biophysique. Je souhaite ainsi remercier Philippe Maitre, directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli au sein du LCP.

Je tiens ensuite à remercier mon jury de thèse. D'abord, Sophie Lecomte qui me suit depuis le début de ma thèse en tant que membre de mon jury d'évaluation de thèse puis qui a accepté d'en être la rapportrice ainsi que Renaud Bachelot qui a accepté lui aussi d'être rapporteur de ma thèse et dont les discussions au cours de sa lecture de mon manuscrit m'ont permis de nourrir ma réflexion. Je remercie aussi Paul Dumas, Cécile Engrand, Eric Lesniewska et Emmanuel Maisonhaute qui ont aussi accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse Alexandre Dazzi et ma co-encadrante Ariane Deniset-Besseau pour ces années passées ensemble qui furent pour moi bien plus qu'un simple travail et qui m'ont permis de progresser tant sur le plan scientifique qu'humain. Ce fut un réel plaisir de faire ma thèse avec vous et j'espère que l'aventure puisse encore continuer.

Je remercie également les autres membres de l'équipe. Les deux doctorants avec qui j'ai pu travailler Rolando, maintenant docteur, pour m'avoir aidé lors de mon arrivée en thèse et Jehan qui m'a accompagné sur la fin du voyage. Ainsi que Dominique mon compagnon de bureau de la fin.

J'aimerais ensuite remercier les membres du groupe Biophysique du LCP pour leur accueil, en particulier les doctorants que j'ai pu rencontrer au cours de l'aventure et qui ont fini comme Éric et Xavier, mais aussi ceux qui continuent (courage Aïcha et Hana!) ainsi qu'Alexandra, ma compagne de mésaventure.

Enfin je remercie les autres membres du laboratoire qui m'ont aidé au cours de cette thèse et particulièrement Séverine Bourguignon qui m'a toujours été d'un grand secours et d'une grande indulgence quand je me perdais dans les arcanes administratifs et les lignes de crédit ainsi que pour ses conseils lors de mon retour de pause.

Au cours de ces travaux de thèse, j'ai eu la chance de collaborer sur des nombreux projets aux sujets divers et variés, mais qui m'ont permis de travailler avec de nombreuses personnes avec qui ce fut un plaisir d'interagir tant sur le plan scientifique qu'humain.

Pour l'étude sur les nanoparticules polymériques, qui furent un projet clé de ma thèse, je tiens à remercier Ruxandra Gref de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay ainsi qu'Elisabatta Pancani, mon alter ego sur l'ensemble de ce travail, ainsi que Seray Ural qui a repris la suite de nos travaux.

Sous l'impulsion d'Ariane, j'ai eu la chance de mener différentes études sur le collagène et pour lesquels je tiens à remercier Marie-Claire Schanne-Klein du Laboratoire d'Optique et Biosciences, Gaël Latour du Laboratoire Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie, Gervaise Mosser et François Portier du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris.

Un autre projet d'importance pour moi et celui que j'ai pu mener sur les micrométéorites. Pour cela, je tiens à remercier Jean Duprat et Cécile Engrand du Centre de Sciences Nucléaires et de Sciences de la Matière ainsi qu'Emmanuel Dartois de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay qui m'ont permis de travailler sur ce projet, mais aussi avec qui j'ai eu la chance d'interagir lors de stages précédents ma thèse qui furent pour moi fondateur.

Je tiens aussi à remercier Human Rezaï et Davy Martin de l'équipe VIM de l'INRA pour m'avoir initié au monde intrigant des prions, riche en émotions scientifiques et en émotions tout court.

Je remercie l'ensemble de l'équipe SMIS du synchrotron Soleil qui m'a accueilli durant une partie de ma thèse pour le travail sur le couplage de l'AFM-IR avec les sources continues et sur les fibres bactériennes HfQ. Je tiens à remercier plus particulièrement Stéphane Lefrançois qui fut toujours d'une très grande aide lors du travail sur les sources continues. Je remercie aussi Pierre Montaville du Synchrotron Soleil pour m'avoir permis de travailler avec lui sur son projet sur les iridovirus.

Pour le travail sur les fibres bactériennes HfQ, je remercie aussi particulièrement Véronique Arluisson du Laboratoire Léon Brillouin qui est à l'origine du projet et Sylvain Trépout de l'Institut Curie pour m'avoir permis d'assister au travail sur la microscopie électronique et m'avoir initié aux joies des traitements de surface par plasma.

Enfin, je remercie le professeur Wojciech M. Kwiatek, Natalia Piergies et Anna Borkowska de l'Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Sciences pour leur accueil lors de mon séjour à Cracovie et en espérant que les travaux que nous avons initiés soient fructueux ainsi qu'Achim Kolher et Volha Shapaval de la Norwegian University of Life Sciences qui m'ont permis de venir à deux reprises dans leur laboratoire.

Cette aventure a été l'aboutissement d'un long voyage qui a commencé pour moi depuis fort longtemps et je tiens maintenant à remercier toutes les personnes qui m'ont suivi d'ici là. Tout d'abord ma famille qui m'a toujours suivi et a toujours été présente même quand plus personne ne comprenait plus trop ce que je faisais. La famille Rebeyrat qui est pour moi une seconde famille et notamment mes sœurs Céline et Delphine qui m'ont toujours soutenu et ont toujours su être indulgentes lors de mes absences et mes oublis d'anniversaire (promis un jour j'arriverai à appeler à la bonne date !). Mes amis du lycée et surtout Jérémie, mon compagnon de toujours et feu colocataire qui a toujours été là dans les meilleurs moments comme dans les pires. Mes agros, compagnons d'infortune de prépa BCPST en qui j'ai trouvé une troisième famille et une bande d'amis à toute épreuve. Salomé et Claire qui m'ont accompagné dans mes aventures magistériennes à Orsay et à qui je dois tellement pour toutes ces années. Enfin je tiens plus particulièrement à remercier mon père qui a été un pilier essentiel de ma vie et sans qui rien de ça n'aurait pu être possible. Et enfin je remercie Suzelle, merci pour tout.

J'espère maintenant n'avoir oublié personne...

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : État de l'art de la technologie AFM-IR	5
I. Spectroscopie infrarouge.....	5
1. Indice optique et absorption	6
2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	8
3. Microspectroscopie IR.....	12
II. Microscopie à force atomique.....	14
III. Mesure IR locale : détection de l'effet photothermique	18
1. Description d'une mesure AFM-IR classique.....	18
2. Description théorique de l'AFM-IR	22
IV. Limitations de la technique AFM-IR classique	29
1. Limites de résolutions latérales et de sensibilité de la technique	29
2. Limitations instrumentales	31
V. Conclusions	32
Chapitre II : AFM-IR en résonance forcée.....	34
I. Description du principe de l'AFM-IR en résonance forcée	34
1. Description de la mesure AFM-IR en résonance forcée	34
2. Preuve de concept de l'AFM-IR en résonance forcée	37
3. Description théorique de l'AFM-IR en résonance forcée.....	39
II. Mise en place de la résonance forcée sur le système AFM-IR en réflexion totale	42
1. Montage expérimental.....	42
2. Validations expérimentales.....	43
III. Acquisitions de cartographies et de spectres en résonance forcée	47
1. Les cartographies d'absorption IR : mise en place du rétrocontrôle en fréquence ...	47
2. Acquisition des spectres d'absorption en AFM-IR en résonance forcée	59
IV. Modélisation du comportement thermique d'objets de dimensions nanométriques.....	65
1. Etude de l'influence de la taille dans le cas d'une sphère	67
2. Etude de l'influence de la taille dans le cas d'un disque	71
V. Conclusions	73
Chapitre III : Enjeux méthodologiques de l'éclairage pour la mesure AFM-IR	75
I. Mise en place de l'éclairage par le dessus	75
1. Présentation du montage avec l'éclairage par le dessus	76
2. Intérêt de l'éclairage par le dessus	77

3.	Conséquences sur la mesure AFM-IR.....	77
II.	Influence de la pointe en or sur la mesure AFM-IR	79
1.	Exaltation de champ par la pointe en or en AFM-IR.....	79
2.	Étude bibliographique	82
3.	Caractérisation de l'effet de la pointe pour la configuration en réflexion totale.....	84
III.	Les surfaces utilisées en AFM-IR et leur influence sur la mesure	91
1.	Interaction entre la surface de ZnSe et l'échantillon.....	91
2.	Étude du substrat or.....	94
IV.	Mesures corrélatives.....	101
1.	Mesures corrélatives AFM-IR / microscopie optique non linéaire - Étude de la dénaturation du collagène de type I.....	102
2.	Mesures corrélatives AFM-IR/TEM – Étude d'une fibre protéique bactérienne....	114
3.	Discussion autour des mesures corrélatives.....	119
V.	Conclusions	120
	Chapitre IV : AFM-IR en mode tapping.....	122
I.	Limitations de l'AFM-IR en mode contact.....	122
II.	Développement de l'AFM-IR en mode tapping.....	123
1.	AFM hétérodyne.....	123
2.	Preuve de concept de l'AFM-IR en mode tapping	124
3.	Mise en équation de l'AFM-IR en mode tapping.....	126
III.	Exemples d'applications de l'AFM-IR en mode tapping.....	131
1.	Étude de la structure de nanoparticules polymériques	131
2.	Étude de la matière organique dans les micrométéorites collectées en Antarctique	136
IV.	Limitations de l'AFM-IR en mode tapping.....	147
V.	Conclusions	148
	Chapitre V : Acquisitions hyperspectrales en AFM-IR : enjeux et défis.....	149
I.	Imagerie hyperspectrale : laser QCL	149
1.	Intérêt de l'imagerie hyperspectrale	149
2.	Essai d'imagerie hyperspectrale.....	150
II.	Acquisitions hyperspectrales : sources continues.....	152
1.	Preuve de concept de l'AFM-IR couplé avec une source continue	153
2.	Montage réalisé en collaboration avec la ligne SMIS du synchrotron SOLEIL	155
3.	Utilisation d'un laser supercontinuum	156
4.	Essais de mesure avec une source synchrotron	171
III.	Conclusions et Perspectives	172

Conclusions générales.....	174
A. Présentation des sources IR utilisées durant ma thèse.....	178
I. Description de la source OPO.....	178
II. Description du laser QCL.....	178
III. Description du laser Novae.....	180
B. Théorie de l'AFM-IR avec un signal sinusoïdal	182

Liste des figures

Figure I-1 : Schéma récapitulatif des différentes vibrations moléculaires possibles dans le cas d'un groupement -CH ₂ - Figure extraite de [15]	7
Figure I-2 : Schéma de principe d'un spectromètre à transformée de Fourier	8
Figure I-3 : Description du mode ATR - a) Schéma d'un montage avec un éclairage ATR à multiples réflexions - b) Détails de l'éclairage de l'échantillon via un champ évanescent généré à l'interface cristal/échantillon par une réflexion totale du faisceau IR.....	10
Figure I-4 : Exemple de table d'identification des liaisons chimiques en fonction de la position en nombre d'onde du maximum de la bande d'absorption - La partie encadrée en rouge correspond à la région de l'empreinte digitale	11
Figure I-5 : Exemple de spectres d'absorption IR obtenus dans le cas d'une bactérie (en rouge) et de poly(méthyl-acrylate) (PMMA) (en bleu) où il est possible d'identifier les principales bandes d'absorption.....	12
Figure I-6 : Schéma de principe de la microscopie confocale.....	13
Figure I-7 : Image de MEB de l'extrémité d'un levier AFM en silicium avec la pointe	15
Figure I-8 : Schéma présentant la déflexion du levier dans le cas où a) la force appliquée sur la pointe est répulsive, b) la force appliquée sur la pointe est attractive.....	15
Figure I-9 : Schéma de principe d'un système AFM utilisant une diode laser et une photodiode 4-cadrans comme système de détection de la déflexion du levier	16
Figure I-10 : Principe de l'acquisition d'une image de topographie en AFM en mode contact - La position de la pointe est ici figurée à trois temps différents au cours de la mesure permettant de maintenir une force constante F_0 quelle que soit les variations au niveau de la surface	17
Figure I-11 : Schéma de principe de l'AFM-IR classique	19
Figure I-12 : Signaux acquis en AFM-IR classique - a) Signal $Q(t)$ correspondant à l'oscillation du levier au cours du temps et en fonction du pulse laser initial - b) Transformée de Fourier du signal $Q(t)$ qui permet de visualiser les différentes résonances de contact du levier excitées par un pulse laser, en encart un zoom sur la résonance de contact qui correspond à la première harmonique	20
Figure I-13 : Exemple d'acquisition de cartographie chimique obtenue en AFM-IR dans le cas d'une cellule de macrophage THP-1 - a) Topographie AFM - b) Cartographie chimique obtenue à 1660 cm ⁻¹ , nombre d'onde situé dans une des bandes d'absorption des protéines	21
Figure I-14 : Exemple de spectre local (en rouge) obtenu séquentiellement en observant l'oscillation du levier pour chaque nombre d'onde utilisé par le laser (en bleu)	22
Figure I-15 : Schéma du levier AFM - Le levier de longueur L est fixé au support à $x=0$. La pointe est positionnée à $x = L-\delta x$. L'interaction de contact entre l'échantillon et la pointe est modélisée par deux ressorts, un pour le déplacement latéral de constante de raideur k_x et un pour le déplacement vertical de constante de raideur k_z	24
Figure I-16 : Schéma de la pointe AFM en contact avec la surface - L'angle d'inclinaison entre la surface et le levier est noté α , la hauteur de la pointe est notée H et le centre de la pointe est décalée d'une distance δx par rapport à l'extrémité du levier.....	26

Figure I-17 : Schéma de la pente du levier en fonction du mode de vibration observé (mode fondamental à gauche, seconde harmonique à droite) – Figure extraite de [51]	28
Figure II-1 : Modes de résonance de contact d'un levier en silicium – En encart un agrandissement sur le mode de la 2 ^{ème} harmonique	35
Figure II-2: Comparaison du signal AFM-IR dans le cas de l'oscillation amortie et de la résonance forcée, l'énergie du laser a été diminuée par dix entre la mesure en oscillation amortie et celle en résonance forcée – a) Déflexion du levier en oscillation amortie – b) Transformée de Fourier du signal de déflexion du levier en oscillation amortie – c) Déflexion du levier en résonance forcée – d) Transformée de Fourier du signal de déflexion du levier en résonance forcée.....	36
Figure II-3 : Schéma du système AFM-IR utilisé par F. Lu et M. Belkin pour la mesure AFM-IR en résonance forcée – Figure extraite de [14].....	37
Figure II-4 : Mise en évidence expérimentale de l'augmentation de la sensibilité par la résonance forcée - (a) Fréquences propres de l'oscillation du levier - (b) Spectres obtenus dans le cas d'un régime en résonance forcée (en rouge le spectre du LOR-3A et en noir celui du SU-8, les spectres en pointillés correspondent aux spectres des espèces correspondantes obtenus en spectroscopie FTIR) – (c) Spectres obtenus sur en régime classique d'oscillations amorties - Figure adaptée de [14]	38
Figure II-5 : Mise en évidence expérimentale de l'augmentation de la résolution latérale par la résonance forcée (a) Topographie d'une interface entre les deux polymères SU-8 et LOR-0.7A - (b)-(e) Spectres obtenus sur les différents points indiqués sur l'image de topographie (a) - Figure extraite de [14]	39
Figure II-6 : Présentation du montage utilisé pour le couplage du laser QCL avec un système AFM-IR utilisant une configuration d'éclairage par le dessous – a), b) Photographies du montage à différents angles présentant le système AFM-IR ouvert avec les deux sources IR (OPO et QCL), le trajet du faisceau du laser QCL est figuré en pointillé rouge – c) Schéma de principe du montage.....	43
Figure II-7 : Étude de filaments de Streptomyces Lividans en mode classique avec l'OPO (oscillations amorties) et en mode résonant avec le laser QCL (résonance forcée) – a) Topographie AFM acquise durant la mesure en oscillation amortie, les flèches rouges indiquent la position des filaments et les flèches bleues les rémanents cellulaires – b), c) Cartographies chimique à 1650 cm ⁻¹ respectivement avec le l'OPO et le laser QCL - d), e) Cartographies chimique à 1740 cm ⁻¹ respectivement avec l' OPO et le laser QCL	44
Figure II-8 : Comparaison entre l'étude avec la source OPO (oscillations amorties) et le laser QCL (résonance forcée) d'une zone d'intérêt contenant un résidu de la bactérie – a) Topographie AFM de la zone d'intérêt obtenue lors de l'analyse avec la source OPO – b) Cartographie chimique à 1650 cm ⁻¹ avec la source OPO - c) Topographie AFM de la zone d'intérêt obtenue lors de l'analyse avec le laser QCL, les flèches en rouge indiquent les principales zones de dégâts infligés par la pointe en or – d) Cartographie chimique à 1650 cm ⁻¹ avec le laser QCL.....	45
Figure II-9 : Étude d'un dépôt de rémanents cellulaires par AFM-IR en résonance forcée – a) Topographie AFM du dépôt – b) Cartographie chimique à 1650 cm ⁻¹ avec le laser QCL – c) Comparaison de la variation de hauteur le long du profil (ligne en pointillés blancs) avec la variation du signal AFM-IR le long de cette même ligne.	46
Figure II-10 : Étude de l'effet de la fréquence sur le signal obtenu en cartographie IR - a) Topographie de la zone étudiée – Cartographies effectuées à 1726 cm ⁻¹ et à différentes	

fréquences b) fréquence = 255,1 kHz - c) fréquence = 256,4 kHz - d) fréquence = 257,7 kHz - e) fréquence = 259 kHz - f) fréquence = 260 kHz	49
Figure II-11 : Détection du signal utilisé pour le rétrocontrôle en fréquence en mode chirp – a) Résonance de contact étudiée ; la variation d’amplitude du signal est donnée en noir, la variation de phase en bleue – b) Exemple de pics de détection de la résonance de contact en un point en mode chirp en fonction du nombre de points utilisés – le pic en pointillé indique la résonance de contact réelle donnée en a)	51
Figure II-12 : Étude de l'influence de la vitesse de balayage sur le signal obtenu en mode chirp dans le cas de la cartographie chimique à 1732 cm ⁻¹ d’une coupe de bille de PMMA – a) Fréquence de scan : 0.1 Hz – b) Fréquence de scan : 0.2 Hz – c) Fréquence de scan : 0.4 Hz – d) Fréquence de scan : 0.6 Hz	52
Figure II-13 : Reproductibilité de la détection du signal utilisé pour le rétrocontrôle en fréquence en mode chirp – a) Résonance de contact étudiée ; la variation d’amplitude du signal est donnée en noir, la variation de phase est donnée en bleue – b) Exemple de trois acquisitions du pic de résonance obtenues successivement en un même point – le pic en pointillé indique la résonance de contact réelle donnée en a)	53
Figure II-14 : Étude de l'influence de la fréquence de scan sur le signal obtenu en mode PLL dans le cas de la cartographie chimique à 1732 cm ⁻¹ d’une coupe de bille de PMMA – a) Topographie AFM- b) Vitesse de balayage : 0.2 Hz – c) Vitesse de balayage : 0.4 Hz – d) Vitesse de balayage : 0.6 Hz.....	54
Figure II-15 : Comparaison du signal de déflexion (oscillation amortie) obtenu pour de l'éthylène-propylène (en rouge sur la figure) qui est un matériau mou et pour du polypropylène rigide (en bleu sur la figure) – Figure adaptée de [73]	57
Figure II-16 : Influence de la résonance de contact choisie sur le signal AFM-IR – a) 1 ^{ère} harmonique (160,5 kHz) – b) 2 ^{ème} harmonique (316,1 kHz) – c) 3 ^{ème} harmonique (521,9 kHz) – c) 4 ^{ème} harmonique (1219,6 kHz)	58
Figure II-17 : Influence de la résonance de contact choisie sur le signal AFM-IR obtenu dans le cas de deux matériaux différents – a) cartographie à 1732 cm ⁻¹ , 1 ^{ère} mode – b) cartographie à 1732 cm ⁻¹ , 2 ^{ème} mode – c) cartographie à 1732 cm ⁻¹ , 3 ^{ème} mode – d) cartographie à 1510 cm ⁻¹ , 1 ^{ère} mode – e) cartographie à 1510 cm ⁻¹ , 2 ^{ème} mode – f) cartographie à 1510 cm ⁻¹ , 3 ^{ème} mode	58
Figure II-18 : Exemples de spectres bruts de protéines d’albumine sérique bovine obtenus en AFM-IR en résonance forcée – a) Sans purge et b) Avec purge de la machine.	60
Figure II-19 : Spectres AFM-IR obtenus sur une fibrille de collagène – a) Un seul spectre acquis – b) Spectre moyen obtenu à partir de la moyenne de dix spectres acquis sur le même point – c) Spectre moyen obtenu à partir de la moyenne de vingt-cinq spectres acquis sur le même point – d) Spectre moyen obtenu à partir de la moyenne de cinquante spectres acquis sur le même point.....	62
Figure II-20 : Étude de l'influence de l'application d'un filtre sur la dérivée seconde de la bande amide I - a) Moyenne de 25 spectres AFM-IR obtenue une fibrille de collagène dénaturée sur laquelle a été appliquée un filtre de type Savitzky-Golay d'ordre trois avec dix points (en rouge) ou vingt points (en bleu) ou aucun filtre (en noir) - b) Dérivées secondes obtenues sur les différents spectres filtrés.....	63
Figure II-21 : Schéma du modèle utilisé pour la modélisation COMSOL du comportement thermoélastique d'une sphère de PMMA – l'air est représenté en bleu, en orange le PMMA et en gris le silicium. Le point jaune indique la position où ont été faites les mesures d'expansion et d'augmentation de température	66

Figure II-22 : Schéma du modèle utilisé pour la modélisation COMSOL d'un disque de PMMA – En bleu est représenté la zone attribuée à l'air, en orange celle attribuée au PMMA et en gris celle attribuée au silicium. Le point jaune indique la position où ont été faites les mesures d'expansion et d'augmentation de température.....	66
Figure II-23 : Résultats obtenus par la modélisation COMSOL dans le cas d'une sphère de PMMA – a) Variation de la température de l'échantillon sous la pointe en fonction du diamètre – b) Variation de l'expansion de l'échantillon sous la pointe en fonction du diamètre - c), d) Agrandissements sur la zone allant de 1 nm à 120 nm pour respectivement la variation de température c) et l'expansion de l'échantillon d).....	67
Figure II-24 : Courbes d'ajustements polynomiales obtenues dans le cas d'épaisseurs de l'objet inférieures à 150 nm - a) Pour l'augmentation de température à l'apex de l'objet – b) Pour l'expansion thermique de l'apex de l'objet	69
Figure II-25 : Modélisation du comportement d'expansion thermique d'une sphère de PMMA en fonction de la durée du pulse et en fonction de l'épaisseur du cylindre qui est soit 7,5 nm (carré noir), 75 nm (rond rouge) ou 750 nm (triangle bleu) – a) Augmentation de la température en fonction de la durée du pulse – b) Augmentation de l'expansion thermique en fonction de la durée du pulse – l'encart en haut à gauche représente un zoom sur les épaisseurs 75 nm et 7,5 nm.....	70
Figure II-26 : Résultats obtenus par la modélisation COMSOL dans le cas d'un disque de PMMA – a) Variation de la température de l'échantillon sous la pointe en fonction du diamètre – b) Variation de l'expansion de l'échantillon sous la pointe en fonction du diamètre - c), d) Agrandissements sur la zone allant de 1 nm à 120 nm pour respectivement la variation de température c) et l'expansion de l'échantillon d).....	71
Figure II-27 : Modélisation du comportement thermo-expansion en fonction de la durée du pulse de la sphère (rond rouge) et du disque (carré bleu) de PMMA de 7,5nm d'épaisseur – a) Augmentation de la température en fonction de la durée du pulse – b) Augmentation de l'expansion thermique en fonction de la durée du pulse	72
Figure III-1: Schéma simplifié du montage utilisant la configuration d'éclairement par le dessus – En encart, le montage utilisant l'éclairement en réflexion totale.....	76
Figure III-2 : Comparaison des deux tâches laser obtenues a) dans le cas de la pointe en silicium – b) dans le cas d'une pointe en silicium recouverte d'or.....	78
Figure III-3 : Modélisation de l'exaltation de champ : simulation 3D de l'intensité du champ I/I_0 pour une couche monomoléculaire de 2 nm d'épaisseur déposée sur un substrat d'or - Figure extraite de [88]	80
Figure III-4 : Spectres obtenus sur des monocouches moléculaires de EG6-OH a) et de NTP b) - Les spectres en rouge représentent des spectres de références obtenus en spectroscopie FTIR en réflexion totale pour chacune des espèces - Figure adaptée de [88]	80
Figure III-5 : Démonstration de l'augmentation de résolution latérale en utilisant l'exaltation du champ électrique - a) Topographie en mode contact de l'échantillon de PEG - b) Profil de hauteur symbolisé par la ligne bleue sur la topographie - c) Spectres obtenus dans les différents points indiqués sur le profil de hauteur b) - d) Mesure de la déflexion du levier le long du profil de topographie b) quand le nombre d'onde du laser est 1342 cm^{-1} (ligne continue noire) ou 1552 cm^{-1} (ligne pointillée orange) - e) Cartographie obtenue en simultanée de la topographie a) lorsque le nombre d'onde du laser est fixé à 1342 cm^{-1} - f) Mesure de la déflexion du levier obtenue le long de la flèche rouge indiquée sur la cartographie e) - Figure extraite de [88]	81

Figure III-6 : Comparaison des spectres obtenus sur la coupe de nylon de 250 nm d'épais dans le cas de la pointe Si (trait plein noir) et de la pointe Si-Au (trait plein bleu), les deux autres spectres (pointillé bleu clair) sont deux spectres obtenus avec la pointe Si-Au pour deux autres positions.....	85
Figure III-7 : Comparaison des cartographies chimiques à 1660 cm ⁻¹ obtenus avec l'OPO sur un dépôt de Streptomyces lividans en fonction de la pointe AFM utilisé - a) Topographie AFM- b) Cartographie à 1660 cm ⁻¹ obtenue avec une pointe Si - c) Cartographie à 1660 cm ⁻¹ obtenue avec une pointe Si-Au.....	86
Figure III-8 : Schéma de principe de l'exaltation du champ local en fonction de la position de la pointe par rapport au champ évanescent - a) Cas du résidu membranaire, la pointe Si-Au est dans un champ suffisamment intense pour générer son exaltation - b) Cas de la bactérie, la pointe est trop haute par rapport à la surface, l'intensité du champ évanescent est plus faible comparée au cas précédent pour observer une exaltation de champ significative.....	87
Figure III-9 : Comparaison des cartographies chimiques à 1660 cm ⁻¹ obtenues avec la source OPO sur un dépôt contenant majoritairement des rémanents cellulaires de Streptomyces lividans - a) Topographie AFM avec la pointe Si - b) Cartographie à 1660 cm ⁻¹ obtenue avec cette même pointe - c) Topographie AFM avec la pointe Si-Au - d) Cartographie à 1660 cm ⁻¹ associée.....	88
Figure III-10 : Comparaison des cartographies chimiques à 1660 cm ⁻¹ obtenus avec le laser QCL sur un dépôt de Streptomyces lividans avec une pointe Si et une pointe Si-Au : a) Topographie AFM obtenue avec la pointe Si - b) Cartographie à 1660 cm ⁻¹ associée - c) Topographie AFM obtenue avec la pointe Si-Au - Les principaux dommages thermiques sont indiqués par une flèche rouge- d) Cartographie à 1660 cm ⁻¹ associée - Les zones entourées signalent les intersections des rémanents cellulaires	89
Figure III-11 : Exemple de dépôts de nanoparticules polymériques à base d'acide polylactique sur du ZnSe pour différentes conditions physico-chimiques - a), b) Images optiques de la surface (objectif x10) où il est possible de constater que les nanoparticules sont agrégées a) ou forment un film de plusieurs couches b) - c) Image de topographies AFM en mode tapping dans le cas où les nanoparticules sont agrégées.....	92
Figure III-12 : Schéma du montage d'éclairage en réflexion totale avec un prisme et une fenêtre en CaF ₂	93
Figure III-13 : Comparaison des spectres obtenus en AFM-IR en résonance forcée sur un dépôt de fibres de PrP humaine (spectres bleu et violet en trait plein) et du spectre ATR-IR obtenu sur une solution de fibres de PrP ovine (en pointillé rouge).....	97
Figure III-14 : Comparaison des spectres obtenus en AFM-IR en résonance forcée sur un dépôt de fibres de PrP humaine (spectres bleu et violet en trait plein) et du spectre en AFM-IR en résonance forcée obtenu sur un dépôt de la partie N-Ter de PrP ovine (en pointillé vert)	98
Figure III-15 : Comparaison des spectres obtenus en AFM-IR en résonance forcée sur un dépôt de la partie C-Ter de la protéine PrP ovine (spectre en noir) et sur un dépôt de la partie N-Ter de la protéine PrP ovine (spectre en vert)	98
Figure III-16 : Étude de l'hétérogénéité de fibres PrP issue de l'extrait de cerveau de hamster - a) Topographie caractéristique d'une fibre isolée étudiée - b) Ensemble des spectres caractéristiques des trois familles de structures identifiées dans l'étude des fibres.....	100
Figure III-17 : Mesure effectuée sur des résidus d'analogues de glaces interstellaires déposés sur une lame d'incox et irradiés par des ions lourds - a) Topographie AFM, au niveau du trou	

en bas à droite apparaît la surface d'inox (entouré par des tirets blancs) - b) Cartographie chimique à 1760 cm^{-1} , la surface d'inox n'interfère pas avec la mesure AFM-IR..... 101

Figure III-18 : Schéma de la structure du collagène (image extraite de www.proto-col.com) 103

Figure III-19 : Caractérisation du collagène type I par AFM-IR - a) Image de topographie AFM d'une fibre de collagène, sur l'image il est possible de voir la striation à 69 nm typique de la fibre - b) Cartographie chimique obtenue en AFMIR à 1660 cm^{-1} - c)- Superposition de la topographie AFM (en relief 3D) avec la cartographie chimique - d) Spectre AFM-IR typique d'une fibre de collagène de type I 104

Figure III-20 : Comparaison des résultats obtenus sur un échantillon de parchemin préservé (A-F) et un échantillon de parchemin altéré (G-L) : (A,G) Image de de microscopie optique, (B,H) image composite de microscopie non linéaire : le signal SHG est en vert et le signal 2PEF est en rouge ; (C,I) topographies AFM de zones locales des échantillons préalablement caractérisées en microscopie non linéaire, les zones caractérisées sont indiquées par un carré sur les images B et H ; cartographies chimiques obtenues en AFM-IR à 1724 cm^{-1} (D,J) et 1660 cm^{-1} (E,K) ; (F,L) spectres AFM-IR locaux obtenus respectivement sur l'échantillon préservé et sur l'échantillon altéré, les localisations des spectres sont indiquées par des points de couleurs sur les topographies AFM. 105

Figure III-21 : Comparaison des résultats obtenus sur des fibres de collagène intactes (A - C) et du collagène dénaturé (gélatine) (D - F) image composite signal de fluorescence en rouge, SHG en vert (A) de fibre de collagène et (D) de gélatine et microscopie AFM (B, E) - (C, F) spectres infrarouges obtenus sur les différents points - figure adaptée de [45]..... 105

Figure III-22 : Schéma de principe du montage utilisé pour la dénaturation du collagène type I en fonction de différentes conditions 106

Figure III-23 : Zoom sur la zone 1600 cm^{-1} - 1800 cm^{-1} des spectres obtenus en spectroscopie FTIR pour les dépôts de collagène type I chauffé à 75°C pendant 60 min en présence de vapeur d'eau (spectre bleu), d'éthanol (spectre rouge) ou d'acide acétique à 30% (spectre vert) et comparé au spectre obtenu sur du collagène de type I natif (spectre en pointillé noir) - L'encart représente la dérivée seconde de ces spectres..... 107

Figure III-24: Schéma de principe du protocole de dénaturation d'une fibrille de collagène type I avec une pointe NanoTA 109

Figure III-25 : Dénaturation thermique d'un film épais de collagène ($2\text{ }\mu\text{m}$ d'épais) - a) Image optique du dépôt de collagène après dénaturation par la pointe NanoTA - b) Image de topographie AFM, le gradient thermique est le plus faible à gauche et le plus fort à droite - c) Spectres AFM-IR, les couleurs se réfèrent aux points indiqués en b) 110

Figure III-26 : Dénaturation d'un film fin de collagène (100 nm d'épais) - Avant dénaturation : a) Topographie AFM, b) Cartographie chimique à 1725 cm^{-1} , c) Spectres AFMIR obtenus le long d'une ligne indiquée sur l'image b) - Après dénaturation : d) Topographie AFM, e) Cartographie chimique à 1725 cm^{-1} , f) spectres AFMIR obtenus le long d'une ligne indiquée sur l'image e), g) Image composite de microscopie NLO : le signal vert représente le signal SHG, le signal rouge représente le signal de 2PEF 112

Figure III-27 : Dénaturation du collagène à l'échelle de la fibrille - a) Topographie AFM avant dénaturation (l'encart en bleu est la zone étudiée ensuite après dénaturation), b) - c) Cartographies chimiques de la fibrille de collagène avant dénaturation respectivement à 1660 cm^{-1} et à 1745 cm^{-1} , d) Topographie AFM après dénaturation, e) - f) Cartographies chimiques

à 1660 cm^{-1} et à 1745 cm^{-1} , g) Spectres IR locaux obtenus sur la fibrille dénaturée, la position des spectres est indiquée par les flèches de couleur..... 113

Figure III-28 : Schéma du support $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}$ utilisé pour la mesure corrélative - a) Vue transverse, b) Vue du dessus 115

Figure III-29 : Analyse en AFM-IR des fibres HfQ CTR38 déposées sur le film de Si_3N_4 surmontant le plot de Si - a) Topographie AFM - b) Spectres obtenus en AFM-IR sur différents endroits comme le faisceau de fibres (les spectres en cyan sont représentatifs de 5 points de mesure pris le long de la fibre indiquée par la flèche en cyan tous les 250 nm) et sur le dépôt d'oligomères (spectre en rouge, la localisation du spectre est indiquée par une flèche rouge sur la topographie) - c) Rapport des cartographies d'absorption IR obtenues à 1620 cm^{-1} et 1660 cm^{-1} . Les flèches en jaunes indiquent des zones riches en feuillets β - d) Cartographie d'absorption IR obtenue 1745 cm^{-1} - Figure extraite de [48] 116

Figure III-30 : Étude du comportement thermique du film de Si_3N_4 - a) Comparaison des amplitudes d'oscillations du levier en contact avec le film de Si_3N_4 sur le silicium en fonction de la puissance incidente du laser QCL - b) Comparaison des fréquences d'oscillation du levier en contact avec la surface de Si_3N_4 (expansion thermique de la surface) ou en contact avec une fibre de HfQ CTR₃₈ (expansion photothermique) - c) Évolution de l'oscillation du levier en fonction de sa position sur le support (au milieu du film de Si_3N_4 libre, sur le film de Si_3N_4 sur les plots en Si ou à l'interface entre les deux) - Agrandissement sur la gamme de fréquences allant de 130 kHz à 180 kHz - Figure extraite de [48] 118

Figure III-31 : Mesure corrélative effectuée sur des fibres de HfQ CTR₃₈ - a) image de TEM - b) Topographie AFM de la même fibre - c) Spectres locaux obtenus sur les fibres, la position des spectres est indiquée par des flèches de couleurs - Le spectre en pointillé noir est un spectre obtenu en FTIR sur un dépôt analogue - Agrandissement : dérivée seconde du spectre obtenu en FTIR permettant de mettre en évidence les deux sous structures d'absorption principales à 1625 cm^{-1} et 1665 cm^{-1} - Figure extraite de [48] 119

Figure IV-1 : Résultat de l'analyse d'une nanoparticule de PLA/PVA en AFM-IR en mode contact - Image 3D de nanoparticules obtenue par superposition de la topographie en mode contact (relief) et de la cartographie chimique d'absorption obtenue à 1760 cm^{-1} - L'échelle des fausses couleurs pour l'absorption: vert, pour une faible absorbance ; rouge pour l'absorbance - Figure adaptée de [156] 123

Figure IV-2 : Schéma de principe de l'AFM-IR en mode tapping - Le levier en mode tapping oscille à une fréquence f_1 et le taux de répétition du laser est fixé à une fréquence f_p de sorte que la somme corresponde au second mode d'oscillation du levier (encart en haut à droite). La somme de fréquence de l'oscillation du levier et de celle de l'objet du fait de l'expansion photo-thermique conduit à générer par interaction non linéaire une oscillation de fréquence f_2 qui contient l'information sur l'absorption IR de l'objet situé sous la pointe..... 124

Figure IV-3 : Analyse d'une nanoparticule de PLA/PVA par la technique AFM-IR en mode tapping - a) Image 3D de la nanoparticule obtenue en superposant la topographie en mode tapping (relief) et la cartographie chimique d'absorption à 1760 cm^{-1} . L'échelle de la couleur est la suivante : vert, pas d'absorption IR ; plus le rouge est intense plus l'absorption IR est forte - b) Superposition 3D de la topographie en mode tapping (relief) et de la cartographie chimique d'absorption obtenue à 1415 cm^{-1} . L'échelle de la couleur est la suivante : vert, pas d'absorption IR ; plus le bleu est intense plus l'absorption IR est forte - c) Schéma de principe décrivant le comportement de la couronne de PVA lors de la déshydratation - Figure extraite de [156]..... 126

Figure IV-4 : Schéma du levier AFM oscillant en mode tapping et les principaux paramètres de mesure utilisés	127
Figure IV-5 : Cliché de cryo-TEM de Nps à base de PLA et contenant un antibiotique, l'éthionamide, ainsi qu'un principe actif supplémentaire, appelé booster, augmentant l'efficacité de l'antibiotique - Sans marquage il apparaît impossible de distinguer les différents éléments du système - Figure adaptée de [168].....	132
Figure IV-6 : Spectres FTIR et formules chimiques des principaux composés des Nps - a) Spectres FTIR du PLGA (en rouge), du PVA (en bleu) et de l'acide pipémidique (en cyan) - b), c) , d) Formules chimiques respectivement du PLGA, du PVA et de l'acide pipémidique - figure extraite de [156].....	134
Figure IV-7 : Résultat de l'analyse d'une Np de PLGA/PVA chargée avec de l'acide pipémidique en AFM-IR en mode tapping - a) Image de topographie- b) Cartographie chimique obtenue à 1425 cm ⁻¹ , nombre d'ondes où l'absorption du PLGA est majoritaire par rapport au PVA - c) Cartographie chimique obtenue à 1415 cm ⁻¹ , nombre d'ondes où l'absorption du PVA est majoritaire par rapport au PLGA - d) Cartographie chimique obtenue à 1640 cm ⁻¹ , nombre d'ondes spécifique à l'acide pipémidique - e) Spectres d'absorption locaux obtenus au niveau de la couronne (spectre en cyan) et sur la Np (spectre en violet) - Figure extraite de [156].....	135
Figure IV-8: Répartition des types texturaux de micrométéorites de la collection Concordia, d'après Dobrică et al. [180]. Les particules non fondues sont : Fine-grained compact (FgC), fine-grained fluffy (FgF), crystalline (Xtal) et UCAMMs. Les particules scoriacées (Sc) ont été partiellement fondues lors de l'entrée atmosphérique, et les sphérules cosmiques totalement fondus.....	136
Figure IV-9 : Analyse AFM-IR en mode contact d'un fragment de l'UCAMM DC18 - a) Spectre FTIR du fragment entier avec les courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des deux liaisons (C=C en orange et C=O en vert), permettant d'accéder au ratio moyen sur les deux fragments ; dans l'encart, un agrandissement a été fait spécifiquement sur la zone étudiée en AFM-IR, les nombres d'ondes des deux cartographies effectuées sont indiqués par des traits respectivement en orange pour la liaison C=C et en vert pour la liaison C=O - b) Cartographie chimique obtenue à 1710 cm ⁻¹ - c) Cartographie chimique obtenue à 1600 cm ⁻¹ - d) Image composite obtenue par la superposition des deux cartographies IR - e) Topographie AFM en mode contact	139
Figure IV-10 : Étude AFM-IR en mode contact du fragment - Neuf spectres différents ont été enregistrés (indiqués par des cercles blancs sur la cartographie IR à 1600 cm ⁻¹). Ils sont comparés au spectre FTIR obtenu sur le même fragment (situé au milieu de la ligne des spectres du haut de la figure), avec les courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des deux liaisons chimiques d'intérêt (liaison C=C en orange et C=O en vert)	140
Figure IV-11 : Morphologie du fragment d'UCAMM - a) Topographie AFM obtenue lors de l'analyse AFM-IR - b) Cliché obtenu au microscope électronique à balayage (MEB) en électrons rétrodiffusés, la zone étudiée en AFM-IR correspond à l'encadré A	140
Figure IV-12 : Étude corrélative AFM-IR en mode tapping MEB d'une coupe de l'UCAMM DC309 - a) Spectre FTIR avec les courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des liaisons chimiques C=O et C=C; en encart, un agrandissement a été effectué sur la gamme spectrale de l'AFM-IR, des traits de couleurs les maxima d'absorption auxquelles ont été acquises les cartographies chimiques - b), c) et d) Cartographies chimiques obtenues en AFM-IR en mode tapping aux nombres d'onde 1710 cm ⁻¹ , 1600 cm ⁻¹ et 1460 cm ⁻¹ respectivement associés aux liaisons C=O (vert) , C=C (rouge) et CH ₂ (bleu) - e) Image composite (R, G ,B)	

obtenue à partir des trois cartographies IR précédentes – f) Topographie AFM en mode tapping – g) Cliché de microscopie électronique à balayage (électrons rétrodiffusés), sur cette image, les différents minéraux déduits de l'analyse MEB-EDX ont été indiqués par une flèche..... 142

Figure IV-13 : Analyse MEB-EDX permettant d'obtenir la répartition de différents éléments atomiques : de gauche à droite et de haut en bas : le soufre S, le silicium Si, le Fer Fe, le magnésium Mg et l'oxygène O ; cette dernière carte de répartition a été comparée avec celle obtenue en AFM-IR à 1710 cm^{-1} , à droite en vert..... 143

Figure IV-14 : Étude par AFM-IR en mode tapping de la deuxième coupe de l'UCAMM – a) Spectre FTIR global, des courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des liaisons chimiques C=O et C=C ont été effectuées et permettent d'obtenir une estimation de la proportion moyenne de l'une par rapport à l'autre ; en encart, un agrandissement a été effectué sur la gamme spécifiquement en AFM-IR, des traits de couleurs ont été rajoutés à la position en nombre d'ondes où ont été acquises les cartographies chimiques aux couleurs correspondantes – b), c) et d) Cartographies chimiques à 1710 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} et 1470 cm^{-1} (C=O, C=C et CH_2) – e) Image composite (R, G, B) obtenue à partir des trois cartographies chimiques (vert pour celle à 1710 cm^{-1} , rouge pour celle à 1600 cm^{-1} et bleu pour celle à 1460 cm^{-1}) – f) Topographie AFM de l'objet obtenue en AFM en mode tapping – g) Image de microscopie électronique obtenue en microscopie électronique à balayage à partir des électrons rétrodiffusés par l'objet..... 145

Figure IV-15 : Analyse SEM-EDX de l'échantillon effectuée sur le quart supérieur de l'échantillon après l'analyse AFM-IR permettant d'obtenir la répartition de différents éléments atomiques dans l'ordre de gauche à droite et de haut en bas : le soufre S, le silicium Si, le Fer Fe, le magnésium Mg et l'oxygène O ; cette dernière carte de répartition a été comparée avec celle obtenue en AFM-IR à 1710 cm^{-1} et disposée côte à côte pour faciliter la comparaison. 146

Figure IV-16 : Étude spectrale de la coupe d'UCAMM de la Figure IV-14 – a) Image composite obtenue avec les cartographies à 1710 cm^{-1} (en vert) et à 1600 cm^{-1} (en rouge), les deux cercles en pointillés bleus indiquent l'emplacement des contaminations – b) Spectre FTIR global avec les courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des liaisons chimiques C=O et C=C; en encart, un agrandissement a été effectué sur la gamme spectrale du montage AFM-IR– c) Lignes de spectres obtenues en différents endroits de la coupe, leurs positions sont indiquées sur l'image a) ; les traits de couleurs indiquent les nombres d'onde où ont été acquises les cartographies chimiques utilisées en a)..... 146

Figure IV-17 : Étude des effets de phase lors de l'acquisition des cartographies IR en AFM-IR en mode tapping – a) Image de topographie – b) Image de phase observée lors de l'acquisition d'une cartographie chimique correspondante 147

Figure V-1 : Étude de l'internalisation des Nps de PLA par un macrophage THP-1 – a) Vue 3D de la cartographie chimique à 1770 cm^{-1} d'un macrophage– b), c) Agrandissements sur des zones d'intérêt contenant des nanoparticules. Des spectres locaux ont été enregistrés en différents points indiqués par les flèches de couleurs. La barre d'échelle représente 500 nm - Figure extraite de [162] 151

Figure V-2 : Essai d'imagerie hyperspectrale – a) Topographie de la zone d'intérêt, la matrice utilisée pour l'acquisition hyperspectrale est indiquée par un carré noir où à chaque intersection correspond à un spectre – b) Cartographie chimique à 1770 cm^{-1} – c) Image de l'absorption IR à 1770 cm^{-1} de la zone marquée par un carré jaune sur b) reconstituée à partir de l'image hyperspectrale 151

Figure V-3 : Interférogramme obtenu par la mesure photothermique sur un échantillon de poly(butylène téréphtalate) – Figure adaptée de [10] 153

Figure V-4 : Schéma du montage utilisé par Donaldson et al. – a) Montage du modulateur en fréquence sous vide – b) vue de profil du montage optique avec l'AFM – Figure extraire de [193]	154
Figure V-5 : Résultats obtenus en AFM-SR-IR par P. Donaldson et al. – a), b) Spectres obtenus par la mesure photothermique respectivement pour le polystyrène et le cyanoacrylate – c), d) Spectres obtenus sur les mêmes échantillons en microspectroscopie IR conventionnelle respectivement pour le polystyrène et le cyanoacrylate – Figure adaptée de [193]	155
Figure V-6 : Schéma simplifié du montage utilisé pour l'AFM-IR avec des sources continues – Le système AFM-IR (en noir) correspond au système commercial NanoIR2s- L'essentiel du montage repose sur l'ajout de deux éléments en amont : un modulateur en fréquence et un interféromètre de Michelson – Une lame séparatrice permet d'envoyer une partie du faisceau sur un détecteur MCT après son passage par les deux modules.....	156
Figure V-7 : Description du de l'interféromètre de Michelson – a) Photographie du montage intégrant l'interféromètre et montrant le chemin optique depuis le modulateur en fréquence (faisceau du haut) jusqu'au système AFM-IR (injection en bas à droite) – pour plus de clarté le trajet optique du laser a été figuré en rouge – b) Photographie du système interférométrique utilisé comprenant une séparatrice de ZnSe, un miroir mobile (à l'horizontale de l'image) et un miroir fixe.....	157
Figure V-8 : Étude du spectre du PP détecté par le MCT – a) Comparaison des spectres obtenus en fonction d'un changement important de la valeur du VSP – b) Comparaison de deux spectres obtenus lorsque le changement de valeur du paramètre est faible.....	158
Figure V-9 : Étude de fonctionnement de l'interféromètre de Michelson - a) Superposition de dix interférogrammes obtenus successivement - b) Spectre obtenu à partir de la transformée de Fourier de la moyenne des dix interférogrammes de a).....	159
<i>Figure V-10 : Description du modulateur en fréquence utilisé – a) Photographie du montage vu du dessus – pour plus de clarté le trajet optique du laser a été figuré en rouge, il est injecté depuis le trou en haut à droite et est transmis à l'interféromètre par le trou en haut à gauche – b) Schéma de principe d'une vue transversale du modulateur en fréquence permettant de voir les deux miroirs paraboliques intégrés dans un périscope.</i>	161
Figure V-11 : Étude de l'effet des vibrations du modulateur en fréquence - a) Résonance de contact du levier AFM avec ou sans modulateur en fréquence - b) Évolution de la valeur de résonance de contact en fonction de la fréquence du modulateur	162
Figure V-12 : Schéma de principe du montage avec deux tables optiques indépendantes...	163
Figure V-13 : Interférogrammes obtenus sur le détecteur MCT sans modulateur de fréquence (en noir) ou avec le modulateur de fréquence à 24 kHz (en rouge) - b), c) Agrandissements sur les interférogrammes obtenus respectivement sans modulateur en fréquence et avec le modulateur en fréquence à 24 kHz – La gamme d'échelle est conservée identique dans les deux cas	164
Figure V-14 : Comparaison des deux spots obtenus sur la pointe a) dans le cas du laser QCL - b) dans le cas du laser Novae (La fenêtre dans le cas du laser QCL est de 120 µm x 120 µm et de 240 µm x 240 µm pour le laser Novae).....	166
Figure V-15 : Interférogramme obtenu avec la pointe en observant le signal AFM-IR en fonction de la position du miroir mobile de l'interféromètre de Michelson.....	166
Figure V-16 : Spectre AFM-IR obtenu sur un film de PE avec et sans atténuation du laser incident	167

Figure V-17 : Spectres AFM-IR obtenu sur le film de PE avec le laser Novae en fonction de la fréquence du modulateur en fréquence	167
Figure V-18 : Spectres AFM-IR obtenu avec le laser Novae a) sur le film épais de PE - b) sur un dépôt de collagène épais.....	168
Figure V-19 : Expansion thermique au cours du temps d'un objet obtenu par modélisation COMSOL après un chauffage modélisant le tir laser Novae à t = 0 s - a) Cas du disque de PMMA de 2 μm d'épais - b) Cas d'une sphère de PMMA de 2 μm d'épais - dans les deux cas, la ligne en pointillée rouge indique le temps où le second tir laser devrait avoir lieu.....	170
Figure A-1 : Schéma de principe de fonctionnement d'un laser QCL avec deux régions actives séparé par le matériau d'injection : le schéma présente le diagramme d'énergie des bandes de conduction des différents puits ainsi que les niveaux d'énergie impliqués dans la transition, les flèches ondulées correspondent aux transitions électroniques, les flèches droites indiquent le flux d'électrons - figure extraite de [206].....	179
Figure A-2: Schéma de principe du laser supercontinuum Novae - adaptée de [190]	181

Liste des tableaux

Tableau 1: Table de référence de la position des sous-structures de la bande amide I (structures secondaires) dans l'eau (colonne de gauche) ou dans l'eau deutérée (colonne de droite) - Tableau extrait de [74]	64
Tableau 2 : Récapitulatif des conditions expérimentales de la dénaturation du collagène ...	107

Introduction générale

La spectroscopie d'absorption infrarouge est une technique de spectroscopie vibrationnelle très puissante pour la caractérisation de la matière. En sondant les vibrations moléculaires, elle permet de caractériser directement la nature chimique de l'échantillon avec un minimum de préparation et à priori sans connaissance nécessaire de l'échantillon. Le couplage de cette technique avec la microscopie optique pour donner la spectromicroscopie infrarouge a permis de combiner les capacités d'analyse de la spectroscopie d'absorption infrarouge à la localisation spatiale précise de l'information. La principale limite des techniques de microscopie infrarouge est qu'elles possèdent une faible résolution imposée par la limite de diffraction. En effet, dans le cas de la gamme de rayonnement infrarouge moyen (domaine d'énergie des liaisons chimiques de la matière organique), les longueurs d'onde observées sont comprises entre 2,5 μm et 20 μm . En conséquence, les meilleures résolutions atteignables sont supérieures au micron. Ce dernier point représente une forte limitation quant à la taille des objets étudiables.

Dépassez la limite de diffraction est un enjeu de taille dans le domaine de l'absorption infrarouge. Pour cela, un certain nombre de couplages entre la spectroscopie infrarouge et des techniques de microscopie autre que la microscopie optique a vu le jour. En 1984, A. Lewis et al. [1] et D. Pohl et al. [2] ont proposé d'utiliser des fibres optiques pour réaliser des mesures de champ proche optique permettant de dépasser la limite de diffraction inhérente aux mesures optiques classiques et donnant naissance à la technique dite SNOM (pour Scattering Near field Optical Microscopy). Ce couplage a été appliqué avec succès à la spectroscopie infrarouge notamment en 1998 par M. Hong et al. [3] en utilisant un laser à électron libre comme source infrarouge puis en 2000 par C. Michaels et al. [4] avec un laser de table, ouvrant la possibilité d'utiliser cette technique sans nécessité de grand instrument. Cependant, de nombreuses questions demeurent sur l'intensité locale de l'éclairement du fait des fibres employées ainsi que sur l'évaluation de la résolution spatiale atteinte avec ce type d'approche. Une autre solution proposée a été de réaliser un couplage de la spectroscopie infrarouge avec une autre technique de champ proche qui est la microscopie à force atomique. Cette technique de champ proche a été initialement développée par G. Binnig, C. Quate et Ch. Gerber en 1986 [5]. Elle repose sur la mesure d'interaction entre une sonde locale, formée d'un levier micrométrique avec au bout une pointe dont le rayon de courbure est nanométrique, et la surface de l'échantillon. Le but du couplage de la microscopie à force atomique avec la spectroscopie IR est de s'affranchir de la plupart des problèmes optiques grâce à la pointe de microscopie à force atomique qui est utilisée soit comme source de lumière secondaire, dans le cas de la technique s-SNOM (pour scattering SNOM), soit comme détecteur de l'absorption infrarouge dans la technique AFM-IR (pour Atomic Force Microscopy-based InfraRed spectroscopy).

La première mesure de s-SNOM infrarouge, effectuée par l'équipe d'A. C. Boccara en 1996 [6], [7], a pu montrer un contraste d'image infrarouge à une longueur d'onde donnée. En 2011, la technique a été couplée avec des sources continues permettant de réaliser des spectres locaux via la pointe du levier de microscopie à force atomique [8]. Dans la mesure s-SNOM, la pointe est utilisée comme source de lumière. En focalisant le faisceau sur une pointe métallique, il va être possible de générer une source d'illumination infrarouge secondaire à partir de l'effet de pointe. Le levier de microscopie à force atomique va être utilisé dans un mode oscillant pour pouvoir moduler l'interaction entre la pointe (sonde) et la surface

(échantillon). Le signal qui sera détecté lors de l'interaction sera alors le signal des photons rétrodiffusés par l'échantillon. En reliant la modulation de l'illumination à l'oscillation du levier, il va être possible de connaître la quantité de photons diffusés par la partie de l'échantillon qui se retrouve directement sous la pointe. Par calcul, il est possible d'extraire du signal optique diffusé et d'obtenir l'indice de réfraction local de l'échantillon [9]. Si la source utilisée est continue, il est possible de moduler le signal diffusé par un interféromètre de Michelson et obtenir ainsi un interférogramme. Celui-ci peut, après traitement mathématique, permettre d'approcher le spectre d'absorption infrarouge local [8]. Le principal avantage de la technique est qu'il permet d'accéder à un ensemble de mesures physiques autre que l'absorption infrarouge via la mesure de l'indice de réfraction local de l'échantillon et donc d'avoir accès à des mesures comme celle du champ électrique local dans des matériaux [10]. En contrepartie, la mesure qui est faite contient à la fois la partie réelle et imaginaire de l'indice optique. Or seule cette dernière contient l'information sur l'absorption infrarouge. En conséquence, pour avoir accès à l'absorption locale, il est nécessaire de calculer l'indice réel de l'objet et ensuite d'extraire l'information d'absorption. Ce calcul peut s'avérer difficile dans le cas d'objets complexes et très hétérogènes. C'est cette limitation qui a conduit au développement d'une autre technique permettant une mesure directe de l'absorption infrarouge.

La seconde technique de couplage possible entre la spectroscopie infrarouge et la microscopie à force atomique est la technique AFM-IR. La preuve de concept de cette technique a été publiée en 2005 par A. Dazzi et al. [11]. Dans ce couplage, la pointe du levier de microscopie à force atomique est utilisée comme détecteur permettant de mesurer la dilatation thermique d'un objet suite à l'illumination par un faisceau infrarouge pulsé accordable en longueur d'onde. Cette technique fait suite aux mesures d'augmentation de température induite par effet photothermique effectuées par A. Hammiche et al. en 1999 [12]. Le principal avantage de la technique AFM-IR par rapport au s-SNOM est que la mesure de l'expansion thermique est directement proportionnelle à l'absorbance infrarouge de l'objet situé sous la pointe [13]. En utilisant des sources accordables en longueur d'onde, il est donc possible d'effectuer des mesures directes de spectroscopie d'absorption infrarouge à l'échelle submicrométrique et donc de dépasser la limite de diffraction de la microscopie optique. Cette possibilité a fait que la technique a connu un réel succès marqué notamment par le dépôt d'un brevet en 2007 et la commercialisation en 2011 du premier système AFM-IR (NanoIR1, Anasys Instruments). Si la preuve de concept a été effectuée avec un laser à électron libre, le système commercial actuel utilise une source infrarouge de table : un oscillateur paramétrique optique. L'utilisation de ce type de source permet une grande flexibilité du système et a été employée dans de nombreuses applications [14], [15].

Le but de ma thèse va être de présenter les différents développements qui ont eu lieu dans le domaine de l'AFM-IR à partir de cette configuration initiale commercialisée en 2011, comme l'AFM-IR en résonance forcée, l'AFM-IR en mode tapping ou les débuts du développement de l'AFM-IR avec des sources spectralement continues. Ces développements majeurs s'appuient sur des modifications de la configuration de base comme notamment le remplacement de l'oscillateur paramétrique optique par un laser à cascade quantique. Ces lasers ont permis d'étendre les champs d'application de la technique. Cela a eu aussi pour conséquence de populariser la technique et de voir une rapide augmentation du nombre d'utilisateurs. Cependant, l'AFM-IR reste une technique récente et non triviale à maîtriser, car elle demande à la fois des connaissances en microscopie à force atomique, mais aussi en spectroscopie infrarouge.

Les dernières avancées technologiques ont permis de s'approcher de la résolution nanométrique. Les conséquences sont multiples, mais une question se pose : les règles qui ont jusque-là régi l'AFM-IR sont-elles toujours applicables à l'échelle nanométrique ? Qui dit nouveaux domaines dits nouvelles problématiques, mais surtout nouveaux challenges expérimentaux. Il est donc important d'identifier les verrous technologiques et limitations associés pour garder un esprit critique sur ce qui peut être ou non obtenu avec la technique AFM-IR et éviter des erreurs d'interprétation et/ou d'analyse qui pourraient avoir des conséquences néfastes dans les champs d'applications étudiés. Dans ce contexte, ce manuscrit a pour but de présenter les quatre principaux développements majeurs menés durant la période de thèse soit par notre équipe soit par des équipes d'autres laboratoires et se découpera en cinq chapitres :

- Chapitre I : « État de l'art de la technologie AFM-IR » - Dans cette partie, les principes des deux techniques à l'origine du couplage AFM-IR, la spectroscopie infrarouge et la microscopie AFM, seront présentés. Puis la technique AFM-IR avant les développements issus de la thèse sera présentée, avec notamment une discussion sur les principaux verrous technologiques qui ont poussé à l'amélioration de la technique.
- Chapitre II : « AFM-IR en résonance forcée » - Dans ce chapitre, l'un des développements majeurs de l'AFM-IR, la mise en place de la mesure en résonance forcée, sera présenté. Ce développement proposé pour la première fois par F. Lu et al. en [16] repose sur l'utilisation des lasers à cascades quantiques qui permettent d'exploiter au mieux l'expansion thermique en amplifiant le signal observé et ainsi d'atteindre de meilleures résolutions. Une description théorique ainsi que les travaux de thèse réalisés dans le but de caractériser ce mode d'acquisition seront décrits. Pour finir, une discussion autour des limitations et des avantages de ce développement instrumental sera menée.
- Chapitre III : « Enjeux méthodologiques de l'éclairage pour la mesure AFM-IR » - Le but de ce chapitre est de présenter un changement de configuration d'éclairage en AFM-IR qui a eu lieu en parallèle de la mise en place de la résonance forcée. Les avantages indéniables de ce mode d'éclairage sont présentés puis je discuterai des nouveaux challenges expérimentaux apportés par l'utilisation de cette configuration notamment l'utilisation de pointes en silicium recouvertes d'or. Enfin, l'application directe de ce type d'éclairage sera illustrée par deux exemples de projets, menés durant ma thèse, portant sur la mise en place de mesures corrélatives, soit avec de la microscopie optique non linéaire dans le but d'étudier la dénaturation thermique du collagène, soit avec la microscopie électronique pour caractériser des protéines fibrillaires d'origine bactérienne.
- Chapitre IV : « AFM-IR en mode tapping » - Cette partie présentera un autre développement mené durant ma thèse qui est la mise en place du couplage de la spectroscopie infrarouge avec un autre mode d'acquisition AFM : le mode oscillant intermittent aussi appelé mode tapping. L'utilisation de ce mode permet d'analyser de nouveaux objets jusque-là inaccessibles à la mesure en mode contact, car soit trop mou soit peu adhérent à la surface. Après une présentation de la preuve de concept et d'une description théorique de la technique AFM-IR en mode tapping, deux applications réalisées durant la thèse (sur les nanoparticules polymériques et sur les micrométéorites ultra-carbonées d'Antarctique) illustreront l'intérêt de ce mode d'acquisition et permettront de discuter de ses limitations.
- Chapitre V : « Acquisitions hyperspectrales en AFM-IR : enjeux et défis ». Dans ce dernier chapitre, il sera abordé un dernier développement instrumental, commencé durant ma thèse, qui consiste à faire évoluer la technique vers des mesures hyperspectrales. Ce développement nécessite l'utilisation de sources continues

spectralement : les lasers supercontinuum ou le rayonnement synchrotron. Les travaux préliminaires réalisés durant ma thèse seront présentés et une discussion sera menée sur les difficultés rencontrées lors de la mise en place de ce couplage, les perspectives d'évolution et les futurs challenges.

Une conclusion générale résumera les principaux développements instrumentaux présentés dans ce manuscrit et les conséquences de ces développements sur la mesure AFM-IR.

À ce manuscrit s'ajoutent deux annexes :

- L'annexe A, dans laquelle est détaillée le principe de fonctionnement des trois sources IR utilisées lors de ma thèse à savoir : la source OPO, le laser QCL et le laser supercontinuum Novae.
- L'annexe B, dans lequel sera détaillé une description théorique de l'AFM-IR en mode sinusoïdal, mode de mesure potentiel qui n'a pas encore été mis en place expérimentalement

Chapitre I : État de l'art de la technologie AFM-IR

L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit de thèse possède un objectif commun : l'amélioration et l'optimisation des différentes configurations de la technique de nanospectroscopie infrarouge appelée AFM-IR. Pour pouvoir comprendre et discuter ces résultats, il est nécessaire de rappeler les points essentiels servant de base à ce travail. C'est l'objet de ce premier chapitre.

La technique AFM-IR est un instrument de caractérisation chimique, à l'échelle submicrométrique, couplant la spectroscopie infrarouge (noté par la suite IR) et la microscopie à force atomique (acronyme anglophone AFM). Ce couplage bénéficie des avantages des deux techniques : les deux premières parties vont donc décrire ces deux techniques que sont la spectroscopie IR et la microscopie AFM, puis la dernière partie décrira le couplage donnant lieu à la mesure AFM-IR. Lors de cette description, un état de l'art instrumental sera détaillé. Celui-ci servira de socle pour l'ensemble des développements présentés ensuite. Notons qu'au cours des cinq dernières années, plusieurs configurations de la technique ont vu le jour. Dans la suite du manuscrit pour distinguer la configuration originale de l'ensemble des autres développements, la technique présentée dans ce chapitre sera appelée « AFM-IR classique », car elle reste pour le moment la configuration qui a donné lieu au plus grand nombre de publications. Cette description sera aussi l'occasion de reprendre la théorie de l'AFM-IR avec un nouveau formalisme simplifié. Celui-ci est nécessaire pour décrire théoriquement les développements instrumentaux discutés dans les chapitres suivants, à savoir l'AFM-IR en résonance forcée et l'AFM-IR en mode tapping. Ce chapitre se terminera par la description des différentes limitations de la technique AFM-IR classique, limitations qui ont motivé les développements instrumentaux présentés dans les chapitres suivants.

I. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie est l'étude de l'interaction entre la matière et une onde électromagnétique. Plusieurs phénomènes peuvent intervenir : absorption de photon par l'échantillon qui passe alors dans un état excité, émission d'un photon par un échantillon préalablement excité ou encore diffusion de la lumière. Ces phénomènes dépendent à la fois des caractéristiques du rayonnement et des propriétés physico-chimiques des objets composant l'échantillon. Dans le domaine IR, ce sont les niveaux vibrationnels des liaisons chimiques qui sont sollicités. Pour l'étude des vibrations moléculaires des molécules organiques, la gamme de longueurs d'onde utilisée est comprise entre $2,5 \mu\text{m}$ à $25 \mu\text{m}$ soit en nombre d'onde de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} . L'étude de l'absorption IR sur le moyen IR est donc un outil très puissant de caractérisation chimique.

1. Indice optique et absorption

D'un point de vue physique, l'interaction entre le rayonnement électromagnétique et l'échantillon étudié dépend des propriétés optiques de ce dernier. Dans le cas le plus simple qui est celui d'un matériau transparent, isotrope, infini et non absorbant, une onde électromagnétique de longueur d'onde λ en interaction avec ce matériau voyage à une vitesse v donnée par :

$$v(\lambda) = \frac{c}{n(\lambda)} \quad (\text{I-1})$$

Avec c la célérité (ou vitesse de propagation) de la lumière dans le vide et $n(\lambda)$ l'indice de réfraction optique du matériau à la longueur d'onde considérée.

Cet indice est un indice réel dans le cas simple où il n'y a pas d'absorption de photons. Dans le cas où les phénomènes d'absorption sont pris en compte, l'indice optique possède également une partie imaginaire qui rend compte de cette absorption :

$$\tilde{n}(\lambda) = n(\lambda) + i\kappa(\lambda) \quad (\text{I-2})$$

Avec $n(\lambda)$ la partie réelle de l'indice optique et $\kappa(\lambda)$ la partie imaginaire, aussi appelée coefficient d'extinction.

L'intensité du rayonnement électromagnétique ayant traversé un échantillon absorbant d'épaisseur d s'écrit à partir de la loi de Beer-Lambert :

$$I_t(\lambda) = I_{inc}(\lambda) \cdot e^{-\frac{4\pi\kappa d}{\lambda}} \quad (\text{I-3})$$

Avec $I_t(\lambda)$ l'intensité transmise à travers l'échantillon et $I_{inc}(\lambda)$ l'intensité incidente.

Dans le domaine de l'infrarouge, au lieu de la longueur d'onde λ , l'unité utilisée est le nombre d'onde σ avec $\sigma = 1/\lambda$. Le nombre d'onde σ est exprimé en cm^{-1} , on a alors :

$$I_t(\sigma) = I_{inc}(\sigma) e^{-4\pi\sigma\kappa d} \quad (\text{I-4})$$

La transmittance T est définie par le ratio entre l'intensité transmise et l'intensité incidente. Plus fréquemment, on suit l'évolution de l'absorbance qui est définie de la manière suivante :

$$A(\sigma) = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \frac{4\pi d}{\ln(10)} \sigma\kappa(\sigma) \quad (\text{I-5})$$

Dans le domaine du moyen IR, l'énergie des photons considérés correspond aux transitions vibrationnelles des liaisons chimiques des molécules. Les atomes de part et d'autre de la liaison peuvent être modélisés comme un système de deux masses reliées par un ressort. Dans ce cas-là, l'excitation de la liaison chimique par l'absorption d'un photon peut être assimilée à une excitation extérieure appliquée sur le système masses-ressort. Le comportement du système peut alors être décrit comme un oscillateur harmonique amorti excité par une fréquence ω , qui est celle de l'onde électromagnétique considérée. Par la résolution de l'équation du mouvement de l'oscillateur harmonique, il est possible d'exprimer le coefficient d'extinction en fonction d'un nombre d'onde :

$$\kappa(\sigma) = \frac{\kappa_{max}\Delta^2}{4(\sigma_0 - \sigma)^2 + \Delta^2} \quad (\text{I-6})$$

Avec κ_{max} qui correspond au maximum de $\kappa(\sigma)$ (c'est-à-dire quand $\sigma = \sigma_0$) et Δ qui correspond à la largeur à mi-hauteur du potentiel harmonique du ressort.

Cette définition du coefficient d'extinction montre que dans le cas de la spectroscopie IR celui-ci n'a pas une valeur discrète à un nombre d'onde unique, mais qu'il existe un

élargissement de la bande sur une gamme spectrale donnée (qui va être fonction du potentiel harmonique considéré). Ce qui est observé en spectroscopie IR est donc un spectre de bandes et non pas un spectre de raies comme dans le cas de la spectroscopie atomique. Les bandes sont définies par le coefficient d'extinction de chaque vibration moléculaire en fonction de la gamme de nombres d'onde observée. D'un point de vue physique, cette structure en bande du spectre d'absorption IR est due aux différents états rotationnels que possède la molécule pour un état vibrationnel donné. Dans le cas de la matière condensée (phase liquide ou solide), ces états rotationnels ne sont plus discrets et forment un continuum d'énergie qui peut être influencé par les paramètres extérieurs comme notamment l'état de la matière, l'état cristallin ou amorphe, mais aussi l'environnement chimique.

Du fait du modèle utilisé, la résonance du nombre d'onde σ_0 est liée aux paramètres définissant le système masses-ressort défini précédemment :

$$\sigma_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_l}{m^*}} \quad (\text{I-7})$$

Avec k_l la constante de raideur associée au ressort représentant la liaison chimique et m^* la masse réduite associée aux deux masses représentant les atomes.

La valeur de la résonance du nombre d'onde va donc varier en fonction des atomes impliqués et du type de liaison chimique. À l'inverse, à partir de la détermination de la valeur de la résonance, il est possible de connaître la nature des atomes de la liaison chimique. La constante de raideur varie en fonction de la force de la liaison chimique impliquée entre les deux atomes (liaison simple, double ou triple) ainsi que du type de vibration considérée : élongation, cisaillement ou torsion qui peuvent être soit symétriques soit antisymétriques (Figure I-1). Une liaison chimique donnée peut posséder plusieurs modes possibles de vibrations et donc plusieurs bandes d'absorption. De même, en fonction de l'environnement de la liaison chimique, la constante de raideur du ressort/liaison chimique peut être modifiée comme dans le cas d'un couplage de la liaison considérée avec une liaison hydrogène.

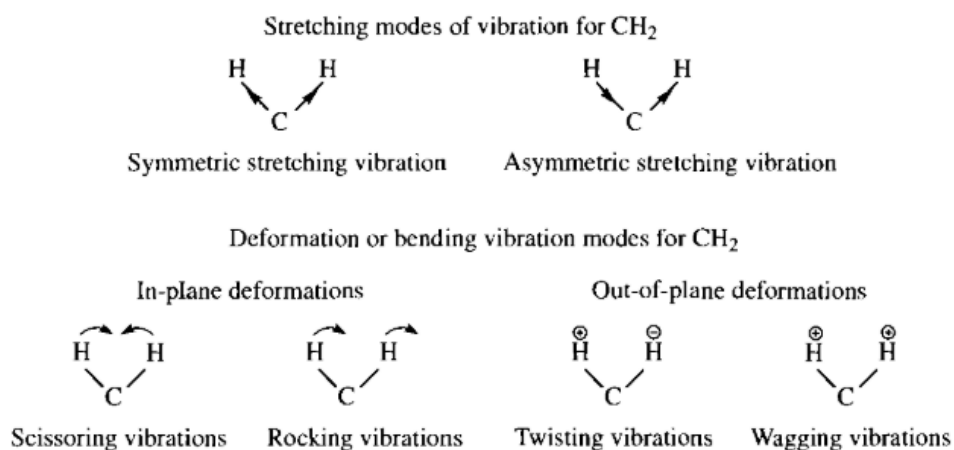


Figure I-1 : Schéma récapitulatif des différentes vibrations moléculaires possibles dans le cas d'un groupement -CH₂ - Figure extraite de [17]

En conséquence, en observant la variation du coefficient d'extinction en fonction d'un nombre d'onde, il va être possible d'identifier les différentes liaisons chimiques d'une molécule donnée. En observant la position de la résonance du nombre d'onde pour une liaison donnée, il est aussi possible d'avoir accès à des informations physico-chimiques sur cette liaison. L'étude de l'absorption infrarouge se révèle donc un outil puissant pour la caractérisation chimique.

2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Pour mesurer le spectre infrarouge d'un échantillon, la technique la plus utilisée est la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (abrégée spectroscopie FTIR par la suite). Dans cette partie, le principe de fonctionnement de cette technique ainsi que les deux configurations d'éclairages seront présentés. Puis un spectre d'absorption IR classique sera décrit.

a) Principe de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Un schéma de principe d'un spectrophotomètre IR à transformée de Fourier est donné en Figure I-2. La source utilisée est une source continue en nombre d'onde analogue à un corps noir et qui va émettre sur l'ensemble de la gamme du moyen IR. L'élément clé est l'interféromètre de Michelson. Il est constitué d'une lame séparatrice ainsi que de deux miroirs, l'un mobile et l'autre fixe. Le rayonnement émis par la source est séparé en deux au niveau de la séparatrice qui va transmettre 50% de l'intensité du faisceau sur le miroir mobile (miroir M2 dans le schéma de la Figure I-2) et réfléchir 50% de l'intensité du faisceau sur le miroir fixe (miroir M1 dans le schéma de la Figure I-2). Les deux faisceaux vont alors être réfléchis par les miroirs et en repassant par la séparatrice vont converger vers le détecteur en passant par l'échantillon. Le signal brut obtenu sur le détecteur est un interférogramme qui correspond à une signature de l'intensité en fonction de la différence de trajet optique (aussi appelée différence de marche) entre chaque faisceau.

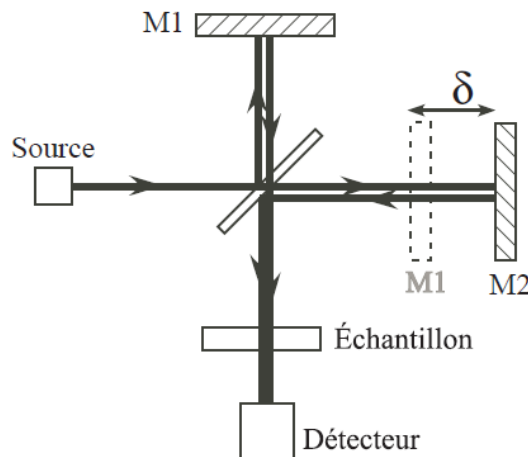


Figure I-2 : Schéma de principe d'un spectromètre à transformée de Fourier

Dans le cas d'un rayonnement monochromatique de longueur d'onde λ , l'intensité détectée par le détecteur est la suivante :

$$I(\delta) = T(\lambda) \cos\left(\frac{2\pi\delta}{\lambda}\right) \quad (\text{I-8})$$

Avec $T(\lambda)$ la transmission de l'échantillon à la longueur d'onde λ et δ la différence de marche entre les miroirs M1 et M2 de l'interféromètre.

L'expression peut être exprimée en fonction du nombre d'onde :

$$I(\delta) = T(\sigma) \cos(2\pi\sigma\delta) \quad (\text{I-9})$$

Comme indiqué précédemment, la source de lumière utilisée en spectroscopie FTIR est une source continue en nombre d'onde. Ce rayonnement continu permet d'observer les bandes IR dans leurs intégralités. En conséquence, pour représenter cette continuité du rayonnement, l'intensité doit être intégrée sur l'ensemble de la gamme spectrale. Dans ce cas, l'expression de l'intensité détectée devient :

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} T(\sigma) \cos(2\pi\sigma\delta) d\sigma \quad (\text{I-10})$$

La grandeur intéressante à mesurer n'est pas l'intensité sur le détecteur, mais la transmission en fonction du nombre d'onde. Pour cela, on peut appliquer une transformée de Fourier inverse à l'intensité :

$$T(\sigma) = \int_0^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\sigma\delta) d\delta \quad (\text{I-11})$$

À partir de cette formule, on constate que dans le cas d'une source polychromatique, il suffit de connaître la correspondance entre le nombre d'onde et la différence de marche optique pour pouvoir reconstituer un spectre de transmission. En conséquence, et c'est le principal avantage de cette technique, un spectre infrarouge peut être acquis sur l'ensemble de la gamme spectrale en faisant varier la position du miroir mobile de l'interféromètre de Michelson. Cela permet d'acquérir un nombre de spectres importants en un temps limité. Par cette accumulation, il est possible d'obtenir un très bon rapport signal sur bruit à partir d'un spectre obtenu en moyennant plusieurs centaines d'acquisitions. De plus, il apparaît que la résolution ne dépend pas directement de la source infrarouge, mais du déplacement du miroir. En utilisant des systèmes interférométriques très performants couplés à des sources infrarouges très intenses que sont les rayonnements synchrotrons, il est alors possible d'atteindre des résolutions spectrales très élevées comme dans le cas des mesures effectuées sur la ligne Ailes du synchrotron Soleil ou à l'Institut Paul Scherrer du synchrotron Swiss Light Source.

b) Les deux principales configurations d'éclairage en spectroscopie IR

Plusieurs configurations d'éclairage et de détection sont possibles. Dans cette partie, les deux configurations les plus utilisées, la transmission et la réflexion totale atténuée (notée par la suite ATR), vont être présentées.

La première configuration est la transmission. Elle correspond à la configuration déjà illustrée sur le schéma de principe de la Figure I-2. Dans cette configuration, le faisceau IR est focalisé de sorte à traverser l'échantillon puis aller sur le détecteur situé derrière. Cette configuration est assez versatile, mais nécessite de contrôler l'épaisseur de l'échantillon pour permettre au faisceau IR d'atteindre le détecteur sans trop d'atténuation. De même, le substrat sur lequel repose l'échantillon doit être transparent à l'IR pour permettre la transmission du faisceau.

La seconde configuration est la configuration en réflexion totale atténuée (Figure I-3) [18], [19]. Cette solution est utilisée pour l'étude d'échantillons liquides, épais, voire opaques ou déposés sur un substrat non transparent dans l'IR. Dans cette configuration, l'échantillon est placé sur un cristal transparent à l'IR dans lequel va être injecté le faisceau IR. Les propriétés du matériau ainsi que la géométrie sont définies de sorte que le faisceau IR subisse soit une seule soit de multiples réflexions totales avant d'atteindre le détecteur (Figure I-3 a)). À chaque réflexion totale, une onde évanescente est produite à l'interface entre le cristal et l'échantillon (Figure I-3 b)).

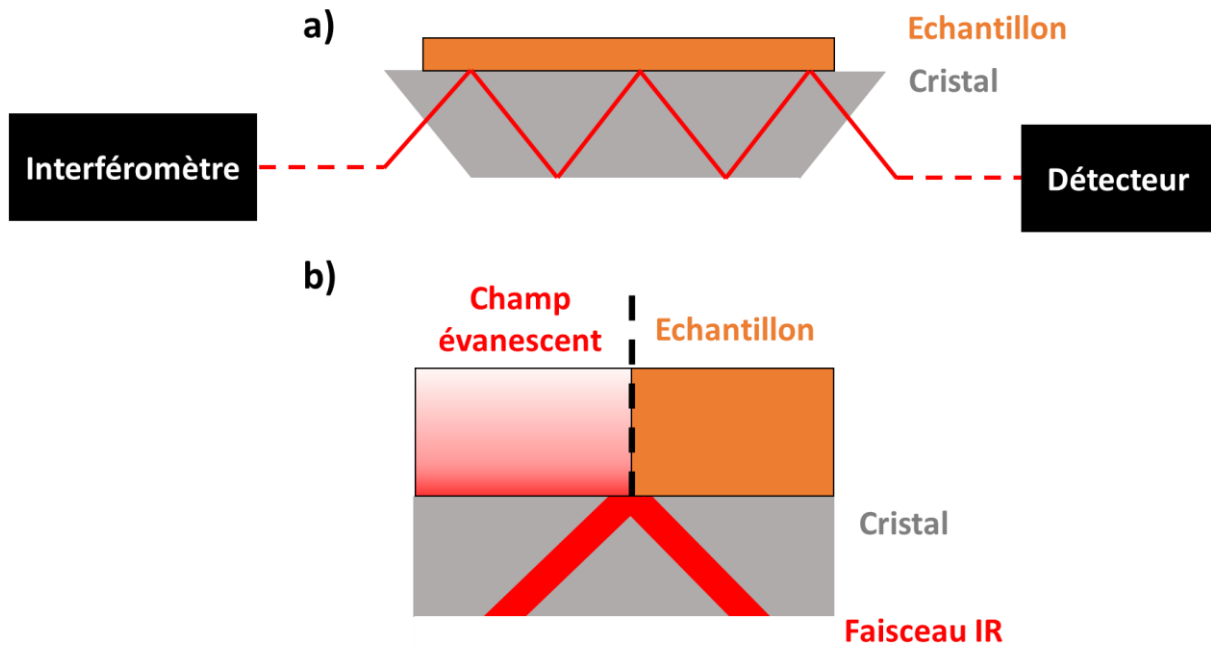


Figure I-3 : Description du mode ATR - a) Schéma d'un montage avec un éclairage ATR à multiples réflexions - b) Détails de l'éclairage de l'échantillon par un champ évanescent généré à l'interface cristal/échantillon par une réflexion totale du faisceau IR

Si l'échantillon possède une absorption IR à un nombre d'onde donné, il va interagir avec le faisceau via l'onde évanescente, ce qui va conduire in fine à la diminution de l'intensité du faisceau à ce nombre d'onde lors de chaque réflexion. C'est cette diminution d'intensité totale pour un nombre de réflexions donné qui va être détectée et permettre d'obtenir un spectre d'absorption IR. L'onde évanescente produite possède les mêmes propriétés spectrales que le faisceau initial hormis la distribution de son intensité : celle-ci est maximale au niveau de l'interface et décroît fortement à mesure que l'on s'en éloigne. La profondeur de pénétration du champ évanescent d_p peut être définie par l'équation suivante [20]:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - (n_2/n_1)^2}} \quad (I-12)$$

Avec λ la longueur d'onde du rayonnement considéré, n_1 qui est l'indice optique du cristal et n_2 celui de l'échantillon et θ l'angle d'éclairage du faisceau IR.

En conséquence, la pénétration de l'onde évanescente va varier d'un matériau à un autre et le plus souvent ne pas dépasser l'ordre du micron.

c) Description d'un spectre FTIR dans le moyen IR

La position en nombre d'onde du pic d'absorption IR d'une liaison chimique dépend de la masse des atomes impliqués ainsi que de la constante de raideur associée à la liaison chimique, c'est-à-dire si celle-ci est simple, double ou triple (équation (I-7)). Pour une molécule donnée, l'ensemble des liaisons chimiques va posséder plusieurs bandes d'absorption lui conférant une

signature spectrale propre. Un exemple de table d'identification des liaisons chimiques à partir de la position du maximum de la bande d'absorption est donné en Figure I-4.

Dans la gamme du moyen IR (allant de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1}), deux régions sont généralement distinguées : la région des groupes fonctionnels et la région dite de l'empreinte digitale. La région des groupes fonctionnels s'étend de 4000 cm^{-1} à 1500 cm^{-1} et correspond à la gamme d'absorption des vibrations d'élongation des principales liaisons chimiques. La région de l'empreinte digitale s'étend de 1500 cm^{-1} à 400 cm^{-1} (indiquée par un carré rouge sur la Figure I-4) et comprend un ensemble de bandes plus complexes à interpréter.

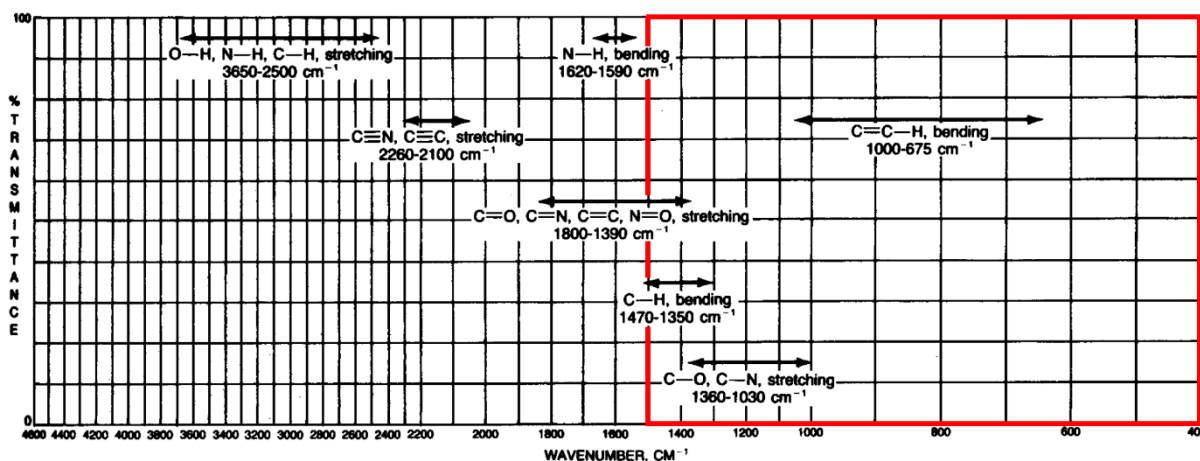


Figure I-4 : Exemple de table d'identification des liaisons chimiques en fonction de la position en nombre d'onde du maximum de la bande d'absorption - La partie encadrée en rouge correspond à la région de l'empreinte digitale

Un exemple de spectres d'absorption IR obtenus par spectroscopie FTIR est donné Figure I-5. À partir de ces deux spectres, il est possible de comparer le cas de figure où l'échantillon analysé est une espèce chimiquement pure comme ici le poly(méthyl-acrylate) (PMMA) (spectre en bleu) ou un objet chimiquement complexe comme ici une bactérie (spectre en rouge). Dans les deux cas, les bandes d'absorption IR ont une largeur à mi-hauteur qui est au minimum de l'ordre de la dizaine voire de la vingtaine de cm^{-1} . Ceci est dû au fait que les objets sont dans un état condensé, ce qui va conduire à l'élargissement du domaine énergétique d'une vibration donnée. De même, un continuum d'absorption peut se former dans le cas où les énergies des vibrations chimiques sont très proches soit au sein de la même liaison ou dans le cas de liaisons chimiques proches comme c'est le cas pour les liaisons chimiques $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ et $-\text{OCH}_3$ par exemple. Dans le cas du PMMA, les bandes d'absorption observées sont relativement bien définies et permettent une identification facile de l'ensemble des vibrations. Dans le cas d'échantillons plus complexes chimiquement, comme c'est le cas des objets biologiques illustré ici avec l'exemple de la bactérie (spectre en rouge), l'absorption de plusieurs espèces chimiques peut conduire à une superposition de plusieurs bandes d'absorption sur une même gamme spectrale comme par exemple dans le cas de l'élongation du groupement $\text{P}=\text{O}$. Il peut s'avérer plus compliqué d'interpréter ce type de spectres contenant les absorptions de multiples objets et cela peut limiter la quantité d'information chimique accessible notamment au niveau d'une molécule donnée. Si maintenant on compare les deux spectres l'un à l'autre, on constate que malgré leurs divers degrés de complexités, ceux-ci ont des signatures spectrales très différentes qui permettent facilement de les distinguer.

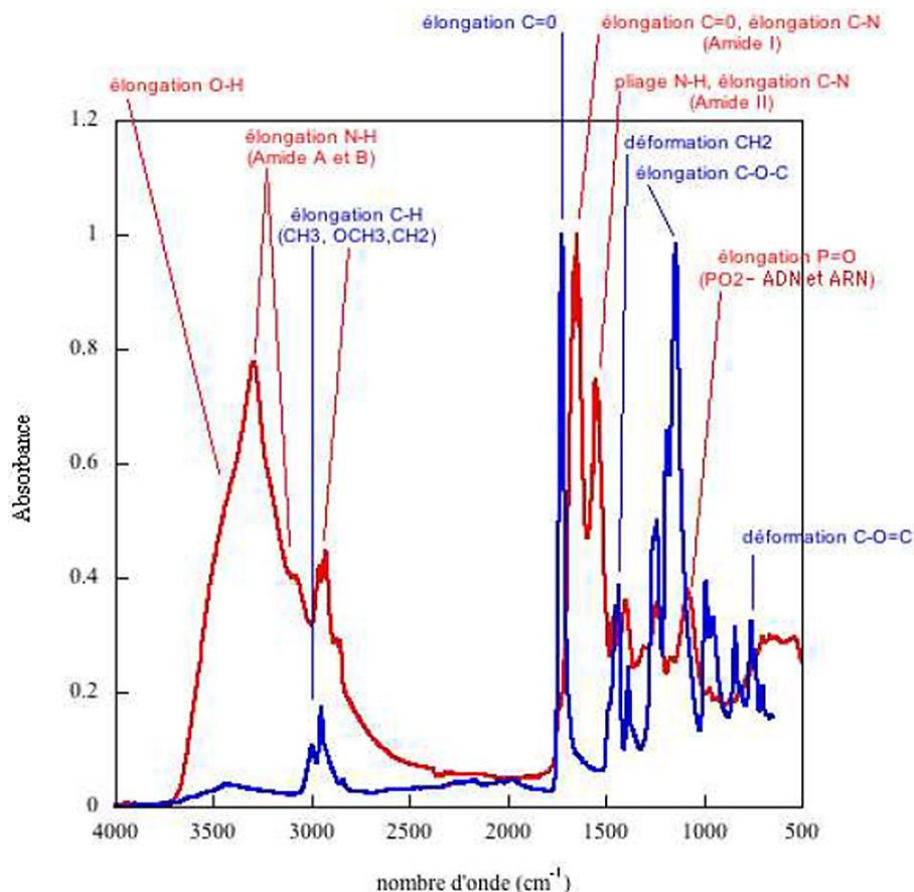


Figure I-5 : Exemple de spectres d'absorption IR obtenus dans le cas d'une bactérie (en rouge) et de poly(méthyl-acrylate) (PMMA) (en bleu) où il est possible d'identifier les principales bandes d'absorption.

3. Microspectroscopie IR

La spectroscopie IR peut être un très bon outil de caractérisation chimique. Néanmoins sans résolution spatiale, il est difficile de discriminer les différentes espèces constituant un mélange complexe hétérogène du fait des propriétés d'additivité de la loi de Beer-Lambert.

Pour répondre à cette problématique, la spectroscopie FTIR a été combinée avec des techniques de microscopie optique comme la microscopie confocale [21], [22] ou la microscopie plein champ combinée avec une matrice plan-focal (aussi appelé détecteur FPA) [23]. Dans cette partie, la première des deux combinaisons, la spectromicroscopie IR confocale, va être présentée. Dans cette technique, l'illumination optique est faite de sorte à être focalisée au niveau de l'échantillon tout en passant entre deux diaphragmes, l'un conjugué avec la source et l'autre avec le détecteur (Figure I-6). Le premier diaphragme, situé au niveau de la source, permet de filtrer le faisceau incident pour atteindre la résolution voulue. Il est suivi d'une lentille qui permet de focaliser le faisceau IR incident sur l'échantillon. Le second diaphragme est situé au niveau du détecteur et a pour rôle de ne récupérer que le signal IR issu du plan focal de l'objectif. En balayant latéralement l'échantillon, il est possible de reconstituer l'image 2D de l'échantillon. En variant la profondeur de l'objectif, il est possible de sonder différents plans focaux. La combinaison des balayages latéraux et en profondeur permet de faire une étude complète de l'échantillon grâce à l'acquisition de spectres d'absorption IR localisés.

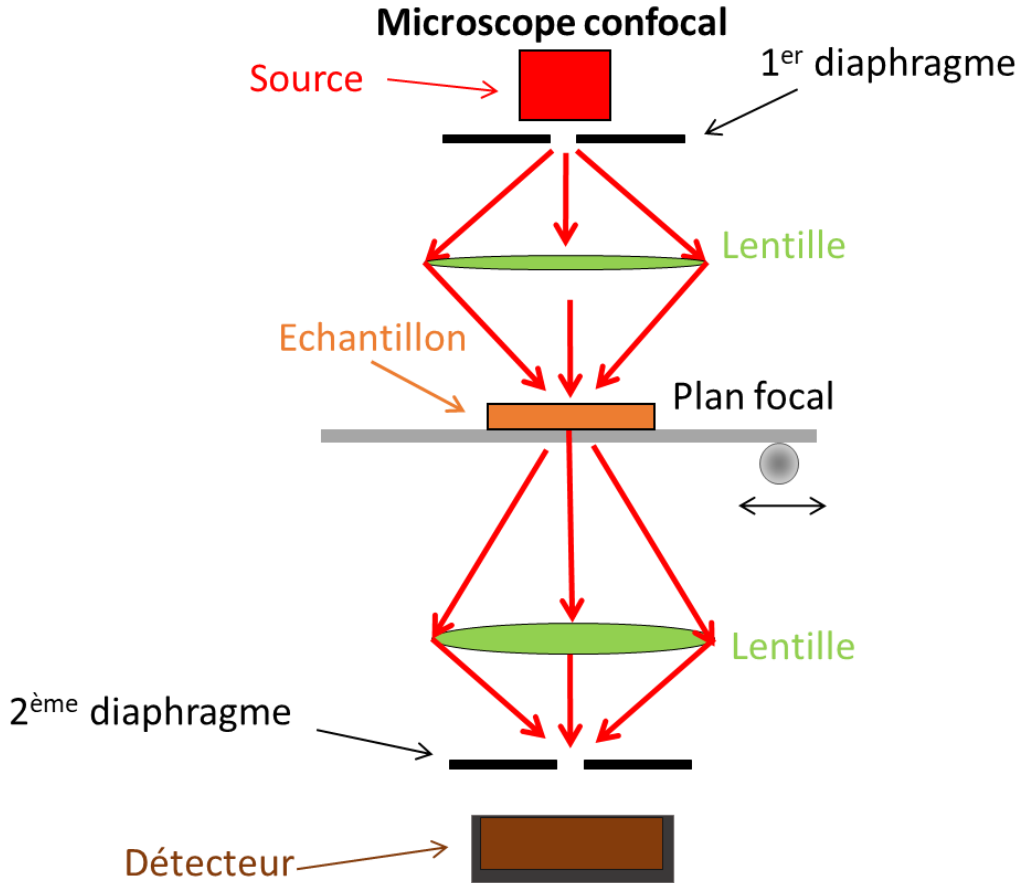


Figure I-6 : Schéma de principe de la microscopie confocale

En microscopie, la résolution latérale est définie comme la distance minimale à laquelle il est possible de distinguer deux objets. Elle est donnée par le critère de Rayleigh. À partir de ce critère, il est possible de définir la résolution par la formule suivante [24]:

$$\Delta x > 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \theta} \quad (I-13)$$

Avec Δx la distance séparant deux objets, λ la longueur d'onde du rayonnement considéré, $n \sin \theta$ appelé ouverture numérique et qui comprend deux termes, n qui est l'indice optique du milieu entre l'objectif et l'échantillon et θ l'angle d'ouverture de l'objectif.

À partir de cette formule, on constate que la limite de résolution latérale dépend de deux facteurs principaux : la longueur d'onde considérée et l'ouverture numérique de l'objectif du microscope. En jouant sur ce dernier paramètre, il est possible d'améliorer la résolution latérale sans pour autant pouvoir dépasser une limite physique qui est fixée par la longueur d'onde de l'éclairage. La gamme spectrale du moyen IR va des longueurs d'onde de 2,5 μm à 25 μm . En considérant une ouverture numérique égale à 1, cela signifie que dans le meilleur des cas la résolution latérale accessible ne sera pas inférieure à 1,5 μm . Cela apparaît comme une forte limitation en termes d'applications. De plus, du fait que la limite de résolution est directement reliée à la longueur d'onde, cela signifie que pour un même objet la taille minimale du pixel va varier en fonction de la gamme spectrale sondée. Prenons par exemple le cas d'une cellule eucaryote. L'une des bandes d'absorption caractéristiques des lipides est à 2920 cm^{-1}

c'est-à-dire à 3 μm . En considérant l'ouverture numérique encore égale à 1, cela signifie que la résolution latérale maximale accessible est ici de 1,83 μm . Si maintenant l'absorption observée est celle de la bande amide I des protéines, la longueur d'onde caractéristique est de 6 μm . Dans ce cas-là, la résolution latérale maximale accessible est de 3,66 μm . Il y a donc une différence d'un facteur deux entre les résolutions latérales accessibles pour ces deux composés cellulaires. En conséquence, si le but de la mesure est d'étudier simultanément la répartition des deux espèces chimiques, il est nécessaire d'utiliser la résolution latérale la plus basse et donc de dégrader la résolution dans le cas des lipides [25].

À cette limite physique s'ajoutent des limitations expérimentales. Dans le cas spécifique de la spectromicroscopie IR confocale, les meilleures résolutions spatiales latérales possibles sont atteintes grâce aux trous de filtrage. Cela nécessite d'utiliser des sources IR les plus intenses possible, comme le rayonnement synchrotron, pour compenser le signal perdu du fait des diaphragmes [26], [27]. Le corollaire est que l'amélioration de résolution latérale se fait au détriment de l'intensité du signal obtenu sur la fenêtre et peut amener à une forte dégradation du rapport signal sur bruit.

En conclusion, la spectroscopie infrarouge est un outil très puissant pour caractériser les molécules organiques. Le domaine de l'IR moyen correspond à la gamme d'énergie d'excitation des vibrations moléculaires. En observant l'absorption IR d'un objet en fonction du nombre d'onde, il est possible de remonter aux liaisons chimiques qui le composent, mais aussi parfois à des informations plus spécifiques comme son environnement chimique. L'utilisation de systèmes interférométriques permet d'acquérir un nombre important de spectres en un temps restreint et d'obtenir de façon simple un spectre moyen avec un très bon rapport signal sur bruit. Couplée à la microscopie optique, l'étude de l'absorption IR peut être exploitée à son maximum en la reliant à une information spatiale précise permettant alors des études IR locales pour un échantillon donné. Cette technique est très utilisée et les champs d'application de la spectromicroscopie IR sont vastes allant de la biologie, à la physique en passant à l'étude des matériaux [28]. La principale limitation de ce couplage est la résolution latérale qui est fixée par la longueur d'onde d'étude. Cette limitation impose de ne pas pouvoir étudier d'objets de taille inférieure au micron. Dépasser cette limite de résolution latérale pour avoir une résolution submicrométrique et indépendante de la longueur d'onde est un enjeu de taille. Une des solutions proposées a été de remplacer la microscopie optique utilisée par une technique de microscopie de champ proche. L'une de ses techniques est la microscopie à force atomique (noté par la suite AFM).

II. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique de microscopie de champ proche qui a été développée par G. Binnig, C. Quate et Ch. Gerber en 1986 [5]. Cette technique apparaît alors comme une alternative à la microscopie à effet tunnel, une autre technique de champ proche développée en 1981 par G. Binnig et H. Rohrer, car cette dernière nécessite que la surface analysée soit conductrice [29] alors que l'AFM permet d'étudier tout type de surface.

Comme toute technique de microscopie de champ proche, l'AFM permet de détecter des interactions entre une sonde locale et la surface de l'échantillon. Ici, la sonde est formée d'un levier de dimensions micrométriques (plusieurs centaines de micromètres de longueur, pour quelques dizaines de micromètres de largeur et quelques microns d'épaisseur) à l'extrémité duquel se trouve une pointe dont le rayon de courbure peut aller du nanomètre à quelques

dizaines de nanomètres. À titre d'exemple, une image de microscopie électronique à balayage (notée par la suite MEB) de l'extrémité d'un levier AFM et d'une pointe en silicium est donnée en Figure I-7.

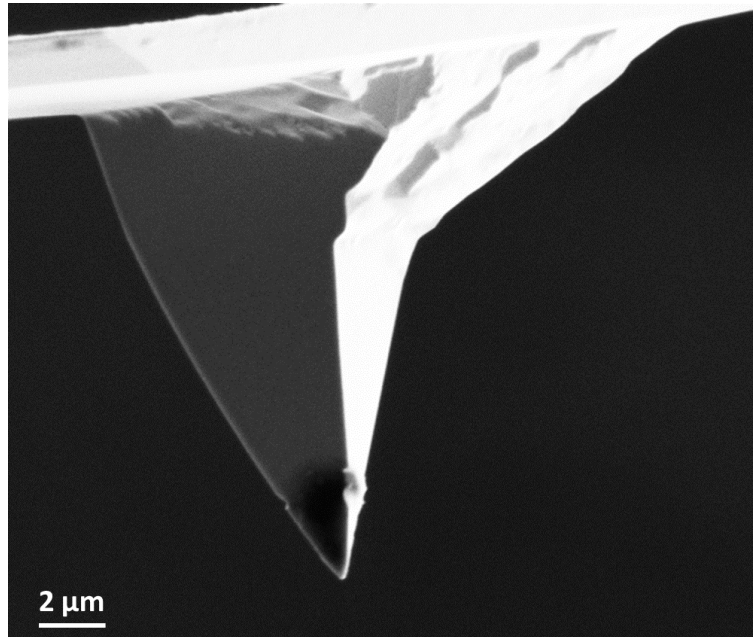


Figure I-7 : Image de MEB de l'extrémité d'un levier AFM en silicium avec la pointe

Via cette pointe, le levier va pouvoir interagir avec la surface de l'échantillon et être soumis à des champs de forces attractives (type Van der Waals ou forces d'adhésion) ou répulsives (contact avec la surface, forces électrostatiques). L'application de ces forces sur la pointe va être transmise au levier qui va alors se déformer par rapport à sa position d'équilibre. Cette déformation est appelée *déflexion*. En fonction de la nature de la force (attractive ou répulsive), le levier va subir différents modes de torsions (Figure I-8).

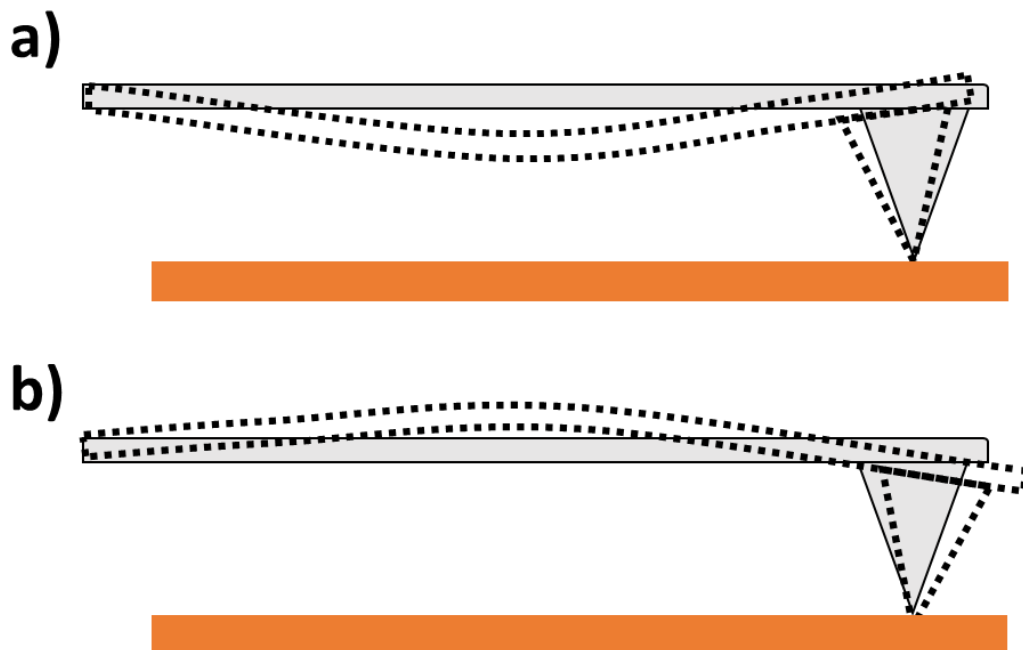


Figure I-8 : Schéma présentant la déflexion du levier dans le cas où a) la force appliquée sur la pointe est répulsive, b) la force appliquée sur la pointe est attractive

Les mouvements de flexion du levier permettent de mesurer les forces appliquées sur la pointe par la surface. Pour mesurer ces mouvements, la solution communément utilisée est une diode laser réfléchiée par le levier vers un détecteur photodiode 4-cadrans. La réflexion est centrée au milieu du détecteur lorsque le levier est à sa position d'équilibre, hors contact de l'échantillon. Une fois en contact et selon la déflection du levier, la position de la réflexion de la diode laser va se déplacer sur un des quatre cadrans et induire une différence de tension. En polarisant la tension en fonction de la position spatiale du laser sur le cadran (haut-bas et gauche-droite), il est possible d'avoir accès directement au mouvement du levier. La mesure de la différence haut/bas permet de détecter les mouvements de flexion et le signal gauche/droite sert à définir les mouvements de torsion liés aux phénomènes de friction. À partir de ces mesures, il est possible d'en déduire la topographie de la surface en déplaçant le levier dans le plan latéral (x, y). Pour assurer cela, il est nécessaire d'utiliser un système de rétroaction (Figure I-9). En conséquence, le système AFM est un système versatile qui permet de mesurer des forces d'interactions locales en un point ou d'imager la topographie de la surface d'un échantillon donné.

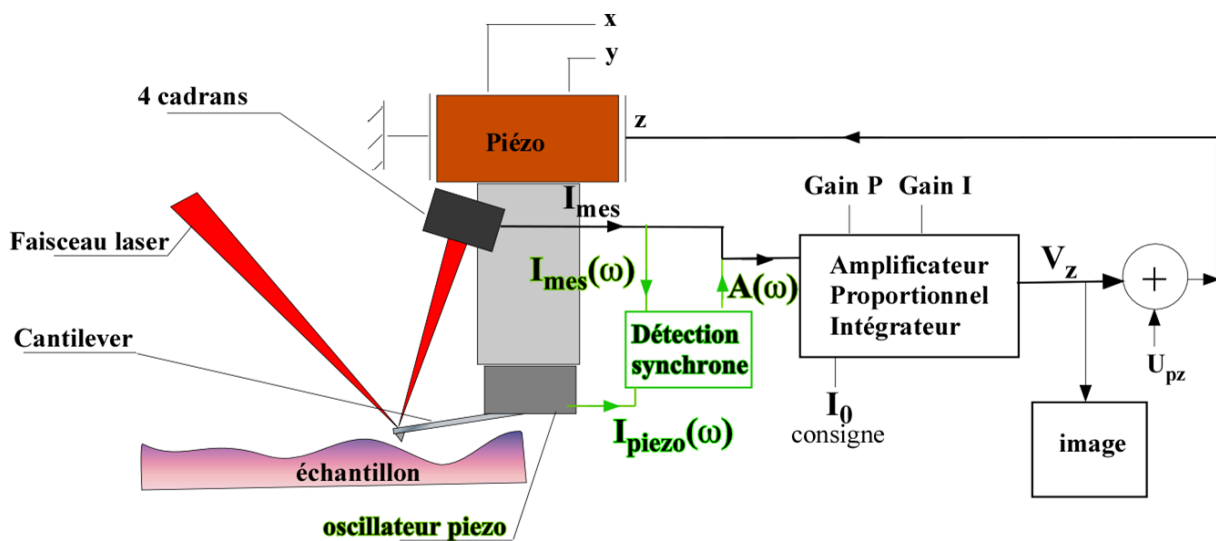


Figure I-9 : Schéma de principe d'un système AFM utilisant une diode laser et une photodiode 4-cadrans comme système de détection de la déflection du levier

D'un point de vue de l'utilisation pour l'imagerie, plusieurs modes d'acquisitions ont été développés, notamment le mode statique contact et le mode oscillant en contact intermittent, aussi appelé mode tapping.

Dans le mode contact, la pointe du levier AFM est maintenue en contact avec la surface de l'échantillon. Les seules forces détectées sont alors les forces répulsives. Dans la configuration qui est la plus couramment utilisée pour imager la topographie de la surface en mode contact, la déflection du levier est maintenue constante au cours du balayage de la surface. Pour cela, on maintient constante au cours de la mesure la force de quelques nanoNewtons appliquée au niveau de la pointe. Dès qu'il y a une variation de cette force du fait d'une modification du contact avec la surface, notamment dans le cas où un objet se trouve sur la trajectoire de la pointe, le système va corriger la position verticale de la pointe selon l'axe z grâce à la boucle de rétroaction de façon à conserver la force initiale. Il est alors possible d'obtenir directement la topographie de la surface en détectant en chaque point les variations de hauteur corrigées par rétroaction (Figure I-10).

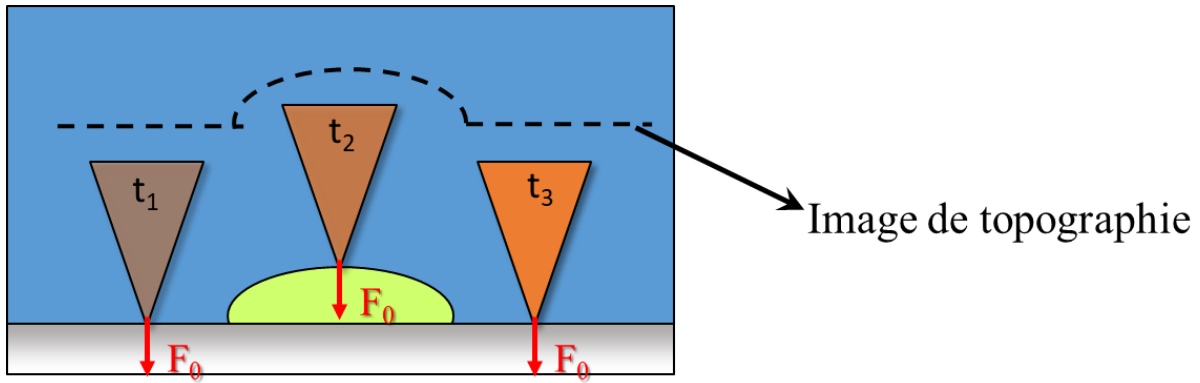


Figure I-10 : Principe de l'acquisition d'une image de topographie en AFM en mode contact – La position de la pointe est ici figurée à trois temps différents au cours de la mesure permettant de maintenir une force constante F_0 quelles que soient les variations au niveau de la surface

Pour le mode tapping, le levier est contraint d'osciller lors de la mesure [30]. D'un point de vue mécanique, un levier AFM peut être assimilé à une poutre. De manière analogue à la poutre, le levier possède des modes propres d'oscillation [31]. La fréquence de l'oscillation du levier est choisie de manière à être égale à celles d'un des modes propres du levier. Pour imaginer la surface dans ces conditions, la boucle de rétroaction est paramétrée de sorte que l'amplitude de l'oscillation reste constante au cours du balayage. Pour cela, la position verticale du levier doit être corrigée en chaque point, ce qui permet d'avoir directement accès à la topographie de manière analogue au mode contact présenté précédemment. Contrairement aux variations de topographie, les variations d'amplitude d'oscillations dues à la dissipation d'énergie lors du contact vont se traduire par un changement de la phase de la résonance du levier. Ces variations de dissipation d'énergie étant liées à des variations de propriétés mécaniques au sein de l'échantillon, il est alors possible d'imager en même temps les variations de topographie et de mécanique en distinguant les variations d'amplitude de celles de la phase [32]. Du fait du contact intermittent avec l'échantillon, les forces de cisaillement sont réduites lors de variations de topographie de l'objet, le mode tapping est considéré comme un mode plus approprié que le mode contact lorsqu'il s'agit d'imager des objets fragiles et/ou peu adhérents à la surface [30]. En revanche, du fait du temps de réponse de la boucle rétroaction en amplitude, la variation maximale de topographie de l'objet doit être beaucoup plus faible qu'en contact sous peine d'endommager la pointe ou de ne pas pouvoir imaginer correctement la surface.

Que ce soit en mode contact ou en mode tapping, la résolution latérale maximale d'un microscope AFM est définie par les dimensions de la pointe. Il est donc possible d'atteindre des résolutions de l'ordre du nanomètre avec des systèmes commerciaux classiques. Hormis la microscopie électronique, les résolutions atteignables avec les systèmes AFM en font une des techniques les mieux résolues spatialement. De plus, les mesures AFM peuvent être effectuées à l'air, dans l'eau [33] comme dans le vide [34], ce qui en fait une technique robuste et applicable pour de nombreux champs d'application [35], [36]. Cette diversité de conditions d'application couplées à la possibilité de caractériser l'échantillon tout en mesurant des forces locales a conduit aux développements de techniques dérivées [37]–[39], mais aussi de couplages avec d'autres techniques déjà connues, dont la spectroscopie infrarouge.

Le but du couplage entre la microscopie AFM et la spectroscopie infrarouge est d'obtenir des informations locales chimiques. Pour réaliser ce couplage, deux solutions sont possibles. La première technique est la technique s-SNOM (pour scattering Scanning Near-field Optical

Microscope) [9]. Elle consiste à utiliser la pointe comme source d'illumination secondaire en la faisant interagir avec le faisceau incident. Le signal détecté n'est alors pas directement l'absorption IR, mais la résultante de l'interaction des photons de la source secondaire avec l'échantillon. La seconde solution consiste à utiliser la pointe AFM comme détecteur de la résultante locale de l'absorption IR par l'échantillon. Deux résultantes peuvent être détectées de cette manière : la variation de température locale de l'échantillon [12] ou l'expansion photothermique de l'objet à la suite de l'absorption IR.

Cette dernière technique est l'AFM-IR (pour microscopie AFM couplée à l'absorption IR). Elle a été développée par A. Dazzi et la preuve de concept a été faite en 2005 [11]. Son but est d'étudier l'expansion photothermique d'un objet éclairé par un faisceau pulsé en utilisant la microscopie AFM en mode contact et d'en déduire l'absorption IR. Le principe de cette méthode a été breveté en 2007 et en 2011 un premier système a été commercialisé (NanoIR1, Anasys Instruments). Depuis, cette technique connaît un réel succès et a été utilisée dans de nombreux champs d'applications comme l'étude de polymères [40]-[42], la biologie [43]-[46], l'étude du patrimoine [47] ou encore des thématiques de physique comme l'étude des plasmons [48], [49]. La suite de ce chapitre va se focaliser sur la description de la technique AFM-IR qui sera qualifiée de « classique ». La technique AFM-IR classique correspond au système commercial appelé NanoIR1 (Anasys Instrument), avec comme source IR un oscillateur paramétrique optique (noté par la suite OPO). Cette configuration a été utilisée pour l'ensemble des applications ayant eu lieu avant ma thèse. Elle reste la base commune à l'ensemble des développements ultérieurs. La description de cette technique et la compréhension de son fonctionnement sont donc essentielles.

III. Mesure IR locale : détection de l'effet photothermique

1. Description d'une mesure AFM-IR classique

a) Principe et montage expérimental

La technique appelée AFM-IR est une technique récente utilisant une source infrarouge pulsée couplée à un microscope à force atomique (AFM) en mode contact. Ce couplage va permettre de détecter les effets photothermiques en suivant la déformation de l'échantillon se situant sous la pointe AFM en contact avec la surface. Le principe est le suivant : lorsqu'un objet absorbe un rayonnement infrarouge, une partie de l'énergie absorbée est directement convertie en chaleur. Cela génère une augmentation locale de température qui conduit à une déformation de l'objet du fait de la dilatation thermique. Cette déformation locale peut alors être détectée par l'AFM en mode contact. Comme les échelles de temps des phénomènes mis en jeu (absorption, dilatation...) sont très courtes par rapport au temps de réponse du levier AFM, la dilatation thermique, transférée via la pointe, va être ressentie comme un choc par le levier. Ce dernier va se mettre à osciller sur ces modes propres. Ce sont les amplitudes des oscillations ainsi générées pour chaque nombre d'onde sélectionné qui vont pouvoir être enregistrées via le détecteur photodiode 4-cadrans. Généralement, les oscillations observées par ce type d'approche sont des oscillations amorties. L'amortissement est essentiellement dû ici aux frictions de la pointe avec la surface et aux déplacements du levier dans l'air.

Le système utilisé pour la mesure AFM-IR classique est représenté en Figure I-11. Le montage est constitué d'un système AFM standard pouvant fonctionner en mode contact à

l'air libre, d'un prisme d'un matériau transparent dans la gamme du moyen IR sur lequel est déposé l'échantillon et d'une source IR pulsée accordable en nombre d'onde qui éclaire l'échantillon en réflexion totale à travers le prisme.

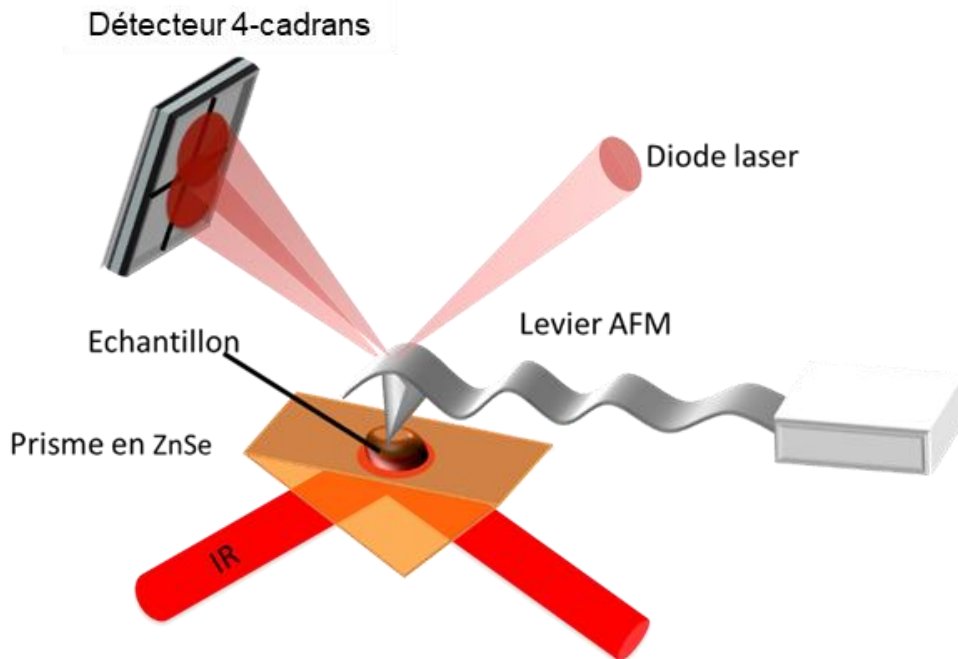


Figure I-11 : Schéma de principe de l'AFM-IR classique

Le système AFM utilisé est similaire à celui décrit précédemment dans le cas du mode contact. Dans le système commercial, le microscope AFM utilisé permet d'effectuer des balayages sur des fenêtres allant de $80\ \mu\text{m}$ par $80\ \mu\text{m}$ à $3\ \mu\text{m}$ par $3\ \mu\text{m}$. Le support utilisé pour la mesure est un prisme d'un matériau transparent dans le moyen infrarouge. Le système commercial a été conçu plus spécifiquement pour l'usage de prisme en séléniure de zinc (ZnSe). Ce matériau a l'avantage d'être à la fois transparent dans l'ensemble de la gamme du moyen IR avec une transmittance supérieure à 70 % entre $700\ \text{cm}^{-1}$ et $4000\ \text{cm}^{-1}$, mais aussi dans le domaine du visible, ce qui permet l'utilisation d'un laser d'alignement visible et facilite l'optimisation de l'alignement des optiques pour la mesure. L'éclairement de l'objet se fait par une source IR pulsée accordable en nombre d'onde. Le faisceau IR est injecté par-dessous l'échantillon dans une configuration de réflexion totale. Dans le système commercial, l'angle d'éclairement au niveau de l'interface prisme-objet est choisi pour qu'une onde évanescente soit produite au niveau de cette interface. C'est donc une situation expérimentale analogue à celle de la spectroscopie ATR (cf. p. 9). Cela permet d'avoir un éclairement relativement homogène d'un objet de faible épaisseur, quel que soit son indice optique, tout en limitant au maximum l'éclairement de la pointe et du levier qui pourrait fortement perturber la mesure.

b) Acquisition, traitement et analyse du signal en AFM-IR

Le signal brut en AFM-IR correspond à l'oscillation du levier engendrée par l'expansion thermique rapide de l'objet. D'un point de vue dynamique, cette oscillation générée est majoritairement une flexion du levier selon l'axe Z et va produire un signal caractéristique sur le détecteur 4-cadrans. Grâce à un oscilloscope, il va être possible de visualiser en simultané le signal d'oscillation du levier obtenu en chaque point pour chaque tir ou impulsion laser (noté $Q(t)$) et la transformée de Fourier de ce signal (notée $\tilde{Q}(\omega)$) (Figure I-12). En effet, en appliquant

un algorithme de transformée de Fourier rapide (noté FFT par la suite), il est possible de passer d'un signal temporel à un signal dans le domaine fréquentiel. Dans ce domaine, il va être possible de visualiser les différents modes propres du levier excités par le choc ainsi que leurs amplitudes relatives (Figure I-12 b)). Les modes propres du levier sont appelés résonance de contact, car leur position en fréquence est non seulement fonction des propriétés mécaniques et géométriques du levier, mais aussi des interactions de contact entre la pointe et la surface et impliquent les propriétés mécaniques de cette dernière. Toute l'information nécessaire pour décrire le mouvement du levier peut être directement obtenue en observant l'excitation de ces résonances de contact. L'énergie due à l'excitation va se répartir entre les différentes résonances de contact. Pour la mesure de l'absorbance, l'analyse des différentes résonances de contact va donner des informations équivalentes pour un échantillon donné. Ce qui peut varier est la répartition relative de l'énergie dans les différents modes. De manière générale pour un échantillon donné, le signal obtenu est filtré de manière à observer la résultante d'une seule des résonances de contact, le plus souvent la seconde harmonique, car c'est celle qui reçoit généralement le plus d'énergie de l'excitation. En comparant la variation de l'amplitude de la résonance de contact sélectionnée en fonction des paramètres de mesures variés (position de la pointe ou nombre d'onde du laser), il est possible d'effectuer deux types d'acquisitions AFM-IR.

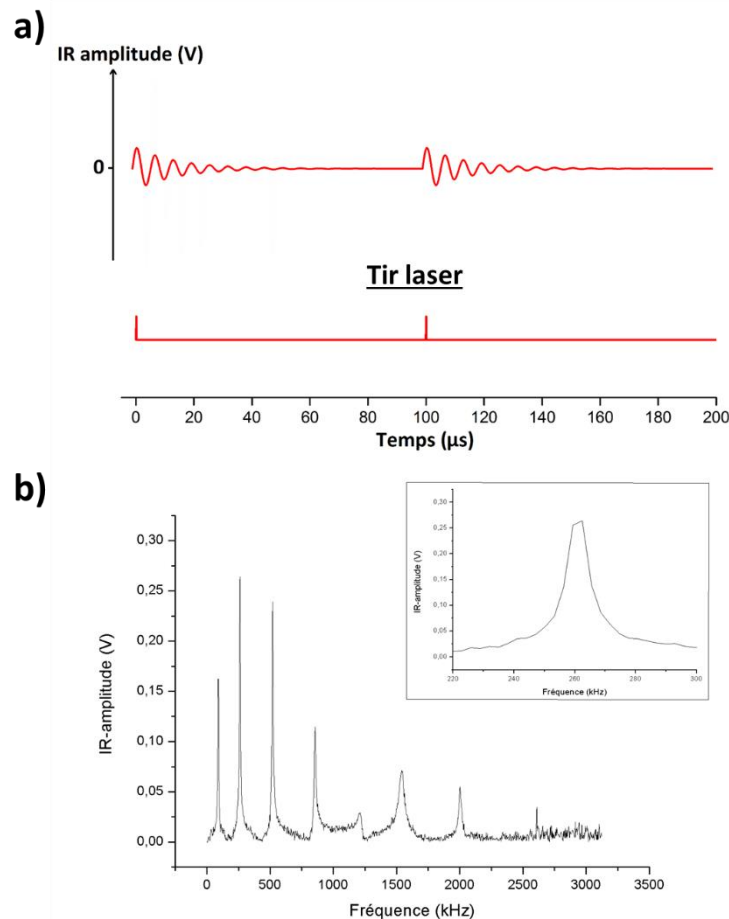


Figure I-12 : Signaux acquis en AFM-IR classique – a) Signal $Q(t)$ correspondant à l'oscillation du levier au cours du temps et en fonction du pulse laser initial – b) Transformée de Fourier du signal $Q(t)$ qui permet de visualiser les différentes résonances de contact du levier excitées par un pulse laser, en encart un zoom sur la résonance de contact qui correspond à la première harmonique

Dans le premier cas, l'acquisition obtenue est une cartographie chimique à un nombre d'onde donné. Dans le second cas, le résultat obtenu est un spectre d'absorption local du matériau situé directement sous la pointe. Ces deux modes sont complémentaires dans l'information qu'ils vont apporter c'est-à-dire soit une information de répartition spatiale de l'absorbance pour un nombre d'onde fixé, dans le premier cas, soit une information chimique complète, mais en un point dans le second cas. Le plus souvent, les deux acquisitions sont effectuées séquentiellement pour permettre l'accès à l'ensemble de l'information chimique.

i) Cartographie chimique

Dans ce mode d'acquisition, le nombre d'onde de la source IR est fixé pendant le balayage de la surface par la pointe. En chaque point de la surface, la pointe doit avoir un temps de résidence qui permet d'observer les oscillations du levier sous l'effet du tir laser au nombre d'onde sélectionné. En effet, pour améliorer la qualité du rapport signal sur bruit, il est nécessaire de moyennner les oscillations obtenues sur plusieurs tirs laser et d'extraire le signal moyen. Plus l'absorption à ce nombre d'onde sera importante et plus l'amplitude de l'oscillation de la pointe à ce point sera importante. En enregistrant la déflexion du levier en chaque point, il va alors être possible de reconstituer simultanément la topographie de la surface (dont le signal est une variation de la déflexion à une fréquence inférieure au kilohertz) et l'absorption de l'objet sous la pointe au nombre d'onde considéré (qui va induire des variations de déflexion de fréquence supérieure à la dizaine de kilohertz). C'est cette différence de fréquence des deux phénomènes qui permet la mesure simultanée. Cependant, pour éviter d'introduire des artefacts, il est nécessaire de fixer les paramètres de sorte qu'il y ait concordance entre la mesure AFM et la mesure d'expansion thermique. Pour cela, la vitesse de balayage doit être telle que le temps d'acquisition de la mesure AFM corresponde au temps d'acquisition de la mesure AFM-IR, fixé par le nombre de tirs laser considérés. Les lois énoncées par B. Lahiri et al. permettent de calculer ce temps d'acquisition en fonction de la source IR utilisée [50]. Un exemple d'acquisition simultanée sur une cellule eucaryote est donné en Figure I-13. Dans ce cas, on obtient en même temps la topographie de l'objet ainsi que la cartographie chimique à un nombre d'onde où absorbe une des liaisons chimiques d'un élément constitutif de l'objet (ici la fonction amide I des protéines). L'objet ici est relativement homogène d'un point de vue chimique. Cependant si l'objet est complexe et possède plusieurs espèces chimiques différentes, il est possible de localiser précisément l'une de ces espèces en effectuant une cartographie chimique à un nombre d'onde où elle est la seule à avoir une absorption IR.

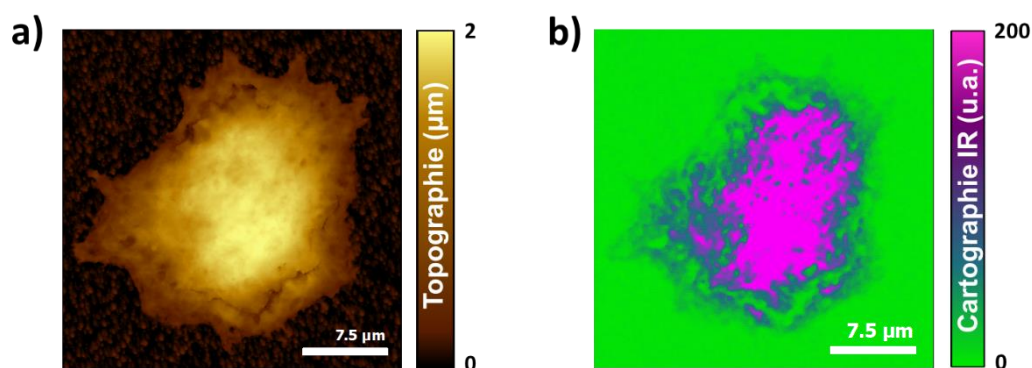


Figure I-13 : Exemple d'acquisition de cartographie chimique obtenue en AFM-IR dans le cas d'une cellule de macrophage THP-1 – a) Topographie AFM – b) Cartographie chimique obtenue à 1660 cm^{-1} , nombre d'onde situé dans une des bandes d'absorption des protéines

ii) Spectroscopie locale

Dans cette configuration, une topographie est préalablement acquise. La pointe est ensuite positionnée au niveau de la zone d'intérêt et le laser est accordé aux différents nombres d'ondes. Pour chaque nombre d'onde, l'amplitude de l'oscillation est mesurée. Il est alors possible de reconstituer séquentiellement un spectre d'absorption sur l'ensemble de la gamme balayée par le laser à partir de l'amplitude de l'oscillation du levier pour chaque nombre d'onde (Figure I-14).

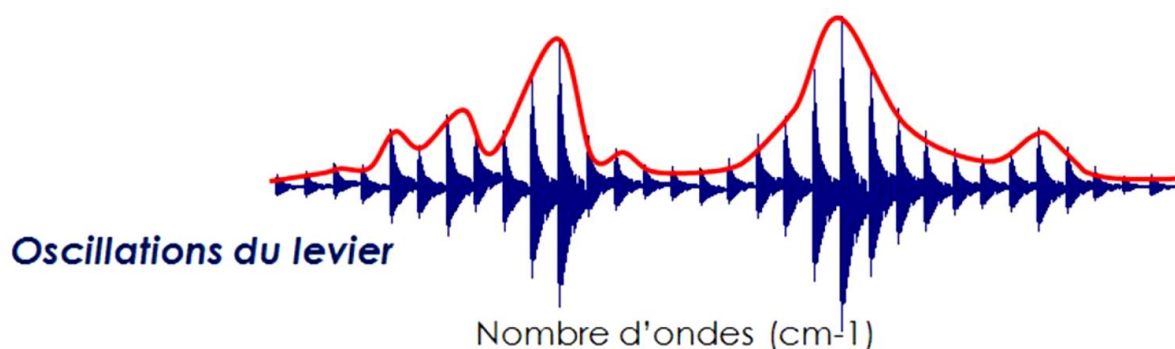


Figure I-14 : Exemple de spectre local (en rouge) obtenu séquentiellement en observant l'oscillation du levier pour chaque nombre d'onde utilisé par le laser (en bleu)

Ce type d'acquisition permet donc d'obtenir des spectres d'absorption IR très localisés. La comparaison des spectres ainsi obtenus avec ceux obtenus en spectroscopie FTIR a montré que les spectres obtenus en AFM-IR étaient identiques à ceux obtenus en spectroscopie FTIR [11], [51]. Grâce à l'AFM-IR, il est donc possible d'effectuer des caractérisations analogues à celle faite avec la spectroscopie infrarouge classique, mais à une échelle beaucoup plus petite.

2. Description théorique de l'AFM-IR

La théorie qui va être présentée ici est basée sur la théorie présentée dans l'article de A. Dazzi et C. Prater dans le journal Chemical Reviews en 2017 [14]. Elle correspond à une remise à jour de la théorie présentée initialement dans A. Dazzi et al. dans le Journal of Applied Physics en 2010 [13] avec un nouveau formalisme utile pour la description de la théorie de l'AFM-IR en mode de résonance forcée (Chapitre II) et de l'AFM-IR en mode tapping (Chapitre IV).

a) Absorption optique

La puissance d'un rayonnement absorbée par l'échantillon peut être obtenue par la formule suivante :

$$P_{abs} = \int_V \frac{\pi c \epsilon_0}{\lambda} \Im m(\tilde{n}(\lambda)^2) \|E_{loc}\|^2 dV \quad (I-14)$$

Avec V le volume de l'échantillon, λ la longueur d'onde du rayonnement, E_{loc} le champ électrique local dans l'échantillon et $\Im m(\tilde{n}(\lambda))$ la partie imaginaire de l'indice optique de l'objet.

La quantité de puissance absorbée est fortement dépendante du champ électrique local E_{loc} . Ce paramètre peut être compliqué à calculer, notamment si le champ électrique local considéré est hétérogène dans le volume de l'échantillon étudié. Cependant dans le cas des études en AFM-IR, la taille de l'échantillon peut être considérée inférieure à la longueur d'onde du rayonnement infrarouge. Cela permet de considérer que le champ électrique local est constant. De plus, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'absorption reste faible et donc que dans le cas de l'indice de réfraction optique complexe, on a : $n^2 \gg \kappa^2$. Avec ces deux approximations, il est possible de simplifier l'équation (I-14) :

$$P_{abs} = I_{inc} \alpha_{opt} V \sigma \kappa(\sigma) \quad (I-15)$$

Où α_{opt} est un terme qui contient toutes les constantes et les paramètres optiques. Ce terme ne dépend que de l'indice de réfraction optique et de la célérité de la lumière. Dans le cas des mesures AFM-IR, l'effet dispersif est faible et est considéré comme négligeable.

La comparaison des deux équations (I-4) et (I-15) met en valeur que les deux paramètres considérés (l'absorbance A et la puissance absorbée P_{abs}) sont proportionnels au terme $\sigma \kappa(\sigma)$, il est donc possible de les combiner et obtenir la relation suivante :

$$P_{abs} = I_{inc} \alpha_{opt} V \frac{\ln 10}{4\pi d} A(\sigma) \quad (I-16)$$

Cette dernière relation (I-16) permet de relier directement la puissance absorbée à l'absorption et aux paramètres optiques de l'objet.

b) Effets de l'expansion photothermique

Pour décrire la variation de température dans l'objet, on peut considérer que la source de chaleur est directement égale à l'énergie absorbée et alors utiliser la loi de Fourier :

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\Pi(t_p) * P_{abs}}{v} + k_{th} \Delta T \quad (I-17)$$

Avec ρ la densité de l'échantillon, C_p la capacité thermique, k_{th} la conductivité thermique, t_p la durée du tir laser, Δ représente le Laplacien et Π est une fonction rectangle de longueur t_p .

La résolution de cette équation a déjà été effectuée dans l'article A. Dazzi et al, Journal of Applied Physics, 2010 [13] dans le cas d'un temps de tir court t_p qui est inférieur au temps de relaxation de l'objet τ_{relax} (cas de figure vérifié quand la source utilisée est une source OPO). La loi alors obtenue est la suivante :

$$\begin{aligned} \Delta T(t) &= T_{max} \frac{t}{t_p} && \text{pour } 0 \leq t \leq t_p \\ \Delta T(t) &= T_{max} \exp\left(\frac{t-t_p}{\tau_{relax}}\right) && \text{pour } t \geq t_p \end{aligned} \quad (I-18)$$

Où $T_{max} = \frac{P_{abs} t_p}{v \rho C_p}$ et $\tau_{relax} = \frac{\rho C_p}{k_{eff}} a^2$ avec k_{eff} la conductivité thermique effective associée à l'environnement de l'échantillon (air et surface) et a la longueur caractéristique de l'objet (rayon pour la sphère, côté pour un cube).

Le principal point de la loi présentée en (I-18) est que l'augmentation de T_{max} est proportionnelle à la puissance absorbée par l'échantillon P_{abs} qui est elle-même directement proportionnelle à l'absorbance (I-16).

Or l'augmentation de la température induit une expansion thermique au niveau de la région chauffée. Dans l'hypothèse d'un échantillon d'un objet de géométrie simple, l'expansion thermique suit la loi suivante :

$$u(t) = aG\alpha_T\Delta T(t) \quad (I-19)$$

Avec a la taille caractéristique de la zone chauffée, G une constante dépendant de la géométrie, α_T le coefficient de l'expansion thermique de l'échantillon et $\Delta T(t)$ la variation de T au niveau de la région considérée.

D'après les lois données en (I-18), $\Delta T(t) = T_{max} \frac{t}{t_p}$ (pour $0 \leq t \leq t_p$). T_{max} est proportionnelle à P_{abs} et P_{abs} est proportionnelle à $A(\sigma)$ d'après (I-14) donc $\Delta T(t)$ est directement proportionnelle à $A(\sigma)$. En conséquence, il est possible de conclure de l'équation (I-16) et de l'équation (I-19) que $u(t)$ est directement proportionnelle à $A(\sigma)$. Il y a donc une loi de proportionnalité entre l'expansion thermique de l'objet chauffé par le rayonnement infrarouge à un nombre d'onde donné et l'absorbance de cet objet à ce même nombre d'onde. L'effet photothermique est une approche qui permet une mesure directe de l'absorbance contrairement aux autres techniques de nanospectroscopie IR.

c) Réponse du levier AFM

L'expansion thermique de l'échantillon est un phénomène très local et peut être mesurée avec la pointe d'un levier AFM.

Pour simplifier le modèle, on utilise un micro-levier de forme rectangulaire, encastré et assimilable à une simple poutre. Ce modèle est assez représentatif de l'ensemble des leviers qui ont été utilisés durant ma thèse. Le modèle du levier est donné en Figure I-15. Un levier de ce type possède une constante de raideur $k_c = 3EI/L^3$ avec E le module d'Young du levier et I son moment d'inertie. De la même manière, le contact pointe/surface est aussi assimilé à un ressort de raideur k_z caractérisant le déplacement de la pointe par rapport à la surface (direction z) et par un ressort de raideur k_x pour le déplacement latéral de la pointe (x et z étant respectivement les directions longitudinales et de déflexion du levier).

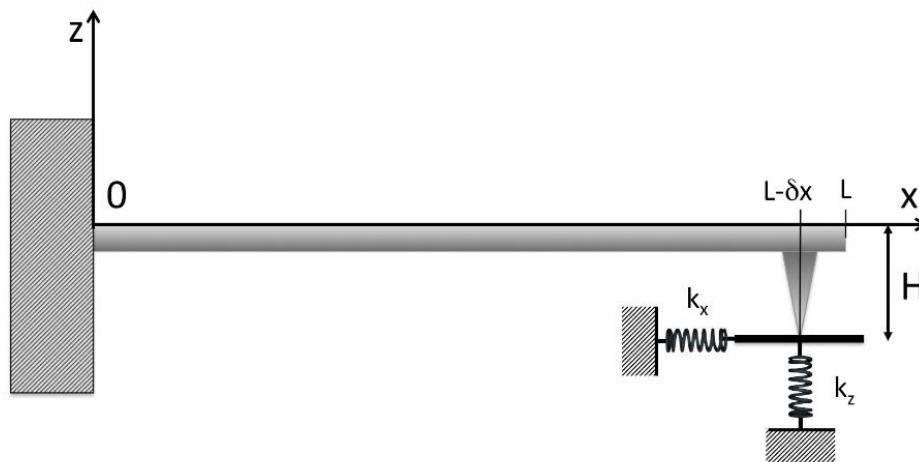


Figure I-15 : Schéma du levier AFM - Le levier de longueur L est fixé au support à $x=0$. La pointe est positionnée à $x = L-\delta x$. L'interaction de contact entre l'échantillon et la pointe est modélisée par deux ressorts, un pour le déplacement latéral de constante de raideur k_x et un pour le déplacement vertical de constante de raideur k_z

L'équation du mouvement de ce levier pour les vibrations de flexion dans l'air est une équation différentielle d'ordre quatre obtenue à partir de l'équation de Euler-Bernoulli :

$$EI \frac{\partial^4 z}{\partial x^4} + \rho S \frac{\partial^2 z}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial z}{\partial t} = 0 \quad (\text{I-20})$$

Avec E module d'Young de la poutre, I le moment d'inertie, ρ sa densité, S la section transversale et γ l'amortissement. Pour un objet rectangulaire, la section transversale est $S = le$ et le moment d'inertie $I = le^3/12$ avec l la largeur du levier et e son épaisseur.

Si l'on considère maintenant que ce levier est soumis à une excitation externe $W(x, t)$ résultant d'une perturbation extérieure, son mouvement peut être décrit de la manière suivante :

$$EI \frac{\partial^4 z}{\partial x^4} + \rho S \frac{\partial^2 z}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial z}{\partial t} = W(x, t) \quad (\text{I-21})$$

La solution générale de l'équation est la somme de l'ensemble des modes propres n du levier :

$$Z(x, t) = \sum_n P_n g_n(x) h(t) \quad (\text{I-22})$$

Avec P_n le coefficient d'amplitude du mode n , g_n la distribution spatiale du mode n et $h(t)$ une fonction qui permet de décrire le comportement temporel.

La forme du mode g_n est déterminée par la résolution de l'équation du mouvement en fonction des conditions aux limites. Elle dépend fortement du vecteur d'onde $\vec{\beta}$ déduit des valeurs propres du système. La détermination de ces paramètres peut se faire en suivant soit une approche analytique soit une approche utilisant les éléments finis.

Dans l'équation (I-22) le terme $W(x, t)$ permet de décrire la variation de force induite par une perturbation extérieure. Dans le cas de l'AFM-IR, cette perturbation correspond à l'expansion thermique de l'objet. Pour obtenir une expression analytique de ce terme, il est d'abord nécessaire de décrire l'interaction entre la pointe et l'échantillon lors de l'expansion thermique.

Le contact entre la pointe et l'objet peut être décrit par la théorie de Hertz ou d'autres modèles mécaniques complexes [52]. Comme présenté dans la Figure I-15, le modèle choisi ici pour l'interaction verticale entre la pointe et l'échantillon est simple et est modélisé par un ressort de constante de raideur k_z . Cela suppose deux hypothèses. La première est que la pointe est rigide et donc que la perturbation se propage de façon instantanée dans le levier, ce qui est relativement vrai dans le cas des leviers de silicium ou de silicium recouvert d'or utilisé pour ce travail de thèse. La seconde hypothèse est que l'expansion thermique de l'objet est de faible amplitude comparée aux autres grandeurs du système. Si ces deux hypothèses sont vérifiées, l'interaction pointe-échantillon peut être décrite par un ressort en utilisant une approximation linéaire. La constante de raideur k_z de ce ressort est associée aux paramètres de contact entre la pointe et l'échantillon et va dépendre de la géométrie de la pointe et des paramètres mécaniques de l'échantillon. Dans ce cas, la force de l'interaction liée à la perturbation est finalement modélisée par la loi de Hooke et peut être exprimée de la manière suivante :

$$F(t) = k_z u(t) \quad (\text{I-23})$$

Dans le cas présent, la fonction $u(t)$ de (I-23) correspond à l'expansion thermique de l'objet au cours du temps dont le détail de la formule est donné en (I-19).

Pour obtenir la force réellement appliquée au levier, il est nécessaire de prendre deux paramètres en compte. Premièrement, comme présenté sur la Figure I-15, la pointe du levier ne se situe pas exactement au bout du levier, mais à une position $L - \delta x$. La force n'est donc pas appliquée au bout du levier et le système doit être considéré comme composé de deux leviers reliés, un qui est fixé au support et de longueur $L - \delta x$ et un qui est libre est de longueur δx . Ensuite, la surface n'est pas nécessairement plane et présente une inclinaison. La situation est résumée dans la Figure I-16.

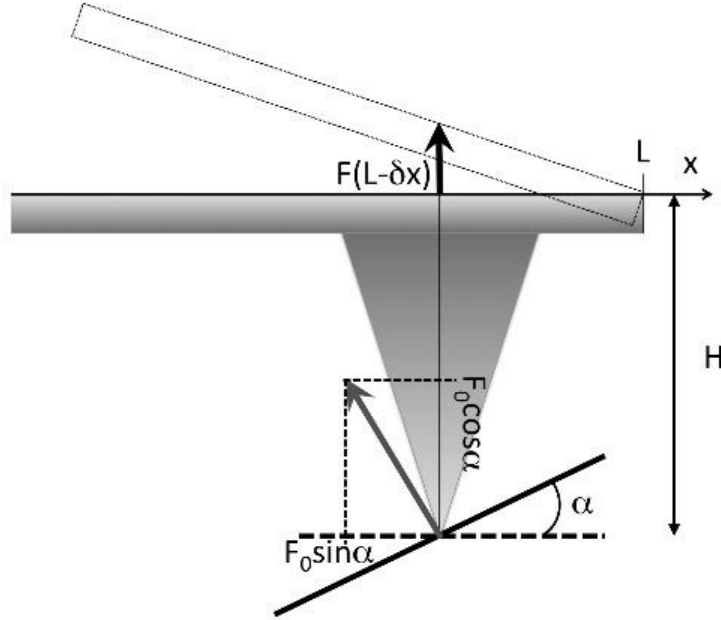


Figure I-16 : Schéma de la pointe AFM en contact avec la surface - L'angle d'inclinaison entre la surface et le levier est noté α , la hauteur de la pointe est notée H et le centre de la pointe est décalée d'une distance δx par rapport à l'extrémité du levier

En prenant en compte ces deux paramètres, la force réellement mise en jeu dans l'interaction entre la surface et le levier apparaît comme une combinaison de la force due à l'expansion thermique donnée en (I-23) et de l'inclinaison du levier par rapport à la surface. Dans ce cas, la perturbation $W(x, t)$ générée par l'expansion thermique peut s'écrire sous la forme :

$$W(x, t) = K\delta(x - L + \delta x)F(t) \quad (I-24)$$

Avec $K = \cos(\alpha) + \frac{H}{\delta x} \sin(\alpha)$, L la longueur du levier et δx la longueur entre le centre de la pointe et le bord du levier.

Il est alors possible d'injecter la formule de $W(x, t)$ dans l'équation (I-21) :

$$EI \frac{\partial^4 z}{\partial x^4} + \rho S \frac{\partial^2 z}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial z}{\partial t} = K\delta(x - L + \delta x)F(t) \quad (I-21')$$

En combinant l'équation (I-21') obtenue avec la solution générale donnée en (I-22) et en effectuant la transformée de Fourier, l'équation suivante est obtenue :

$$\sum_n P_n g_n(x) \tilde{h}(\omega) (EI\beta_n^4 - \rho S\omega^2 + i\gamma\omega) = \tilde{W}(x, \omega) \quad (I-25)$$

La transformée de Fourier de $W(x, t)$ (I-24) donne :

$$\tilde{W}(x, \omega) = K\delta(x - L + \delta x)\tilde{F}(\omega) = K\delta(x - L + \delta x)k_z \tilde{u}(\omega) \quad (I-26)$$

En combinant alors les deux équations (I-25) et (I-26), on obtient :

$$\sum_n P_n g_n(x) \tilde{h}(\omega) (EI\beta_n^4 - \rho S\omega^2 + i\gamma\omega) = K\delta(x - L + \delta x) k_z \tilde{u}(\omega) \quad (I-25')$$

Pour isoler la composante spatiale de la contribution en fréquence dans l'équation (I-25'), il est possible d'utiliser la propriété d'orthogonalité des modes du levier qui fait que :

$$\int_0^L g_n(x) g_m(x) dx = L\delta_{nm} \quad (I-27)$$

De fait, en multipliant l'équation (I-25') par $g_m(x)$ et en intégrant de 0 à L , l'équation suivante est obtenue :

$$\sum_n P_n \tilde{h}(\omega) (EI\beta_n^4 - \rho S\omega^2 + i\gamma\omega) \int_0^L g_n(x) g_m(x) dx = Kk_z \tilde{u}(\omega) \int_0^L g_m(x) \delta(x - L + \delta x) dx \quad (I-28)$$

La résolution de l'équation permet d'obtenir le terme de la composante spatiale et le terme de la contribution en fréquence :

$$\begin{cases} \sum_n P_n \int_0^L g_n(x) g_m(x) dx = \frac{Kk_z}{\rho SL} \int_0^L g_m(x) \delta(x - L + \delta x) dx \\ \tilde{h}(\omega) = \frac{1}{\omega_n^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \tilde{u}(\omega) \end{cases} \quad (I-29)$$

Avec $\omega_n = \sqrt{\frac{EI}{\rho S}} \beta_n^2$ et $\Gamma = \gamma/\rho S$

En utilisant toujours l'orthogonalité des modes du levier, l'expression générale des coefficients P_n peut être déduite :

$$P_n = \frac{Kk_z}{\rho SL} g_n(L - \delta x) \quad (I-30)$$

De plus, comme la longueur δx est très petite devant la longueur du levier L et sachant que $g(L) = 0$, l'expression générale des coefficients P_n devient :

$$P_n = \frac{Kk_z}{\rho SL} \left. \frac{\partial g_n}{\partial x} \right|_{x=L} \delta x \quad (I-31)$$

La solution générale de l'équation (I-22) peut alors être détaillée à partir de cette expression et de la transformée de Fourier inverse de $\tilde{h}(\omega)$ (I-29) :

$$Z(x, t) = \sum_n \frac{Kk_z}{\rho SL} \left. \frac{\partial g_n}{\partial x} \right|_{x=L} \delta x g_n(x) \left(\frac{\sin(\omega_n t) e^{-\frac{\Gamma}{2}t}}{\omega_n} \right) * u(t) \quad (I-32)$$

Le symbole * indique un produit de convolution.

Le signal $Z(x, t)$ obtenu correspond à la déflexion pure du levier. Celle-ci est détectée en utilisant une diode laser qui est dirigée sur l'extrémité du levier et est réfléchi sur un détecteur 4-cadrans. Le déplacement du levier est alors visualisé par le déplacement de la réflexion de la diode sur ce détecteur. La déflexion pourra ainsi être mesurée en intégrant la pente du levier entre la distance L et la distance $L - d$, d étant le diamètre du spot laser focalisé sur le levier. Dans le cas spécifique de la mesure AFM-IR, le signal mesuré $Z'(t)$ va être dépendant du mode d'oscillations du levier observé. En effet, la pente du levier peut varier en fonction du mode (Figure I-17).

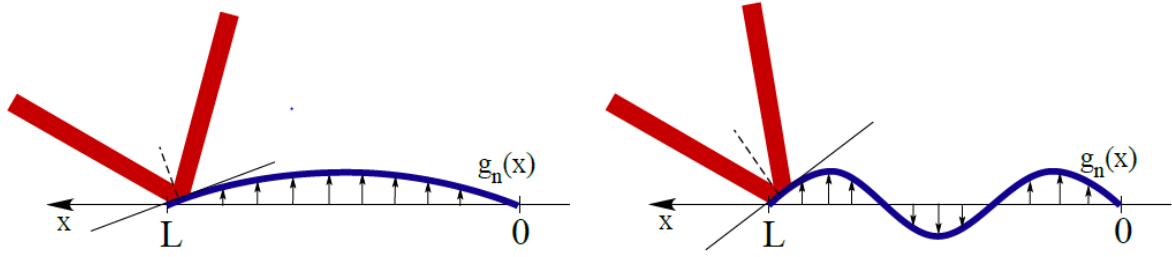


Figure I-17 : Schéma de la pente du levier en fonction du mode de vibration observé (mode fondamental à gauche, seconde harmonique à droite) – Figure extraite de [53]

À partir de l'équation (I-32), le signal détecté $Z'(x, t)$ peut s'exprimer comme :

$$Z'(x, t) = \sum_n \frac{Kk_z}{\rho SL} \frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \delta x \int_{L-d}^L \frac{\partial g_n}{\partial x} dx \left(\frac{\sin(\omega_n t) e^{-\frac{\Gamma}{2}t}}{\omega_n} \right) * u(t) \quad (\text{I-33})$$

Si l'hypothèse que le diamètre du spot d est très petit devant la longueur du levier L et sachant que $g(L) = 0$, l'expression du signal détecté devient :

$$Z'(t) = \sum_n \frac{Kk_z}{\rho SL} \delta x \left(\frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \right)^2 \left(\frac{\sin(\omega_n t) e^{-\frac{\Gamma}{2}t}}{\omega_n} \right) * u(t) \quad (\text{I-34})$$

Cette expression finale montre que le signal détecté sur le détecteur 4-cadrans correspond à la convolution de l'expansion thermique $u(t)$ par la fonction de transfert du levier. Sachant que l'expansion thermique $u(t)$ est proportionnelle à l'absorbance de l'objet à un nombre d'onde donné, le signal mesuré donne donc directement accès l'absorbance de l'objet.

d) Irradiation par une source OPO pompée par un laser Nd : YAG

Dans cette partie, la réponse du levier va être étudiée dans le cas spécifique d'une irradiation de l'échantillon par une source OPO pompée par un laser Nd : YAG. Cette source est présentée en détail en Annexe A. Ce type de source produit une impulsion dans la gamme IR d'une durée allant de 5 à 20 ns avec une fréquence de tir de 1 kHz. Il est possible de faire les trois hypothèses suivantes :

- La durée du tir t_p et le temps de relaxation τ_{relax} de l'objet associé à la diffusion thermique sont inférieurs au temps de réponse du levier qui est de l'ordre de 10 à 50 μs .
- La fréquence de tir de 1 kHz correspond à un tir toutes les 1 ms. En considérant l'amortissement de l'oscillation dû à la surface, le levier revient à son état d'équilibre après 0,3 – 0,5 ms ce qui signifie que chaque tir agit indépendamment l'un de l'autre sur le levier qui a pu revenir à l'état d'équilibre après chaque perturbation.
- La durée du tir t_p est très inférieure au temps de relaxation de l'objet τ_{relax}

Dans ce cas, la transformation de Fourier du signal de l'expansion thermique $\tilde{u}(\omega)$ peut être calculée [13] :

$$\tilde{u}(\omega) = B_{th} \tilde{T}(\omega) = B_{th} T_{max} \left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right) \quad (\text{I-35})$$

Avec $B_{th} = aG\alpha_T$ (cf. p. 24)

Comme, du fait de la longueur du tir, la durée de l'expansion thermique est très courte comparée à la réponse du levier, l'interaction entre le levier et l'échantillon en expansion thermique peut être modélisée par une fonction de Dirac. À partir de la transformée de Fourier inverse de l'expression (I-27) et de l'expression de réponse générale du levier (I-26), il est possible de déterminer le signal obtenu à partir de la réponse du levier dans le cas d'une source OPO :

$$Z'_{OPO}(t) = \sum_n \frac{Kk_z D \delta_x}{\rho S L} B_{th} \left(\frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \right)^2 \frac{\left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right)}{\omega_n} \sin(\omega_n t) e^{-\frac{\Gamma}{2} t} T_{max} \quad (I-36)$$

La formule ainsi obtenue montre que le signal détecté est directement relié à la température maximale atteinte par l'échantillon. Or à partir de la formule de T_{max} et de celle de P_{abs} donnée en (I-16), on sait que :

$$T_{max} = \frac{t_p}{V \rho C_p} P_{abs} = \frac{1}{4\pi d} \ln(10) t_p \frac{I_{inc} \alpha_{opt} V}{V \rho C_p} \dot{A}(\sigma)$$

On en déduit alors l'expression finale du signal obtenu :

$$Z'_{OPO}(t) = \sum_n \frac{Kk_z D \delta_x}{\rho S L} B_{th} \left(\frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \right)^2 \frac{\left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right)}{\omega_n} \sin(\omega_n t) e^{-\frac{\Gamma}{2} t} \frac{1}{4\pi d} \ln(10) t_p \frac{I_{inc} \alpha_{opt} V}{V \rho C_p} \dot{A}(\sigma) \quad (I-37)$$

On constate alors que le signal obtenu est donc directement relié à l'absorbance à un nombre d'onde donné. Ce qui permet de démontrer que le signal de déflexion observé en AFM permet d'accéder à l'absorbance locale de l'échantillon sous la pointe à une longueur d'onde donnée et qui est à la base de la mesure AFM-IR.

IV. Limitations de la technique AFM-IR classique

Dans cette partie, les limitations de la technique AFM-IR classique vont être discutées. Elles peuvent être divisées en deux catégories. D'une part, il existe des limitations de résolution et de sensibilité qui sont propres à la mesure. D'autre part, il existe des limitations techniques propres aux choix instrumentaux faits, tels que la configuration d'éclairage ou encore le mode AFM utilisé.

1. Limites de résolutions latérales et de sensibilité de la technique

Du fait des dynamiques mises en jeu, la pointe ne ressent que la poussée verticale de l'objet. Au premier ordre, la résolution latérale maximale va donc être fixée par le rayon de courbure de la pointe et il sera alors possible d'atteindre des résolutions latérales équivalentes à celle de l'AFM en mode contact. En conséquence, le spectre local obtenu ici correspond au spectre d'absorption d'une colonne dont le diamètre correspond à la zone de contact entre l'échantillon et la pointe (dépendant directement du rayon de courbure) et dont la longueur correspond à l'ensemble de l'épaisseur de l'échantillon. Ceci est aussi vrai pour la cartographie chimique. En revanche, la résolution en profondeur (aussi appelée sensibilité par la suite) va directement dépendre de l'échantillon.

Avant de discuter des mesures de sensibilités effectuées dans la littérature, il est important d'aborder la question de la définition de la sensibilité en AFM-IR. En règle générale, celle-ci est définie par la communauté utilisant l'AFM-IR en fonction de l'épaisseur minimale pouvant être mesurée sur un objet. Or cette définition peut être trompeuse. Dans les faits, ce qui compte n'est pas tant l'épaisseur de l'objet que la nature et le nombre d'oscillateurs absorbants à un nombre d'onde donné, ainsi que leurs répartitions spatiales. En effet, comme en spectroscopie IR, le mode de vibration excité par l'absorption IR, et donc l'échauffement thermique généré, ne va pas être nécessairement équivalent pour un même nombre d'oscillateurs du fait des variations de coefficient d'absorption molaire en fonction de l'espèce et du nombre d'onde considérés. De même, l'évaluation de la sensibilité en termes d'épaisseur n'est valable que dans le cas d'objets chimiquement purs. Dans le cas d'objet hétérogène, la sensibilité va aussi être fonction de la distribution spatiale des oscillateurs concernés. L'expansion thermique sous la pointe ne va pas avoir la même efficacité si tous les oscillateurs sont regroupés dans une zone bien définie et où il va être observé un effet collectif du fait de la proximité des oscillateurs, comme cela peut être le cas par exemple dans l'étude de vésicules lipidiques [54], ou si celui est présent de manière diffuse dans un milieu comme cela peut être observé dans le cas de sondes IR dans ces cellules [44]. De plus, l'expansion thermique est fonction des propriétés mécaniques du matériau et notamment de sa dureté, ce qui fait que pour une même épaisseur il peut y avoir ou non une expansion thermique suffisante. Enfin, en fonction du rayon de courbure considéré, le nombre d'oscillateurs sous la pointe peut varier. En tout état de cause, il apparaît donc nécessaire de ne plus évaluer la sensibilité en termes d'épaisseur, mais en termes de nombre d'oscillateurs nécessaires pour observer une expansion thermique suffisante. Cependant, ce type d'évaluation est difficile à mettre en œuvre, car il nécessite d'étudier un matériau dont on connaît l'ensemble des paramètres (mécanique, coefficient d'absorption molaire, densité d'oscillateurs, épaisseur...). A long terme, il apparaît nécessaire de faire ce type d'évaluation pour permettre de quantifier l'amélioration permise par un développement instrumental donné.

Des études complètes sur la résolution ont été effectuées par l'équipe de J. Felts en utilisant des structures polymères types [40], [50]. La résolution latérale observée à chaque reprise est inférieure à 100 nm. Des calculs de transfert thermique, dans le cas d'un modèle d'éléments finis, permettent de montrer que ces limites ne sont pas fixées par les phénomènes de transfert thermique. Comme attendu, la limite de résolution spatiale est bien fixée par le rayon de courbure de la pointe et l'interaction entre cette dernière et la surface. Dans le cas de matériaux relativement élastiques ou de structures très particulières comme une juxtaposition de plans, la résolution latérale peut être dégradée.

Dans le cas de la sensibilité, il a été observé que l'épaisseur minimale observée était de l'ordre de 80 nm [40]. Cette valeur a été obtenue dans le cas de l'étude de films de polymères purs. Cela signifie que pour des structures d'épaisseurs inférieures, l'expansion thermique obtenue n'est pas suffisante pour observer une oscillation du levier. Les raisons de cette limite sont complexes, mais il est possible de noter à partir des équations du signal le rôle important joué par l'amortissement de l'oscillation. Cet amortissement est dû aux forces de friction entre la pointe et la surface, mais aussi entre le levier et l'air ainsi qu'aux paramètres liés aux leviers AFM utilisés.

Cette limite de sensibilité est apparue comme une limite importante, car un certain nombre d'objets apparaissent inaccessibles à la technique. Surtout, cette limite est bien en deçà des capacités de l'AFM où il est possible d'imager sans difficulté des objets de quelques nanomètres d'épaisseur. En conséquence, dépasser cette limite est rapidement apparue comme un enjeu instrumental important. Plusieurs solutions ont été alors proposées. La première solution consiste à appliquer un traitement mathématique du signal pour améliorer

le rapport signal sur bruit [55], ce qui a permis, dans le cas le plus optimal, d'atteindre des sensibilités de l'ordre de 15 nm [56]. Pour ce faire, des algorithmes utilisant les ondelettes ont été appliqués à l'ensemble du signal AFM-IR en temps et en fréquence pour l'ensemble des résonances de contact. Cette solution implique donc la mise en place d'un traitement de données a posteriori qui nécessite l'enregistrement de l'ensemble de l'oscillation du levier en chaque point d'acquisition (c'est-à-dire pour chaque nombre d'onde dans le cas d'acquisition de spectres locaux ou pour chaque position de la pointe dans le cas de cartographie chimique). C'est donc un traitement de données conséquent qui est nécessaire à mettre en œuvre et limite le taux possible d'acquisition. De plus, les ondelettes sont un outil mathématique très puissant. Il existe toujours un risque d'introduire des artefacts de traitement dans le résultat final (comme pour toute technique de traitement de données). Ces deux facteurs ont fait que ce type de solution a été peu utilisé par la suite. Les autres solutions proposées sont cette fois-ci des solutions technologiques. Ce sont ces solutions qui sont apparues sur le long terme les plus intéressantes pour la mise en œuvre. La première solution technologique, et la principale, a été d'utiliser de nouvelles sources lasers, les lasers à cascade quantique, pour passer d'une oscillation amortie à une oscillation entretenue (aussi dite forcée). Ce développement a été un réel progrès et a permis d'améliorer la sensibilité d'au moins un ordre de grandeur. Il sera discuté en détails dans le Chapitre II de ce manuscrit de thèse. La seconde solution consiste à remplacer les leviers d'AFM classiques utilisés par des micro-résonateurs [57].

2. Limitations instrumentales

Les limitations instrumentales de l'AFM-IR classique peuvent être résumées en deux points : les limitations liées au mode d'imagerie AFM en mode contact et les limitations liées à la configuration d'éclairage.

La première limitation est celle qui concerne l'imagerie AFM. En effet dans le cas de la mesure AFM-IR classique, la mesure AFM est nécessairement en mode contact et l'échantillon doit être analysé à l'air. La première conséquence est qu'il n'est pas possible de mesurer des échantillons mous ou peu adhérents. L'alternative serait de faire une mesure AFM-IR en mode tapping, l'autre principal mode de mesure en AFM. Or dans le cas du mode AFM oscillant, le levier a déjà une oscillation en z induite par une céramique piézoélectrique, ce qui est incompatible. Cependant, le problème posé par l'oscillation du mode tapping a pu être résolu par la mise en place d'une détection hétérodyne du signal AFM-IR qui a permis le développement de l'AFM-IR en mode tapping. Ce développement sera traité spécifiquement dans le Chapitre IV. La seconde conséquence, le fait que la mesure doit être faite dans l'air, est très limitante pour les applications biologiques, notamment les études cellulaires. Pour effectuer ce type d'expérience, il est nécessaire de modifier une partie du montage et notamment une tête AFM, un levier AFM et une configuration d'éclairage spécifique qui n'est pas nécessairement optimale avec la mesure AFM-IR. Cependant même dans ces conditions, la mesure AFM-IR en liquide reste problématique. Cela est dû à la forte absorption de l'eau liquide dans la même gamme que la bande amide I ($1500\text{ cm}^{-1} - 1700\text{ cm}^{-1}$) qui va conduire à une expansion thermique de l'eau bien supérieure à celle de l'échantillon présent sous la pointe. Des tests ont été effectués pour mettre en place ce type de mesure [58], [59]. Mais les résultats obtenus dans les deux cas peuvent être discutables.

La seconde limitation vient de la configuration d'éclairement choisie. Dans le système commercial, l'angle d'éclairement au niveau de l'interface prisme-objet est choisi pour qu'une onde évanescente soit produite au niveau de cette interface. Cela permet d'avoir un éclairement relativement homogène dans le cas d'un objet de faible épaisseur, quel que soit son indice optique, tout en limitant au maximum l'éclairement de la pointe et du levier qui pourrait fortement perturber la mesure. Cependant, cette configuration d'éclairement peut représenter un désavantage comparé à la configuration utilisée dans le prototype et où l'onde lumineuse était propagative dans l'ensemble de l'échantillon (sous condition que celui-ci est un indice optique supérieur à $n=1,2$) [11], [53]. En effet, le choix d'une configuration d'éclairement par une onde évanescente et non par un éclairement propagatif peut conduire à une perte d'homogénéité de l'éclairement de l'objet en fonction de l'épaisseur. Cela a été déjà observé par B. Lahiri et al. dans le cas de l'étude de polymère modèle [50] ainsi que par G. Ramer et al. dans le cas de la mise en place d'une mesure d'AFM-IR quantitative [60]. Dans ces études, il apparaît que si l'augmentation de signal est directement proportionnelle à l'augmentation de l'épaisseur de l'objet dans une gamme allant de 100 nm à 1 μm , une perte de linéarité est observée pour des épaisseurs supérieures à 1 μm . Cette perte de linéarité a été reliée à la décroissance exponentielle de l'intensité de l'onde évanescente. L'utilisation de l'éclairement en réflexion totale nécessite aussi l'utilisation de prisme de ZnSe dont les angles d'inclinaison doivent être contrôlés. Le ZnSe est un matériau avec des propriétés de surface qui peuvent poser un problème pour réaliser des dépôts de matériaux qui ont une chimie de surface complexe. De plus, le fait d'avoir un prisme peut limiter les possibilités d'effectuer des mesures corrélatives avec d'autres techniques de microscopie ou analytique. Une solution alternative a été proposée. Elle consiste à utiliser un prisme de fluorure de calcium (ce matériau sera noté par la suite CaF_2) sur lequel est ajoutée une lamelle de CaF_2 servant de support à l'échantillon. La continuité optique entre les deux est assurée par de l'huile de paraffine d'indice optique équivalent au CaF_2 . Ce dispositif sera présenté plus en détail dans le Chapitre III. La lamelle de CaF_2 est plus facilement maniable que le prisme et permet le couplage avec d'autres techniques d'optique. Cependant en utilisant un prisme de CaF_2 , l'éclairement n'est plus comparable avec le ZnSe. En effet, les angles d'éclairement et les indices optiques n'étant pas les mêmes que dans le cas du prisme de ZnSe, un champ évanescent n'est plus généré à l'interface prisme/solide et l'éclairement est alors propagatif à travers l'échantillon. De plus, il a été observé expérimentalement des problèmes pour faire le contact dans ce genre de configuration et qui sont dus à la couche d'huile de paraffine qui va soit perturber la stabilité de la lamelle de CaF_2 lors du contact soit générer des charges de surface qui vont perturber électrostatiquement la pointe. La solution à ces problèmes consiste à changer la configuration d'éclairement et de passer d'un éclairement en réflexion totale à un éclairement direct. La mise en place de cette configuration d'éclairement, les développements qu'elle a permis, mais aussi les nouvelles problématiques soulevées, seront discutés spécifiquement dans le Chapitre III.

V. Conclusions

Depuis sa création en 2005, la technique AFM-IR est devenue une technique très utilisée dans le domaine de la spectroscopie IR. En couplant deux techniques, l'AFM et la spectroscopie infrarouge, elle permet d'obtenir des spectres d'absorption IR locaux avec une résolution inférieure de plusieurs ordres de grandeur par rapport à la spectromicroscopie IR classique qui est limitée par le facteur de diffraction. Le principal avantage de la technique AFM-IR est que la grandeur mesurée est directement proportionnelle à l'absorbance de l'objet situé directement sous la pointe AFM. Développer initialement avec un laser à électron libre, l'AFM-IR utilise maintenant des sources de table comme la source OPO qui sont accordables

en nombre d'ondes dans la gamme du moyen IR. En conséquence, deux modes d'acquisition sont possibles : le premier est la cartographie chimique où le nombre d'onde du laser est fixé et la surface balayée par la pointe, en observant le signal de déflexion en chaque point, il va alors être possible d'obtenir une cartographie de l'absorption de l'échantillon à ce nombre d'onde ; le second est la spectroscopie locale où la position de la pointe est fixée et une gamme de nombres d'onde est balayée par la source IR. En enregistrant le signal de déflexion pour chaque nombre d'onde, il est possible de reconstituer séquentiellement le spectre d'absorption de l'échantillon situé sous la pointe. L'éclairement de l'échantillon se fait en réflexion totale via un prisme. Ce choix d'éclairement permet de contrôler l'illumination de l'échantillon au prix d'une contrainte sur son épaisseur qui ne doit pas dépasser l'ordre du micromètre.

Dans cette configuration, c'est-à-dire avec un mode d'imagerie AFM en mode contact, un OPO comme source IR et un éclairement en réflexion totale, la technique AFM-IR a pu être appliquée à de nombreux champs d'études allant de l'étude de polymères [40]-[42] à la biologie [43]-[46] en passant par l'étude du patrimoine [47] ou encore des thématiques de physique comme l'étude des plasmons [48], [49]. Un bon aperçu des différents sujets étudiés en AFM-IR peut être obtenu dans la revue d'A. Centrone de 2015 [15] et celle d'A. Dazzi et C. Prater de 2017 [14].

Des limitations apparaissent cependant avec la technique AFM-IR ainsi utilisée. La première est la limite de sensibilité qui, du fait notamment de l'amortissement de l'oscillation du levier, est de l'ordre de la centaine de nanomètres. Ce qui est bien inférieur à ce qui est théoriquement accessible avec un système AFM. La seconde limitation est la configuration d'éclairement choisie qui contraint à utiliser des prismes en ZnSe et limite l'épaisseur maximale de l'échantillon, nécessitant un travail parfois fastidieux de préparation d'échantillon dans le cas où celui-ci est plus épais. Enfin, la troisième limitation est le mode d'imagerie AFM qui est le mode contact. Si ce mode permet d'étudier un très grand nombre d'échantillons, il n'est pas compatible avec les échantillons mous ou peu adhérents à la surface. Dans les cinq dernières années, des développements instrumentaux ont pu être faits dans le but de dépasser ces trois limitations et vont maintenant être présentés.

Chapitre II : AFM-IR en résonance forcée

Du point de vue de la résolution, le développement de la technique AFM-IR constitue une grande avancée pour la spectromicroscopie infrarouge. Cependant comme toute technique de spectro-imagerie, les résolutions latérales et la sensibilité ainsi obtenues sont limitées. Les limites de résolution latérale sont données au premier ordre par les dimensions de la pointe. En revanche, la limite de sensibilité est directement reliée à la limite de détection de l'expansion thermique par le levier de l'AFM. Comparée à une résolution latérale de l'ordre de la vingtaine de nanomètres, la sensibilité minimale typique est plutôt de l'ordre de 100 nm. Elle peut apparaître comme faible compte tenu des dimensions des échantillons et son amélioration est donc un véritable enjeu pour le développement de la technique AFM-IR.

Plusieurs solutions ont été proposées pour améliorer la sensibilité. La principale a été publiée peu de temps avant le début de ma thèse par l'équipe de F. Lu et M. Belkin [16]. Cette nouvelle configuration permet de passer d'un mode où l'oscillation du levier suite à l'expansion thermique est amortie à une oscillation entretenue, aussi appelée résonance forcée. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser un nouveau type de laser IR dont la cadence de tir est ajustable, les lasers à cascade quantique (noté par la suite QCL).

Cette évolution instrumentale représente un développement majeur de la technique AFM-IR, car il a permis d'atteindre des sensibilités d'ordre nanométrique ([61], [62]). Il a ouvert la voie à un ensemble de nouvelles thématiques de recherche. Cependant, ce mode de mesure est loin d'être trivial tant du point de vue technique que du point de vue de l'interprétation des résultats obtenus et son étude a été un des enjeux clés de ma thèse. Dans ce chapitre, la présentation de la preuve de concept expérimentale et de la théorie de l'AFM-IR en résonance forcée sera faite. Ensuite, une discussion sera menée sur la mise en place d'un couplage permettant la mise en place de la résonance forcée sur un système en éclairage par réflexion totale. Ce type de couplage effectué durant la thèse est le premier de ce genre. Ensuite, les conséquences de l'utilisation de la résonance forcée et des lasers QCL sur les modes d'acquisitions de l'AFM-IR seront présentées dans les cas de la cartographie d'absorption IR à un nombre d'onde et les spectres d'absorption IR locaux. Suite aux résultats obtenus dans cette configuration, des modélisations d'expansion thermiques ont été effectuées pour comprendre le comportement des objets de taille nanométrique nouvellement accessible grâce à la mesure AFM-IR en résonance forcée et en déduire les possibles conséquences sur les résultats expérimentaux.

I. Description du principe de l'AFM-IR en résonance forcée

1. Description de la mesure AFM-IR en résonance forcée

Le principe de la mesure AFM-IR en résonance est de changer le régime d'oscillation du levier et de passer d'un régime d'oscillations amorties à un régime d'oscillations forcées. Dans la mesure AFM-IR classique, l'expansion thermique produit une excitation unique sur la pointe du levier, ce qui va se traduire par l'oscillation du levier qui revient ensuite à sa position d'équilibre. Dans ce cas, la majeure partie de l'information IR est contenue dans les premiers instants de l'oscillation. L'amortissement qui apparaît ensuite est dû la dissipation de l'énergie

transmise au levier du fait de différents facteurs comme les frottements de la pointe ou encore l'amortissement avec l'air. Dans la mesure AFM-IR en résonance forcée, le but est de paramétrer les conditions de la dilatation thermique de sorte à entretenir l'excitation du levier et de supprimer l'amortissement. L'énergie nécessaire par tir laser conduisant à l'oscillation permanente du levier va alors être réduite comparée à celle utilisée pour la méthode classique, permettant ainsi d'améliorer grandement la sensibilité. L'obtention du régime de résonance forcée le plus optimal va être réalisée en coordonnant la fréquence de tir du laser à la fréquence d'un des modes de résonance de contact du levier. Ces fréquences sont le plus souvent supérieures à 100 kHz (Figure II-1).

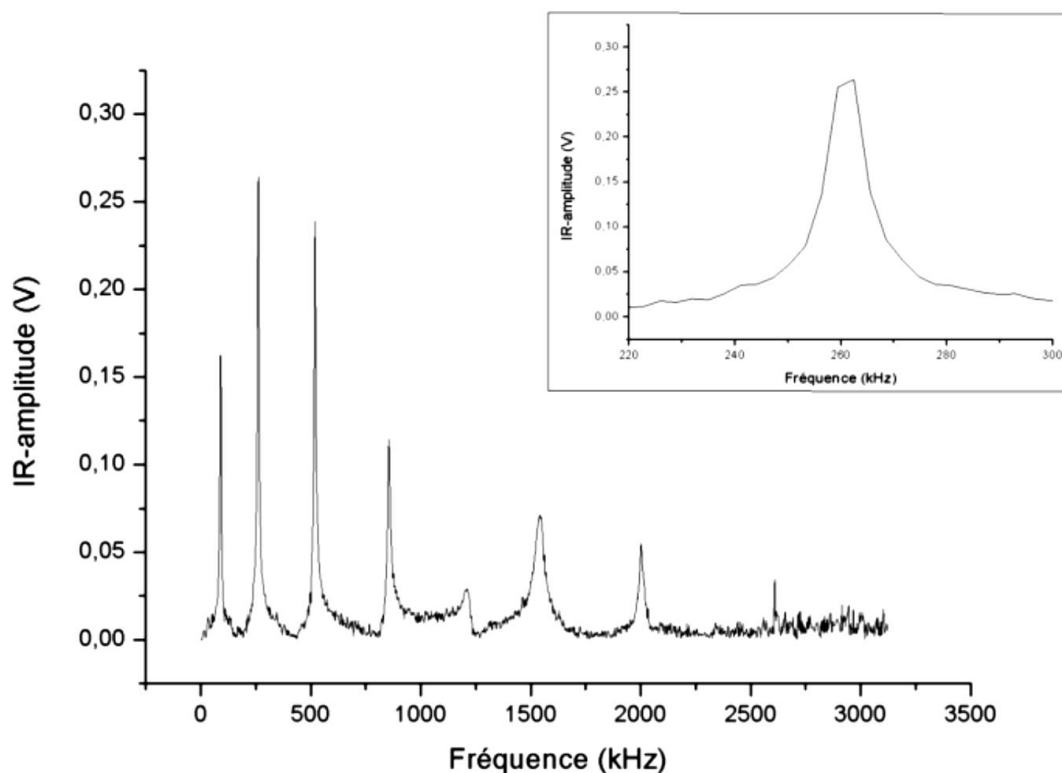


Figure II-1 : Modes de résonance de contact d'un levier en silicium – En encart un agrandissement sur le mode de la 2^{ème} harmonique

Le passage d'un régime d'oscillations amorties à un régime d'oscillations entretenues va permettre d'augmenter le signal détecté et par conséquent d'augmenter la sensibilité de la mesure. Pour illustrer ce point, la comparaison du signal obtenu pour un même levier sur un même échantillon selon si le tir laser est à 1 kHz (oscillations amorties) ou si la fréquence de tir correspond à une des résonances de contact de levier (oscillations forcées) est donné en Figure II-2. La comparaison des deux signaux de déflexion montre que l'intensité du signal AFM-IR obtenu en résonance forcée (Figure II-2 c)) est ici deux fois plus intense qu'en oscillations amorties (Figure II-2 a)) alors que l'énergie du laser a été diminuée d'un ordre de grandeur entre les deux mesures. En conséquence, la sensibilité de la mesure devrait être elle aussi améliorée par un facteur vingt. Cette augmentation de signal permise par la résonance forcée peut se comprendre en comparant les résonances de contact excitées dans les deux cas. Cette information peut être extraite des transformées de Fourier des signaux de déflexions (Figure II-2 b) et d)). Dans le cas de l'oscillation amortie (Figure II-2 b)), on constate que quatre résonances de contact apparaissent distinctement dans le signal. Cela signifie que l'énergie générée par la perturbation de l'expansion thermique est distribuée dans l'ensemble de ces

quatre modes. À l'inverse, un seul mode est excité dans le cas de la résonance forcée (Figure II-2 d)). Celui dont la fréquence correspond à la fréquence de tir du laser. Cette résonance de contact reçoit donc la majorité de l'énergie transmise par l'expansion thermique. L'oscillation du levier obtenue va donc être plus importante, ce qui explique l'augmentation du signal de déflexion observé.

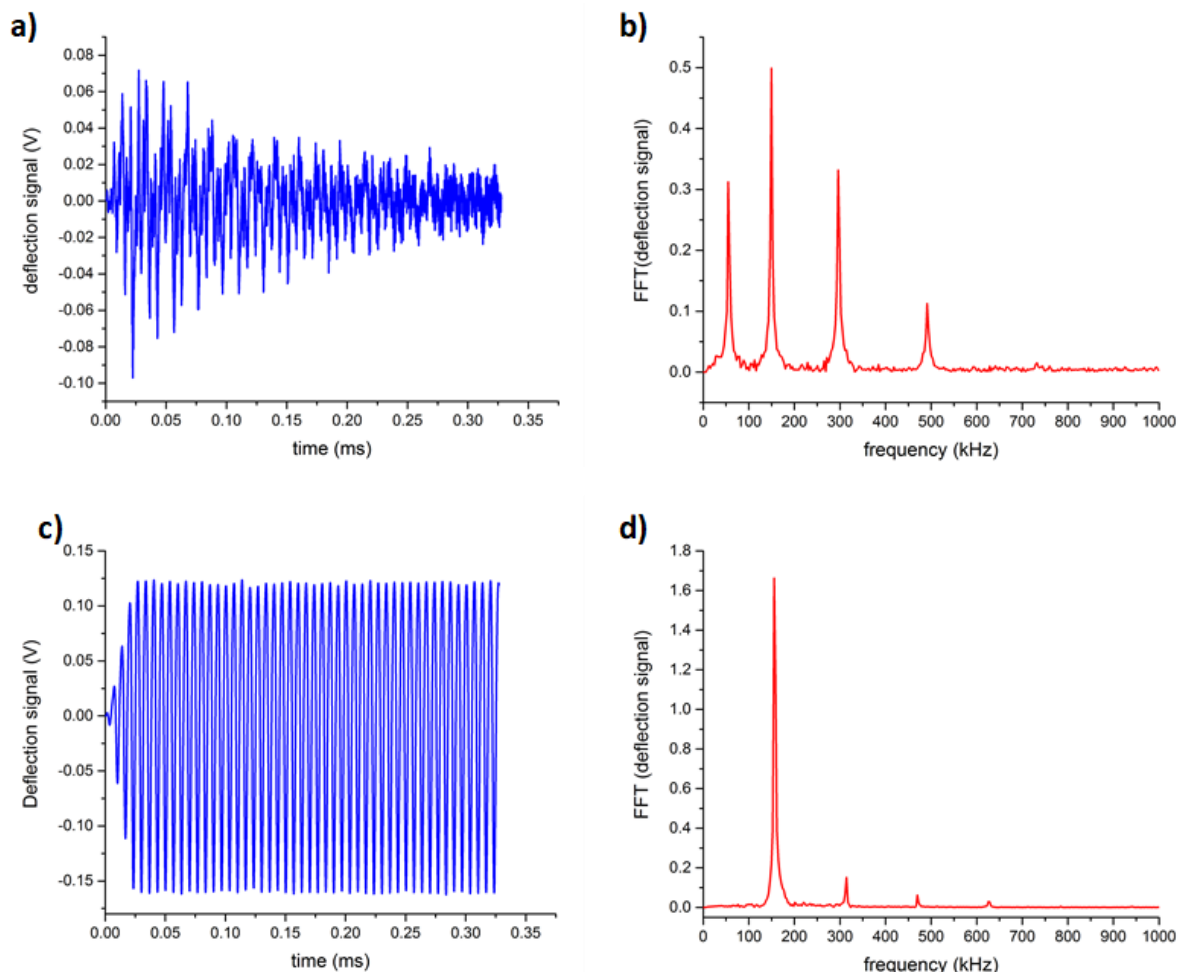


Figure II-2: Comparaison du signal AFM-IR dans le cas de l'oscillation amortie et de la résonance forcée, l'énergie du laser a été diminuée par dix entre la mesure en oscillation amortie et celle en résonance forcée – a) Déflexion du levier en oscillation amortie – b) Transformée de Fourier du signal de déflexion du levier en oscillation amortie – c) Déflexion du levier en résonance forcée – d) Transformée de Fourier du signal de déflexion du levier en résonance forcée

Comme expliqué dans le chapitre I, la valeur de ces résonances de contact est directement reliée à la nature du matériau et à son module de Young [13]. Dans le cas d'un matériau inhomogène, les valeurs des résonances de contact vont changer selon l'élasticité du matériau sous la pointe. Or pour que le levier soit dans un mode d'oscillations forcées, il faut que le taux de répétition de tir du laser coïncide avec la fréquence de l'une des résonances de contact. Il est donc nécessaire d'avoir une source laser capable d'accorder son taux de répétition de tir en quelques millisecondes pour que la correction puisse se faire pendant l'acquisition d'une image. Dans la configuration classique d'AFM-IR, les sources utilisées (laser à électron libre puis l'OPO [11], [46], [51], [63]) possèdent des fréquences de tir fixes ou difficilement ajustables. Pour obtenir la mesure AFM-IR en résonance forcée, l'équipe de M. Belkin a proposé dans sa preuve de concept de remplacer ces types de sources lasers par un laser de type QCL dont la fréquence de tir est ajustable jusqu'à 2 MHz [16]. Le fonctionnement des lasers QCL est présenté en Annexe 1.

2. Preuve de concept de l'AFM-IR en résonance forcée

La preuve de concept de l'AFM-IR en résonance forcée a été validée par l'équipe de F. Lu et M. Belkin dans l'article [16], ce qui a permis aussi de démontrer que cette approche était un moyen efficace d'améliorer la sensibilité.

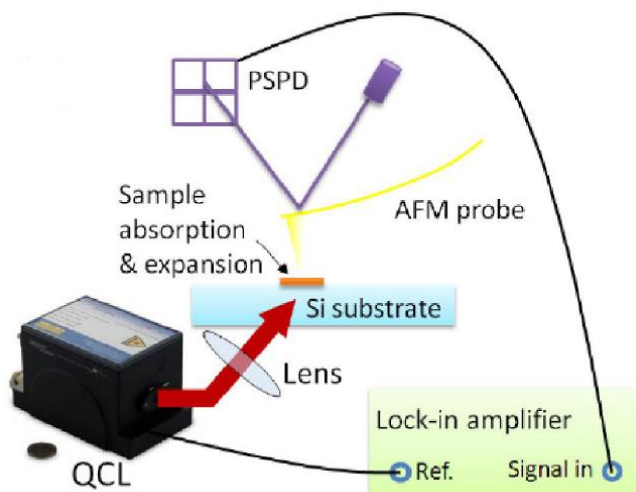


Figure II-3 : Schéma du système AFM-IR utilisé par F. Lu et M. Belkin pour la mesure AFM-IR en résonance forcée – Figure extraite de [16]

La configuration d'éclairage AFM-IR proposée par le groupe de M. Belkin diffère de celui utilisé classiquement en AFM-IR : l'éclairage se fait par le dessus et non en réflexion totale. Cette différence d'éclairage n'a aucune influence sur le principe même de la mesure en résonance forcée, mais va induire d'autres changements. La comparaison entre les deux modes d'éclairage (en réflexion totale et par le dessus) sera abordée dans le Chapitre III.

L'idée principale développée ici est de chercher la résonance de contact du levier avant le début de la mesure. Cette première étape va consister à utiliser une région de l'échantillon que l'on sait être absorbante et y positionner la pointe. On règle la longueur d'onde du laser sur une valeur correspondant à l'absorption de l'échantillon et on balaye la fréquence de tir du laser QCL pour trouver le mode de résonance. Une fois une fréquence de résonance trouvée et choisie, on peut réaliser la mesure du spectre d'absorption en mesurant simplement l'amplitude des oscillations de la déflexion pour chaque nombre d'onde.

L'article de F. Lu et al. montre deux améliorations distinctes : l'augmentation de la sensibilité verticale et l'augmentation de la résolution latérale.

La preuve expérimentale de l'augmentation de la sensibilité de la technique a été faite sur un mélange de deux films polymères : le SU-8 (polymère utilisé en photolithographie) et le LOR-3A (aucune information disponible dans l'article sur ce polymère) d'une épaisseur de 300 nm. Les fréquences des résonances de contact du levier utilisées sont données en Figure II-4 a). Deux modes de résonance de contact sont observables sur cette figure : le premier à 55 kHz et le second à 155 kHz. Pour mettre en évidence l'augmentation de la sensibilité verticale, des spectres ont été enregistrés à différentes fréquences sur les polymères. La première fréquence de tir est de 155 kHz et correspond au deuxième mode de résonance de contact (Figure II-4 b)). Les spectres obtenus sont donnés en trait plein rouge pour le polymère LOR-3A et en trait

plein noir pour le polymère SU-8. Ils sont comparés aux spectres de référence des polymères obtenus en spectroscopie FTIR (spectres en pointillés). On constate que les mêmes bandes sont observables dans les deux cas. Les spectres obtenus avec la seconde fréquence de tir à 130 kHz, c'est-à-dire hors d'un des modes de résonance, sont représentés par la ligne de points proches de zéro. Un agrandissement sur ces spectres est présenté Figure II-4 c). On constate alors que les spectres obtenus avec cette deuxième fréquence présentent les mêmes bandes d'absorption, mais ont une intensité qui est en moyenne 200 fois plus faible. La comparaison des spectres obtenus avec les deux fréquences de tir permet donc de montrer l'augmentation de la sensibilité en passant d'un régime d'oscillations amorties à un régime d'oscillations forcées.

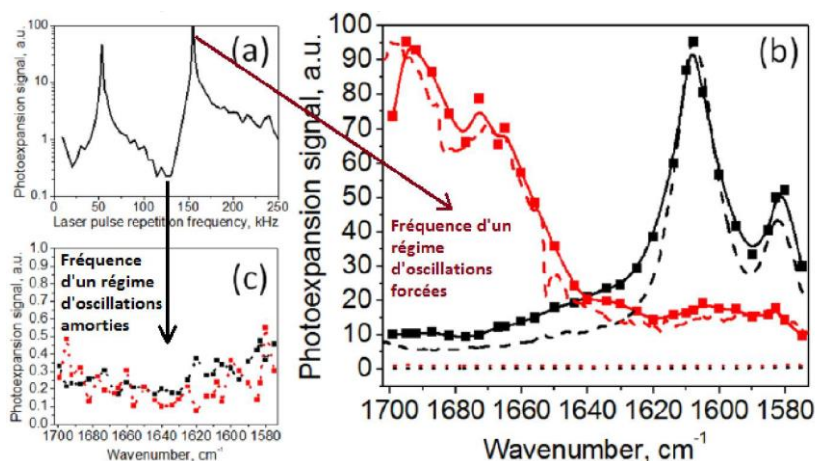


Figure II-4 : Mise en évidence expérimentale de l'augmentation de la sensibilité par la résonance forcée - (a) Fréquences propres de l'oscillation du levier - (b) Spectres obtenus dans le cas d'un régime en résonance forcée (en rouge le spectre du LOR-3A et en noir celui du SU-8, les spectres en pointillés correspondent aux spectres des espèces correspondantes obtenus en spectroscopie FTIR) - (c) Spectres obtenus sur en régime classique d'oscillations amorties - Figure adaptée de [16]

L'article s'intéresse aussi à l'augmentation de la résolution latérale de cette méthode. Pour cela, une inclusion de polymère SU-8 de 50 nm d'épais dans un polymère LOR-0.7A d'une épaisseur de 70 nm a été étudiée. Les spectres obtenus en différents points de la jonction entre les deux polymères sont donnés dans la Figure II-5 b) - e). Il est possible de voir sur ces spectres l'évolution de la bande du SU-8 : celle-ci est nettement résolue pour le point Figure II-5 c) alors qu'elle n'apparaît pas sur le point de la Figure II-5 d). Il apparaît donc possible d'obtenir une résolution latérale inférieure à 50 nm dans le cas du couplage avec le laser. Cela représente une relative amélioration par rapport à d'autres mesures du genre effectuées en AFM-IR classique [40], [50]. Le gain n'est pas comparable à celui obtenu en termes de sensibilité. Il est même compliqué de conclure si cette légère amélioration est due à la résonance forcée ou si elle est liée à un autre paramètre notamment le changement de la configuration d'éclairage qui pourrait plus focaliser le laser ou une différence entre les pointes AFM utilisées.

Pour conclure, il apparaît que l'utilisation de la résonance forcée peut améliorer grandement la sensibilité de la technique. Cette solution expérimentale est relativement aisée à mettre en œuvre et est donc d'un grand intérêt pour le développement de l'AFM-IR. La suite de ce chapitre se focalise sur l'étude plus spécifique des phénomènes physiques mis en jeu lors la résonance forcée et propose une description théorique du mode.

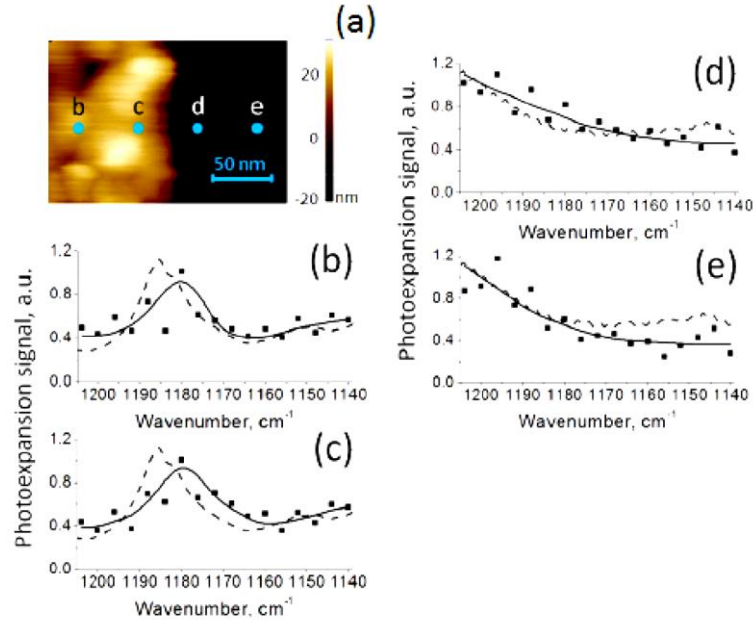


Figure II-5 : Mise en évidence expérimentale de l'augmentation de la résolution latérale par la résonance forcée (a) Topographie d'une interface entre les deux polymères SU-8 et LOR-0.7A - (b)-(e) Spectres obtenus sur les différents points indiqués sur l'image de topographie (a) - Figure extraite de [16]

3. Description théorique de l'AFM-IR en résonance forcée

La majeure partie de la théorie a déjà été énoncée dans les informations supplémentaires de l'article de A. Dazzi et C. Prater dans le journal Chemical Reviews [14]. Le résultat final qui va être obtenu ici diffère un peu du résultat énoncé dans l'article, cette différence sera discutée lors de la démonstration.

Dans le Chapitre I (cf. p. 22), la théorie de l'AFM-IR a été présentée dans le cas d'une source de type OPO. Dans ce cas, les tirs sont considérés indépendants les uns des autres vis-à-vis de la perturbation du levier. Cette théorie peut aussi être utilisée pour décrire la perturbation du levier dans le cas d'un tir unique de laser QCL. Pour le cas qui nous intéresse, les équations de résolution modale du levier et de l'expansion thermique sont toujours valables :

- L'expression de déflection, $Z(x,t)$, peut s'écrire comme le produit de la déformation spatiale et temporelle du levier :

$$Z(x,t) = \sum_n P_n g_n(x) h(t) \quad (\text{I-22})$$

- En utilisant la méthode de résolution modale du levier et temporelle, on peut écrire $g_m(x)$ et $\tilde{h}(\omega)$ [4] :

$$\begin{cases} \sum_n P_n \int_0^L g_n(x) g_m(x) dx = \frac{Kk_z}{\rho SL} \int_0^L g_m(x) \delta(x-L+\delta x) dx = \frac{Kk_z}{\rho SL} \frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \delta x \\ \tilde{h}(\omega) = \frac{1}{\omega_n^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \tilde{u}(\omega) \end{cases} \quad (\text{I-29})$$

- L'expression de la dilatation thermique dans l'espace de Fourier dans le cas d'un pulse court ($t_p < \tau_{relax}$) vaut :

$$\tilde{u}(\omega) = B_{th} \tilde{T}(\omega) = B_{th} T_{max} \left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right) \quad (\text{I-35})$$

Dans le cas de cette dernière équation, on constate que $\tilde{u}(\omega)$ ne dépend pas de ω et peut être assimilé à une constante qui sera notée par la suite u_0 .

Pour comprendre le comportement du levier lorsque la perturbation est générée par un laser QCL, il est nécessaire de modéliser la perturbation subie par le levier par un ensemble de tirs répétés avec une période de tir T_0 . Pour ce faire, il faut redéfinir la loi de l'expansion thermique de l'objet au cours du temps $u(t)$ comme étant maintenant :

$$u(t) = B_{th}\Delta T(t) * \sum_{m=0}^{+\infty} \delta(t - mT_0) \quad (\text{II-1})$$

Avec pour rappel B_{th} un terme décrivant les propriétés thermiques de l'objet et $\Delta T(t)$ décrivant la loi thermique de l'objet après absorption IR (cf. Chapitre I, p. 28). T_0 est la période de tir du laser QCL.

Pour simplifier le produit de convolution, le traitement se fait dans l'espace de Fourier :

$$\tilde{u}(\omega) = u_0\omega_0 \sum_{m=0}^{+\infty} \delta(\omega - m\omega_0) \quad (\text{II-2})$$

Il est alors possible de développer la contribution en fréquence de $Z(x, t)$ à partir de la combinaison des équations (I-19) et (II-2) :

$$\tilde{h}(\omega) = \frac{u_0\omega_0 \sum_{m=0}^{+\infty} \delta(\omega - m\omega_0)}{\omega_n^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (\text{II-3})$$

Pour rappel : le terme ω_0 correspond à la fréquence de tir du laser et ω_n correspond à la fréquence d'oscillation d'un des modes du laser (avec $n > 1$).

Dans ce cas, pour qu'il y ait interaction entre le levier AFM et l'expansion thermique de l'objet, il faut que la fréquence du tir de laser coïncide avec une des résonances propres du levier. En conséquence, le produit de l'équation (II-3) est non nul si et seulement si pour tout indice m on a $\omega_n = \omega_0$. De plus, dans le cas du levier considéré, les modes propres du levier ne sont pas des harmoniques pures. Les fréquences $2\omega_0, 3\omega_0$ etc... ne vont pas coïncider avec des modes propres du levier et ne vont pas remplir la condition précédente. Donc les seuls indices m donnant une valeur non nulle dans le produit seront les indices $m = \{-1; 0; 1\}$. En prenant en compte ces deux assertions, il est alors possible de simplifier l'équation (II-3) :

$$\tilde{h}(\omega) = u_0\omega_0 \left(\frac{1}{\omega_0^2} + \frac{\delta(\omega - \omega_0)}{i\Gamma\omega_0} - \frac{\delta(\omega + \omega_0)}{i\Gamma\omega_0} \right) \quad (\text{II-4})$$

Cette expression diffère avec celle utilisée pour la première fois dans l'article de A. Dazzi et C. Prater [14]. En effet dans cet article, la détection était considérée comme synchronisée avec le premier tir laser et commençait à $t = 0$. Dans ce cas, l'indice m ne pouvait prendre que deux valeurs possibles $m = \{0; 1\}$. Or le signal détecté correspond au moment où la résonance forcée est déjà établie. Donc dans le cas qui nous intéresse, le tir laser existe depuis $t = -\infty$ car il n'y a pas de causalité. La détection du signal s'effectue après que le levier soit entré en résonance forcée et donc il faut considérer aussi la solution $m = -1$.

Dans la gamme de fréquences considérée, on peut faire l'hypothèse que $\frac{1}{\omega_0^2} \ll \frac{1}{\omega_0}$, ce qui permet de simplifier l'équation (II-4) en :

$$\tilde{h}(\omega) = \frac{u_0}{\Gamma} \left(\frac{\delta(\omega - \omega_0) - \delta(\omega + \omega_0)}{i} \right) \quad (\text{II-5})$$

Grâce à une transformée de Fourier inverse, il est possible de revenir alors à l'expression temporelle de la composante $h(t)$:

$$h(t) = \frac{u_0}{\pi\Gamma} \sin(\omega_0 t) \quad (\text{II-6})$$

Le facteur de qualité Q_n d'un mode propre n du levier peut être défini par :

$$Q_n = \frac{\omega_n}{\Delta\omega} \quad (\text{II-7})$$

Le facteur de qualité d'un levier est relié à la largeur à mi-hauteur de ces modes propres. Dans le cas des leviers AFM, les modes propres peuvent être assimilés à des Lorentziennes et sont définis par la fonction de transfert du levier $T(\omega)$ qui apparaît dans l'expression de $\tilde{h}(\omega)$ donnée dans l'équation (I-29) :

$$T(\omega) = \frac{1}{\omega_n^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (\text{II-8})$$

À partir de cette fonction de transfert, il est possible de déduire que le maximum M du pic vaut :

$$M = \frac{1}{\Gamma\omega_n} \quad (\text{II-9})$$

Et comme le pic considéré est une Lorentzienne, la largeur à mi-hauteur $L_{1/2}$ vaut :

$$L_{1/2} = \frac{M}{\sqrt{2}} = \frac{1}{\sqrt{2}\Gamma\omega_n} \quad (\text{II-10})$$

L'équation suivante peut alors être établie :

$$\frac{1}{\sqrt{2}\Gamma\omega_n} = \frac{1}{\omega_n^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (\text{II-11})$$

La résolution de cette équation permet de démontrer que $\Delta\omega = \Gamma$ et donc de reformuler l'équation (II-6) telle que :

$$h(t) = u_0 \frac{Q_n}{\pi\omega_n} \sin(\omega_n t) \quad (\text{II-12})$$

Il est alors possible à partir de cette dernière expression de redéfinir l'expression du signal de déflexion pure du levier $Z(t)$ en fonction de l'équation donnée en (I-22) (cf. Chapitre I, p. 25) et de l'équation (II-12) :

$$Z(t) = \sum_n \frac{Kk_z}{\rho SL} \frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \delta x g_n(x) u_0 \frac{Q_n}{\pi\omega_n} (\sin(\omega_n t)) \quad (\text{II-13})$$

Cependant d'après les conditions définies auparavant, la perturbation due au tir laser n'est possible que quand $\omega_n = \omega_0$. Seul le mode n est excité les autres modes donnent une contribution nulle. L'expression $Z(t)$ devient alors :

$$Z(t) = \frac{Kk_z}{\rho SL} \frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \delta x g_n(x) u_0 \frac{Q_n}{\pi\omega_n} (\sin(\omega_n t)) \quad (\text{II-14})$$

Enfin, en prenant en compte la visualisation du signal par la diode laser comme définie dans le Chapitre I (cf. p. 28), le signal mesuré $Z'_{QCL}(t)$ peut être défini dans le cas d'une mesure utilisant un laser QCL avec un taux de répétition de fréquence ω_n :

$$\begin{aligned} Z'_{QCL}(t) &= \frac{Kk_z}{\rho SL} \left(\frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \right)^2 u_0 \frac{Q_n}{\pi\omega_n} (\sin(\omega_n t)) \\ Z'_{QCL}(t) &= \frac{Kk_z}{\rho SL} \left(\frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \right)^2 B_{th} T_{max} \frac{\left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right)}{\omega_n} \frac{Q_n}{\pi} (\sin(\omega_n t)) \end{aligned} \quad (\text{II-15})$$

Il est possible de comparer le résultat obtenu $Z'_{QCL}(t)$ avec celui obtenu dans le cas de l'OPO $Z'_{OPO}(t)$ donné par l'équation (I-36) (cf. Chapitre I, p. 28). Les principales différences sont soulignées en rouge :

$$Z'_{OPO}(t) = \sum_n \frac{Kk_z D \delta x}{\rho SL} \left(\frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \right)^2 B_{th} T_{max} \frac{\left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right)}{\omega_n} \sin(\omega_n t) e^{-\frac{\Gamma}{2}t} \quad (\text{I-36})$$

$$Z'_{QCL}(t) = \frac{Kk_z}{\rho SL} \left(\frac{\partial g_n}{\partial x} \Big|_{x=L} \right)^2 B_{th} T_{max} \frac{\left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right)}{\omega_n} \frac{Q_n}{\pi} (\sin(\omega_n t)) \quad (II-15)$$

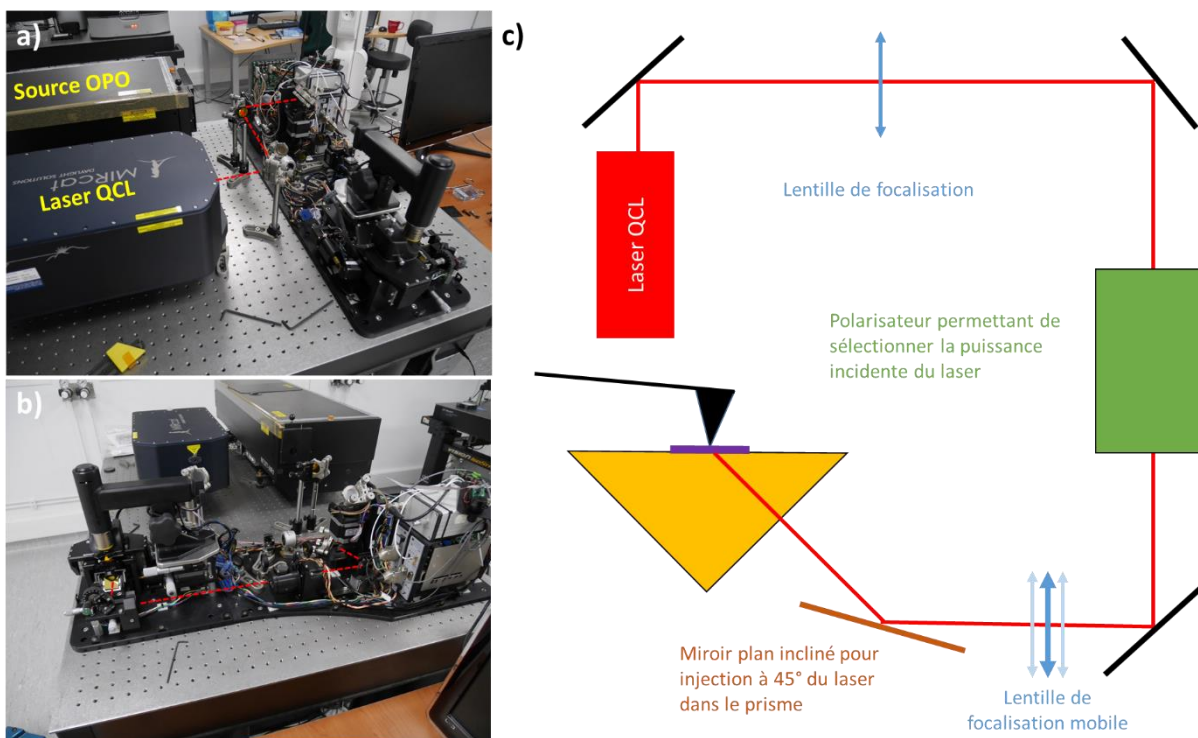
Deux différences majeures apparaissent : d'une part le terme d'amortissement $e^{-\frac{r}{2}t}$ n'est plus présent dans la formule de $Z'_{QCL}(t)$, d'autre part il apparaît dans l'équation un facteur multiplicatif directement relié au facteur de qualité du mode propre du levier sélectionné $\frac{Q_n}{\pi}$. Dans le cas des leviers AFM utilisés pour la mesure AFM-IR, le facteur de qualité des différents modes propres varie entre la dizaine à la centaine. La perte du facteur d'amortissement combinée au facteur multiplicatif lié au facteur de qualité conduit théoriquement à une augmentation de la sensibilité du signal par au moins un à deux ordres de grandeur par rapport au signal obtenu avec l'OPO. Sachant que la sensibilité maximale déterminée dans le cas de l'OPO est de l'ordre de 50 à 100 nm dans le cas d'un polymère [40], l'équation (II-15) nous indique donc que l'augmentation de sensibilité devrait nous permettre d'atteindre des sensibilités de l'ordre de 1 nm voire moins dans le cas d'un polymère pur et ouvre la voie à de nouvelles applications avec la technique AFM-IR.

II. Mise en place de la résonance forcée sur le système AFM-IR en réflexion totale

Les travaux effectués par F. Lu et al. ont été faits avec un éclairage par le dessus [16]. Depuis la parution de cet article, ce type d'éclairage est devenu la configuration la plus répandue pour les systèmes AFM-IR commercialisés. L'étude de ce mode d'éclairage, ces avantages et ces limitations sont développés dans le chapitre suivant (Chapitre III). Les deux configurations ne sont pas totalement équivalentes. La configuration en réflexion totale possède des avantages comme un meilleur contrôle de la profondeur de pénétration de l'éclairage dans l'échantillon permettant de mettre en place des mesures quantitatives et des facilités techniques pour la mise en place de l'AFM-IR en mode liquide. En conséquence, il est nécessaire de développer le même type de couplage utilisant les lasers QCL avec l'éclairage en réflexion totale à la fois pour une étude plus approfondie sur les phénomènes mis en jeu dans le cas de la résonance forcée, mais aussi pour le développement d'applications futures en AFM-IR.

1. Montage expérimental

La configuration mise en place est proche de celle utilisée classiquement en AFM-IR en réflexion totale avec la source OPO (Figure II-6). L'installation d'un ensemble de miroirs fixes et amovibles permet de passer du laser QCL à l'OPO sans avoir à modifier le trajet optique d'un des deux lasers. Le seul changement majeur est l'ajout d'une lentille fixe sur le trajet optique entre les deux miroirs. Celle-ci, couplée à la lentille mobile de focalisation, permet d'obtenir un spot de taille optimale sous la pointe de quelques dizaines de micromètres avec le laser QCL. En utilisant le laser vert de référence déjà aligné avec la source OPO, il a été possible d'aligner le laser QCL de sorte que le trajet optique au sein du microscope soit le même pour les deux lasers. Il est donc aisé de passer d'un laser à l'autre pour étudier un même échantillon.



2. Validations expérimentales

Pour valider le mode résonant dans cette configuration d'éclairage, l'échantillon utilisé est une culture de bactérienne de *Streptomyces Lividans*. Cette bactérie filamenteuse a été largement étudiée au sein de l'équipe pour sa production de lipides [54], [64], [65]. Pour cet échantillon bactérien, le dépôt sur ZnSe est bien contrôlé et il est possible d'y observer simultanément deux types objets. D'une part les filaments bactériens contenant des lipides et d'autre part les rémanents cellulaires. Ces derniers sont des dépôts de protéines et de membranes de quelques dizaines de nanomètres d'épais qui résultent de la mort des premières générations de bactéries par autophagie [66]. Du fait de leur épaisseur qui est inférieure à 50 nm, les rémanents cellulaires n'ont jamais été détectés en AFM-IR classique. En conséquence, cet échantillon est optimal pour la preuve de concept de l'AFM-IR en résonance forcée en réflexion totale, car il est possible d'avoir dans une même région d'intérêt un objet d'épaisseur supérieure à 100 nm qui est comparable avec la mesure classique en OPO et un échantillon d'épaisseur plus faible qui n'est accessible que si le mode résonant est utilisé.

La première mesure a été faite sur une bactérie entière. La configuration de notre système permettant d'utiliser les deux lasers de manière séquentielle, il est possible de comparer les résultats obtenus en AFM-IR classique et en AFM-IR en résonance forcée pour une même zone d'intérêt et sur un même objet (Figure II-7). Il est à noter qu'il existe un léger décalage sur la droite entre les deux zones étudiées avec la source OPO (Figure II-7 a), b) et d)) et avec le laser QCL (Figure II-7 c) et e)). Cette comparaison permet déjà de vérifier que l'utilisation du laser QCL ne modifie pas la qualité des résultats sur un objet étudiable avec l'OPO. Pour la comparaison, la puissance des lasers a été sélectionnée de manière à avoir des cartographies

de signal équivalent pour chaque nombre d'onde. Que ce soit au niveau de la comparaison de la cartographie chimique des protéines (bande amide I à 1650 cm^{-1}) (Figure II-7 b) et c)) ou de la comparaison de la cartographie chimique des lipides (bande ester à 1740 cm^{-1}) (Figure II-7 d) et e)), les résultats obtenus en résonance forcée et en oscillation amortie sont équivalents, même s'il semble que les images QCL soient plus sensibles aux objets fins. Un résultat similaire est observé sur les spectres locaux (non montré ici). L'utilisation des lasers QCL et la mise en place de la résonance forcée ne modifient donc pas les résultats AFM-IR pour des échantillons d'une épaisseur supérieure à plus de 100 nm.

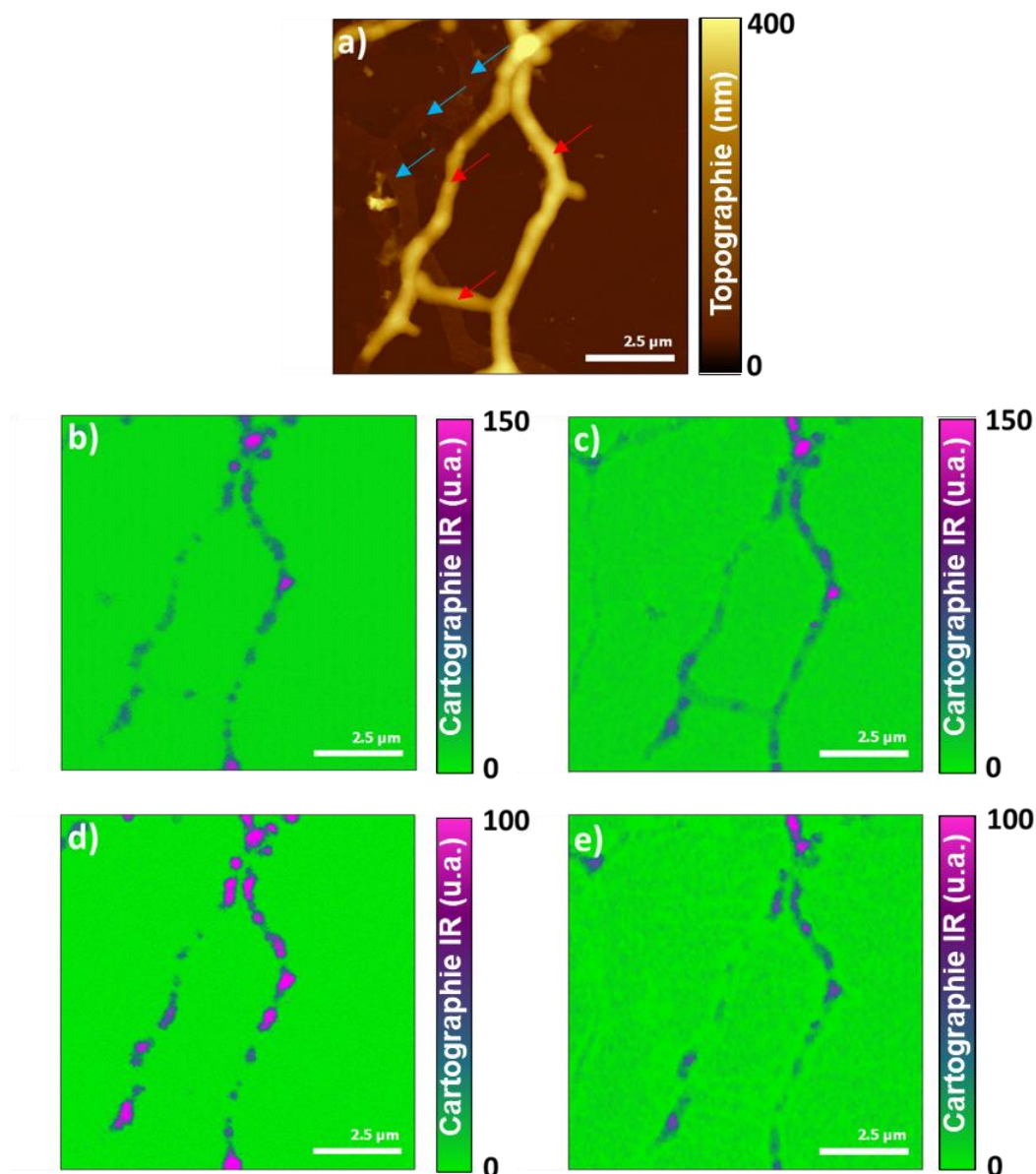


Figure II-7 : Étude de filaments de *Streptomyces Lividans* en mode classique avec l'OPO (oscillations amorties) et en mode résonant avec le laser QCL (résonance forcée) - a) Topographie AFM acquise durant la mesure en oscillation amortie, les flèches rouges indiquent la position des filaments et les flèches bleues les rémanents cellulaires - b), c) Cartographies chimiques à 1650 cm^{-1} respectivement avec le l'OPO et le laser QCL - d), e) Cartographies chimiques à 1740 cm^{-1} respectivement avec l' OPO et le laser QCL

Dans la topographie AFM de la bactérie (Figure II-7 a)), il est possible d'observer un rémanent cellulaire dans la moitié gauche de l'image. Cependant celui-ci n'apparaît pas dans les cartographies chimiques obtenues avec le laser QCL (Figure II-7 c) et e)). Cela est dû au fait

que la puissance du laser QCL utilisée ici est relativement faible pour être comparable avec le résultat obtenu avec l'OPO. Une étude plus spécifique des rémanents cellulaires a donc été effectuée avec les paramètres appropriés pour les faibles épaisseurs d'échantillons (Figure II-8). Dans le cas de l'analyse classique utilisant le l'OPO, il est possible de voir sur la cartographie à 1650 cm^{-1} que la seule partie ayant du signal à une épaisseur supérieure à 100 nm (Figure II-8 b)). La même étude a été effectuée ensuite avec le laser QCL. Cependant entre les deux études, une expérience utilisant une pointe en or avec l'OPO a été effectuée et a endommagé la zone d'étude, notamment l'objet de plus de 100 nm d'épais ainsi que des points de dommages localisés sur le rémanent cellulaire central comme il est possible de l'observer sur la topographie AFM obtenue lors de la mesure en résonance forcée (Figure II-8 c) où les principaux dommages sont indiqués par des flèches rouges. Pour plus de détails, les résultats de l'étude avec la pointe en or seront présentés dans le Chapitre III. Du fait de ses dommages, la zone d'intérêt a été décalée de quelques micromètres pour pouvoir observer un autre objet d'épaisseur supérieure à 100 nm. L'étude de la même zone en résonance forcée avec le laser QCL à pleine puissance permet de voir un faible signal en contraste provenant de certaines zones des rémanents cellulaires (Figure II-8 d)), notamment au niveau de l'intersection de celui à l'horizontale et de celui à la verticale de l'image. Les rémanents présentés ici ont une épaisseur de l'ordre de 20 nm, ce qui représente une épaisseur cinq fois inférieure à l'épaisseur limite en AFM-IR classique. De plus, comme les rémanents contiennent à la fois des lipides et des protéines, le signal observé ne provient que d'une portion de l'échantillon mesuré. En conclusion, il est donc possible d'utiliser la résonance forcée pour obtenir du signal AFM-IR sur des objets de l'ordre de la dizaine de nanomètres d'épais. Ce qui démontre bien l'amélioration de la sensibilité.

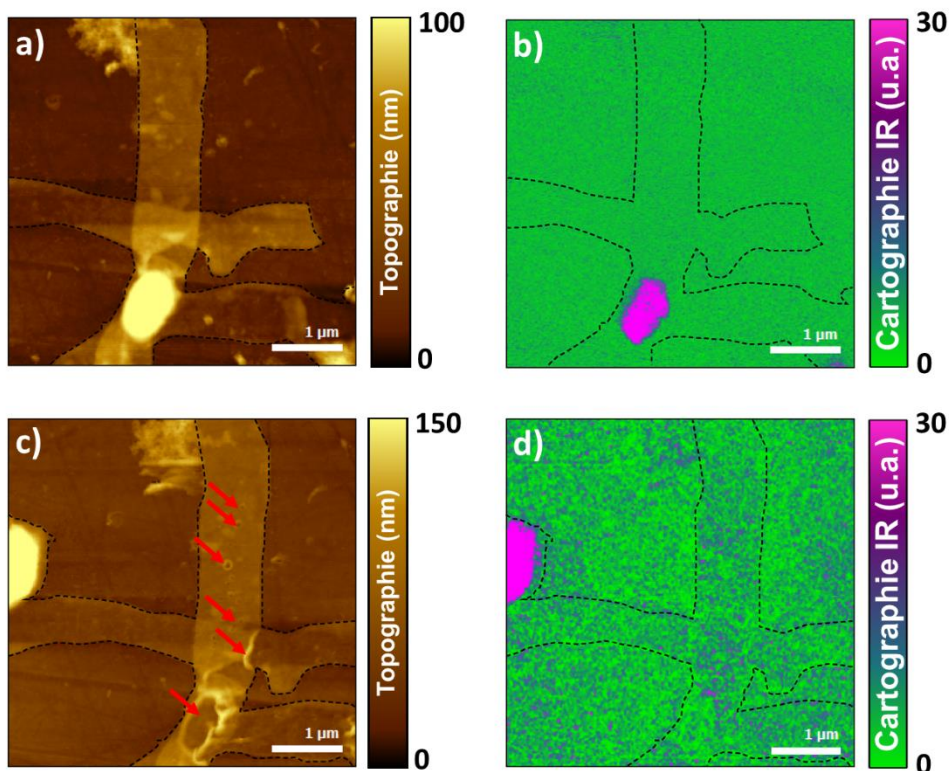


Figure II-8 : Comparaison entre l'étude avec la source OPO (oscillations amorties) et le laser QCL (résonance forcée) d'une zone d'intérêt contenant un rémanent cellulaire de bactérie - a) Topographie AFM de la zone d'intérêt obtenue lors de l'analyse avec la source OPO - b) Cartographie chimique à 1650 cm^{-1} avec la source OPO - c) Topographie AFM de la zone d'intérêt obtenue lors de l'analyse avec le laser QCL, les flèches en rouge indiquent les principales zones de dégâts infligés par la pointe en or - d) Cartographie chimique à 1650 cm^{-1} avec le laser QCL

Les mesures présentées par Lu et al. [16] ont été effectuées sur un échantillon d'une épaisseur minimale de 50 nm. Les rémanents cellulaires observés ici sont plus fins, ce qui explique en partie la différence de rapport signal sur bruit observée. De plus, les rémanents cellulaires n'étant pas constitués que de protéines, le signal attendu est plus faible que dans le cas des polymères purs étudiés avec l'éclairage par le dessus.

En analysant une zone présentant une superposition de rémanents cellulaires, il est possible d'évaluer l'évolution du signal en fonction de l'épaisseur et déterminer l'épaisseur minimale pour avoir un signal suffisant dans le cas spécifique du rémanent cellulaire (Figure II-9). En étudiant le signal obtenu en fonction de la hauteur de l'échantillon correspondant, il est possible de voir que le signal optimal est obtenu pour un échantillon de l'ordre de 40-50 nm. Ce qui est dans les ordres de grandeur de ce qui a été observé par Lu et al. [16]. La différence est que dans le cas de l'article, l'échantillon mesuré était pur chimiquement alors qu'ici l'échantillon étudié est complexe. Le résultat ici présente donc une meilleure sensibilité que ce qui a été fait par l'équipe de M. Belkin.

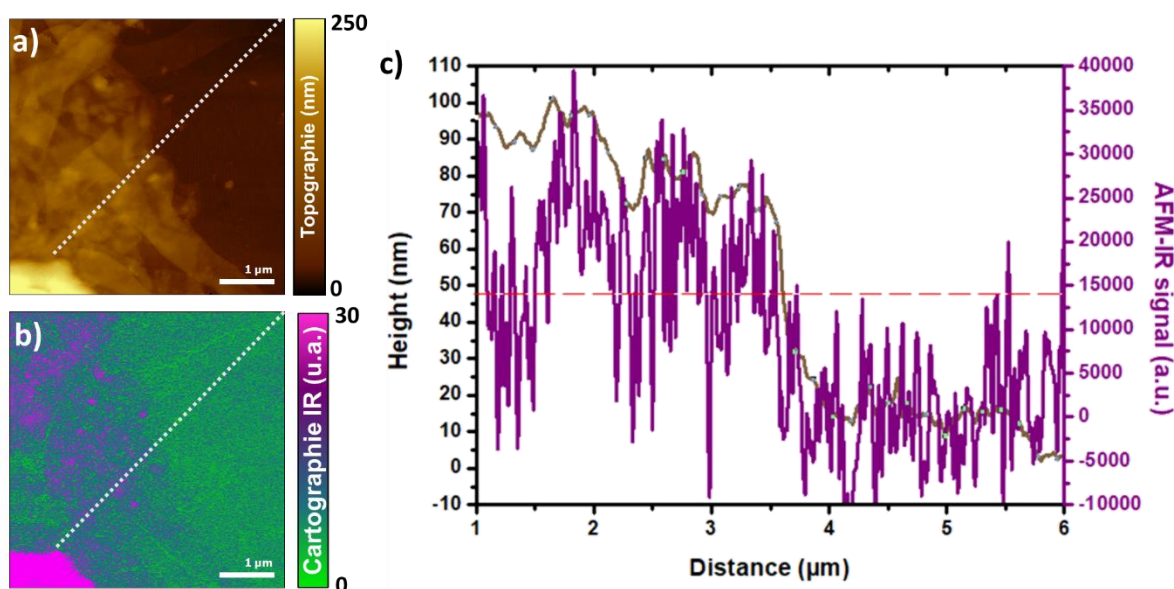


Figure II-9 : Étude d'un dépôt de rémanents cellulaires par AFM-IR en résonance forcée – a) Topographie AFM du dépôt – b) Cartographie chimique à 1650 cm^{-1} avec le laser QCL – c) Comparaison de la variation de hauteur le long du profil (ligne en pointillés blancs) avec la variation du signal AFM-IR le long de cette même ligne.

Les résultats obtenus démontrent que, quelle que soit la configuration d'illumination utilisée, il est possible de mettre en place un régime de résonance forcée qui permet d'augmenter significativement la sensibilité de la mesure AFM-IR et d'avoir accès à des échantillons d'épaisseurs de la dizaine de nanomètres. Cependant, en prenant en compte uniquement le résultat obtenu avec la théorie et en considérant le facteur de qualité du levier utilisé ici qui est de l'ordre d'un facteur trente, les objets les plus fins dont l'épaisseur est inférieure à la dizaine de nanomètres auraient pu être mesurables. Cette divergence est due au fait que si la théorie présentée permet de comprendre les phénomènes mis en jeu expérimentalement, elle ne permet pas de prendre en compte un certain nombre de facteurs expérimentaux. Le principal qui apparaît ici est le bruit de la mesure lors de l'acquisition de cartographie chimique en résonance forcée. Ce bruit peut être mis en évidence en observant le signal obtenu sur la surface de ZnSe (entre la distance $4\text{ }\mu\text{m}$ et $6\text{ }\mu\text{m}$ sur la Figure II-9 c) où il n'y a aucune absorbance. On constate dans ce cas que le signal possède une oscillation importante autour de la valeur d'absorbance moyenne nulle. En conséquence, pour qu'un

signal soit détecté, il faut que sa valeur moyenne soit au moins supérieure à celle de l'amplitude des oscillations. Cette condition ne semble atteinte ici que pour des objets ayant une épaisseur supérieure à cinquante nanomètres. Du fait que le bruit est observé sur la surface de ZnSe sans qu'il y ait d'absorption IR, il est possible d'en déduire que ce bruit est probablement lié soit à la détection de la déflexion par la tête AFM, soit à un bruit électronique et donc serait indépendant du mode de mesure AFM-IR utilisé. Ce bruit observé expérimentalement diminue l'efficacité de l'utilisation de la résonance forcée avec le système nanoIR1 du laboratoire.

En conclusion, les mesures effectuées sur un dépôt de bactéries *Streptomyces Lividans* ont permis de montrer que d'une part pour les objets déjà analysables en AFM-IR classique, l'utilisation de la résonance forcée ne modifie pas les performances de la mesure et que d'autre part cette dernière permet d'analyser des échantillons plus fins que ce qui était jusque-là accessible. Cependant, ces mesures ont aussi mis en évidence que les performances de sensibilité obtenues en résonance forcée sont inférieures à ce qui est attendu. Cette différence s'explique par la présence d'un bruit important dans la mesure de déflexion.

III. Acquisitions de cartographies et de spectres en résonance forcée

D'un point de vue expérimental, le passage à la résonance forcée n'a pas modifié le fonctionnement de base du système. On retrouve les deux modes d'acquisition séquentiels déjà utilisés en AFM-IR classiques c'est-à-dire la cartographie d'absorption IR à un nombre d'onde donné et les spectres d'absorption IR locaux. Si le mode de fonctionnement n'a pas été modifié, un nouveau point de réglage apparaît : la nécessité d'ajuster au cours du temps le taux de répétition de tir du laser pour toujours exciter le maximum de la résonance de contact. Le but de cette partie est de détailler les procédures développées pour parvenir à faire les acquisitions dans ces conditions.

1. Les cartographies d'absorption IR : mise en place du rétrocontrôle en fréquence

La clef de la mesure AFM-IR en résonance forcée est de réussir à ajuster la fréquence de tir du laser sur un mode de résonance du levier pour obtenir le régime d'oscillations entretenues. Les modes de résonance de contact caractéristiques d'un levier utilisé en AFM-IR ont été donnés en Figure II-1. Pour des fréquences inférieures à 1 MHz, chaque mode peut être représenté par une Lorentzienne dont la largeur à mi-hauteur varie entre 5 kHz et 10 kHz selon les modes considérés.

Comme présenté dans le chapitre I, la valeur des fréquences de résonances de contact est déterminée par les caractéristiques du levier, mais est aussi par la raideur de contact entre la pointe et l'échantillon. Les principaux effets qui vont conduire à une variation de la résonance de contact sont : des variations du module d'Young des matériaux, des variations d'adhésion au niveau de la surface ou encore des variations brusques de topographie qui peuvent

modifier le contact entre la pointe et la surface. Il est donc fort probable qu'au cours de l'acquisition d'une cartographie d'absorption IR, il soit observé des variations du maximum de fréquence de la résonance de contact du mode utilisé pour détecter l'absorption IR. Cette variation en fréquence peut avoir un impact sur la mesure et doit donc être évaluée. Cet impact peut être mis en évidence à travers une expérience qui consiste à comparer des cartographies d'absorption IR successives en fonction de la fréquence de répétition du laser. Les résultats de cette expérience sont donnés en Figure II-10. La mesure a été effectuée avec l'éclairage en réflexion totale et l'échantillon analysé est une bille de PMMA incluse dans une matrice d'époxy. Le levier utilisé est un levier silicium dont le mode de résonance considéré ici est centré à 260,5 kHz. La Figure II-10 représente différentes cartographies obtenues à 1726 cm^{-1} (absorption du groupement carbonyle C=O du PMMA) dont tous les paramètres d'acquisitions sont conservés hormis le taux de répétition de tir du laser qui varie sur une gamme proche de la fréquence de la résonance de contact. La comparaison des résultats met en évidence que plus le taux de répétition de tir du laser sélectionné est proche de la fréquence maximale du mode de résonance et plus le signal est intense et homogène. La variation de signal entre le haut et le bas de la bille s'explique par un plan d'inclinaison de la coupe observable en topographie AFM. En revanche au niveau des contours de la bille (l'interface PMMA/époxy) et des fractures de la bille, le signal détecté est soit plus intense soit plus faible qu'attendu. Cet artefact connu en AFM-IR est lié à la rapide variation de topographie et de dureté du matériau qui induit une perturbation du contact entre la pointe et l'échantillon. Cela se traduit alors par une variation locale de la valeur en fréquence de la résonance de contact. Pour suivre cette variation locale, il est nécessaire de mettre en place un rétrocontrôle en fréquence qui va permettre de mesurer en chaque point la fréquence de la résonance de contact étudiée et d'ajuster la valeur du taux de répétition de tir du laser pour que celui-ci corresponde à cette fréquence. Sans rétrocontrôle en fréquence, la mesure va être sensible à des artefacts comme ceux observés en Figure II-10 qui vont soit générer un signal AFM-IR là où il n'y en a pas, soit annuler le signal lié à l'absorption IR. Non pris en compte, cet effet peut même devenir prépondérant : le contraste de l'image obtenue sera alors majoritairement dominé par les effets topographiques et mécaniques au lieu de l'information chimique recherchée.

L'expérience qui vient d'être présentée démontre bien l'importance de maintenir le taux de répétition de tir du laser synchronisé avec le maximum en fréquence de la résonance de contact pour obtenir une cartographie d'absorption IR correcte. D'un autre point de vue, il est possible de voir que la mesure AFM-IR permet de mesurer en tout point la résonance de contact de l'objet sous condition que celui-ci absorbe le rayonnement IR au nombre d'onde d'étude. De ce fait, la mesure AFM-IR en résonance forcée apparaît alors analogue à une mesure de microscopie à force atomique en résonance de contact (CR-AFM) [67], [68]. La différence réside que, dans le cas de la mesure AFM-IR, l'oscillation du levier n'est pas induite par une excitation de la surface de l'objet par une céramique piézoélectrique [67] ou par une excitation photothermique du levier [69], mais par l'expansion photothermique due à l'absorption de l'échantillon.

Ce problème du suivi de la position en fréquence du maximum d'un pic de résonance de contact lors du balayage d'une surface est donc très bien connu dans le cas du CR-AFM où on mesure le décalage du maximum en fréquence d'un pic de résonance de contact par rapport à une valeur de référence en fonction de la position du levier. Un changement de ce maximum indique une variation des propriétés mécaniques du levier et permet de mesurer le module d'Young du matériau situé sous la pointe à partir de modélisations. Pour résoudre ce problème, essentiel pour assurer la qualité de la mesure, deux solutions existent : la première consiste à mesurer en chaque point l'amplitude du pic de résonance de contact et de mettre en place le rétrocontrôle à partir de la mesure de la variation d'amplitude ; la seconde solution consiste à étudier la phase de ce signal.

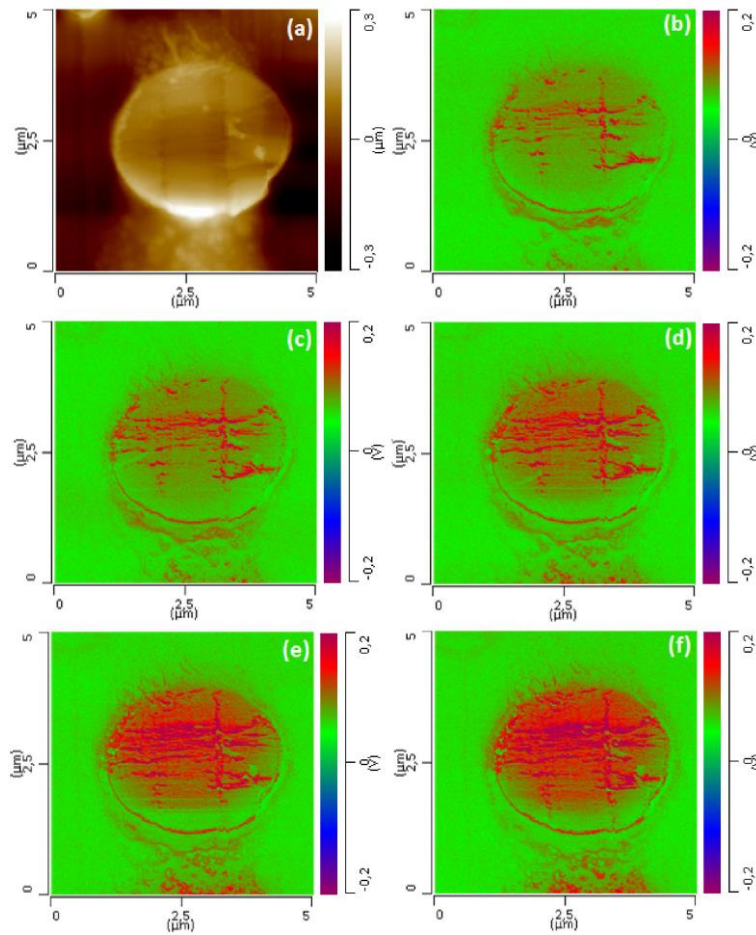


Figure II-10 : Étude de l'effet de la fréquence sur le signal obtenu en cartographie IR - a) Topographie de la zone étudiée - Cartographies effectuées à 1726 cm^{-1} et à différentes fréquences de balayage b) fréquence = 255,1 kHz - c) fréquence = 256,4 kHz - d) fréquence = 257,7 kHz - e) fréquence = 259 kHz - f) fréquence = 260 kHz

La suite de cette partie va donc s'intéresser à la mise en place de ces deux solutions de rétrocontrôle en fréquence dans le cadre de la mesure AFM-IR en résonance forcée et à évaluer leurs performances.

a) *Rétrocontrôle en fréquence : suivi de l'amplitude de la résonance de contact - le mode chirp*

Dans le cas de la mise en place d'un rétrocontrôle en fréquence utilisant la mesure de l'amplitude d'un pic de résonance de contact, deux solutions ont été proposées.

La première est le suivi de la résonance par double amplitude (DART) [70]. Dans ce cas, le système de rétrocontrôle mesure l'amplitude de signal à deux fréquences disposées de part et d'autre du maximum de la résonance de contact. Un changement de ces valeurs d'amplitude va indiquer un décalage du maximum en fréquence de la résonance de contact. Il va être possible de calculer le décalage en fréquence de la résonance de contact grâce à la mesure de l'intensité pour les deux fréquences.

Pour la seconde solution appelée « chirp », la résonance de contact est mesurée en chaque point par une stimulation externe très rapide produite par une céramique piézoélectrique qui va faire vibrer la surface à différentes fréquences [71], [72]. À partir de cette stimulation, il est

possible de détecter précisément le maximum de fréquence. La difficulté de cette méthode est de réussir à mettre en place un système de stimulation/détection suffisamment stable et rapide pour que le temps de mesure soit adapté à la mesure AFM. Ce problème ne se pose pas pour la mesure AFM-IR en résonance forcée et c'est donc cette solution qui a été choisie. En effet dans le cas de l'AFM-IR, la stimulation extérieure de la surface n'est pas faite via une céramique piézo-électrique, mais par l'effet photothermique. S'il y a absorption par l'échantillon, celui-ci va se mettre à osciller à la fréquence de tir du laser. En changeant la fréquence, il va alors être possible de moduler l'oscillation de l'échantillon sur une gamme de fréquences donnée et obtenir une situation analogue à l'utilisation de la céramique piézoélectrique proposée par la détection *chirp*. Cette seconde technique est donc apparue plus simple à mettre en œuvre dans le cas de la mesure AFM-IR en résonance forcée que le DART, car elle ne nécessite pas une importante modification du montage initial. Un exemple détaillé de ce type de montage a été présenté pour la première fois dans l'article de G. Ramer et al. [73]. À cela s'ajoute une procédure de mesure qui sera par la suite la procédure standard utilisée avec ce type de rétrocontrôle en fréquence :

- Dans une première étape, qui a lieu avant la mesure, la position des fréquences de résonance de contact est déterminée, puis une des résonances de contact est choisie.
- Lors de la mesure, en chaque point, la fréquence de tir du laser est variée autour de la fréquence précédemment sélectionnée. La détection de l'amplitude d'oscillation du levier est faite pour chaque fréquence grâce au détecteur 4-cadrans qui permet de mesurer la déflexion du levier AFM. À partir des valeurs mesurées, un pic de détection est obtenu et la valeur du maximum en fréquence de la résonance de contact du levier est évaluée.
- La fréquence de tir du laser est alors ajustée pour correspondre à la position du maximum de la résonance de contact. La mesure du signal AFM-IR est enfin effectuée. Puis le levier change de position et la procédure recommence.

L'avantage de cette approche est qu'elle permet de maximiser le signal AFM-IR en résonance forcée en chaque point. Pour les spectres, comme l'acquisition se fait en un point, il suffit de faire une seule mesure de la résonance de contact avant l'acquisition. En revanche, dans le cas de la cartographie chimique, il est nécessaire de mettre en place un rétrocontrôle en fréquence en chaque point de mesure, dont le nombre peut varier de 300 points à 1000 points par ligne. En prenant en compte le temps pris pour la mesure en plus de celle pour le rétrocontrôle en fréquence, la vitesse d'acquisition va être fortement diminuée. Pour rester dans un temps d'acquisition raisonnable, il faut trouver un compromis entre le nombre de points nécessaire pour détecter le maximum du pic de résonance de contact et le temps d'acquisition pour le rétrocontrôle en fréquence. Un exemple de pic de détection utilisé pour le rétrocontrôle en fréquence est donné en Figure II-11. Dans cette figure, la partie b) représente les pics de détection par la boucle de rétrocontrôle pour trouver la position de la résonance de contact en fonction du nombre de points utilisés pour la détection. Plus le nombre de points utilisés est important et plus le pic de résonance de contact est correctement modélisé. L'erreur sur la position du maximum en fréquence est alors réduite. Cependant dans le cas de l'imagerie, cette étape doit être répétée en chaque point et se révèle très consommatrice en temps. En effet, il apparaît expérimentalement que c'est le temps d'acquisition du rétrocontrôle en fréquence qui va fixer la vitesse de balayage par ligne de la mesure et celui-ci peut rapidement augmenter le temps d'acquisition. Par exemple, dans le cas où la détection est faite avec 20 points, la fréquence maximale de balayage accessible avec ce type de rétrocontrôle en fréquence n'excédera pas 0,2 Hz. Comme montré dans la Figure II-12 qui est une acquisition de cartographie chimique à 1732 cm^{-1} dans une coupe de billes de PMMA dans

une matrice d'époxy, si cette fréquence de balayage dépasse la valeur de 0,2 Hz, le rétrocontrôle va générer des artefacts qui sont directement observables sur la cartographie IR (Figure II-12 c) et d)).

Cette fréquence de balayage conduit à une vitesse d'acquisition relativement faible pour une mesure AFM et limite la quantité de données accessibles. Le rôle du temps d'acquisition en chaque point a aussi été étudié, mais l'influence de ce paramètre semble mineure comparé à celui du nombre de points utilisés.

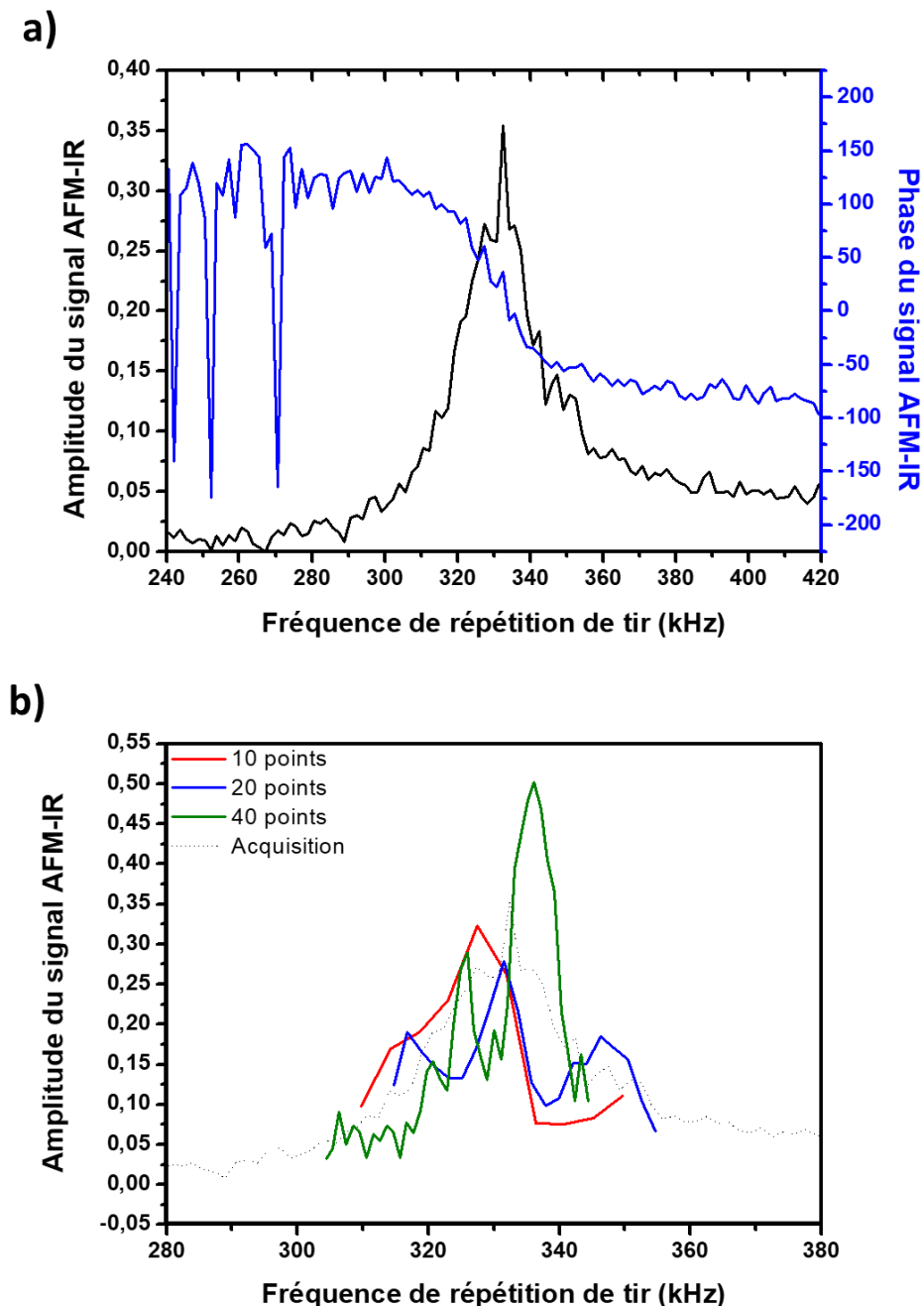


Figure II-11 : Détection du signal utilisé pour le rétrocontrôle en fréquence en mode chirp – a) Résonance de contact étudiée ; la variation d'amplitude du signal est donnée en noir, la variation de phase en bleue – b) Exemple de pics de détection de la résonance de contact en un point en mode chirp en fonction du nombre de points utilisés – le pic en pointillé indique la résonance de contact réelle donnée en a)

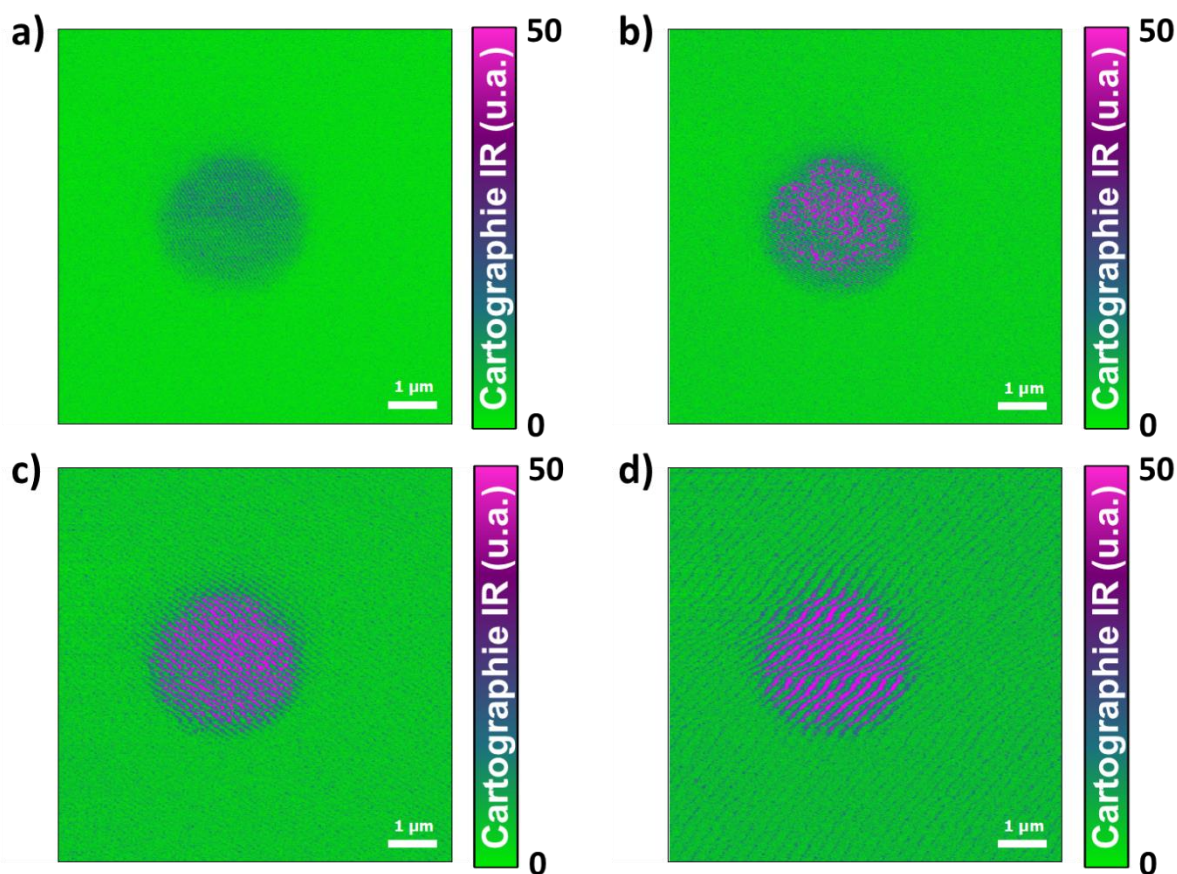


Figure II-12 : Étude de l'influence de la vitesse de balayage sur le signal obtenu en mode chirp dans le cas de la cartographie chimique à 1732 cm^{-1} d'une coupe de bille de PMMA – a) Fréquence de balayage : 0.1 Hz – b) Fréquence de balayage : 0.2 Hz – c) Fréquence de balayage : 0.4 Hz – d) Fréquence de balayage : 0.6 Hz

En observant le pic de détection obtenu avec 20 points (Figure II-11 b)), on constate que celui-ci ne décrit pas parfaitement le pic de résonance de contact étudié. Ceci n'est pas sans conséquence sur la mesure. Une mesure de reproductibilité de trois acquisitions successives d'un pic d'acquisition en un même point est donnée en Figure II-13. Il est alors possible de constater que la position du maximum qui peut être extraite de ces mesures varie de plusieurs kilohertz d'une mesure à l'autre. Or les résultats obtenus en Figure II-10 montre qu'à partir de quelques kilohertz de décalage par rapport au maximum en fréquence du mode de résonance, la mesure devient très sensible aux artefacts. Il faut donc que la précision du rétrocontrôle soit de l'ordre de 1 kHz pour être sûr de maintenir la correspondance du signal AFM-IR détecté avec le signal d'absorption IR pur. Dans la mesure où le champ principal d'application de la résonance forcée se fait sur des échantillons de faible épaisseur ou de faible concentration, le rapport signal sur bruit sera faible et l'erreur risque de dépasser quelques kilohertz, ce qui est suffisante pour introduire des artefacts de mesure. Il est donc nécessaire de trouver un autre moyen de détection plus précis pour améliorer la qualité de la mesure.

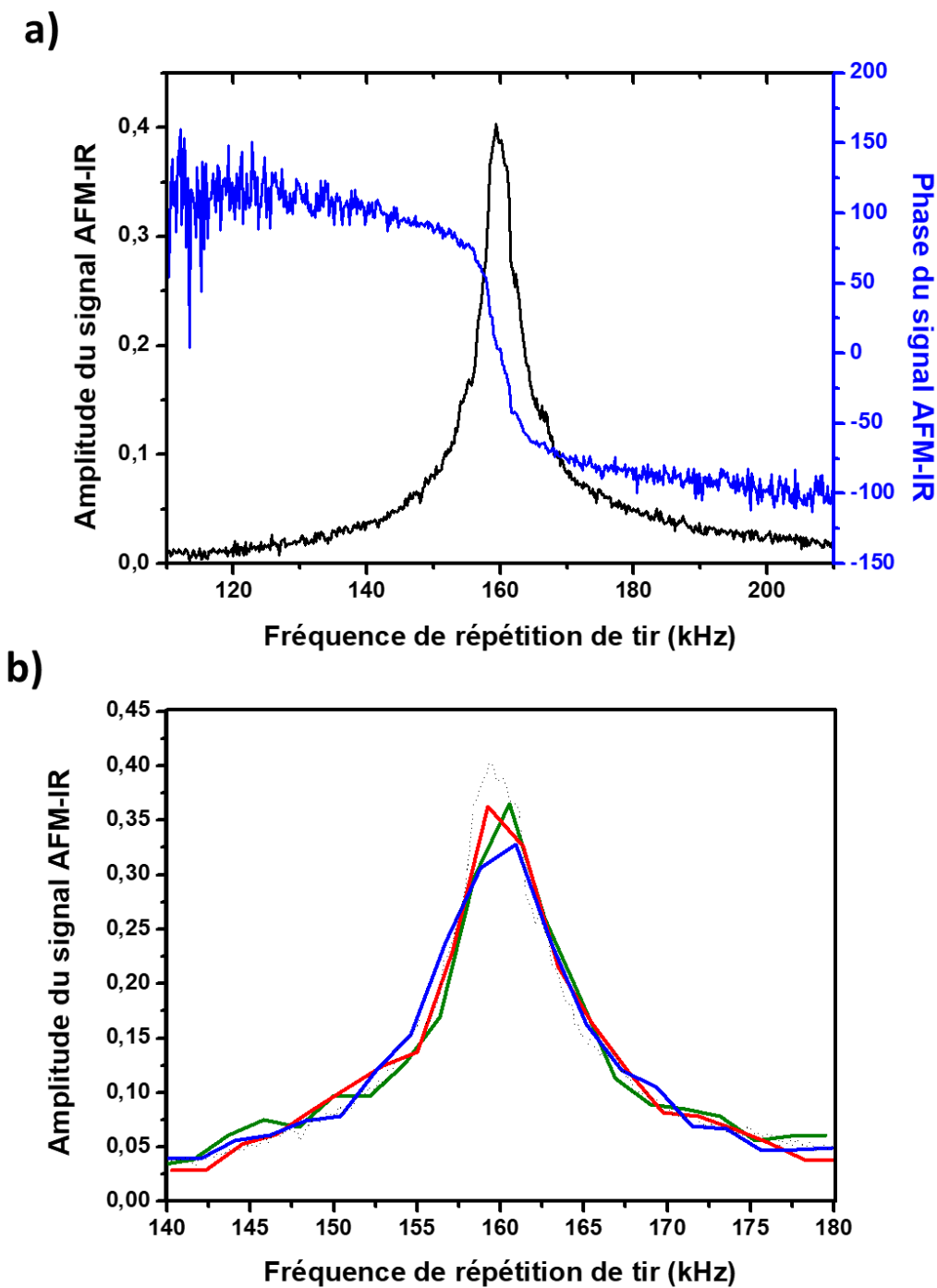


Figure II-13 : Reproductibilité de la détection du signal utilisé pour le rétrocontrôle en fréquence en mode chirp – a) Résonance de contact étudiée ; la variation d'amplitude du signal est donnée en noir, la variation de phase est donnée en bleue – b) Exemple de trois acquisitions du pic de résonance obtenues successivement en un même point – le pic en pointillé indique la résonance de contact réelle donnée en a)

b) *Rétrocontrôle en fréquence : suivi de la phase du pic de résonance de contact - le mode PLL (Phase Locking Loop)*

Une solution proposée pour dépasser les problèmes observés avec le rétrocontrôle en fréquence du mode chirp est de ne plus s'intéresser à la variation du maximum d'amplitude

de la résonance de contact mais de suivre son changement de phase. En effet, jusqu'ici l'étude de la résonance de contact s'est focalisée sur la variation d'amplitude du mouvement d'oscillation du levier qui devient plus importante à mesure que la fréquence de tir du laser s'approche de la fréquence de la résonance de contact. Cependant, il est aussi possible d'extraire la phase de l'oscillation en fonction de la fréquence (en bleu dans la Figure II-11 a) et Figure II-13 a)). La position du point d'inflexion de la courbe de phase correspond à la position du maximum d'amplitude du pic de résonance de contact. Tout déplacement de la position du maximum du pic de résonance de contact va induire un déplacement de la position du point d'inflexion de la phase.

Les systèmes fonctionnant avec un rétrocontrôle de la phase sont appelés PLL (pour Phase Locked Loop) et ont déjà été développés dans le cas des mesures AFM en mode non-contact. Ils ont aussi été implémentés pour des mesures en CR-AFM [74]. L'avantage d'utiliser la phase pour détecter les changements de résonance de contact est que la détection des changements de points d'inflexion est plus simple à mettre en œuvre et est plus rapide.

Dans le cas des mesures AFM-IR, la mise en place d'un rétrocontrôle en fréquence utilisant un système PLL permet d'obtenir des cartographies chimiques plus précises et à une vitesse d'acquisition plus rapide. Un exemple d'acquisition de cartographie chimique avec le PLL est donné en Figure II-14. La zone analysée est la même que celle présentée en Figure II-12 et hormis le type de rétrocontrôle en fréquence utilisé, tous les autres paramètres de mesure sont identiques.

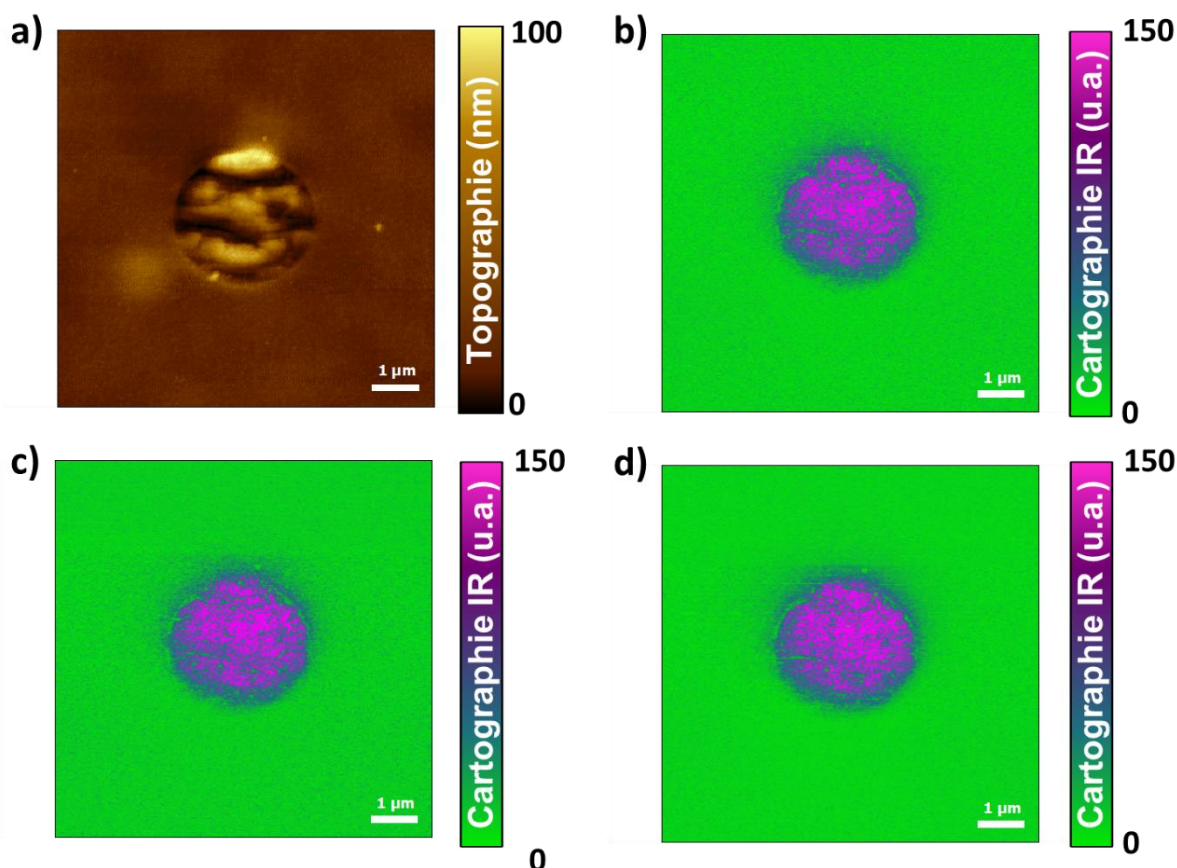


Figure II-14 : Étude de l'influence de la fréquence de balayage sur le signal obtenu en mode PLL dans le cas de la cartographie chimique à 1732 cm^{-1} d'une coupe de bille de PMMA – a) Topographie AFM– b) Vitesse de balayage : 0.2 Hz – c) Vitesse de balayage : 0.4 Hz – d) Vitesse de balayage : 0.6 Hz

Sur l'acquisition obtenue en PLL, on peut constater que le signal obtenu est beaucoup moins pixélisé. Ceci est logique, car l'objet observé est plan et chimiquement homogène (la topographie de l'objet est donnée en Figure II-14 a)). Il ne devrait y avoir aucune différence de contraste entre deux points adjacents. Les différences observées entre les différentes vitesses de balayage sont minimales et montrent qu'il est possible d'au moins doubler la vitesse de balayage par rapport au mode chirp, ce qui conduit à une diminution importante du temps d'acquisition. La comparaison des deux figures permet d'illustrer l'intérêt d'utiliser un système de rétrocontrôle de type PLL plutôt qu'un système de type chirp.

Les performances du système utilisant le PLL montrent que ce type de rétrocontrôle en fréquence permet d'améliorer la qualité des résultats obtenus. Il permet aussi d'augmenter sensiblement la vitesse de balayage utilisable pour la cartographie d'absorption IR et donc d'accroître la quantité de données acquises. Cette augmentation conduit même à obtenir des cartographies d'absorption IR avec des vitesses d'acquisition deux à trois fois plus élevées qu'en AFM-IR classique. De ce point de vue, l'utilisation du PLL représente une amélioration importante de la technique AFM-IR, car on peut atteindre facilement des vitesses de balayage de 0,5 Hz/ligne.

Cependant, il a été observé expérimentalement que la détection utilisant le PLL ne peut pas suivre un décalage en fréquence de la résonance de contact si celui est trop important en termes de fréquence. Ça sera le cas, pour des objets très hétérogènes mécaniquement comme par exemple un mélange de polymères dont l'un est dur et l'autre mou ou encore des objets contenant une phase organique et une phase inorganique. Dans ces cas-là, il sera extrêmement difficile d'utiliser ce type de rétrocontrôle en fréquence pour réussir à imager l'ensemble de l'échantillon.

Un autre point important, qui est aussi valable pour le cas de la détection chirp, est la nécessité d'avoir un matériau absorbant sous la pointe pour détecter la fréquence de résonance. En effet dans le cas de la technique CR-AFM, la détection de la résonance de contact se fait grâce à une stimulation extérieure obtenue avec des céramiques piézoélectriques. Dans ce cas, la stimulation peut se faire en tout point, quel que soit le matériau. Dans le cas de la mesure AFM-IR, cette stimulation est reliée à l'expansion photothermique de l'objet : c'est en changeant la fréquence de cette expansion photothermique via la fréquence de tir du laser QCL que la résonance de contact est explorée. Donc, quand il n'y a pas d'absorption IR sous la pointe, les changements de résonance de contact ne peuvent pas être détectés. Cela peut conduire à des effets de topographie où le changement brusque de topographie peut générer un signal artéfact semblable à celui généré par l'expansion photothermique de l'objet. Des effets de bord peuvent aussi apparaître, notamment dans le cas où il n'y a absorption que d'un côté du bord. Ces effets doivent être eux aussi pris en compte dans l'analyse du signal obtenu avec les cartographies chimiques infrarouges. Dans les deux cas, ces effets sont liés par un brusque changement du contact entre la pointe et l'objet. L'enregistrement de la position en fréquence du maximum de résonance de contact (dans le cas du mode chirp) ou du décalage en phase du point d'inflexion (dans le cas du mode PLL) peuvent permettre de voir les effets de topographie et de bord qui vont se traduire par un brusque et local changement de la valeur par rapport aux valeurs attendues.

Pour conclure, il a pu être montré ici l'importance de mettre en place un rétrocontrôle en fréquence lors d'une mesure d'AFM-IR en résonance forcée. Ce rétrocontrôle s'avère crucial pour l'acquisition de cartographies d'absorption IR. En effet, la résonance de contact peut varier d'un point à l'autre en fonction de la nature du matériau ou la qualité du contact entre la pointe et la surface. Or une variation de quelques kilohertz de la position de la résonance de

contact peut conduire à une forte diminution du signal ou au contraire l'apparition d'artefacts de mesure. La mise en place d'un système de rétrocontrôle en fréquence lors de l'acquisition de cartographies d'absorption IR s'inspire de ce qui a déjà été réalisé en CR-AFM. Deux solutions sont compatibles avec l'AFM-IR : le rétrocontrôle chirp où l'on détecte le maximum d'amplitude de la résonance de contact ou le rétrocontrôle PLL où l'on détecte le point d'inflexion de la phase de la résonance de contact. Ces deux modes de rétrocontrôle ne nécessitent pas la mise en place d'une instrumentation supplémentaire, car la résonance de contact est détectée via l'absorption IR. En variant le taux de répétition du laser comme cela est possible avec le laser QCL utilisé, il va être possible de décrire l'ensemble du pic de résonance de contact d'intérêt : la détection va donc être directement intégrée à la mesure d'absorption IR. De même, comme aucun ajout d'instrumentation supplémentaire n'est nécessaire, les deux modes peuvent être utilisés avec le même instrument. La mise en place de ces deux modes d'acquisition a permis de corriger l'ensemble des artefacts de mesure observés auparavant. Si la seconde solution présente de nombreux avantages et permet, contrairement à la détection chirp, d'acquérir des cartographies de bonne qualité à une vitesse de balayage élevée, elle ne peut pas être utilisée dans le cas où les variations de résonances de contact sont trop importantes. Dans ce cas, c'est le mode chirp qu'il faudra utiliser. Le mode de rétrocontrôle choisi va donc dépendre de l'objet observé.

c) Influence des propriétés mécaniques de la surface sur les mesures AFM-IR

La principale cause de variations de la position en fréquence de la résonance de contact provient généralement d'un changement des propriétés mécaniques de l'objet sous la pointe. Le but de cette partie est d'évaluer la possible influence des propriétés mécaniques des objets étudiés sur la mesure AFM-IR en résonance forcée.

L'influence de la mécanique sur la mesure AFM-IR a déjà été étudiée en AFM-IR classique par J. Waeytens et al. [75] pour un mélange de deux polymères polyoléfiniques. Il a alors été montré que pour une absorption IR équivalente, le signal AFM-IR obtenu est différent selon si le matériau était la matrice rigide de polypropylène plutôt dure ou une gomme d'éthylène-propylène plutôt molle. Cela peut se voir notamment dans le cas de la Figure II-15 où est faite la comparaison du signal de déflexion montrant l'oscillation amortie dans les deux cas. D'après les résultats obtenus dans cette publication, il est possible d'analyser le signal, obtenu ici en AFM-IR dans le cas d'une oscillation amortie, pour étudier les propriétés mécaniques d'un objet, notamment grâce à l'étude des résonances de contact obtenues par la transformée de Fourier du signal de déflexion. La mise en place d'une telle mesure des propriétés mécaniques d'un objet via la mesure de l'expansion photothermique demande une étude complète de ce pic de résonance en fonction de chaque objet et notamment la variation de la position en fréquence du maximum, la largeur à mi-hauteur du pic et les variations de phase associées. S'il n'est pas question ici de mettre en place ce type de mesure en AFM-IR en résonance forcée, les résultats obtenus dans cette étude posent la question de savoir comment va se traduire une différence de comportement mécanique entre deux objets sur le signal obtenu en AFM-IR en résonance forcée et quelle conséquence cela peut avoir sur la mesure.

Pour vérifier ce point, une expérience préliminaire a été menée pour mettre en évidence ou non l'influence possible de la mécanique sur le signal AFM-IR en résonance forcée. Le protocole est le suivant : une coupe de polymère contenant des billes de PMMA dans une matrice d'époxy a été analysée en AFM-IR en variant le mode de résonance de contact sélectionné tout en gardant les autres paramètres identiques.

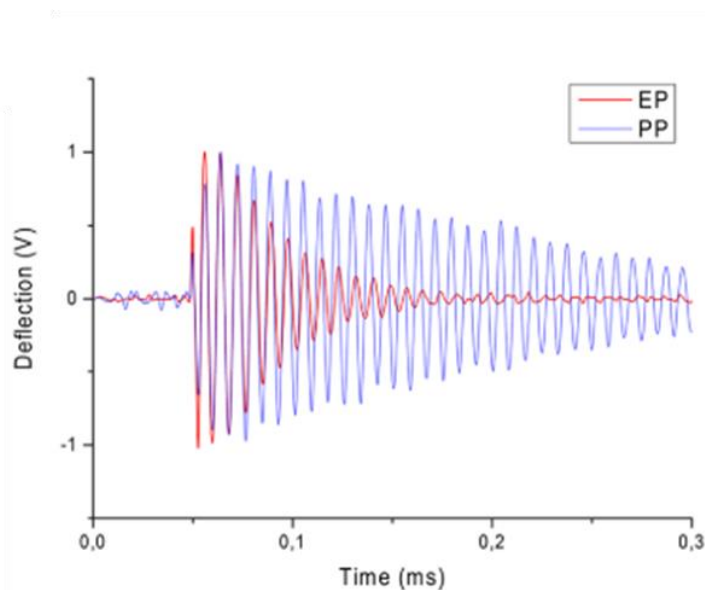


Figure II-15 : Comparaison du signal de déflexion (oscillation amortie) obtenu pour de l'éthylène-propylène (en rouge sur la figure) qui est un matériau mou et pour du polypropylène rigide (en bleu sur la figure) – Figure adaptée de [75]

Une première expérience a été réalisée sur une coupe de polymère contenant des billes de PMMA dans une matrice d'époxy. Elle a pour but d'évaluer l'influence du mode de résonance de contact sur le signal AFM-IR obtenu dans le cas d'une bille de PMMA isolée (Figure II-16). Les cartographies ont été effectuées à 1732 cm^{-1} qui est le maximum d'absorption du groupement carbonyle de la bande ester du PMMA. Les résultats obtenus montrent ici l'influence de la mécanique sur la mesure AFM-IR. En effet, en fonction de la résonance de contact choisie, le signal obtenu va être plus ou moins intense. Le meilleur signal a été obtenu pour la seconde harmonique. Dans le cas des modes les plus élevés, le signal perd en homogénéité et devient de plus en plus sensible aux effets de la topographie. Les effets de topographie deviennent même prédominants dans le cas où le pic choisi correspond à la 4^{ème} harmonique.

Dans la seconde expérience, la même mesure a été effectuée pour le PMMA, mais aussi pour la matrice d'époxy qui entoure la bille (Figure III-17). La composition exacte de l'époxy présent ici n'est pas connue, mais en moyenne ce matériau a un module d'Young supérieur au PMMA de 0,5 à 1 GPa. De plus, le fait qu'il forme une matrice plane autour de la bille de PMMA va amplifier les différences de comportements mécaniques observables. Pour l'époxy, la cartographie chimique a été effectuée à 1510 cm^{-1} , ce qui correspond à une absorption des C=C des cycles aromatiques. De la même façon que pour le PMMA, les paramètres autres que la fréquence de tir ont été gardés constants entre chaque mesure. Le même résultat que dans le premier cas est observable : le signal obtenu pour l'époxy varie en fonction du pic de résonance de contact choisi. Si la tendance est la même pour les deux matériaux, l'amplitude de la variation du signal d'une harmonique à l'autre n'est pas la même. En considérant que les matériaux sont homogènes et en prenant en compte l'intensité moyenne obtenue dans chaque cas, l'amplification du signal entre la 1^{ère} harmonique et la 2^{ème} harmonique est d'environ 1.65 dans le cas de la bille de PMMA et de 1.4 dans le cas de la matrice d'époxy. Ici les deux matériaux ont des propriétés mécaniques relativement proches. On peut attendre des différences de signal beaucoup plus importantes dans le cas où l'objet contient des matériaux très différents d'un point de vue mécanique.

Cette étude illustre l'influence de l'interaction mécanique sur le signal AFM-IR en résonance forcée comme cela a déjà été observé en AFM-IR classique [75]. Ceci n'a pas

vraiment de conséquences sur une analyse qualitative. Cela peut même être un atout dans le cas où le choix d'une harmonique spécifique peut permettre un gain de signal. En revanche, toute analyse quantitative en AFM-IR, comme celle déjà réalisée en AFM-IR classique par G. Ramer et al. [60], devra prendre en compte ce facteur pour évaluer l'importance de l'effet mécanique par rapport au signal chimique et de pouvoir le corriger.

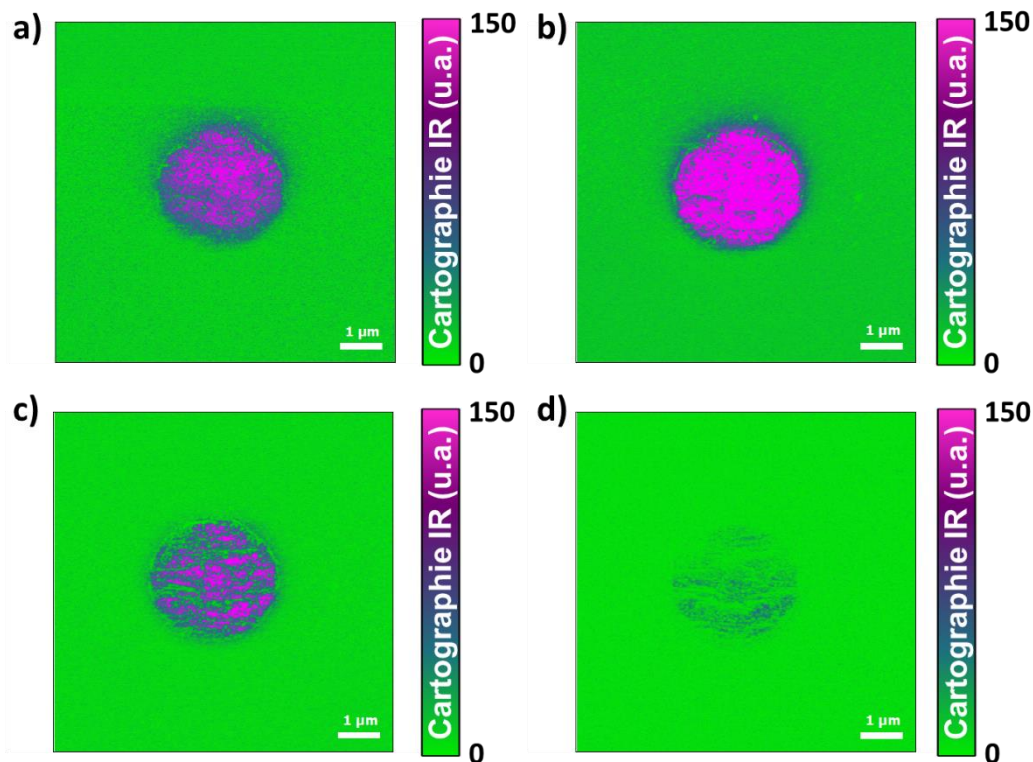


Figure II-16 : Influence de la résonance de contact choisie sur le signal AFM-IR – a) 1^{ère} harmonique (160,5 kHz) – b) 2^{ème} harmonique (316,1 kHz) – c) 3^{ème} harmonique (521,9 kHz) – d) 4^{ème} harmonique (1219,6 kHz)

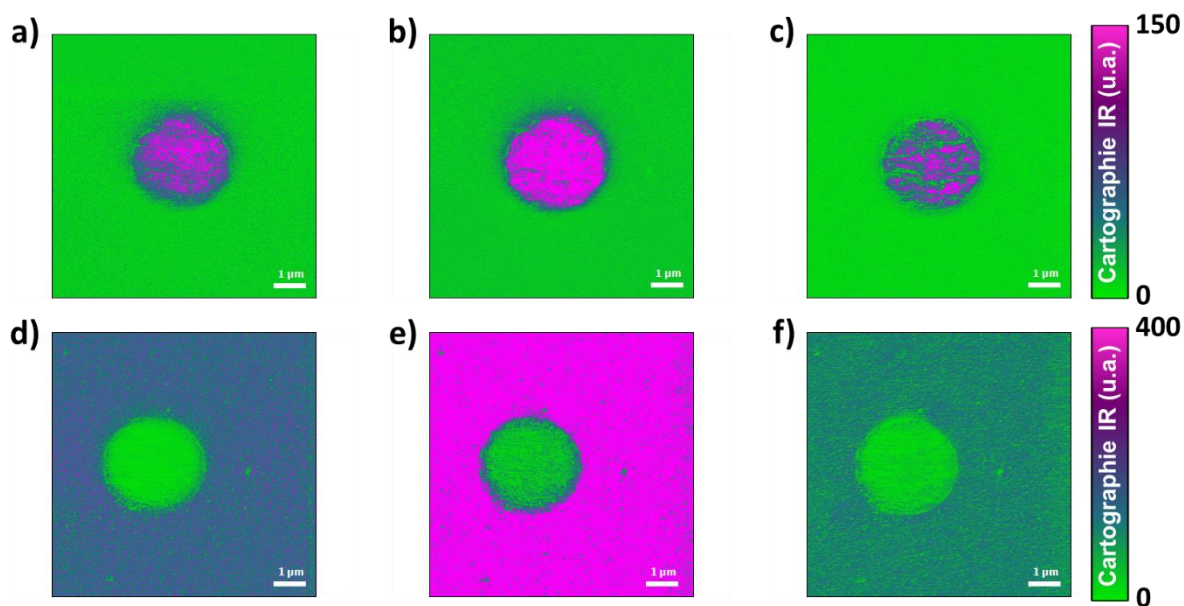


Figure II-17 : Influence de la résonance de contact choisie sur le signal AFM-IR obtenu dans le cas de deux matériaux différents – a) cartographie à 1732 cm^{-1} , 1^{ère} mode – b) cartographie à 1732 cm^{-1} , 2^{ème} mode – c) cartographie à 1732 cm^{-1} , 3^{ème} mode – d) cartographie à 1510 cm^{-1} , 1^{ère} mode – e) cartographie à 1510 cm^{-1} , 2^{ème} mode – f) cartographie à 1510 cm^{-1} , 3^{ème} mode

2. Acquisition des spectres d'absorption en AFM-IR en résonance forcée

D'un point de vue expérimental, il n'y a pas de différence concernant l'acquisition des spectres en AFM-IR en résonance forcée et en AFM-IR classique : le laser QCL va successivement balayer différents nombres d'onde, le signal AFM-IR obtenu pour chaque nombre d'onde va être enregistré et le spectre d'absorption local va être reconstitué à partir de l'ensemble du signal enregistré pour chaque nombre d'onde. Comme le spectre est obtenu en un point fixe, la variation de la fréquence de résonance devrait être nulle. Il suffit d'ajuster le taux de répétition des tirs du laser sur le maximum de la fréquence de la résonance de contact avant l'acquisition des spectres. Cette étape peut être faite manuellement sans le rétrocontrôle en fréquence. Ce dernier n'interviendra que dans le cas de l'acquisition d'une ligne de spectres où la pointe va bouger d'une position à l'autre entre chaque spectre. Les principales différences qui vont être observées entre les spectres en AFM-IR en résonance forcée et en AFM-IR classique vont donc venir des propriétés propres aux lasers QCL. Comparés aux sources OPO, les lasers QCL émettent sur une gamme restreinte du moyen IR. Cependant, ils ont une meilleure résolution spectrale, qui est inférieure à 1 cm^{-1} contre 6 à 8 cm^{-1} pour les OPO. Si l'utilisation de la plus haute résolution spectrale accessible a un intérêt limité en AFM-IR où les échantillons étudiés sont solides, avoir une résolution spectrale élevée permet de suréchantillonner les spectres, ce qui permet d'améliorer la description des bandes IR observées ainsi que de faciliter le traitement de données post-acquisition. La vitesse de balayage en nombre d'onde est reliée au système de laser QCL utilisé (laser EC-QCL, voir Annexe 1). Cette vitesse de balayage est le facteur limitant de la vitesse maximale possible d'acquisition des spectres. Dans les faits, les spectres AFM-IR obtenus avec un laser QCL peuvent maintenant être acquis en quelques secondes pour une gamme spectrale de 1000 cm^{-1} . Cela représente une amélioration importante par rapport aux sources OPO où l'obtention d'un même spectre sur une gamme spectrale équivalente nécessite environ une dizaine de minutes. La principale conséquence de cette augmentation de vitesse d'acquisition est qu'il est possible d'obtenir beaucoup plus de spectres en un point pour une même gamme de temps et d'obtenir alors un spectre moyen à partir d'un grand nombre de spectres. L'obtention d'un spectre moyen à partir d'un nombre le plus élevé possible de spectres est un des moyens les plus efficaces pour améliorer la qualité du signal en spectroscopie IR. En conséquence, les deux facteurs identifiés, la meilleure résolution spectrale et la plus grande vitesse d'acquisition, devraient conduire à une amélioration de la qualité des spectres d'absorption locaux obtenus en AFM-IR.

Pour vérifier ce point, une étude des spectres obtenus en AFM-IR en résonance forcée a été effectuée en se focalisant sur l'étude des spectres obtenus avec un laser QCL accordable de 1550 cm^{-1} à 1750 cm^{-1} . Cette gamme spectrale est intéressante pour les applications biologiques, car elle correspond à la zone d'absorption de la bande amide I des protéines qui est une bande d'absorption IR très riche en informations structurales [76]. La discussion qui va être faite ici est motivée par l'intérêt croissant de la technique AFM-IR pour l'étude de la structure secondaire de protéines. Ces projets se basent sur l'étude de la bande amide I et réutilisent les outils classiques déjà développés pour l'étude des protéines avec la spectroscopie FTIR [61], [77]–[81]. Les avantages des lasers QCL décrits dans le paragraphe précédent devraient conduire à améliorer la qualité de la description de la bande amide I des protéines et donc permettre une analyse plus précise de sa sous-structuration. Cependant pour que ces informations soient exploitables, il est nécessaire que le rapport signal sur bruit des spectres soit suffisamment élevé. Or l'exemple d'un spectre AFM-IR en résonance forcée d'une protéine standard, l'albumine sérique bovine, montre que celui-ci est très bruité (Figure II-18 a)).

L'analyse de ce spectre montre qu'entre les différents points, il y a une importante variation d'intensité d'un point à l'autre. Cette variation génère une oscillation à laquelle s'ajoutent des pics négatifs plus importants. En l'état, l'analyse spectrale accessible semble limitée et il n'est pas possible de faire une analyse poussée de la sous-structuration de la bande amide I.

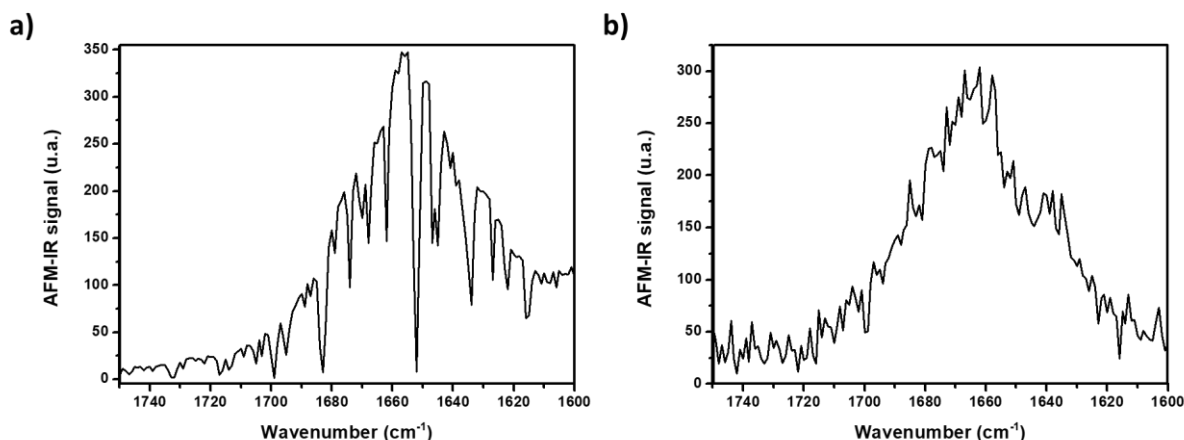


Figure II-18 : Exemples de spectres bruts de protéines d'albumine sérique bovine obtenus en AFM-IR en résonance forcée – a) Sans purge et b) Avec purge de la machine.

Les pics négatifs observés sur le spectre de la Figure II-18 a) sont dus à l'absorption de la vapeur d'eau. La gamme spectrale d'étude est ici $1550\text{ cm}^{-1} - 1750\text{ cm}^{-1}$. Par conséquent, comme le système ne possède pas de système de purge, toute la vapeur d'eau présente sur le trajet optique absorbe une partie de l'intensité laser. Jusque-là, la vapeur d'eau n'apparaissait pas aussi clairement dans les mesures AFM-IR dans cette gamme spectrale. Les pics de la vapeur d'eau ont une largeur à mi-hauteur de l'ordre de quelques cm^{-1} et sont donc gommés par la faible résolution spectrale des sources OPO. Cette problématique est donc directement liée à l'amélioration de la résolution spectrale permise avec l'utilisation des lasers QCL. En contrepartie, comme les bandes d'absorption de la vapeur d'eau sont finement décrites, il devrait être plus simple de les corriger et donc d'accéder à une meilleure description de la bande amide I. Cette correction est normalement faite grâce à la soustraction d'un spectre de référence. Celui-ci est obtenu par la mesure de puissance du laser par une photodiode sur un trajet optique équivalent à celui allant du laser à la pointe AFM. La soustraction d'un spectre de référence a deux rôles : prendre en compte les variations de puissance intrinsèque du laser en fonction du nombre d'onde et celles générées par l'environnement. Cependant pour que cette correction soit adéquate il est nécessaire qu'il n'y ait pas de variation d'humidité entre le moment où le spectre de référence a été pris et le moment où le spectre sur l'échantillon est enregistré. Ce n'est pas le cas pour le système nanoIR1 utilisé dans le cas de la Figure II-18 a), qui est un système ouvert et donc soumis aux variations atmosphériques. Il apparaît donc nécessaire de mettre en place un système de purge de l'air. Cette purge peut utiliser soit de l'air sec soit du diazote. L'influence des bandes d'absorption de la vapeur d'eau sur les spectres AFM-IR obtenus peut alors être mise en évidence en comparant le spectre obtenu dans le cas d'un système purgé (Figure II-18 b)) et dans le cas d'un spectre obtenu dans un système non purgé (Figure II-18 a)). L'étude structurale des protéines nécessite d'avoir un taux d'humidité le plus stable possible lors de la mesure. Ce fait est connu de longue date dans le cas de la spectroscopie FTIR. Il n'est apparu que très récemment dans le cas de l'AFM-IR avec l'augmentation de la résolution spectrale des acquisitions avec les lasers QCL. Les systèmes les plus anciens comme celui avec un éclairage en réflexion totale (comme le système nanoIR1 qui est utilisé dans notre laboratoire) n'ont pas été conçus pour intégrer un système de purge.

Si l'installation d'un système de purge permet de limiter l'influence de la vapeur d'eau. Elle ne peut pas permettre de s'affranchir du bruit important observé avec un laser QCL. Ce bruit apparaît comme une surmodulation du spectre moyen (Figure II-18 b)). Les lasers QCL utilisés sont des lasers EC-QCL. La haute résolution spectrale accessible avec ce type de laser est permise par l'adjonction d'un réseau optique en sortie de laser (cf. Annexe 1). Lors de l'acquisition d'un spectre, le laser va effectuer un balayage en nombre d'onde et le réseau est ajusté mécaniquement en fonction de ce balayage. Dans le cas d'autres techniques de spectroscopie IR utilisant les lasers EC-QCL, il a été montré qu'il existe une erreur dans le mouvement mécanique du réseau [82]. Cette erreur induit un décalage de la position exacte des pics entre plusieurs acquisitions successives. Ce décalage est faible au regard de la gamme spectrale étudiée, mais est critique pour les bandes d'absorption IR de la vapeur d'eau. En conséquence, si un décalage suffisamment important existe entre le spectre de référence et le spectre mesuré sur l'échantillon, des artefacts vont apparaître au niveau des pics de vapeur d'eau. Ils vont influencer là aussi sur l'information spectrale accessible. Pour dépasser ce problème, une solution de traitement mathématique a été proposée et validée dans le cas d'une technique de spectroscopie IR classique [82]. Pour des raisons techniques, elle n'a pas pu être encore mise en place dans le cas des mesures AFM-IR. Une autre solution possible est une solution technique qui consisterait à s'inspirer des systèmes de spectroscopie à doubles faisceaux et à acquérir en même temps le spectre sur l'échantillon et le spectre de référence. Cela est possible à mettre en place exclusivement dans le cas de certains systèmes AFM-IR comme le nanoIR2s présenté dans le chapitre suivant (Chapitre III) et où le faisceau laser incident est divisé en deux par une lame séparatrice. Une partie du faisceau va sur la pointe, l'autre sur un chemin optique de référence où se situe le puissance-mètre utilisé pour acquérir le spectre de référence. Cependant, cette solution possible nécessite un développement informatique non effectif pour les systèmes commerciaux. En conséquence, à l'heure actuelle cette source d'artefact doit être prise en compte lors de l'analyse des spectres obtenus avec le laser QCL.

Un des autres avantages des lasers QCL par rapport aux lasers OPO est l'augmentation de la vitesse d'acquisition possible qui permet d'acquérir rapidement un ensemble de spectres en un point donné. À partir de cet ensemble de spectres, il peut être théoriquement possible d'améliorer le rapport signal sur bruit (noté par la suite S/N). À première vue, ce bruit ressemble à un bruit statistique qui peut être dû à la faiblesse du signal détecté. Si le bruit est statistique, l'obtention d'un spectre moyen en un point à partir d'un grand nombre de spectres sur le même point doit permettre de s'en affranchir. Dans la Figure II-19 est présentée la comparaison d'un spectre brut obtenu sur une fibrille de collagène (Figure II-19 a)) avec les spectres moyens obtenus à partir de dix (Figure II-19 b)), vingt-cinq (Figure II-19 c)) ou cinquante spectres obtenus sur le même point (Figure II-19 d)) sans autre traitement mathématique appliqué. Cette comparaison met en évidence deux points. Le premier est que l'acquisition d'un spectre moyen à partir d'une dizaine de spectres bruts permet d'améliorer significativement le S/N. La majeure partie du bruit observé est donc bien du bruit statistique. Cependant, le deuxième point important qui ressort de cette comparaison est qu'une oscillation est toujours observable à partir d'une moyenne de vingt spectres, et est obtenue de manière identique même en augmentant le nombre de spectres acquis. Il n'a pas été possible d'acquérir un nombre de spectres plus élevé d'un ou plusieurs ordres de grandeur de manière fiable à cause d'autres effets comme la dérive thermique. Cependant, la même expérience a été répétée dans d'autres acquisitions et un résultat similaire a été observable à chaque fois. Il est possible de conclure qu'une autre source de bruit, non statistique cette fois, existe.

Des mesures ont été effectuées avec différents lasers QCL et différents systèmes AFM-IR et conduisent à un résultat similaire. Ce bruit non statistique semble spécifique de l'acquisition AFM-IR avec un laser QCL. Son origine n'a pas pu être identifiée au cours de la thèse, mais plusieurs hypothèses ont pu être émises.

La première est que ce bruit aurait pour origine les problèmes de division du spectre de référence évoqués précédemment dans le cas des bandes d'absorption de la vapeur d'eau. Pour élucider ce point, il est nécessaire d'avoir accès aux données brutes des spectres de références et des acquisitions par la pointe. Or ce point est loin d'être trivial à cause du logiciel commercial utilisé pour les acquisitions qui ne permet pas d'avoir accès directement à ces données.

La seconde hypothèse serait que ce bruit observé dans les spectres ait une origine similaire à celui observé dans les cartographies d'absorption IR obtenues en éclairage par réflexion totale (Figure II-9 c)). Cette hypothèse tendrait à être vérifiée par le fait que du bruit est observé dans les deux cas quand il n'y a pas d'absorption IR. L'origine de ce bruit n'a pas encore été déterminée, mais s'il est à l'origine des phénomènes dans le cas des spectres et des cartographies et qu'il apparaît indépendamment de la mesure faite, il est probable que ce soit un bruit d'origine électronique. Cependant si c'est le cas, cela devrait être un bruit statistique et donc devrait réduire en fonction du nombre de spectres utilisés pour obtenir le spectre moyen. Ce qui n'est pas le cas ici.

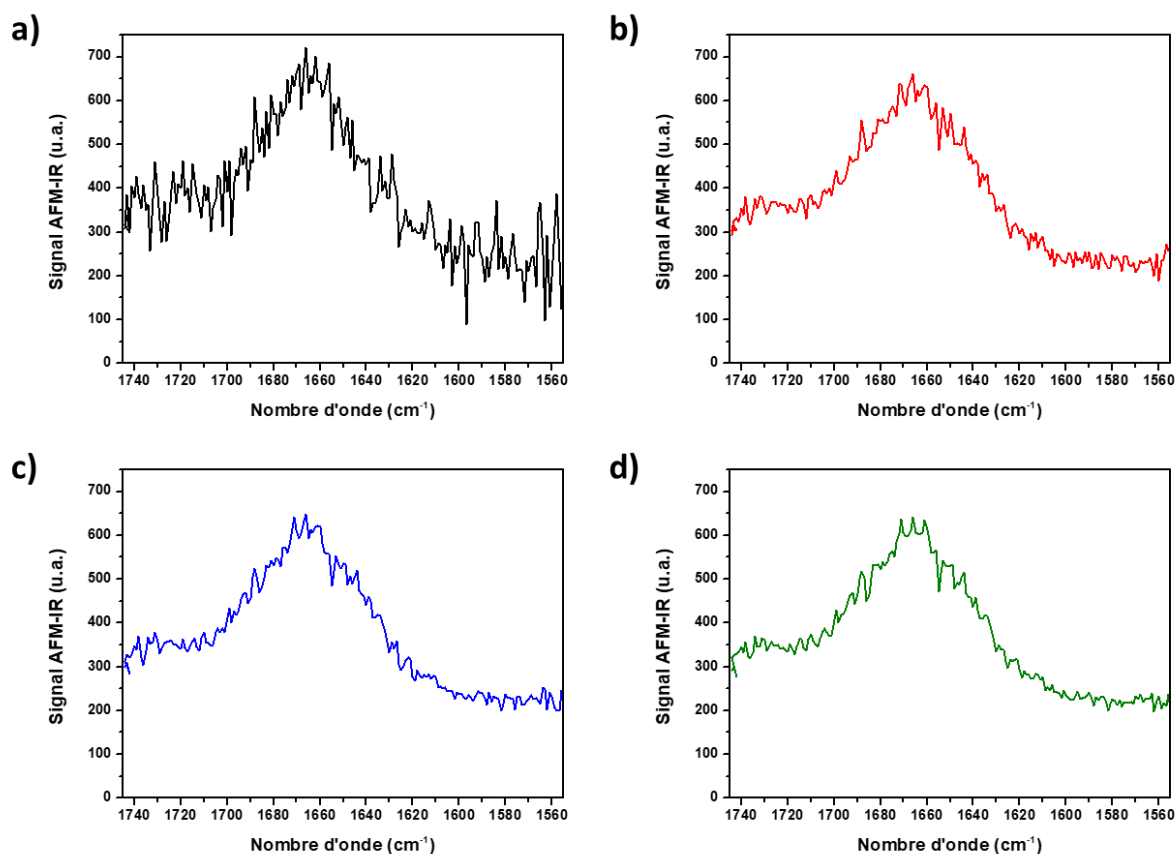


Figure II-19 : Spectres AFM-IR obtenus sur une fibrille de collagène – a) Un seul spectre acquis – b) Spectre moyen obtenu à partir de la moyenne de dix spectres acquis sur le même point – c) Spectre moyen obtenu à partir de la moyenne de vingt-cinq spectres acquis sur le même point – d) Spectre moyen obtenu à partir de la moyenne de cinquante spectres acquis sur le même point

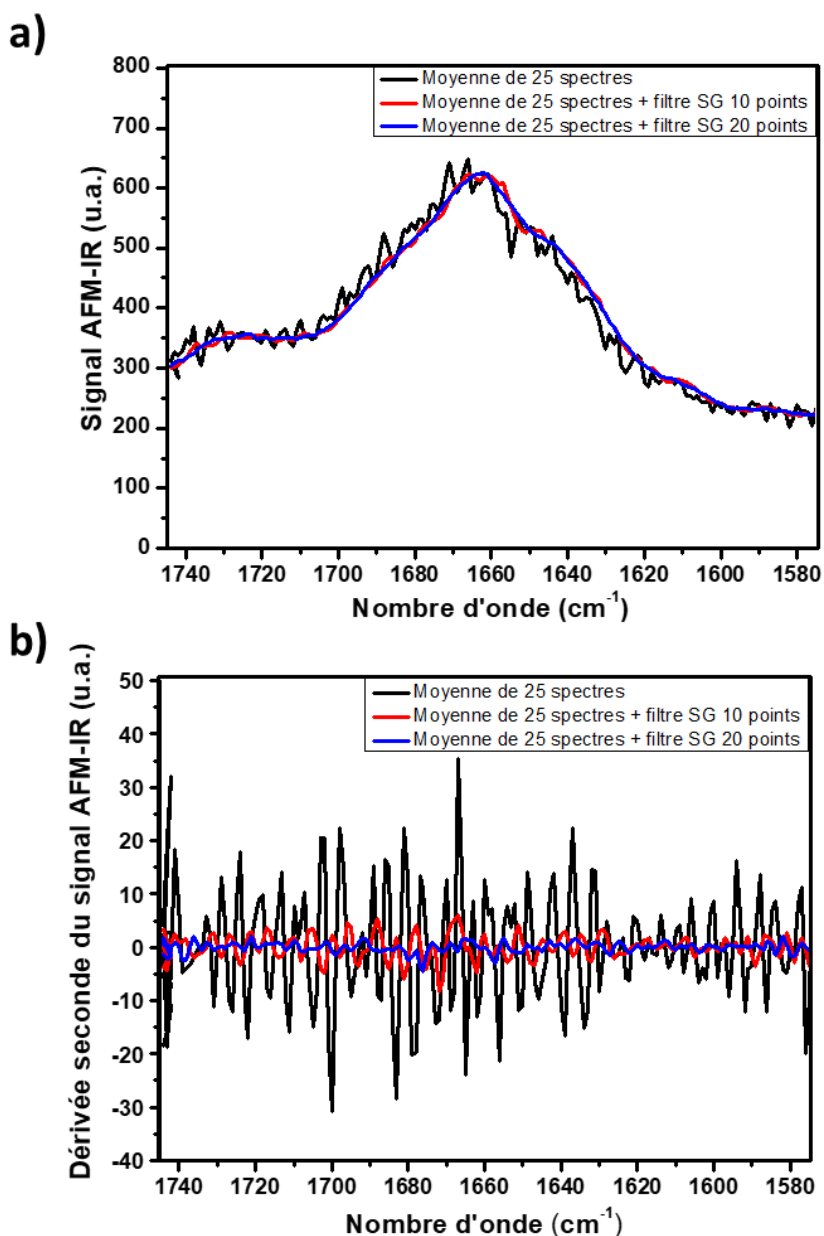


Figure II-20 : Étude de l'influence de l'application d'un filtre sur la dérivée seconde de la bande amide I - a) Moyenne de 25 spectres AFM-IR obtenue une fibrille de collagène dénaturée sur laquelle a été appliqué un filtre de type Savitzky-Golay d'ordre trois avec dix points (en rouge) ou vingt points (en bleu) ou aucun filtre (en noir) - b) Dérivées secondes obtenues sur les différents spectres filtrés

Comme la source du bruit non statistique n'a pas pu être clairement identifiée, il n'a pas été possible de proposer une solution simple permettant de s'en affranchir. Celui-ci doit alors aussi être pris en compte lors de l'analyse de la bande amide I, notamment dans le cas de l'étude de protéines isolées. Dans les études publiées jusque-là, le traitement mathématique proposé pour s'affranchir du bruit est d'utiliser un filtre de type Savitzky-Golay. Ce traitement mathématique est utilisé communément dans le traitement des spectres IR de protéines. Cependant, ce type de filtre est relativement inefficace sur le bruit non statistique. Pour évaluer l'influence de ce bruit sur le résultat du filtre, la comparaison est faite entre le spectre moyen obtenu à partir de vingt-cinq spectres présentés en Figure II-19 et ce même spectre après application d'un filtre de type Savitzky-Golay avec une fenêtre soit de dix points ou soit de vingt points (Figure II-20 a)). La comparaison de la dérivée seconde des spectres obtenus dans

les différents cas est donnée en Figure II-20 b). Dans le cas de l'analyse de la bande amide I, l'étude de la dérivée seconde des spectres est importante, car elle donne des informations directes sur la sous-structuration de la bande. En effet chaque sous-structure présente va générer un pic dans la dérivée seconde de la bande amide I dont la position va dépendre de la structure secondaire associée. Le Tableau 1 est un exemple de table de références où sont attribuées les positions de sous-structure de la bande amide I associées à différentes structures secondaires. De fait, en obtenant la position du maximum pour chaque sous-structure, il va être possible d'avoir accès à la présence de différentes structures secondaires dans la protéine et dans les cas optimaux pouvoir déterminer en théorie le pourcentage approximatif de chacune des structures secondaires dans la structure totale de la protéine [76].

Les comparaisons présentées dans la Figure II-20 sont significatives. En effet, si dans le cas de la forme générale des spectres (Figure II-20 b)), les changements ne semblent pas critiques, les résultats obtenus dans la Figure II-20 b) montrent clairement que l'utilisation d'un filtre de type Savitzky-Golay induit un changement de la position des pics obtenus avec la dérivée seconde. Dans le cas où aucun filtre n'est appliqué, il est évident qu'un nombre important de pics observés dans la dérivée seconde provient du bruit non statistique et n'a aucune information structurale. Dans le cas de l'application du filtre de type Savitzky-Golay avec différents nombres de points, le nombre de pics et leurs positions respectives changent et il est important de savoir à quel point ses modifications ont pu altérer l'information structurale contenue dans le spectre. En effet, les valeurs de déplacement de maxima des pics sont loin d'être négligeables ici et peuvent atteindre 5 à 10 cm^{-1} . Malheureusement, en se référant au Tableau 1, il est possible d'observer que la variation de positions entre les maxima d'absorption de différentes structures secondaires est du même ordre de grandeur. On peut en conclure que l'information structurale du spectre obtenue en résonance forcée avec un laser QCL est probablement modifiée par l'application du filtre, surtout si le rapport signal est faible.

Secondary structure	$W_{\text{H}_2\text{O}}$ (cm^{-1})	$W_{\text{D}_2\text{O}}$ (cm^{-1})
α -Helix	1,658–1,647	1,655–1,638
α_{II} -Helix ^a	1,666–1,658	1,658–1,652
α -Helical coiled coil ^b	1,640–1,630	1,640–1,630
3_{10} -Helix	1,665–1,655 ^c	1,665–1,655 ^c
3_1 -Helix ^d	1,639	1,632
β -Helix ^e	1,640–1,630	~1,630
Parallel β -sheet	1,638–1,632	1,636–1,630
Antiparallel β -sheet	1,638–1,632 (strong) and 1,695–1,675 (weak)	1,636–1,630 (strong) and 1,680–1,670 (weak)
Intermolecular (aggregated) β -sheet	1,627–1,615 ^f	1,625–1,613 ^f
α -Pleated sheet ^g	1,653–1,650	1,653–1,650
β -Turns	1,685–1,655	1,675–1,640
γ -Turns	1,690–1,650	1,690–1,650
Irregular (“unordered”) structure	1,660–1,652	1,648–1,640

Tableau 1: Table de référence de la position des sous-structures de la bande amide I (structures secondaires) dans l'eau (colonne de gauche) ou dans l'eau deutérée (colonne de droite) – Tableau extrait de [76]

En conclusion, l'utilisation d'un laser QCL est très intéressante pour la mesure AFM-IR. Grâce aux vitesses d'acquisitions accessibles, il est possible d'acquérir un nombre très important de spectres comparés à ce qui est possible avec une source OPO. De plus, la plus grande résolution spectrale de ces lasers devrait conduire à améliorer la qualité des spectres obtenus. Cependant, à travers l'exemple de l'étude de la bande amide I des protéines, il a été montré ici que l'acquisition AFM-IR avec une résolution spectrale fine (c'est-à-dire inférieure à 4 cm^{-1}) révèle un certain nombre de problèmes pour les analyses spectrales fines, par exemple l'étude de la structure secondaire. Du fait d'un rapport signal sur bruit qui n'est pas optimal et de l'existence d'un bruit non statistique inhérent à la mesure, l'analyse chimique ou structurale des spectres peut s'avérer complexe ou même fautive si elle n'est pas abordée de manière rigoureuse.

IV. Modélisation du comportement thermique d'objets de dimensions nanométriques

Les résultats obtenus lors de la mise en place de la résonance forcée ont permis de montrer qu'il existait des limitations instrumentales notamment liées au rapport signal sur bruit important observé comme dans le cas des cartographies chimiques effectuées en Figure II-9. Cette limitation instrumentale reste le facteur principal limitant les capacités de l'AFM-IR en résonance forcée. Cependant, d'autres facteurs expérimentaux peuvent entrer en jeu et expliquer la différence de sensibilité obtenue entre ce qui était attendu et ce qui a été observé avec les rémanents cellulaires du dépôt de *Streptomyces lividans*. Dans cette partie, les modélisations des comportements thermiques de différents objets vont être présentées et discutées. En effet, le comportement thermique d'objet possédant des dimensions nanométriques peut se révéler très différent de ceux possédant des dimensions micrométriques et donc modifier le signal détecté par la méthode AFM-IR. À partir de ces modélisations, il va être possible de décrire ces comportements et d'en déduire l'impact potentiel sur la mesure AFM-IR.

La notion de sensibilité en AFM-IR a déjà été discutée dans le Chapitre I (cf. p. 29). Cette discussion a mis en évidence la complexité de cette notion. Cependant, pour comprendre les résultats obtenus dans ce Chapitre, les modélisations peuvent se focaliser sur l'étude d'objets polymériques purs analogues à ceux étudiés expérimentalement dans l'ensemble des articles qui discutent la notion de sensibilité dans la mesure AFM-IR [11], [16], [40], [50], [55], [56], [83], [84]. Dans ce cas, la sensibilité sera directement liée à l'épaisseur de l'objet considérée.

L'expansion photothermique est le phénomène clé de la mesure AFM-IR. La loi décrivant la dilatation thermique $u(t)$ dans les différents ouvrages [13], [56], [85], [86] se base sur une approche analytique du comportement photothermique d'une sphère. Même si cette approche permet de mettre en évidence deux comportements distincts dépendant de la taille de l'objet (et de son temps de relaxation τ_{relax} et de la durée du tir laser t_p ($\tau_{relax} < t_p$ ou $\tau_{relax} > t_p$) [13], elle n'est pas suffisante pour décrire le comportement d'objets de tailles quelconques déposés sur une surface. Le moyen le plus simple pour affiner la modélisation et pour mieux décrire notre expérience est d'utiliser la méthode des éléments finis.

Ici, nous avons utilisé le logiciel COMSOL et modélisé deux objets de formes différentes. Le premier objet est une sphère dont on fait varier le diamètre. Le matériau choisi est le PMMA,

car il est souvent utilisé comme polymère de référence. Pour décrire au mieux la surface qui sert de support aux échantillons, le silicium a été choisi car c'est un matériau assez proche du séléniure de zinc et du fluorure de calcium utilisé. Pour modéliser le contact entre l'objet et la surface, la sphère a été sectionnée au 4/5ème de son diamètre. Le schéma du modèle est donné en Figure II-21. Du fait de la symétrie, il a été possible de ne modéliser qu'une moitié de sphère pour avoir accès aux propriétés désirées.

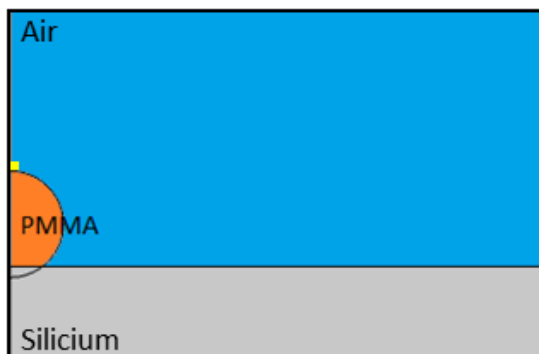


Figure II-21 : Schéma du modèle utilisé pour la modélisation COMSOL du comportement thermoélastique d'une sphère de PMMA – l'air est représenté en bleu, en orange le PMMA et en gris le silicium. Le point jaune indique la position où ont été faites les mesures d'expansion et d'augmentation de température

Le second objet est un disque dont on fera varier l'épaisseur et dont la largeur sera fixée à 4 μm . Le schéma du modèle est donné en Figure II-22. Les autres paramètres (matériau, surface, environnement) sont les mêmes que ceux de la modélisation précédente.

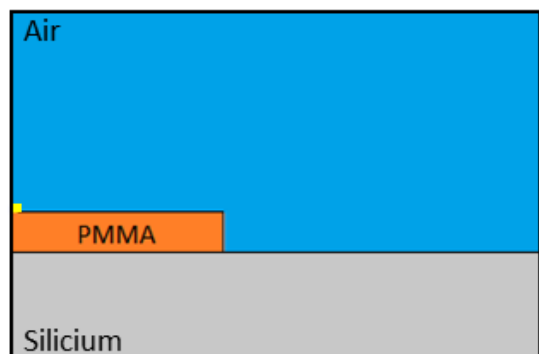


Figure II-22 : Schéma du modèle utilisé pour la modélisation COMSOL d'un disque de PMMA – En bleu est représenté la zone attribuée à l'air, en orange celle attribuée au PMMA et en gris celle attribuée au silicium. Le point jaune indique la position où ont été faites les mesures d'expansion et d'augmentation de température

Les deux objets étudiés ont été choisis de sorte à avoir des dimensions finies, ce qui permet de se rapprocher des réalités expérimentales. L'éclairement de l'objet est simulé par un chauffage uniforme de l'objet durant un temps de 100 ns et dont l'énergie déposée provoque des augmentations de température n'excédant pas le degré. Pour être en accord avec nos conditions expérimentales (c'est-à-dire $t_p < \tau_{relax}$), il n'est pas nécessaire de modéliser un train de pulses pour décrire le comportement de l'objet, car lors de l'acquisition en résonance forcée, l'échantillon revient à sa position d'équilibre entre chaque tir laser. Pour décrire le comportement thermique de l'objet, deux paramètres sont analysés : l'élévation de température et l'expansion maximale de l'objet après chauffage. Le relevé de ces deux paramètres a été fait dans les deux cas à l'apex de l'objet qui est symbolisé par un point jaune sur les Figure II-21 et Figure II-22.

1. Étude de l'influence de la taille dans le cas d'une sphère

Pour décrire l'influence du diamètre de la sphère sur son comportement d'expansion thermique, plusieurs modélisations ont été effectuées à différents diamètres dans une gamme allant 1,8 μm à 1 nm. Cette gamme permet de couvrir à la fois les objets pouvant être étudiés en AFM-IR classique et dont des simulations COMSOL ont déjà été effectuées [56] et des objets plus fins qui ne sont accessibles qu'avec l'AFM-IR en résonance forcée et dont on veut caractériser le comportement. Les résultats de l'influence du diamètre sur l'augmentation de température et de la dilatation thermique sont donnés en Figure II-23.

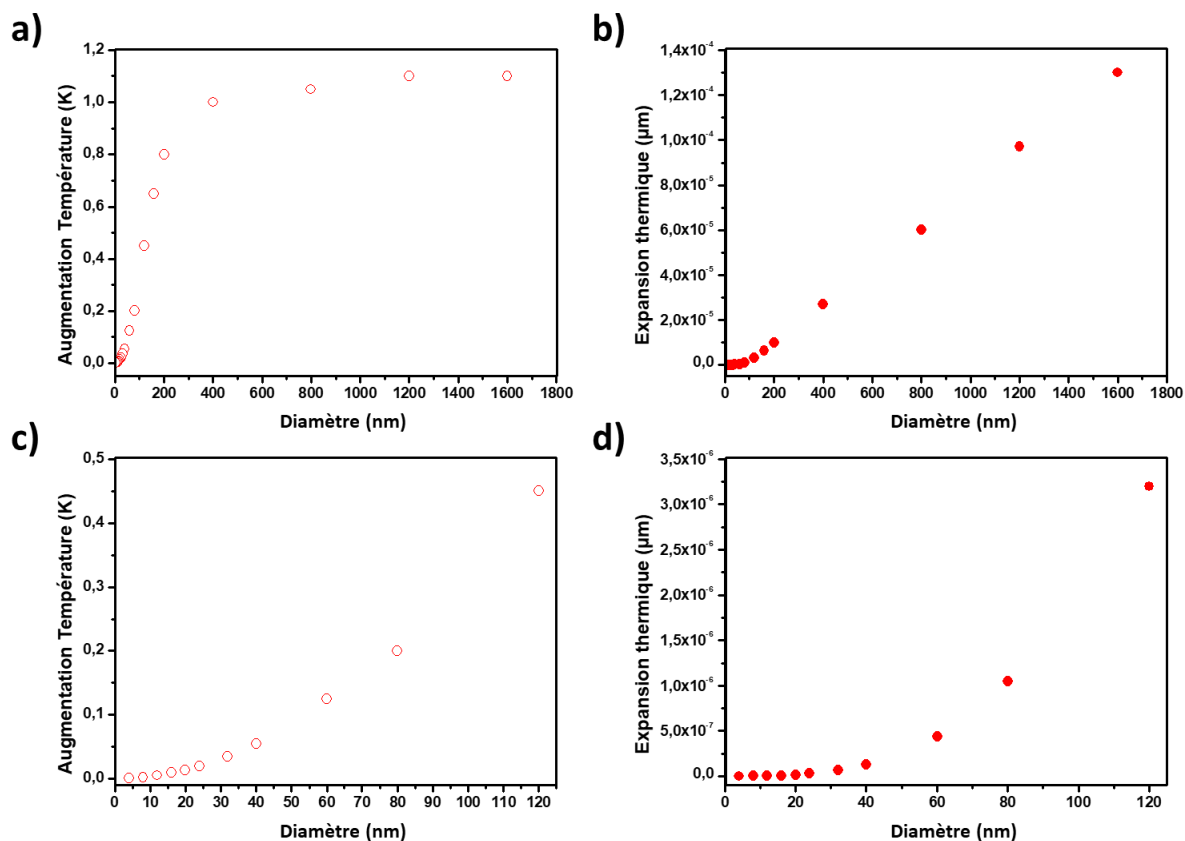


Figure II-23 : Résultats obtenus par la modélisation COMSOL dans le cas d'une sphère de PMMA – a) Variation de la température de l'échantillon sous la pointe en fonction du diamètre – b) Variation de l'expansion de l'échantillon sous la pointe en fonction du diamètre - c), d) Agrandissements sur la zone allant de 1 nm à 120 nm pour respectivement la variation de température c) et l'expansion de l'échantillon d)

À partir des graphiques obtenus par la modélisation, il est possible de constater l'importante variation de comportement d'expansion thermique de l'objet en fonction de l'épaisseur et notamment qu'il y a une perte de linéarité du comportement dans les faibles diamètres. Deux comportements distincts peuvent être extraits des résultats obtenus :

- Pour un diamètre d'échantillon supérieur à 400 nm, la variation de température au niveau de l'apex en fonction du diamètre de l'objet est relativement constante. La variation de l'expansion thermique au niveau de l'apex en fonction de l'épaisseur est linéaire.
- Pour une épaisseur de diamètre inférieur à 150 nm, la variation de température n'est plus linéaire, de même que l'expansion thermique.

L'existence de deux comportements possibles d'expansion thermique a déjà été modélisée par A. Dazzi et al. dans la théorie de l'AFM-IR classique [13]. En effet, dans cette publication il a été identifié que selon la valeur du temps de relaxation τ_{relax} par rapport à la durée de pulse laser t_p , il était possible d'avoir deux comportements thermiques possibles. Dans le premier cas, le tir laser est court (cas d'une source OPO) et le temps de relaxation de l'objet est considéré supérieur à la durée du pulse laser, la loi thermique temporelle d'une sphère durant l'irradiation est alors définie par A. Dazzi et al. comme étant la suivante :

$$T(t) = \frac{T_{max}}{t_p} t = \frac{P_{abs}}{V\rho C_p t_p} t$$

L'ensemble des paramètres de cette équation a déjà été défini dans le Chapitre I (p. 19).

Dans le second cas, le temps de relaxation est considéré inférieur au temps de tir, alors la loi thermique temporelle de la sphère pendant le temps de tir est définie comme étant :

$$T(t) = T_{max} = \frac{P_{abs}}{4\pi a\kappa}$$

Avec a le rayon de la sphère et κ la conductivité thermique effective de l'objet.

Contrairement à la première équation, l'équation obtenue ici n'est pas linéaire en fonction du temps, mais est constante. En conséquence, cela signifie qu'il existe dans ce cas une saturation de l'augmentation de la température au niveau de l'objet et donc de l'expansion thermique.

Jusqu'ici, l'hypothèse qui a été faite dans l'étude de l'AFM-IR en résonance forcée, notamment dans la description théorique, est que les phénomènes observés se situaient dans le premier cas, c'est-à-dire que le temps de relaxation de l'objet était inférieur à la durée du pulse laser. Or par définition, le temps de relaxation dans le cas d'une sphère est fonction de la taille de celle-ci [13] :

$$\tau_{relax} = \frac{\rho_{sph} C_{sph}}{3\kappa} a^3$$

En conséquence, plus l'objet est petit et plus son temps de relaxation est faible. À partir d'une certaine taille limite, le comportement thermique de l'objet irradié va donc changer. C'est ce changement de comportement qui est observé ici et qui explique les deux comportements possibles de la sphère. Ce point peut se vérifier à partir de l'étude de l'évolution de l'augmentation de température de l'objet et de l'expansion thermique en fonction du diamètre obtenu dans la gamme la plus faible de diamètres (Figure II-24). En effet, dans le cas où $\tau_{relax} < t_p$, la température de l'objet dépend du rapport entre la puissance absorbée P_{abs} et du rayon de l'objet, or la P_{abs} dépend elle-même du volume de l'objet. Donc la variation de la température devrait dépendre du carré du diamètre. Cela est vérifié dans le cas du modèle effectué ici par l'obtention d'une courbe d'ajustement polynomiale.

À ces courbes d'ajustement polynomiales sont associées les équations suivantes :

$$\Delta T(e) = -1,73.10^{-3} + 2,44.10^{-4} e + 2,93.10^{-5} e^2 \text{ avec } R^2 = 0,99948$$

$$\Delta u(e) = 1,16.10^{-7} - 1,33.10^{-8} e + 3,22.10^{-10} e^2 \text{ avec } R^2 = 0,99739$$

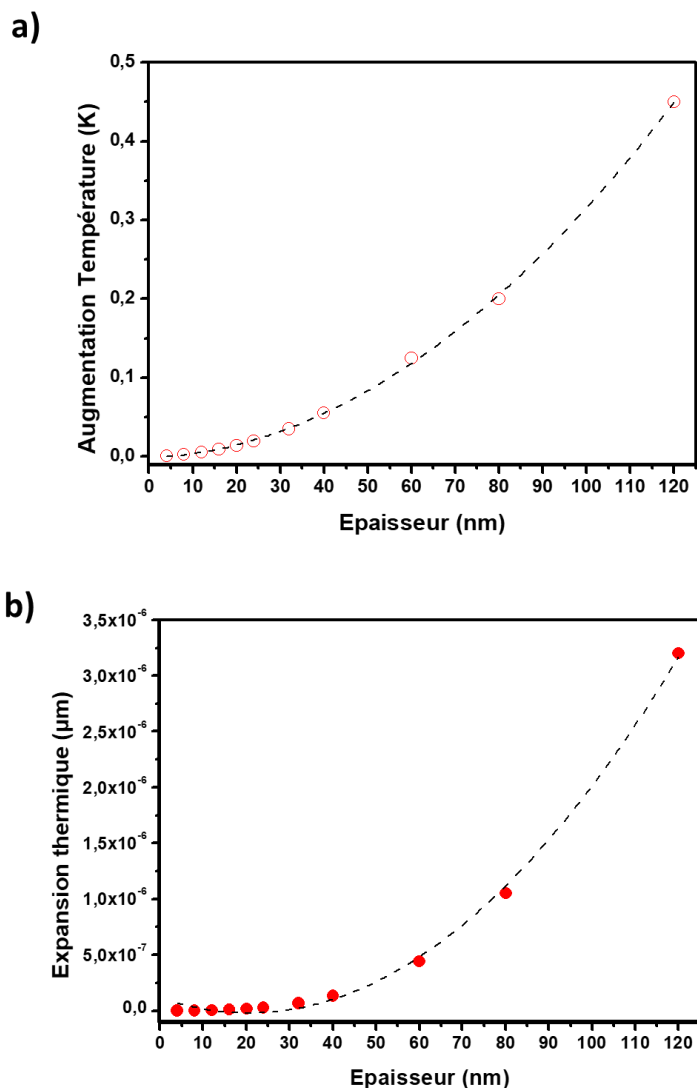


Figure II-24 : Courbes d'ajustements polynomiales obtenues dans le cas d'épaisseurs de l'objet inférieures à 150 nm - a) Pour l'augmentation de température à l'apex de l'objet - b) Pour l'expansion thermique de l'apex de l'objet

En comparant les deux paramètres choisis, c'est-à-dire l'augmentation de température à l'apex de l'objet et l'expansion thermique de l'apex, une divergence de comportement apparaît pour un diamètre de sphère inférieure à 25 nm. Cette divergence représente une limitation du modèle effectué ici. En effet à très petit diamètre, le nombre de points de mesure utilisés pour la modélisation devient critique et l'erreur numérique ne peut pas descendre en dessous de 10^{-13} m. S'il est suffisant pour modéliser le comportement thermique de l'objet, il ne l'est pas pour modéliser correctement la déformation élastique et génère un effet de plateau qui n'est pas symptomatique.

Un résultat similaire mettant en évidence le rôle clé du diamètre de l'objet par rapport à la durée du temps de pulse laser peut être obtenu en observant cette fois-ci l'effet d'une augmentation de t_p sur l'augmentation de température et l'expansion thermique de l'objet dans le cas de trois diamètres de sphères différents : 7,5 nm, 75 nm, 750 nm (Figure II-25).

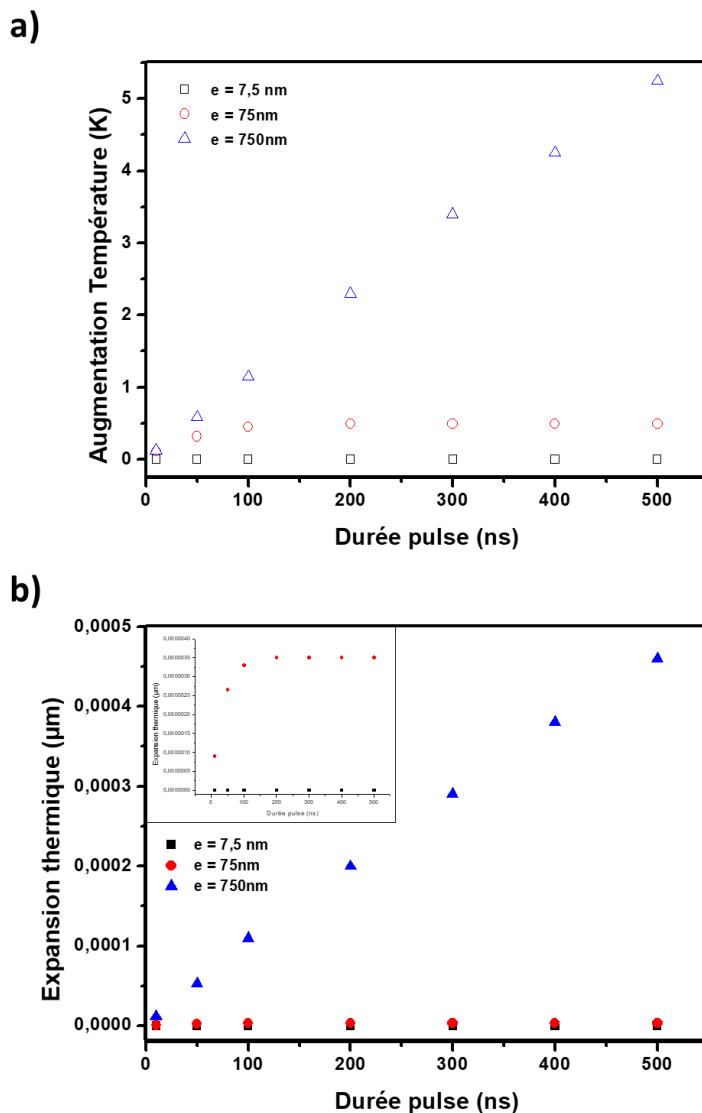


Figure II-25 : Modélisation du comportement d'expansion thermique d'une sphère de PMMA en fonction de la durée du pulse et en fonction de l'épaisseur du cylindre qui est soit 7,5 nm (carré noir), 75 nm (rond rouge) ou 750 nm (triangle bleu) – a) Augmentation de la température en fonction de la durée du pulse – b) Augmentation de l'expansion thermique en fonction de la durée du pulse – l'encart en haut à gauche représente un zoom sur les épaisseurs 75 nm et 7,5 nm

Dans le cas où le diamètre de la sphère est de 750 nm (soit le cas observé dans une mesure classique en AFM-IR), le résultat obtenu montre qu'il y a une proportionnalité directe entre le temps du pulse, l'élévation de la température et l'expansion thermique. On retrouve donc bien le comportement dans le premier cas où $\tau_{\text{relax}} > t_p$ et où il existe une relation linéaire entre la température de l'objet et le temps de pulse. À l'inverse dans le cas où le diamètre de la sphère est de 7,5 nm, on a $\tau_{\text{relax}} < t_p$ et un effet seuil est observé avec une valeur de température maximale atteinte indépendante de la durée de tir laser. Enfin, le cas où le diamètre de la sphère est 75 nm représente une situation intermédiaire où selon la durée du pulse laser, l'un ou l'autre des comportements va être observé. En conséquence, dans ce cas, augmenter la durée du tir laser au-dessus d'une certaine limite (ici 100 ns) va conduire à obtenir un effet de seuil et ne pas augmenter la température de l'objet.

On retrouve donc un résultat analogue à celui décrit par A. Dazzi et al. [13]. Dans ce cas, c'est la différence entre la durée de tir de deux sources IR utilisées qui étaient comparées : la source OPO avec un temps de tir relativement court (cas linéaire) et le laser à électron libre

avec un temps de tir long (cas de la saturation). Les mesures modélisées étaient en AFM-IR classique et l'épaisseur de l'échantillon supérieure à 100 nm (limite de détection de cette configuration). On constate ici que le même résultat peut être obtenu cette fois en gardant les paramètres laser constants, mais en variant la taille de l'objet. Donc, par analogie, les résultats observés pour un échantillon de taille inférieure à la dizaine de nanomètres devraient être similaires à ceux obtenus quand l'échantillon était irradié par un laser avec un tir de plusieurs microsecondes et dans ce cas la dépendance de la température et de la dilatation thermique en fonction de la taille ne sera plus linéaire, mais parabolique.

2. Étude de l'influence de la taille dans le cas d'un disque

Une étude similaire a été menée pour un disque dont le modèle a été présenté en Figure II-22. Les résultats d'augmentation de température de l'apex et d'expansion thermique en fonction de l'épaisseur sont donnés en Figure II-26.

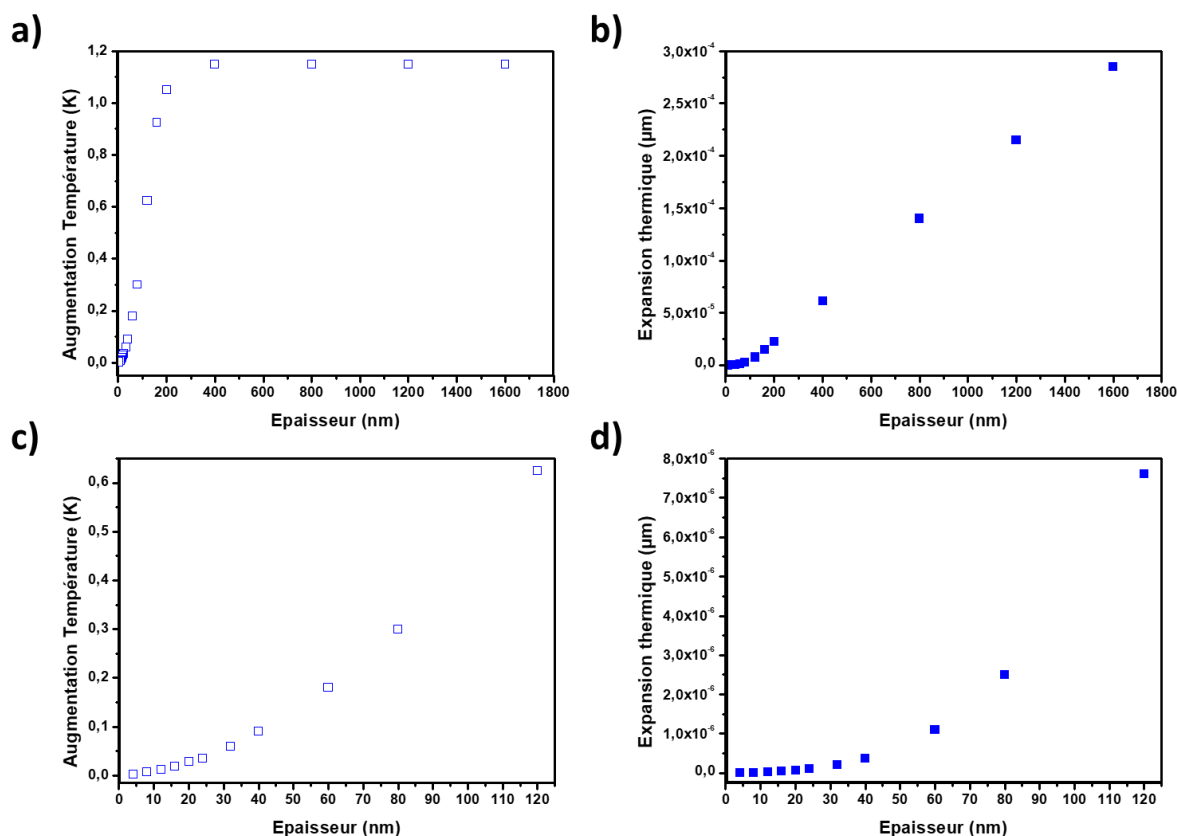


Figure II-26 : Résultats obtenus par la modélisation COMSOL dans le cas d'un disque de PMMA - a) Variation de la température de l'échantillon sous la pointe en fonction du diamètre - b) Variation de l'expansion de l'échantillon sous la pointe en fonction du diamètre - c, d) Agrandissements sur la zone allant de 1 nm à 120 nm pour respectivement la variation de température c) et l'expansion de l'échantillon d)

Un résultat analogue à celui obtenu avec la sphère est obtenu avec l'existence de deux comportements selon l'épaisseur de l'objet. On retrouve aussi la dépendance de la température en a^2 pour des épaisseurs inférieures à 150 nm, hormis qu'ici a n'est pas le rayon, mais l'épaisseur de l'objet (figure non présentée). En revanche, une différence de comportement a pu être observée dans le cas où le comportement d'expansion thermique est étudié en fonction du temps de pulse pour une sphère de 7,5 nm et un disque d'épaisseur 7,5 nm (Figure II-27).

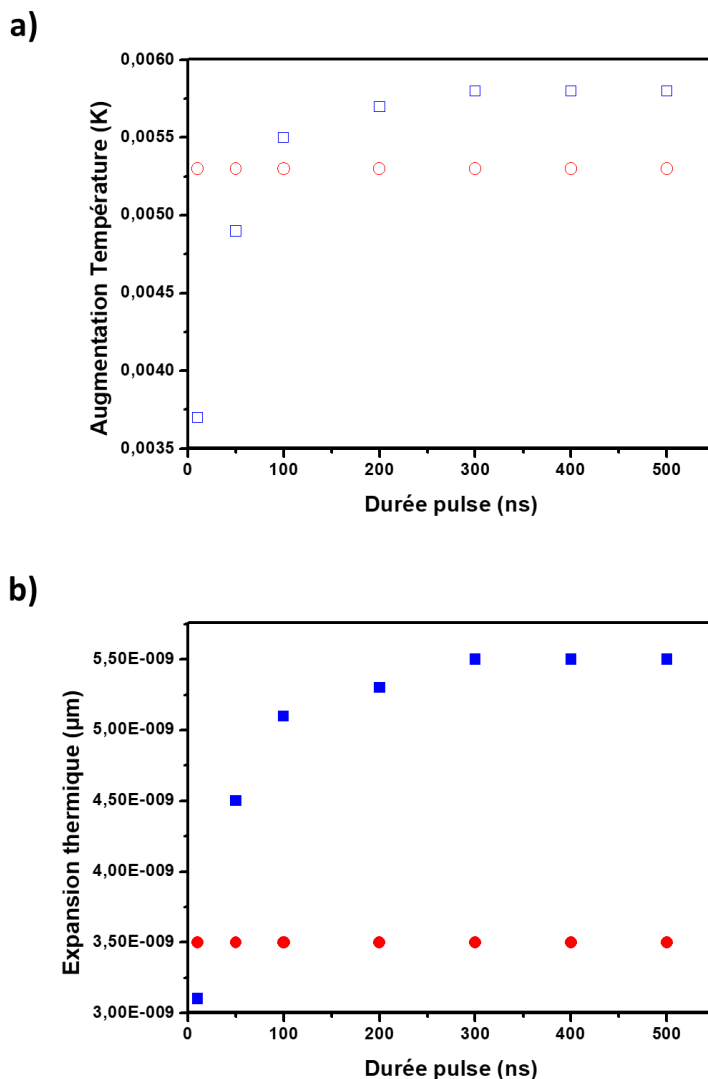


Figure II-27 : Modélisation du comportement thermo-expansion en fonction de la durée du pulse de la sphère (rond rouge) et du disque (carré bleu) de PMMA de 7,5nm d'épaisseur – a) Augmentation de la température en fonction de la durée du pulse – b) Augmentation de l'expansion thermique en fonction de la durée du pulse

En effet dans le cas de la sphère, un effet de saturation est observé, quelle que soit la durée du temps de tir laser. Ici, la modélisation de la sphère n'est pas optimale, car elle ne sait pas décrire les temps entre 10 ns et 0 ns. En revanche, dans le cas du disque, un comportement de transition analogue à celui observé pour la sphère à 75 nm est obtenu. Cela signifie que dans le cas du disque, le temps de relaxation est suffisamment élevé même avec une épaisseur très faible pour être dans la zone $\tau_{\text{relax}} > t_p$ et donc pour observer une linéarité en fonction du temps de tir laser si celui-ci est suffisamment faible. Cela vient du fait que selon la géométrie de l'objet, la valeur du temps de relaxation peut fortement varier. En conséquence, les effets de saturations observables en fonction de l'épaisseur de l'objet peuvent fortement varier d'un objet à l'autre selon leur géométrie.

a) Conclusions et perspective sur les échantillons de tailles nanométriques

Pour conclure, les modélisations réalisées avec le logiciel COMSOL ont permis d'évaluer théoriquement l'effet du changement de dimensions sur le comportement d'expansion

thermique d'objet type. Le résultat majeur montre que pour des objets de faibles dimensions, la diminution du temps de relaxation de l'objet conduit à une modification de son comportement thermique et de sa dilatation. Lorsque l'objet devient suffisamment petit, la dépendance en taille de la température ne sera plus linéaire, mais parabolique. Cette transition d'un cas linéaire à un cas parabolique va être fonction du temps de relaxation de l'objet par rapport à la durée du tir laser. Or le temps de relaxation est dépendant de la géométrie de l'objet donc, d'un cas à un autre, la transition sera différente comme observé dans les cas de la sphère et du disque.

Ces résultats théoriques permettent de mieux appréhender les conséquences de changement de taille des objets sur les expériences réelles. En effet, plus l'objet sera de petite dimension et moins l'expansion thermique sera efficace. En conséquence, même si l'utilisation de la résonance forcée permet d'augmenter la sensibilité, celle-ci sera contrebalancée par la forte diminution de l'expansion thermique d'un objet de dimension nanométrique. Il va donc être plus difficile qu'attendu d'observer ce genre d'objet malgré l'augmentation de sensibilité de la résonance forcée. Un autre résultat important est que, dans le cas d'objets d'épaisseur inférieure à 100 nm, changer le temps de tir laser ne devrait avoir aucune influence sur l'intensité de la mesure du fait de l'effet de seuil observé.

V. Conclusions

Dans ce Chapitre, le mode de résonance forcée a été présenté à la fois d'un point de vue expérimental et théorique. Ce développement instrumental représente un véritable bond technologique pour la technique, car il permet d'atteindre des sensibilités meilleures de plusieurs ordres de grandeur par rapport à la mesure d'AFM-IR classique. Il a permis l'analyse d'échantillons d'épaisseurs nanométriques ou encore de molécules présentes à l'état de trace dans un échantillon [84], [87]. Cette augmentation de la sensibilité étant directement reliée au facteur de qualité des modes de résonance du levier AFM utilisé. Cependant, le fait de changer d'ordre de grandeur dans la taille des échantillons a aussi des conséquences sur la mesure AFM-IR notamment du point de vue thermique. Comme les modélisations ont pu le montrer, le comportement thermique d'un échantillon de quelques nanomètres d'épaisseur excité par le laser IR n'est pas le même que celui d'un échantillon de plusieurs centaines de nanomètres d'épaisseur. L'expansion thermique de l'objet est directement impactée par ce changement de comportement et devient beaucoup moins efficace, ce qui contrebalance le gain de sensibilité permis par l'utilisation de la résonance forcée. La mise en place d'un mode de résonance forcée avec un éclairage par le dessous, qui a été menée durant la thèse, a permis de valider ce type de configuration d'éclairage et d'en dessiner les limitations. Le rétrocontrôle s'avère être un outil indispensable pour réaliser une cartographie chimique correcte et l'importance du bruit dans la mesure des spectres doit être prise en compte pour les analyses spectrales.

Des points qui viennent d'être traités dans cette partie, il apparaît que pour améliorer encore les capacités de mesure obtenues en AFM-IR en résonance forcée et atteindre l'échelle nanométrique, il est nécessaire de travailler sur les leviers AFM utilisés. De fait, plusieurs solutions ont déjà été proposées. La première des solutions consiste à modifier les propriétés optiques de la pointe AFM. En effet jusque-là, la pointe était considérée comme un détecteur passif dans les mesures AFM-IR classiques. Le développement de la résonance forcée a conduit à l'utilisation de plus en plus commune à un nouveau type de pointe qui est recouvert d'une couche d'or. Dans ces conditions, les pointes ne sont plus passives, mais induisent une amplification du champ électrique sous la pointe et permettent d'améliorer la mesure [83]. Cependant, cette amplification de champ n'est pas sans conséquence sur la mesure AFM-IR

en elle-même et, comme les surfaces, l'étude de l'influence des pointes dans la mesure en résonance forcée sera abordée dans le chapitre suivant (Chapitre III). Une autre solution possible est de changer le design du levier AFM dans le but d'augmenter le plus possible son facteur de qualité. Un premier exemple de leviers AFM basés sur le concept de transducteur optomécanique spécialement fabriqués pour la mesure AFM-IR a déjà été publié [88]. Ce type de système a été utilisé dans le cas de mesure AFM-IR classique et a permis d'augmenter le signal détecté par un facteur 50, obtenant alors des conditions de mesure proches de celles observées expérimentalement avec la mesure AFM-IR en résonance forcée. L'utilisation de ces leviers en mode résonance forcée devrait permettre d'atteindre encore de meilleures sensibilités et d'obtenir un rapport signal sur bruit supérieur au levier classique. Cependant, ce type de système n'est pas disponible commercialement et demande à la fois un équipement et un savoir-faire spécifique pour pouvoir être fabriqué. Ce qui limite fortement son accessibilité.

Chapitre III : Enjeux méthodologiques de l'éclairement pour la mesure AFM-IR

Initialement, la technique AFM-IR a été développée avec un éclairement en réflexion totale via un prisme. Un autre mode d'éclairement a été ensuite mis en place : celui-ci propose d'éclairer l'échantillon du même côté que le levier. Cet éclairement est appelé « par le dessus ». Il a été introduit pour la première fois par l'équipe de M. Belkin (cf. Chapitre II, p. 37) [16]. Dans cette configuration, le laser est focalisé directement sur la pointe et sur l'échantillon. Le principal avantage de cet éclairement est de faciliter la préparation des échantillons : il n'est plus nécessaire de limiter l'épaisseur de l'échantillon à un micromètre. De plus, comme il n'est plus nécessaire d'utiliser un prisme, il est possible de diversifier les surfaces utilisées pour déposer les échantillons et de s'affranchir de certaines difficultés liées aux interactions entre l'échantillon et la surface en ZnSe. En contrepartie, comme le laser est maintenant focalisé sur la pointe, il est nécessaire d'utiliser des leviers transparents à l'IR ou réfléchissants. Pour le moment, la seule solution accessible pour réussir à faire une mesure en éclairement par le dessus a été d'utiliser des leviers de silicium recouvert d'or.

La configuration d'éclairement par le dessus a connu un fort engouement et s'est développée à un point où elle est maintenant la plus utilisée en AFM-IR. Ce Chapitre présente cette nouvelle configuration d'éclairement. Les deux premières parties décrivent précisément cette configuration et proposent une discussion autour de l'influence du levier en silicium recouvert d'or sur la mesure AFM-IR. Dans une troisième partie, l'influence du substrat sur lequel est déposé l'échantillon est discutée plus en détail. Notamment dans le cas où c'est un substrat or qui est choisi pour l'étude. Enfin, dans une dernière partie, deux applications de mesures corrélatives développées durant ma thèse grâce à l'éclairement sur le dessus vont être présentées. La première s'intéresse à la dénaturation thermique du collagène fibrillaire de type I. La seconde application a pour but la caractérisation structurale et chimique de fibres protéiques d'origine bactérienne : les fibres HfQ.

I. Mise en place de l'éclairement par le dessus

Historiquement, l'AFM-IR a été développé avec un éclairement en réflexion totale (Chapitre I). Ce type d'éclairement limite les interactions de la pointe avec le rayonnement. De plus, il permet d'avoir un contrôle relativement fin sur l'éclairement de l'objet, paramètre très important dans le cadre du développement d'une méthode de mesure quantitative à partir de l'AFM-IR comme celle proposée par Ramer et al. [60]. Cependant, ce type d'éclairement contraint la préparation des échantillons. D'une part, pour que l'éclairement soit le plus homogène possible, il est nécessaire que l'épaisseur de l'objet étudié ne dépasse pas un à deux micromètres. Cela implique donc de couper ou d'amincir l'échantillon si celui est trop épais, ce qui peut être particulièrement délicat pour certains échantillons. Ceci est d'autant plus contraignant que l'utilisation des résines comme l'époxy (technique d'enrobage standard pour faire des coupes fines) est à éviter, car il y a un fort risque de polluer le signal IR de l'échantillon. D'autre part, du fait des conditions d'illumination nécessaires à la mise en place de la réflexion totale, un seul type de prisme doit être utilisé pour que l'éclairement conduise à la génération d'un champ évanescent à l'interface. Commercialement, ce sont des prismes de ZnSe qui ont été choisis. Le ZnSe a des propriétés optiques optimales pour les mesures IR et

notamment il est transparent sur la majeure partie de la gamme du moyen IR. Cependant, la chimie de surface du ZnSe est très complexe et il apparaît impossible d'obtenir un dépôt satisfaisant avec un certain nombre d'échantillons.

L'ensemble des limitations présentées ici ont conduit à l'émergence d'un nouveau mode d'éclairage : l'éclairage par le dessus. Le premier système utilisant l'éclairage par le dessus a été un système prototype utilisé par l'équipe de M. Belkin [16]. Peu de temps après, un système utilisant cette même configuration d'éclairage a été commercialisé par la société Anasys Instruments. Cette configuration va maintenant être présentée. Ensuite, les intérêts qu'apporte cette configuration ainsi que les conséquences sur la mesure AFMIR vont être abordés.

1. Présentation du montage avec l'éclairage par le dessus

Un schéma simplifié du montage d'éclairage par le dessus est donné en Figure III-1. Ce montage est inspiré du premier système acquis par l'équipe : le NanoIR2s. Ce système est un microscope hybride permettant de faire des mesures AFM-IR ainsi que des mesures s-SNOM. Le fonctionnement de ce système est détaillé dans le Chapitre V. La lame séparatrice figurée ici n'a pas de rôle direct dans la mesure AFM-IR. Elle permet de rediriger la moitié du faisceau vers un bras contenant un détecteur MCT nécessaire à la mesure s-SNOM et le puissance-mètre utilisé pour mesurer le spectre de référence. Si l'on compare le montage classique donné dans l'encart de la même figure, on constate que la principale différence entre les deux montages vient de la focalisation qui est maintenant faite grâce à un miroir parabolique au lieu de la lentille focale mobile. En fonction de son inclinaison le miroir parabolique va permettre de focaliser le laser au niveau de l'interface pointe/échantillon. Cependant, même dans le cas d'une focalisation optimale, la taille du spot laser reste bien supérieure aux dimensions du levier AFM-IR. Celui-ci va donc être éclairé par le faisceau IR. Pour que l'éclairage soit le plus homogène possible et limiter les interférences avec le levier, l'éclairage se fait avec un angle de 60° par rapport à la normale de la surface.

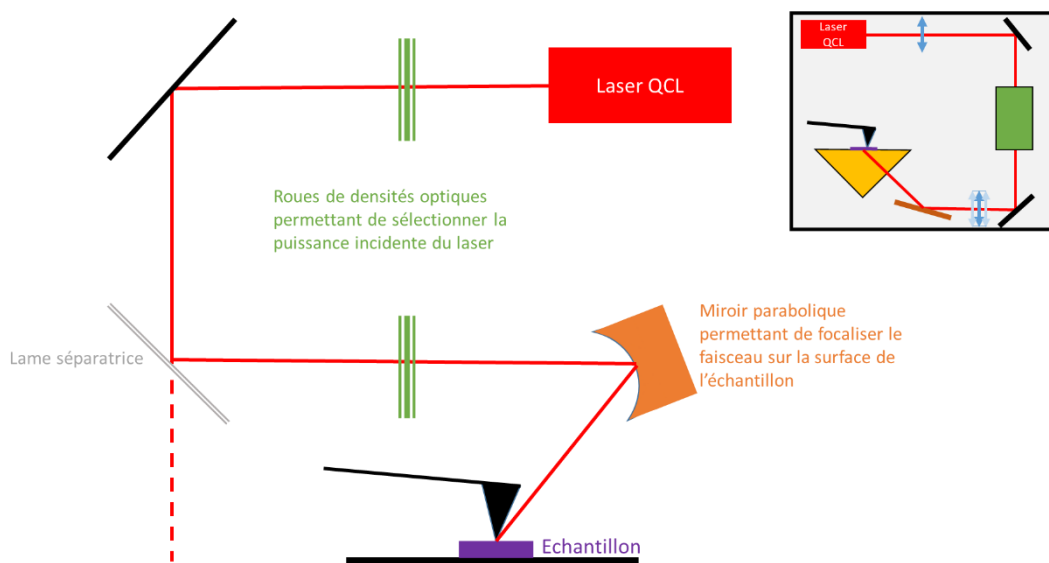


Figure III-1: Schéma simplifié du montage utilisant la configuration d'éclairage par le dessus – En encart, le montage utilisant l'éclairage en réflexion totale

Un autre changement entre les deux configurations vient de l'atténuation de la puissance du faisceau laser : précédemment faite avec un polarisateur, elle est ici réalisée grâce à deux roues de densités optiques en série. La sélection en puissance se fait que sur des valeurs discrètes, mais en contrepartie aucun changement de polarisation du laser n'est induit lors de la sélection en puissance.

2. Intérêt de l'éclairage par le dessus

En utilisant un éclairage par le dessus, il est possible de s'affranchir de l'utilisation du prisme. Cela présente de multiples intérêts du point de vue de la mesure, mais aussi de la préparation des échantillons.

Le premier intérêt est de retirer une partie des contraintes de surface. En effet, la surface choisie ne doit plus avoir nécessairement être transparente dans la gamme du moyen IR, mais seulement ne pas être absorbante. Cela ouvre donc à la possibilité d'utiliser des surfaces métalliques comme notamment les surfaces de silicium recouvertes d'or. Les contraintes pour la mesure AFM sont cependant conservées : la surface doit être la plus plane possible et avoir une rugosité de surface la plus faible possible. Ces contraintes sont facilement respectées par un certain nombre de surfaces (en plus du CaF_2 et du ZnSe) comme celles en silicium, les surfaces métalliques ou différents types de support compatible avec la microscopie IR ou optique. De plus, il est possible que celles-ci passent d'un rôle passif pour la mesure d'absorption à un rôle actif comme c'est le cas pour les surfaces d'or, ce qui est détaillé dans la suite.

De plus, il est possible d'utiliser de simples lamelles au lieu de prismes ce qui facilite la préparation des échantillons comme par exemple en biologie, il est possible de faire les cultures directement sur les surfaces. Enfin, la flexibilité du design du support permet aussi d'utiliser des substrats adaptés à d'autres techniques d'analyse, ce qui permet des mesures corrélatives AFM-IR/microscopie optique ou AFM-IR/microscopie électronique qui seront présentés dans la dernière partie de ce Chapitre.

3. Conséquences sur la mesure AFM-IR

Si l'éclairage par le dessus présente des avantages par rapport à la versatilité de substrat, mais aussi de coût de consommables, cette configuration possède quelques contraintes et inconvénients.

La contrainte la plus forte est celle qui touche le levier. En effet, contrairement au cas classique, le levier est directement éclairé par le laser dans cette configuration. Il faut donc éviter que celui-ci n'absorbe une partie du rayonnement IR générant son propre échauffement thermique, sous peine de le voir osciller. La solution proposée jusque-là a été de recouvrir le levier de silicium par une couche d'or. Par la suite, ce type de levier sera appelé levier Si-Au et les leviers simples en silicium seront nommés leviers Si.

Pour illustrer ce point, on peut comparer le comportement d'un levier Si avec celui d'un levier Si-Au. En effet, si le levier interagit avec le rayonnement, son oscillation propre ne

permettra plus de distinguer le choc provenant de la pointe, empêchant alors toute mesure AFM-IR. Ce phénomène peut être observé lors de l'alignement du laser avec la pointe, étape appelée « optimisation de la mesure ». Pour ce faire, un ensemble de miroirs pilotés par des céramiques piézoélectriques permet de balayer l'espace (X, Y) autour de la pointe AFM qui est gardée à une position fixe. Au cours de ce balayage, le signal de déflexion est enregistré. Lorsque le laser arrive au niveau de la pointe AFM, le signal de déflexion augmente fortement du fait de l'expansion thermique de l'échantillon sous la pointe. Il est alors possible d'aligner le laser sous la pointe. Deux résultats d'alignement du laser sur la pointe sont donnés en Figure III-2. Ils ont été obtenus en éclairage par le dessus dans le cas d'un levier Si (Figure III-2 a)) et dans le cas d'un levier Si-Au (Figure III-2 b)). Dans le cas du levier Si-Au (Figure III-2 b)), le résultat obtenu correspond à ce qui est attendu dans une mesure AFM-IR : un faisceau focalisé apparaît à la position de la pointe. En revanche dans le cas du levier Si, le spot est diffus et de grande taille. Ce résultat est observable dans le cas où l'ensemble du levier interagit avec le rayonnement en plus de l'absorption IR de l'objet. Il n'est donc pas possible d'obtenir une mesure AFM-IR dans ces conditions, car le signal sera dominé par l'interaction du laser avec le levier Si. En conséquence, si l'éclairage par le dessus permet une plus grande versatilité de substrat pour la mesure, une contrainte majeure apparaît sur la nature des leviers utilisables.

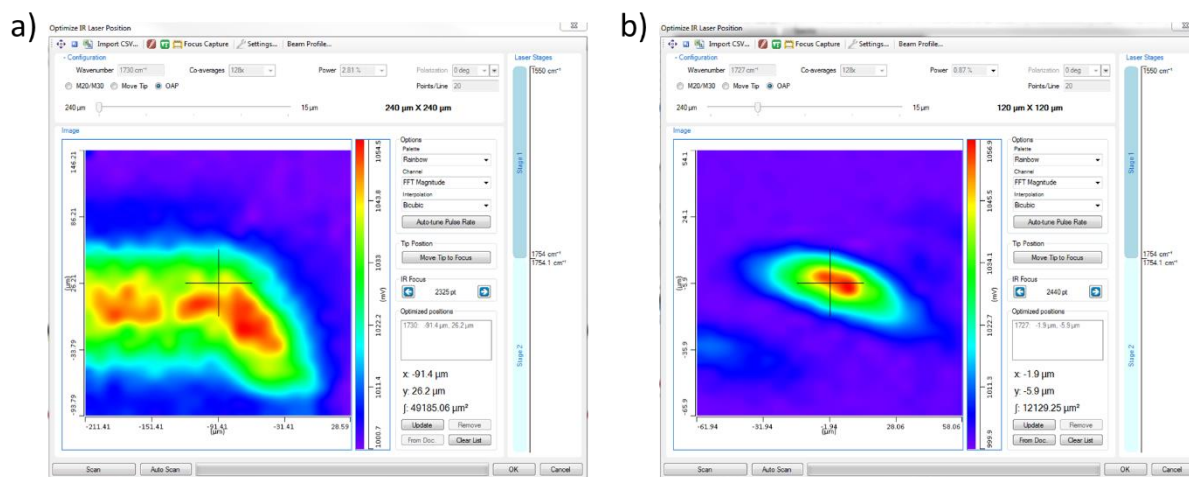


Figure III-2 : Comparaison des deux tâches laser obtenues a) dans le cas de la pointe en silicium – b) dans le cas d'une pointe en silicium recouverte d'or

La seconde contrainte vient de l'éclairage de l'échantillon. Dans le cas de la mesure en réflexion totale, l'illumination est faite par un champ évanescent. Il est alors possible de connaître exactement l'illumination de l'échantillon, au prix d'une contrainte sur son épaisseur. Dans le cas de l'éclairage par le dessus, le faisceau pénètre directement dans l'échantillon. Il n'est pas possible de connaître précisément la profondeur de pénétration du rayonnement dans l'échantillon. En conséquence, dans le cas d'un objet épais, il est impossible de savoir quelle partie exactement va être éclairée et va participer au signal photothermique détecté par la mesure AFM-IR. Ce point est particulièrement critique dans le but de faire une mesure quantitative en AFM-IR comme il a pu déjà être avec un éclairage en réflexion totale [60].

Maintenant que les avantages et inconvénients de l'éclairage par le dessus ont été abordés, les deux grandes conséquences de ce mode d'éclairage sont détaillées dans la suite de ce Chapitre.

II. Influence de la pointe en or sur la mesure AFM-IR

L'utilisation de l'or pour recouvrir le levier est une condition nécessaire de la mise en place de l'éclairage par le dessus. La question qui est étudiée ici est l'influence que celle-ci peut avoir sur la mesure. En effet, du fait du recouvrement par l'or, la pointe peut interagir avec le rayonnement en créant un champ lumineux intense comme cela a pu être observé dans d'autres techniques de champ proche utilisant des pointes en or, telle la spectroscopie Raman par exaltation de pointe [89]. Si cette interaction avec le rayonnement IR conduit à des changements dans l'information spectrale obtenue, cela aurait pour conséquence que les résultats obtenus en AFM-IR ne seraient plus directement comparables à ceux de spectroscopie d'absorption IR. Comprendre les effets dus à l'exaltation du champ électromagnétique est donc essentiel pour interpréter les résultats obtenus en AFM-IR avec l'éclairage par le dessus.

Les résultats obtenus par le groupe de M. Belkin dans l'article de Lu et al. [90] vont être détaillés dans la première partie. Dans cette publication, l'or est utilisé pour amplifier le champ local et améliorer la sensibilité et la résolution latérale de la mesure. Ensuite, une discussion sur les effets de polarisation du rayonnement observables en éclairage par le dessus est proposée à partir d'autres publications. Enfin, il sera présenté des résultats d'expériences préliminaires sur l'effet de la pointe en or qui ont été réalisées durant ma thèse. À partir des résultats obtenus dans ces expériences et de l'étude bibliographique, des conclusions préliminaires sur le rôle de la pointe en or seront faites ainsi que les conséquences sur les mesures AFM-IR.

1. Exaltation de champ par la pointe en or en AFM-IR

L'utilisation de la pointe en or couplée à la mesure en résonance forcée pour améliorer significativement la sensibilité de la technique a été aussi démontrée par F. Lu et M. Belkin [90]. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser à la fois une surface et une pointe recouvertes d'or. La principale conséquence de l'utilisation d'un substrat et d'une pointe en or est qu'un champ électrique localement amplifié apparaît en un point beaucoup plus petit que le spot du laser et est situé sous la pointe. Il y a donc une augmentation locale de l'intensité du champ électrique local au niveau de la zone d'intérêt pour la mesure AFM-IR.

Dans cette étude de l'équipe de M. Belkin, des simulations 3D ont été faites pour estimer l'augmentation de l'intensité du champ dans le cas d'une monocouche moléculaire d'une épaisseur de 2 nm (Figure III-3). Les résultats obtenus montrent une augmentation de la sensibilité du système par un facteur 2,105 et que la zone éclairée par la pointe est limitée entre 5 et 10 nm.

À partir de l'exaltation du champ électrique, deux améliorations distinctes ont pu être mises en évidence : l'augmentation de la sensibilité verticale et l'augmentation de la résolution latérale.

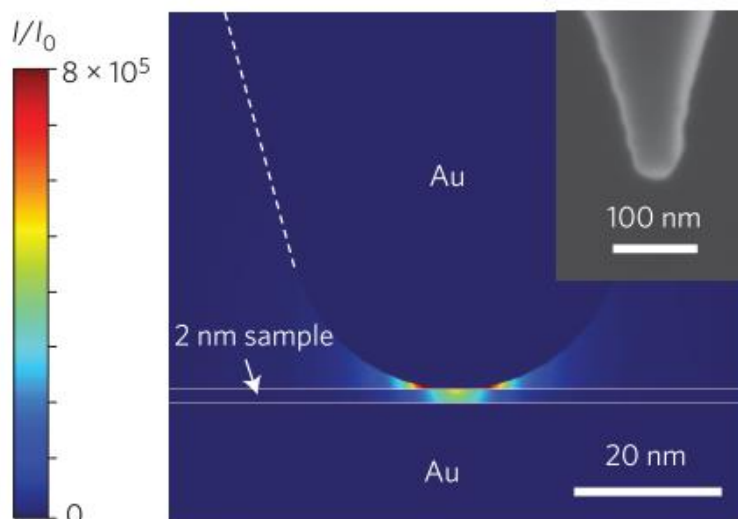


Figure III-3 : Modélisation de l'exaltation de champ : simulation 3D de l'intensité du champ I/I_0 pour une couche monomoléculaire de 2 nm d'épaisseur déposée sur un substrat d'or - Figure extraite de [90]

Il a pu être montré par F. Lu et al. [90] que l'utilisation simultanée de la résonance forcée et de l'exaltation de champ permet d'obtenir un spectre d'absorption infrarouge sur deux couches monomoléculaires dont l'épaisseur ne dépasse pas 2 nm dans les deux cas. La Figure III-4 présente en bleu les spectres obtenus soit sur la monocouche de EG6-OH soit sur la monocouche de NTP (les formules des deux molécules sont indiquées dans la Figure III-4). Les spectres obtenus sont proches de ceux obtenus en spectroscopie FTIR (en rouge sur la Figure III-4). Il est cependant possible d'observer certaines distorsions comme la diminution d'intensité relative de la bande à 1275 cm^{-1} dans le cas de la couche monomoléculaire de EG6-OH.

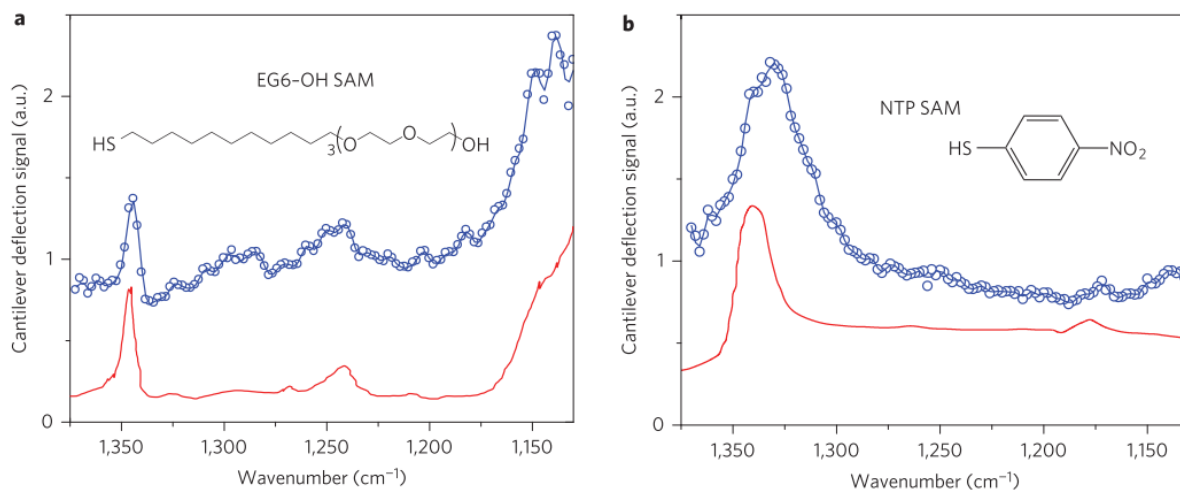


Figure III-4 : Spectres obtenus sur des monocouches moléculaires de EG6-OH a) et de NTP b) - Les spectres en rouge représentent des spectres de références obtenus en spectroscopie FTIR en réflexion totale pour chacune des espèces - Figure adaptée de [90]

Une autre expérience menée dans l'étude de Lu et al. [90] montre que la combinaison de la résonance forcée et du couplage or-or permet d'améliorer la résolution latérale des cartographies. Cela a été montré avec une monocouche à base de PEG-thiolé (Figure III-5). Cette molécule possède un maximum d'absorption à 1342 cm^{-1} . La monocouche a une épaisseur de 2 nm. Sur les images, il est possible de voir que les îlots de PEG peuvent être

cartographiés avec précision. La résolution latérale obtenue alors est d'environ 25 nm, ce qui correspond au rayon de courbure de la pointe.

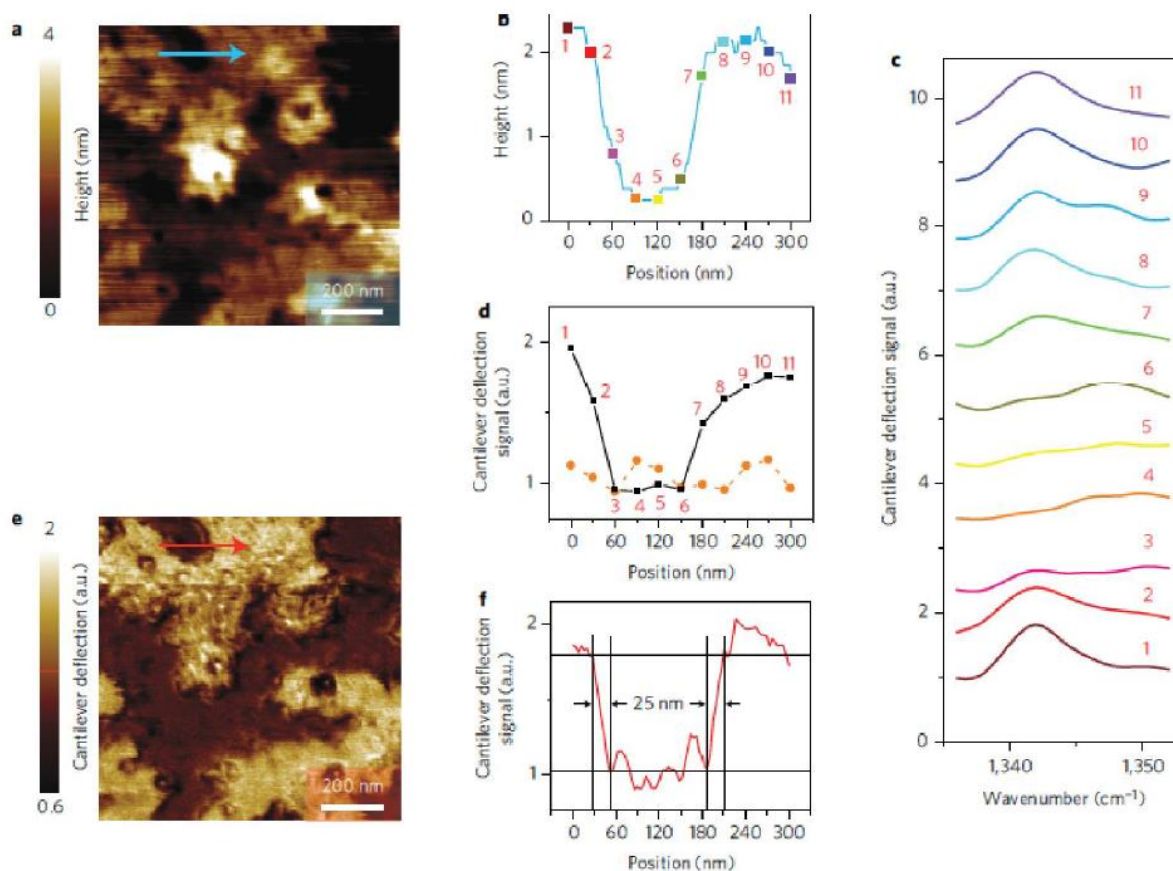


Figure III-5 : Démonstration de l'augmentation de résolution latérale en utilisant l'exaltation du champ électrique - a) Topographie en mode contact de l'échantillon de PEG - b) Profil de hauteur symbolisé par la ligne bleue sur la topographie - c) Spectres obtenus dans les différents points indiqués sur le profil de hauteur b) - d) Mesure de la déflexion du levier le long du profil de topographie b) quand le nombre d'onde du laser est 1342 cm^{-1} (ligne continue noire) ou 1552 cm^{-1} (ligne pointillée orange) - e) Cartographie obtenue en simultanée de la topographie a) lorsque le nombre d'onde du laser est fixé à 1342 cm^{-1} - f) Mesure de la déflexion du levier obtenue le long de la flèche rouge indiquée sur la cartographie e) - Figure extraite de [90]

Le couplage or-or permet d'améliorer encore les capacités de l'AFM-IR en résonance forcée et d'atteindre les sensibilités nanométriques. Le principe physique mis en jeu ici est l'amplification du champ local par l'interaction de l'or avec le rayonnement. La pointe du levier AFM va alors jouer le rôle d'antenne et générer une source secondaire plus intense que le faisceau laser initial. La question se pose de savoir si les propriétés de l'éclairage restent identiques à celle de l'éclairage incident et si cela n'a aucune influence sur le spectre d'absorption IR obtenu. Un premier élément de réponse apparaît dans l'analyse des résultats obtenus par F. Lu et M. Belkin dans l'article qui vient d'être détaillé. En effet, comme déjà relevé, certaines distorsions sont observables dans les spectres obtenus avec le couplage or-or. Il semblerait donc qu'en plus de l'exaltation du champ électrique, d'autres effets induits par la pointe Si-Au apparaissent dans la mesure AFM-IR. Pour le comprendre, des études bibliographiques et expérimentales ont été faites durant ma thèse.

2. Étude bibliographique

La preuve de concept de l'augmentation de sensibilité faite par F. Lu et M. Belkin a ouvert la voie à une importante utilisation de la pointe en or pour la technique AFM-IR. D'autant plus que ce type de pointe est le seul utilisable pour des mesures avec l'éclairage par le dessus. Cependant comme discuté précédemment, le champ local intense créé par exaltation par la pointe semble induire des distorsions dans les spectres observés. Ces phénomènes ont été relevés dans d'autres projets et discutés dans la littérature.

Le premier article s'intéressant spécifiquement aux distorsions de spectres observés en AFM-IR avec l'éclairage par le dessus a été publié en 2017 par V. Giliberti et al. [91]. En effet, lors de mesures effectuées sur des protéines transmembranaires dans des extraits de membranes pourpres, les auteurs ont relevé que lorsqu'ils utilisaient une configuration avec une pointe Si-Au et une surface en or le ratio de la bande amide I par rapport à la bande amide II des protéines n'était plus le même que celui observé en spectroscopie IR classique (10/1 ici contre 3/2 en spectroscopie IR classique). Or d'après la théorie de l'AFM-IR, comme la mesure AFM-IR est une mesure directe de l'absorbance IR de l'objet, ce genre de différence de spectres ne devrait pas exister entre les deux mesures. Le même résultat a été observé lorsque la surface d'or était remplacée par du silicium. Ceci n'est donc pas un effet de la surface. Deux facteurs peuvent alors expliquer ce résultat : soit un effet de l'éclairage direct par le dessus, soit un effet corrélé à l'utilisation de la pointe Si-Au. Dans l'article précédemment cité, les auteurs ont émis l'hypothèse que ce résultat serait lié à la pointe Si-Au, car le champ local qu'elle générerait serait un champ polarisé. Ceci est dû au fait que le faisceau IR généré par le laser QCL possède une polarisation initiale. Du fait que l'éclairage est à un angle donné (ici de 60°), le faisceau entrant en interaction avec la pointe possède une composante parallèle et une composante normale à la surface. Ici, seule la partie dans l'axe de la pointe (c'est-à-dire normale à la surface d'analyse) serait conservée et donc le champ local intense généré par la pointe Si-Au serait polarisé. Cette hypothèse est analogue à ce qui a été modélisé dans le cas d'îlots métalliques utilisés pour la spectroscopie d'absorption infrarouge exaltée par la surface (dont l'acronyme est SEIRA). Si cette hypothèse est vérifiée, des règles de sélection similaires à celle observée en SEIRA doivent s'appliquer et conduire à une sélection de bandes [92]. Dans le cas spécifique de la protéine transmembranaire de membrane pourpre, la différence de ratio amide I / amide II va alors s'expliquer par le fait que cette protéine contient des hélices alpha majoritairement orientées perpendiculairement à la surface. En conséquence, les groupements participant au signal de la bande amide II qui sont principalement orientés dans une configuration opposée ne vont pas interagir avec le champ polarisé verticalement, contrairement à ceux participant au signal de la bande amide I qui sont dans la bonne direction pour interagir. Ce serait donc cette différence d'orientation qui générerait la différence de ratio observée par rapport à la spectroscopie IR classique où le champ n'est pas polarisé [93].

L'hypothèse de la polarisation du champ est une hypothèse relativement admise dans la communauté pour expliquer les distorsions observées dans les spectres AFM-IR obtenus en éclairage par le dessus avec une pointe Si-Au. De fait, l'utilisation de la polarisation du champ est même à la base de la mise en place d'expérience de nanopolarimétrie utilisant l'AFM-IR en résonance forcée par T. Shaykhutdinov et al. [94]. Cependant, les résultats de cette expérience entrent en contradiction avec l'hypothèse émise précédemment. En effet dans leur article, l'équipe de V. Giliberti et al. suggère que, quelle que soit la polarisation initiale du faisceau laser, l'éclairage généré par la pointe est toujours polarisé de façon normale par rapport à la surface. Dans ce cas, faire varier la polarisation initiale du faisceau, comme il est fait dans l'expérience de nanopolarimétrie, ne devrait avoir d'influence que sur l'intensité du

signal généré (selon si la composante normale est plus ou moins importante) et non pas conduire à des différences de ratio de bandes comme observé dans l'article de T. Shaykhutdinov et al. [94]. L'interprétation des résultats obtenus dans ce second cas suggère alors que s'il y a bien un effet de polarisation, celui-ci n'est pas dû à la pointe Si-Au, mais à l'éclairage direct de l'objet. En effet, la principale différence entre les deux expériences est l'épaisseur des échantillons analysés. Dans le cas de l'article de T. Shaykhutdinov et al., les objets analysés ont une épaisseur allant de 70 nm à 600 nm. Ils sont donc beaucoup plus épais que les extraits de membranes pourpres. Il est donc possible de faire l'hypothèse que la divergence de résultats observée impliquerait que dans le cas où l'objet est épais, il existe un phénomène de compétition entre le signal AFM-IR généré par l'éclairage par la pointe et celui généré par l'éclairage direct. Dans le cas d'un objet épais de plusieurs dizaines de nanomètres, le signal obtenu va être la somme d'un signal de la partie proche de la surface de l'objet (éclairé par la pointe et polarisé verticalement) et d'un signal venant de la partie plus profonde de l'échantillon (excité par le rayonnement direct du laser). Si cette hypothèse de compétition des éclairages est vérifiée, cela aurait pour conséquence que le signal AFM-IR ne serait plus linéaire dans le cas d'une pointe Si-Au du fait de la contribution due à la pointe Si-Au qui n'est plus linéaire et qui va s'ajouter au signal dû à l'éclairage direct de l'objet

Au cours de ma thèse, de nombreux types de protéines ont pu être étudiés en utilisant une pointe Si-Au et un éclairage par le dessus comme le collagène fibrillaire de type I, les fibres amyloïdes HfQ et les fibres PrP de prions pour différentes espèces. Il est clair que statistiquement, il est impossible de retrouver dans chaque cas une orientation préférentielle par rapport à la surface identique à celle de la protéine transmembranaire de membrane pourpre utilisée par V. Giliberti et al. [91]. Or dans tous les cas, le ratio bande amide I / bande amide II varie de 5/1 à 10/1. Ceci peut être observé par exemple sur le spectre du collagène fibrillaire de type I de la Figure III-19 d). Un résultat identique a aussi été obtenu lors de mesures sur des cellules où aucune orientation préférentielle ne peut être observée. De plus, les variations de ratio entre 5/1 et 10/1 peuvent être observées d'une expérience à l'autre pour un même type d'échantillon. Par conséquent, elles sont alors soit dues à un changement dans l'optimisation de la mesure soit dues à un changement de pointe en or entre deux mesures. Ce résultat est donc en contradiction directe avec l'hypothèse d'une polarisation du champ par la pointe. De même, d'une expérience à l'autre, le système AFM-IR utilisé est identique : la polarisation du faisceau laser est conservée et donc le changement de ratio n'est pas dû à un changement de la polarisation incidente. On est donc aussi en contradiction avec l'hypothèse d'un effet de l'éclairage direct.

Ce dernier point montre que l'effet observé lors de l'éclairage direct couplé à l'utilisation d'une pointe Si-Au semble plus complexe qu'un simple effet de polarisation du champ électrique local exalté. Et même si l'effet observé est bien un effet de polarisation du champ local, il semble que l'effet de la pointe Si-Au soit déterminant et a pour conséquence la perte de linéarité de la mesure AFM-IR. Pour essayer d'aller plus loin dans la compréhension du phénomène, il est donc nécessaire de s'affranchir d'un des deux paramètres (la configuration d'éclairage directe et l'utilisation de la pointe Si-Au). Ceci a pu être fait grâce au couplage du système AFM-IR en réflexion total avec un laser QCL (Chapitre II).

3. Caractérisation de l'effet de la pointe pour la configuration en réflexion totale

Dans cette partie, une étude de l'effet de la pointe Si-Au est menée dans le cas d'un éclairage en réflexion totale. Jusque-là, l'ensemble des résultats présentés ont été obtenus avec un éclairage direct. En changeant le mode d'éclairage, il est possible de s'affranchir des effets possibles de l'éclairage direct de la pointe et de comparer ces résultats avec ceux obtenus dans la littérature. Un autre intérêt de la configuration en réflexion totale est qu'il est possible de s'affranchir de l'utilisation de la pointe Si-Au pour les mesures. Il va donc être possible de comparer les résultats obtenus sur un même échantillon avec une pointe Si et une pointe Si-Au.

a) Exemple d'une coupe de nylon

Pour la première étude, l'échantillon choisi est une coupe de nylon déposée sur un prisme de ZnSe. Le nylon possède une liaison chimique de type amide et donc une bande amide I et une bande amide II (cf. Chapitre II, p. 59). D'un point de vue spectroscopique, ce type d'échantillon test peut servir de modèle aux observations faites sur les protéines. Le ratio des deux bandes de cet échantillon peut être directement comparé à celui obtenu avec les protéines. La discussion des résultats obtenus par V. Giliberti et al. et T. Shaykhutdinov et al. nous ont conduits à émettre l'hypothèse que, selon l'épaisseur de l'échantillon, il pouvait exister un phénomène de compétition entre l'éclairage par la pointe et l'éclairage direct. En utilisant un polymère, il est possible de contrôler l'épaisseur de la coupe étudiée ainsi que l'homogénéité de structure de l'échantillon sur l'ensemble de la zone étudiée et donc de mettre en évidence l'effet d'épaisseur, s'il existe. De plus, la configuration d'éclairage utilisée ici fait que, d'une part, plus l'échantillon va être épais et moins le champ évanescent sera intense au niveau de la pointe et que, d'autre part l'échantillon va être éclairé avant la pointe. Donc s'il y a une compétition entre les deux éclairages, elle devrait ici être dominée par l'éclairage direct de l'objet par le champ évanescent.

Ici, une seule coupe de nylon de 250 nm d'épais a pu être étudiée en éclairage en réflexion totale avec alternativement une pointe Si et une pointe Si-Au. Cette épaisseur a été choisie, car elle est suffisamment faible pour pouvoir observer un effet de la pointe, mais elle est aussi suffisamment importante pour être sûr que le nylon ne présente aucun effet d'orientation préférentielle possible contrairement aux études menées sur les protéines transmembranaires de la membrane pourpre et à la nanopolarimétrie. Des spectres ont été obtenus avec des conditions de mesures similaires pour les deux types de pointes. Ils sont donnés en Figure III-6.

Les spectres en trait plein ont été obtenus à la même position avec soit une pointe Si (trait plein noir), soit une pointe Si-Au (trait plein bleu). Le changement du ratio amide I/amide II dû au changement de pointe apparaît alors clairement. En effet de 2/1 dans le cas de la pointe Si, il est de 3/1 dans le cas de la pointe Si-Au. Les deux autres spectres présentés (trait pointillé) sont des exemples de spectres obtenus sur d'autres zones de l'échantillon. Ils montrent un ratio de bandes amide I/amide II équivalent à celui du spectre en trait plein bleu. Le changement observé est donc clairement dû à un effet de la pointe Si-Au. L'effet est ici moins exacerbé que dans le cas des protéines. Cela est probablement dû à un effet d'épaisseur du nylon : du fait

de l'éclairage par le champ évanescent, l'amplification du champ n'est pas maximale pour une épaisseur de 250 nm. Le signal obtenu est donc la somme du signal venant du nylon éclairé directement par le champ évanescent et de celui du nylon éclairé par la pointe Si-Au. Cependant, le résultat est suffisant pour démontrer qu'il y a un effet réel de la pointe Si-Au sur le spectre AFM-IR obtenu. De plus, le fait que l'échantillon soit un polymère et que le même spectre soit obtenu en différents points exclut un effet de polarisation locale de l'échantillon qui expliquerait la différence dans le ratio comme cela a été suggéré par V. Giliberti et al. [91]. C'est donc un autre effet qui est observé ici. Il n'est pas possible pour autant de conclure sur la nature de l'effet réel de la pointe en or. L'hypothèse qui semble la plus probable est que l'amplification du champ local de la pointe Si-Au est suffisamment importante pour passer dans un domaine de réponse non linéaire. Dans ces conditions, des phénomènes identiques à ceux obtenus dans le cas des lasers très intenses vont être observés, notamment la biréfringence optique [95]. Dans ce cas, le coefficient d'absorption molaire d'une liaison chimique donnée ne va plus être une constante, mais va dépendre de l'intensité du faisceau. Si pour une intensité donnée, le facteur n'est pas le même pour la bande amide I et pour la bande amide II, le ratio de bandes serait impacté comme observé expérimentalement. Pour valider cette hypothèse, il est nécessaire de faire plus d'expériences avec des échantillons de nylon de différentes épaisseurs, mais aussi d'autres types d'échantillons. Il est aussi important de trouver des pointes qui puissent être utilisées avec l'éclairage par le dessus tout en étant passive dans cette configuration.

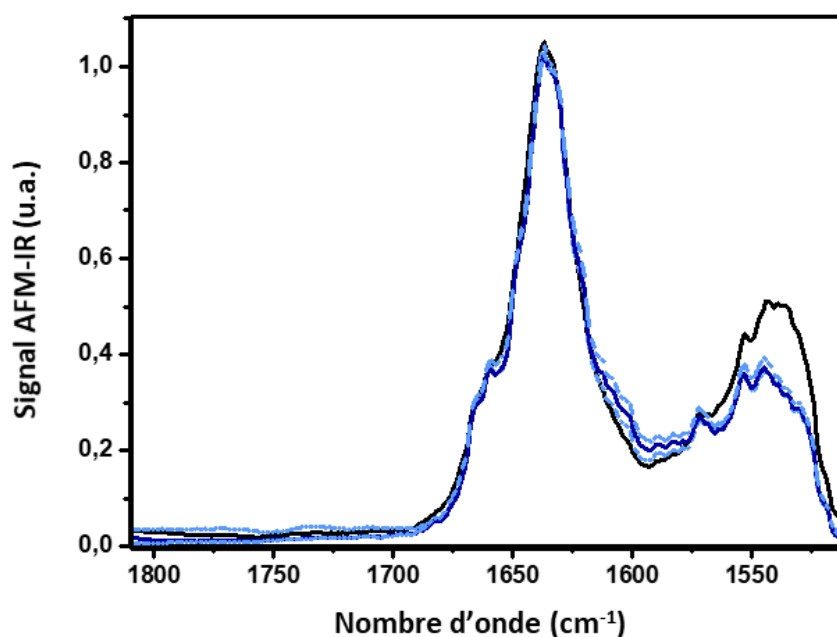


Figure III-6 : Comparaison des spectres obtenus sur la coupe de nylon de 250 nm d'épaisseur dans le cas de la pointe Si (trait plein noir) et de la pointe Si-Au (trait plein bleu), les deux autres spectres (pointillé bleu clair) sont deux spectres obtenus avec la pointe Si-Au pour deux autres positions

b) Exemple d'un échantillon biologique

Dans le cas de l'étude avec le nylon, les effets de la pointe Si-Au ont été évalués à partir des spectres. Le but des expériences suivantes est d'étudier l'influence de ce type de pointe dans le cas des cartographies chimiques. Pour cette étude, l'échantillon de culture de *Streptomyces lividans* sur le prisme de ZnSe utilisé pour la preuve de concept de la résonance

forcée a été repris (Chapitre II, p. 43). Comme expliqué précédemment, cet échantillon a l'avantage de présenter des objets de différentes épaisseurs qui sont à la fois compatibles avec des mesures en AFM-IR classique et en résonance forcée. Un autre avantage du montage utilisé ici est qu'il est couplé avec un laser QCL et une source OPO. Il est alors possible de passer de l'un à l'autre au cours d'une même expérience. Ce qui permet d'analyser le même échantillon avec les deux sources. En revanche, le laser QCL utilisé pour cette expérience a une gamme spectrale réduite de 1550 cm^{-1} à 1750 cm^{-1} . Il n'a donc pas été possible de faire de comparaison du ratio de la bande amide I et de la bande amide II.

La première comparaison entre les deux types de pointes a été faite dans le cas d'une acquisition AFM-IR classique avec la source OPO. La zone étudiée a été choisie, car elle contient à la fois des bactéries entières (détectables en AFM-IR classique) et des rémanents cellulaires (qui normalement ne peuvent être étudiés qu'en AFM-IR en résonance forcée) (cf. Chapitre II, p. 43). La comparaison des cartographies chimiques à 1660 cm^{-1} obtenues dans le cas de chaque pointe est donnée en Figure III-7.

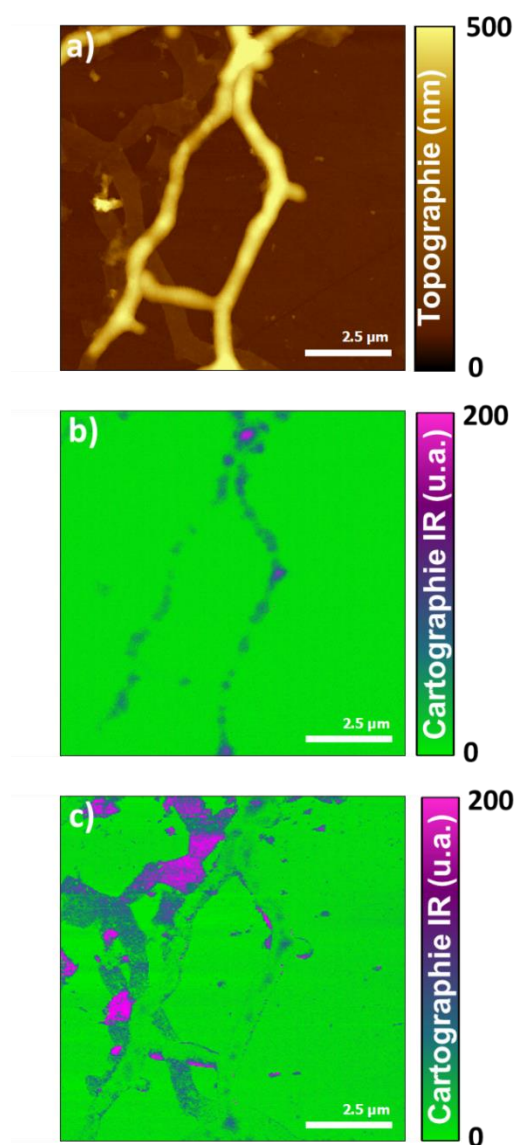


Figure III-7 : Comparaison des cartographies chimiques à 1660 cm^{-1} obtenus avec l'OPO sur un dépôt de *Streptomyces lividans* en fonction de la pointe AFM utilisé – a) Topographie AFM– b) Cartographie à 1660 cm^{-1} obtenue avec une pointe Si – c) Cartographie à 1660 cm^{-1} obtenue avec une pointe Si-Au

Sur ces images, on constate alors que le résultat obtenu avec la pointe Si-Au est très différent de celui obtenu avec la pointe Si. En effet, dans le cas de la pointe Si-Au, le signal observé vient majoritairement des résidus membranaires qui ne font que quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur. Le signal obtenu sur la bactérie apparaît très faible. Cette différence de signal entre le résidu membranaire et la bactérie est due à l'onde évanescente générée à l'interface prisme-échantillon. Dans ce cas, plus on s'éloigne de la surface et plus l'intensité du champ évanescent est faible. En conséquence, lorsque l'acquisition se fait au niveau du résidu membranaire l'onde évanescente est très intense. L'amplification résultante par la pointe est très importante. En revanche dans le cas de l'acquisition au niveau de la bactérie, la pointe est éloignée de plusieurs centaines de nanomètres de la surface. L'onde évanescente est beaucoup moins intense et l'amplification du champ électrique local apparaît négligeable. Un schéma de principe donné par la Figure III-8 résume la situation dans les deux cas.

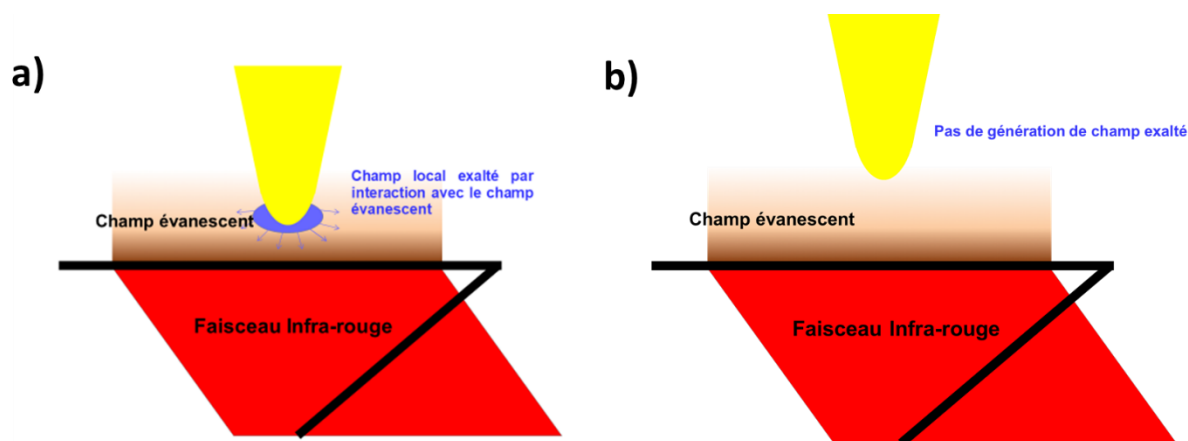


Figure III-8 : Schéma de principe de l'exaltation du champ local en fonction de la position de la pointe par rapport au champ évanescent – a) Cas du résidu membranaire, la pointe Si-Au est dans un champ suffisamment intense pour générer son exaltation – b) Cas de la bactérie, la pointe est trop haute par rapport à la surface, l'intensité du champ évanescent est plus faible comparée au cas précédent pour observer une exaltation de champ significative.

Des résultats obtenus en Figure III-7, il apparaît que contrairement à l'éclairage par le dessus, l'exaltation du champ électrique par la pointe Si-Au n'apparaît que sous certaines conditions et que le facteur principal est l'épaisseur de l'objet. Il est à noter que l'intensité initiale du laser a un rôle important. Si le faisceau est suffisamment intense, il doit être possible de générer une exaltation de la pointe même sur un échantillon épais. Cependant, celle-ci restera moins intense que celle générée proche de la surface. Ce résultat est à rapprocher de la discussion qui a été menée pour l'article de V. Giliberti et al. et celui de T. Shaykhtudinov et al et confirme qu'il existe bien une compétition entre l'expansion thermique liée à l'augmentation de température générée par le champ électrique local exalté et l'expansion thermique due à l'éclairage de l'objet par le champ évanescent produit par tout le faisceau laser. Dans le cas spécifique de l'éclairage en réflexion totale, il existe donc deux sources d'éclairage possibles de l'objet : la source primaire qui est le champ évanescent produit par la réflexion du faisceau IR et une source secondaire qui est le champ exalté par la pointe et qui est localisé au niveau de l'apex de la pointe. Selon l'épaisseur de l'objet, l'un prédomine par rapport à l'autre. Il est donc possible de s'affranchir des effets de pointes dans le cas des objets épais. En revanche, dans le cas de l'éclairage par le dessus, la pointe est toujours éclairée en premier par le laser et il existera toujours un signal lié au champ électrique local exalté, quelle que soit l'épaisseur de l'échantillon.

Une étude plus spécifique d'une zone contenant majoritairement des résidus membranaires bactériens permet d'observer plus en détail le cas où l'éclairage par le champ exalté domine (Figure III-9). Dans cette comparaison, le rôle de la pointe Si-Au comme

amplificateur du champ électrique local apparaît clairement, car il est possible d'observer une expansion thermique sur des objets d'une taille inférieure d'un ordre de grandeur à la limite de sensibilité de la mesure observée dans cette configuration (cf. Chapitre II, p. 43). Comme les propriétés géométriques et le facteur de qualité du levier sont équivalents entre le levier Si et le levier Si-Au, la sensibilité de la détection de la résonance forcée n'a pas été changée par rapport au cas présenté dans le Chapitre II. L'hypothèse la plus évidente pour expliquer ce résultat est que l'expansion thermique de l'objet a été plus importante. Or d'après les simulations thermiques présentées aussi dans le Chapitre II (cf. p. 65), une augmentation de l'expansion thermique est directement reliée à une augmentation de la température locale de l'objet. En conséquence, on peut conclure ici qu'en interagissant avec le champ évanescent à la position où il est le plus intense, la pointe en or va générer par exaltation un champ électrique local très intense qui va conduire à un chauffage de l'objet plus important et donc à une plus grande expansion thermique. Dans le cas de l'expérience présentée en Figure III-9, l'augmentation de l'expansion thermique est suffisante pour obtenir du signal sur un objet normalement non analysable avec une mesure AFM-IR classique dont la sensibilité est diminuée du fait de l'amortissement de l'oscillation du levier. Dans le cas de la mesure avec l'OPO, c'est à dire avec un seul tir par milliseconde, l'amplification se révèle être suffisamment intense pour que des dommages thermiques apparaissent sur la topographie de l'acquisition (Figure III-9 d)). Cette destruction locale provoquée par la pointe traduit une élévation de température très intense au-delà de celle prévue par les modélisations de F. Lu et M. Belkin [83]. Cette différence de comportement s'explique par la différence de structure des pulses entre ceux de l'OPO et ceux du laser QCL. Dans le cas du laser QCL, les pulses ont une durée d'au moins 100 ns alors que dans le cas de la source OPO, ils sont de l'ordre de 10 ns. En conséquence, à puissance équivalente pour un pulse, l'énergie crête est beaucoup plus élevée dans le cas de l'OPO.

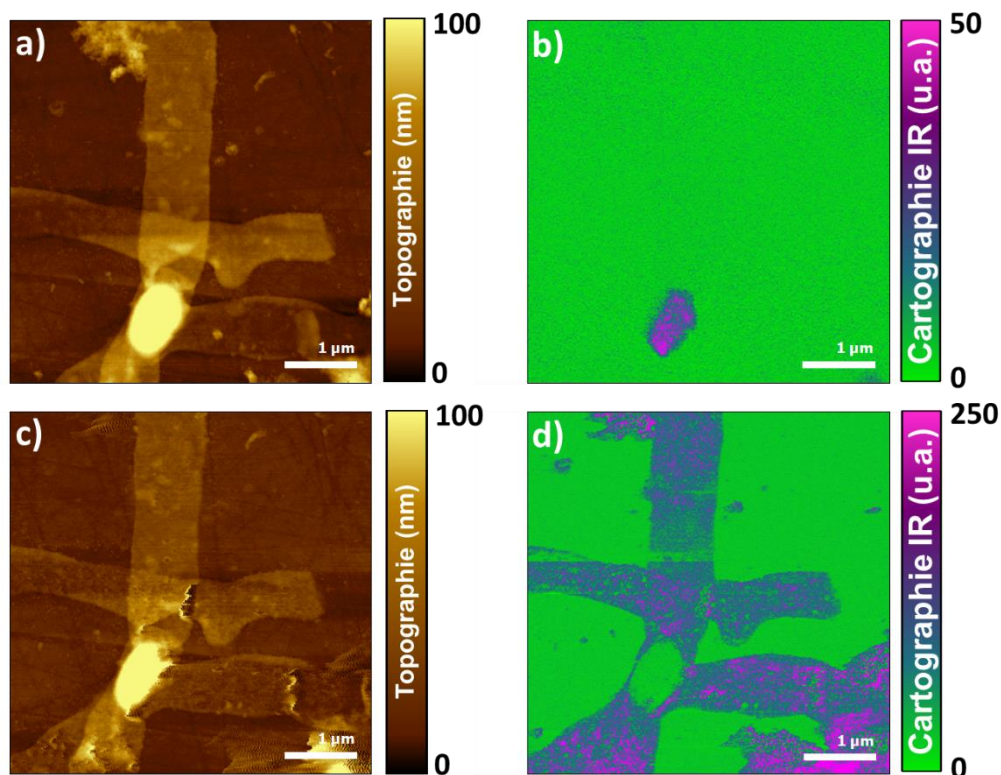


Figure III-9 : Comparaison des cartographies chimiques à 1660 cm^{-1} obtenues avec la source OPO sur un dépôt contenant majoritairement des rémanents cellulaires de *Streptomyces lividans* – a) Topographie AFM avec la pointe Si – b) Cartographie à 1660 cm^{-1} obtenue avec cette même pointe – c) Topographie AFM avec la pointe Si-Au – d) Cartographie à 1660 cm^{-1} associée.

Comme l'exaltation du champ est proportionnelle à l'énergie à un instant t , l'intensité du champ local exalté généré par l'éclairage avec la source OPO est probablement de plusieurs ordres de grandeur plus intenses que dans le cas de la source QCL et donc des températures proches de la centaine de degrés peuvent être atteintes.

En Figure III-10, une comparaison similaire a été faite avec le laser QCL sur la même zone que celle analysée avec la source OPO dans la Figure III-9. La comparaison des topographies obtenues dans cette mesure avec les topographies précédentes montre l'ensemble des dommages thermiques infligés à l'échantillon avec la mesure OPO par la pointe. Cela se traduit notamment par la disparition de l'unité cellulaire dans la seconde moitié de l'image ainsi que l'apparition de trous visibles dans les résidus (indiqués par des flèches rouges sur la Figure III-10 c)). Dans le cas de la mesure avec le laser QCL, aucun dommage thermique supplémentaire n'a été observé lorsque la pointe utilisée était la pointe Si-Au. Dans la cartographie IR à 1660 cm^{-1} obtenue avec la pointe Si (Figure III-10 b)), il est possible d'obtenir une image des résidus bactériens, mais avec un contraste extrêmement mauvais. Cela est en accord avec les précédentes mesures présentées lors de la mise en place de la résonance forcée (cf. Chapitre II, p. 43). Dans le cas de la pointe Si-Au (Figure III-10 d)), le contraste apparaît bien meilleur. Il est possible de distinguer les rémanents cellulaires et d'observer une variation linéaire du signal avec l'épaisseur au niveau de l'intersection des deux rémanents (zones entourées par un cercle en pointillée). L'utilisation de la pointe Si-Au conduit donc à une réelle augmentation du signal qui permet d'améliorer le signal en résonance forcée.

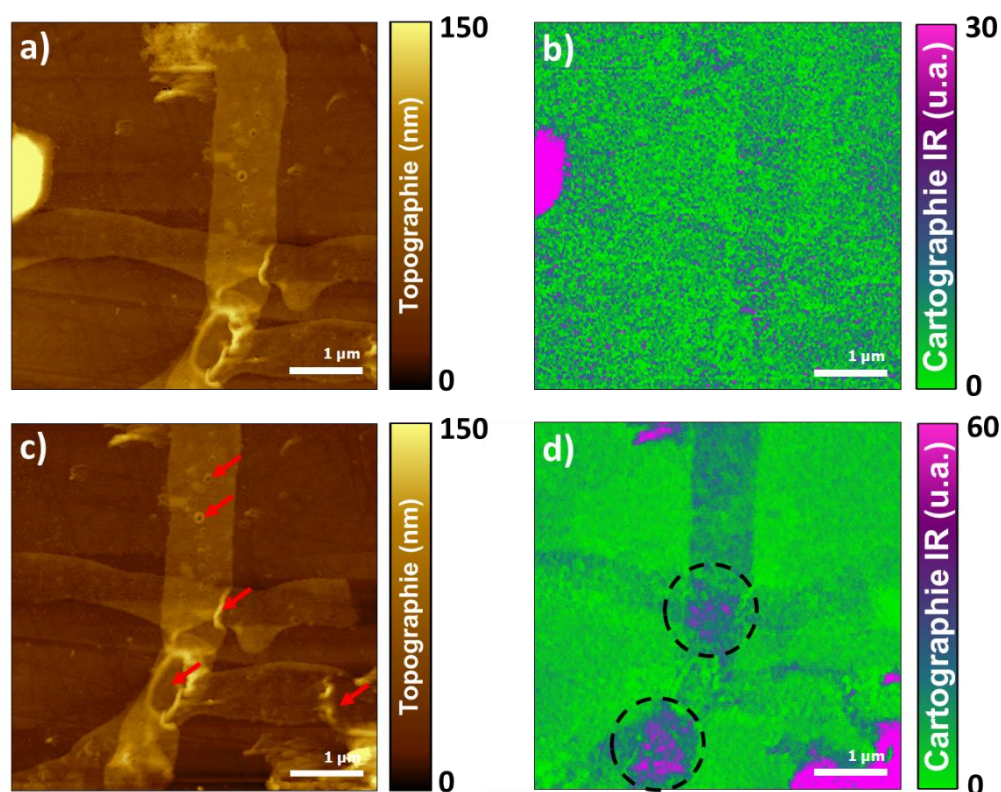


Figure III-10 : Comparaison des cartographies chimiques à 1660 cm^{-1} obtenus avec le laser QCL sur un dépôt de *Streptomyces lividans* avec une pointe Si et une pointe Si-Au : a) Topographie AFM obtenue avec la pointe Si - b) Cartographie à 1660 cm^{-1} associée - c) Topographie AFM obtenue avec la pointe Si-Au - Les principaux dommages thermiques sont indiqués par une flèche rouge- d) Cartographie à 1660 cm^{-1} associée - Les zones entourées signalent les intersections des rémanents cellulaires

Pour conclure, les comparaisons faites entre les mesures AFM-IR en réflexion totale avec les deux types de leviers ont permis de mettre en évidence plusieurs points.

Le premier est qu'il existe bien un effet de la pointe Si-Au sur le signal AFM-IR. L'interaction de la pointe avec le faisceau laser conduit à la création d'un champ local beaucoup plus intense par exaltation du champ local. Si l'échantillon absorbe le rayonnement alors l'augmentation de température de l'objet est plus élevée que pour un éclairage avec un levier Si et conduit à une plus grande dilatation thermique. Cette augmentation de l'expansion thermique permet d'obtenir du signal AFM-IR sur des objets dont l'expansion thermique était jusque-là indétectable même en résonance forcée. L'utilisation de la pointe Si-Au présente donc un avantage indéniable dans le cas de l'analyse d'objet de très faible épaisseur. Cependant, cette seconde source d'éclairage n'est pas comparable à la source incidente et des changements dans les spectres sont observables. En effet, les mesures effectuées sur le nylon ont montré que la pointe Si-Au a un effet direct sur le signal mesuré et que cet effet n'est pas dû à un effet de polarisation du rayonnement. Ce qui invalide les explications proposées dans les articles présentés précédemment. Cela implique que l'utilisation de la pointe Si-Au conduit à une perte de linéarité du signal IR observé par la mesure AFM-IR. Une des grandes forces de la mesure AFM-IR est que, jusque-là, les résultats d'expansion thermique obtenus étaient directement reliés à l'absorption IR de l'objet. Les spectres ainsi obtenus sont alors directement comparables à ceux obtenus en spectroscopie d'absorption IR. Dans le cas de la pointe Si-Au, il n'est plus possible de maintenir une telle affirmation. Cela n'invalide pas pour autant l'utilisation de la pointe Si-Au. D'autant plus que pour le moment, aucune alternative n'a été trouvée pour la configuration d'éclairage par le dessus qui est actuellement la configuration la plus utilisée par la communauté. En revanche, cela signifie qu'il faut être très prudent avec les résultats obtenus. Notamment si l'on veut comparer les spectres AFM-IR avec ceux obtenus en spectroscopie FTIR. En effet, il est fort probable que la distorsion du rapport des bandes amide I / amide II ne soit pas le seul effet généré par la pointe Si-Au. Notamment, la bande amide I peut présenter une structuration avec des sous-bandes liées à l'absorption des différentes structures secondaires. Or chaque sous-bande possède son propre coefficient d'absorption molaire. Il est impossible en l'état de conclure que, dans le cas de l'éclairage par la pointe Si-Au, les valeurs relatives de ces coefficients d'absorption molaire soient conservées et que le signal d'une structure secondaire ne soit pas amplifié par rapport à un autre. Cela rend l'interprétation des résultats obtenus plus complexe dans le cas de l'absorption des protéines isolées. Ceci n'est qu'un exemple des conséquences que peut avoir la perte de linéarité due à l'amplification du champ par la pointe Si-Au sur l'interprétation des spectres AFM-IR. Les mesures effectuées sur un dépôt de *Streptomyces Lividans* ont montré que la pointe Si-Au a aussi des effets sur les résultats obtenus en cartographie chimique. Dans ce cas aussi, il va être nécessaire de prendre en compte les divergences de signal pour comparer des cartographies chimiques centrées sur différentes bandes d'absorption ainsi que sur la mise en place d'une mesure quantitative. Il apparaît obligatoire de comprendre à l'avenir l'effet réel de la pointe Si-Au pour pouvoir interpréter les résultats AFM-IR.

Grâce au gradient d'intensité du champ évanescent, il a aussi pu être montré que l'intensité du champ exalté est bien fonction de l'intensité du champ initial. De plus, il a été mis en évidence qu'il existe une compétition entre deux types d'éclairage : celui par le champ évanescent et celui par le champ exalté par la pointe. Selon l'épaisseur de l'objet, l'un ou l'autre va prédominer. Par extension et d'après ce qui a été relevé dans la littérature, cette compétition d'éclairage entre le faisceau direct et la source secondaire générée par la pointe Si-Au doit aussi exister dans le cas de l'éclairage par le dessus. Cependant du fait de la condition d'éclairage, le champ au niveau de la pointe est toujours très intense et doit dominer sur l'éclairage par la source directe. Ce résultat est probablement le plus important de ces

expériences : l'éclairage par la pointe ne remplace pas l'éclairage direct par le faisceau IR, les deux coexistent et une compétition entre les deux sources d'éclairage se met en place. Ce dernier point soulève alors une question importante : si la majorité du signal provient du champ créé par la pointe, quelle profondeur réelle de l'échantillon est sondée ? Cette question est lourde de conséquences, car selon l'étendue du champ exalté il est possible que la majeure partie du signal observé ne vienne que d'une fraction de l'échantillon sondé. Il est aussi possible que si l'échantillon est relativement épais, l'expansion thermique de l'ensemble éclairé directement par le laser soit suffisamment importante pour entrer en compétition avec l'expansion thermique de la fraction de l'échantillon qui se trouve sous la pointe. Mais dans ce cas, il y aura une perte de la linéarité du signal en fonction de l'épaisseur. En conséquence, caractériser l'éclairage généré par la pointe apparaît un point clé pour la suite des mesures AFM-IR utilisant une pointe Si-Au. Sans cette compréhension, il n'est pas possible de comprendre quantitativement le signal AFM-IR observé. Cela peut aussi être à l'origine d'artéfacts de mesure et de mauvaises interprétations lors de la comparaison de contrastes obtenus en cartographies IR par exemple.

Dans cette partie, une étude a été menée sur la pointe Si-Au permettant de mettre en évidence ces avantages et ces inconvénients. La pointe Si-Au est nécessaire pour une mesure AFM-IR en éclairage par le dessus. Cela représente donc un important désavantage pour cette configuration d'éclairage. Cependant, s'il existe une contrainte sur les leviers utilisables qui n'existaient pas en AFM-IR en réflexion totale, l'éclairage par le dessus permet en contrepartie une plus grande flexibilité quant aux supports d'échantillon utilisables.

III. Les surfaces utilisées en AFM-IR et leur influence sur la mesure

Jusqu'à-là, les mesures AFM-IR étaient effectuées en réflexion totale. Cette configuration d'éclairage impose d'avoir un prisme d'un matériau transparent dans le moyen IR. Ce qui n'est plus le cas avec la nouvelle configuration.

1. Interaction entre la surface de ZnSe et l'échantillon

Pour la configuration d'AFM-IR classique (éclairage en réflexion totale), le support utilisé est un prisme de ZnSe. Ce matériau est connu pour ces propriétés optiques et ses applications en IR. En revanche, il n'a été jamais utilisé avant ça comme support pour des mesures AFM. S'il est possible d'obtenir des rugosités de surface compatible avec les critères de l'AFM, la chimie de surface du ZnSe rend compliquée le dépôt de certains échantillons. C'est notamment vrai quand ceux-ci ont une chimie de surface complexe et des charges de surface élevées. Un exemple peut être observé en Figure III-11 dans le cas d'un dépôt de nanoparticules polymériques d'acide polylactique. Ici, même en changeant les conditions de dépôts (séchage, solution des nanoparticules), il n'a pas été possible d'obtenir un dépôt correct. Soit les nanoparticules forment de grands agrégats (Figure III-11 a)), soit elles forment des films épais (Figure III-11 b)). Les topographies AFM obtenues montrent des structures totalement agrégées qui ne sont pas exploitables pour faire des études précises de nanoparticules isolées.

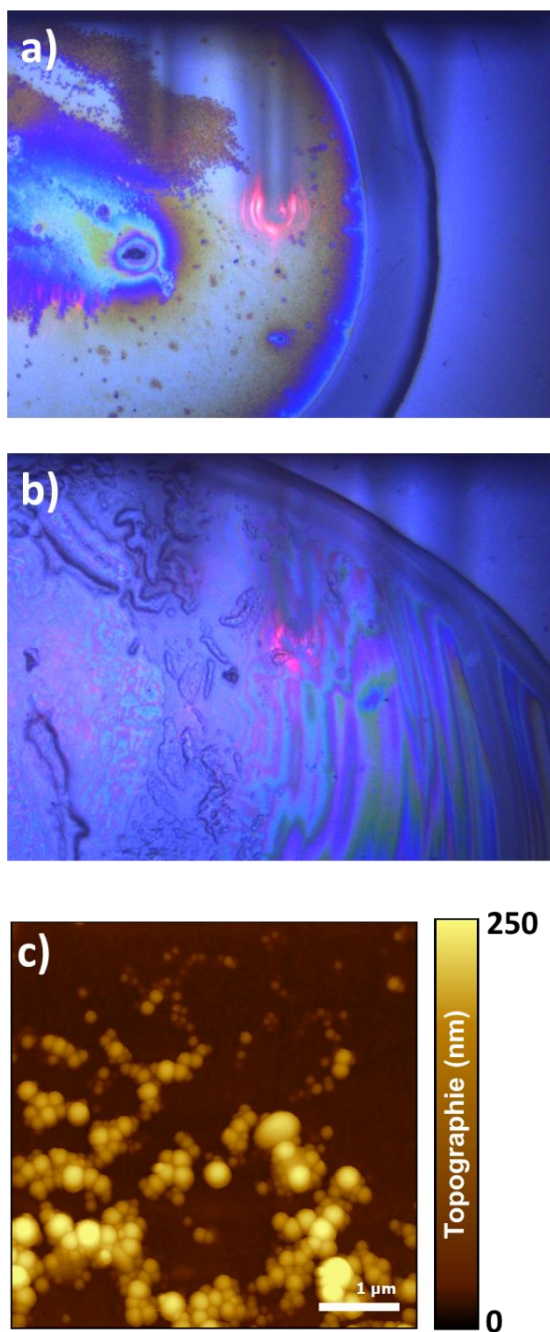


Figure III-11 : Exemple de dépôts de nanoparticules polymériques à base d'acide polylactique sur du ZnSe pour différentes conditions physico-chimiques – a), b) Images optiques de la surface (objectif x10) où il est possible de constater que les nanoparticules sont agrégées a) ou forment un film de plusieurs couches b) – c) Image de topographie AFM en mode tapping dans le cas où les nanoparticules sont agrégées

Dans le cas précis des nanoparticules, il est possible de résoudre ce problème en changeant les charges de surface du ZnSe. Pour cela, la surface a été polarisée en utilisant un plasma d'air chargé négativement. Ainsi, le dépôt obtenu est de meilleure qualité. On n'observe plus d'agrégats et il est possible de trouver des nanoparticules isolées. Cependant, cette stratégie ne fonctionne que pour certains échantillons. Elle n'a pas pu être appliquée dans le cas d'échantillons fragiles et/ou dont la dynamique est différente. Par exemple, dans le cas de fibres protéiques HfQ qui seront étudiées plus loin dans ce Chapitre, il a été observé une déstabilisation de la fibre en contact avec la surface. Celle-ci est due à l'interaction avec la surface de ZnSe, que ce soit sans ou avec une activation de la surface par plasma. De plus, le

ZnSe n'est pas une surface biocompatible. Il n'est donc pas possible de faire des cultures cellulaires directement sur cette surface. Cela limite les possibilités d'applications pour la biologie.

Une solution alternative au matériau ZnSe consiste à utiliser un autre matériau, le CaF_2 , qui est couramment utilisé en IR et qui peut être poli pour avoir des rugosités de surface compatibles avec les contraintes de l'imagerie AFM. Dans ce cas, l'échantillon n'est pas déposé directement sur le prisme, mais sur une lamelle de CaF_2 qui est ensuite déposée sur un prisme lui aussi en CaF_2 . La continuité d'indice optique entre le prisme et la lamelle est assurée par une huile de paraffine. Un schéma de principe de cette configuration est donné Figure III-12.

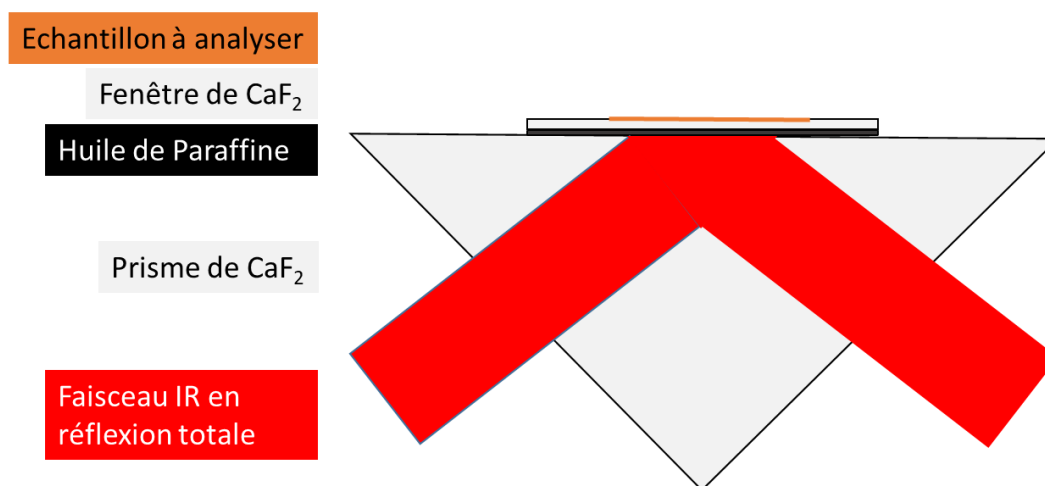


Figure III-12 : Schéma du montage d'éclairage en réflexion totale avec un prisme et une fenêtre en CaF_2

L'avantage de cette configuration est d'une part que le CaF_2 est biocompatible et d'autre part que l'utilisation de lamelle plutôt qu'un prisme rend la manipulation plus aisée pour les cultures cellulaires ou la préparation préalable du dépôt. La chimie de surface du CaF_2 étant différente de celle du ZnSe [96], cette surface peut être utilisée en deuxième intention dans le cas où il n'a pas été possible de trouver des conditions pour obtenir un dépôt avec le ZnSe.

Si l'utilisation de la surface de CaF_2 présente des avantages pour les échantillons biologiques et peut être une alternative aux échantillons incompatibles avec le ZnSe, la configuration utilisée présente aussi des désavantages. Comme l'indice optique du CaF_2 est très inférieur à celui du ZnSe (1.4 comparé à 2.4), l'angle d'éclairage pour conserver la réflexion totale n'est plus le même. Or le montage ne permet pas d'adapter cet angle. Par conséquent, l'éclairage est propagatif dans l'échantillon et dans l'air. Une partie du faisceau éclaire directement le levier AFM, ce qui peut générer un échauffement du levier et perturber la mesure. De plus, la configuration prisme CaF_2 - huile de paraffine - fenêtre CaF_2 peut être problématique pour faire le contact entre la pointe et la surface, celle-ci étant moins stable mécaniquement. Enfin, il a aussi été observé dans cette configuration l'apparition de charges électrostatiques à la surface du CaF_2 qui peuvent perturber le levier notamment par un effet répulsif qui empêche l'approche du levier sur la surface.

En conclusion, dans le cadre de la configuration classique d'AFM-IR utilisant l'éclairage en réflexion totale, l'utilisation du prisme de ZnSe peut être une réelle limitation pour l'étude de certains échantillons. C'est notamment le cas des échantillons fragiles ou présentant des

charges de surface. S'il est possible d'utiliser un autre type de surface que le ZnSe, les possibilités restent limitées car il faut que la surface soit compatible avec la mesure AFM et possède une bonne transmission dans le moyen IR. En permettant d'utiliser d'autres surfaces que le ZnSe et le CaF₂ et en ne nécessitant pas l'utilisation d'un prisme, l'éclairage par le dessus devrait permettre de dépasser cette limitation.

2. Étude du substrat or

Avec la configuration d'éclairage par le dessus, le support de l'échantillon peut être soit transparent dans l'IR soit réfléchissant. Parmi les surfaces nouvellement accessibles, une surface qui a été rapidement populaire est celle en or. Le plus souvent, elle consiste en un dépôt d'or sur une surface de verre ou de silicium. L'avantage de ce substrat est qu'il est possible d'obtenir une surface de rugosité faible. De plus, l'or possède des propriétés optiques qui peuvent être intéressantes pour la mesure AFM-IR.

a) Intérêt de la surface d'or

L'utilisation de surface de métal noble en spectroscopie IR a donné lieu au développement de la spectroscopie SEIRA déjà évoqué dans la partie précédente sur la pointe Si-Au [97].

La spectroscopie SEIRA est une technique de spectroscopie IR basée sur une amplification du signal grâce à une interaction avec une surface de métal noble comme de l'or, l'argent ou le cuivre. Celle-ci est déposée sur le substrat sous la forme de film mince [97], d'ilots [92] ou encore de film de nanoparticules [98]. L'échantillon à analyser est déposé sur cette surface de métal. Comme la spectroscopie infrarouge classique, plusieurs configurations d'illumination sont possibles : en transmission [99], en ATR [97], [100]–[102] ou en réflexion totale [92]. Deux mécanismes possibles vont permettre d'amplifier le signal observé en spectroscopie IR [103]. D'une part, la surface de métal va interagir avec le rayonnement infrarouge et conduire à une amplification du champ électrique local. D'autre part, il peut exister un mécanisme chimique lié à l'interaction directe entre la surface d'or et la molécule adsorbée qui peut conduire à une amplification de l'absorption du mode considéré. Dans les deux cas, l'utilisation d'une surface de métal noble conduit à une augmentation du signal d'absorption et permet d'étudier des monocouches moléculaires. En contrepartie dans ce type d'expérience, il a été observé que l'orientation de la molécule pouvait modifier l'allure du spectre d'absorption enregistré notamment au niveau des rapports d'intensité de bandes [104], [105].

Les propriétés optiques de l'or observées dans le cas de la spectroscopie SEIRA ont été utilisées en AFM-IR par F. Lu et al. [83] dans la mise en place du couplage or-or présenté dans la partie précédente. L'hypothèse est que le mécanisme mis en jeu ici est équivalent au mécanisme électromagnétique observé en SEIRA. Cette hypothèse est invérifiable en l'état, car dans le cas de l'éclairage par le dessus, il est nécessaire d'utiliser une pointe Si-Au. Dans ces conditions, il est impossible de découpler l'effet de la pointe de l'effet du film recouvert d'or. Pour étudier uniquement le rôle du film d'or sur le champ électrique local, il est nécessaire de mener l'étude en AFM-IR en réflexion totale. Cela nécessite le développement d'un système équivalent à ceux utilisés pour les mesures SEIRA en ATR et qui consisterait à avoir un prisme (dans notre cas soit de ZnSe soit de CaF₂) qui serait recouvert d'une couche mince d'or de l'ordre de la dizaine de nanomètres, compatible avec la génération d'une onde évanescente à

l'interface. Cependant, il n'a pas été possible dans le temps de ma thèse de réussir à obtenir un tel système.

Si l'influence du film sur le signal généré en AFM-IR n'a pas pu être étudiée ici, des expériences menées sur des protéines ont permis de révéler un autre aspect de l'utilisation de la surface d'or. Celui de l'interaction chimique entre cette surface et des échantillons biologiques. Comme il va être montré dans la partie suivante, cette interaction est importante, car elle a une influence directe sur l'interprétation des spectres d'absorption.

b) Influence de la surface sur les spectres AFM-IR à l'échelle nanométrique

Comme vu précédemment, la surface du substrat joue un rôle sur la qualité du dépôt obtenu. Ce point a été illustré avec les nanoparticules polymériques, mais il est encore plus crucial dans le cas de l'étude des protéines.

Les protéines peuvent adopter un large éventail de structures avec des propriétés très hydrophiles ou très hydrophobes. En plus de sa physico-chimie, la structure secondaire d'une protéine est versatile et sensible à l'environnement. Si l'objectif de la mesure est l'étude de cette structure secondaire via la bande amide I du spectre IR, l'interaction avec la surface doit être prise en compte. D'autant plus que dans notre cas, l'échantillon est observé après séchage, ce qui a tendance à exacerber les interactions potentielles.

L'influence de la surface sur la structure d'une protéine est un phénomène qui a déjà été étudié [106], [107]. La principale forme que prend cette interaction est l'adsorption de la protéine sur la surface. Selon les paramètres mis en jeu, cette adsorption sera réversible ou irréversible et aura des conséquences plus ou moins importantes sur la structure de la protéine en interaction. Ce phénomène est très complexe et met en jeu de nombreux paramètres. En effet, l'interaction entre la protéine et la surface est fortement dépendante de la nature même de cette surface. Il a été notamment observé des pertes partielles de la structure secondaire de la protéine dans le cas de la surface d'or [108]. De même, les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent avoir une influence importante sur le taux de désorganisation de la protéine en interaction, en particulier l'hydrophobicité [109]. Il existe aussi des paramètres très influents au niveau de la protéine. Le plus important est la structure initiale de la protéine. En effet, il est possible de distinguer assez arbitrairement des protéines dites dures, c'est-à-dire qui ont une structure secondaire très stable et difficilement modifiable, et des protéines dites molles. La différence entre les deux états va être liée au pourcentage contenu dans la structure secondaire de structure désordonnée ou de structures faiblement stable d'un point de vue thermodynamique. Si la protéine a un comportement dur, elle est beaucoup moins labile, son adsorption sur la surface sera limitée et elle conserve majoritairement sa structure secondaire native. En revanche, si la protéine a un comportement mou, elle s'adsorbe plus facilement sur la surface. De cette adsorption résulte un changement de structure secondaire [110]. En conclusion, l'interaction entre la protéine et la surface est un phénomène complexe. S'il n'est pas question ici d'étudier en détail ce processus, il est important de connaître son existence, car il peut avoir une influence sur la mesure AFM-IR. D'une part, le type d'interaction mis en jeu entre la protéine et la surface peut avoir une influence sur la qualité du dépôt obtenu, notamment sur l'état d'agrégation ou de cristallisation de l'échantillon. D'autre part, l'interaction entre la surface et la protéine peut avoir une forte influence quant à l'information chimique accessible par la mesure AFM-IR.

En effet, si un changement de configuration de la structure secondaire de la protéine a lieu, l'interaction entre la protéine et la surface conduit à des variations dans le spectre IR. Comme déjà discutée dans le Chapitre II (cf. p. 59), l'information structurale des protéines est notamment contenue dans la bande amide I (1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1}). Un changement de structure va donc conduire à un changement de la forme de la bande amide I. Sauf phénomènes d'agrégation ou de cristallisation assistée par la surface, cette modification ne concerne que les premiers nanomètres d'épaisseur du dépôt de protéines, c'est-à-dire là où il y a un contact direct avec la surface. En conséquence, dans une mesure d'AFM-IR classique où le film aura une épaisseur d'au moins 100 nm, la contribution du signal IR de la bande amide I des protéines en interaction avec la surface est faible comparée au reste du film. Le spectre obtenu sera donc similaire à celui observé avec une mesure de spectroscopie IR classique. Dans ce cas-là, l'influence de la surface peut être considérée comme négligeable. En contrepartie, s'il existe des hétérogénéités de structures au sein d'une même protéine, il sera difficile de les observer du fait que le signal obtenu en AFM-IR sera la moyenne du signal de l'ensemble des protéines situées dans les 100 nm sous la pointe.

Dans le cas d'une mesure en AFM-IR en résonance forcée, il est en revanche possible d'atteindre des sensibilités permettant d'observer une couche de protéine unique déposée sur la surface et ainsi d'accéder à des structures locales permettant de mettre en évidence des hétérogénéités. Bien sûr, la mise en évidence d'hétérogénéité est aussi limitée par la résolution latérale accessible, c'est-à-dire par le rayon de courbure de la pointe utilisée. Il est de l'ordre de 20 nm pour l'ensemble des expériences effectuées dans la thèse. Les édifices protéiques à étudier doivent donc avoir une dimension supérieure à cette valeur, comme c'est le cas des fibrilles.

Pour comprendre l'influence que peut avoir l'interaction entre la protéine et la surface sur le signal AFM-IR en résonance forcée, l'étude de la protéine PrP (anagramme de Prion Protein) déposée sur une couche d'or a été réalisée. La protéine PrP possède plusieurs formes, une forme cellulaire qui est sa forme physiologique et qui est riche en hélices alpha et une forme infectieuse, riche en feuillet bêta, qui est à l'origine de maladies neurodégénératives comme la maladie de Creutzfeldt-Jacob. Du fait de ces propriétés physico-chimiques, il semble très compliqué de réussir à caractériser la structure de cette seconde forme de la protéine [111], [112]. Cependant, cette étape est cruciale pour comprendre la dynamique et les mécanismes conduisant d'une forme à l'autre qui n'ont pas été totalement élucidés [113], [114]. Le but de l'AFM-IR est de permettre d'obtenir de l'information sur la structure locale à partir des spectres infrarouges locaux de différents objets formés par la PrP sous plusieurs conditions et ainsi apporter des informations supplémentaires pour compléter les modèles déjà formulés. L'étude de la protéine PrP menée durant ma thèse s'inscrit dans une collaboration avec l'équipe de H. Rezaei du laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires de l'INRA (Jouy-en-Josas).

La protéine PrP est constituée de deux parties : i) la partie dite C-Ter correspondant à la partie globulaire de la protéine et contenant deux feuillets bêta et trois hélices alpha (référence : PMID : 8700211, PMID : 15240887) et ii) La partie dite N-Ter désordonnée. Elle fait partie des Internal Disordered Domain (référence : PMID : 9391046). À partir du monomère de Prp, il est possible de former des fibres par agrégation. Ce processus s'accompagne d'un changement partiel de structure de la partie globulaire. Cette protéine peut donc être considérée comme une protéine molle et a de fortes probabilités d'interagir avec la surface. Ceci apparaît dans l'étude de la protéine par AFM-IR en résonance forcée. En effet, en étudiant un dépôt de fibres de PrP humaine d'une cinquantaine de nanomètres d'épaisseur sur une surface d'or, il est possible d'extraire deux familles de spectres de la bande amide I différents. Ils sont donnés en trait plein bleu et violet dans la Figure III-13. Statistiquement, le spectre dont le maximum est

à 1665 cm^{-1} est majoritaire comparé au spectre dont le maximum est à 1628 cm^{-1} . Ce dernier n'est observable que dans les zones où le dépôt est le plus épais. Pour comprendre cette hétérogénéité de spectres, qui est synonyme d'hétérogénéité de structures, les spectres AFM-IR ont été comparés avec le spectre obtenu en spectroscopie ATR-IR sur une solution de PrP ovine. Cette protéine possède une homologie de séquence de 96% avec la PrP humaine et aucune différence structurale n'a été observée entre les deux. Le spectre ATR-IR est donné en pointillé rouge sur la Figure III-13. Il est à noter que dans les spectres obtenus en AFM-IR en résonance forcée, il apparaît une bande intense centrée autour de 1740 cm^{-1} . Cette bande est inhabituelle pour des spectres de protéines pures et a été ultérieurement identifiée comme une pollution par l'acétate utilisé lors de la purification de la protéine.

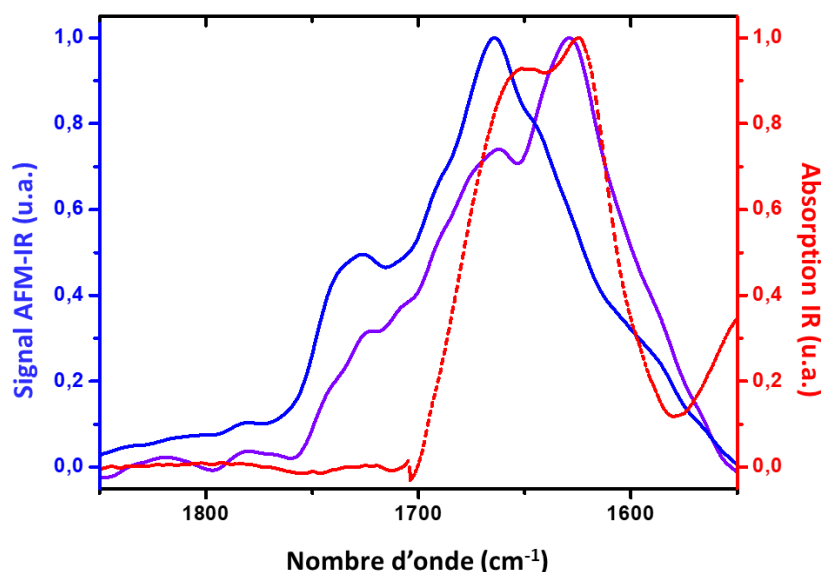


Figure III-13 : Comparaison des spectres obtenus en AFM-IR en résonance forcée sur un dépôt de fibres de PrP humaine (spectres bleu et violet en trait plein) et du spectre ATR-IR obtenu sur une solution de fibres de PrP ovine (en pointillé rouge)

La comparaison des spectres permet de montrer que dans le cas du spectre violet, la forme de la bande amide I est plus proche de la structure native de la protéine que dans le cas du spectre bleu. Ce dernier est même très différent du spectre attendu. Considérant l'épaisseur du dépôt où ont été pris les spectres, le spectre bleu qui apparaît là où le dépôt est plus fin correspondrait au spectre de la protéine totalement adsorbée sur la surface. Le spectre violet lui correspondrait majoritairement au signal d'une couche de protéine qui n'interagit pas ou peu avec la surface. Pour aller plus loin dans l'interprétation, une étude AFM-IR en résonance forcée a été menée sur la partie N-Ter de la protéine qui est la partie désordonnée. Les spectres obtenus dans ce cas-là sont homogènes sur l'ensemble du dépôt. Le spectre moyen obtenu est comparé aux spectres obtenus dans le cas de la PrP humaine pleine longueur (en pointillé vert sur la Figure III-14). En partant du principe que la séquence N-Ter est totalement désordonnée, le spectre attendu devrait être formé d'une unique gaussienne centrée autour de 1655 cm^{-1} . Or le spectre obtenu ici présente un maximum à 1665 cm^{-1} ainsi que des épaulements clairs à 1625 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} et 1694 cm^{-1} qui sont indicateurs d'une structuration de la protéine. En conclusion, le spectre obtenu ici démontre que la partie N-Ter interagit fortement avec l'or et que cette interaction conduit à générer une bande amide I caractéristique liée à une structuration spécifique. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la partie N-Ter est fortement chargée (avec un point isoélectrique de 11) et donc peut avoir une forte interaction avec la surface d'or.

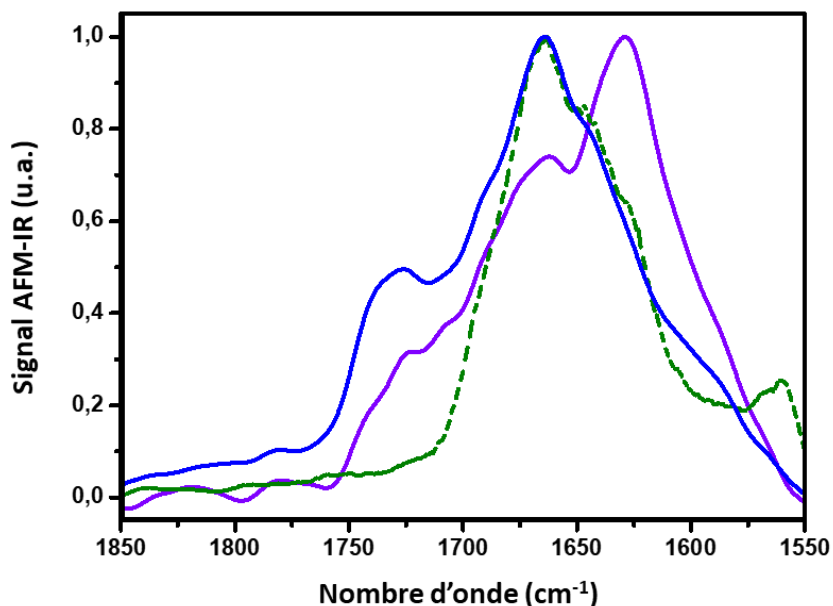


Figure III-14 : Comparaison des spectres obtenus en AFM-IR en résonance forcée sur un dépôt de fibres de PrP humaine (spectres bleu et violet en trait plein) et du spectre en AFM-IR en résonance forcée obtenu sur un dépôt de la partie N-Ter de PrP ovine (en pointillé vert)

Par la comparaison de la Figure III-14, il est possible de constater que le spectre obtenu dans le cas de la partie N-Ter de PrP ovine est fortement analogue à celui en bleu dans le cas de la PrP humaine pleine longueur. En conséquence, cela signifie que le signal de la bande amide I de ce dernier est fortement dominé par le signal généré par l'interaction or - partie N-Ter. Pour voir s'il est possible d'éliminer ce signal d'interaction, une analyse par AFM-IR en résonance forcée d'un dépôt de la partie C-Ter de la PrP humaine a été faite. Ici aussi, les spectres obtenus sont homogènes sur l'ensemble du dépôt. Le spectre moyen obtenu est donné en Figure III-15.

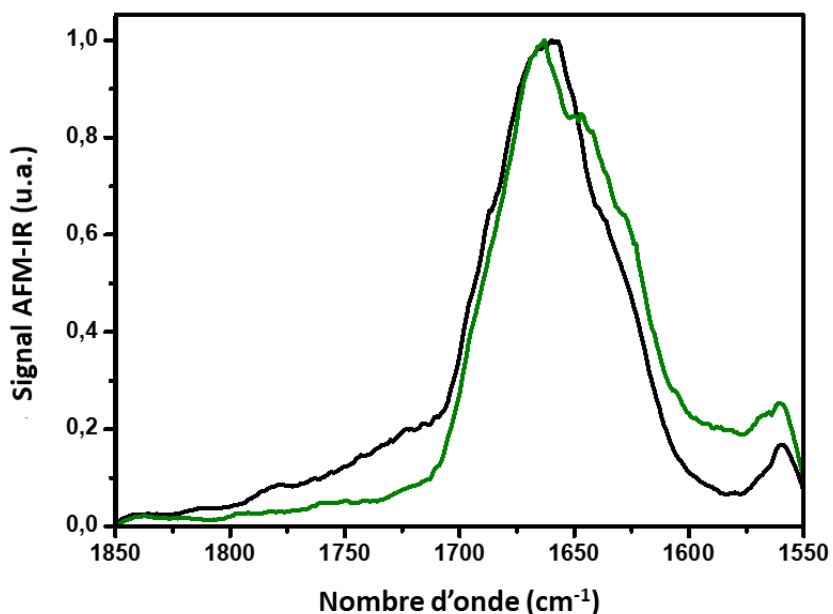


Figure III-15 : Comparaison des spectres obtenus en AFM-IR en résonance forcée sur un dépôt de la partie C-Ter de la protéine PrP ovine (spectre en noir) et sur un dépôt de la partie N-Ter de la protéine PrP ovine (spectre en vert)

La partie C-Ter comprend l'ensemble de l'information structurale de la protéine. Il est attendu théoriquement que ce spectre soit assez proche de celui obtenu en ATR-IR avec la PrP ovine pleine longueur. Or le spectre obtenu ici est proche de celui obtenu dans le cas de la partie N-Ter adsorbée sur la surface d'or. Il est donc possible de conclure ici que même la partie C-Ter peut interagir suffisamment fortement avec la surface d'or pour induire un changement de structure de la protéine. En conséquence, le spectre observé dans le cas de la PrP pleine longueur (spectre en bleu de la Figure III-14) n'est pas seulement dominé par le signal de la partie N-Ter en interaction avec la surface d'or, mais représente le signal de l'ensemble de la protéine en interaction avec la surface. Il apparaît impossible dans ces conditions de conserver la structure native de la protéine. Cependant, toute l'information structurale n'est pas perdue. En effet, la comparaison des spectres de la partie N-Ter et C-Ter présente des différences observables comme un décalage des maxima d'environ 10 cm^{-1} ainsi qu'une différence de positions des épaulements entre les deux cas. Ces différences indiquent une variation de structure. Il est donc encore possible dans ces conditions de démontrer l'existence d'hétérogénéités entre deux structures adsorbées sur la surface d'or.

En conclusion, il a été montré ici que la protéine PrP (humaine comme ovine) interagit fortement avec la surface d'or. Cette interaction induit des changements de structures de la protéine qui vont se traduire par un changement de la forme de la bande amide I par rapport à la forme native de la protéine. À cela s'ajoute l'apparition d'un signal IR fort qui est spécifique de l'interaction entre la partie N-Ter de la protéine (initialement désordonnée) et la surface d'or. La conjonction de ces deux facteurs fait que les résultats obtenus en AFM-IR en résonance forcée ne peuvent être directement comparables avec les spectres obtenus par des techniques de spectroscopie IR classique où le signal sera celui de la protéine native. Cependant, cela n'exclut pas une étude des hétérogénéités locales. Le résultat présenté en Figure III-13 s'explique surtout par la différence d'épaisseur locale du dépôt qui fait qu'une partie des protéines n'interagit localement pas ou peu avec la surface et garde sa structure native. Donc si cette situation est évitée, comme dans le cas d'une monocouche de protéine ou d'une dispersion de fibre sur la surface, l'interaction avec la surface d'or sera équivalente en tout point. En conséquence si la protéine est homogène, les spectres locaux obtenus seront homogènes en tout point comme c'est le cas avec les dépôts de partie N-Ter ou C-Ter de la PrP ovine. En revanche, si des variations locales de spectres apparaissent, elles seront bien le signe d'une hétérogénéité locale de structure.

La mise en évidence de l'existence d'hétérogénéités de structures a été observée dans le cas de l'étude de la PrP extraite du cerveau de hamster par AFM-IR en résonance forcée. Pour cette étude, le dépôt a été fait de sorte à obtenir des structures isolées. Un nombre important de spectres locaux ont pu être acquis au sein d'une même structure et entre différentes structures. À partir de l'ensemble de ces spectres obtenus, il a alors été possible de mettre en évidence la présence de trois familles de spectres en appliquant une analyse par clustering et une analyse par composante principale (aussi appelée PCA). Les spectres moyens extraits sont donnés en Figure III-16. L'ensemble des spectres obtenus localement est une combinaison linéaire de ces trois spectres. Ce résultat montre donc qu'il est possible d'étudier des hétérogénéités locales dans les protéines. Cependant, les sources d'artefact possibles mises en évidence (effet du champ local généré par la pointe Si-Au et interaction de la protéine avec la surface) ne permettent pas d'approfondir l'analyse des données obtenues notamment en proposant une déconvolution de la bande amide I.

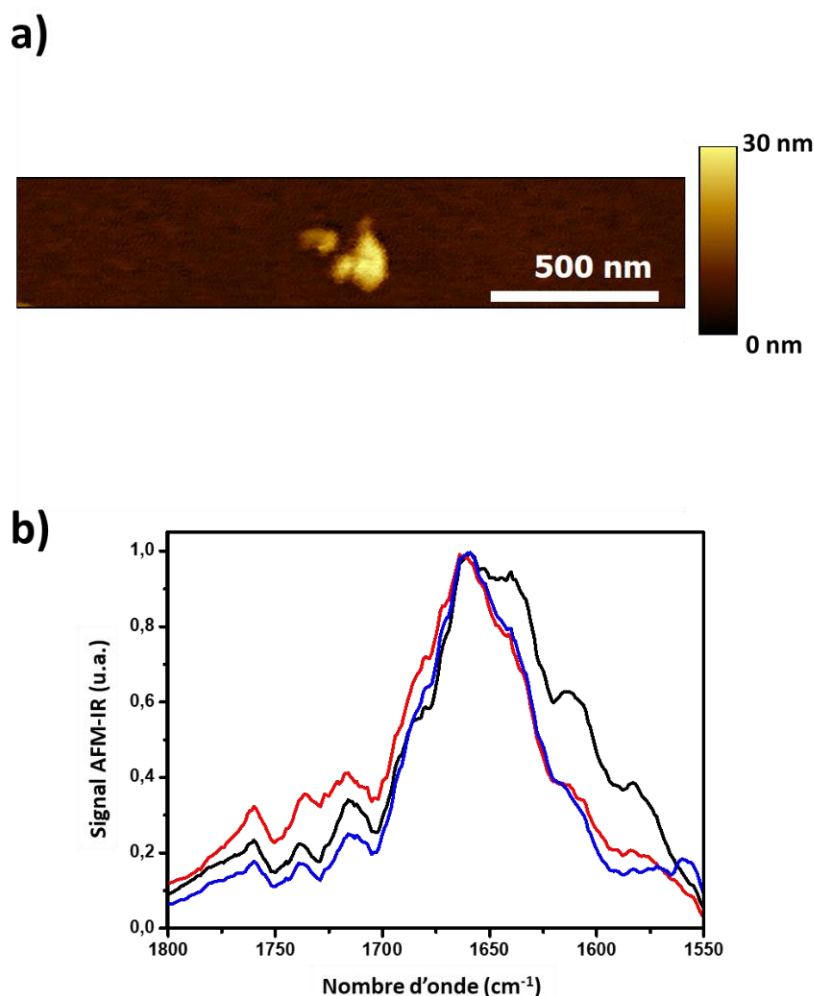


Figure III-16 : Étude de l'hétérogénéité de fibres PrP issue de l'extrait de cerveau de hamster – a) Topographie caractéristique d'une fibre isolée étudiée – b) Ensemble des spectres caractéristiques des trois familles de structures identifiées dans l'étude des fibres

En conclusion, il a pu être mis en évidence ici le rôle que peut avoir la surface sur la mesure à travers l'exemple de la protéine PrP déposée sur une surface d'or. Cette expérience ne peut pas servir de généralité, mais illustre bien l'influence de l'interaction avec la surface sur le signal AFM-IR en résonance forcée. La compréhension du phénomène nécessite des tests avec d'autres types de protéines, mais aussi avec d'autres types de surface. Cependant, il est possible de conclure de ces résultats que l'interaction entre la protéine et la surface doit être prise en compte dans l'étude de structure de protéines isolées. Ceci est d'autant plus vrai si la protéine a une structure qui est connue pour être labile et si le spectre IR local moyen diverge fortement avec les spectres IR observés en spectroscopie IR classique. Même si l'étude de l'interaction peut paraître fastidieuse, ne pas prendre en compte ce facteur peut conduire à des erreurs d'interprétation.

c) *Autres substrats non absorbants*

L'exemple de l'utilisation de la surface d'or qui vient d'être présenté montre qu'avec la configuration d'éclairage par le dessus il n'est plus nécessaire que le substrat sur lequel repose l'échantillon soit nécessairement transparent à l'IR. La surface utilisée peut aussi être

réfléchissante comme la surface d'or. Une autre possibilité est celle où la surface choisie n'a pas d'absorption IR dans la gamme spectrale étudiée. Cela peut par exemple être le cas de surfaces métalliques ou en inox. Un test effectué durant ma thèse a permis par exemple d'imager des résidus d'analogues de glaces interstellaires irradiés par des ions lourds qui étaient sur une lame d'inox (Figure III-17).

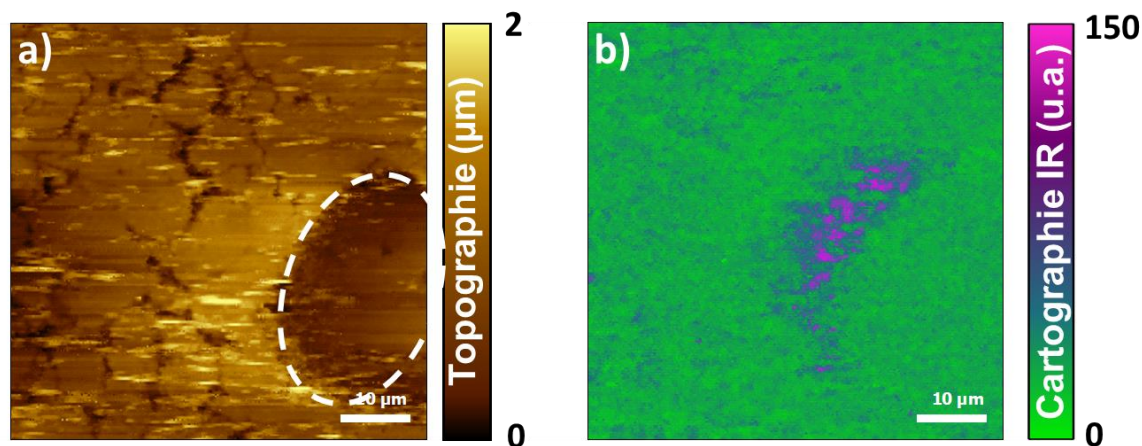


Figure III-17 : Mesure effectuée sur des résidus d'analogues de glaces interstellaires déposés sur une lame d'inox et irradiés par des ions lourds – a) Topographie AFM, au niveau du trou en bas à droite apparaît la surface d'inox (entouré par des tirets blancs) – b) Cartographie chimique à 1760 cm^{-1} , la surface d'inox n'interfère pas avec la mesure AFM-IR

Du fait de l'absence d'absorption IR de ce matériau, ces substrats sont théoriquement utilisables en AFM-IR à partir du moment où ils n'interfèrent pas avec le faisceau IR et ne présentent pas de difficultés majeures pour l'acquisition de la topographie AFM. Ce qui est confirmé par les expériences menées ici sur l'inox. Cela montre que du moment que le substrat n'interagit pas avec le faisceau IR dans la gamme spectrale d'étude et donc ne chauffe pas, il est possible de l'utiliser comme surface d'étude en AFM-IR avec un éclairage par le dessus.

La possibilité de varier les surfaces accessibles est un grand avantage en termes de préparation d'échantillons. Cela représente donc un des principaux avantages de cette configuration d'éclairage. Les diminutions de contraintes sur la nature et la géométrie des supports de mesure utilisés ouvrent aussi la possibilité d'utiliser des supports compatibles avec d'autres techniques d'analyse et sont à l'origine du développement de plusieurs projets de mesures corrélatives.

IV. Mesures corrélatives

La nouvelle configuration d'éclairage permet la mise en place de mesures corrélatives avec l'AFM-IR. En effet, pour mettre en place ce type de mesure, il est nécessaire que le support sur lequel repose l'échantillon soit compatible pour les autres techniques d'analyse. Dans cette partie, deux projets de mesures corrélatives sont présentés. Le premier projet est une étude corrélative entre l'AFM-IR et la microscopie optique non linéaire pour la caractérisation et la compréhension de la dénaturation du collagène de type I. Le second propose d'étudier une protéine fibrillaire bactérienne (exprimée par *E. Coli*) appelée HfQ par l'AFM-IR et la microscopie électronique en transmission (TEM).

1. Mesures corrélatives AFM-IR / microscopie optique non linéaire - Étude de la dénaturation du collagène de type I

Le premier projet développé au sein de l'équipe est la mise en place de mesure corrélative entre l'AFM-IR et la microscopie optique non linéaire pour l'étude du collagène de type I. Ce projet a été initié avant le début de ma thèse et a déjà donné lieu à une première publication sur la caractérisation de marqueurs de la dénaturation du collagène de type I dans les parchemins par G. Latour et al. [47]. Ce projet a été poursuivi au cours de ma thèse dans le but de comprendre l'origine de l'un des marqueurs observés.

La microscopie non linéaire (notée par la suite microscopie NLO) est utilisée pour faire de l'imagerie de fluorescence sous excitation à deux photons (2PEF) et de la génération de seconde harmonique (SHG). La gamme spectrale de la source d'excitation est comprise entre 700 et 1000 nm et la détection de la fluorescence et de la SHG se fait dans le visible. Il est donc difficile d'utiliser le prisme de ZnSe, car celui-ci est trop épais pour faire des mesures en transmission et le matériau n'est pas suffisamment transparent dans le visible. Pour ces deux raisons, l'échantillon a été déposé sur une lamelle de CaF₂, matériau compatible d'un point de vue optique pour les deux mesures. La lamelle a été choisie avec une épaisseur de 0,2 mm (épaisseur compatible avec la distance de travail des objectifs du microscope NLO).

Dans l'étude précédente de la dénaturation du collagène dans les parchemins publiée par G. Latour et al., la mesure AFM-IR a été effectuée avec l'AFM-IR classique (Figure III-12). Pendant ma thèse, la configuration en éclairage par le dessus a été choisie.

a) Dénaturation du collagène de type I dans les parchemins

Le parchemin est fabriqué à partir de derme. Il contient majoritairement du collagène fibrillaire de type I. La conservation des parchemins est un enjeu majeur et comprendre les processus physico-chimiques impliqués dans la dénaturation du collagène de type I permettrait de mettre en place des protocoles précis permettant une meilleure protection des objets. L'ensemble des dommages observés sont appelés altérations et correspondent à une gélatinisation du collagène, qui perd sa structure. Elle peut être obtenue sous l'effet de diverses conditions physiques comme l'exposition à la chaleur, aux radiations UV ou encore à des variations de pH. Ce processus de gélatinisation semble donc mettre en cause un ensemble de différentes réactions physico-chimique qui conduit à une dénaturation irréversible. Dans le cadre de la conservation des parchemins, il est nécessaire de comprendre les étapes conduisant à la gélatinisation et trouver un marqueur d'une étape précédant le processus. Ce qui nécessite de trouver une méthode non destructive permettant d'analyser facilement les objets.

Le collagène est le composant majoritaire des parchemins. Il existe plusieurs formes de collagène. Dans la suite de notre étude, je me suis focalisé sur le collagène de type I. La structure du collagène de type I est donnée Figure III-18. Il est formé de trois chaînes alpha surenroulées en triple hélice : le tropocollagène qui peut être considéré comme l'unité de base du collagène. Les niveaux supérieurs d'organisation du collagène vont être : la fibrille qui est formée par l'enroulement de plusieurs unités tropocollagènes et la fibre qui est un surenroulement de plusieurs fibrilles. Le collagène de type I est donc une molécule fortement structurée et compactée. En changeant les paramètres physico-chimiques (pH, force ionique, température), il est possible de les dénaturer en modifiant leur structure de manière

irréversible. La gélatine correspond au stade de dénaturation irréversible le plus poussé dans lequel les chaînes alpha se réorganisent pour former un réseau [115].

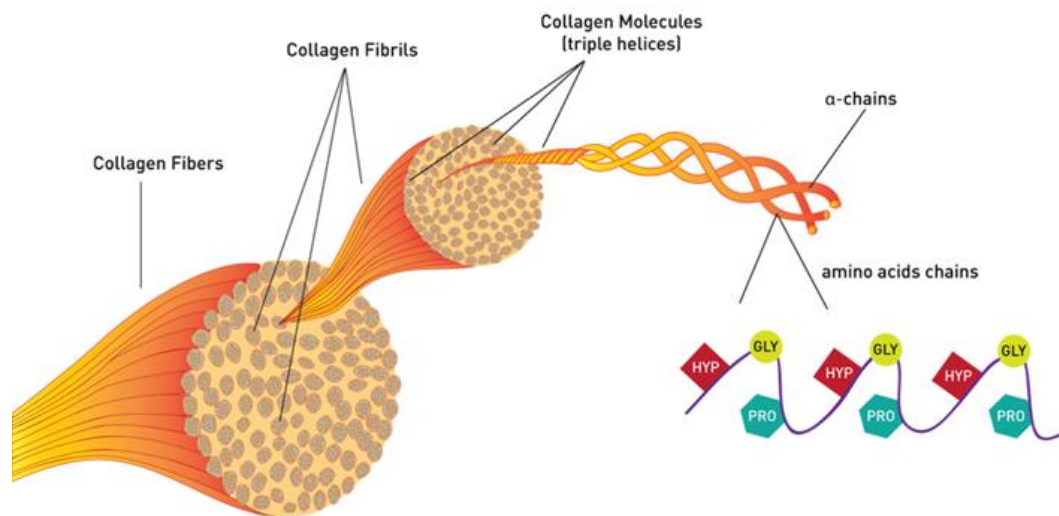


Figure III-18 : Schéma de la structure du collagène (image extraite de www.proto-col.com)

La caractérisation du collagène fibrillaire de type I par AFM-IR en résonance forcée est montrée (Figure III-19). Il est possible d'observer sur la topographie en mode contact la striation à 69 nm qui est caractéristique du collagène de type I [116], [117]. Cette striation est aussi observable sur la cartographie chimique à 1660 cm^{-1} (Figure III-19 b)). La corrélation entre les deux striations peut être mise en évidence en superposant la topographie AFM en 3D avec la cartographie chimique obtenue (Figure III-19 c)). Cette mesure illustre les résolutions latérales de l'appareil, mais aussi la sensibilité obtenue grâce à l'utilisation du mode en résonance forcée.

La forme de la bande amide I du spectre AFM-IR (Figure III-19 d)) est elle aussi caractéristique du collagène fibrillaire de type I avec un maximum d'absorption centré à 1660 cm^{-1} et deux épaulements autour de 1630 cm^{-1} et autour de 1690 cm^{-1} qui sont directement reliés aux surenroulements de la fibre de collagène [118], [119]. L'étude des spectres locaux est donc riche en information sur la structure locale du collagène notamment pour des fibrilles de l'ordre de la dizaine de nanomètres d'épaisseur.

Pour l'étude de la macro-organisation du collagène, la microscopie NLO est une technique de référence [120]–[122]. La molécule de collagène est non-centrosymétrique ce qui va permettre de générer un signal SHG. Ce signal va être amplifié par l'organisation des unités de tropocollagène en fibrilles et des fibrilles en fibres. La perte de structure de la fibre se traduit alors par une diminution du signal SHG et une augmentation du signal 2PEF. Ce dernier provient de la chaîne alpha directement et qui va apparaître lors de la désorganisation de la fibre de collagène. La comparaison des signaux SHG et 2PEF peut donc être utilisée pour étudier la dénaturation du collagène in situ car elle ne nécessite aucun marquage. C'est donc un très bon outil pour l'étude de l'altération des parchemins. La microscopie NLO a d'ailleurs été utilisée avec succès sur d'autres matériaux anciens [123]–[127].

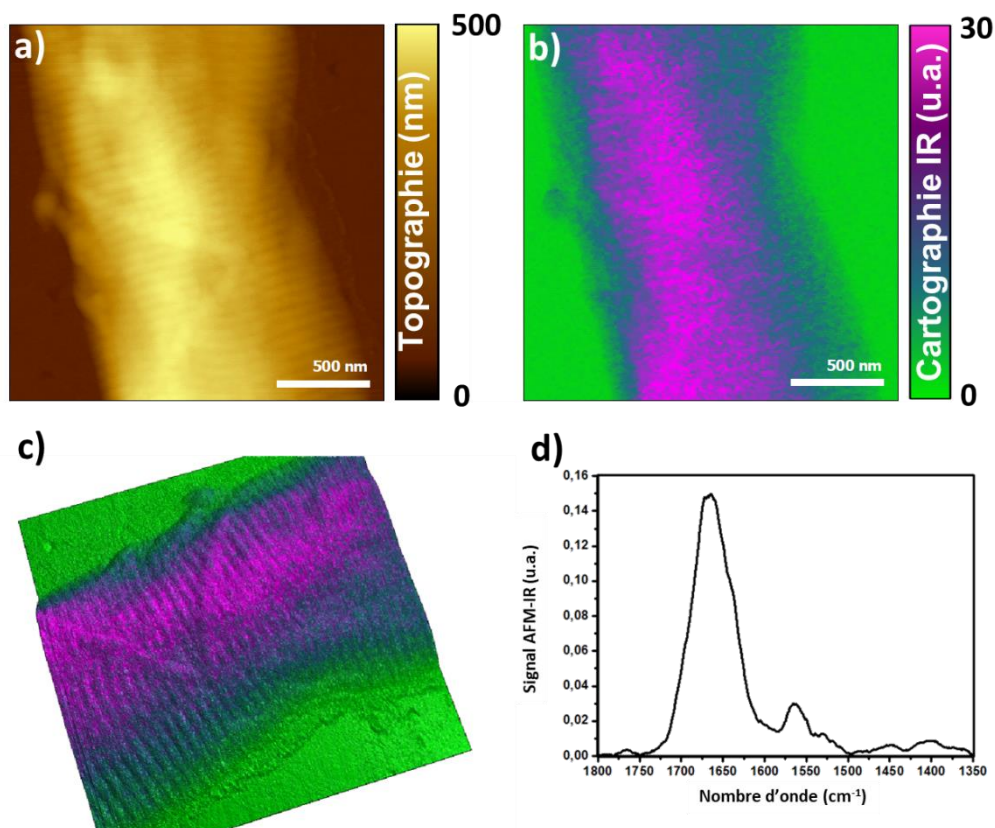


Figure III-19 : Caractérisation du collagène type I par AFM-IR – a) Image de topographie AFM d'une fibre de collagène, sur l'image il est possible de voir la striation à 69 nm typique de la fibre – b) Cartographie chimique obtenue en AFM-IR à 1660 cm^{-1} – c) Superposition de la topographie AFM (en relief 3D) avec la cartographie chimique – d) Spectre AFM-IR typique d'une fibre de collagène de type I

Cependant, cette technique présente deux désavantages. D'une part, la résolution de la technique est de l'ordre du micromètre et ne permet pas d'étudier une fibrille de collagène. D'autre part, les informations obtenues ici sont seulement structurales et ne font pas apparaître les possibles modifications chimiques. Ce sont cette limite de résolution et ce manque d'information chimique qui ont conduit au développement du couplage entre l'AFM-IR et la microscopie NLO. En effet, la spectroscopie d'absorption IR est un bon outil pour caractériser la structure des protéines et a déjà été appliquée à la caractérisation du collagène de type I [118], [119], [128]. L'identification de nouvelles bandes peut aussi mettre en évidence la modification de groupements chimiques. La combinaison des deux techniques va alors permettre de relier les observations faites sur la macro-organisation des fibres en SHG et 2PEF avec la caractérisation chimique.

Les travaux réalisés par G. Latour et al. [47] sur les parchemins ont permis de mettre en avant deux résultats :

1. La mise en place et l'optimisation de la mesure corrélative effectuée sur des prélèvements de parchemins préservés (Figure III-20 A-F) ou altérés (Figure III-20 G-L). Pour les morceaux de parchemins préservés, un fort signal SHG est détecté (en vert sur la Figure III-20 B) indiquant que le collagène de type I est formé de fibres. Ce résultat est confirmé par les mesures AFM-IR qui montrent que le spectre obtenu est homogène en tout point et est caractéristique de la protéine.
2. En revanche pour le parchemin altéré, on observe simultanément la diminution du signal SHG (en vert sur la Figure III-20 H) et l'augmentation du signal 2PEF (en rouge sur la Figure III-20 H) qui correspondent à la perte de structure du collagène.

Celle-ci corrèle avec l'apparition d'une bande IR de 1720 cm^{-1} – 1760 cm^{-1} . Cette bande pourrait donc être liée à la dénaturation du collagène et à l'altération du parchemin.

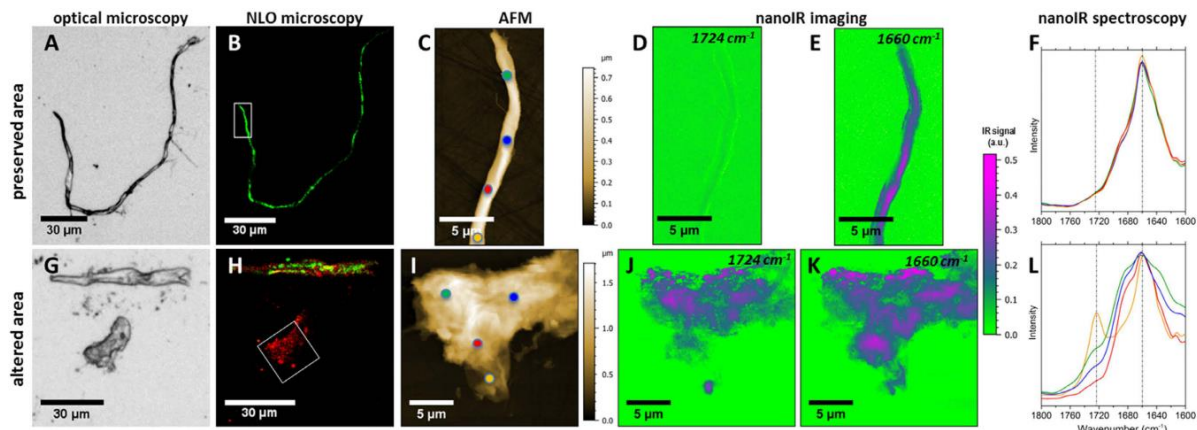


Figure III-20 : Comparaison des résultats obtenus sur un échantillon de parchemin préservé (A-F) et un échantillon de parchemin altéré (G-L) : (A,G) Image de microscopie optique, (B,H) image composite de microscopie non linéaire : le signal SHG est en vert et le signal 2PEF est en rouge ; (C,I) topographies AFM de zones locales des échantillons préalablement caractérisées en microscopie non linéaire, les zones caractérisées sont indiquées par un carré sur les images B et H ; cartographies chimiques obtenues en AFM-IR à 1724 cm^{-1} (D,J) et 1660 cm^{-1} (E,K) ; (F,L) spectres AFM-IR locaux obtenus respectivement sur l'échantillon préservé et sur l'échantillon altéré, les localisations des spectres sont indiquées par des points de couleurs sur les topographies AFM.

Ce résultat est confirmé par les expériences (Figure III-21) réalisées sur du collagène modèle dans son état fibrillaire natif (Figure III-21 A-C) ou ayant été dénaturé (Figure III-21 D-F, gélatinisation du collagène). Dans ce second cas, la perte de signal SHG sur l'ensemble de l'échantillon, indiquant la dénaturation de la fibre, corrèle directement avec la présence de la bande IR de 1720 cm^{-1} – 1760 cm^{-1} sur l'ensemble de l'échantillon. Cette bande IR est donc un marqueur spécifique de la dénaturation du collagène dans le parchemin. Elle a pu être observée pour la première fois grâce à la mesure corrélative entre AFM-IR et microscopie optique non linéaire et peut être un indicateur d'une modification chimique spécifique à l'altération du collagène.

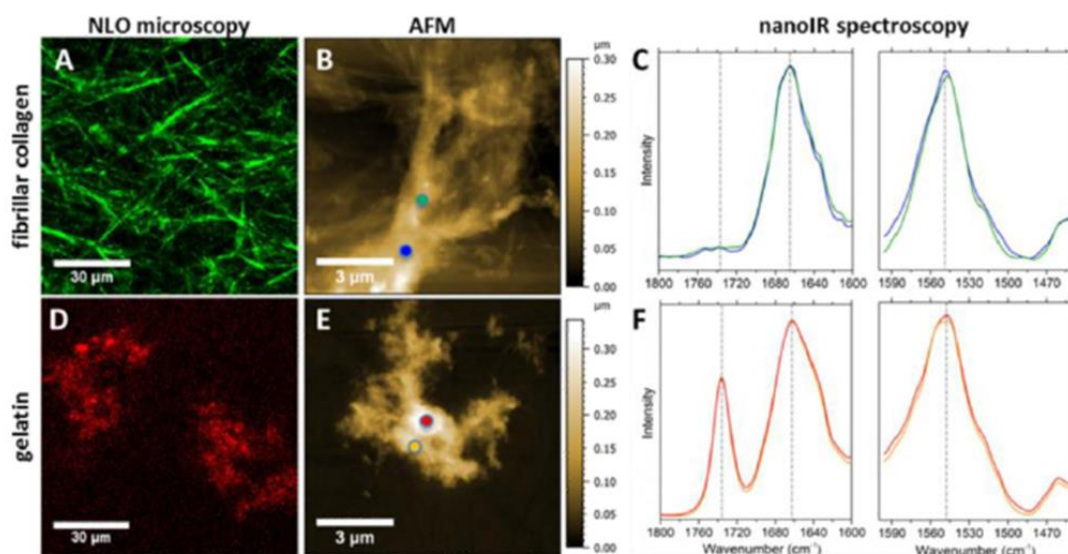


Figure III-21 : Comparaison des résultats obtenus sur des fibres de collagène intactes (A - C) et du collagène dénaturé (gélatine) (D - F) image composite signal de fluorescence en rouge, SHG en vert (A) de fibre de collagène et (D) de gélatine et microscopie AFM (B, E) – (C, F) spectres infrarouges obtenus sur les différents points – figure adaptée de [47]

La suite du projet, mené durant ma thèse, a consisté à mettre en œuvre un protocole et des expériences permettant de mieux caractériser et comprendre ce marqueur de la dégradation du collagène.

b) Dénaturation thermique du collagène de type I

Les résultats obtenus précédemment ont mis en évidence l'apparition d'une bande d'absorption IR autour de 1720 cm^{-1} - 1760 cm^{-1} qui serait caractéristique du processus de gélatinisation du collagène. Cette bande a déjà été observée dans d'autres études sur l'altération des parchemins et une première hypothèse sur l'apparition de cette bande a été formulée comme étant la résultante de l'apparition de groupements -COOH (et NH_3^+) libres lors du processus de gélatinisation [47]. La signature observée serait alors la signature d'absorption IR du C=O du groupement -COOH . Cette hypothèse est intéressante, car l'apparition de groupements libres -COOH est commune aux trois processus identifiés de dénaturation du collagène dans le parchemin [129] (l'hydrolyse, l'acidification et l'oxydation). Cette hypothèse permet aussi d'expliquer la variation de position de la bande observée selon l'origine du collagène (1738 cm^{-1} dans le cas de la gélatine modèle, 1728 cm^{-1} dans le cas du parchemin altéré) par le changement d'environnement dans lequel se trouve le groupement -COOH (types de liaisons hydrogène différentes) [130].

Nous allons donc caractériser plus précisément les conditions de formation de ce marqueur IR de la dégradation du collagène à l'échelle de la fibrille de collagène pour essayer d'avoir des indices supplémentaires sur les mécanismes mis en jeu.

La première partie de l'étude est une étude préliminaire par spectroscopie FTIR dans le but de caractériser les conditions d'apparition de la bande 1720 cm^{-1} - 1760 cm^{-1} pour différentes conditions physico-chimiques. Pour ce faire, le montage expérimental utilisé est le suivant : un dépôt de collagène type I est disposé sur une fenêtre de ZnSe, il est mis dans une enceinte isolée avec un bécher contenant soit de l'eau pure, soit de l'éthanol, soit de l'acide acétique à différentes concentrations. L'ensemble est chauffé grâce à une plaque chauffante (Figure III-22). La température est contrôlée via un thermocouple apposé à la fenêtre de ZnSe. Le chauffage permet aussi de générer des vapeurs de différentes molécules via la solution dans le bécher qui vont interagir avec le dépôt de collagène.

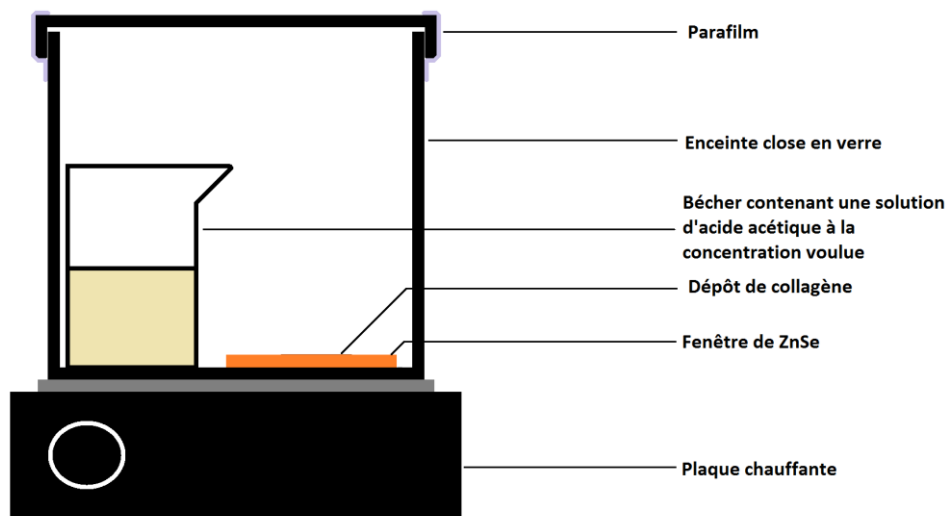


Figure III-22 : Schéma de principe du montage utilisé pour la dénaturation du collagène type I en fonction de différentes conditions

Pour cette étude, plusieurs paramètres physico-chimiques ont été pris en compte : la nature de la solution dans le bécher, la température à la surface du ZnSe et le temps de chauffage. L'ensemble des paramètres testés est récapitulé dans le Tableau 2. Les conditions ont été choisies, car elles sont connues comme pouvant induire l'altération du collagène des parchemins.

Solutions	(Temps de chauffage, Température)			
	50°C, 30 min	75°C, 30 min	75°C, 60 min	100°C, 30min
Eau	50°C, 30 min	75°C, 30 min	75°C, 60 min	100°C, 30min
Ethanol	75°C, 30 min	75°C, 60 min		
Acide acétique 10%	75°C, 30 min	75°C, 60 min		
Acide acétique 30%	75°C, 30 min	75°C, 60 min		
Acide acétique 100%	75°C, 30 min	75°C, 60 min		

Tableau 2 : Récapitulatif des conditions expérimentales de la dénaturation du collagène

Le résultat le plus intéressant qui ressort de cette étude est la comparaison de l'effet des différentes vapeurs sur le dépôt. La Figure III-23 représente les résultats sur une partie du spectre permettant de mieux observer les variations de la bande amide I (de 1600 cm^{-1} à 1800 cm^{-1}). Les résultats ont été obtenus dans les mêmes conditions de chauffage ($T=75^\circ\text{C}$, durée du chauffage 60 min), mais en variant les solutions dans le bécher (et donc les vapeurs produites) : soit de l'eau (spectre en bleu), soit de l'éthanol (spectre en rouge), soit de l'acide acétique (spectre en vert). Ces spectres sont comparés avec celui du collagène fibrillaire de type I natif (spectre en pointillé noir).

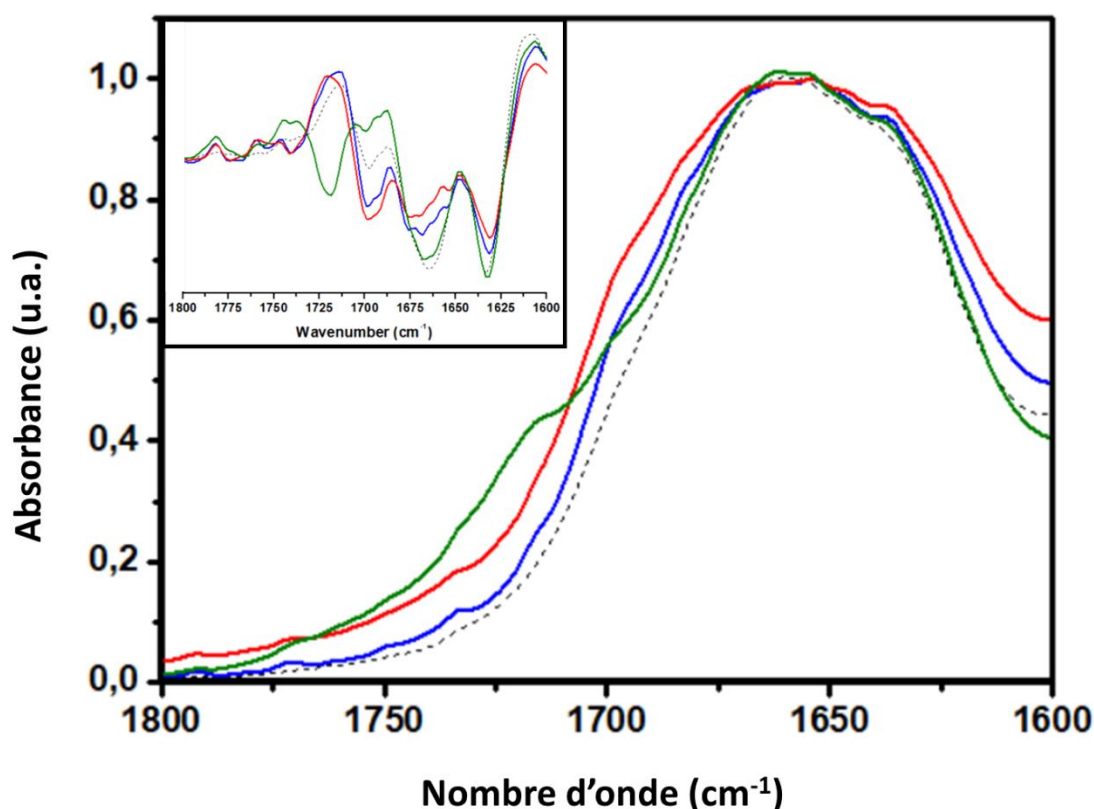


Figure III-23 : Zoom sur la zone 1600 cm^{-1} – 1800 cm^{-1} des spectres obtenus en spectroscopie FTIR pour les dépôts de collagène type I chauffé à 75°C pendant 60 min en présence de vapeur d'eau (spectre bleu), d'éthanol (spectre rouge) ou d'acide acétique à 30% (spectre vert) et comparé au spectre obtenu sur du collagène de type I natif (spectre en pointillé noir) – L'encart représente la dérivée seconde de ces spectres

Aucun des spectres obtenus dans les différentes conditions ne possède de structures similaires. Cela se retrouve dans l'analyse des dérivées secondes des spectres (encart en haut à gauche de la Figure III-23). Dans le cas de l'eau et de l'éthanol, une seule bande supplémentaire apparaît. Elle est centrée autour de 1700 cm^{-1} . De plus la structure de la bande amide I est différente de celle observée dans le cas du collagène fibrillaire de type I natif : il y a élargissement de la bande et un décalage des pics à 1635 cm^{-1} vers les bas nombres d'ondes et à 1660 cm^{-1} vers les hauts nombres d'ondes, ce qui traduit un changement global de la structure secondaire du collagène. Dans le cas de l'acide acétique, la forme de la bande amide I est conservée par rapport au collagène natif, il n'y a donc pas de changement global de structure du collagène. En revanche dans ce cas, deux bandes similaires apparaissent : une centrée autour de 1700 cm^{-1} , mais moins intense que dans le cas de l'eau et de l'éthanol, et une bande centrée autour de 1725 cm^{-1} .

L'étude de ces résultats met donc en évidence qu'en fonction de la molécule utilisée, les conséquences sur la nature de la dénaturation ne sont pas les mêmes : la position de la bande marqueur est très variable et son apparition peut être indépendante d'une modification de la structure secondaire. Cela signifie donc qu'il n'existe pas un unique mécanisme de dénaturation du collagène mettant en jeu simplement l'apparition d'une bande $-\text{COOH}$, comme supposé précédemment, mais plusieurs mécanismes possibles selon les conditions dans lesquelles a lieu la dénaturation ou alors un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs étapes.

Ces résultats sont préliminaires et nécessitent une étude plus approfondie avec le développement d'un système plus perfectionné pour la dénaturation du collagène où il serait possible de contrôler finement le pourcentage d'humidité dans la chambre et la quantité de vapeur introduite. Pour comprendre les effets de chaque paramètre et les mécanismes conduisant à la dénaturation du collagène de type I, chaque paramètre nécessite donc une étude complète séparée. Cependant, la quantité d'informations obtenue ici est limitée par le type d'expérience, car elle ne permet pas de connaître la quantité de collagène qui a été altérée. En effet, il n'est pas possible par ce type d'expérience de savoir si tout le collagène a été altéré et conserve globalement sa structure secondaire de la bande amide I ou si l'altération n'est que partielle. De même, dans le cas de la dénaturation en présence d'eau et d'éthanol, il est nécessaire de comprendre si le changement de structure de la bande amide I est concomitant de l'apparition de l'épaule à 1700 cm^{-1} ou représente une autre étape du mécanisme de dénaturation du collagène. Une étude locale permettrait de dépasser ce problème en analysant précisément les zones de changements du collagène. Par l'étude des bandes IR, il devrait être possible d'observer s'il existe des changements de structure de la fibrille de collagène en plus de l'apparition d'une bande supplémentaire entre 1700 cm^{-1} et 1760 cm^{-1} .

Pour l'étude des fibrilles par AFM-IR, un protocole de chauffage local du collagène par la pointe AFM a été mis en place. Il permet de chauffer des zones précises du dépôt. Le fait de localiser les dommages thermiques permet ensuite de reproduire des mesures corrélatives AFM-IR/microscopie optique non linéaire et comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus sur les parchemins.

Le montage qui va être présenté s'inspire de celui utilisé par L. Bozec et al. pour l'étude des propriétés thermiques du collagène [131]. À la différence du montage proposé dans cet article qui utilise un fil de Wollaston à base de platine et d'argent [132], le montage proposé ici est un levier AFM NanoTA intégrant une thermorésistance qui permet de chauffer le bout de la pointe jusqu'à 300°C (EX-AN2-300, *App Nano*, Anasys Instrument). Généralement, ces pointes sont utilisées dans l'étude des propriétés thermiques des polymères [133]-[135]. Dans

le cas de la dénaturation du collagène, c'est la capacité de fixer la température de la pointe à la valeur voulue qui a été exploitée. Cela permet ainsi de dénaturer thermiquement le collagène sur une zone définie grâce à l'image de topographie AFM. Il est possible d'appliquer la dénaturation thermique sur une zone de plusieurs dizaines de micromètres ou de la taille proche du rayon de courbure de la pointe. Ce système de pointe est directement utilisable sur nos systèmes AFM-IR (NanoIR1 et NanoIR2s). Le fait d'utiliser la même tête AFM pour l'expérience de chauffage et pour l'analyse IR permet d'effectuer la caractérisation de l'échantillon par AFM-IR avant et après dénaturation thermique de la pointe de NanoTA sans problème de repositionnement. Le protocole est représenté ici en Figure III-24. Dans cet exemple, il est appliqué à une fibrille de collagène.

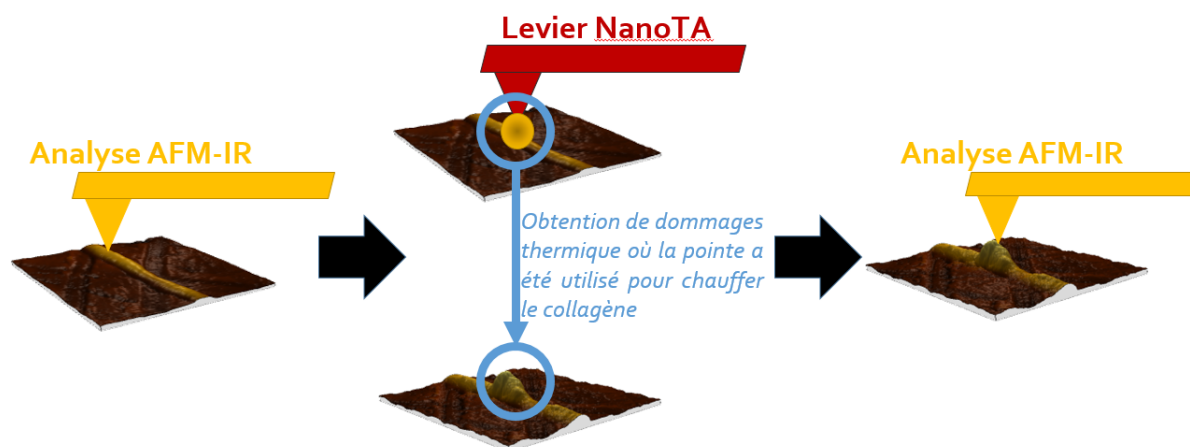


Figure III-24: Schéma de principe du protocole de dénaturation d'une fibrille de collagène type I avec une pointe NanoTA

La dénaturation thermique a d'abord été faite sur une large zone contenant un ensemble de fibres d'environ $2\ \mu\text{m}$ d'épais et chauffée autour de 350°C . Sur l'image optique de la Figure III-25 a), une zone a été fortement chauffée et apparaît sous la forme d'un sablier. La zone formée ici est d'environ $50\ \mu\text{m}$ de large pour $100\ \mu\text{m}$ de longueur. Autour de cette zone de collagène détruit, un gradient de température a été généré au sein du film de collagène. Pour mettre en évidence la zone dénaturée, une partie de la région (entourée en vert sur l'image optique) a été analysée par AFM-IR. Une ligne de spectres avec un pas de $1\ \mu\text{m}$ a été réalisée à partir de la zone où le collagène a été le plus chauffé (spectres en pourpres à noir) jusqu'à la zone où elle n'a pas été dénaturée (spectres en violet et bleu) (Figure III-25 b) et c)). Les spectres obtenus montrent d'abord l'apparition d'une première bande d'absorption à $1710\ \text{cm}^{-1}$ puis d'une bande supplémentaire à $1730\ \text{cm}^{-1}$. Ces bandes apparaissent progressivement et sont plus intenses à mesure qu'on s'approche de la zone chauffée. L'apparition des deux bandes montre que dans le cas d'une dénaturation thermique avec un chauffage intense, il est possible d'obtenir la bande à $1730\ \text{cm}^{-1}$ comme dans le cas observé sur les mesures FTIR lors de la dénaturation avec l'acide acétique (Figure III-23).

En plus de la zone totalement dénaturée (spectres du pourpre au noir), un gradient de dénaturation apparaît. Ce gradient met en évidence les différentes étapes de la dénaturation thermique du collagène (spectres allant du vert au rouge vif) : dans cette suite il est possible de constater que le changement de la bande amide I apparaît avant l'apparition des bandes de $1700\ \text{cm}^{-1}$ à $1750\ \text{cm}^{-1}$. Le phénomène est donc progressif en fonction de la température appliquée : d'abord un changement de la structure secondaire de la molécule collagène fibrillaire de type I avec changement d'intensité des différents sous-modes de la bande amide I et élargissement de la bande amide I puis apparition de bandes supplémentaires sur les spectres dans la zone la plus dénaturée avec une bande amide I toujours plus large.

Pour conclure sur les résultats obtenus ici : la bande à 1725 cm^{-1} peut être obtenue en chauffant l'échantillon localement. Les spectres IR locaux réalisés permettent d'accéder à des informations importantes sur la dénaturation thermique du collagène et d'identifier les deux principales étapes du mécanisme : d'abord un changement de structure secondaire du collagène fibrillaire de type I puis une apparition de nouvelles bandes. Plus l'échantillon a été chauffé plus l'apparition de ces bandes sont importantes ainsi que les modifications de la bande amide I.

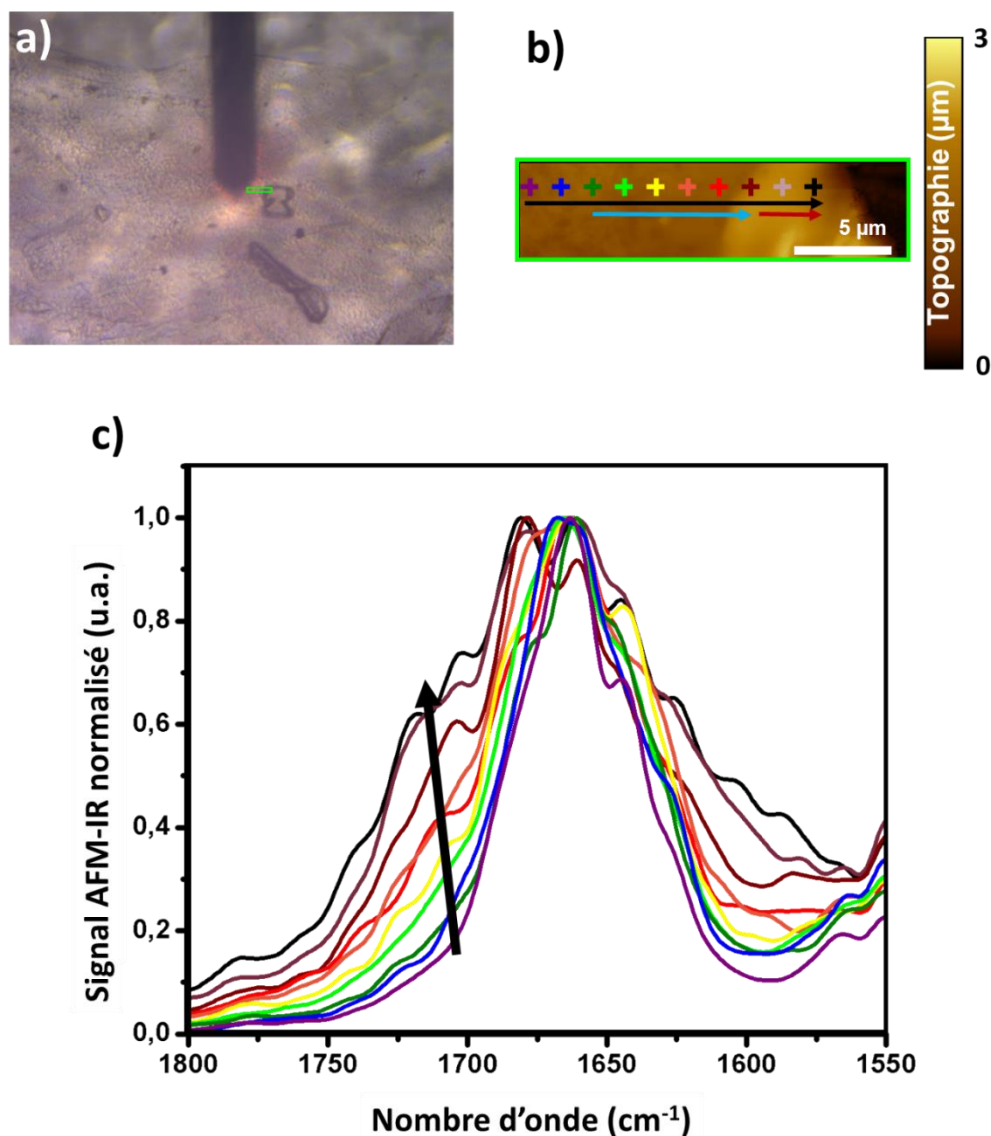


Figure III-25 : Dénaturation thermique d'un film épais de collagène ($2\ \mu\text{m}$ d'épais) - a) Image optique du dépôt de collagène après dénaturation par la pointe NanoTA - b) Image de topographie AFM, le gradient thermique est le plus faible à gauche et le plus fort à droite - c) Spectres AFM-IR, les couleurs se réfèrent aux points indiqués en b)

La même expérience a été reproduite sur un dépôt plus fin (autour de 100 nm d'épais). La température au niveau de la pointe a été fixée à environ 150°C dans le but de simplement dénaturer le collagène et non le détruire, comme cela a pu être le cas dans la précédente mesure. Dans cette seconde expérience, une mesure en microscopie NLO a également été effectuée sur la zone étudiée en AFM-IR.

Dans un premier temps, l'échantillon de collagène fibrillaire de type I a été caractérisé par AFM-IR (Figure III-26 a), b) et c)). Les spectres obtenus le long de la fibre (Figure III-26 c) sont

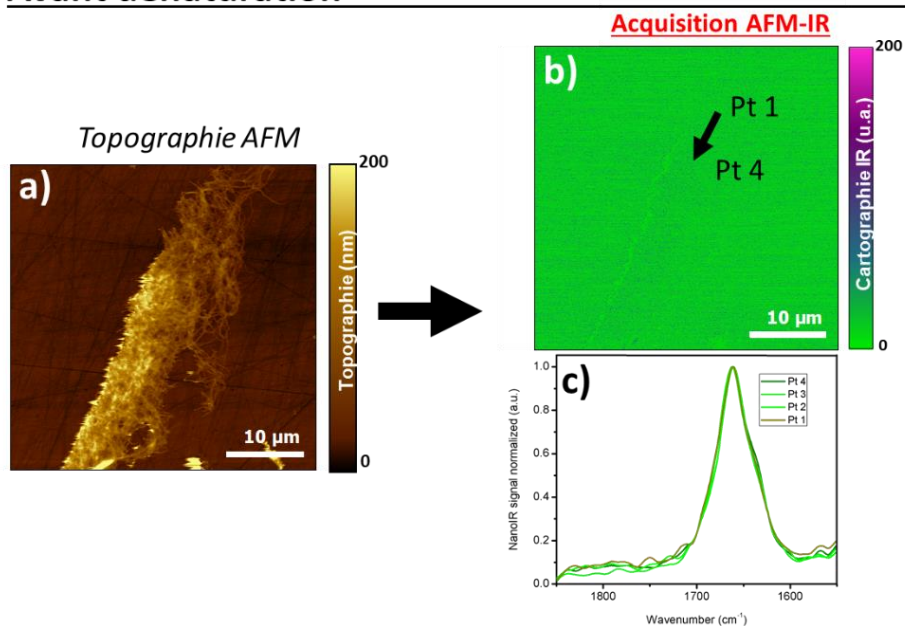
des spectres typiques de collagène I natif, il n'y a donc pas de signes de dénaturation avant le chauffage. Ceci est confirmé par la cartographie chimique à 1725 cm^{-1} obtenue sur la zone analysée et où aucun signal n'est observé (Figure III-26 b)). Ensuite, une zone de $20\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$ a été chauffée par la pointe NanoTA. La zone apparaît sur la topographie AFM après dénaturation (Figure III-26 d)). Sur la cartographie chimique à 1725 cm^{-1} , du signal AFM-IR apparaît alors spécifiquement au niveau de la zone qui a été dénaturée thermiquement. Une ligne de spectres similaire à celle prise avant la dénaturation a été reproduite (Figure III-26 f)). La zone obtenue a aussi été analysée en microscopie NLO (Figure III-26 g)) : dans la zone qui a été dénaturée thermiquement, le signal 2PEF (en rouge sur la figure) est majoritaire alors que dans les zones où il n'y a pas eu de chauffage, le signal majoritaire est le signal SHG (en vert dans la figure). Ce qui confirme que la structure du collagène fibrillaire de type I est conservée. La mesure corrélative effectuée ici permet de confirmer le lien entre la dénaturation du collagène par la pointe NanoTA, la disparition du signal SHG et l'apparition de la bande marqueur AFM-IR semblable au cas du parchemin.

Les spectres obtenus dans la Figure III-26 f) se situent à l'interface entre la zone non dénaturée et la zone dénaturée : les spectres qui sont dans la zone dénaturée présentent maintenant un épaulement dans la zone $1700\text{ cm}^{-1} - 1750\text{ cm}^{-1}$ ainsi qu'un changement de la forme de la bande amide I. Les changements de la bande amide I observés ici sont différents de ceux observés dans la mesure précédente (Figure III-25 c)). Dans le cas de la première expérience, le collagène fait plusieurs microns d'épais et le gradient de dénaturation a pu aussi se réaliser en profondeur. Comme l'AFM-IR intègre tout le signal en profondeur, l'ensemble du collagène (natif, première étape de dénaturation et seconde étape de dénaturation) contribue au signal. En conséquence, le signal AFM-IR obtenu sera alors une combinaison linéaire de ceux des trois espèces.

Dans le cas de la seconde expérience, il est raisonnable de considérer que l'ensemble de la zone a été dénaturé compte tenu de la faible épaisseur (100 nm). La forme de la bande amide I observée ici est donc celle du collagène totalement dénaturé thermiquement. Un moyen de confirmer ce résultat est de faire la même mesure à une échelle plus petite encore, c'est-à-dire la fibrille de collagène.

Le même protocole a donc été appliqué à une fibrille de collagène isolée (Figure III-27). L'épaisseur de la fibrille analysée ici est d'environ 30 nm . La dénaturation de la fibrille a été faite en un point. Les figures (Figure III-27 a) - c), d)-g)) représentent les résultats obtenus avant et après dénaturation. Sur la topographie de la zone dénaturée, un globule apparaît là où la fibrille a été chauffée par la pointe de NanoTA. La cartographie d'absorption IR à 1660 cm^{-1} (Figure III-27 b) et e)) indique que de part et d'autre de la zone dénaturée, l'absorption de la fibrille est homogène, comme avant dénaturation. Elle est donc intacte hors de la zone qui a été chauffée. Dans le cas des cartographies d'absorption IR à 1725 cm^{-1} , la comparaison des résultats obtenus avant et après dénaturation (Figure III-27 c) et f)) montre l'apparition du marqueur de dénaturation thermique au niveau de la zone qui a été chauffée. Les résultats sont donc reproductibles à l'échelle de la fibrille isolée. La comparaison de ce spectre avec celui obtenu sur la zone dénaturée montre un signal équivalent à celui observé avec le dépôt de 100 nm (Figure III-26). Les changements observés sur la bande amide I sont donc spécifiques de la dénaturation thermique du collagène et corrélés à l'apparition de la bande à $1700\text{ cm}^{-1} - 1750\text{ cm}^{-1}$. L'étude à l'échelle de la fibrille unique est donc une source d'information riche et directe sur les mécanismes de dénaturation thermique du collagène. Il permet notamment de démontrer que le changement peut s'effectuer au niveau de la fibrille et qu'il suffit de chauffer l'échantillon en présence d'eau pour l'obtenir. Cependant, il est nécessaire de collecter plus d'informations chimiques pour conclure maintenant sur la nature de la réaction mise en jeu ici.

Avant dénaturation



Après dénaturation

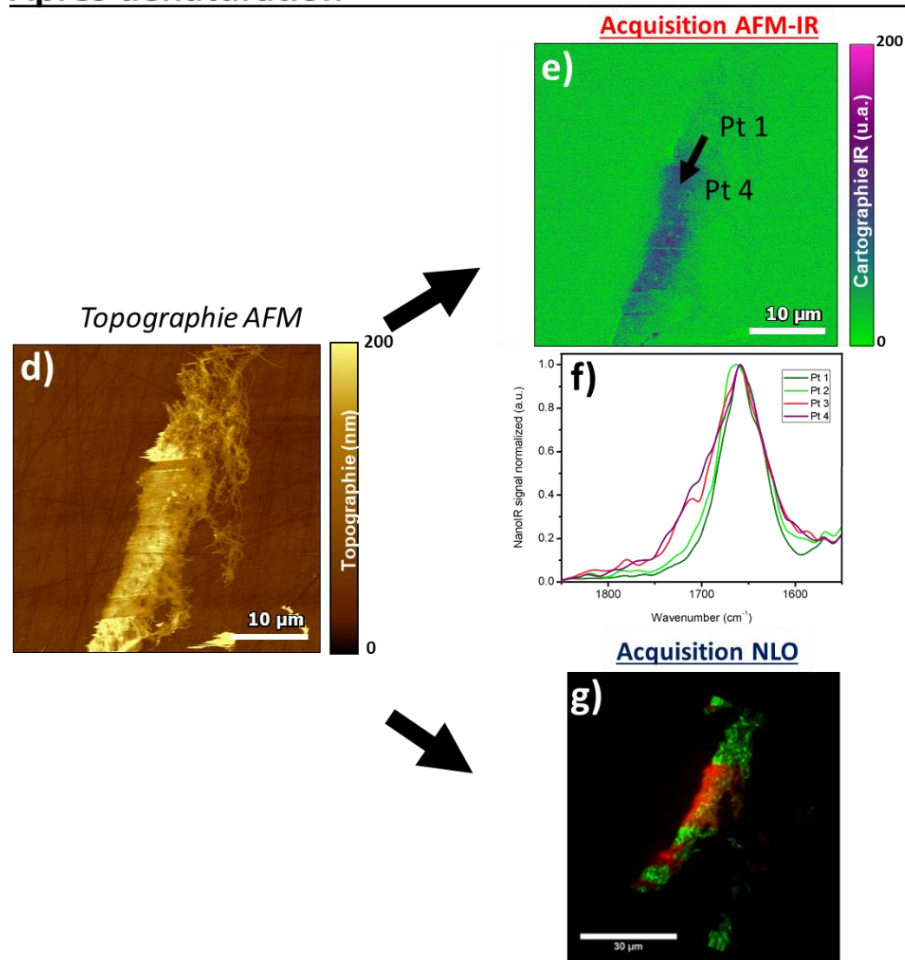


Figure III-26 : Dénaturation d'un film fin de collagène (100 nm d'épais) – Avant dénaturation : a) Topographie AFM, b) Cartographie chimique à 1725 cm^{-1} , c) Spectres AFM-IR obtenus le long d'une ligne indiquée sur l'image b) – Après dénaturation : d) Topographie AFM, e) Cartographie chimique à 1725 cm^{-1} , f) spectres AFM-IR obtenus le long d'une ligne indiquée sur l'image e), g) Image composite de microscopie NLO : le signal vert représente le signal SHG, le signal rouge représente le signal de 2PEF

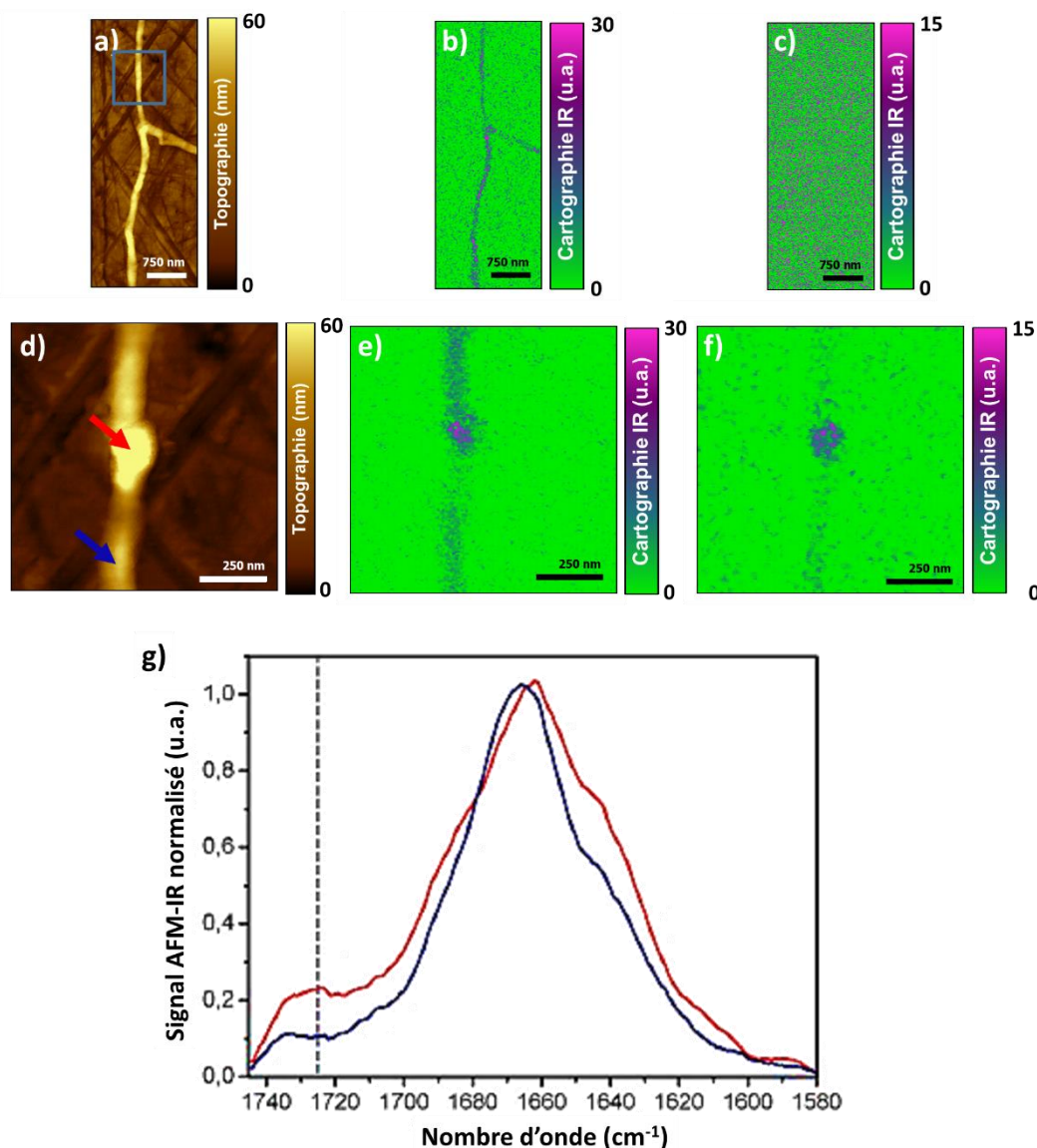


Figure III-27 : Dénaturation du collagène à l'échelle de la fibrille – a) Topographie AFM avant dénaturation (l'encart en bleu est la zone étudiée ensuite après dénaturation), b) – c) Cartographies chimiques de la fibrille de collagène avant dénaturation respectivement à 1660 cm⁻¹ et à 1745 cm⁻¹, d) Topographie AFM après dénaturation, e) – f) Cartographies chimiques à 1660 cm⁻¹ et à 1745 cm⁻¹, g) Spectres IR locaux obtenus sur la fibrille dénaturée, la position des spectres est indiquée par les flèches de couleur

Pour aller plus loin dans l'étude de ces mécanismes, il est nécessaire d'observer les différentes étapes du gradient et voir s'il est possible de reproduire le mécanisme en deux étapes que laissent supposer les résultats obtenus en spectroscopie FTIR (Figure III-23) et sur le film de collagène épais (Figure III-25). Pour cela, il est nécessaire d'appliquer différents niveaux de chauffage à la fibre et obtenir des effets proches de ceux observés dans le cas des gradients faits sur les films. Cependant, cela n'a pu être réalisé ici. Pour réussir à obtenir le globule, il a été nécessaire de chauffer la fibrille à 350°C avec la pointe (ce qui est la température maximale accessible avec ce système de pointe). Quand le chauffage a été appliqué à des températures plus faibles, aucun effet n'a été observé de manière significative.

Le comportement de la fibrille unique est donc différent de celui du film fin. Deux hypothèses peuvent expliquer cette différence de comportement : soit il y a un transfert rapide de la chaleur vers la surface de CaF₂, le chauffage n'est alors plus équivalent au cas du film qui est assez épais pour que le substrat de CaF₂ ne diffuse pas la température ; soit à l'échelle de

la fibrille, il y a une forte interaction avec le CaF_2 qui fige ou contraint la structure du collagène, limitant la dénaturation de la structure.

Pour compléter l'étude, il faudrait pouvoir faire varier l'environnement chimique de la molécule comme la quantité d'eau (ce qui nécessite d'avoir une enceinte contrôlée), le pH ou adjoindre d'autres molécules comme l'éthanol ou l'acide acétique, ce que ne permet pas l'AFM utilisé ici.

2. Mesures corrélatives AFM-IR/TEM - Étude d'une fibre protéique bactérienne

Durant ma thèse, une mesure corrélative entre l'AFM-IR et la microscopie électronique à transmission (TEM) a également été réalisée. Le développement de cette mesure corrélative a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Microscopy* [62].

Une mesure corrélative entre spectroscopie vibrationnelle (spectromicroscopie Raman TERS) et microscopie électronique a déjà été effectuée par l'équipe de P. Lasch [136]. L'intérêt de ce genre d'étude est la possibilité de coupler les capacités de description morphologique de la microscopie électronique avec les informations chimiques qui peuvent être extraites de la spectroscopie vibrationnelle. La limitation principale est la résolution de la microscopie Raman qui est de plusieurs ordres de grandeur inférieure à celle de la microscopie électronique. D'où le recours à des techniques de spectroscopie vibrationnelle couplées à la microscopie de champ proche comme le TERS [136], le s-SNOM [137] ou l'AFM-IR. L'intérêt est d'autant plus grand que ces techniques ont démontré leurs capacités à étudier des fibres protéiques isolées et peuvent, sous réserve, donner accès à des informations structurales.

Dans le cas de la mesure corrélative avec l'AFM-IR appliquée aux protéines, plusieurs difficultés existent : il est nécessaire, comme vu précédemment, de trouver un substrat adapté à la mesure photothermique IR (c'est-à-dire soit non absorbant soit complètement réfléchissant dans la gamme d'IR observée), qui soit aussi adapté aux mesures de topographie AFM en mode contact et qui puisse aussi d'être utilisé en TEM, donc transparent aux électrons. La solution qui a été proposée est l'utilisation de fenêtres de Si_3N_4 qui semblent répondre au cahier des charges imposé par les deux techniques. Dans la suite de cette partie, les résultats obtenus avec cette solution et les limitations observées vont être discutés.

L'objet étudié est une fibre d'origine bactérienne : Hfq. Cette protéine est impliquée dans le compactage de l'ADN [138]. Dans les faits, les monomères de la protéine Hfq s'autoassemblent en fibres de type amyloïdes du fait de la présence d'une séquence de 11 acides aminés dans la région C-terminale de la protéine (CTR₁₁) [139]-[141]. Si l'utilisation de la partie de la région C-terminale est suffisante pour permettre une interaction avec l'ADN, dans les travaux qui sont présentés ici, l'étude se fait sur une séquence de 38 acides aminés (CTR₃₈). Cette séquence inclut les 11 acides aminés responsables du comportement amyloïde et une autre séquence importante pour de futures applications avec les complexes nucléoprotéiques [142]. Dans le cas de la séquence Hfq CTR₃₈, en absence d'ADN, environ 20% du peptide forme une structure riche en feuillets β intermoléculaires typique de structures amyloïdes et caractérisable par spectroscopie IR [143]-[146]. Cet objet déjà caractérisé en TEM et en IR apparaît donc comme un bon objet modèle pour la mise en place d'un protocole pour des mesures corrélatives AFMIR/TEM.

Le support utilisé pour l'étude corrélative est un support composé d'un film de nitrure de silicium (Si_3N_4) d'une épaisseur de 50 nm qui repose sur des plots de silicium (Si). Il est asymétrique et composé de huit fenêtres carrées de Si_3N_4 de $100\ \mu\text{m}$ par $100\ \mu\text{m}$ et une fenêtre rectangulaire de $100\ \mu\text{m} \times 350\ \mu\text{m}$. Pour plus de clarté, un schéma du support est donné en Figure III-28. Le film de Si_3N_4 a été choisi de sorte à avoir une rugosité de surface de l'ordre de 1 à 2 nm, permettant d'effectuer des mesures d'AFM sur des objets ayant une épaisseur inférieure à 10 nm, mais aussi d'avoir une très bonne résolution latérale en TEM. L'intérêt du Si_3N_4 pour la mesure corrélative réside dans le fait qu'il possède une absorbance IR quasi nulle dans la gamme $1500\ \text{cm}^{-1} - 1800\ \text{cm}^{-1}$ où se situe la bande amide I [147] et est transparent aux électrons.

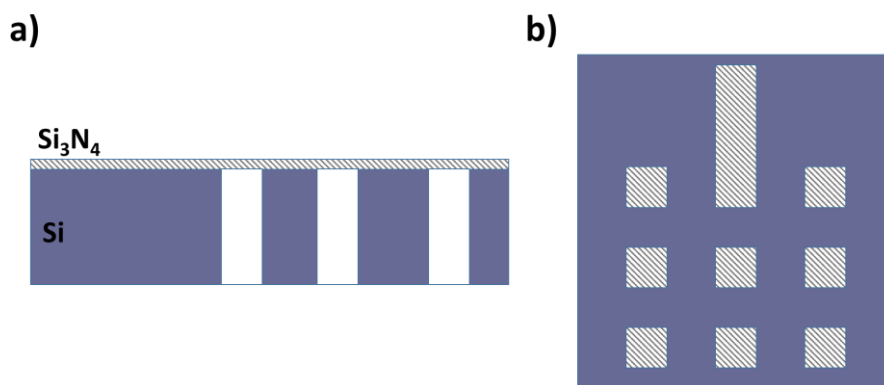


Figure III-28 : Schéma du support $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}$ utilisé pour la mesure corrélative - a) Vue transverse, b) Vue du dessus

La première étape de l'étude a consisté à voir s'il était possible d'effectuer une mesure AFM-IR sur le film de Si_3N_4 situé sur un plot de Si. Cette étape a deux buts : le premier est de s'assurer que l'état de surface et les propriétés du film de Si_3N_4 ne vont pas affecter la mesure et le second de vérifier qu'il est possible d'obtenir un signal AFM-IR sur un échantillon d'une épaisseur de quelques nanomètres. En effet, si cette mesure est effectuée en AFM-IR en mode de résonance forcée, il a été montré dans le Chapitre II que l'augmentation de sensibilité n'est pas suffisante pour avoir un rapport signal sur bruit permettant d'étudier des objets nanométriques dans des conditions de mesure classique [16]. Cependant, l'utilisation de la pointe Si-Au permet d'augmenter le signal détectable en AFM-IR par exaltation du champ électrique local. Cette augmentation par la pointe est-elle suffisante pour obtenir du signal sur les fibres HfQ CTR₃₈ de quelques nanomètres d'épais sur un substrat qui n'est pas en or ?

La Figure III-29 montre un exemple de résultats obtenus dans cette configuration expérimentale (pointe Si-Au - surface Si_3N_4). L'analyse de la topographie AFM (Figure III-29 a)) démontre qu'il existe deux types de populations au sein de l'échantillon : d'une part des fibres de plusieurs micromètres de long et de 20 à 25 nm de hauteur et d'autre part des dépôts non structurés d'environ dix nanomètres d'épaisseur. Ces deux types de populations ont déjà été observés dans des expériences similaires sur d'autres fibres de type amyloïdes [80]. Ils correspondent à différents états de polymérisation : les fibres sont les oligomères de HfQ CTR₃₈ qui ont polymérisé tandis que les dépôts sont un mélange de monomères et d'oligomères de HfQ CTR₃₈. Ces différences morphologiques sont corrélées par la comparaison des spectres obtenus le long de la fibre (Figure III-29 b) - spectres en cyan) et les spectres obtenus sur le dépôt (Figure III-29 b) - spectre en rouge). Dans le premier cas, il apparaît un épaulement à $1626\ \text{cm}^{-1}$ qui peut être attribué à la présence de feuillettes β intermoléculaires caractéristiques des structures de type amyloïdes [143]-[146]. Un résultat plus détaillé peut être obtenu en effectuant le ratio des cartographies chimiques à $1660\ \text{cm}^{-1}$ et

à 1620 cm^{-1} (Figure III-29 c)). L'intérêt d'un tel ratio est qu'il permet à la fois de voir au sein des dépôts le rapport de quantité entre monomères et oligomères, ces derniers présentant également une structure en feuillets β agrégés, ainsi que l'hétérogénéité de structure au niveau des fibres. La sensibilité obtenue ici est même suffisante pour observer sur les spectres une bande centrée autour de 1745 cm^{-1} (Figure III-29 b)) qui est atypique pour un spectre de protéine pure. L'analyse de la répartition de l'espèce associée à cette bande a été possible grâce à une cartographie chimique à 1745 cm^{-1} et montre que celle-ci est associée à la protéine. Ce n'est donc ni une pollution de la surface, ni une pollution de la pointe. De plus, la composition en acides aminés de la protéine étudiée ici exclut que ce signal soit attribué à des chaînes latérales d'acides aminés. Des analyses complémentaires ont par la suite permis de déterminer que cette bande IR pourrait provenir d'une pollution à l'acide trifluorique (TFA), qui est utilisé lors des étapes de purification des monomères commerciaux. Les interactions entre les protéines et le TFA sont déjà connues et ont déjà été décrites dans la littérature [148], [149]. La plupart du temps, le TFA est sous sa forme ionique dont le maximum d'absorbance est centré autour de 1675 cm^{-1} . Cependant, un décalage de la bande a déjà été observé lors d'interaction du TFA avec des amides non biologiques [150] ou d'autres espèces protonées comme cela semble être le cas ici [151].

Pour conclure, les résultats présentés en Figure III-29 démontrent que l'utilisation d'une pointe Si-Au seule peut être suffisante pour obtenir une amplification locale du signal et étudier des protéines d'épaisseur inférieure à 10 nm . Même si la pollution fausse une partie de l'interprétation de la bande amide I des spectres AFM-IR obtenus, il est possible d'avoir accès à une information chimique clé pour l'analyse de fibres amyloïdes comme l'épaulement à 1626 cm^{-1} caractéristique des feuillets β intermoléculaires.

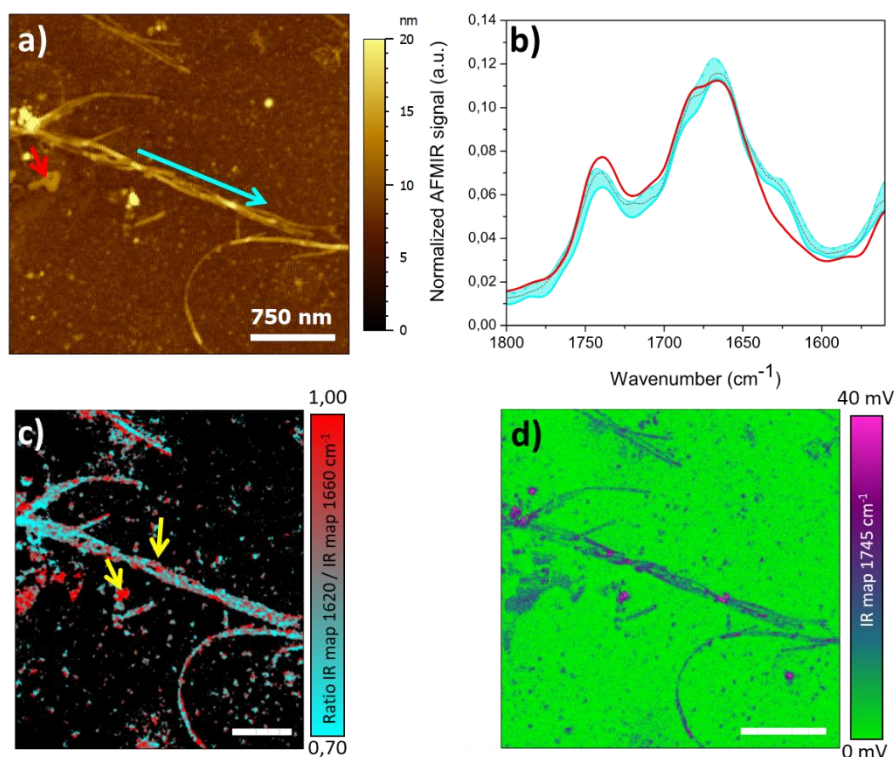


Figure III-29 : Analyse en AFM-IR des fibres HfQ CTR38 déposées sur le film de Si_3N_4 surmontant le plot de Si - a) Topographie AFM - b) Spectres obtenus en AFM-IR sur différents endroits comme le faisceau de fibres (les spectres en cyan sont représentatifs de 5 points de mesure pris le long de la fibre indiquée par la flèche en cyan tous les 250 nm) et sur le dépôt d'oligomères (spectre en rouge, la localisation du spectre est indiquée par une flèche rouge sur la topographie) - c) Rapport des cartographies d'absorption IR obtenues à 1620 cm^{-1} et 1660 cm^{-1} . Les flèches en jaunes indiquent des zones riches en feuillets β - d) Cartographie d'absorption IR obtenue 1745 cm^{-1} - Figure extraite de [48]

Par la suite, nous avons vérifié qu'il était possible de faire les mêmes mesures sur le film de Si_3N_4 libre.

Pour ces mesures AFM-IR, il est également nécessaire d'utiliser le mode de résonance forcée. La fréquence de tir du laser QCL est alors synchronisée sur la résonance de contact du levier qui dépend des variations des propriétés mécaniques de l'échantillon. Dans le cas de protéines de type amyloïde comme les protéines α -synucléine et $\text{A}\beta_{42}$, il existe de grandes variations de propriétés mécaniques entre les oligomères et les fibres [152]. Comme on a pu le voir précédemment, une répartition de population a été constatée dans les dépôts de HfQ CTR₃₈. Il est donc fort probable que des variations de résonance de contact non négligeables soient observées entre les zones riches en oligomères et les zones riches en fibres.

De plus, il a été possible d'observer l'apparition d'une résonance de contact spécifique au film sur les plots en Si même si l'absorbance du Si_3N_4 est très limitée dans la gamme spectrale étudiée. Ceci est lié aux propriétés thermiques du matériau utilisé : la conductivité thermique de films minces de SiN et de Si_3N_4 est d'environ 3,5 W/mK [153], [154], ce qui est deux ordres de grandeur plus faibles que celle des surfaces d'or qui sont utilisées généralement pour les protéines de quelques nanomètres d'épaisseur [155]. En conséquence, du fait de l'illumination par le laser QCL, le film de Si_3N_4 absorbe de l'énergie puis une expansion thermique spécifique du film se produit. Cet effet peut être démontré en observant l'oscillation du film en fonction de la puissance du laser (Figure III-30 a)). Néanmoins, il est possible de distinguer l'expansion thermique du film de l'expansion photothermique des fibres. D'une part, les oscillations du levier observées pour le film sont indépendantes du nombre d'onde contrairement à celles des échantillons qui sont reliées à des absorptions IR spécifiques. D'autre part, les propriétés mécaniques du film et des échantillons biologiques sont différentes et donc les fréquences de résonance de contact entre le film et la fibre sont très différentes et par chance ne coïncident pas comme il est possible de l'observer sur la Figure III-30 b). Ce décalage de l'ordre de la dizaine de kHz est suffisant pour faire la distinction entre le signal de la surface et celui de l'échantillon, permettant d'effectuer des mesures comme celles présentées en Figure III-29.

Qu'en est-il dans le cas du film Si_3N_4 libre (Figure III-30 c)) ? Dans ce cas la résonance de contact observée sur le film libre (en vert sur la Figure III-30 c)) est très décalée par rapport à celle observée pour le film sur les plots en Si. En effet ici le film n'est plus lié au plot de Si et peut se mettre à osciller librement. Ce qui explique l'ampleur du décalage du maximum de fréquence mesuré ici qui est de l'ordre de 25 kHz. Si la même mesure est effectuée sur le bord du film libre (courbe en orange), le maximum de la résonance de contact est proche de celui observé dans le cas du film de Si_3N_4 sur le Si. En effet, comme le film n'est alors plus contraint, les oscillations propres sont plus faibles. De plus, pour une même intensité laser, l'intensité de la résonance de contact du film libre est plus du double de celle du film de Si_3N_4 sur le Si (encart de la Figure III-30 c)). L'expansion thermique du film devient alors prédominante sur l'effet photothermique liée à l'absorption IR des objets biologiques et rend théoriquement impossible la mesure corrélative en utilisant ce type de support.

Pour résoudre ce problème, la solution est d'utiliser les propriétés de la pointe Si-Au présentées précédemment et d'utiliser l'exaltation du champ local pour maximiser l'éclairage de l'objet tout en limitant celui du film. En effet, dans cette configuration le signal thermique du film provient de l'illumination par l'ensemble du faisceau laser (de l'ordre de la centaine de microns de diamètre) alors que le signal photothermique vient de la zone illuminée par la pointe. Donc, si l'intensité du faisceau diminue suffisamment tout en gardant un champ local intense, il va être possible d'inverser la tendance des phénomènes observés. Pour cela, il est nécessaire d'avoir une pointe Si-Au qui permet une amplification la plus importante

possible. Des expériences de TERS avec des systèmes similaires à celui utilisé en AFM-IR ont montré que ce paramètre était grandement dépendant de l'état de surface de la pointe Si-Au [89]. Dans le cas des mesures AFM-IR effectuées ici, les pointes Si-Au utilisées sont des pointes commerciales. Il n'est donc pas possible de contrôler ce paramètre. Il est cependant possible de trouver empiriquement des pointes de « haute qualité » permettant d'utiliser le laser dans des conditions de puissance du laser suffisante pour limiter l'oscillation thermique du film et permettre d'effectuer la mesure corrélative AFM-IR/TEM. Un exemple de résultats obtenus avec une pointe efficace est donné en Figure III-31 où il a été possible de comparer les structures des fibres protéiques grâce à une analyse en TEM (Figure III-31 a)) et AFM (Figure III-31 b)) ainsi que d'avoir accès à l'information chimique par les spectres locaux AFM-IR (Figure III-31 c)).

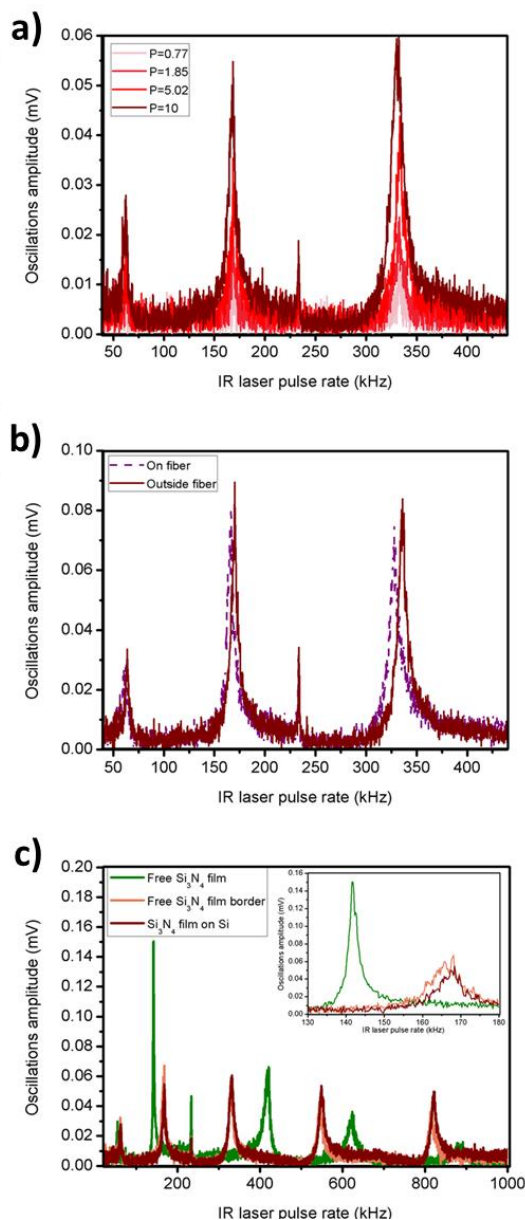


Figure III-30 : Étude du comportement thermique du film de Si_3N_4 – a) Comparaison des amplitudes d'oscillations du levier en contact avec le film de Si_3N_4 sur le Si en fonction de la puissance incidente du laser QCL – b) Comparaison des fréquences d'oscillation du levier en contact avec la surface de Si_3N_4 (expansion thermique de la surface) ou en contact avec une fibre de HfQ CTR₃₈ (expansion photothermique) – c) Évolution de l'oscillation du levier en fonction de sa position sur le support (au milieu du film de Si_3N_4 libre, sur le film de Si_3N_4 sur les plots en Si ou à l'interface entre les deux) – Agrandissement sur la gamme de fréquences allant de 130 kHz à 180 kHz – Figure extraite de [48]

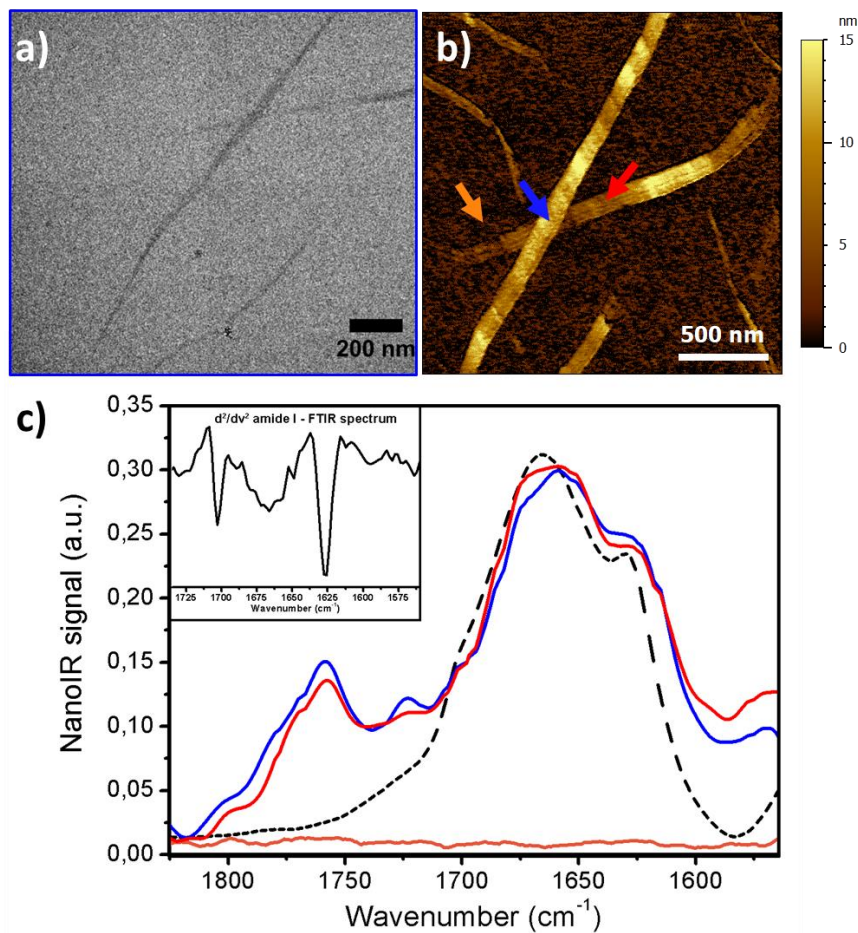


Figure III-31 : Mesure corrélative effectuée sur des fibres de HfQ CTR₃₈ – a) Image de TEM – b) Topographie AFM de la même fibre – c) Spectres locaux obtenus sur les fibres, la position des spectres est indiquée par des flèches de couleurs – Le spectre en pointillé noir est un spectre obtenu en FTIR sur un dépôt analogue – Agrandissement : dérivée seconde du spectre obtenu en FTIR permettant de mettre en évidence les deux sous structures d'absorption principales à 1625 cm⁻¹ et 1665 cm⁻¹ - Figure extraite de [48]

En résumé, l'étude présentée ici ouvre la voie aux études corrélatives combinant AFM-IR et toutes les techniques basées sur la microscopie électronique. Il est possible d'améliorer la qualité des résultats obtenus en améliorant d'une part la qualité et le design des pointes en or utilisées et d'autre part en jouant sur les propriétés géométriques du support utilisé. En effet, en diminuant la taille des fenêtres de Si₃N₄ libres, mais aussi en augmentant l'épaisseur du film de Si₃N₄, il serait possible de rigidifier plus le film pour décaler le mode de vibration vers les hautes fréquences (MHz).

3. Discussion autour des mesures corrélatives

Les deux exemples qui viennent d'être présentés montrent qu'il est possible de combiner la mesure AFM-IR avec d'autres techniques d'analyse. L'approche des mesures corrélatives permet non seulement d'augmenter la quantité d'informations accessibles sur un même objet, mais aussi de pouvoir répondre de manière plus affirmative à des questions scientifiques complexes.

La multiplication des mesures corrélatives en AFM-IR ne doit pas occulter que ce type d'expérience est loin d'être trivial. En effet, la mise en place de ce type de mesures nécessite une réflexion en amont sur la préparation de l'échantillon, la surface utilisée et sur la mise en place de moyen pour retrouver la zone analysée d'une technique à l'autre. Le plus simple est d'utiliser une image optique de référence permettant de replacer l'image avant l'acquisition. Cette stratégie est viable pour les objets qui ont une épaisseur suffisante pour être détectable optiquement (par exemple des cellules, des dépôts de collagène épais...). Dans le cas d'un objet de faible épaisseur comme les fibres amyloïdes HfQ analysées précédemment, il n'est pas possible d'appliquer cette stratégie et il est nécessaire d'utiliser des repères sur le substrat pour avoir une première localisation grossière de la zone puis ensuite de faire une localisation précise grâce à des images AFM obtenues successivement. Cette étape peut vite se montrer laborieuse et consommatrice en temps. De plus, multiplier le nombre d'acquisitions augmente le risque d'endommager l'échantillon, mais surtout la pointe. Or pour des applications comme celle sur les fibres amyloïdes HfQ qui nécessitent une pointe optimale, cela peut s'avérer critique. Une autre difficulté pratique peut apparaître avec ce genre de mesure. Du fait que les mesures sont effectuées sur deux appareils différents, il est nécessaire de transférer l'échantillon d'un appareil à l'autre. Or les deux appareils ne sont souvent pas dans la même salle voire sur le même site. Ceci augmente fortement le risque de dégradation de l'échantillon lors du transport (surtout si l'échantillon est très fragile et/ou peu adhérent à la surface) ainsi que le risque de pollution de la surface.

Les problèmes qui viennent d'être présentés peuvent être pénalisants dans le développement de mesures corrélatives avec l'AFM-IR. S'il est possible de passer outre pour une expérience spécifique, ce type de fonctionnement n'est pas viable pour des mesures de routine. Dans cet objectif, il est nécessaire de développer des systèmes dédiés qui combinent les deux techniques dans un seul système. Plusieurs systèmes de ce genre couplant la microscopie AFM classique à des techniques optiques ont déjà été réalisés comme par exemple un système couplant l'AFM à un spectromètre IR en ATR [156] ou encore un système couplant l'AFM avec la microscopie de fluorescence [157]. Dans les deux cas précités, le système couplé à l'AFM utilise un éclairage par le dessous. Il est donc envisageable de reproduire le même type de configuration avec un système AFM-IR en éclairage par le dessus en adaptant des optiques permettant de focaliser le laser IR sur la pointe. Dans cette configuration, l'encombrement est relativement limité et comme il n'est pas nécessaire d'utiliser un prisme, il n'y a pas de limitation pour l'éclairage par l'autre technique. Le couplage en un seul système entre l'AFM-IR et d'autres techniques optiques semblent donc réalisables. En revanche dans le cas des techniques basées sur la microscopie électronique, le développement doit être plus poussé et nécessite dans un premier temps le développement de l'AFM-IR en conditions environnementales contrôlées.

V. Conclusions

Dans ce chapitre, un nouveau mode d'éclairage a été présenté : le mode d'éclairage par le dessus. Ce mode d'éclairage présente un certain nombre d'avantages par rapport au mode d'éclairage en réflexion totale utilisé classiquement en AFM-IR. Il permet notamment une plus grande versatilité de surfaces utilisables. Cela facilite fortement la réalisation de dépôts pour la mesure AFM, notamment dans le cas d'objets ayant une chimie de surface complexe. De plus, la perte de contrainte sur la géométrie du support imposée par l'éclairage en réflexion totale a permis de développer des applications de mesures corrélatives associant la mesure AFM-IR à une mesure complémentaire. Deux exemples

d'applications corrélatives menées au cours de ma thèse ont été exposés dans ce Chapitre, le premier sur l'étude de la dénaturation de collagène de type I avec la microscopie NLO et le second sur la caractérisation de la fibre protéique d'origine bactérienne HfQ avec la microscopie électronique. Ces deux projets ont permis d'illustrer les points clés de ce type de développements ainsi que la diversité des mesures accessibles. L'utilisation de la configuration d'éclairage par le dessus a aussi permis d'utiliser des surfaces jusque-là non utilisées en AFM-IR : les surfaces recouvertes d'or. L'utilisation de ces surfaces couplées à une pointe recouverte d'or a permis d'atteindre des sensibilités encore plus importantes que celles accessibles en résonance forcée et d'imager des objets d'épaisseur nanométriques. La pointe recouverte d'or apparaît comme le facteur clé de l'éclairage par le dessus. Du fait que le levier est directement éclairé par le faisceau, la configuration d'éclairage par le dessus impose d'utiliser un levier recouvert d'or. Or les pointes de ces leviers peuvent interagir avec le rayonnement IR incident. En conséquence, la pointe qui est le détecteur de la mesure AFM-IR n'est plus passive comme dans le cas des leviers de silicium, mais peut avoir une influence sur la mesure. L'étude menée ici sur ce type spécifique de levier a mis en évidence plusieurs points importants. En interagissant avec le faisceau IR, elle conduit à une amplification du champ local. Le champ très intense ainsi généré permet d'augmenter la quantité d'énergie absorbée par l'échantillon situé sous la pointe et donc le signal détectable en AFM-IR, ce qui permet d'atteindre des sensibilités nanométriques. Cependant, les résultats obtenus à partir d'un éclairage via la pointe recouverte d'or présentent des distorsions au niveau des spectres IR obtenus. Si l'origine exacte de ces distorsions n'a pas pu être déterminée, les expériences menées pendant ma thèse montrent clairement que le phénomène est complexe et ne peut être associé à un simple effet de polarisation du champ, comme suggéré dans la littérature. Il apparaît aussi qu'il existe une compétition entre l'éclairage par le faisceau incident et celui généré par la source secondaire qu'est la pointe. Il est impossible en l'état de déterminer quelle proportion de chaque éclairage contribue au signal final, car plusieurs paramètres semblent intervenir et notamment l'épaisseur de l'échantillon. Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus dans ces conditions ne sont plus directement comparables avec ceux obtenus en spectroscopie d'absorption IR. L'utilisation de levier recouvert d'or est pour le moment obligatoire dans le cas d'une mesure AFM-IR en éclairage par le dessus. Il est donc nécessaire d'être extrêmement vigilant et précautionneux sur les interprétations des analyses spectrales obtenues surtout lorsqu'il s'agit des structures secondaires des protéines.

Chapitre IV : AFM-IR en mode tapping

Jusqu'à présent, la technique AFM-IR a toujours utilisé le mode contact de l'AFM. Ce mode convient pour un grand nombre d'échantillons, sauf pour les objets mous et/ou peu adhérents à la surface. Dans ces cas-là, le mode d'imagerie appelé tapping est plus approprié : le levier est mis en oscillation et un contact intermittent est maintenu avec la surface lors de son déplacement, limitant les forces latérales de cisaillements qui peuvent endommager ou déplacer les objets présents sur la surface. Du point de vue de la technique AFM-IR, le challenge majeur de l'utilisation de ce mode de mesure est de pouvoir synchroniser la mesure AFM-IR avec le contact intermittent. Après avoir montré la pertinence de l'utilisation du mode tapping en AFM-IR, une description théorique de l'AFM-IR en mode tapping sera ensuite proposée pour mettre en valeur les paramètres physiques dominant cette nouvelle méthode. Puis, deux exemples d'applications seront présentés : i) l'un portant sur l'étude de la structure fine de nanoparticules polymériques associées à des antibiotiques, ii) et le second portant sur l'étude de la matière organique dans des micrométéorites ultra-carbonées d'Antarctique (notées par la suite UCAMMs). Enfin, les limitations de ce nouveau mode d'acquisition AFM-IR seront discutées.

I. Limitations de l'AFM-IR en mode contact

Pour l'imagerie AFM, les deux modes les plus communs sont le mode contact et le mode oscillant avec contact intermittent aussi appelé mode tapping. La technique AFM-IR a été initialement développée en mode contact, ce qui peut être un frein pour l'analyse des objets mous et/ou peu adhérents à la surface. Comme la mesure du signal infrarouge se fait par l'intermédiaire de la pointe, tous les problèmes d'imagerie de topographie de l'AFM peuvent se répercuter sur la mesure de la dilatation thermique. Cet exemple a pu être illustré lors de l'étude de nanoparticules polymériques formées d'acide polylactique (PLA) et d'alcool polyvinylique (PVA).

D'un point de vue de l'AFM, les nanoparticules polymériques sont flexibles et le contact avec la pointe a tendance à les déformer. De plus, ces nanoparticules sont peu adhérentes à la surface et du fait de leurs grandes tailles (> 100 nm) associées à leur forme sphérique, elles sont facilement déplacées par la pointe lors de l'imagerie. Un exemple issu de l'analyse AFM-IR en mode contact d'une nanoparticule formée de PLA et de PVA est représenté en Figure IV-1. Les résultats montrent une image en trois dimensions qui correspond aux variations de la topographie avec un code couleur rouge-vert pour représenter la cartographie d'absorption chimique à 1760 cm^{-1} qui est l'un des maxima d'absorption IR du PLA. La structure des nanoparticules a été identifiée préalablement par d'autres méthodes d'analyse comme étant des sphères d'un diamètre d'environ 180 nm. L'analyse de la topographie des deux objets sur la surface (en trois dimensions sur la Figure IV-1) ne donne pas le résultat attendu. Au lieu de sphères, on observe deux objets aplatis (50 nm de haut) avec des diamètres entre 100 et 200 nm qui sont bien composés de PLA au vu des cartographies d'absorption obtenues à 1760 cm^{-1} . Il semble que la nanoparticule ait été soit écrasée soit déplacée durant l'acquisition.

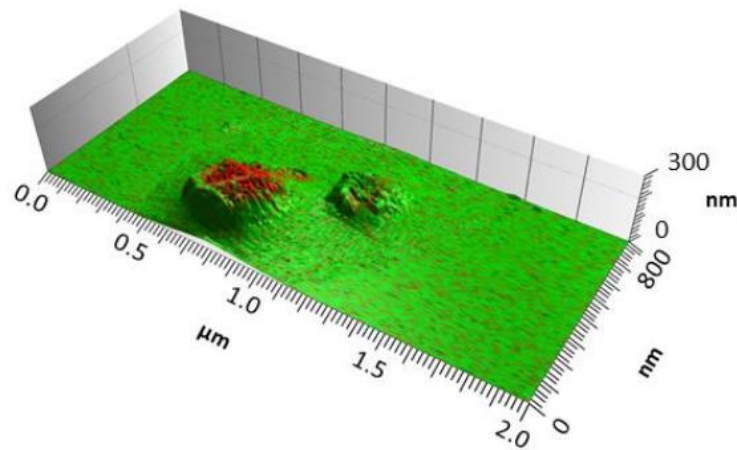


Figure IV-1 : Résultat de l'analyse en AFM-IR en mode contact d'une nanoparticule de PLA/PVA - Image 3D de nanoparticules obtenue par superposition de la topographie en mode contact (relief) et de la cartographie chimique d'absorption obtenue à 1760 cm^{-1} - L'échelle des fausses couleurs pour l'absorption : vert, pour une faible absorbance ; rouge pour l'absorbance - Figure adaptée de [158]

La solution la plus évidente pour dépasser cette limitation d'imagerie est de remplacer le mode contact par le mode tapping. Dans ce mode, le levier est contraint d'osciller constamment à une amplitude et à une fréquence donnée. Pour mettre en place une mesure AFM-IR avec ce mode d'imagerie AFM, il est donc nécessaire de réussir à détecter l'oscillation générée par l'expansion photothermique sachant que le levier a déjà une oscillation propre indépendante de la mesure photothermique du fait du mode d'imagerie choisi. Ceci a cependant pu être résolu en s'inspirant des résultats obtenus par un autre mode de mesure AFM qui est l'AFM en détection hétérodyne [159], [160].

II. Développement de l'AFM-IR en mode tapping

1. AFM hétérodyne

La technique d'AFM hétérodyne (notée par la suite HFM) dérive des techniques de CR-AFM pour lesquelles le support de l'objet [67] ou le levier [68] sont excités par un transducteur piézoélectrique dans le but de tester les réponses mécaniques de l'objet (voir le Chapitre II à travers l'exemple de la mesure CR-AFM, p.a)49).

Dans le cas du HFM, deux stimulations à deux fréquences différentes sont générées. L'une se fait au niveau de l'échantillon, l'autre se fait au niveau du levier AFM. Il a été montré par M.T. Cuberes et al. [159] que lorsque la pointe est maintenue en contact avec l'échantillon, un mélange de fréquence (somme ou différence) est observé et un signal non linéaire dit hétérodyne apparaît au niveau de l'interface entre la pointe et la surface de l'objet. Il apparaît soit au niveau de la somme soit au niveau de la différence des deux fréquences. L'oscillation alors générée va pouvoir être détectée en démodulant le signal d'oscillation de la pointe à cette somme ou à cette différence de fréquences. Dans le cas des articles de M.T. Cuberes et des articles suivants, c'est toujours la différence de fréquence qui est observée. Un résultat similaire est théoriquement observable avec la somme [159]. L'analyse de l'amplitude et de la phase du signal hétérodyne généré permet d'accéder aux propriétés mécaniques de l'objet. Par la suite, S.A. Cantrell et al. ont montré qu'il était possible d'augmenter le signal hétérodyne

obtenu en faisant coïncider la différence de fréquences avec une des résonances de contact du levier [161]. À partir de ce développement, M.T. Cuberes a développé une seconde configuration du HFM en substituant le mode contact de l'AFM par le mode tapping [160]. Dans ce cas, le levier oscille à une fréquence qui correspond à son mode fondamental et la différence de fréquences entre l'oscillation du levier et celle de l'objet est choisie de sorte à correspondre à un mode du levier d'ordre supérieur. En démodulant le signal de l'oscillation du levier à la fréquence de ce mode, il est alors possible d'obtenir exclusivement le signal hétérodyne.

2. Preuve de concept de l'AFM-IR en mode tapping

En s'inspirant de ce qui a été fait en HFM, il est possible de mettre en place une stratégie pour l'AFM-IR en mode tapping : la fréquence d'oscillation du levier est mélangée à la fréquence de dilatation de l'objet créée lors de l'absorption du rayonnement IR. Cela va être possible grâce à l'utilisation du laser QCL qui va permettre de choisir finement la cadence du tir laser. En fonction de celle-ci, l'oscillation de l'objet est paramétrée pour obtenir une interaction non linéaire lorsque la pointe est en contact. Concrètement, le levier en mode tapping va osciller à la fréquence fondamentale et la fréquence du taux de répétition de tir du laser va être choisie de sorte que la somme de ces deux fréquences corresponde à la fréquence du second mode du levier. On se retrouve dans un cas analogue au HFM en mode tapping sauf que ce sera la somme de fréquence qui sera étudiée au lieu de la différence de fréquence. Comme il est nécessaire que l'objet absorbe le rayonnement IR pour qu'il puisse osciller à la fréquence du laser QCL, l'interaction non linéaire produite est donc directement liée à l'expansion photothermique et va contenir l'ensemble de l'information sur l'absorption de l'objet. Le processus qui vient d'être décrit est résumé dans un schéma de principe donné en Figure IV-2.

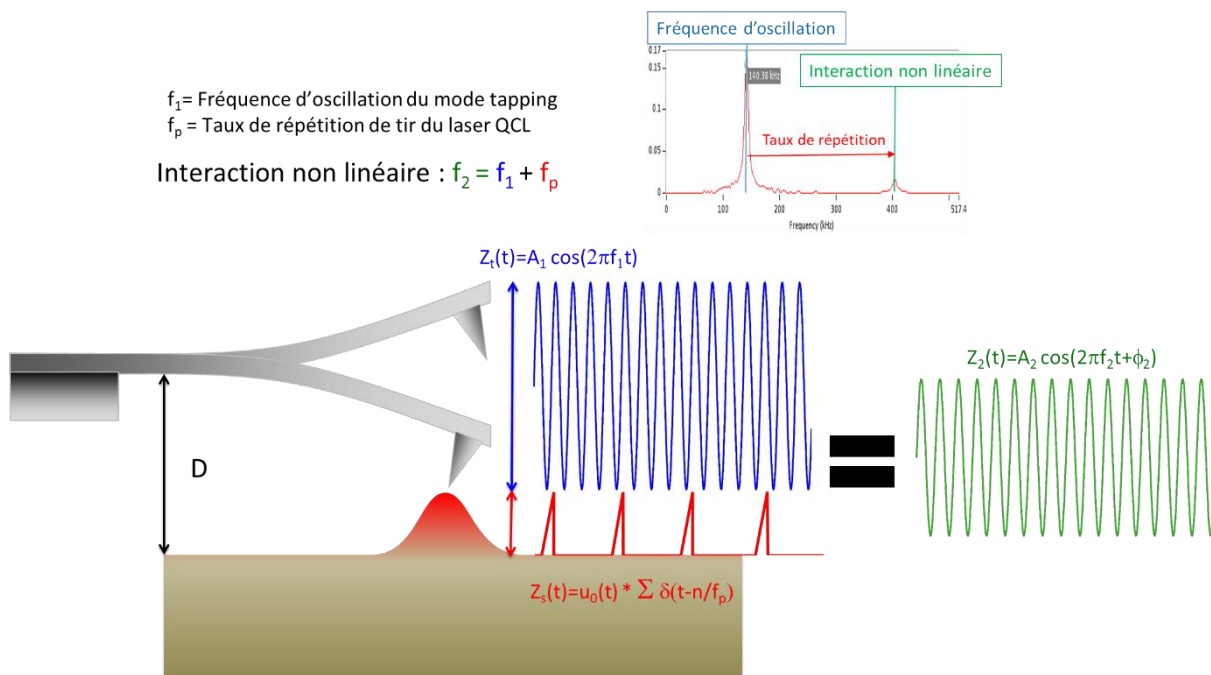


Figure IV-2 : Schéma de principe de l'AFM-IR en mode tapping – Le levier en mode tapping oscille à une fréquence f_1 et le taux de répétition du laser est fixé à une fréquence f_p de sorte que la somme corresponde au second mode d'oscillation du levier (encart en haut à droite). La somme de fréquence de l'oscillation du levier et de celle de l'objet du fait de l'expansion

photothermique conduit à générer par interaction non linéaire une oscillation de fréquence f_2 qui contient l'information sur l'absorption IR de l'objet situé sous la pointe

Expérimentalement, le fonctionnement de l'AFM-IR en mode tapping sera le suivant : avant d'approcher de la surface, on cherche à connaître les fréquences des différents modes du levier. Pour cela, le système réalise un balayage en fréquence par l'actionneur piézoélectrique sur une gamme de fréquences comprises entre 10 kHz et 1 Mhz. Ensuite, les deux modes tapping sont identifiés comme étant les fréquences f_1 (pour le mode fondamental) et f_2 (pour le 2^{ème} mode). L'approche de la surface se déroule de manière classique avec une boucle d'asservissement sur l'amplitude des oscillations à la fréquence f_1 . Une fois la pointe en contact intermittent, le laser est paramétré de sorte que le taux de répétition de tir f_p soit égal à la différence des deux modes soit $f_p = f_2 - f_1$. Pour réaliser la mesure de l'absorption IR, il suffit de démoduler le signal de déflexion à la fréquence f_2 . L'acquisition de spectres d'absorption locaux est similaire à ce qui est fait en AFM classique : la pointe est maintenue à une position fixe pendant que le laser est accordé sur les différents nombres d'onde. À partir de la démodulation à la fréquence f_2 , il est possible de reconstituer séquentiellement le spectre d'absorption local. Pour la cartographie à un nombre d'onde donné, l'acquisition se fait en simultanée de la topographie. Pour cela, le mode fondamental de fréquence f_1 est utilisé par la boucle de contre-réaction pour donner l'image de topographie et la démodulation à la fréquence du second mode f_2 donne directement le signal IR s'il y a génération d'un signal hétérodyne, c'est-à-dire absorption IR au nombre d'onde considéré. L'avantage principal ici est que les images de topographie et infrarouge sont intrinsèquement corrélées. De plus, l'interaction non linéaire permet de s'affranchir du « suivi des modes de résonances », car les modes tapping sont fixés par les caractéristiques du levier et non par le contact pointe-échantillon qui peut évoluer au cours du déplacement sur la surface. Il est à noter qu'il est également possible d'obtenir un résultat équivalent à partir d'une différence de fréquence de manière analogue à ce qui est fait en HFM. Dans ce cas, c'est le deuxième mode qui est utilisé pour faire l'imagerie AFM tapping en topographie et le signal IR sera obtenu en démodulant le signal à la fréquence du mode fondamental.

Si l'on reprend l'exemple des nanoparticules de PLA, on constate qu'avec ce mode, il est alors possible d'observer une topographie plus conforme avec ce qui est attendu pour ce genre d'objet (Figure IV-3). De plus, la distribution de l'absorption IR du PLA est homogène comme attendu (Figure IV-3 a)). Dans le cas d'une nanoparticule non chargée (sans principe actif), en plus du PLA, on doit pouvoir retrouver le PVA qui est le surfactant utilisé pour stabiliser les édifices. D'après la littérature, cette molécule doit former une couronne autour du cœur de PLA même si elle n'a jamais été observée expérimentalement. En effet, la seule technique ayant une résolution suffisante pour analyser une sous-structuration sans marqueur dans une nanoparticule isolée est la microscopie électronique. Or du fait de la proximité chimique entre les deux molécules, il est impossible d'obtenir un contraste suffisant entre les deux éléments. Les seules preuves de la présence de PVA sont donc des preuves indirectes [162]. Pour répondre à cette question, une cartographie d'absorption IR de la nanoparticule à un nombre d'onde correspondant à une bande d'absorption du PVA (1415 cm^{-1}) a été réalisée (Figure IV-3 b)). Sur cette image, il est possible d'observer la répartition du PVA et de la comparer avec celle du PLA de la Figure IV-3 a)). On constate alors que le PVA se situe préférentiellement autour de la nanoparticule. La disposition particulière du PVA par rapport à la structure de la nanoparticule peut être due au séchage qui conduit le PVA à plutôt s'accumuler sous la nanoparticule (Figure IV-3 c)). À partir de la complémentarité des deux cartographies IR, il est donc possible de confirmer la structure noyau/couronne présumée. Ce résultat obtenu en AFM-IR en mode tapping est la première visualisation directe de ce type de structure. Il est à noter que l'épaisseur de la couche de PVA observée ici ne dépasse pas 10 nm. Cela démontre donc qu'au niveau de la sensibilité, le mode tapping AFM-IR est équivalent à l'AFM-IR en

résonance forcée. L'utilisation d'une interaction non linéaire pour la détection de l'absorption IR ne semble donc pas limitante pour la sensibilité de mesure.

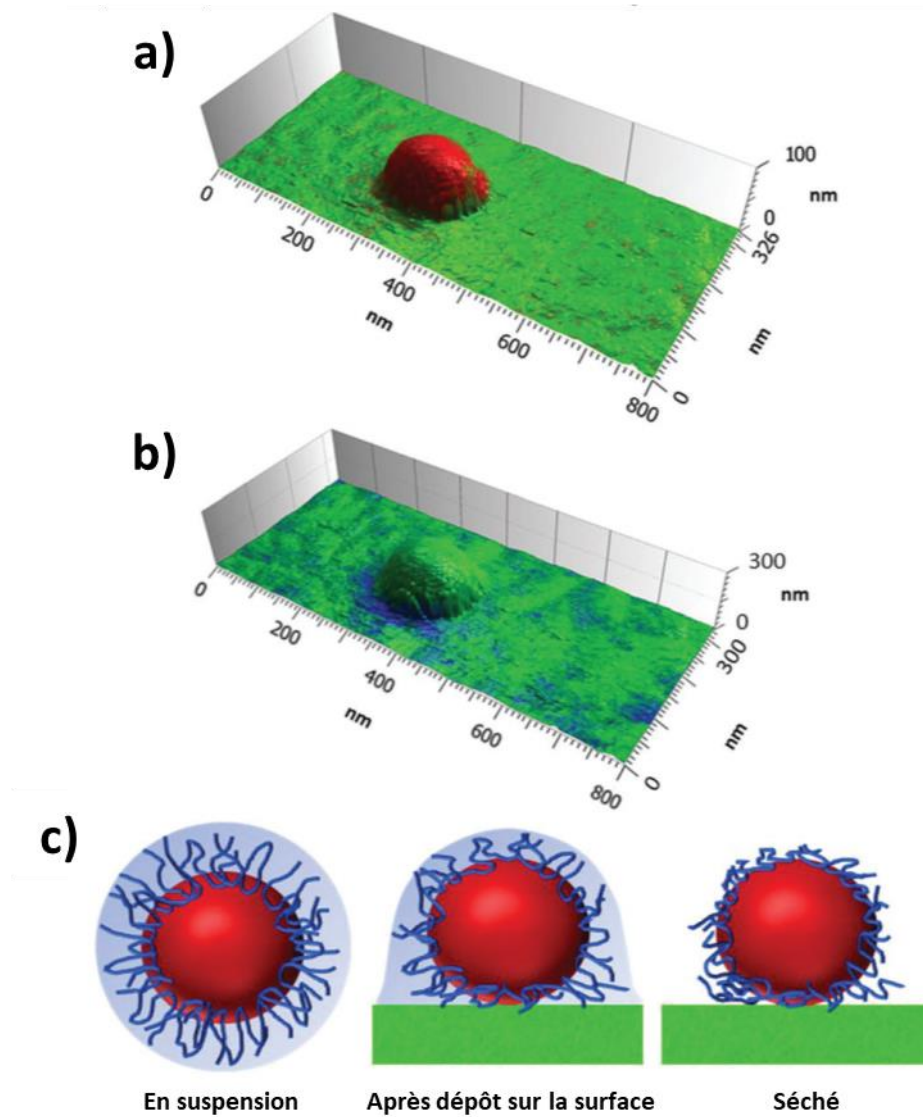


Figure IV-3 : Analyse d'une nanoparticule de PLA/PVA par la technique AFM-IR en mode tapping – a) Image 3D de la nanoparticule obtenue en superposant la topographie en mode tapping (relief) et la cartographie chimique d'absorption à 1760 cm^{-1} . L'échelle de la couleur est la suivante : vert, pas d'absorption IR ; plus le rouge est intense plus l'absorption IR est forte – b) Superposition 3D de la topographie en mode tapping (relief) et de la cartographie chimique d'absorption obtenue à 1415 cm^{-1} . L'échelle de la couleur est la suivante : vert, pas d'absorption IR ; plus le bleu est intense plus l'absorption IR est forte – c) Schéma de principe décrivant le comportement de la couronne de PVA lors de la déshydratation – Figure extraite de [158]

3. Mise en équation de l'AFM-IR en mode tapping

La démonstration exposée ici reprend la théorie exposée dans l'article de J. Mathurin et al., publié en 2018 dans *Analyst*, [158] avec l'introduction d'une simplification supplémentaire.

Pour décrire le mode tapping AFM-IR, on définit le mode fondamental (pulsation ω_1) lié à la topographie de la surface et le deuxième mode (pulsation ω_2) au signal infrarouge. L'amplitude du mode fondamental est représentée par A_1 et la distance levier-échantillon est appelé D (Figure IV-4).

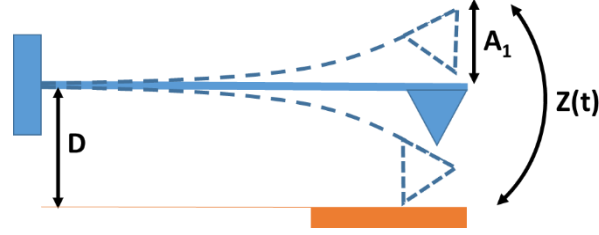


Figure IV-4 : Schéma du levier AFM oscillant en mode tapping et les principaux paramètres de mesure utilisés

Pour décrire le mouvement de la pointe respectivement à la fréquence du premier et du second mode, on utilise les équations différentielles suivantes :

$$\ddot{z}' + \Gamma \dot{z}' + \omega_1^2 z' = \frac{F_{ts}(t)}{m_1^*} + \frac{F_{piezo}}{m_1^*} \cos(\omega_1 t) \quad (\text{IV-1})$$

$$\ddot{z} + \Gamma \dot{z} + \omega_2^2 z = \frac{F_{ts}(t)}{m_2^*} \quad (\text{IV-2})$$

Avec z' la position du levier dans le cas de l'oscillation du levier dans le mode fondamental et z la position du levier dans le cas de l'oscillation dans le deuxième mode, Γ le facteur d'amortissement du levier, ω_i la pulsation du i -ème mode étudié, m_i^* la masse réduite associée au i -ème mode, F_{ts} la force due à l'interaction entre la pointe et la surface ainsi que F_{piezo} la force due à l'excitation piézoélectrique générant l'oscillation du mode tapping.

Une manière simple pour résoudre une équation différentielle est d'utiliser la transformée de Fourier pour simplifier les expressions puis d'appliquer la transformée inverse pour avoir la solution finale. L'expression obtenue à partir de l'équation (IV-2) donne directement la transformée de Fourier de l'amplitude du 2^{ème} mode :

$$\tilde{z}(\omega) = \frac{\tilde{F}_{ts}(\omega)}{m_2^*} \frac{1}{\omega_2^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (\text{IV-3})$$

L'expression de $\tilde{z}(\omega)$ contient un produit de deux termes. Le premier $\frac{\tilde{F}_{ts}(\omega)}{m_2^*}$ correspond à la source d'excitation tandis que le second $\frac{1}{\omega_2^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega}$ correspond à la fonction de transfert associée au deuxième mode de résonance du levier.

Pour résoudre l'équation (IV-3), il est nécessaire de décrire la force d'interaction F_{ts} entre la pointe et la surface. La force F_{ts} due à l'interaction entre la pointe et la surface présente deux composantes. La première est liée à l'oscillation du levier en mode tapping, la seconde est liée à l'expansion thermique $u(t)$ de l'échantillon due à l'éclairage laser. En considérant que le contact entre la pointe et la surface suit le modèle de Hertz, on peut exprimer la force F_{ts} de la manière suivante :

$$F_{ts}(t) = k_z (z'(t) - D)^{3/2} \quad (\text{IV-4})$$

Avec k_z la constante de raideur du contact, $z'(t)$ la position de la pointe au cours du temps et D la distance entre le levier au repos et la surface.

Pendant l'oscillation du mode fondamental ($z'(t)$), la force F_{ts} ne s'applique que lorsque la pointe touche la surface. On définit τ le temps de résidence de la pointe sur la surface :

$$\tau = \frac{2}{\omega_1} \arccos\left(\frac{D}{A_1}\right) \quad (\text{IV-5})$$

Avec A_1 l'amplitude du mode fondamental.

Le temps de résidence est donc directement relié à la force de contact (aussi appelé «setpoint») choisie pour la mesure soit le rapport $\frac{D}{A_1}$.

La force F_{ts} ne s'applique que lorsque la pointe touche la surface. Pour prendre en compte cette réalité physique, il est possible d'appliquer une fonction porte $\Pi(\tau)$. Pour décrire le contact intermittent que provoque le mode fondamental, on peut définir $z_{tap}(t)$ qui correspond à l'oscillation de la pointe lors du contact pour un cycle d'interaction comme :

$$z_{tap}(t) = \Pi(\tau)[A_1 \cos(\omega_1 t + \varphi) - D] \quad (IV-6)$$

avec $A_1 \cos(\omega_1 t + \varphi)$ qui décrit l'oscillation du mode fondamental.

En remplaçant cette dernière expression dans l'équation (IV-4), on obtient l'expression de $F_{ts}(t)$ dans le cas où il y a aussi l'expansion thermique de l'objet $u(t)$:

$$F_{ts}(t) = k_z(z_{tap}(t) - u(t))^{3/2} \quad (IV-7)$$

Dans cette expression de $F_{ts}(t)$, deux mouvements apparaissent : celui du levier en oscillation et celui de la surface en expansion thermique. Ces mouvements sont ici en opposition et l'interaction observée est similaire à celle décrite dans le cas du HFM. Par analogie avec le raisonnement effectué dans le cas de cette seconde technique [159], il est possible de linéariser l'expression de $F_{ts}(t)$ par un développement limité comme :

$$F_{ts}(t) = k_z(z_{tap}(t) - u(t)) + \chi_s(z_{tap}(t) - u(t))^2 + \dots \quad (IV-8)$$

Avec χ_s le module d'élasticité non linéaire de la surface en contact avec la pointe.

L'expression de la dilatation thermique $u(t)$ est la même que dans le cas de la résonance forcée (Chapitre II, p. 40), c'est-à-dire :

$$u(t) = B_{th}\Delta T(t) * \sum_{m=0}^{+\infty} \delta(t - mT_0) \quad (II-1)$$

Avec B_{th} un terme décrivant les propriétés thermiques de l'objet (cf. Chapitre I, p. 28) et $\Delta T(t)$ décrivant la loi thermique de l'objet après l'absorption IR (cf. Chapitre I, p. 23). T_0 est la période de tir du laser QCL.

En étudiant l'équation (IV-8), on constate que les termes linéaires de l'équation ne vont générer que des signaux aux pulsations ω_0 ou ω_1 . Donc, ils ne contribueront pas à la réponse du signal à ω_2 . En ce qui concerne la partie d'ordre 2, les termes carrés vont donner des termes en $2\omega_0$ ou $2\omega_1$. Ici encore, ces pulsations ne contribueront pas au signal à ω_2 . En conséquence, seul le double produit peut donner un signal en ω_2 . Dans ces conditions, on peut écrire la force F_{ts} sous la forme :

$$F_{ts}(t) = -2\chi_s z_{tap}(t)u(t)$$

$$F_{ts}(t) = -2\chi_s B_{th} \Pi(\tau)[A_1 \cos(\omega_1 t + \varphi) - D] * \sum_{n=0}^{+\infty} \delta(t - nT_1) \cdot \Delta T(t) * \sum_{m=0}^{+\infty} \delta(t - mT_0) \quad (IV-9)$$

Contrairement à la théorie présentée dans l'article [158], une hypothèse supplémentaire est utilisée ici pour simplifier l'expression de $F_{ts}(t)$. On considère que la force d'interaction entre la pointe et la surface due à l'oscillation tapping (c'est-à-dire sans prendre en compte l'expansion thermique de l'objet) est constante durant le temps de résidence. Cette hypothèse est valable quand le matériau est rigide (c'est-à-dire quand $k_z \gg k_c$). Dans ces conditions, il est possible de considérer que le terme cosinus tend vers 1 et alors l'expression (IV-9) est simplifiée :

$$F_{ts}(t) = -2\chi_s \Pi(\tau)[A_1 - D] * \sum_{n=0}^{+\infty} \delta(t - nT_1) \cdot B_{th} \Delta T(t) * \sum_{m=0}^{+\infty} \delta(t - mT_0) \quad (IV-10)$$

La convolution par un peigne de Dirac de période T_1 , $\sum_{n=0}^{+\infty} \delta(t - nT_1)$, permet de prendre en compte la périodicité du terme cosinus.

On applique ensuite la transformée de Fourier à l'expression de $F_{ts}(t)$ simplifiée :

$$\widetilde{F}_{ts}(\omega) = -2\chi_s \left[2\tau \frac{\sin(\frac{\omega\tau}{2})}{\omega\tau} (A_1 - D) \cdot \frac{2\pi}{T_1} \sum_{n=0}^{+\infty} \delta(\omega - n\omega_1) \right] * \left[u_0 \frac{t_p}{2} \omega_0 \sum_{m=0}^{+\infty} \delta(\omega - m\omega_0) \right] \quad (\text{IV-11})$$

Comme le temps de résidence τ est très petit devant la période des oscillations du levier et du tir laser, on peut considérer que le rapport $\omega\tau$ tend vers 0 et donc que le terme en sinus tend vers 1, d'où :

$$\widetilde{F}_{ts}(\omega) = -\chi_s \tau (A_1 - D) u_0 t_p \omega_1 \omega_p \left[\sum_{n=0}^{+\infty} \delta(\omega - n\omega_1) \right] * \left[\sum_{m=0}^{+\infty} \delta(\omega - m\omega_0) \right] \quad (\text{IV-12})$$

L'expression finale de $\widetilde{F}_{ts}(\omega)$ donnée dans l'équation (IV-12) est le produit de convolution de deux peignes de Dirac. Ce produit peut être examiné en considérant uniquement deux couples de paramètres possibles pour n et m . Les autres combinaisons n'étant pas pertinentes pour notre cas.

a) *Premier cas $n = 1$ et $m = 1$: la somme de fréquence*

En considérant le couple de paramètres ($n = 1$ et $m = 1$), il est possible de résoudre le produit de convolution. L'expression (IV-12) devient alors :

$$\widetilde{F}_{ts}(\omega) = -\chi_s \tau (A_1 - D) u_0 t_p \omega_1 \omega_0 \delta(\omega - (\omega_1 + \omega_0)) \quad (\text{IV-13})$$

En remplaçant cette expression de $\widetilde{F}_{ts}(\omega)$ dans l'équation (IV-3), on obtient :

$$\tilde{z}(\omega) = \frac{-\chi_s \tau (A_1 - D) u_0 t_p \omega_1 \omega_0 \delta(\omega - (\omega_1 + \omega_0))}{m_2^*} \frac{1}{\omega_2^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (\text{IV-14})$$

L'expression de $\tilde{z}(\omega)$ est donc composée par une fonction liée à l'excitation et la fonction de transfert du levier. L'excitation qui résulte du mélange du pulse laser avec l'oscillation ω_1 est représentée par une distribution de Dirac. En conséquence, $\tilde{z}(\omega)$ est maximale uniquement quand $\omega_1 + \omega_0 = \omega_2$, c'est-à-dire quand la somme de fréquence du mode fondamental et de la fréquence de la dilatation thermique correspondent à la fréquence du maximum du pic du mode de résonance. Dans ces conditions, l'expression de l'amplitude du deuxième mode est donnée par :

$$\|\tilde{z}(\omega)\| = \chi_s u_0 \frac{\tau t_p (A_1 - D)}{m_2^*} \frac{\omega_1 \omega_0}{\Gamma \omega_2} \quad (\text{IV-15})$$

Comme $Q_2 = \frac{\omega_2}{\Gamma}$ et $\omega_0 = \omega_2 - \omega_1$ alors l'équation (IV-15) devient :

$$\|\tilde{z}(\omega)\| = \chi_s u_0 \frac{\tau t_p (A_1 - D)}{m_2^*} \frac{\omega_1 (\omega_2 - \omega_1)}{\omega_2^2} Q_2 \quad (\text{IV-16})$$

En reprenant dans l'équation (IV-16), l'expression de $\tilde{u}(\omega)$ donnée dans l'équation (I-34) et celle de T_{\max} définie dans l'équation (I-18) (cf. Chapitre I, p. 28 et 23), on obtient l'expression finale en fonction de l'absorbance :

$$\|\tilde{z}(\omega)\| = B_{th} \left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right) t_p \frac{I_{inc} \alpha_{opt} V \ln 10}{V \rho C_p} \frac{1}{4\pi d} \chi_s \frac{\tau t_p (A_1 - D)}{m_2^*} \frac{\omega_1 (\omega_2 - \omega_1)}{\omega_2^2} Q_2 \dot{A}(\sigma) \quad (\text{IV-17})$$

L'expression finale montre bien la relation directe entre $\|\tilde{z}(\omega)\|$ et l'absorbance de l'objet. Le signal AFM-IR détecté est bien directement proportionnel à l'absorption IR de l'objet situé sous la pointe de manière analogue avec ce qui est obtenu en AFM-IR en mode contact.

b) Deuxième cas $n = 1$ et $m = -1$: la différence de fréquence

Dans le cas de la mesure en différence de fréquence, on considère maintenant le couple de paramètres ($n = 1$ et $m = -1$). La pulsation liée à l'imagerie en mode tapping est maintenant ω_2 et la différence de ω_0 à ω_2 doit être égale à ω_1 , fréquence à laquelle le signal IR est démodulé. Dans ces conditions, la résolution du produit de convolution de l'expression (IV-14) donne :

$$\widetilde{F}_{ts}(\omega) = -\chi_s \tau (A_2 - D) u_0 t_p \omega_2 \omega_0 \delta(\omega - (\omega_2 - \omega_0)) \quad (IV-18)$$

En utilisant cette expression de $\widetilde{F}_{ts}(\omega)$ dans l'expression de $\widetilde{z}(\omega)$ énoncée précédemment (IV-3), on obtient :

$$\widetilde{z}(\omega) = \frac{-\chi_s \tau (A_2 - D) u_0 t_p \omega_2 \omega_0 \delta(\omega - (\omega_2 - \omega_0))}{m_1^*} \frac{1}{\omega_1^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (IV-19)$$

De manière analogue à la somme de fréquence, on obtient l'expression de l'amplitude de l'oscillation :

$$\|\widetilde{z}(\omega)\| = B_{th} \left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right) t_p \frac{I_{inc} \alpha_{opt} V \ln 10}{v \rho C_p} \frac{\chi_s \tau t_p (A_2 - D)}{m_1^*} \frac{\omega_2 (\omega_1 - \omega_2)}{\omega_1^2} Q_1 A(\sigma) \quad (IV-20)$$

L'expression obtenue ici est similaire à celle de la mesure en somme de fréquence (équation (IV-17)).

En considérant que la force de contact est gardée identique entre les deux mesures (c'est-à-dire $A_1 - D = A_2 - D$), le rapport des deux cas, obtenus en (IV-17) et en (IV-20) nous donne :

$$\frac{\|\widetilde{z}(\omega)\|_{différence}}{\|\widetilde{z}(\omega)\|_{somme}} = \frac{\frac{t_p}{2} + \tau_{relax,2}}{\frac{t_p}{2} + \tau_{relax,1}} \frac{m_2^* \omega_2^3 Q_1}{m_1^* \omega_1^3 Q_2} \quad (IV-21)$$

Avec $\tau_{relax,1}$ et $\tau_{relax,2}$ les temps de relaxation associés respectivement au premier et second modes.

On constate que ce rapport peut indiquer la manière la plus sensible de détecter l'infrarouge. Si le rapport est supérieur à un alors il faut choisir le deuxième mode pour la topographie, en revanche si le rapport est inférieur à un alors il faut choisir le premier mode. Compte tenu des paramètres modaux ($\omega_1, \omega_2, m_1^*, m_2^*$) et les facteurs de qualité des deux modes considérés, il est possible pour chaque levier d'estimer ce rapport et ainsi de choisir préalablement s'il vaut mieux faire la mesure hétérodyne sur la somme ou la différence de fréquence.

c) Conséquences sur la mesure

Les expressions de $\widetilde{z}(\omega)$ obtenues dans les deux cas montrent qu'il est possible d'augmenter le signal obtenu indépendamment de l'absorbance. En effet dans les deux expressions, il apparaît un terme en $(A_x - D)$ qui correspond à un paramètre propre à la mesure AFM et qui peut être modifié en jouant sur deux paramètres : la force motrice de l'oscillation et la valeur de la force de contact. La valeur de force de contact (aussi appelée setpoint) correspond à la valeur consigne contrôlant le contact de la pointe avec la surface. Il définit le

rapport $\frac{D}{A_x}$. Une diminution de la valeur de force de contact va donc conduire à une augmentation de la différence ($A_x - D$). La force motrice de l'oscillation régit l'amplitude de l'oscillation du levier. Une augmentation de sa valeur va conduire à augmenter directement la valeur de l'amplitude de l'oscillation du mode observé A_x et donc augmenter directement le signal IR. En modifiant ces deux paramètres de mesures, il est possible d'augmenter le signal IR observé, et donc d'améliorer la sensibilité de la mesure, sans avoir à augmenter la puissance du laser.

Expérimentalement, il est apparu que si l'amplitude de mode tapping dans l'air est trop faible (10-20 nm) et que la valeur de force de contact est choisie dans le même ordre de grandeur que pour une mesure en mode contact, alors le signal obtenu en AFM-IR est relativement peu intense par rapport à ce qui est observé en AFM-IR en mode contact. Les raisons de la faiblesse du signal sont d'une part qu'il s'agit d'une interaction non linéaire et d'autre part qu'il faut que l'expansion thermique de l'objet se produise quand la pointe entre en contact avec l'échantillon, ce qui n'arrive pas de manière efficace en mode hétérodyne. Pour compenser cette perte d'efficacité, il est nécessaire d'améliorer le signal à partir du paramètre ($A_x - D$). Dans les faits, il est nécessaire de diminuer le setpoint d'au moins 10%-20% de sa valeur initiale et de doubler ou tripler la valeur de l'amplitude du mode tapping à l'air libre. Ensuite seulement on augmente la puissance laser. Sans cela il n'est pas possible d'obtenir un signal AFM-IR suffisamment intense pour être détecté.

III. Exemples d'applications de l'AFM-IR en mode tapping

Au cours de ma thèse, l'AFM-IR en mode tapping a été utilisée pour i) la caractérisation de nanoparticules polymériques (notées par la suite Nps) dont les premiers résultats ont été présentés lors de la preuve de concept de l'AFM-IR en mode tapping [158] et ii) l'étude de la matière organique dans des micrométéorites ultra-carbonées d'Antarctique (notées par la suite UCAMMs) [163].

1. Étude de la structure de nanoparticules polymériques

Le projet qui va maintenant être présenté a été mené en collaboration avec l'équipe de R. Gref de l'Institut des Sciences moléculaires d'Orsay (ISMO, Orsay). La spécialité de cette équipe est la synthèse de systèmes à base de nanoparticules polymériques pour la vectorisation de médicaments. Le but de ce projet est d'améliorer la compréhension des systèmes ainsi synthétisés, d'une part en réussissant à caractériser leur structure à l'échelle de la nanoparticule unique et, d'autre part à observer les changements chimiques intervenant lors de l'absorption de ces systèmes par des cellules. Cette collaboration a donné lieu à deux publications durant ma thèse, l'une dans *Particle and Particle Systems Characterization* [164], l'autre dans *Analyst* [158].

Les Nps sont de plus en plus populaires pour la vectorisation de principes actifs d'intérêt pharmaceutique [165]-[168] ou cosmétique. Dans le domaine médical, le but de ce type de système est de dépasser les contraintes physico-chimiques imposées par la molécule d'intérêt, comme les problèmes d'hydrophobicité, ou encore d'effets secondaires dus à des concentrations élevées du principe actif lors du traitement [169], qui peuvent diminuer sa biodisponibilité ou l'empêcher d'atteindre ses cibles thérapeutiques. Le concept est de pouvoir encapsuler le principe actif à l'intérieur d'un véhicule qui l'amènera sans dégradation à

proximité de ces cibles. La vectorisation d'antibiotique présentant des résistances est une application possible de ce type de système Np/molécule d'intérêt. Par exemple, J. Costas-Gouveia et al. ont proposé d'utiliser des Nps associées à un principe actif pour améliorer le traitement de la tuberculose par l'éthionamide, antibiotique ayant des problèmes de résistance bactérienne et des effets secondaires importants apparaissant à haute concentration [170]. Pour que ce type de système soit efficace, il est nécessaire de maîtriser la libération de l'antibiotique de sorte qu'elle soit ciblée au niveau de la zone d'intérêt et qu'elle se fasse de manière contrôlée, notamment pour éviter les effets de relargage brutal qui diminuerait l'efficacité de la vectorisation [165]. Pour répondre à ces enjeux, il apparaît donc nécessaire de comprendre en détail la structure du système Np-antibiotique formé. Les paramètres clés sont :

- L'état et la distribution spatiale de l'antibiotique au sein de la Np
- La compréhension des phénomènes physico-chimiques impliqués dans l'absorption des Nps par les cellules et leur devenir.

Dans le cadre de l'étude des différents composants de la Np isolée contenant un antibiotique, la limitation majeure qui apparaît est la taille des objets considérés. En effet, les Nps sont des objets dont la taille caractéristique est très inférieure au micromètre. Étudier la répartition de ces composants comme par exemple celle de l'antibiotique nécessite donc des résolutions spatiales de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Du fait des dimensions des Nps, les principales techniques ayant une résolution latérale suffisante sont celles de microscopie électronique. Or les différents éléments de la Np sont très proches les uns des autres d'un point de vue de la composition atomique et il va être nécessaire là aussi de marquer au moins un des éléments à l'aide de contrastants pour pouvoir obtenir sa répartition spatiale (Figure IV-5). Or cette étape peut fortement perturber la formulation et risquer de déstabiliser la Np formée ou de modifier les répartitions des différents éléments.

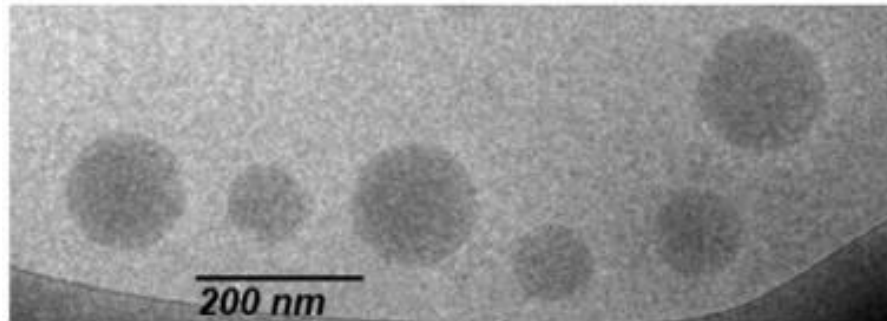


Figure IV-5 : Cliché de cryo-TEM de Nps à base de PLA et contenant un antibiotique, l'éthionamide, ainsi qu'un principe actif supplémentaire, appelé booster, augmentant l'efficacité de l'antibiotique – Sans marquage il apparaît impossible de distinguer les différents éléments du système – Figure adaptée de [170]

La technique la plus populaire pour l'étude de l'internalisation des Nps en milieu cellulaire est la microscopie fluorescente. Elle nécessite de marquer les Nps. Or il a été montré que dans le cas de marqueurs attachés physiquement à la Np, il existe des problèmes de fuite et de transfert du marqueur qui vont quitter la Np et soit diffuser dans le milieu soit s'attacher à d'autres éléments [171]–[174]. Dans le cas des marqueurs liés covalentement avec un des éléments de la Np, ils peuvent conduire à modifier la forme, la taille ou les propriétés de surfaces de l'objet. De telles modifications peuvent avoir de fortes conséquences sur l'internalisation des Nps [175]. De plus pour suivre le devenir des différents éléments (polymères de la Np et antibiotique), notamment lors du relargage de l'antibiotique, il peut être nécessaire de faire un double marquage amplifiant les problèmes cités précédemment. De plus, que ce soit en fluorescence pour l'étude de l'internalisation de la Np ou en microscopie électronique pour la caractérisation d'une Np isolée, les informations obtenues se limitent surtout à des

informations de localisation et il va être compliqué d'extraire des informations sur la physico-chimie des processus comme la dégradation du polymère ou une possible altération de l'antibiotique.

Pour répondre à ces problématiques, des techniques ne nécessitant pas de marquage et pouvant apporter des informations chimiques comme la microscopie Raman ont été utilisées pour l'étude d'objets analogues absorbés par les cellules comme par exemple par M. Diem et al. pour la détection de liposomes dans des cellules eucaryotes [176] ou encore des microsphères de PLGA dans des macrophages par A. Van Apeldoorn et al. [177]. Cependant dans le cas de la microscopie Raman, la résolution latérale utilisée est limitée par le critère de diffraction de manière identique à la spectroscopie IR (cf. l'équation (I-13) Chapitre I, p. 9). En conséquence, malgré le fait que le faisceau d'excitation utilisé soit dans le domaine du visible et non pas de l'infrarouge, la résolution de la technique est souvent de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres voire du micromètre et est donc supérieure à la taille des Nps observées. Dans ces conditions, s'il est possible de localiser précisément une Np et d'obtenir une information chimique moyenne sur l'ensemble de la Np, il est impossible de mener une étude plus poussée au sein de la Np. De même, les résolutions mises en jeu ici excluent toutes possibilités d'étude de répartition de composants au sein de la Np.

C'est dans ce contexte qu'un projet a été développé au cours de ma thèse dans le but d'utiliser la technique AFM-IR pour étudier les Nps polymériques. Avec l'amélioration d'au moins un ordre de grandeur de la résolution de l'AFM-IR par rapport à la microscopie, il sera possible de caractériser sans difficulté la structure d'une Np donnée et d'étudier ensuite les phénomènes mis en jeu à l'échelle de cette même Np dans la cellule.

Ce projet s'est focalisé sur des Nps cœur-coquille purement polymériques formées d'un cœur soit d'acide polylactique (noté par la suite PLA) soit d'acide polylactique-co-glycolique (noté par la suite PLGA) et d'une coquille d'alcool polyvinylique (noté par la suite PVA) et chargées avec un antibiotique qui est l'acide pipémidique. Le projet a donné lieu à deux publications. Dans la première publication, la preuve de concept de la localisation sans marquage des Nps polymériques de PLA dans des cellules a été faite [164]. Les résultats obtenus dans cette étude seront détaillés dans le chapitre suivant dans le cadre des essais d'imagerie hyperspectrale avec les lasers QCL (Chapitre V). La seconde publication concerne l'analyse de Nps de PLGA isolées et chargées avec un l'acide pipémidique [158]. Le PLA a été remplacé par le PLGA pour des raisons de formulation chimique, car il a été observé que l'antibiotique utilisé ne se liait pas efficacement au PLA.

Les spectres obtenus en spectroscopie FTIR des différents éléments constituant la Np sont donnés en Figure IV-6. Les résultats obtenus par l'analyse tapping AFM-IR sont donnés en Figure IV-7.

Le premier point à noter est que l'absorbance IR du PLGA se superpose à celle du PVA dans la gamme spectrale de 1300 cm^{-1} à 1500 cm^{-1} (qui correspond majoritairement aux vibrations de déformation des liaisons C-H des groupements CH_2 et CH_3) (Figure IV-6). Il n'est donc pas possible de totalement discriminer l'absorbance d'une des deux molécules par rapport à l'autre. Cependant, il existe des nombres d'ondes où le PLGA absorbe plus que le PVA. En comparant les intensités de la cartographie chimique obtenue à 1425 cm^{-1} , nombre d'ondes où le PLGA absorbe majoritairement (Figure IV-7 b)), à celle obtenue à 1415 cm^{-1} (contribution majoritairement due au PVA) (Figure IV-7 c)), on observe la présence d'une couronne autour de la Np (figurée en pointillée sur les deux cartographies). Il est donc possible de mettre en évidence la structure cœur/coquille observée pour les Nps PLA/PVA (Figure IV-3).

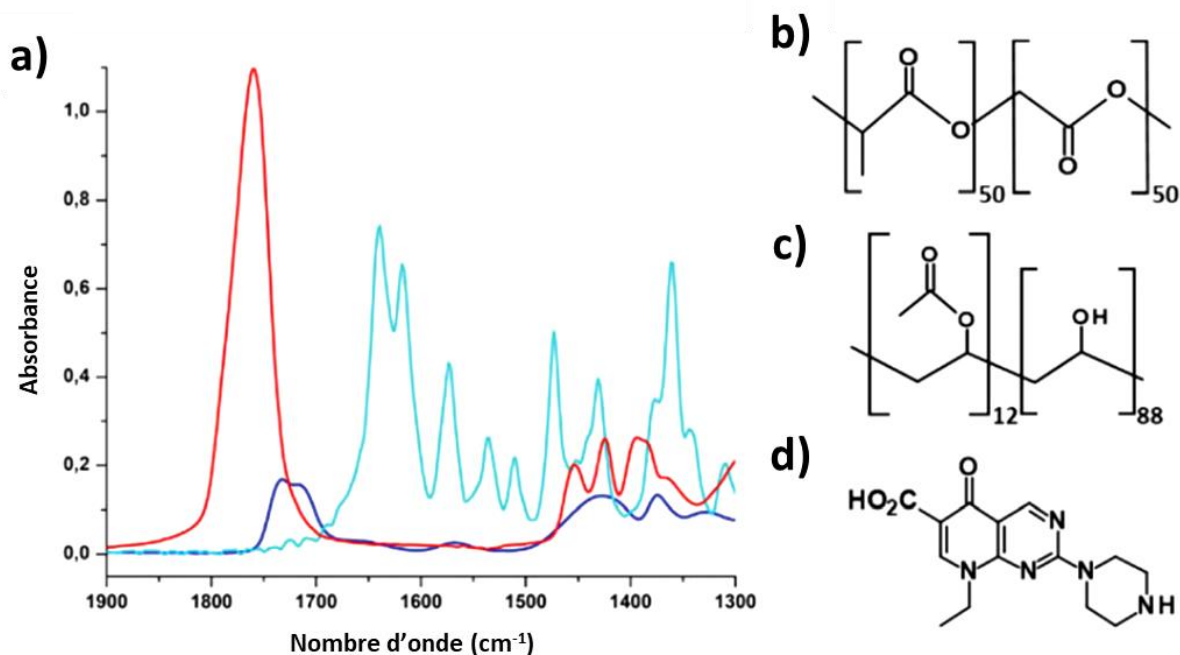


Figure IV-6 : Spectres FTIR et formules chimiques des principaux composés des Nps – a) Spectres FTIR du PLGA (en rouge), du PVA (en bleu) et de l'acide pipémidique (en cyan) – b), c), d) Formules chimiques respectivement du PLGA, du PVA et de l'acide pipémidique – figure extraite de [158]

Est-il possible d'obtenir la distribution spatiale de l'antibiotique associé au PLGA ? Les propriétés des systèmes Np/antibiotique recherchées sont que l'antibiotique soit progressivement relargué par la Np et ceci n'est possible que si l'antibiotique est localisé dans son cœur. Connaître la distribution spatiale de l'antibiotique est donc un élément clé pour valider une formulation. Dans le cas de la formulation de PLGA/PVA et acide pipémidique étudiée ici, il a été observé *in vitro* que le relargage de l'antibiotique n'est pas continu : peu de temps après avoir été mis en solution, l'ensemble de l'antibiotique est relargué dans le milieu ce qui ne correspond pas au comportement attendu pour ce genre de vectorisation. Une étude de la répartition de l'antibiotique à l'échelle de la Np unique devrait pouvoir nous aider à comprendre ce phénomène.

L'acide pipémidique utilisé ici possède une absorption IR dans la gamme spectrale 1600 cm⁻¹ – 1700 cm⁻¹ qui correspond à l'absorption du groupement carbonyle du cycle aromatique pyridopyrimidine (Figure IV-6 d)) et où aucun autre élément de la Np ne présente d'absorption. En effectuant la cartographie chimique à 1640 cm⁻¹, il est donc possible de localiser spécifiquement l'antibiotique (Figure IV-7 d)). Le résultat obtenu montre alors deux choses :

- L'antibiotique est associé à la Np, car l'ensemble du signal est localisé au niveau des Nps
- Contrairement à ce qui est attendu, l'antibiotique n'est pas encapsulé au cœur de la Np, mais avec la couronne de PVA. En effet, la distribution spatiale de l'antibiotique est comparable à celle obtenue pour le PVA avec un effet d'accumulation en bordure de Np. Cette association entre le PVA et l'acide pipémidique est confirmée par l'acquisition de spectres d'absorption IR locaux (Figure IV-7 e)). Le spectre enregistré au niveau de la couronne (spectre en cyan), présente des bandes d'absorption typiques de l'antibiotique et du PVA (cf. Figure IV-6a)) avec notamment la bande d'absorption à 1425 cm⁻¹ des déformations C-H du PVA et l'absorption à 1640 cm⁻¹ du groupement carbonyle du cycle aromatique pyridopyrimidine donner ces bandes. En revanche le

spectre obtenu sur la Np présente uniquement les bandes d'absorption du PLGA avec notamment les trois pics d'absorption à 1340 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} et 1420 cm^{-1}

Cette distribution en périphérie du médicament explique le relargage brutal de celui-ci lors de la mise en solution. En effet, en se trouvant associé non pas avec le PLGA, mais avec le PVA, l'acide pipémidique est plus labile que s'il était pris dans le réseau de PLGA du cœur et entouré par la couronne de PVA. D'où le relargage immédiat de l'antibiotique observé quand la Np est testée in vitro. Les résultats surprenants obtenus ici par l'analyse en mode tapping AFM-IR permettent de confirmer que cette technique est un outil adéquate pour l'analyse des structures des Nps.

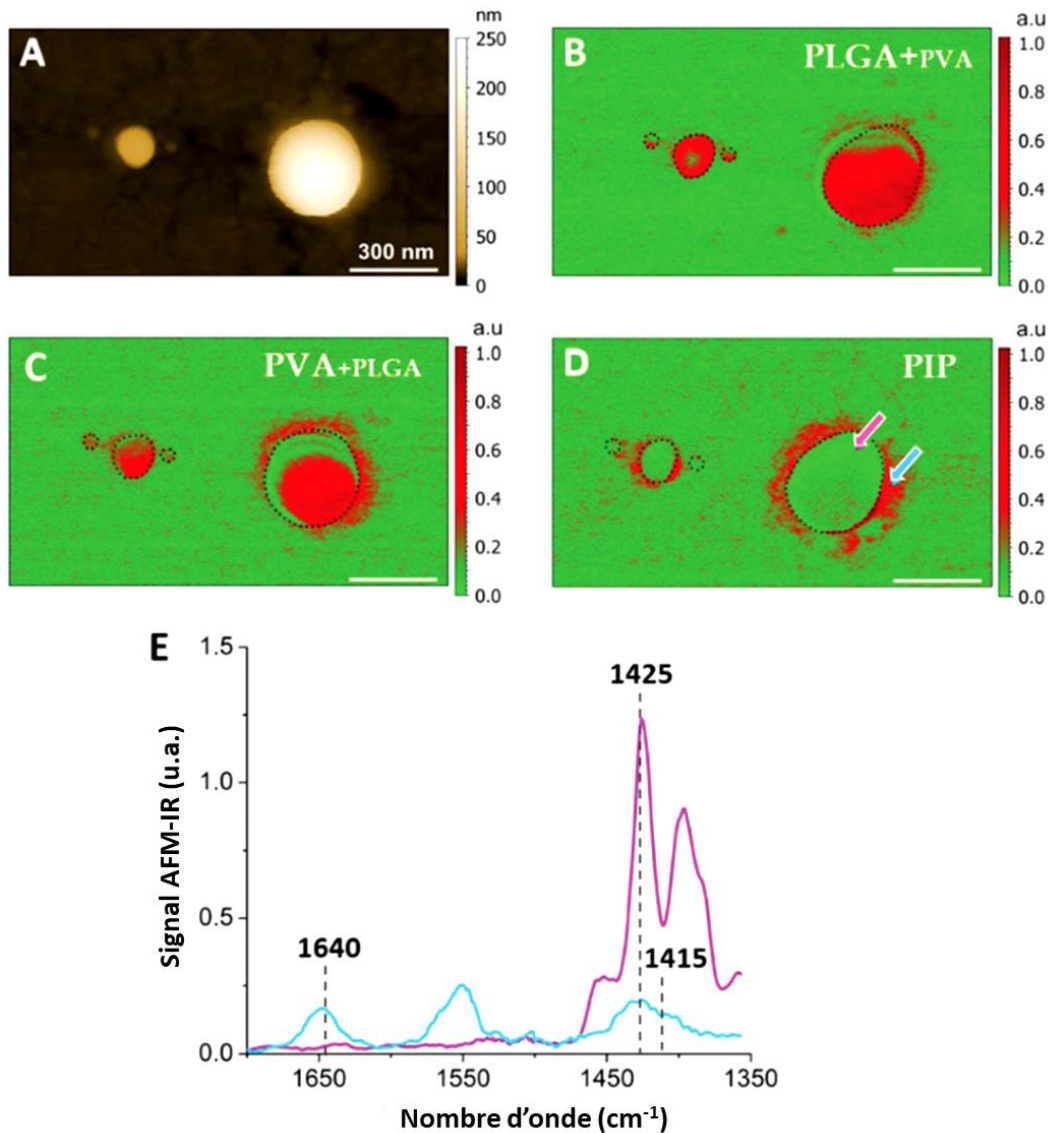


Figure IV-7 : Résultat de l'analyse d'une Np de PLGA/PVA chargée avec de l'acide pipémidique en AFM-IR en mode tapping – a) Image de topographie– b) Cartographie chimique obtenue à 1425 cm^{-1} , nombre d'ondes où l'absorption du PLGA est majoritaire par rapport au PVA – c) Cartographie chimique obtenue à 1415 cm^{-1} , nombre d'ondes où l'absorption du PVA est majoritaire par rapport au PLGA – d) Cartographie chimique obtenue à 1640 cm^{-1} , nombre d'onde spécifique à l'acide pipémidique – e) Spectres d'absorption locaux obtenus au niveau de la couronne (spectre en cyan) et sur la Np (spectre en violet) – Figure extraite de [158]

2. Étude de la matière organique dans les micrométéorites collectées en Antarctique

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une collaboration avec des chercheurs du Centre de Sciences Nucléaires et de Sciences de la Matière (CSNSM, Orsay) et de l'ISMO (Orsay), et a fait l'objet d'une publication dans *Astronomy & Astrophysics* [163]. Il porte sur l'étude des micrométéorites, qui sont des particules de poussière interplanétaire qui tombent naturellement sur Terre (les plus grosses d'entre elles peuvent provoquer le phénomène d'étoiles filantes que l'on peut observer dans le ciel nocturne). Ces poussières représentent l'essentiel de l'apport extraterrestre sur Terre (environ 30,000 tonnes/an), mais du fait de leur petite taille (submillimétrique), il faut aller les rechercher dans les régions les plus propres de la Terre, en particulier les calottes polaires. Grâce au travail pionnier de M. Maurette du CSNSM [178], [179], les micrométéorites sont actuellement collectées dans des conditions optimales en Antarctique, proche de la station Concordia [180]. La collection de micrométéorites Concordia comporte actuellement plusieurs milliers de particules extraterrestres, et les chercheurs ont mis en évidence une nouvelle famille rare d'objets (~1%), les micrométéorites "ultracarbonées" (UCAMMs - pour UltraCarbonaceous Antarctic MicroMeteorites) qui sont probablement d'origine cométaire [181] (Figure IV-8).

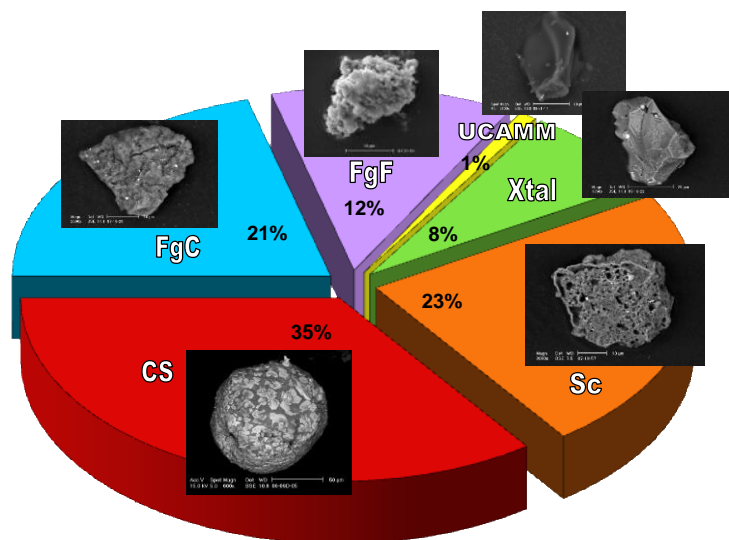


Figure IV-8: Répartition des types texturaux de micrométéorites de la collection Concordia, d'après E. Dobrică et al. [182]. Les particules non fondues sont : Fine-grained compact (FgC), fine-grained fluffy (FgF), crystalline (Xtal) et UCAMMs. Les particules scoriacées (Sc) ont été partiellement fondues lors de l'entrée atmosphérique, et les sphérules cosmiques totalement fondues.

L'étude des UCAMMs, originaires de la partie extérieure du système solaire, est fondamentale pour comprendre les phénomènes à l'origine de la complexification de la matière organique. Ces objets d'origine extraterrestre ont enregistré des phénomènes physico-chimiques liés à la formation et à l'évolution des glaces des comètes, témoins du disque protoplanétaire naissant autour du Soleil. Dans la famille des micrométéorites, les UCAMMs sont des cas particuliers du fait de leur haute teneur en matière organique, mélangée à une composante mineure de minéraux très fins (50-100 nm) [181], [183]–[185]. Ce sont même parmi les seuls objets où il est possible d'analyser cette matière organique sans faire de prétraitement préalable qui dissout les minéraux et rassemble la matière organique comme il est nécessaire de le faire dans le cas des météorites. L'absence de prétraitement chimique pour les UCAMMs limite donc les risques d'artéfacts.

Les techniques généralement utilisées pour l'étude des micrométéorites incluent la microscopie électronique à balayage et en transmission, et les analyses isotopiques à l'aide de spectromètres de masse comme le NanoSIMS. Ces techniques ne permettent pas d'avoir accès directement aux liaisons chimiques qui sont pourtant l'information essentielle pour comprendre les processus physico-chimiques mis en jeu dans la formation de la matière organique extraterrestre. La microscopie X en absorption (STXM-XANES) est également utilisée lorsque les échantillons peuvent être préparés en couches ultraminces (100 nm) et permet un accès aux liaisons chimiques, mais certains groupes fonctionnels ne peuvent pas toujours être entièrement séparés en raison de la proximité de certaines résonances. Les groupements chimiques peuvent cependant être rassemblés en plusieurs familles pour l'analyse, fournissant alors des données semi-quantitatives à quantitatives en fonction du recouvrement des réponses des groupes fonctionnels étudiés. Ce sont les techniques de spectroscopie vibrationnelle comme la spectroscopie d'absorption IR et la spectroscopie Raman qui permettent d'accéder le plus directement aux liaisons chimiques. Il est possible d'analyser la matière organique par spectroscopie Raman ou infrarouge (IR) à l'échelle de quelques microns, mais les UCAMMs contiennent des inclusions minérales de taille typique allant de 50 à 100 nm, bien inférieure à la limite de diffraction imposée par ces techniques. L'analyse dite « classique » IR sur synchrotron moyenne donc la réponse de l'échantillon sur une échelle spatiale avec des tailles de spot typiques échantillonnant une gamme de quelques micromètres dans l'IR moyen, environ 100 fois supérieure à celle des minéraux inclus. L'utilisation de ces techniques pour l'étude des UCAMMs constitue donc un vrai challenge.

De plus, du fait de l'ensemble des processus mis en jeu dans les glaces, la matière organique des UCAMMs est plutôt analogue à un polymère statistique obtenu par chimie radicalaire. Cet analogue de polymère statistique va avoir comme base le carbone et va contenir des cycles riches en doubles liaisons C=C qui vont former un réseau réticulé. Or, l'intensité d'absorption infrarouge des groupements C=C est intrinsèquement faible (comme il a pu être montré par E. Dartois et al. [186], [187]) et donc l'intensité du spectre résultant sera très faible. Les processus chimiques introduisant de l'hétérogénéité comme par exemple l'oxydation d'une liaison C=C en liaison C=O vont se faire en différentes positions de ce réseau. Contrairement à une molécule simple, cette liaison C=O va donc pouvoir avoir statistiquement tout un ensemble d'environnements chimiques possibles. En conséquence, le spectre d'absorption IR de la matière organique obtenu dans le cas des UCAMMs diffère des spectres d'absorption IR des molécules organiques classiquement présentes dans d'autres échantillons présentés dans ce manuscrit. En effet, les bandes d'absorption de chaque vibration moléculaire sont élargies par ces effets d'environnement et des transitions électroniques de très basses fréquences et peuvent se recouvrir. Il existe de plus un continuum d'absorption sous-jacent. Un exemple de spectre d'absorption FTIR caractéristique des UCAMMs est donné en Figure IV-9 a). Dans ce spectre acquis en spectroscopie IR classique sur une échelle de 15x15 microns, des courbes d'ajustement ont été proposées pour visualiser les deux sous-structurations qui correspondent à l'absorption de deux groupements chimiques différents : en orange l'absorption de l'ensemble des liaisons C=C centrée à 1600 cm^{-1} et en vert l'absorption de l'ensemble des liaisons C=O centrée à 1710 cm^{-1} . Il est donc possible d'extraire de l'information chimique du spectre d'absorption IR à cette échelle malgré le recouvrement dû à l'élargissement des bandes d'absorption. Du fait de la taille des objets observés de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, il est nécessaire pour avoir un rapport signal sur bruit acceptable d'utiliser des systèmes de microscopie IR comme ceux présentés dans le Chapitre I et le plus souvent de les coupler à des sources IR intenses comme le rayonnement synchrotron. Cependant du fait de la faible intensité du signal et de la taille des échantillons qui est de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, il est souvent difficilement possible d'obtenir plusieurs spectres sur différentes parties de l'UCAMM.

La résolution spatiale atteinte est aussi d'environ 1 à 2 ordres de grandeur inférieure à celle des hétérogénéités attendues. L'intérêt de l'utilisation de l'AFM-IR pour l'étude des UCAMMs réside ici dans la résolution latérale accessible de l'ordre de la dizaine de nanomètres pour pouvoir mettre en valeur les hétérogénéités au sein de l'échantillon. Le but final étant de pouvoir corrélérer les informations sur les liaisons chimiques ainsi obtenues avec celles des autres techniques qui vont notamment permettre d'étudier les minéraux et voir s'il existe un lien entre la nature de la phase organique et la nature de la phase inorganique au sein de l'objet.

Le premier fragment d'UCAMM (DC18) a été étudié en mode contact avec un laser QCL couvrant la gamme spectrale de 1960 cm^{-1} à 1550 cm^{-1} . Les principaux résultats obtenus sont donnés en Figure IV-9 et Figure IV-10. Pour mettre en évidence l'existence d'une hétérogénéité de la répartition de la matière, des cartographies chimiques ont été acquises à 1710 cm^{-1} (C=O) et à 1600 cm^{-1} (C=C) (Figure IV-9 b) et c)). À partir de ces deux cartographies, une image composite a été créée en additionnant les intensités associées à chaque cartographie IR (vert pour 1710 cm^{-1} , rouge pour 1600 cm^{-1}) (Figure IV-9 d)). L'image composite ainsi obtenue permet de mettre en évidence l'existence d'hétérogénéités par les contrastes de couleur. Des zones de forte absorption apparaissent en plusieurs endroits de l'image. Ces objets sont de taille submicrométrique et donc inaccessibles aux techniques de spectroscopie IR classiques. Un résultat analogue est obtenu en acquérant des spectres locaux d'absorption IR en divers endroits du fragment. Les spectres AFM-IR sont comparés avec le spectre obtenu en spectroscopie FTIR sur le même fragment. La comparaison des courbes d'ajustement obtenues pour les deux modes de vibrations d'intérêt dans le cas de ce spectre FTIR et les spectres locaux met clairement en évidence la différence de répartition des liaisons chimiques déjà observées avec l'image composite de la Figure IV-9 d). Ce résultat est même potentiellement plus puissant, car l'obtention des courbes d'ajustement ouvre la possibilité de faire des ratios locaux quantitatifs de répartition des liaisons chimiques. Il est aussi important de noter le cas spécifique du spectre 9 de la Figure IV-10. Celui-ci a été obtenu sur une région de l'UCAMM mesurée par l'AFM-IR qui a été identifiée ultérieurement par des techniques d'émission X (au microscope électronique à balayage - MEB) comme étant un minéral. Ce spectre, où aucune absorption n'a été détectée dans la gamme spectrale utilisée, montre bien la spécificité de l'utilisation de l'AFM-IR pour l'étude de la matière organique. En contrepartie, cela montre aussi que si l'on veut une analyse complète du fragment, il est alors utile de coupler l'AFM-IR avec une autre technique pour l'étude des minéraux et d'étendre la gamme spectrale pour les mesurer avec l'AFMIR dans la région d'absorption de ces matériaux constitutifs des UCAMMs.

L'analyse en AFM-IR en mode contact a permis de démontrer l'existence d'hétérogénéité dans la répartition de la matière organique des UCAMMs. Cependant, l'échantillon de micrométéorites étant fragile et friable, lors de l'analyse, la pointe AFM a parfois accroché et arraché quelques morceaux de la surface. Ceci s'est traduit notamment par l'apparition de bandes sur la topographie AFM (observables sur la Figure IV-9 e)) et correspond à des effets observés en AFM en mode contact dans le cas de particules de petite taille déplacées par la pointe AFM [188], [189]. En effet, l'UCAMM est un agglomérat de particules de plus petite taille, ce qui est parfaitement observé en imagerie AFM. Lors de la préparation de l'échantillon, le fragment d'UCAMM a été écrasé pour obtenir une épaisseur compatible avec l'analyse AFM-IR. Ce processus a tendance à réduire la cohésion de la structure et les petites particules peuvent se détacher du bloc. Cela a plusieurs conséquences. La première est que la pointe va être endommagée par ces particules au fur et à mesure de l'analyse. Ce qui peut conduire notamment à un élargissement de la pointe, dégradant la résolution latérale, et/ou à un endommagement de la couche d'or sur la pointe, modifiant l'amplification du champ local. Si cela se produit, les résultats obtenus pour un même échantillon se dégradent au cours du temps et ne sont plus reproductibles d'une mesure à l'autre. La seconde conséquence est que

le contact entre la pointe et la surface de l'UCAMM n'est pas tout le temps maintenu constant et se traduit par une baisse de la qualité de l'image de topographie obtenue. Cela peut être mis en évidence en comparant l'image de topographie avec une image de la même zone obtenue en microscopie électronique à balayage (MEB) après l'analyse AFM-IR (Figure IV-11). On constate alors qu'un certain nombre de sous-structures ne sont pas visibles sur la topographie, notamment les structures très granuleuses observables au centre de l'image MEB.

Le fait que le contact ne soit pas constant sur la majeure partie de l'échantillon a aussi une conséquence sur le résultat obtenu en AFM-IR. Comme il est nécessaire d'être en résonance forcée pour analyser ce type d'échantillon, la qualité des résultats obtenus est liée à la résonance de contact et donc à l'interaction entre la pointe et l'échantillon. Si celle-ci varie trop fortement durant la mesure, il est probable que le rétrocontrôle en fréquence ne puisse pas suivre les variations, ce qui se traduit par une perte du signal IR ou au contraire un risque de générer des artefacts liés à la topographie (cf. Chapitre II, p. 47). Les problèmes observés via l'AFM laissent supposer que la qualité des données AFM-IR obtenues est aussi dégradée par rapport à ce qui peut théoriquement être obtenu. Pour réduire ces effets, le balayage doit être le plus limité possible. En conséquence, la zone analysable a dû être restreinte et seulement un morceau du fragment a pu être analysé. De plus, la vitesse de balayage a aussi dû être réduite au maximum pour suivre la topographie complexe de l'échantillon, ce qui augmente très fortement le temps d'acquisition et limite la quantité d'information accessible.

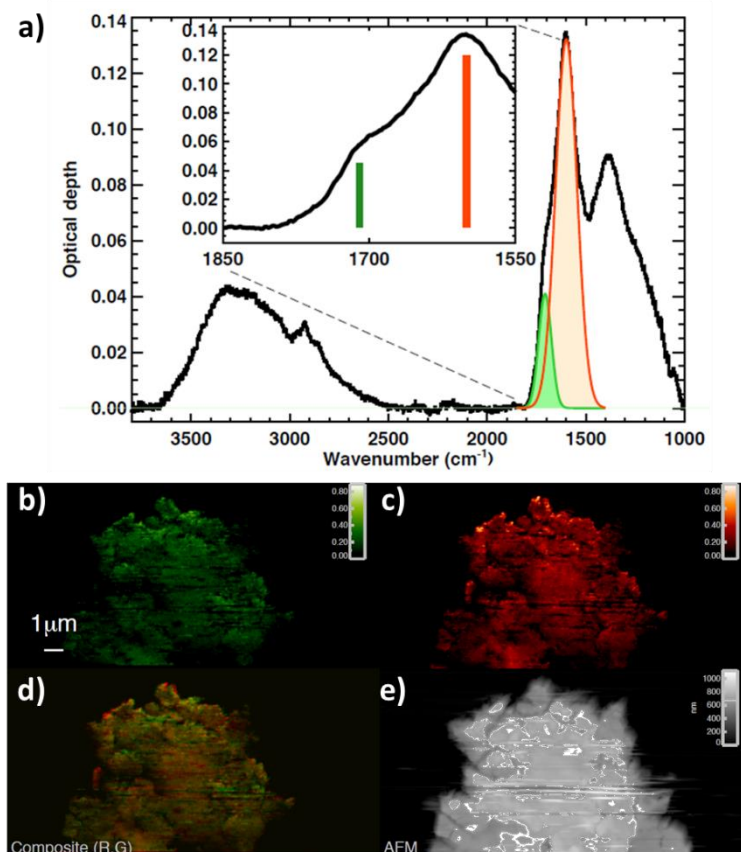


Figure IV-9 : Analyse AFM-IR en mode contact d'un fragment de l'UCAMM DC18 - a) Spectre FTIR du fragment entier avec les courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des deux liaisons (C=C en orange et C=O en vert), permettant d'accéder au ratio moyen sur les deux fragments ; dans l'encart, un agrandissement a été fait spécifiquement sur la zone étudiée en AFM-IR, les nombres d'ondes des deux cartographies effectuées sont indiqués par des traits respectivement en orange pour la liaison C=C et en vert pour la liaison C=O - b) Cartographie chimique obtenue à 1710 cm^{-1} - c) Cartographie chimique obtenue à 1600 cm^{-1} - d) Image composite obtenue par la superposition des deux cartographies IR - e) Topographie AFM en mode contact

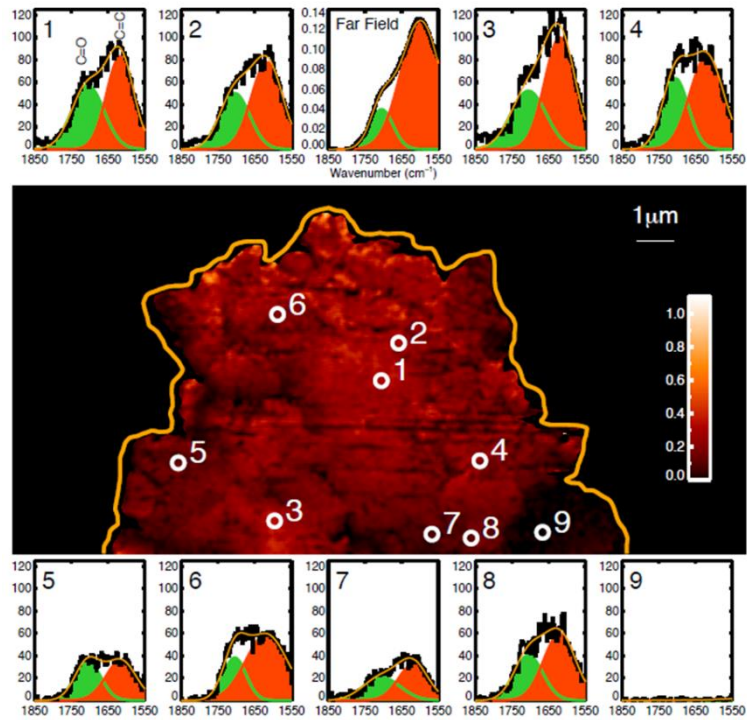


Figure IV-10 : Étude AFM-IR en mode contact du fragment - Neuf spectres différents ont été enregistrés (indiqués par des cercles blancs sur la cartographie IR à 1600 cm^{-1}). Ils sont comparés au spectre FTIR obtenu sur le même fragment (situé au milieu de la ligne des spectres du haut de la figure), avec les courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des deux liaisons chimiques d'intérêt (liaison C=C en orange et C=O en vert)

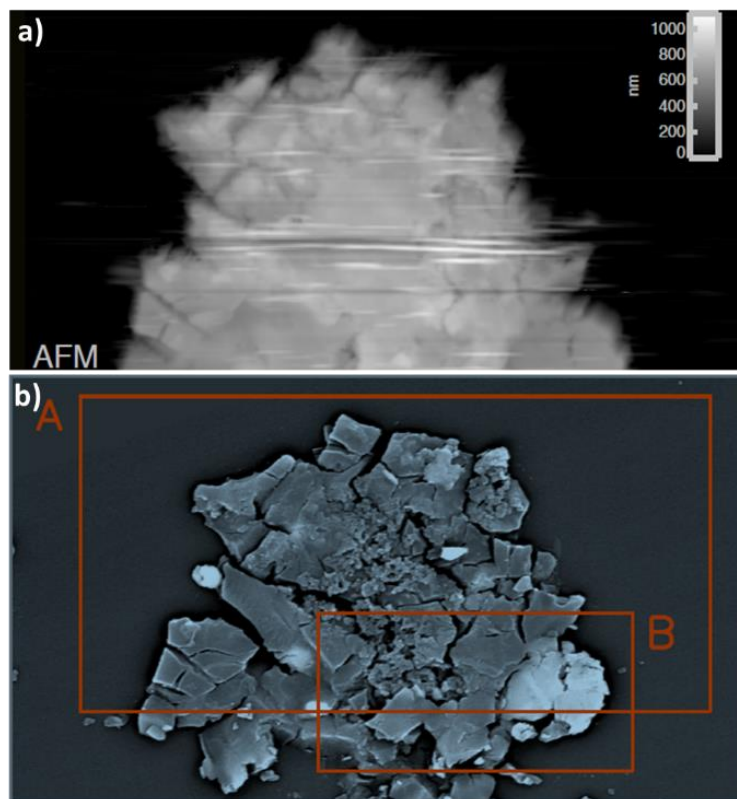


Figure IV-11 : Morphologie du fragment d'UCAMM - a) Topographie AFM obtenue lors de l'analyse AFM-IR - b) Cliché obtenu au microscope électronique à balayage (MEB) en électrons retroréfléchés, la zone étudiée en AFM-IR correspond à l'encadré A

Pour conclure, s'il a été possible de démontrer ici directement l'existence d'hétérogénéités submicrométriques dans un morceau de fragment d'UCAMM grâce à l'AFM-IR en résonance forcée, la qualité des résultats obtenus doit être améliorée afin d'aller plus loin dans l'analyse. Cela passe par une amélioration de la préparation des échantillons, pour limiter la fragmentation, et l'utilisation de l'AFM-IR en mode tapping, abordé dans la suite.

Pour les expériences menées en AFM-IR en mode tapping, le protocole de préparation de l'échantillon a été modifié pour limiter au mieux l'apparition des petites particules, éviter les craquelures induites par l'écrasement de l'échantillon et contrôler l'épaisseur de la coupe produite. Pour cela, la micrométéorite ultra-carbonée (DC309) a été incorporée dans une matrice de soufre solide puis coupée par ultra-microtomie en tranches d'épaisseur allant de 500 nm à 1 μm selon les tranches. L'un des risques lors de l'utilisation de la microtomie est qu'il est possible de modifier la surface de l'objet en étalant une partie de la matrice sur la surface de l'objet lors de la découpe. L'avantage du soufre est qu'il ne possède pas d'absorption IR dans la gamme d'étude choisie et donc il y a peu de risque d'introduire des artefacts de mesures. De plus, la matrice de soufre solide peut être sublimée en chauffant très légèrement l'échantillon autour de 60°C pendant une nuit. Cette température est suffisamment faible pour ne pas induire de modifications chimiques dans l'échantillon tout en permettant l'élimination de l'ensemble de la matrice soufrée.

La mesure AFM-IR a été couplée à une mesure corrélative d'analyse dispersive en énergie des rayons X associée à la microscopie électronique à balayage (notée par la suite MEB-EDX), effectuée a posteriori. Dans cette technique, le faisceau d'électrons (ici accéléré à 15 kV) est utilisé pour sonder la structure électronique des atomes. Cela peut conduire à l'ionisation de cet atome par création d'un trou d'électron avec éjection d'un électron des orbitales de plus basse énergie. La désexcitation de l'atome va alors se faire au moyen d'une transition électronique d'un électron d'une orbitale d'énergie supérieure à l'orbitale où le trou d'électron a été formé. Lors de cette transition électronique, un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre les deux orbitales va être émis. Du fait des énergies mises en jeu, les photons obtenus se situent dans la gamme spectrale des rayons X. En observant l'ensemble des photons émis sur cette gamme spectrale lors de l'interaction avec le faisceau d'électrons, il va être possible d'obtenir un spectre en énergie des rayons X. Comme la longueur d'onde (ou l'énergie) des photons émis est directement reliée aux différentes transitions électroniques effectuées au sein d'une même structure électronique, cette énergie va être caractéristique d'un atome donné. En obtenant un spectre d'énergie en chaque point, on procède donc à une analyse élémentaire locale. Cette technique est complémentaire des techniques vibrationnelles. Elle permet en particulier d'analyser les atomes ayant une masse importante comme les éléments métalliques et ainsi d'accéder à la composition des phases inorganiques des matériaux. La résolution de l'image MEB est de l'ordre du nanomètre, et le faisceau d'électrons à 15 kV provoque une émission de rayons X de l'échantillon sur une épaisseur d'environ 1 μm . La résolution des deux techniques utilisées ici (AFM-IR et MEB-EDX) est donc du même ordre de grandeur, et une mesure corrélative sur un même objet est donc envisageable. D'un point de vue pratique, comme le faisceau d'électrons intense peut potentiellement induire des dommages, l'analyse MEB-EDX est toujours effectuée après l'analyse AFM-IR.

Un premier exemple de mesure corrélative associant AFM-IR en mode tapping et le MEB-EDX est montré Figure IV-12 et Figure IV-13. Lors de cette analyse, l'ensemble de la coupe d'UCAMM a pu être analysé. La qualité de l'image de topographie obtenue en mode tapping (Figure IV-12 f) apparaît bien meilleure que dans le cas du mode contact (Figure IV-11 a)) avec notamment la disparition des trainées sur la topographie ainsi qu'une meilleure description de l'objet qui apparaît comparable en termes de qualité d'image avec ce qui a été obtenu en microscopie électronique (Figure IV-12 g)). L'amélioration apportée pour le nouveau protocole

de coupe apparaît clairement sur les clichés de microscopie électronique (Figure IV-12 g)) où on constate la disparition des particules fines observées précédemment (Figure IV-11 b)).

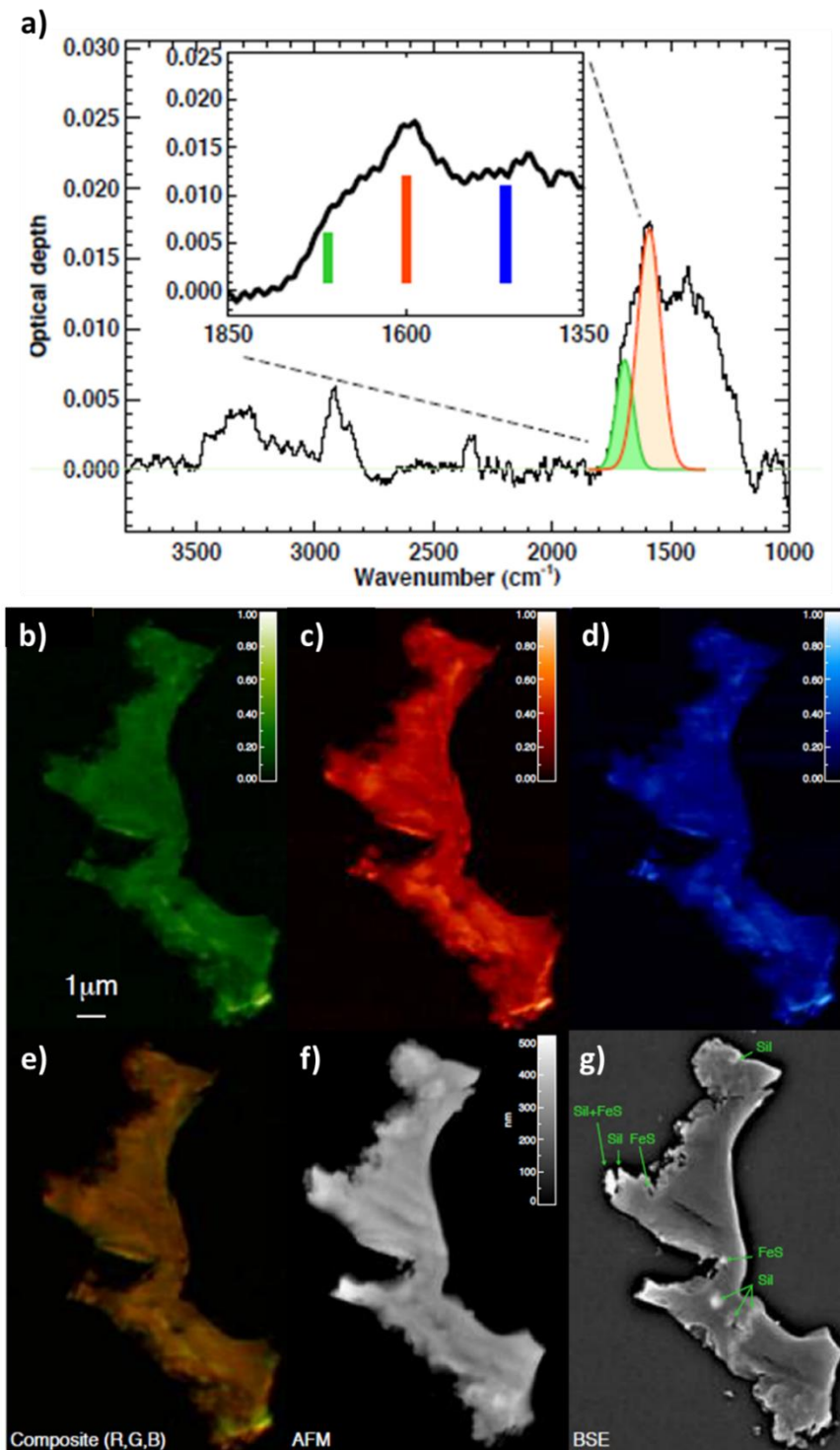


Figure IV-12 : Étude corrélative AFM-IR en mode tapping MEB d'une coupe de l'UCAMM DC309 – a) Spectre FTIR avec les courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des liaisons chimiques C=O et C=C; en encart, un agrandissement a été effectué sur la gamme spectrale de l'AFM-IR, des traits de couleurs les maxima d'absorption auxquelles ont été acquises les cartographies chimiques – b), c) et d) Cartographies chimiques obtenues en AFM-IR en mode tapping aux nombres d'onde 1710 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} et 1460 cm^{-1} respectivement associés aux liaisons C=O (vert), C=C (rouge) et CH₂ (bleu) – e) Image composite (R, G, B) obtenue à partir des trois cartographies IR précédentes – f) Topographie AFM en mode tapping – g) Cliché de microscopie électronique à balayage (électrons rétrodiffusés), sur cette image, les différents minéraux déduits de l'analyse MEB-EDX sont indiqués par une flèche

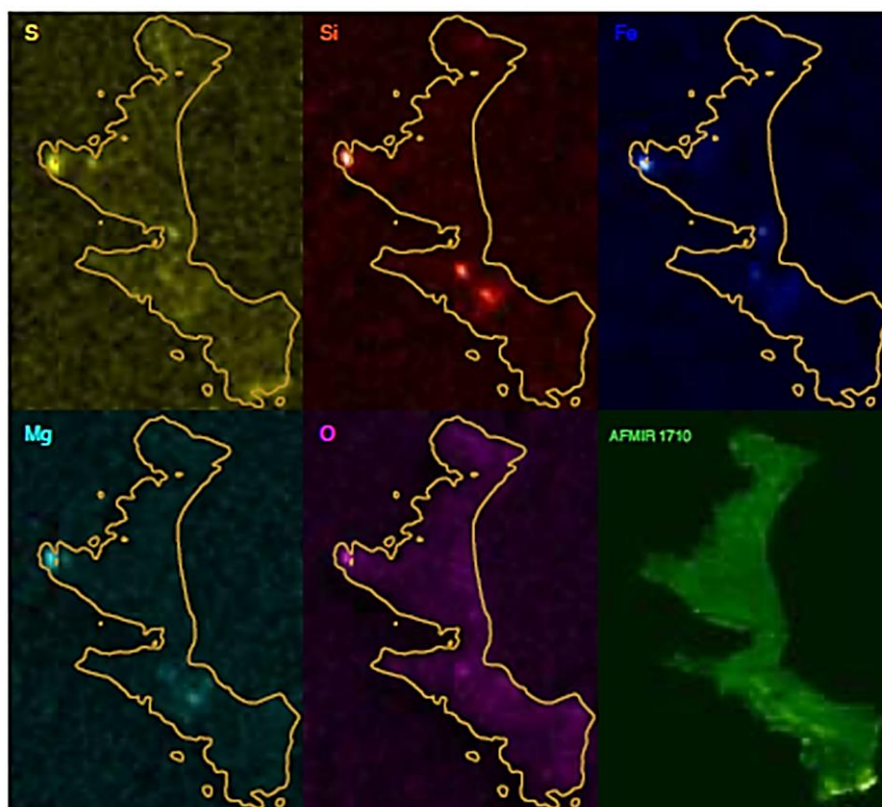


Figure IV-13 : Analyse MEB-EDX permettant d'obtenir la répartition de différents éléments atomiques : de gauche à droite et de haut en bas : le soufre S, le silicium Si, le Fer Fe, le magnésium Mg et l'oxygène O ; cette dernière carte de répartition a été comparée avec celle obtenue en AFM-IR à 1710 cm^{-1} , à droite en vert.

De plus, pour cette nouvelle étude, la gamme spectrale a pu être étendue jusqu'à 1325 cm^{-1} donnant accès à d'autres modes de vibrations. En se basant sur le spectre FTIR du fragment (Figure IV-12 a)), trois nombres d'onde ont été choisis pour analyser l'hétérogénéité de la répartition de la matière organique dans l'ensemble du fragment : 1710 cm^{-1} (Figure IV-12 b)) qui correspond à l'absorption des groupements C=O, 1600 cm^{-1} (Figure IV-12 c)) qui correspond à l'absorption des groupements C=C et 1460 cm^{-1} (Figure IV-12 d)) qui correspond à l'absorption des groupements CH₂ et d'un continuum d'absorption. À partir des trois cartographies chimiques, il a été possible d'obtenir une image composite (R, G, B) (Figure IV-12 e)). Cette image composite est majoritairement dominée par la couleur violette donc par l'absorption des groupements C=C (intensité en rouge) et CH₂ (intensité en bleu). L'homogénéité de la combinaison de ces deux couleurs semble indiquer une corrélation de répartition spatiale entre ces deux groupements chimiques. Le continuum lié à la présence de groupement C-N contribue aussi probablement fortement à cette corrélation. Sur l'image composite, des points spécifiques apparaissent plus verts. Ils révèlent une augmentation locale de la concentration en groupements C=O et confirment les hétérogénéités spatiales de répartition de la matière organique déjà observée à plus petite échelle avec l'analyse en AFM-IR en mode contact (Figure IV-9 d)).

Ces données sont complétées par celles obtenues sur le même échantillon en MEB-EDX (Figure IV-13) qui mettent en évidence la présence de minéraux incrustés dans l'échantillon dont les emplacements ont été pressentis lors de l'analyse AFM-IR, du fait des diminutions locales du signal AFM-IR focalisé sur des groupements organiques, et sur le cliché d'électrons rétrodiffusés avec l'apparition de zones plus claires sur l'image.

La comparaison des résultats obtenus avec les deux techniques permet d'évaluer le rapport entre information atomique et information vibrationnelle. Notamment, la répartition de

l'oxygène atomique et la répartition de la liaison C=O ne sont pas identiques, car l'oxygène atomique est dominé très majoritairement par les minéraux. Ce résultat démontre qu'il est essentiel d'utiliser la spectroscopie vibrationnelle pour l'étude de la matière organique. De plus, la corrélation des deux techniques permet donc d'obtenir une analyse complète de l'objet tant du point de vue organique qu'inorganique. Cependant, dans le cas précis de cet échantillon, la taille des minéraux, beaucoup plus faible que celle observée sur l'échantillon en mode contact (Figure IV-10), et la gamme spectrale restreinte du laser QCL utilisé ne permettent pas de pousser plus loin l'analyse, à savoir quelle est la relation possible entre la présence de minéraux et l'hétérogénéité de répartition de la matière organique.

Une seconde coupe de la même UCAMM (DC309) a pu être analysée. Les résultats obtenus sont donnés en Figure IV-14. Une différence existe entre les deux analyses : le spectre FTIR (Figure IV-14 a)) a révélé une forte absorption à 1470 cm^{-1} ainsi que des pics d'absorption des groupements CH_2/CH_3 très intenses entre $2700\text{ cm}^{-1} - 3000\text{ cm}^{-1}$. Par conséquent, nous avons choisi de faire une cartographie AFM-IR à 1470 cm^{-1} au lieu de 1460 cm^{-1} (comme pour la 1^{ère} coupe) pour localiser les CH_2 (Figure IV-14 d)). Une image composite (R, G, B) a été générée (Figure IV-14 e)) à partir de cette cartographie chimique ainsi que celle à 1710 cm^{-1} (Figure IV-14 b)) et à 1600 cm^{-1} (Figure IV-14 c)). L'image obtenue et la comparaison avec les mesures faites en SEM-EDX (Figure IV-15) permettent de confirmer les résultats obtenus sur la première coupe et de démontrer la robustesse de l'analyse corrélatrice et de l'intérêt de la mesure AFM-IR en mode tapping pour l'étude des UCAMMs. En plus de l'hétérogénéité de distribution de la matière organique, des zones exclusivement bleues (1470 cm^{-1} , signal des liaisons CH_2) sont visibles sur l'image composite : il n'y a donc que des groupements chimiques CH_2 et pas d'absorption des groupements chimiques C=O et C=C. Cette spécificité d'absorption aussi marquée ne semble pas correspondre à ce qui a déjà été observé dans les UCAMMs. De plus, ces zones présentent une plus faible épaisseur sur l'image de topographie AFM (Figure IV-14 f)) et apparaissent sous forme de points très brillants sur le cliché d'électrons rétrodiffusés (Figure IV-14 g)) indiquant une forte concentration en phase inorganique. L'ensemble de ces observations conduit à émettre l'hypothèse que ces zones spécifiques sont des contaminations.

Pour vérifier cette hypothèse, des lignes de spectres dans plusieurs régions d'intérêt ont été enregistrées (Figure IV-16). Pour la zone identifiée clairement comme étant de l'UCAMM, les lignes de spectres obtenues (S1 et S4 de la Figure IV-16 c)) permettent de mettre en valeur l'existence d'hétérogénéité de répartition des groupements chimiques à travers les variations des ratios de bandes en fonction de la position où a été pris le spectre. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu avec les cartographies chimiques à partir de la composition des cartographies à 1710 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} (Figure IV-16 a)). De plus, pour ces spectres, la bande à 1470 cm^{-1} n'est pas présente (Figure IV-16 b)) et les spectres sont homogènes avec ceux obtenus sur les autres coupes. En revanche, les spectres obtenus en S3 et S4 sur la zone exogène (contamination) présentent une bande fine et très intense à 1470 cm^{-1} . Si on couple ces résultats avec ceux obtenus en MEB-EDX, on peut associer cette pollution à un composé proche du stéarate de Zinc. Ce composé se trouve communément dans les peintures, plastiques et gommes et ce contaminant (de taille micrométrique) a dû être introduit durant la phase de préparation de l'échantillon.

À remarquer que l'extension spatiale de la pollution identifiée est inférieure au micron et n'aurait pas pu être identifiée par une technique ayant une résolution plus faible, comme c'est le cas par exemple avec la microspectroscopie FTIR. Le signal moyenné spatialement sur quelques microns conduirait alors à une mauvaise interprétation des résultats, car le contraste d'absorption serait plus faible, et permet de montrer l'intérêt de l'utilisation de l'AFM-IR également pour identifier les éventuels contaminants à l'échelle nanométrique.

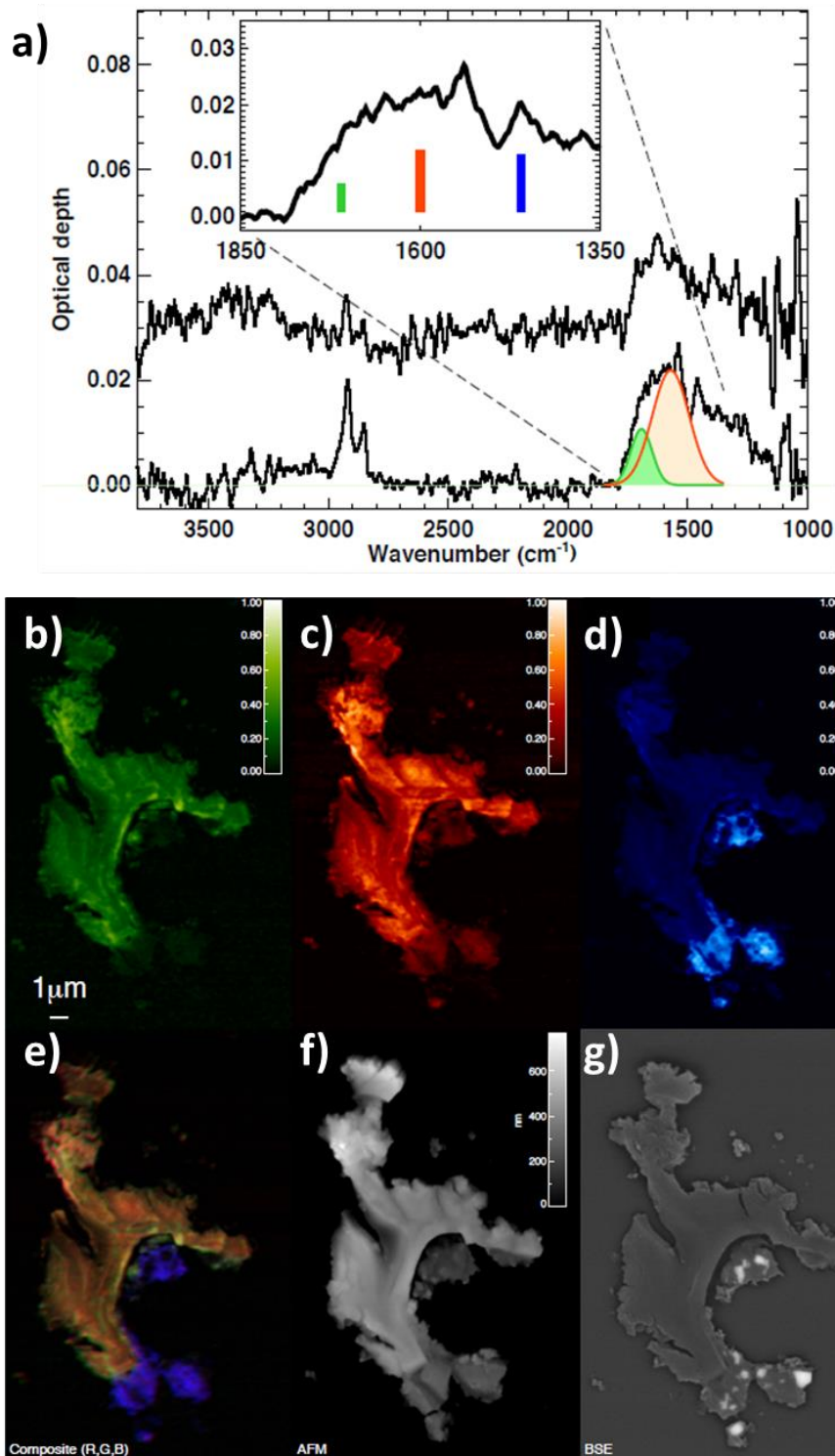


Figure IV-14 : Étude par AFM-IR en mode tapping de la deuxième coupe de l'UCAMM – a) Spectre FTIR global, des courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des liaisons chimiques C=O et C=C ont été effectuées et permettent d'obtenir une estimation de la proportion moyenne de l'une par rapport à l'autre ; en encart, un agrandissement a été effectué sur la gamme spécifiquement en AFM-IR, des traits de couleurs ont été rajoutés à la position en nombre d'ondes où ont été acquises les cartographies chimiques aux couleurs correspondantes – b), c) et d) Cartographies chimiques à 1710 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} et 1470 cm^{-1} (C=O, C=C et CH_2) – e) Image composite (R, G, B) obtenue à partir des trois cartographies chimiques (vert pour celle à 1710 cm^{-1} , rouge pour celle à 1600 cm^{-1} et bleu pour celle à 1470 cm^{-1}) – f) Topographie AFM de l'objet obtenue en AFM en mode tapping – g) Image de microscopie électronique obtenue en microscopie électronique à balayage à partir des électrons rétrodiffusés par l'objet

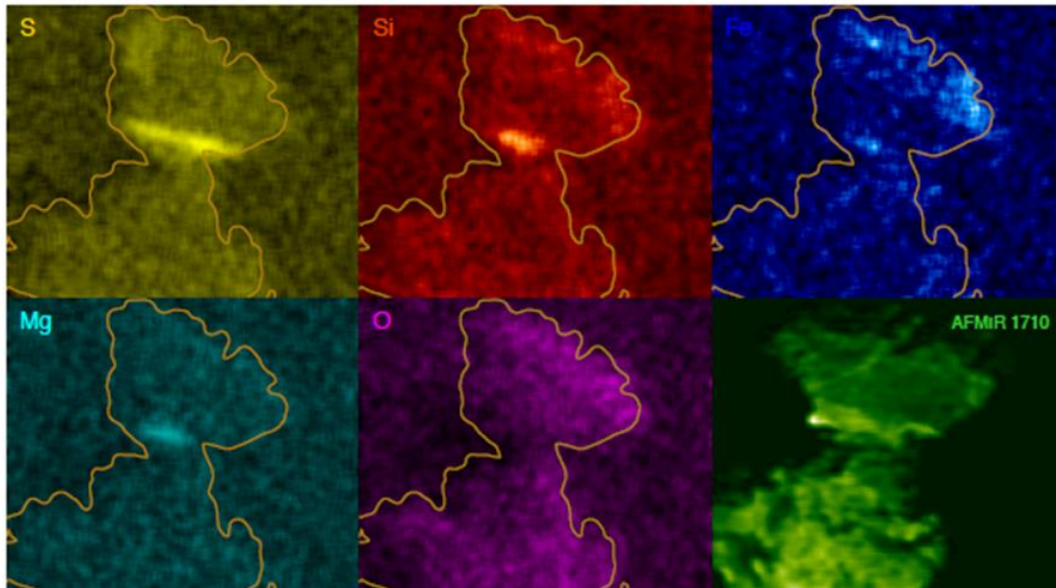


Figure IV-15 : Analyse SEM-EDX de l'échantillon effectuée sur le quart supérieur de l'échantillon après l'analyse AFM-IR permettant d'obtenir la répartition de différents éléments atomiques dans l'ordre de gauche à droite et de haut en bas : le soufre S, le silicium Si, le Fer Fe, le magnésium Mg et l'oxygène O ; cette dernière carte de répartition a été comparée avec celle obtenue en AFM-IR à 1710 cm^{-1} et disposée côte à côte pour faciliter la comparaison

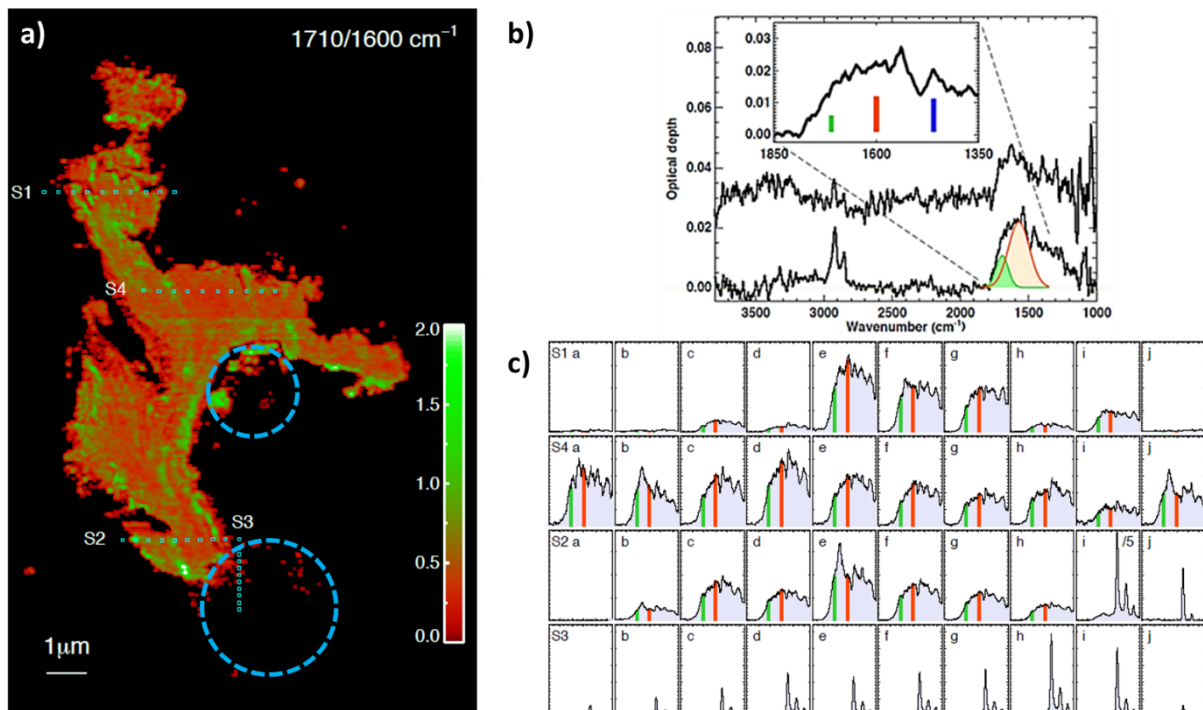


Figure IV-16 : Étude spectrale de la coupe d'UCAMM de la Figure IV-14 – a) Image composite obtenue avec les cartographies à 1710 cm^{-1} (en vert) et à 1600 cm^{-1} (en rouge), les deux cercles en pointillés bleus indiquent l'emplacement des contaminations – b) Spectre FTIR global avec les courbes d'ajustement pour les modes de vibrations des liaisons chimiques C=O et C=C; en encart, un agrandissement a été effectué sur la gamme spectrale du montage AFM-IR– c) Lignes de spectres obtenues en différents endroits de la coupe, leurs positions sont indiquées sur l'image a) ; les traits de couleurs indiquent les nombres d'onde où ont été acquises les cartographies chimiques utilisées en a).

Pour conclure, grâce à l'AFM-IR en mode tapping, il a été possible pour la première fois d'analyser la matière organique dans des UCAMMs à une échelle de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Cette étude a permis de montrer qu'il existait bien une hétérogénéité submicrométrique de la répartition des groupements chimiques. La question se pose

maintenant de savoir quel lien peut avoir ces hétérogénéités avec la présence des phases inorganiques (minéraux et silicates). Pour répondre à cette question clé dans le domaine, il est nécessaire de reproduire l'analyse menée ici avec une gamme spectrale plus étendue dans les bas nombres d'onde et de réussir à analyser l'interface phase organique / phase inorganique grâce à l'AFM-IR en mode tapping.

IV. Limitations de l'AFM-IR en mode tapping

À travers l'exemple des Nps polymériques, il a été possible de voir que l'AFM-IR en mode tapping permet d'obtenir des résultats avec une sensibilité équivalente à ceux obtenus en AFM-IR en mode contact en résonance forcée. En effet, la couronne contenant le PVA et l'acide pipémidique observée ici ne dépasse pas la dizaine de nanomètres d'épaisseur. Cette configuration AFM-IR en mode tapping représente donc une bonne alternative à la résonance forcée lorsqu'il est difficile d'imager l'échantillon en mode contact. Néanmoins, il existe des limitations à la technique et certains aspects sont à améliorer : la principale peut être observée sur les cartographies d'absorption IR des Nps de PLGA (Figure IV-7 c)) où on peut noter la présence d'un croissant centré en haut à gauche de la Np où il n'y a aucune absorption. Si ce manque de signal était réel, cela signifierait qu'aucun élément chimique n'absorbe dans cette zone. Or ceci entre en contradiction avec la structure de la Np qui est parfaitement sphérique. Pour comprendre cet artefact, il est nécessaire d'analyser la phase de l'oscillation du levier (Figure IV-17) au cours de l'acquisition de la cartographie chimique à 1415 cm^{-1} présentée dans la Figure IV-7 c). On observe une forte variation de phase avec une forme de croissant. L'apparition de ce croissant en phase est due à la forme en sphère de la Np ainsi que de sa taille dont le diamètre moyen est d'environ 160 - 170 nm. La combinaison de la forme et de la dimension fait que lors de l'imagerie de la Np la variation de hauteur en quelques nanomètres est très forte ce qui conduit à un changement du contact entre l'échantillon et la nanoparticule. Si contrairement au mode contact, la position en fréquences des modes du levier ne dépend pas de la qualité du contact, cette variation non corrigée de la position en fréquence du mode fondamental génère le changement brusque de phase qui traduit une dissipation d'énergie. Du fait de cette dissipation d'énergie, l'oscillation du levier n'est plus aussi efficace, de même que la détection AFM-IR.

L'ensemble des expériences menées durant la thèse sur des objets présentant une brusque variation de topographie ont montré un comportement similaire. Pour le moment, il est difficile d'obtenir un ensemble de paramètres d'acquisition satisfaisants qui permettent de supprimer cet effet tout en gardant un signal AFM-IR.

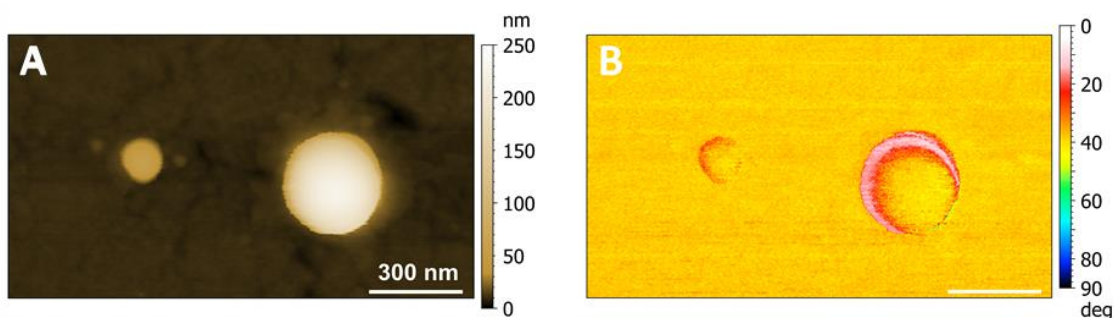


Figure IV-17 : Étude des effets de phase lors de l'acquisition des cartographies IR en AFM-IR en mode tapping – a) Image de topographie – b) Image de phase observée lors de l'acquisition d'une cartographie chimique correspondante

En effet, comme discuté dans la partie sur la théorie de l'AFM-IR, la détection hétérodyne à la base de la mesure AFM-IR en mode tapping est très peu efficace. Pour compenser cette inefficacité et obtenir un signal détectable, il est nécessaire de modifier les valeurs de force de contact et de la force motrice de l'oscillation. Dans le cas de cette dernière, il nous est apparu expérimentalement qu'il fallait la tripler par rapport à celle obtenue à l'air libre pour avoir réussi à faire une mesure AFM-IR en mode tapping. Sans autre solution pour améliorer l'efficacité de la mesure, il n'est pour le moment pas possible de résoudre expérimentalement les artéfacts de phase et ceux-ci doivent être pris en compte dans la mesure.

Une autre conséquence de la faible efficacité de l'interaction non linéaire est qu'en plus de contraindre les paramètres de l'oscillation de la pointe, sa détection semble imposer des contraintes sur les propriétés même du levier. En effet au cours de la thèse, il a été observé que seuls les leviers avec certaines valeurs d'harmoniques et de constantes de raideurs permettent d'obtenir du signal AFM-IR alors qu'à priori l'interaction non linéaire peut se produire avec n'importe quel type de levier. De plus, il a été observé que sur un même ensemble de leviers, seul un nombre restreint sera utilisable pour la mesure, les autres ne permettant pas d'observer un signal IR significatif.

V. Conclusions

Dans ce Chapitre, un nouveau mode d'acquisition AFM-IR a été présenté : l'AFM-IR en mode tapping. Il permet d'étudier en AFM-IR des échantillons mous ou peu adhérents sur la surface. Le développement de ce mode d'acquisition repose sur une détection hétérodyne de l'expansion thermique. Le signal hétérodyne est généré lors de l'interaction de l'oscillation du levier à la fréquence du premier mode et de l'oscillation de l'objet absorbant du fait de l'illumination par le laser QCL. Cette dernière ne se produit donc que lorsque l'objet absorbe. Pour maximiser le signal obtenu, le taux de répétition de tir du laser QCL doit être choisi de sorte que la somme de sa fréquence à celle de l'oscillation du levier corresponde au second mode de ce même levier.

La preuve de concept de l'AFM-IR en mode tapping a permis d'étudier des nanoparticules polymériques et les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence pour la première fois la couronne de surfactant de ces édifices. Une approche théorique de l'AFM-IR en mode tapping a permis de compléter cette preuve de concept en confirmant le lien direct entre le signal observé et l'absorbance IR de l'objet. Cette étude a aussi permis d'identifier des paramètres clés permettant d'optimiser le signal IR. À partir de ces résultats, l'intérêt de l'AFM-IR en mode tapping a ensuite été validé à travers l'exemple de deux applications menées durant ma thèse : l'analyse de nanoparticules polymériques contenant un antibiotique et l'étude de l'hétérogénéité de répartition spatiale de la matière organique dans des micrométéorites UCAMMs. Les observations faites lors de ces expériences ont permis d'identifier les principales limitations de ce mode d'acquisition et notamment les problèmes d'artéfacts de mesure liés aux changements de phase et donc d'avoir une description la plus complète possible de l'intérêt et des problématiques liées à ce mode nouveau mode de l'AFM-IR. Les deux études présentées ici sont parmi les premières avec ce mode d'acquisition, mais la qualité des résultats obtenus et la diversité des champs d'application permettent de voir tout le potentiel et les perspectives ouvertes par ce nouveau mode d'acquisition AFM-IR

Chapitre V : Acquisitions hyperspectrales en AFM-IR : enjeux et défis

Les dernières avancées technologiques ont amélioré significativement les performances de la technique : le mode résonant permet d'atteindre des sensibilités de quelques nanomètres avec des temps d'acquisition raisonnables et les domaines d'applications ont été élargis avec l'évolution des configurations d'éclairement (en réflexion totale ou en éclairage direct) et d'imagerie AFM (mode contact ou tapping). L'un des éléments clés de ces améliorations est l'utilisation de lasers QCL. Cependant, ces lasers sont des sources monochromatiques qui ne couvrent qu'une gamme limitée du moyen IR. Actuellement, l'acquisition des spectres IR est effectuée séquentiellement. Ce fonctionnement n'est pas comparable à ce qui est fait en spectromicroscopie IR classique où les acquisitions sont des acquisitions hyperspectrales. Dans ce cas, au lieu d'acquérir soit ponctuellement des spectres locaux soit une cartographie d'absorption IR à un nombre d'onde, le résultat obtenu est une matrice contenant un spectre en chaque point. Ce type d'acquisition permet de maximiser l'exploitation des données accessibles. Réussir à mettre en place un tel type d'acquisition en AFM-IR apparaît donc comme un enjeu important pour le développement de la technique.

Dans la première partie de ce chapitre, l'intérêt de l'imagerie hyperspectrale est introduit avec une discussion autour de la mise en place de ce type d'acquisition en AFM-IR avec des lasers de type QCL. Ensuite une alternative au laser QCL sera présentée et décrira le couplage de la technique AFM-IR avec des sources continues comme le rayonnement IR synchrotron et le laser supercontinuum Novae. L'utilisation de ces sources couplées avec l'AFM-IR devrait à la fois permettre de couvrir la majorité de la gamme spectrale du moyen IR et d'évoluer d'un mode d'acquisition séquentielle vers un mode hyperspectral. Les résultats préliminaires obtenus durant ma thèse vont maintenant être présentés, suivis d'une discussion sur les perspectives de ce couplage.

I. Imagerie hyperspectrale : laser QCL

1. Intérêt de l'imagerie hyperspectrale

La spectromicroscopie IR s'appuie généralement sur des acquisitions hyperspectrales [23]. Dans ce type d'acquisition, une carte de spectres est acquise selon une matrice de point et les spectres sont localisés sur l'échantillon à partir d'une image optique.

La technique AFM-IR quant à elle propose deux modes d'acquisition :

- Un mode d'imagerie qui permet de reconstituer des cartographies d'absorption à un nombre d'onde donné qui sont acquises simultanément avec la topographie de la surface
- Un mode de spectroscopie qui permet d'acquérir des spectres d'absorption locaux à une position donnée après acquisition de la topographie

Ces deux modes sont suffisants dans un grand nombre d'applications où l'information recherchée est la présence ou non d'une espèce donnée ou l'étude d'hétérogénéités. Dans ces cas-là, la localisation peut se faire via l'acquisition d'une cartographie d'absorption au maximum d'absorbance de l'objet d'étude et la confirmation se fait a posteriori par une analyse spectroscopique. En revanche, lorsqu'il y a un recouvrement des spectres d'absorption pour deux molécules composant l'échantillon, il est impossible de les différencier en se limitant à l'acquisition d'une cartographie à un nombre d'onde. Dans ce cas, l'acquisition du spectre complet en chaque point peut remédier au problème. De même, lorsque le marqueur recherché est une information spectrale très localisée sur un objet comme une bande spécifique, une cartographie chimique à un nombre d'onde donné n'est pas suffisante. Il est alors nécessaire d'effectuer un ensemble de spectres sur une zone définie pour pouvoir localiser le marqueur. L'intérêt de l'imagerie hyperspectrale réside donc dans cette possibilité de maximiser l'information accessible sur une zone donnée. De plus, ce type d'acquisition donne accès à un ensemble d'outils d'analyse comme l'utilisation des analyses en composantes principales (PCA) ou des techniques de clustering [24] permettant l'analyse la plus fine possible des données.

Pour répondre à cette limitation, il est donc nécessaire de mettre en place des acquisitions dites hyperspectrales similaires à celles développées en spectromicroscopie IR classique.

2. Essai d'imagerie hyperspectrale

Un premier essai de mesure hyperspectrale a été réalisé en utilisant un laser QCL. La mesure a été faite sur des Nps polymériques à base de PLA. Ces Nps sont similaires à celles caractérisées avec l'AFM-IR en mode tapping (cf. Chapitre IV, p. 131) par E. Pancani et al. [164] dans le cadre de la collaboration de notre équipe avec de R. Gref de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay.

Ici, les Nps ont été internalisées par des macrophages (étude menée par E. Pancani et al. [164]). Un exemple de résultats obtenus en AFM-IR est donné en Figure V-1. Les cartographies chimiques ont été effectuées à 1770 cm^{-1} , où absorbe le groupement carbonyle de la bande ester du PLA et où l'absorption IR des éléments biologiques (lipides et acides nucléiques notamment) est limitée (Figure V-1 a)). Les cartographies sur des zones restreintes permettent de décrire plus précisément les objets et par exemple de mettre en évidence que des Nps isolées ainsi que des agrégats ont été absorbés (Figure V-1 b) et Figure V-1 c)). L'intérêt d'atteindre ces échelles d'analyse est qu'il est possible d'obtenir des spectres locaux des Nps. D'une part, ces spectres permettent de confirmer que les objets ayant un signal d'absorption fort à 1770 cm^{-1} sont bien des Nps (Figure V-1 b). D'autre part, l'étude des bandes spécifiques du PLA peuvent nous renseigner sur des processus impliqués dans le devenir de la Np à l'intérieur du phagosome (internalisation par la cellule). Dans le cas des Nps polymériques de ce type, il est attendu qu'après la phagocytose le polymère soit détruit, permettant la libération de l'antibiotique [165]. Dans le cas des Nps à base de PLA, les Nps, absorbées par phagocytose, vont être acheminées dans le lysozome où une acidification progressive du milieu va conduire à l'hydrolyse acide du polymère. En conséquence, une diminution de l'intensité de la bande à 1770 cm^{-1} et une augmentation d'une bande liée au groupement $-\text{COOH}$ devrait être observable sur le spectre IR local. De plus, l'analyse de la bande ester du PLA permet d'accéder à des informations sur l'état de cristallisation du polymère ([190], [191]) et peuvent donc nous renseigner sur les changements physico-chimiques qui pourraient intervenir lors de la libération de l'antibiotique. Or cette information ne peut pas être observée avec une cartographie à un nombre d'onde donné. De plus, il est probable que la dégradation se fasse

de manière très localisée. Une acquisition de type hyperspectrale apparaît donc nécessaire pour avoir une analyse complète.

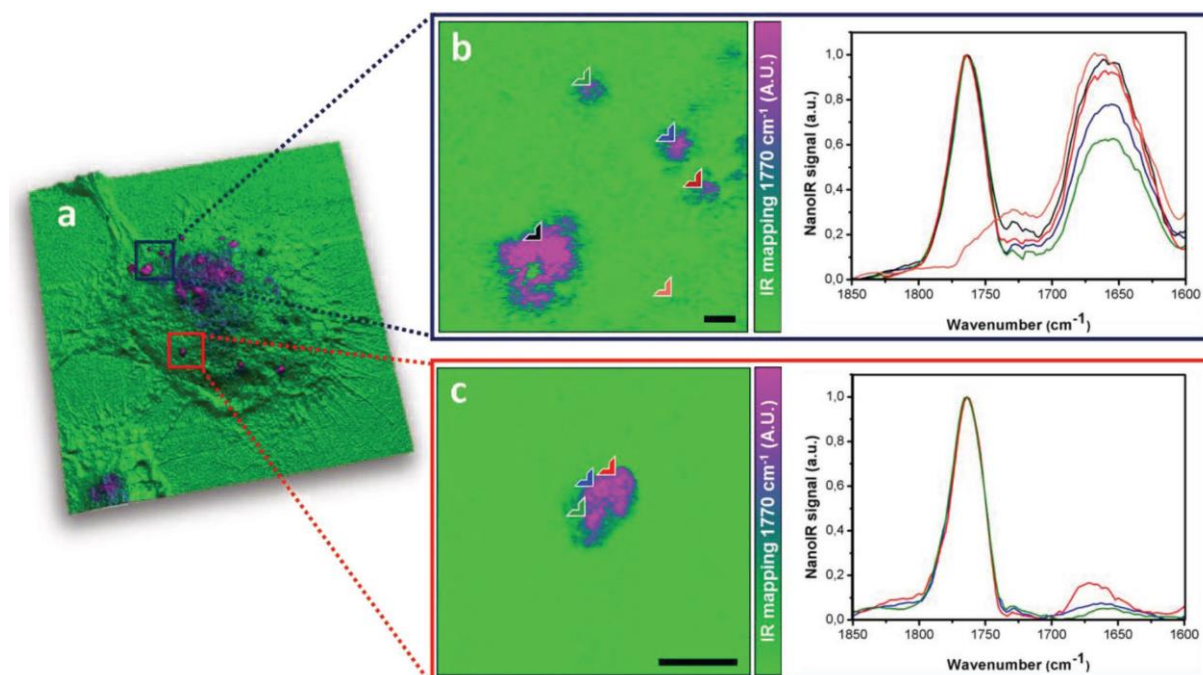


Figure V-1 : Étude de l'internalisation des Nps de PLA par un macrophage THP-1 – a) Vue 3D de la cartographie chimique à 1770 cm^{-1} d'un macrophage – b), c) Agrandissements sur des zones d'intérêt contenant des nanoparticules. Des spectres locaux ont été enregistrés en différents points indiqués par les flèches de couleurs. La barre d'échelle représente 500 nm - Figure extraite de [164]

Un exemple d'acquisition hyperspectrale de Np est donné en Figure V-2. Pour plus de clarté, l'ensemble des spectres obtenus n'est pas présenté ici. Pour cette acquisition, une zone contenant une Np est d'abord localisée grâce à la cartographie chimique à 1770 cm^{-1} (Figure V-2 b)). Une matrice de points de mesure avec un pas défini est fixée sur la zone d'intérêt puis un spectre est enregistré en chaque point (matrice en noir sur la Figure V-2 a)). Pour exploiter au maximum les capacités de l'imagerie hyperspectrale, il est nécessaire qu'il y ait un recouvrement spatial entre chaque point. En effet, s'il n'y a pas de suréchantillonnage, il va être nécessaire d'extrapoler le signal entre chaque pixel. Ceci peut générer des artefacts, mais aussi retirer du résultat tout objet dont le diamètre est inférieur à l'écart entre deux points d'acquisition. Dans ces conditions, le pas choisi est de 25 nm pour notre étude.

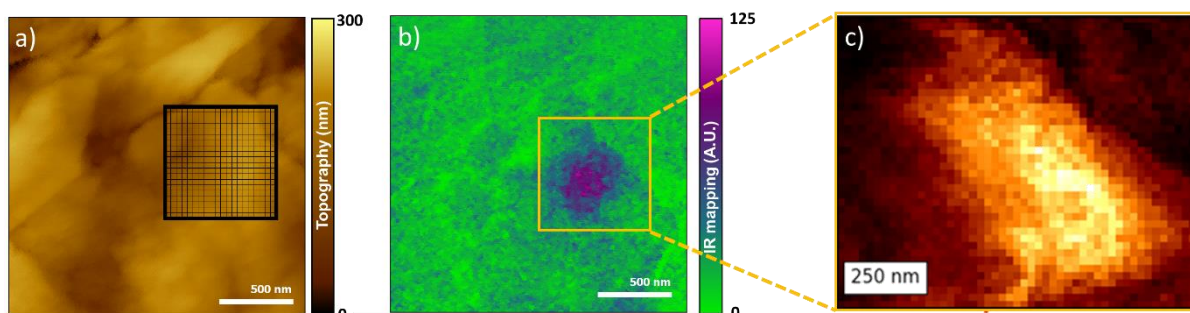


Figure V-2 : Essai d'imagerie hyperspectrale – a) Topographie de la zone d'intérêt, la matrice utilisée pour l'acquisition hyperspectrale est indiquée par un carré noir où à chaque intersection correspond à un spectre – b) Cartographie chimique à 1770 cm^{-1} – c) Image de l'absorption IR à 1770 cm^{-1} de la zone marquée par un carré jaune sur b) reconstituée à partir de l'image hyperspectrale

À partir des données obtenues, il est possible de reconstituer une cartographie

d'absorption à un nombre d'onde donné par projection de la valeur d'absorbance sur l'ensemble des spectres de la matrice (Figure V-2 c)). La comparaison entre la cartographie d'absorption à 1770 cm^{-1} et la projection de l'acquisition hyperspectrale à 1760 cm^{-1} montre des distorsions au niveau de la taille et de la forme de la Np. Celle-ci est notamment plus grande que dans le cas de la cartographie d'absorption. Comment expliquer ces distorsions ? Pour une mesure AFM-IR avec un laser QCL comme celle effectuée ici, le temps d'acquisition varie entre la demi-minute et la minute par spectre. Dans le cas de l'acquisition hyperspectrale présentée, cela représente une acquisition d'au moins 200 min. À ces échelles de temps, les problèmes liés à la dérive thermique ne sont plus négligeables. La forme oblongue observée en Figure V-2 c) traduit une dérive de l'échantillon et /ou des moteurs piézoélectriques au cours de la mesure. De plus, la fenêtre d'acquisition utilisée est de 600 nm par 600 nm , ce qui la rend encore plus sensible à la dérive thermique alors que la dimension de l'acquisition est faible comparée à celle des cartographies chimiques.

Il y a deux possibilités pour obtenir une acquisition satisfaisante : soit on diminue le nombre de points, ce qui aurait pour conséquence de dégrader la résolution de l'acquisition et de risquer de perdre le lien entre les points, soit on essaie de réduire le temps d'acquisition d'un spectre. Comme il a été discuté dans le Chapitre II (cf. p. 59), les spectres obtenus avec un laser QCL sont fortement bruités. Ce bruit important va aussi avoir une influence sur la qualité de l'analyse de l'acquisition hyperspectrale. Dans le cas où l'on doit améliorer ce rapport signal sur bruit, il faut théoriquement augmenter le nombre de spectres obtenus par point et encore augmenter le temps d'acquisition : la limitation principale des acquisitions hyperspectrales avec des lasers QCL. Pour dépasser cette limitation, il est nécessaire d'améliorer la qualité des acquisitions avec les lasers QCL et la rapidité du contrôle de balayage en longueur d'onde pour limiter au maximum les sources de bruits et fluctuations.

II. Acquisitions hyperspectrales : sources continues

L'une des alternatives pour développer l'imagerie hyperspectrale avec l'AFM-IR est de s'inspirer de ce qui est fait en microscopie IR. Jusque-là, les sources utilisées pour les mesures AFM-IR sont des sources pulsées accordables en nombres d'ondes (laser à électron libre, source OPO, laser QCL). Les spectres sont obtenus séquentiellement nombre d'onde par nombre d'onde puis reconstitués. L'utilisation de sources continues couplées à un interféromètre de Michelson permettrait de dépasser ce problème, car dans ce cas-là, un unique tir laser permettrait d'obtenir un spectre IR entier. La vitesse d'acquisition serait alors limitée par la vitesse de balayage de l'interféromètre (cf. Chapitre I, p. 8). La plupart de ces sources présentent aussi l'avantage de couvrir une plus large gamme spectrale que les lasers QCL. En revanche, les sources thermiques classiquement utilisées en spectroscopie IR ne sont pas assez intenses pour permettre d'obtenir un signal IR. Il est donc nécessaire d'utiliser les sources plus intenses pour développer cette configuration. En l'état, deux types de sources peuvent répondre aux critères : les sources IR de type synchrotron et les récents lasers IR de type supercontinuum qui sont en plein développement [192]. Au sein de l'équipe, un projet a été initié en 2012 avec P. Dumas (ligne SMIS, synchrotron Soleil) pour essayer de coupler un système AFM-IR avec un éclairage en réflexion total et le rayonnement synchrotron. À cette époque, la mesure était de type AFM-IR classique et, comme le rayonnement synchrotron est moins intense qu'un laser, il n'a pas été possible de détecter un signal d'expansion photothermique dans ces conditions. Les résultats qui vont maintenant être présentés font suite à ce projet.

1. Preuve de concept de l'AFM-IR couplé avec une source continue

Historiquement, les premières mesures d'effet photothermique IR ont été effectuées par A. Hammiche et al. en utilisant un fil de Wollaston miniaturisé [12]. Dans ces mesures, la variation de température au niveau de la surface de l'échantillon est mesurée. Comme pour l'expansion photothermique, la variation de température de l'échantillon est directement reliée à l'absorption IR. Dans les études menées par A. Hammiche, la mesure n'a pas été effectuée en utilisant un laser accordable en longueur d'onde comme les sources OPO ou les lasers QCL, mais en utilisant des sources continues comme les sources thermiques classiquement utilisées en spectroscopie IR [12], [193] ou en utilisant le rayonnement synchrotron IR [194]. Ces mesures mettent en évidence qu'en utilisant une source IR continue modulée par un interféromètre de Michelson, le signal obtenu par la mesure de la température de surface de l'échantillon est un interférogramme correspondant à l'absorption de l'échantillon sur la gamme du moyen IR comme en spectroscopie FTIR conventionnelle (Figure V-3).

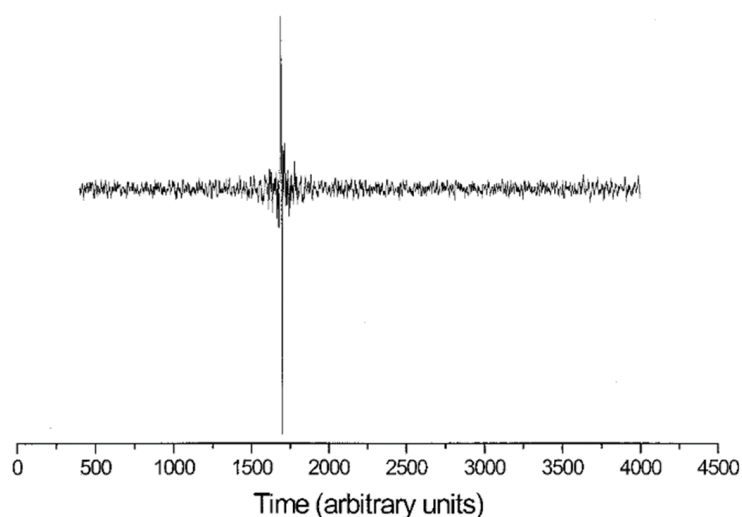


Figure V-3 : Interférogramme obtenu par la mesure photothermique sur un échantillon de poly(butylène téréphtalate) – Figure adaptée de [12]

Ce résultat de mesure purement photothermique démontre qu'il est possible d'utiliser la spectroscopie par transformée de fourrier pour réaliser des mesures d'absorption locale. Malheureusement, cette technique n'est pas résolue spatialement, car limitée par la diffusion thermique, ce qui n'est pas le cas de la technique AFM-IR.

La première mesure effectuée utilisant la technique AFM-IR avec le rayonnement synchrotron a été réalisée par l'équipe de G. Cinque [195] sur la ligne de lumière MIRIAM B22 du synchrotron Diamond. Les caractéristiques de cette ligne de lumière sont décrites dans l'article suivant publié en 2016 dans le journal *Optics Express* [196].

Lors de cette étude, menée par P. Donaldson et al., les deux principaux challenges pour la mise en place de ce type de mesure ont été abordés :

- Le rayonnement synchrotron apparaît comme continu pour la mesure AFM-IR alors que cette technique fonctionne uniquement avec des sources pulsées ;

- L'intensité du faisceau synchrotron est de plusieurs ordres de grandeur inférieure à celle des lasers utilisés usuellement ;

Comme le rayonnement est continu, l'échantillon absorbant va se retrouver dans un état de dilatation thermique permanent dès qu'il sera éclairé. Il est donc nécessaire de moduler le faisceau synchrotron en amont de la mesure AFM-IR de sorte que l'éclairement de l'échantillon soit analogue à un éclairage pulsé et qu'il puisse y avoir une relaxation thermique de l'échantillon entre deux impulsions lumineuses. La solution technique proposée par P. Donaldson et al. est de hacher physiquement le faisceau synchrotron. Pour ce faire, un modulateur en fréquence mécanique constitué d'une hélice et d'un rotor sous vide est installé sur le trajet optique. Le faisceau en sortie de système va alors apparaître comme "pulsé" à une fréquence fixée par la vitesse de rotation du rotor. L'avantage de ce type de montage est qu'en modulant la vitesse du rotor, il est possible d'ajuster la fréquence de tir du faisceau en sortie. En optimisant cette fréquence pour qu'elle corresponde à une résonance de contact, il est possible d'obtenir un régime d'oscillations forcées analogue à celui obtenu avec le laser QCL [16]. Comme discuté dans le Chapitre II, ce régime d'oscillations forcées permet d'augmenter la sensibilité de la mesure par un facteur lié au facteur de qualité Q du mode de résonance de contact sélectionné [14]. Cette augmentation de sensibilité va permettre de compenser la faiblesse de l'intensité du faisceau synchrotron par rapport à celle des lasers. Un schéma du montage utilisé dans l'étude est donné Figure V-4.

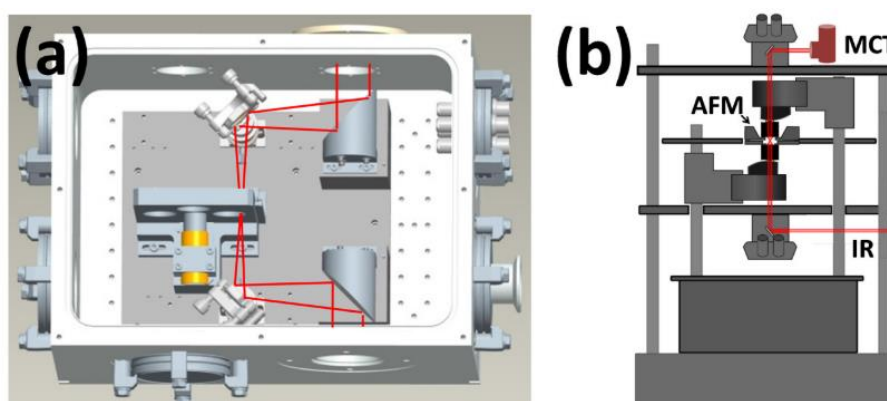


Figure V-4 : Schéma du montage utilisé par Donaldson et al. - a) Montage du modulateur en fréquence sous vide - b) vue de profil du montage optique avec l'AFM - Figure extraire de [195]

Les résultats AFM-IR avec le rayonnement synchrotron (noté par la suite AFM-SR-IR) ont été obtenus sur des films polymères soit de polystyrène d'une épaisseur d'environ 500 nm (Figure V-5 a) et c)) soit de cyanoacrylate d'une épaisseur micrométrique (Figure V-5 b) et d)).

Les résultats obtenus ici montrent que les spectres obtenus en AFM-SR-IR sont comparables avec ceux obtenus en spectroscopie conventionnelle comme dans les mesures AFM-IR classiques [11], [43], [51]. Deux points doivent être cependant soulevés sur ces spectres. D'une part, le rapport signal sur bruit apparaît de moins bonne qualité que celui obtenu en spectroscopie IR classique. Ce point a déjà été soulevé dans le Chapitre II (cf. p. 59) dans le cas de la mesure AFM-IR en résonance forcée. La question se pose de savoir si le bruit observé ici peut avoir la même origine et serait intrinsèque à la mesure AFM-IR ou est lié à la mesure AFM-SR-IR en elle-même. D'autre part, certaines intensités de bandes diffèrent dans le spectre obtenu en AFM-SR-IR et en spectroscopie IR classique comme par exemple dans la gamme spectrale allant de 1000 cm^{-1} à 1500 cm^{-1} dans le cas du cyanoacrylate (Figure V-5 b) et d)). La pointe utilisée par la mesure est une pointe de type Si-Au qui peut induire des distorsions sur la mesure (cf. Chapitre III, p. 79). L'analyse de l'article ne permet pas de

conclure quant à l'origine de ce changement de rapport d'intensité de bandes : est-ce dû à un problème déjà soulevé et qui concerne l'utilisation d'une pointe Si-Au ou est-ce relié à la mesure AFM-SR-IR ?

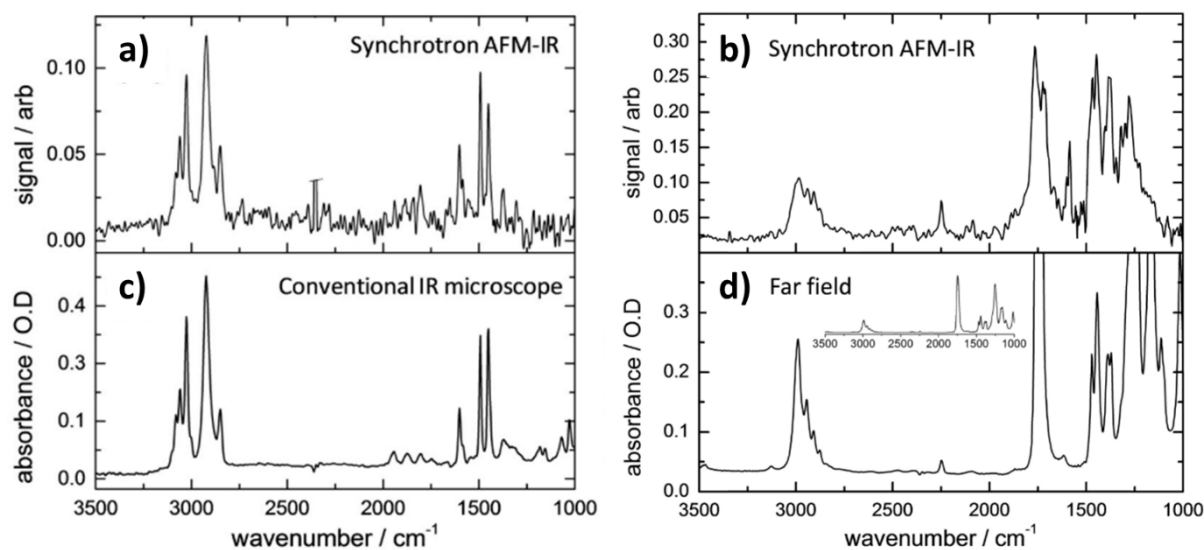


Figure V-5 : Résultats obtenus en AFM-SR-IR par P. Donaldson et al. – a), b) Spectres obtenus par la mesure photothermique respectivement pour le polystyrène et le cyanoacrylate – c), d) Spectres obtenus sur les mêmes échantillons en microspectroscopie IR conventionnelle respectivement pour le polystyrène et le cyanoacrylate – Figure adaptée de [195]

En conclusion, l'étude présentée montre qu'il est possible de mettre en place une mesure d'AFM-IR avec une source continue. L'acquisition est identique à celle de la technique de spectroscopie FTIR. L'utilisation d'un modulateur en fréquence proposée par P. Donaldson et al est une bonne stratégie puisqu'elle permet à la fois de pulser la source synchrotron et de compenser la faible intensité du faisceau synchrotron par la mise en place de la résonance forcée. Cependant, des questions sur les résultats obtenus restent en suspens. La mise en place dans notre laboratoire d'un système équivalent devrait permettre de comprendre les problématiques liées à ce type de montage et améliorer les performances de l'AFM-SR-IR, mais aussi d'étudier les questions fondamentales soulevées par cette première mesure.

2. Montage réalisé en collaboration avec la ligne SMIS du synchrotron SOLEIL

La configuration mise en place pour coupler notre système AFM-IR avec des sources continues est similaire à celle utilisée par l'équipe du synchrotron Diamond. Un schéma de principe est donné en Figure V-6. Le système AFM-IR utilisé (en noir sur le schéma) est un système commercial NanoIR2s (Anasys Instrument) avec une configuration d'éclairage par le dessus. Ce système a été modifié pour permettre d'injecter le faisceau continu en plus du laser QCL. Pour le couplage avec la source continue, deux modules externes supplémentaires ont été ajoutés. Un modulateur en fréquence (en bleu sur le schéma) qui permet de moduler le faisceau IR à la fréquence nécessaire ainsi qu'un interféromètre de Michelson (en vert sur le schéma). Contrairement aux mesures effectuées par P. Donaldson et al., le modulateur en fréquence utilisée ici n'est pas sous vide. Sur le trajet optique entre l'interféromètre de Michelson et la pointe AFM, une séparatrice permet de diviser le faisceau en deux. La moitié va être envoyée sur un détecteur optique sensible dans le moyen IR (ici un MCT refroidi à l'azote liquide). Le MCT est un détecteur classique de spectroscopie FTIR. Il va permettre de

visualiser un interférogramme du faisceau après que celui-ci soit passé dans les deux modules et faciliter leur optimisation. Une fois le positionnement des deux modules optimisé, le faisceau est amené jusqu'à la pointe AFM et la mesure d'expansion photothermique va permettre d'enregistrer un interférogramme avec la pointe. L'interférogramme ainsi obtenu peut alors être comparé à celui obtenu auparavant sur le MCT.

Les deux modules sont détaillés dans la partie qui décrit le couplage de la technique AFM-IR avec le laser supercontinuum.

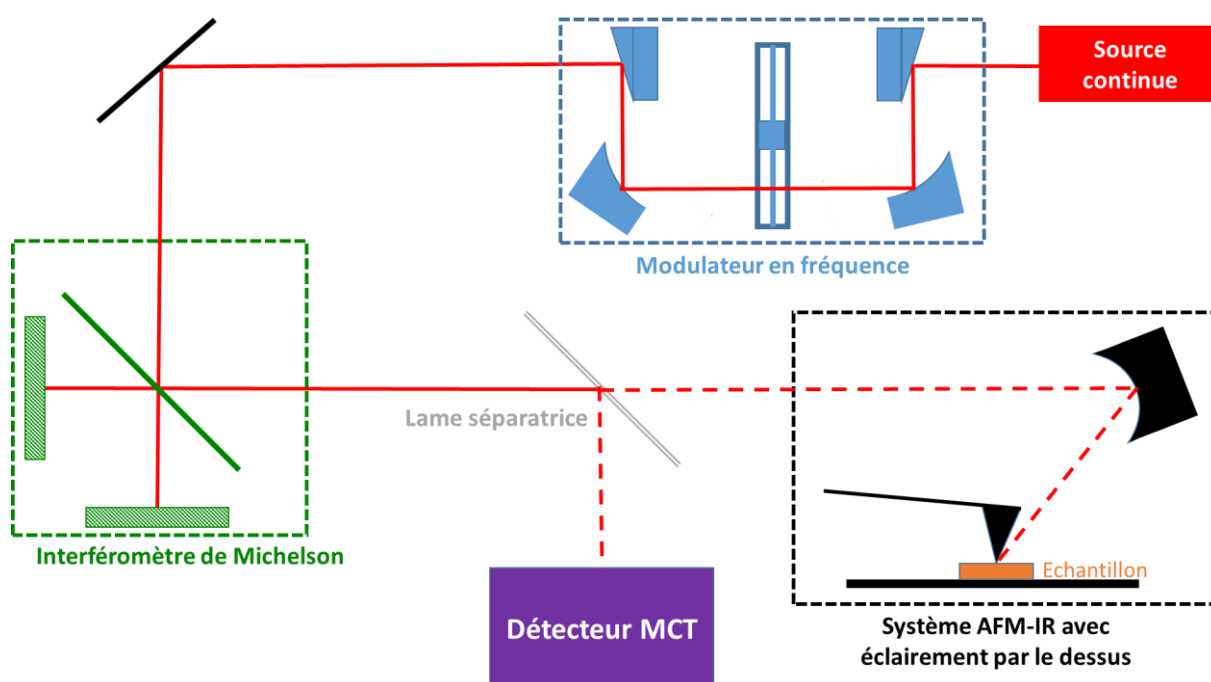


Figure V-6 : Schéma simplifié du montage utilisé pour l'AFM-IR avec des sources continues – Le système AFM-IR (en noir) correspond au système commercial NanoIR2s – L'essentiel du montage repose sur l'ajout de deux éléments en amont : un modulateur en fréquence et un interféromètre de Michelson – Une lame séparatrice permet d'envoyer une partie du faisceau sur un détecteur MCT après son passage par les deux modules

3. Utilisation d'un laser supercontinuum

La preuve de concept de l'AFM-IR couplé à des sources continues ainsi que les premiers tests menés dans l'équipe ont été faits avec un rayonnement synchrotron. Cependant, le fonctionnement d'un grand instrument comme un synchrotron implique un accès limité à quelques semaines par an. Cette limitation d'accès rend le développement instrumental peu aisé, notamment l'optimisation des différents éléments du montage. L'acquisition d'une source laser de type supercontinuum a permis de faire le développement instrumental sans temps d'attente. La source utilisée est un laser Novae dont la présentation est faite en Annexe 1. S'il ne couvre pas toute la gamme du moyen IR et n'a pas la stabilité du faisceau synchrotron, ce type de laser est extrêmement intense (avec une puissance maximale de 2W), ce qui facilite les étapes d'alignement et d'optimisation.

a) Développements associés au laser supercontinuum avec l'AFM-IR

i) Optimisation de l'interféromètre

La première étape a été l'optimisation de l'interféromètre de Michelson (Figure V-7).

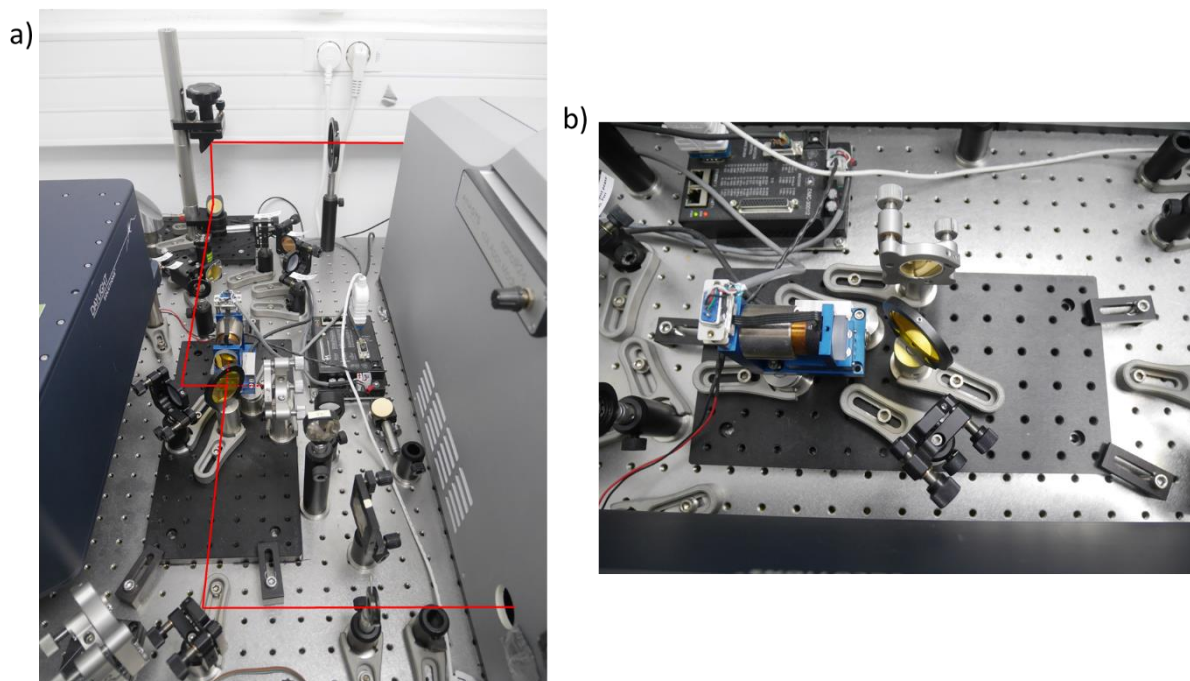


Figure V-7 : Description du de l'interféromètre de Michelson – a) Photographie du montage intégrant l'interféromètre et montrant le chemin optique depuis le modulateur en fréquence (faisceau du haut) jusqu'au système AFM-IR (injection en bas à droite) – pour plus de clarté le trajet optique du laser a été figuré en rouge – b) Photographie du système interférométrique utilisé comprenant une séparatrice de ZnSe, un miroir mobile (à l'horizontale de l'image) et un miroir fixe

L'interféromètre est un interféromètre de Michelson. Il est constitué de deux miroirs recouverts d'or et d'une séparatrice. L'un des miroirs est mobile et est disposé sur un bras de translation horizontale dont le mouvement est contrôlé par des céramiques piézoélectriques. L'autre miroir est fixe. La séparatrice est en ZnSe. Elle contient deux lames, une lame séparatrice et une lame compensatrice qui permet de corriger les effets optiques dus à l'indice optique du ZnSe. La séparatrice va diviser le faisceau incident en deux faisceaux d'intensité égale. Un faisceau va être réfléchi sur le miroir mobile, l'autre transmis au miroir fixe. Les deux faisceaux vont alors être réfléchis par les deux miroirs. La figure d'interférence alors créée va dépendre de la position longitudinale du bras mobile et de l'inclinaison des miroirs. En changeant sa position au cours du temps, il va être possible de moduler l'interférence et ainsi créer l'interférogramme.

Les résultats qui vont être présentés ici ont été obtenus seulement avec l'interféromètre de Michelson. Le modulateur en fréquence est ajouté par la suite.

La mise en place de la mesure AFM-IR avec le laser Novae utilise l'interface classique du système NanoIR2s développée par la compagnie Anasys Instrument. L'interféromètre utilisé est un interféromètre externe au système, il est donc nécessaire de l'interfacer avec le système NanoIR2s. Pour ce faire, un film de polypropylène est mis sur le trajet optique après l'interféromètre de Michelson. Le signal obtenu est alors enregistré par le détecteur MCT.

Connaissant la position des bandes d'absorption IR du polypropylène (noté par la suite PP), il est possible d'optimiser les différents paramètres jusqu'à obtenir le spectre adéquat. Un exemple d'optimisation d'un des paramètres nécessaires à l'interfaçage (le paramètre VSP : velocity shape vector) est donné en Figure V-8.

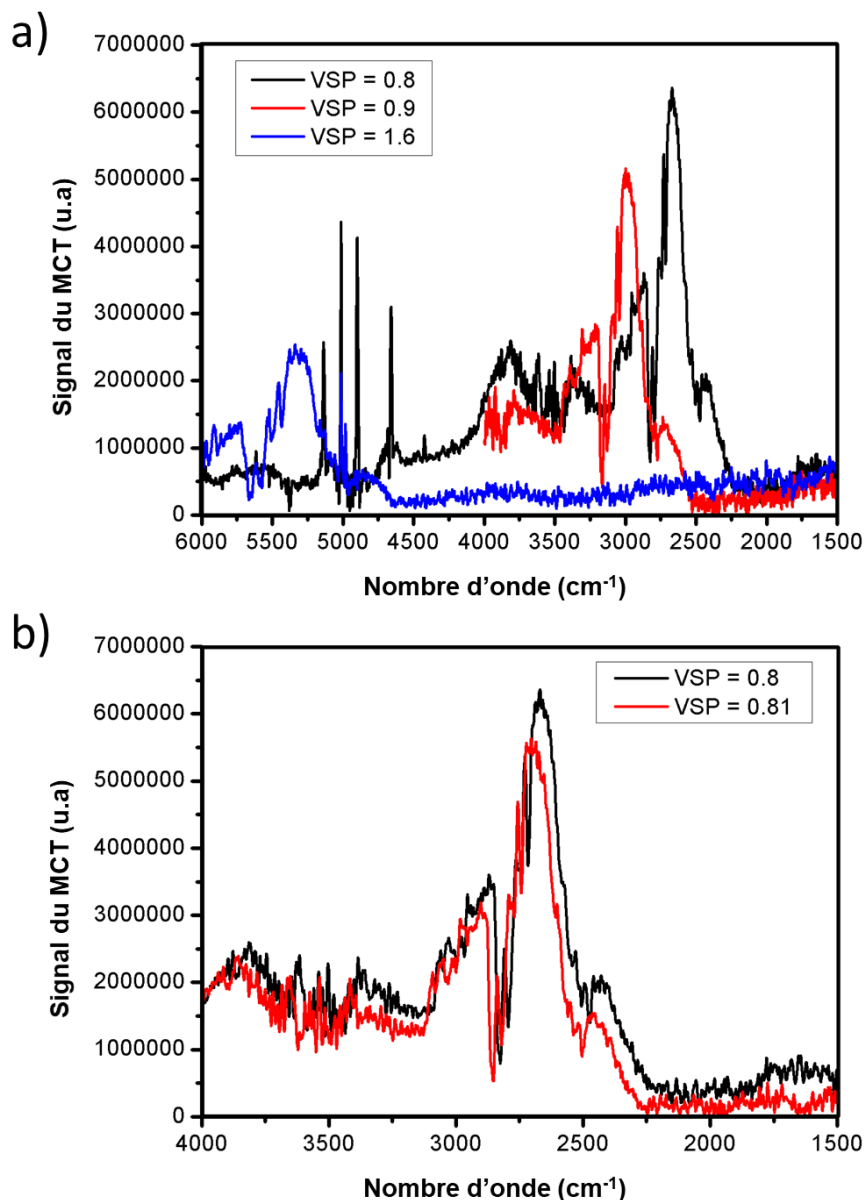


Figure V-8 : Étude du spectre du PP détecté par le MCT – a) Comparaison des spectres obtenus en fonction d'un changement important de la valeur du VSP – b) Comparaison de deux spectres obtenus lorsque le changement de valeur du paramètre est faible

Les spectres sont obtenus par transformée de Fourier inverse de l'interférogramme enregistré avec le détecteur MCT. Ce signal est un signal brut, la forme générale du spectre correspond au spectre d'émission du laser et les bandes d'absorption du PP apparaissent ici en négatif sur ce spectre d'émission. Le paramètre VSP est un paramètre d'interface qui permet de prendre en compte les distorsions induites par la vitesse de balayage du bras mobile de l'interféromètre de Michelson. Ce paramètre est clé pour la transformée de Fourier et donc pour le spectre obtenu. Un changement de sa valeur conduit à un décalage de la position des bandes d'absorption du PP (comparaison de VSP = 0.8 et de VSP = 1.6 dans la Figure V-8 a)),

mais aussi une distorsion de la forme générale du spectre. S'il est possible d'utiliser la position des bandes d'absorption du PP pour régler ce paramètre, un changement très faible du paramètre peut conduire à des distorsions marquées (Figure V-8 b)). L'interfaçage de l'interféromètre externe avec le système NanoIR2s apparaît donc comme critique et doit être pris en compte lors de l'interprétation des résultats ultérieurs (notamment par rapport à la position des bandes d'absorption observées). Il apparaît prioritaire de résoudre ce problème en trouvant une méthode d'interfaçage moins approximative.

L'allure de l'interférogramme comme celui donné par exemple en Figure V-3 est analysée plus en détail : celui-ci se caractérise par un pic central qui indique la position du point de différence de marche nulle (notée par la suite ZPD pour Zero Path Difference) qui est la position du miroir mobile pour laquelle l'intensité lumineuse de l'interférence est la plus élevée. Sur la Figure V-9 a), dix interférogrammes obtenus successivement avec notre module ont été superposés. Dans cette superposition, deux positions pour le ZPD apparaissent de manière reproductible. Or les interférogrammes ont été obtenus sans qu'aucun paramètre ait été changé. Cela signifie que l'interféromètre de Michelson utilisé ici à deux positions de fonctionnement possibles.

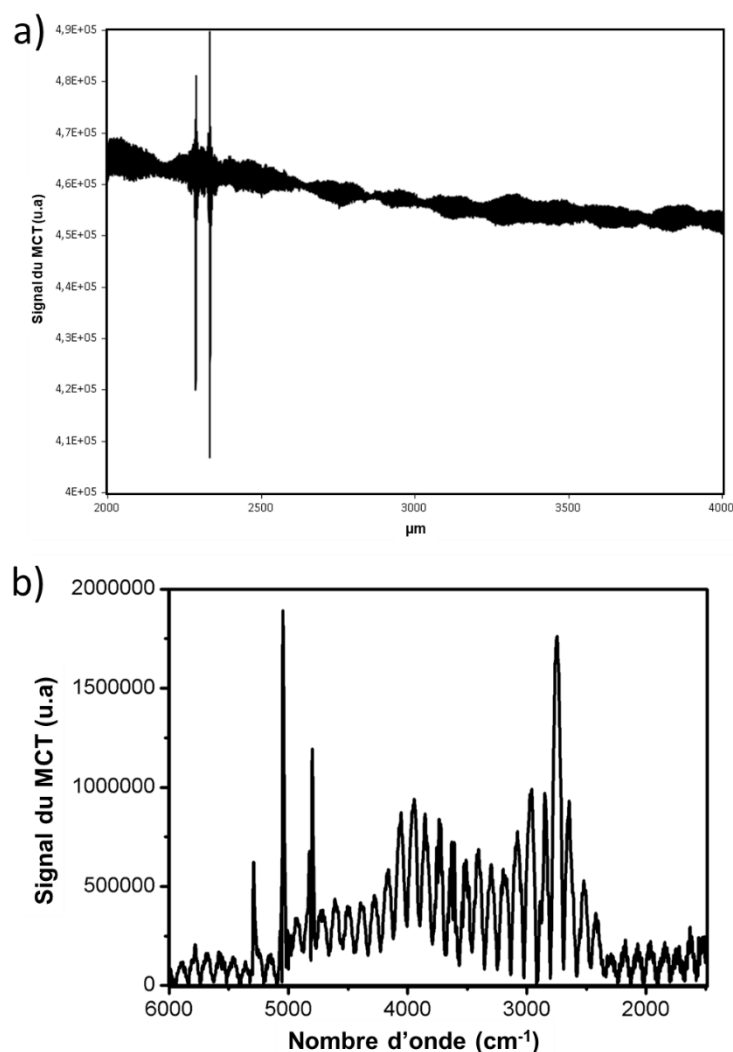


Figure V-9 : Étude de fonctionnement de l'interféromètre de Michelson - a) Superposition de dix interférogrammes obtenus successivement - b) Spectre obtenu à partir de la transformée de Fourier de la moyenne des dix interférogrammes de a)

Le problème observé ici a été identifié comme une erreur mécanique de repositionnement du bras mobile entre deux mesures. Le bras a donc deux positions initiales différentes selon la mesure. Ces deux positions sont décalées l'une l'autre de quelques microns, ce qui explique l'apparition de façon reproductible de deux positions de ZPD différentes. Le fait d'avoir deux positions de ZPD différentes est problématique, car les spectres obtenus en moyennant dix interférogrammes successifs présentent d'importants artefacts (spectre de la Figure V-9 b)). Cette erreur conduisant à l'obtention de deux ZPD est systématique et il n'a pas été possible d'obtenir une seule et unique position de ZPD en modifiant l'alignement du faisceau laser dans l'interféromètre. Ce problème nécessite donc de changer une partie de l'interféromètre de Michelson, ce qui n'a pu être fait avant la fin de la thèse. En conséquence, il n'a pas été possible d'effectuer des moyennes d'interférogrammes pour les mesures ce qui aurait pu améliorer le rapport signal sur bruit et la qualité des spectres obtenus.

En conclusion, l'interféromètre utilisé ici présente d'importantes faiblesses. D'une part, l'interfaçage avec le système AFM-IR demande d'optimiser un certain nombre de paramètres empiriquement et il y a un risque d'introduire ainsi des erreurs dans la mesure. Cela a été illustré avec le paramètre VSP dont un changement minime peut introduire des changements des distorsions des spectres. D'autre part, le montage présente un défaut mécanique qui induit deux positions de fonctionnement possibles. Ce qui empêche de faire des moyennes d'interférogrammes. Pour autant, les résultats obtenus ici montrent qu'il est quand même possible d'obtenir un interférogramme à partir de la source Novae, ce qui est suffisant pour passer à l'étape suivante qui est l'installation et l'optimisation du modulateur en fréquence.

ii) Modulateur de fréquence

Comme dans le cas du rayonnement synchrotron, l'utilisation du modulateur en fréquence est nécessaire pour obtenir un signal AFM-IR.

Le système utilisé ici est similaire à celui proposé par P. Donaldson et al. [195]. Le modulateur en fréquence est un hacheur mécanique composé d'un rotor à vitesse de rotation variable sur lequel est fixée une hélice formée de plusieurs lames. L'espacement des lames est tel que le cycle de service du système est de 50%, c'est-à-dire que lors de la rotation la moitié de la lumière est transmise à l'échantillon. La fréquence du hachage du faisceau par l'hélice est directement reliée à la vitesse de rotation du rotor central. En ajustant cette vitesse, il sera donc possible de calquer la fréquence du faisceau de sortie sur une des résonances de contact du levier. Dans le cas présent, les fréquences maximales accessibles sont de l'ordre de 100 kHz, ce qui limite la mesure à la première harmonique de résonance de contact du levier utilisé. Ce type de modulation conduit à une perte d'intensité totale du faisceau. Pour limiter cette perte, il est nécessaire de s'assurer que l'ensemble du faisceau est transmis lorsque le disque est ouvert. Pour ce faire, le faisceau incident est focalisé grâce à un système de miroirs paraboliques mis en place dans un périscope. Le modulateur en fréquence est disposé sur une platine de translation qui permet d'ajuster finement la position longitudinale de l'hélice pour qu'elle corresponde au foyer image principal du miroir parabolique. L'optimisation des miroirs paraboliques doit être faite de sorte à limiter le plus possible les aberrations optiques. Le système utilisé est donné en Figure V-10.

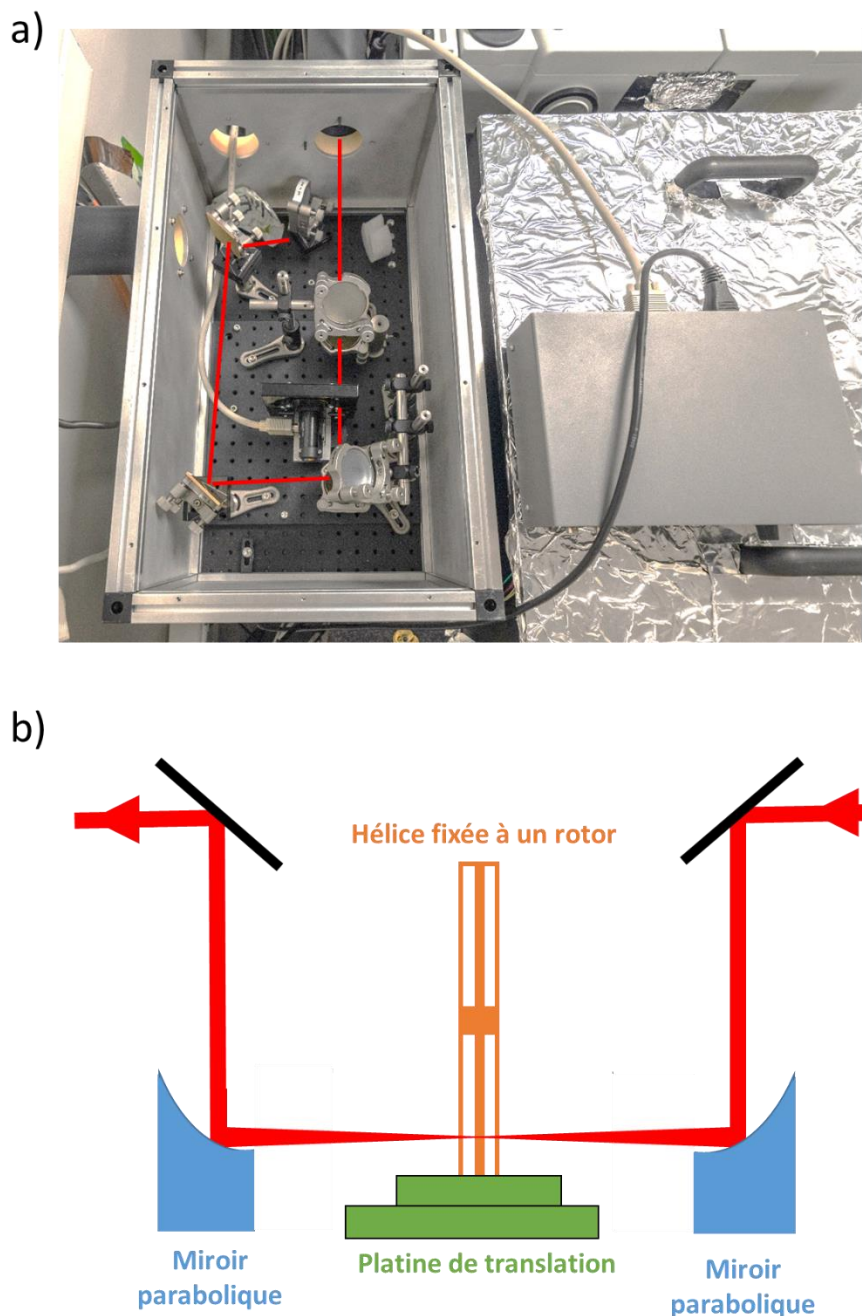


Figure V-10 : Description du modulateur en fréquence utilisé – a) Photographie du montage vu du dessus – pour plus de clarté le trajet optique du laser a été figuré en rouge, il est injecté depuis le trou en haut à droite et est transmis à l’interféromètre par le trou en haut à gauche – b) Schéma de principe d’une vue transversale du modulateur en fréquence permettant de voir les deux miroirs paraboliques intégrés dans un périscope.

Initialement, l’ensemble du montage modulateur en fréquence, interféromètre de Michelson et système AFM-IR se trouvait sur la même table optique. Le faisceau synchrotron ainsi que le laser Novae se situant dans une salle attenante, le faisceau IR étant injecté via une sortie à travers le mur entre les deux salles jusqu’à la table optique de l’AFM-IR. Cependant, des mesures ont montré que lorsque le modulateur était en fonctionnement, les vibrations générées par la rotation de l’hélice étaient suffisamment importantes pour perturber la mesure AFM. Cela peut être observé en regardant la résonance de contact du levier sans tir laser avec et sans fonctionnement du modulateur en fréquence (Figure V-11 a)). Dans ce cas, la résonance de contact était générée par excitation thermique du levier donc indépendamment de

l'expansion thermique générée par l'absorption IR. La résonance de contact observée lorsque le modulateur était en fonctionnement comporte de deux résonances : une résonance de contact similaire à celle observée sans modulateur plus une résonance qui était propre à l'oscillation de la surface de l'échantillon. Plus la fréquence du modulateur était élevée plus les vibrations générées étaient importantes et le pic de résonance décalé vers les basses fréquences (Figure V-11 b).

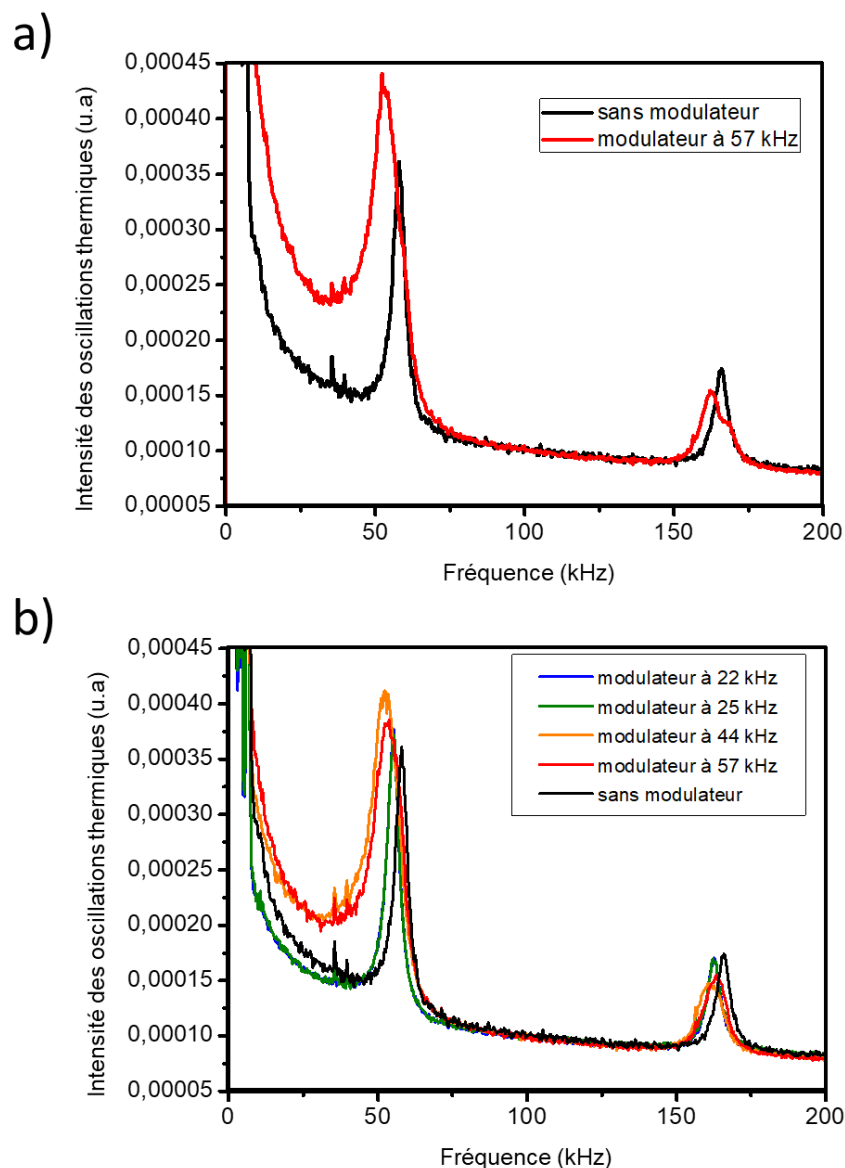


Figure V-11 : Étude de l'effet des vibrations du modulateur en fréquence - a) Résonance de contact du levier AFM avec ou sans modulateur en fréquence - b) Évolution de la valeur de résonance de contact en fonction de la fréquence du modulateur

Le problème observé ici est similaire à celui observé dans le cas de l'oscillation du film de Si_3N_4 quand il est chauffé par le laser (Chapitre III, p. 114). Le signal AFM-IR est alors perturbé par l'oscillation propre de la surface et il est difficile de séparer les deux processus. Il est donc nécessaire de déplacer le modulateur en fréquence dans la salle SMIS 2 attenante (Figure V-12).

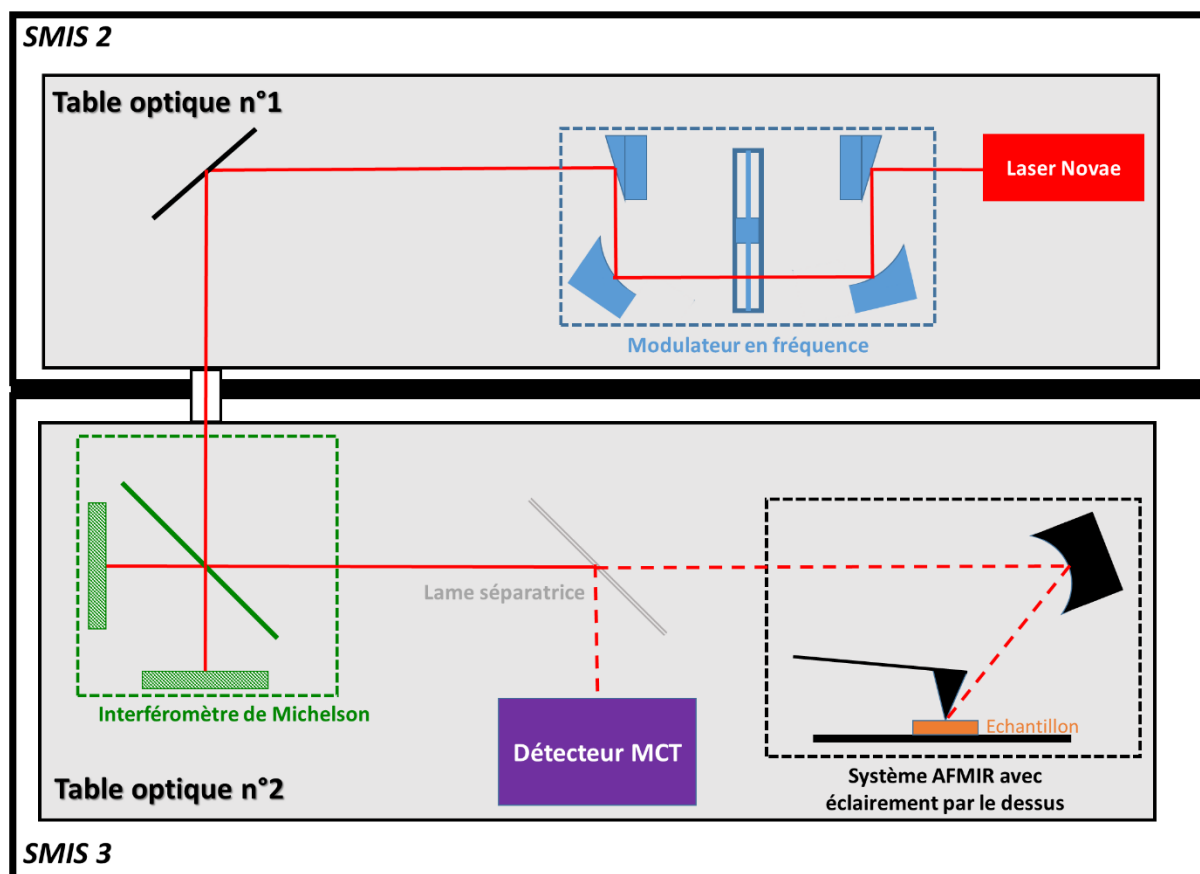


Figure V-12 : Schéma de principe du montage avec deux tables optiques indépendantes

Une fois le montage refait, l'interférogramme obtenu sans ou avec le modulateur en fréquence a été visualisé avec le détecteur MCT. Cette observation a permis de mettre en évidence l'effet de la modulation sur le signal obtenu (Figure V-13).

Le premier effet observable est une atténuation de l'intensité du faisceau incident (Figure V-13 a)). Une diminution d'intensité du faisceau était attendue du fait du hachage mécanique. Cependant, le cycle de service de la roue du modulateur de fréquence étant de 50%, l'intensité du faisceau enregistrée par le détecteur MCT devrait être diminuée de moitié. Or le rapport entre le signal moyen dans le cas où il n'y pas de modulateur en fréquence (Figure V-13 b)) et le signal dans le cas avec le modulateur de fréquence paramétré à 24 kHz (Figure V-13 c)) est égal à 10, ce qui est beaucoup plus important qu'attendu. Le second effet observable est la diminution du rapport signal sur bruit.

Les vibrations générées par le modulateur en fréquence sont toujours présentes : celles-ci semblent induire un désalignement des optiques du périscope (ce qui explique en partie la baisse d'intensité supplémentaire observée) et un bruit acoustique observable sur la partie droite de l'interférogramme. Pour les futures expériences, il apparaît donc nécessaire de changer une nouvelle fois le montage et de rendre le modulateur en fréquence totalement indépendant de tout autre élément du montage en le mettant sur coussin d'air ou en suspension de sorte qu'il n'y ait plus de contact entre le modulateur et tout autre élément du montage ou bien de le mettre sous vide, comme dans le cas de P. Donaldson et al..

Malgré les problèmes observés, l'interférogramme obtenu avec les deux modules optimisés reste relativement bien défini et devrait permettre d'obtenir un spectre d'absorption. L'étape suivante a donc consisté à obtenir un interférogramme en utilisant la pointe AFM.

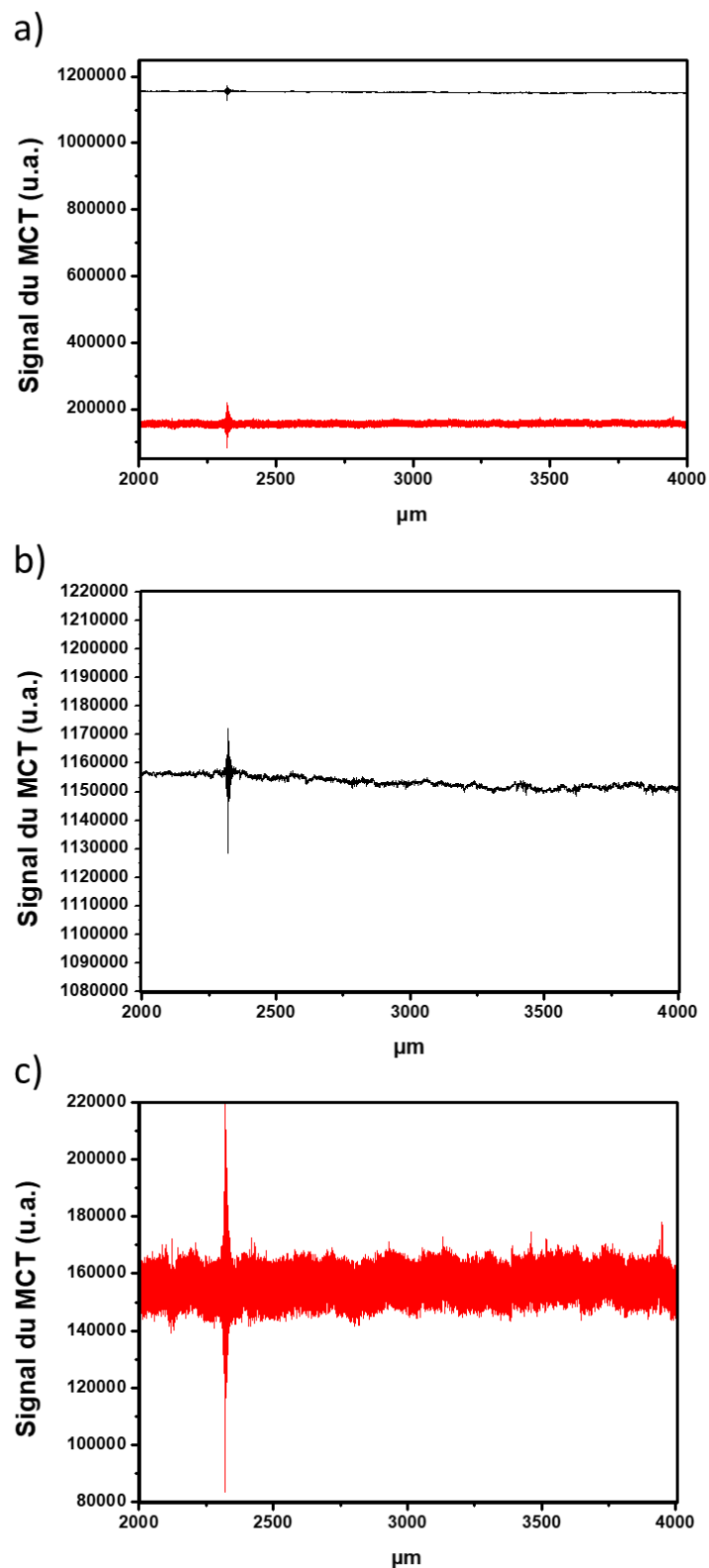


Figure V-13 : Interférogrammes obtenus sur le détecteur MCT sans modulateur de fréquence (en noir) ou avec le modulateur de fréquence à 24 kHz (en rouge) - b), c) Agrandissements sur les interférogrammes obtenus respectivement sans modulateur en fréquence et avec le modulateur en fréquence à 24 kHz – La gamme d'échelles est conservée identique dans les deux cas

iii) Mesure sur un film épais

Pour la mesure avec la pointe, l'échantillon test est un film épais de polyéthylène (noté par la suite PE). Ce polymère a été choisi, car son absorption IR est très importante dans la gamme spectrale du laser Novae. Une fois l'alignement optique fait de manière à amener manuellement le laser le plus proche de la pointe, il est possible d'utiliser les outils déjà implémentés pour la mesure AFM-IR dans le but d'optimiser le signal détectable. L'une des clés de cette optimisation est de pouvoir focaliser au maximum le faisceau sous la pointe en utilisant le dernier miroir parabolique du système. Cependant dans le cas du laser Novae, comme le chemin optique utilisé est celui dédié au synchrotron, il n'est pas optimal pour le laser. Il n'a donc pas été possible d'injecter le faisceau laser Novae de manière adéquate sur le miroir parabolique de focalisation. La qualité de l'alignement peut se constater immédiatement en comparant la forme des profils de focalisation dans le cas du laser QCL et celui du laser Novae (Figure V-14). Pour rappel, cette étape consiste à utiliser des optiques mobiles pour ajuster le laser exactement sous la pointe de l'AFM (cf. Chapitre III, p. 77). Dans le cas du laser Novae (Figure V-14 b)), le spot obtenu est étendu sur plus de 350 μm et ne présente pas un point d'intensité maximum bien défini comme dans le cas du laser QCL (Figure V-14 a)). La puissance sous la pointe va donc être plus faible qu'attendue et la forme du spot peut faire penser à une excitation photo-acoustique interférant avec le levier. En effet si le spot laser est assez grand (c'est-à-dire supérieur 100 μm) il peut générer une onde acoustique avec l'absorption de l'échantillon. Elle va se propager jusqu'au levier AFM et le faire osciller. Cette oscillation sera dominante et il ne sera plus possible de détecter le signal provenant de la pointe AFM.

Une fois le signal optimisé au mieux, il a été possible d'enregistrer un interférogramme en utilisant la pointe comme détecteur. Un exemple d'interférogramme obtenu est donné en Figure V-15. Comparé à ce qui a été obtenu sur le MCT, l'interférogramme provenant de la pointe est plus faible, mais suffisamment intense pour obtenir un spectre grâce à une transformée de Fourier inverse. Le spectre obtenu correspond au spectre rouge de la Figure V-16. Lorsqu'on atténue fortement le faisceau laser incident (courbe noire de la Figure V-16), on peut constater que le spectre enregistré par la pointe AFM diminue également fortement. Ceci démontre bien que le signal enregistré par l'interférogramme est bien un signal associé à l'effet de dilatation photothermique.

Les spectres obtenus sur le film de PE ont permis d'étudier le rôle du modulateur en fréquence sur le spectre obtenu (Figure V-17). La première résonance de contact du levier étant proche d'environ 60 kHz, il est possible de voir que plus la fréquence du modulateur est proche de la résonance de contact est plus le spectre AFM-IR obtenu est intense. Ce comportement permet de vérifier ici aussi que le signal enregistré est bien associé à l'effet photothermique. Donc, malgré les problèmes introduits par l'utilisation du modulateur en fréquence pour obtenir le mode résonant, celui-ci permet d'obtenir le meilleur signal possible pour la mesure AFM-IR.

En conclusion, il est possible d'obtenir un signal AFM-IR avec le laser continuum Novae sur un film épais de PE, ce qui représente la première mesure utilisant ce type de source laser. Cependant, la mise en place des deux modules externes (modulateur et interféromètre) a mis en évidence des limitations techniques pouvant être améliorées. Comprendre tous les phénomènes physiques susceptibles de provoquer les limitations du signal est la clé pour permettre d'améliorer les résultats finaux et permettre d'utiliser de manière plus efficace le couplage avec le laser Novae.

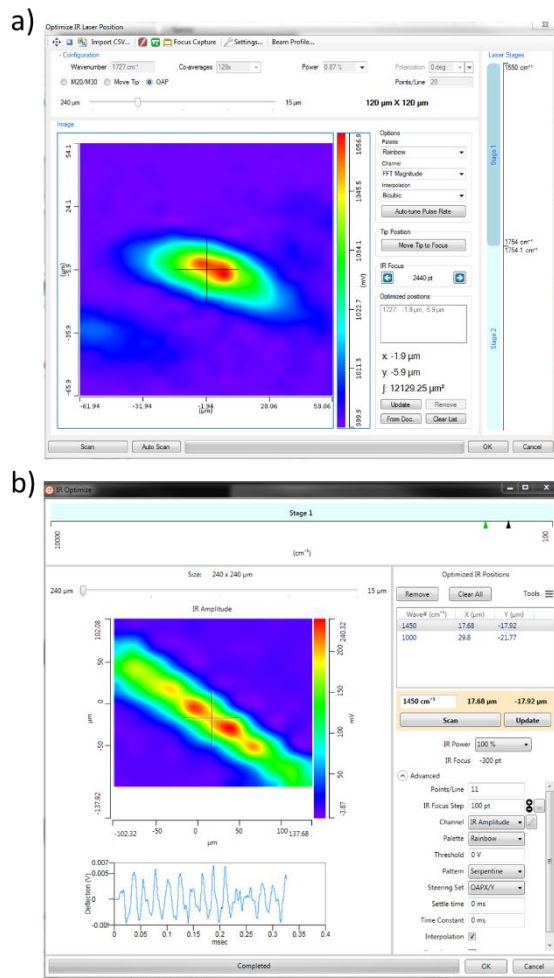


Figure V-14 : Comparaison des deux spots obtenus sur la pointe a) dans le cas du laser QCL - b) dans le cas du laser NovaE (La fenêtre dans le cas du laser QCL est de 120 µm x 120 µm et de 240 µm x 240 µm pour le laser NovaE)

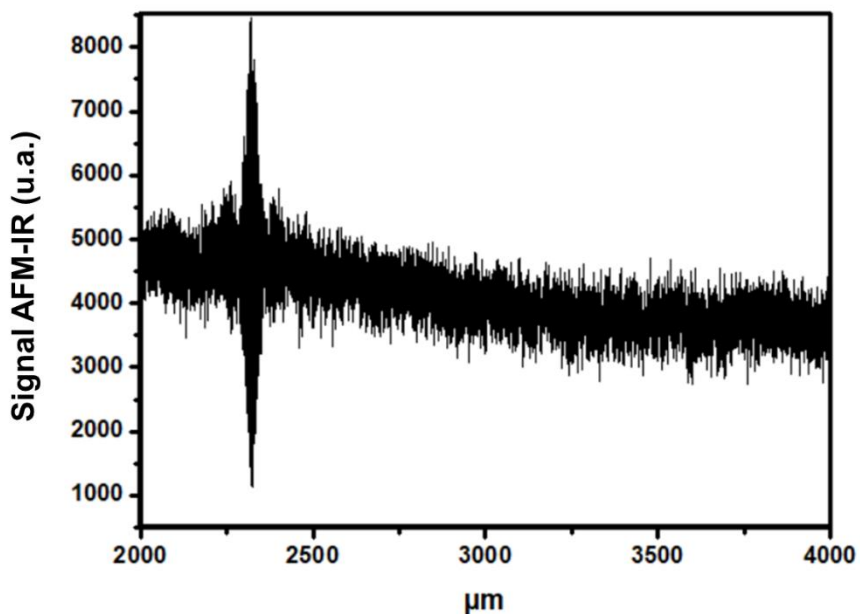


Figure V-15 : Interférogramme obtenu avec la pointe en observant le signal AFM-IR en fonction de la position du miroir mobile de l'interféromètre de Michelson

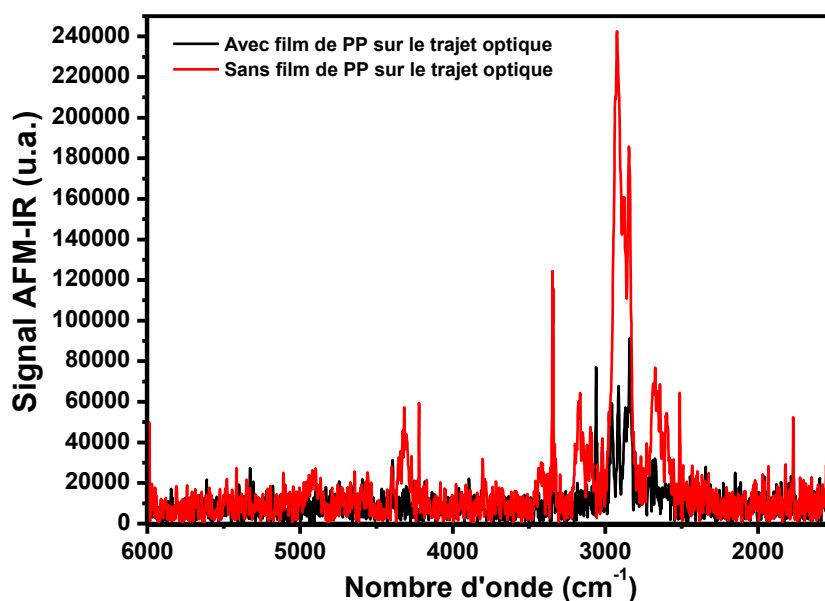


Figure V-16 : Spectre AFM-IR obtenu sur un film de PE avec et sans atténuation du laser incident

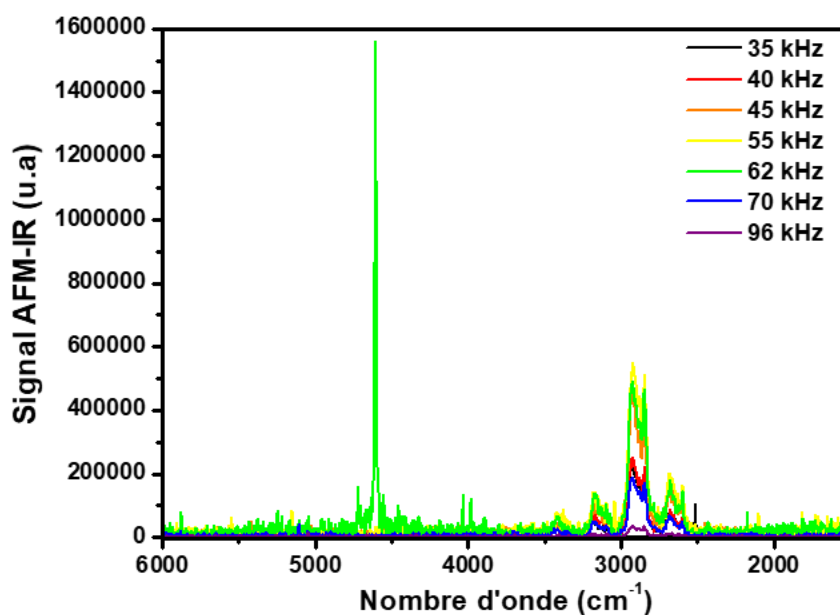


Figure V-17 : Spectres AFM-IR obtenu sur le film de PE avec le laser Novae en fonction de la fréquence du modulateur en fréquence

b) Limitations instrumentales

Pour améliorer le signal obtenu avec le laser Novae, il est tout d'abord essentiel d'améliorer le trajet optique vers le NanoIR2s. Dans ce cas, il ne sera plus optimal pour le laser QCL. De fait, pour pouvoir continuer à utiliser le système avec les deux lasers, le choix a été fait de

trouver un meilleur compromis laissant le trajet optique optimal pour le laser QCL. Ceci est aussi expliqué par le fait que les spectres observés présentent des artefacts et des problèmes qui ne sont pas liés à l'alignement optique, mais à la configuration utilisée ici.

Le meilleur résultat obtenu dans ces conditions expérimentales est représenté Figure V-18 a). Il a été obtenu sur un film de PE d'épaisseur de 2 μm , pour une puissance laser incidente d'environ 10 mW, une fois le trajet optique et le signal sur la pointe AFM optimisés et en prenant en compte les contraintes instrumentales.

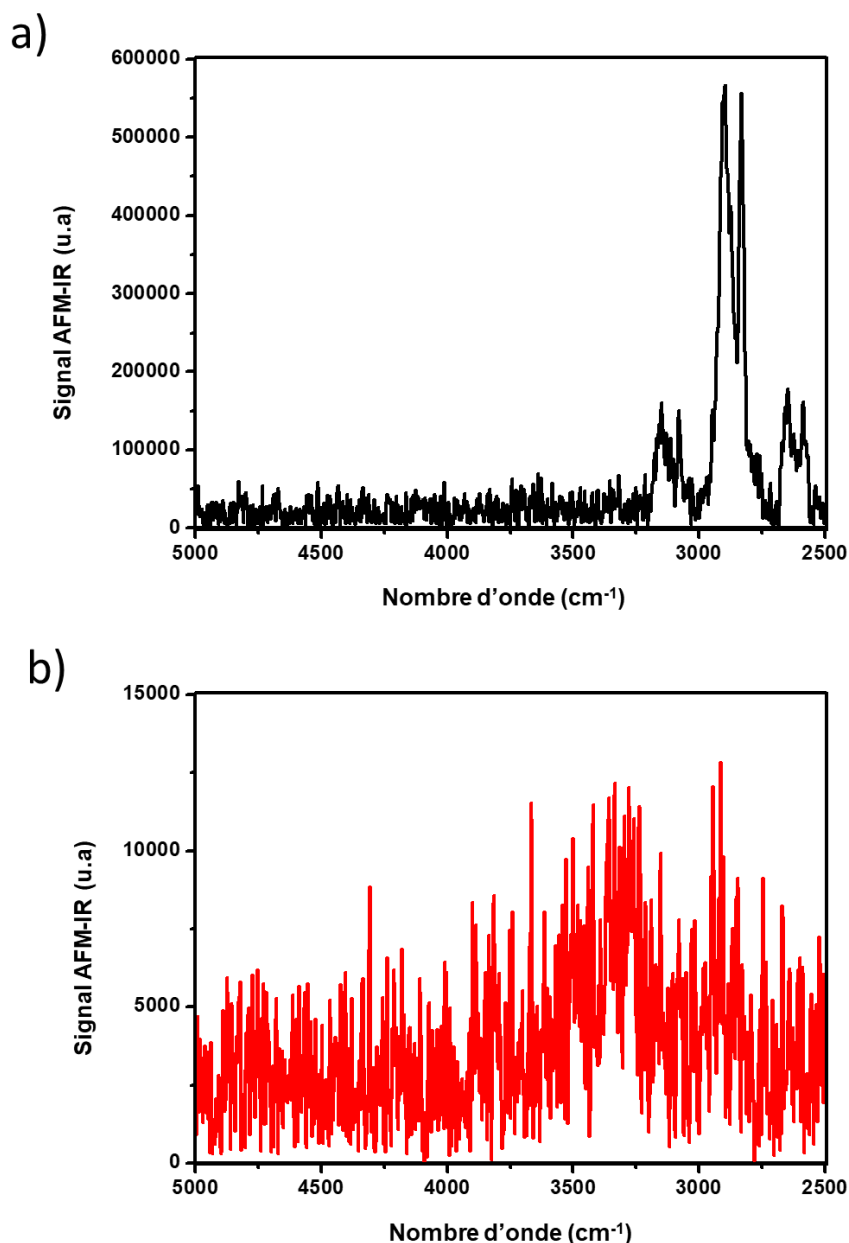


Figure V-18 : Spectres AFM-IR obtenu avec le laser Novae a) sur le film épais de PE - b) sur un dépôt de collagène épais

Sur ce spectre, il est possible de voir les deux bandes d'absorption IR centrées autour de 2850 cm^{-1} et 2920 cm^{-1} associées à l'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons C-H des groupements CH_2 qui sont caractéristiques du PE [197], [198]. Un léger décalage de la valeur en nombres d'onde entre les maxima des pics AFM-IR et FTIR peut s'observer et peut

être expliqué par une incertitude sur le paramètre VSP qui, comme vu précédemment, influe sur la position des pics. Une multimodulation du pic du PE est aussi observée : deux pics secondaires apparaissent de part et d'autre du pic principal. Ce phénomène est déjà connu en spectroscopie IR classique. Les pics sont des artefacts de mesures qui sont générés par un problème de traitement mathématique de l'interférogramme par transformée de Fourier. Ceci est probablement dû au fait que l'interférogramme obtenu est asymétrique alors que l'algorithme appliqué le considère comme étant symétrique. Ce problème devrait donc pouvoir être résolu en modifiant les conditions d'application de la transformée de Fourier et nécessite des modifications du logiciel commercial.

Une mesure équivalente a été effectuée sur un échantillon de collagène d'une épaisseur de plus de 1 μm (Figure V-18 b)). Du fait des problèmes de stabilité de l'interféromètre identifié précédemment, le spectre a été obtenu en moyennant dix spectres différents obtenus avec un unique interférogramme à chaque fois. Dans ce spectre, il est difficile de distinguer les différentes signatures spectrales attendues notamment les bandes amides A (autour de 3300 cm^{-1}) et amides B (autour de 3080 cm^{-1}) ainsi que celles des bandes $-\text{CH}_2$ [118]. Alors que l'échantillon analysé ici a des caractéristiques d'épaisseur proche de celle du film analysé en Figure V-18 a), le signal obtenu est 50 fois plus faible. La bande amide A est relativement intense et une différence d'absorption entre les deux espèces n'est pas suffisante pour suffire à expliquer une baisse d'intensité par un facteur 50. Un autre facteur entre donc en jeu et n'a pas été encore identifié.

Pour comprendre ce facteur, il est nécessaire de répondre à une question qui n'a pas été abordée jusqu'ici que ce soit dans le cas des mesures effectuées ici comme celle effectuée par P. Donaldson et al. : celle du comportement thermique de l'objet sous l'éclairement généré par la modulation. En effet, si l'utilisation d'un modulateur en fréquence permet de moduler la source continue et d'obtenir une illumination pulsée, l'éclairement n'est pas comparable à ce qui peut être observé avec un laser QCL.

Dans le cas du laser Novae modulé, le paramètre qui va fortement varier par rapport au laser QCL est la durée de l'impulsion laser. Pour un laser QCL, la durée du tir laser peut être fixée par l'opérateur dans une gamme allant de la dizaine de nanosecondes à 500 ns. En général, la durée du tir laser utilisée pour nos expérimentations est de 200 ns. Pour le laser Novae, le modulateur possède un cycle de service de 50% et en considérant une fréquence de rotation de l'hélice de 65 kHz, la durée de l'illumination est d'environ 7,5 μs . En conséquence, avec une telle durée pour l'éclairement, la situation observée ici est plus proche du cas de la mesure AFM-IR classique utilisant un laser à électron libre où le temps de tir est supérieur au temps de relaxation de l'objet [13]. Dans le cas de la mesure AFM-IR classique, la fréquence de tir est de l'ordre de 1 kHz, du fait de la durée de l'impulsion laser considérée, l'objet peut revenir à sa position d'équilibre avant le tir suivant. Les conséquences d'un pulse long sont donc limitées à des questions de diffusion thermique. En revanche, dans le cas étudié ici la situation est plus complexe, car le mode d'oscillation étudié n'est pas le mode d'oscillations amorties, mais le mode de résonance forcée où l'objet doit avoir totalement relaxé entre deux pulses à une fréquence de tir bien plus élevée.

Pour essayer de comprendre les résultats observés avec le laser Novae, un modèle similaire à celui utilisé dans le Chapitre II a été utilisé (cf. p. 65). En observant la dilatation thermique d'un objet sur un temps long et notamment le retour à une position d'équilibre, il peut être possible de comprendre les résultats observés dans le cas du film de PE et du dépôt de collagène. Comme observé dans le chapitre II, la géométrie de l'objet a une influence sur le temps de relaxation et sur les propriétés de dilatation thermique. Il est donc probable qu'il

existe une différence de comportement selon si l'objet est un film homogène ou à une structure beaucoup plus hétérogène. Pour illustrer l'effet de la forme, deux types d'objets ont été modélisés : un disque et une sphère. Comme pour l'étude du chapitre II, l'expansion thermique de l'apex de l'objet est observée au cours du temps et le matériau choisi est du PMMA. Le résultat obtenu par ces simulations est donné en Figure V-19.

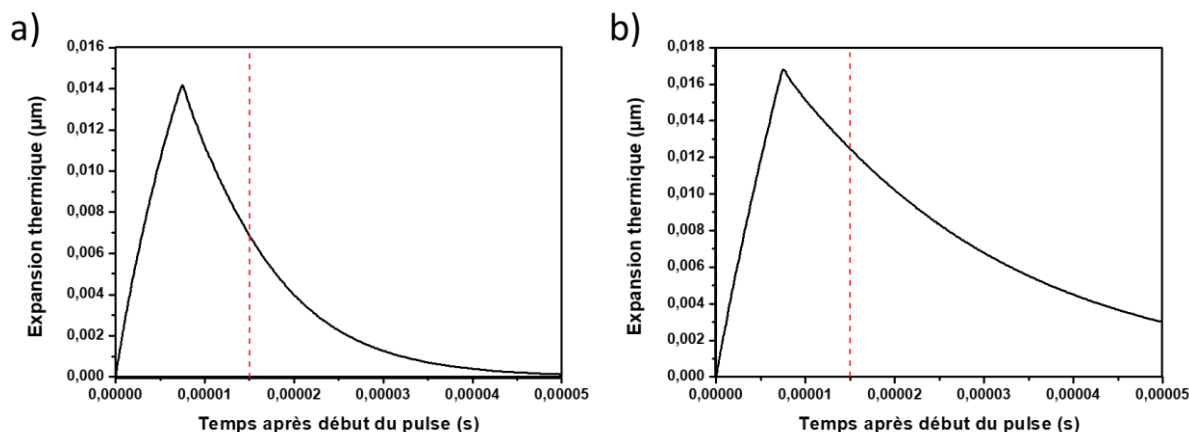


Figure V-19 : Expansion thermique au cours du temps d'un objet obtenu par modélisation COMSOL après un chauffage modélisant le tir laser Novae à $t = 0$ s – a) Cas du disque de PMMA de $2 \mu\text{m}$ d'épais – b) Cas d'une sphère de PMMA de $2 \mu\text{m}$ d'épais – dans les deux cas, la ligne en pointillée rouge indique le temps où le second tir laser devrait avoir lieu.

La modélisation a été faite pour un tir unique de $7,5 \mu\text{s}$, ce qui correspond au temps d'illumination pour une fréquence de rotation du modulateur de 65 kHz . Les épaisseurs du disque et du cylindre ont été fixées à $2 \mu\text{m}$ pour être proches des épaisseurs des échantillons étudiés. Une ligne en pointillée rouge est indiquée sur la Figure V-19 et correspond au moment où devrait commencer le tir suivant. On constate, dans les deux cas, que lorsque le second tir devrait avoir lieu, l'objet n'est pas revenu à sa position d'équilibre. Ceci signifie que pour chaque tir, l'objet va continuer de se dilater jusqu'à atteindre un régime de saturation (régime stationnaire). Dans ce cas, l'expansion thermique est bien moins efficace, car seule une toute petite partie de l'éclairement participe aux variations de température. La vitesse de relaxation thermique de l'échantillon apparaît donc ici comme le facteur clé, car elle va définir l'amplitude de l'oscillation générée par les expansions photothermiques successives et donc le signal qui va pouvoir être détecté par la pointe. Dans le cas du disque, le temps de relaxation est plus rapide que dans le cas de la sphère. En conséquence, l'oscillation générée par les tirs successifs sera plus importante pour le disque que pour la sphère. C'est probablement cette différence de relaxation thermique en fonction de la géométrie de l'objet qui va expliquer la différence de signal obtenu en Figure V-18. Il est à noter que de manière similaire à la mesure effectuée ici sur le film de PE, les échantillons utilisés dans la mesure AFM-SR-IR par P. Donaldson et al. sont uniquement des films épais de polymères purs.

Des précédents résultats, il apparaît donc que la qualité de la modulation du faisceau obtenu par le hacheur mécanique en fréquence n'est pas le seul facteur important. Le temps du pulse est aussi un facteur clé. Or pour obtenir un temps de pulse comparable à celui obtenu avec un laser QCL il est nécessaire de diminuer d'au moins un ordre de grandeur le cycle de service de l'hélice utilisée pour la modulation en fréquence. Une autre solution consiste à mettre en place un système de doubles hélices coordonnées. L'application de ces solutions va dans les deux cas conduire à une perte de puissance importante au niveau du modulateur en fréquence. Pour le laser Novae, cette perte peut être compensée par la puissance incidente du laser (qui peut aller jusqu'à 2 W). En revanche dans le cas du synchrotron où l'intensité incidente est plus faible que celle du laser Novae [192], la perte de puissance occasionnée par

de tels systèmes ne paraît pas vraiment envisageable. Ces résultats posent donc la question de la viabilité du hacheur mécanique comme choix de modulateur en fréquence.

4. Essais de mesure avec une source synchrotron

Les mesures de couplage avec un synchrotron effectuées durant ma thèse ont eu lieu sur la ligne SMIS du synchrotron Soleil. Ce projet fait suite au projet initié par A. Dazzi et P. Dumas.

Initialement utilisée pour des mesures dans la gamme spectrale des rayons X, la source synchrotron a aussi été développée comme une source alternative aux sources globales utilisées en spectroscopie IR. La première ligne de lumière synchrotron dédiée à l'infrarouge a été réalisée au National Synchrotron Light Source au Laboratoire National de Brookhaven [199]. L'intérêt majeur du rayonnement synchrotron est d'être cent à mille fois plus brillant que les sources classiques [27]. Cette forte brillance a été très utilisée en microspectroscopie IR confocale, car elle a permis d'atteindre les meilleures résolutions [22]. D'un point de vue technique, le rayonnement synchrotron dans la gamme du moyen infrarouge peut être extrait soit au niveau d'un aimant de courbure [200] de l'anneau principal du synchrotron, soit au niveau d'un aimant de type onduleur [201]. Dans le cas de l'aimant de courbure, le rayonnement est généré par l'interaction des électrons en mouvement à une vitesse proche de la vitesse de la lumière et du champ magnétique de l'aimant. Deux cas de figure sont possibles. Soit les électrons émettent un rayonnement après avoir effectué un mouvement courbe dans l'aimant qui maintient un champ magnétique constant. Soit les électrons émettent un rayonnement du fait d'une variation très brusque du champ magnétique, cette situation apparaît au niveau des bords des aimants de courbures. Quelle que soit la source de rayonnement, les propriétés optiques du faisceau obtenu sont relativement équivalentes [202] et permettent de couvrir l'ensemble de la gamme du moyen IR. De ce point de vue, quelle que soit la source de rayonnement utilisée, le résultat devrait être équivalent pour la technique AFM-IR.

La ligne SMIS est une ligne de lumière dédiée à l'imagerie dans la gamme spectrale du moyen IR qui a été développée sur le synchrotron Soleil. Ce synchrotron est un synchrotron de troisième génération dont la source d'énergie est de 2.75 GeV. Dans le cas de cette ligne de lumière, le rayonnement infrarouge est extrait au niveau d'un aimant de courbure. Les deux types de rayonnement accessibles dans cette configuration sont collectés et sont envoyés séparément sur deux lignes distinctes où se trouvent différents systèmes de microscopes confocaux. L'une des deux lignes a été prolongée pour accueillir le système AFM-IR. Pour plus d'information, l'ensemble précis des détails techniques de la ligne SMIS peut être trouvé dans la publication suivante de P. Dumas et al. [203].

Pour cette mesure, le trajet optique est identique à celui utilisé avec le laser supercontinuum Novae. Pour vérifier que l'alignement des deux modules (interféromètre et modulateur en fréquence) est toujours optimal, un interférogramme a été acquis avec le détecteur MCT. Le faisceau synchrotron est moins intense que le laser Novae [192], ce qui a pu se constater sur l'interférogramme obtenu sur le détecteur MCT. Plusieurs tests ont été menés pour essayer de détecter le faisceau synchrotron sous la pointe, mais il a été impossible de détecter une expansion thermique de l'échantillon (film de PE). En conclusion, il est réellement nécessaire d'améliorer l'intensité du signal en sortie des modules (modulateur et interféromètre) pour réussir à faire une mesure d'AFM-IR en utilisant la source SMIS du synchrotron Soleil.

III. Conclusions et Perspectives

Pour conclure, les travaux préliminaires effectués au cours de ma thèse ont permis de mettre en lumière les difficultés de la mise en place d'un couplage AFM-IR avec une source continue. L'utilisation de nouvelles sources continues comme les lasers supercontinuum s'est révélée un vrai atout du fait de la puissance de sortie importante, mais aussi pour compenser la disponibilité restreinte de la source synchrotron. Ce qui permet un meilleur suivi du travail. Pour améliorer la qualité des mesures, le système AFM-IR-SR nécessite des améliorations techniques notamment au niveau de l'interféromètre. La principale limitation qui émerge de ces travaux est celle de la modulation de la source continue. La mise en place de cette modulation est inévitable pour pouvoir mesurer l'expansion thermique et l'utilisation de la résonance forcée est le moyen le plus accessible pour permettre d'obtenir un signal à partir d'une source de faible puissance. En l'état, la modulation est faite grâce à un modulateur en fréquence mécanique qui est le seul système actuellement accessible. Or il apparaît que la longueur des pulses obtenus ici est beaucoup trop importante pour permettre la mise en place d'une résonance forcée efficace et explique le faible signal obtenu sur le dépôt de collagène pur. Pour avoir une mesure AFM-IR en résonance forcée, il faut réduire le temps du pulse pour qu'il soit du même ordre de grandeur que celui du laser QCL. Cela implique de réduire fortement le cycle de service de la lame utilisée pour la modulation. Cette solution conduirait à une importante perte d'énergie du faisceau. Dans le cas d'un laser supercontinuum comme le laser Novae utilisé ici, cette perte peut être compensée par la puissance importante du laser. Mais dans le cas d'une source synchrotron où la puissance initiale est beaucoup plus faible, cette solution n'est pas possible à mettre en œuvre.

Quelles perspectives alors pour la mesure AFM-IR avec des sources continues ? La première solution serait de changer la façon de moduler le faisceau. Des prototypes utilisant des membranes de microsystèmes électromécaniques, ayant une oscillation à haute fréquence, ont été proposés comme solution alternative. Cependant, aucun de ces prototypes n'a pu être testé pour le moment. Une seconde solution serait de ne pas effectuer une mesure en résonance forcée, mais plutôt une mesure en un seul tir long. La mesure serait alors similaire à la mesure AFM-IR avec un laser à électron libre [11], [51]. Dans ce cas-là, la diminution du signal pourrait être compensée par l'utilisation de levier spécifique possédant un facteur de qualité élevé comme les transducteurs optomécaniques déjà utilisé pour une mesure AFM-IR classique [88]. Cependant comme discuté dans le Chapitre II (cf. *p.* 73), ces systèmes sont difficilement accessibles et nécessitent le développement d'un savoir-faire spécifique.

Une autre question se pose quant à l'avenir de ce type de couplage. Les récentes améliorations du couplage entre les lasers QCL dernières générations et les systèmes AFM-IR permettent maintenant l'acquisition de spectres à une vitesse très élevée, de l'ordre d'une seconde pour couvrir une gamme de 1000 cm^{-1} . Cette vitesse peut théoriquement être améliorée, car la plupart des pertes de temps observées dans l'acquisition sont dues à des temps de communications entre les appareils. L'amélioration théoriquement accessible permettrait d'atteindre des temps proches de la milliseconde pour 1000 cm^{-1} . Dans ce cas, les problèmes relevés précédemment dans le cas de l'acquisition hyperspectrale AFM-IR avec un laser QCL seraient en grande partie levés. Cela ne signifie pas pour autant la fin du couplage de la technique AFM-IR avec les sources continues. En effet, comme discuté auparavant, l'acquisition utilisant un laser QCL possède toujours un mauvais rapport signal sur bruit et celui-ci est intrinsèque à la mesure (Chapitre II) et ne peut être corrigé que par l'accumulation de spectres. De plus, les sources QCL sont pour le moment limitées dans la gamme du moyen IR et il est impossible de couvrir une gamme étendue à l'ensemble du moyen IR avec un seul

laser QCL. Obtenir des spectres couvrant toute la gamme IR comme c'est le cas avec les sources continues nécessiterait donc l'utilisation de plusieurs lasers QCL en série ce qui représente aussi un défi technique.

Conclusions générales

Depuis sa création en 2005, la technique AFM-IR est en constante évolution et est devenue une technique importante pour la spectroscopie d'absorption IR à haute résolution. Plusieurs développements instrumentaux ont permis d'améliorer de manière conséquente : les résolutions spatiales et spectrales, la sensibilité, l'accessibilité, les vitesses d'acquisition des données et les champs d'application. C'est dans le cadre de ses développements instrumentaux que s'est effectuée ma thèse. Ainsi, sur l'ensemble de mon travail de thèse, les quatre principaux développements instrumentaux de l'AFM-IR, à savoir la mise en place de la résonance forcée, l'éclairement par le dessus, l'utilisation du mode tapping et le développement d'un mode d'imagerie hyperspectrale, ont été validés sur le plan expérimental et pour deux d'entre eux validés théoriquement.

L'innovation la plus spectaculaire de ces dernières années est l'utilisation des lasers QCL qui ont permis la mise en place de la résonance forcée (Chapitre II). Ce développement apparaît comme une réelle avancée dans le domaine de l'AFM-IR. En effet, l'utilisation de la résonance forcée permet d'améliorer la sensibilité de la technique d'un voire de plusieurs ordres de grandeur et ouvre la possibilité d'effectuer des mesures sur des objets de dimensions nanométriques. Cependant, comme il a été montré dans les Chapitres II et III, pour réussir à atteindre cette échelle de mesure, il est nécessaire d'adopter une configuration optimale utilisant une pointe Si-Au, sachant que l'interprétation des spectres doit être prise avec précaution due aux effets de non-linéarité observés. À cela s'ajoute l'impact que la dimension nanométrique de l'objet induit sur son comportement thermique. Cela a pu être évalué grâce aux simulations avec des modélisations de type éléments finis, et a permis de compléter le modèle déjà existant de la loi thermique. Le principal résultat de ces modélisations est que le comportement thermique d'un échantillon de quelques nanomètres d'épaisseur diffère de celui d'un échantillon de plusieurs centaines de nanomètres d'épaisseur du fait des temps de relaxation mis en jeu. L'expansion thermique de l'objet est alors réduite, ce qui contrebalance le gain de sensibilité apporté par l'utilisation de la résonance forcée. Cependant, des solutions existent pour améliorer encore la résonance forcée. En effet, l'augmentation de sensibilité est directement reliée aux propriétés mécaniques du levier. En augmentant son facteur de qualité, il devrait être possible d'améliorer encore les résultats obtenus en AFM-IR en résonance forcée.

Le deuxième développement important est la possibilité d'avoir une configuration d'éclairement par le dessus (Chapitre III). L'éclairement par le dessus a été développé dans le but de simplifier la préparation d'échantillon et de s'affranchir des prismes de ZnSe qui étaient initialement nécessaires pour la configuration d'éclairement en réflexion totale. Affranchi de cette contrainte, un large choix de substrats est maintenant accessible en AFM-IR. Ceci a permis le développement de mesures corrélatives dont deux exemples d'application ont été présentés dans le Chapitre III, l'un combinant l'AFM-IR avec la microscopie optique non linéaire pour étudier la dénaturation du collagène, l'autre couplant l'AFM-IR avec la microscopie électronique à transmission pour caractériser des fibres protéiques d'origine bactérienne. Le premier projet a porté sur l'étude de la dénaturation du collagène grâce à une mesure corrélative d'AFM-IR et de microscopie NLO. Le second, sur la caractérisation de fibres protéiques bactériennes, a conduit à développer une mesure corrélative entre l'AFM-IR

et la microscopie électronique. Il existe cependant deux contreparties à ce changement d'éclairage :

- i) L'illumination de l'échantillon n'est plus contrôlée. On ne connaît donc pas l'épaisseur de l'échantillon sondé, ce qui peut s'avérer problématique dans le cadre du développement de mesures quantitatives.
- ii) Il est maintenant nécessaire d'utiliser des leviers Si-Au pour s'affranchir de la réponse thermique du levier illuminé par le laser. Leur utilisation est à double tranchant. D'un côté, ils augmentent le signal AFM-IR et permettent donc d'améliorer encore la sensibilité de la mesure. D'un autre côté, cela conduit à l'apparition de fortes distorsions dans les spectres d'absorption IR.

Or l'une des grandes forces de la technique est qu'elle permet une mesure directe de l'absorption IR de l'échantillon située sous la pointe et les spectres ainsi obtenus sont directement aux spectres FTIR. Du fait des distorsions observées ici, cela n'est plus vrai. Et il est maintenant important de quantifier les effets de la pointe Si-Au en fonction de l'épaisseur de l'échantillon et de la configuration d'éclairage.

Contrairement à ce qui est admis dans la littérature, les distorsions observées avec la pointe Si-Au ne semblent pas liées à un effet de polarisation. Les phénomènes physiques mis en jeu sont complexes et loin d'être encore parfaitement compris. En conséquence, si l'utilisation de l'éclairage par le dessus et de la pointe en or permet des améliorations de la mesure AFM-IR, ces améliorations ont un prix : celui de la complexification de l'interprétation des données. Il est donc essentiel de mieux appréhender l'ensemble des phénomènes pour pouvoir exploiter au maximum les capacités de la technique dans ces conditions. Cela est d'autant plus vrai si l'objectif est d'atteindre une sensibilité nanométrique.

En effet, si certains effets dus aux changements d'échelles ont pu être mis en évidence dans le Chapitre II, notamment au niveau du comportement thermique de l'objet en fonction de sa taille, les expériences menées dans le Chapitre III sur l'effet de la surface d'or ont permis de montrer qu'il existait des paramètres physico-chimiques à prendre en compte comme l'interaction de l'objet nanométrique avec la surface montrée à travers l'exemple de la fibre protéique PrP. L'ensemble des résultats présentés dans ce Chapitre III ne remettent pas en cause l'intérêt de la mesure AFM-IR pour les échantillons nanométriques. En revanche, ils mettent en évidence la complexité des phénomènes mis en jeu et ouvrent de nouvelles perspectives pour mieux maîtriser la mesure AFM-IR et améliorer les interprétations.

Le Chapitre IV s'est focalisé sur une autre amélioration développée pour l'AFM-IR qui est l'utilisation du mode tapping. Jusque-là, seul le mode contact de l'AFM était utilisé, ce qui ne permettait pas de mesurer des échantillons mous ou peu adhérents sur la surface. La principale difficulté de la mise en place du mode tapping pour la mesure AFM-IR est de réussir à détecter l'oscillation du levier due à l'expansion thermique de l'objet alors que le levier oscille déjà pour l'imagerie de topographie. Durant ma thèse, nous avons pu montrer qu'il était possible d'utiliser une interaction non linéaire analogue à celle utilisée en AFM hétérodyne pour résoudre ce problème. La preuve de concept a été faite avec des nanoparticules polymériques et a permis de montrer que l'on retrouve alors les capacités de la technique AFM-IR. Le véritable défi a ensuite été d'appliquer cette nouvelle modalité à l'étude de la matière organique dans les UCAMMs. Nous avons ainsi dépassé la preuve de concept et montré que ce mode d'acquisition pouvait être utilisé sur des échantillons complexes et aboutir à des résultats très pertinents.

Dans le dernier Chapitre de ce manuscrit, des travaux préliminaires sur la mise en place de sources continues pour l'AFM-IR ont été présentés. Jusqu'ici, la mesure AFM-IR pouvait s'effectuer selon deux modes d'acquisition : à savoir la cartographie d'absorption à un nombre d'onde ou le spectre d'absorption en un point. L'enjeu de l'utilisation de sources continues est de permettre de passer de ces deux modes d'acquisition à un unique mode d'acquisition hyperspectral. L'intérêt ici est d'obtenir en une seule acquisition toute l'information spectrale avec la résolution spatiale de l'AFM et d'élargir les capacités d'analyse spectrale de la technique. Des premiers tests ont été menés en utilisant des lasers QCL. Cependant, il n'a pas été possible d'obtenir des résultats concluants à cause du bruit induit par ces lasers et de la lenteur des acquisitions. À cela s'ajoute leur gamme spectrale restreinte. L'utilisation de sources continues peut être une alternative. Deux sources continues ont pu être testées durant ma thèse : un laser supercontinuum et le rayonnement synchrotron. Le laser supercontinuum Novae présente l'avantage d'être très intense et facilement accessible, mais là encore la gamme spectrale est restreinte. Le rayonnement synchrotron quant à lui présente moins d'intensité, mais couvre l'ensemble de la gamme du moyen IR. Cependant, comme il s'agit d'un grand instrument, l'accès au faisceau a été très limité durant ma thèse. L'ensemble des développements instrumentaux ont donc été menés avec la source Novae. Pour réussir cette mesure, il a d'abord été nécessaire de moduler le faisceau incident avec un hacheur mécanique. Un système interférométrique analogue à ceux utilisés en spectroscopie FTIR a été ajouté au montage. Au lieu d'une acquisition séquentielle, le spectre AFM-IR est obtenu à partir d'un interférogramme enregistré avec la pointe. Les travaux menés durant ma thèse ont permis d'obtenir le premier spectre d'absorption sur un film polymère de polyéthylène. Cependant, certains problèmes technologiques n'ont pas permis d'aller plus loin.

Les améliorations qui peuvent être proposées pour améliorer le système d'acquisition avec une source supercontinuum sont les suivantes :

- i) Mettre le modulateur en fréquence sous vide - isoler totalement du reste du montage pour limiter les vibrations qu'il génère.
- ii) Générer des temps de pulse plus court que quelques microsecondes via le modulateur.

Du fait des améliorations nécessaires, les essais effectués avec le rayonnement synchrotron, qui est moins intense que la source Novae, n'ont pas non plus porté leur fruit.

À travers ces développements instrumentaux, on constate que la technique a pu fortement évoluer au cours des cinq dernières années. Quelles peuvent être les perspectives des futurs développements ? Deux objectifs principaux m'apparaissent intéressants. Le premier est d'améliorer encore la sensibilité dans le but d'être capable d'observer l'expansion thermique d'une unique liaison chimique. Cela est en théorie possible en AFM-IR en résonance forcée avec un levier ayant un facteur de qualité très élevé. Si les microrésonateurs proposés par l'équipe de A. Centrone semblent prometteurs [57], le gain de sensibilité obtenu avec ces systèmes pourrait ne pas être suffisant. Il semble donc nécessaire de repenser la mesure dans son ensemble et de proposer un développement pour réaliser la mesure AFM-IR dans le vide. En effet, en passant dans le vide, un très fort gain serait obtenu sur le facteur de qualité. On peut alors espérer atteindre les sensibilités maximales. Cependant, cela signifie repenser dans son ensemble le design de l'instrument.

Le second objectif qui peut être intéressant pour de futurs développements instrumentaux est la possibilité d'effectuer des mesures AFM-IR en liquide. Ce point est crucial pour devenir

plus pertinent dans l'analyse des échantillons d'intérêt biologique. Des premières études ont été menées en liquide par deux équipes différentes [58], [59] ainsi qu'au laboratoire. Cependant, les résultats obtenus sont très préliminaires et de nombreuses questions restent en suspens. L'une des principales questions est de déterminer la pertinence des modes d'acquisition à utiliser en AFM-IR (mode contact et mode tapping). Actuellement, un autre mode de mesure AFM est privilégié pour les mesures sur du matériel biologique : le mode peak-force. Dans ce mode d'acquisition, au lieu d'observer l'interaction en un point avec la surface, une courbe d'approche-retrait est obtenue en chaque point [204], [205]. C'est-à-dire que la pointe, initialement dans l'air (ou dans l'eau), est progressivement approchée de la surface jusqu'à être en contact avec un certain degré d'indentation puis la pointe est relevée. L'intérêt de ce type d'acquisition est qu'il permet de mesurer simultanément un ensemble de forces d'interaction (et donc de propriétés mécaniques en plus d'imager la surface). Comme l'indentation avec la surface est contrôlée, cette technique est aussi utilisée pour imager les échantillons biologiques en liquide [206]. La preuve de concept de l'utilisation de l'AFM-IR avec ce mode d'acquisition a été récemment publiée par L. Wang et al. [207]. Si des étapes restent encore valider pour rendre ce couplage robuste et pertinent, ce développement semble très prometteur pour l'avenir de la technique et ces applications en liquide.

A. Présentation des sources IR utilisées durant ma thèse

I. Description de la source OPO

Comme déjà introduit dans la description théorique de l'AFM-IR classique (cf. Chapitre I, p. 28), la source IR pulsée généralement utilisée en AFM-IR est une source de type Oscillateur Paramétrique Optique (OPO). En effet, si la preuve de concept de l'AFM-IR a été faite à partir d'un laser à électron libre (source CLIO), ce type de source IR est assez rare et il peut être compliqué d'y avoir accès. Dans le but de rendre la technique AFM-IR plus versatile et ne plus dépendre de grands instruments, l'un des premiers développements de l'AFM-IR a consisté à remplacer cette source par des lasers de table. Le système laser qui a alors été utilisé est donc l'OPO. Ces lasers présentent l'avantage d'être des sources pulsées avec une fréquence de tir de l'ordre de 1 kHz et des durées de pulses très courtes. Ces conditions sont optimales pour générer un ensemble de cycles successifs d'expansion photothermique – retour à l'équilibre qui permet d'avoir un signal AFM-IR optimal.

Une source OPO est constituée d'un laser pompe qui va pomper un cristal non linéaire. Ce passage du faisceau pompe dans le cristal va générer deux autres faisceaux de fréquence inférieure : le faisceau signal et le faisceau complémentaire aussi appelé « idler ». Du fait de la conservation de l'énergie, les fréquences de ces deux faisceaux sont tel que leur somme correspond à la fréquence du faisceau pompe. L'utilisation d'une cavité optique va permettre d'intensifier les faisceaux de sorties et permettre d'avoir un faisceau laser de sortie intense. Les cristaux non linéaires choisis sont anisotropes. En jouant sur les propriétés soit d'orientation soit de température, il va être possible de changer les fréquences obtenues pour une même fréquence de laser pompe et ainsi couvrir une gamme importante du moyen IR.

Dans le cas spécifique du système utilisé dans le laboratoire, la source OPO est un système commercial de modèle NT50kx100 commercialisé par la société Ekspla. En combinant deux cristaux non linéaires différents, il est possible de couvrir l'ensemble de la gamme du moyen IR. Le laser pompe utilisé est un laser Nd-YAG émettant à 1064 nm. Il pompe un cristal non linéaire en niobate de lithium (PPLN). Le faisceau idler issu de ce cristal permet à son tour de pomper un second cristal en ZnGeP₂ (ZGP). Par combinaison de ces deux cristaux et du faisceau émis choisi (soit le faisceau signal soit le faisceau idler), trois configurations sont possibles. Mises bout à bout, elles permettent de couvrir toute la gamme du moyen IR.

II. Description du laser QCL

La partie qui suit va décrire brièvement le fonctionnement du laser QCL, outil nécessaire à la mise en place de la résonance forcée.

Les lasers utilisant des semi-conducteurs ont été développés depuis les années 1970. Le principe de base de ces lasers repose sur la transition énergétique d'électrons entre la bande de valence et la bande de conduction d'un matériau semi-conducteur. Au sein du matériau, la

recombinaison de ces électrons avec des trous d'électrons va conduire à l'émission de photons. Ils auront une longueur d'onde directement reliée à l'espacement entre la bande de valence et la bande de conduction. En changeant le type des matériaux semi-conducteurs utilisés, il est possible d'accéder à une importante gamme de longueurs d'onde. En contrepartie, la gamme spectrale accessible est limitée du fait des matériaux utilisables. Notamment dans le cas de la gamme du moyen IR où peu de matériaux ont des propriétés suffisantes pour faire des lasers stables sur l'ensemble de la gamme.

Les lasers à cascade quantique ont été développés de sorte à dépasser cette principale limitation. Dans le cas de ces lasers, si l'émission de photons utilise aussi des matériaux semi-conducteurs, elle ne repose pas sur la transition entre la bande de conduction et la bande de valence. Au lieu de cela, une transition électronique est effectuée entre deux états quantiques donnés au sein de la bande de conduction. Pour ce faire, les électrons en paquet vont être amenés dans un premier temps à un état d'excitation d'énergie E_n grâce à un voltage imposé. Cette étape conduit à une inversion de population typique des émissions lasers. Puis, au lieu d'une recombinaison entre un électron et un trou d'électron comme dans le cas des autres lasers semi-conducteurs, les électrons vont passer d'un niveau d'énergie E_n à un niveau d'énergie E_{n-1} via un puits quantique conçu entre deux semi-conducteurs. Ce saut quantique via le puits d'énergie va alors conduire à émettre un photon de longueur d'onde égale à $(E_n - E_{n-1})/h$ (avec h , la constante de Planck). La longueur d'onde des photons ne dépend alors plus de l'espacement entre la bande de valence et la bande de conduction du matériau, mais de la conception des puits quantiques et des niveaux d'énergie qui leur sont associés. Une fois passés dans un niveau d'énergie inférieure, les électrons vont transiter dans le matériau d'injection puis atteindre une nouvelle région où ils vont être ramenés à un état d'énergie E_n et effectuer une nouvelle transition. Un schéma de principe de fonctionnement est donné en Figure A-1. Dans la plupart des lasers QCL, il existe environ une vingtaine à une trentaine de régions actives où le saut va pouvoir être effectué par un même paquet d'électrons. Du fait des dynamiques temporelles mises en jeu, cela va conduire à l'émission d'un ensemble de photons cohérents.

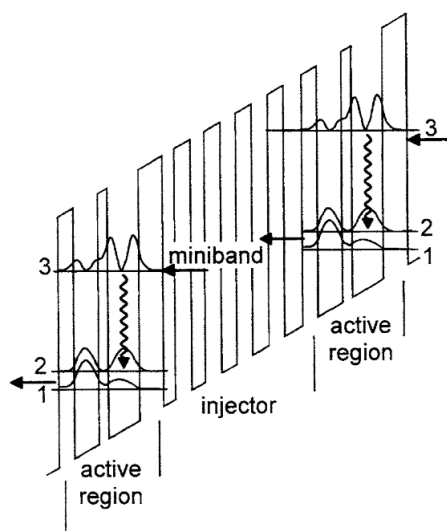


Figure A-1 : Schéma de principe de fonctionnement d'un laser QCL avec deux régions actives séparées par le matériau d'injection : le schéma présente le diagramme d'énergie des bandes de conduction des différents puits ainsi que les niveaux d'énergie impliqués dans la transition, les flèches ondulées correspondent aux transitions électroniques, les flèches droites indiquent le flux d'électrons - figure extraite de [208]

Le premier système de laser de type QCL a été conçu en 1994 par Faist et al. [209]. Depuis de nombreux développements ont été mis en place pour les applications dans le moyen IR [210]. L'une des principales problématiques a été d'étendre la gamme spectrale émise par un

laser donné pour pouvoir mettre en place des mesures de spectroscopie. En effet, l'émission d'un laser QCL est limitée à l'origine à une gamme de quelques cm^{-1} voire une dizaine de cm^{-1} . Ceci représente une gamme d'émission trop faible pour la spectroscopie de molécules en phases condensées où les bandes d'absorption des différentes vibrations moléculaires sont d'au moins 20 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur. Plusieurs solutions ont été proposées pour dépasser ce problème. Celle qui a été choisie dans le cas de la mesure AFM-IR est d'utiliser un type spécifique de laser QCL, dit « lié au continuum », associé à une cavité externe (EC-QCL). Le schéma de principe d'un laser QCL lié au continuum est similaire à celui d'un laser QCL classique. Cependant, au lieu d'avoir une transition d'un unique état excité à un unique état d'énergie inférieure, la transition va se faire d'un ensemble d'états excités à un ensemble d'états d'énergie inférieure. Cela est possible grâce à la réalisation de systèmes semi-conducteurs spécifiques qui possèdent des bandes de conduction ayant des propriétés de super-réseau [211]. En jouant sur les propriétés de ces systèmes, il est possible d'utiliser spécifiquement un niveau d'énergie de l'ensemble d'états excités. Les électrons vont alors se retrouver à un état d'énergie quantifié précis E_n tout en effectuant des transitions dans un ensemble d'états d'énergie inférieure centré autour d' E_{n-1} . Ceci conduit à l'émission non pas d'un ensemble de photons à une énergie donnée, mais à un continuum de photons d'énergie dispersée autour de l'énergie de transition $(E_n - E_{n-1})/h$ [212]. L'émission de ce genre de laser QCL est alors de type large bande avec des largeurs de bande pouvant atteindre la centaine de cm^{-1} . À partir de cette source large bande, il va être possible d'extraire une partie limitée de la gamme spectrale en associant une cavité externe. Celle-ci contient un réseau de diffraction en sortie. En modifiant l'angle du réseau de diffraction, il est possible de sélectionner la gamme spectrale sortant de la cavité externe et ainsi d'obtenir une émission centrée autour d'un nombre d'onde donné [213], [214]. Le réseau de diffraction a donc le rôle d'un filtre de bande passante appliqué à l'émission large bande du laser QCL lié au continuum. En jouant sur les propriétés du réseau de diffraction et les dimensions de la cavité externe, il va être possible de modeler les propriétés du faisceau de sortie du laser EC-QCL [215]. De même, en changeant la position du réseau au cours de la mesure, il sera possible d'accorder le nombre d'onde d'émission en sortie du laser EC-QCL et donc d'effectuer des mesures de spectroscopie.

Du fait de sa conception, le laser QCL est une source laser dans le moyen IR qui est très intense et accordable en longueur d'onde sur une gamme spectrale donnée. À cela s'ajoutent des avantages importants qui sont que ce type de sources peut fonctionner à température ambiante et qu'elles ont pu être suffisamment miniaturisées pour entrer dans la catégorie des lasers de tables. Ils sont donc compatibles pour un couplage avec la mesure AFM-IR. Mais ce qui le plus intéressant pour l'AFM-IR est une autre propriété liée à la conception du laser QCL. Ici, l'inversion de population qui génère l'émission lumineuse est générée par l'application d'une différence de voltage. En conséquence, en changeant la fréquence à laquelle cette différence de voltage est appliquée, il va être possible de changer la fréquence d'émission du tir laser. Dans les faits, la plupart des systèmes commerciaux EC-QCL vont avoir une fréquence de tir ajustable finement et comprise entre 1 kHz et 2 MHz. Ce changement de fréquence de tir peut se faire très rapidement et va permettre d'exploiter les propriétés mécaniques particulières du levier AFM en mode contact permettant alors la mise en place de la résonance forcée.

III. Description du laser Novae

Le laser Novae est un laser utilisant la génération de supercontinuum dans des fibres optiques non linéaires. La génération de supercontinuum est un phénomène d'optique non

linéaire qui a été observé pour la première fois par Alfano et Shapiro [216]. Elle correspond à une interaction entre quatre photons non résonants. Dans le cas plus précis de l'utilisation de fibres optiques non linéaires, un tir laser d'une longueur d'onde donnée va être étendu dans le domaine spectral désiré par un ensemble de phénomènes d'optique non linéaire générés dans la fibre. L'ensemble possible de ces phénomènes ont été résumés dans la revue de J. Dudley et al. [217]. Le laser Novae utilise ce principe pour émettre des tirs laser de spectre continu dans une gamme spectrale allant de $2\ \mu\text{m}$ à $3,75\ \mu\text{m}$ ($2600\ \text{cm}^{-1}$ à $5000\ \text{cm}^{-1}$). Cette source a été introduite pour la première fois lors d'une comparaison de résultats obtenus en spectromicroscopie IR avec ceux obtenus avec une source de type synchrotron usuellement utilisé dans ce type de mesure [192]. La source est formée de trois modules Figure A-2. Le premier module est un laser qui tire à $1952,7\ \text{nm}$ à une fréquence de tir de $4,15\ \text{MHz}$ et de longueur de $40\ \text{ps}$. Le tir laser va être amplifié dans le second module qui consiste en une fibre dopée au thulium pour augmenter l'énergie du pulse laser et atteindre des niveaux d'énergie suffisant pour observer des phénomènes d'optiques non linéaires. Ceux-ci vont être générés dans le troisième module : une fibre optique de fluorure de $20\ \text{m}$ de long dont les propriétés optiques vont permettre de générer les interactions non linéaires pour obtenir la génération supercontinuum.

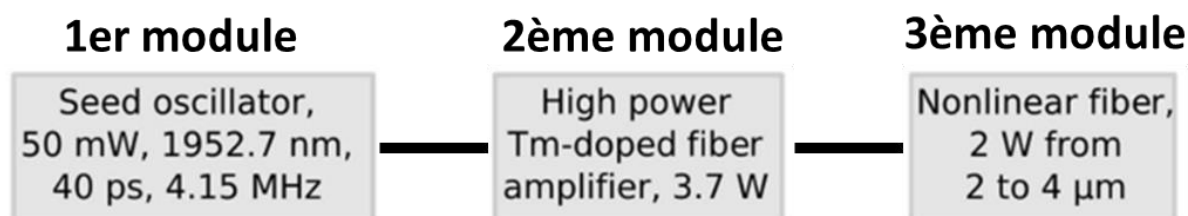


Figure A-2: Schéma de principe du laser supercontinuum Novae – adaptée de [192]

Des tests de comparaison ont été faits entre les performances du laser Novae et le rayonnement de la ligne SMIS du synchrotron Soleil. Les résultats obtenus dans ce cas en spectromicroscopie IR montre que pour une même gamme spectrale, le laser Novae a une intensité plus importante et permet d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit pour une même application [192].

Ces résultats sont très encourageants pour l'étude menée ici car la source Novae présente des propriétés relativement proches au rayonnement IR synchrotron tout en compensant les deux points limitant pour le développement et l'optimisation de notre système d'AFM-IR avec des sources continues qui sont le manque de puissance du faisceau arrivant au niveau de la pointe et la disponibilité de la source qui est disponible à tout moment.

B. Théorie de l'AFM-IR avec un signal sinusoïdal

Le cas théorique qui a été présenté dans le Chapitre II s'intéressait à une modulation dans le temps qui peut être modélisée par un peigne de Dirac. Ce type de modélisation représente bien les phénomènes mis en jeu lors d'une expérience AFM-IR utilisant un laser QCL comme source IR. À partir des équations obtenues dans ce cas et en appliquant le même raisonnement, il est possible d'envisager un cas de figure cette fois-ci purement théorique où la modulation par le laser génère directement une oscillation sinusoïdale de l'objet absorbant. Physiquement, cela signifierait que la réponse thermique de l'objet serait très courte et suivrait l'éclairement imposé par le laser (donc avec des temps d'excitation et de relaxation très courts).

Pour envisager cette situation, il est d'abord nécessaire de redéfinir la réponse temporelle thermique $u(t)$. Dans le cas d'un signal sinusoïdal, elle s'exprimerait sous la forme :

$$u(t) = u_{max} \left(\frac{1 - \cos(\omega_0 t)}{2} \right) \quad (\text{B-1})$$

Avec $u_{max} = B_{th} T_{max}$, c'est-à-dire que l'on fait l'hypothèse que l'expansion maximale de la modulation correspond à l'expansion maximale accessible avec une illumination par un laser QCL comme présenté précédemment.

La transformée de Fourier de l'équation (II-16) peut être exprimée comme :

$$\tilde{u}(\omega) = \frac{u_{max}}{4\pi} \left(\delta(\omega) - \frac{1}{2} (\delta(\omega - \omega_0) + \delta(\omega + \omega_0)) \right) \quad (\text{B-2})$$

À partir de cette équation (B-2) et de l'équation (I-29) (cf. Chapitre I, p. 27), il est alors possible d'établir $\tilde{h}(\omega)$ tel que :

$$\tilde{h}(\omega) = \frac{u_{max}}{4\pi} \left(\frac{\delta(\omega) - \frac{1}{2} (\delta(\omega - \omega_0) + \delta(\omega + \omega_0))}{\omega_n^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \right) \quad (\text{B-3})$$

Les conditions s'appliquant sur les fréquences ω_n et ω_0 sont similaires à celles présentées précédemment dans le cas du laser QCL c'est-à-dire que $\omega_n = \omega_0$, d'où :

$$\tilde{h}(\omega) = \frac{u_{max}}{4\pi} \left(\frac{1}{\omega_0^2} - \frac{1}{2} \left(\frac{\delta(\omega - \omega_0)}{i\Gamma\omega} + \frac{\delta(\omega + \omega_0)}{i\Gamma\omega} \right) \right) \quad (\text{B-4})$$

De même, l'hypothèse que l'assomption $\frac{1}{\omega^2} \ll \frac{1}{\omega_0}$ est toujours vraie dans la gamme de fréquences considérée, d'où :

$$\tilde{h}(\omega) = \frac{u_{max}}{4\pi} \left(-\frac{1}{\Gamma\omega} \left(\frac{\delta(\omega - \omega_0) - \delta(\omega + \omega_0)}{2i} \right) \right) \quad (\text{B-5})$$

Par une transformée de Fourier inverse de l'équation, il est alors possible d'obtenir l'expression temporelle de la fonction $h(t)$ dans le cas d'un signal sinusoïdal :

$$h_{sin}(t) = -\frac{u_{max}}{2\Gamma\omega_0} \sin(\omega_n t) \quad (\text{B-6})$$

À partir de l'expression du facteur de qualité Q_n définie dans la partie précédente : $Q_n = \frac{\omega_n}{\Gamma} = \frac{\omega_0}{\Gamma}$, il est possible de réécrire l'équation (B-6) telle que :

$$h_{sin}(t) = -B_{th} \frac{T_{max} Q_n T_0}{2 \omega_0 2\pi} \sin(\omega_n t) \quad (\text{B-7})$$

Le raisonnement étant le même pour les autres termes du signal mesuré $Z'(t)$. Ils restent identiques par rapport au cas du laser QCL. La comparaison des termes temporels $h(t)$ dans le cas du laser QCL (équation (II-12)) (cf. Chapitre II, p. 41) et dans le cas d'un signal sinusoïdal (équation (B-7)) est suffisante pour voir la variation de signal entre les deux cas. La principale différence est soulignée en rouge.

$$h_{QCL}(t) = u_0 \frac{Q_n}{\pi \omega_n} (\sin(\omega_0 t) = B_{th} T_{max} \frac{(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax})}{\pi} \frac{Q_n}{\omega_n} (\sin(\omega_n t) \quad (\text{II-12})$$

$$h_{sin}(t) = -B_{th} T_{max} \frac{T_0}{4\pi} \frac{Q_n}{\omega_0} \sin(\omega_n t) \quad (\text{II-22})$$

Les paramètres d'une mesure classique effectuée en AFM-IR sont les suivants :

- le temps des pulses du laser QCL t_p est 100 ns
- le mode propre du levier utilisé généralement utilisé est centré autour de 150 kHz donc la période de tir T_0 est de 6,6 μ s

De plus, l'hypothèse est faite que le temps de relaxation τ_{relax} considéré est équivalent de l'ordre de la microseconde (dépend de la taille de l'échantillon). Dans ces conditions, pour une même intensité de tir laser, la valeur du terme temporel $h_{sin}(t)$ est une fois et demie plus élevée que celle de $h_{QCL}(t)$. En conséquence, le fait d'avoir une modulation sinusoïdale au lieu d'un peigne de Dirac permettrait en théorie d'avoir une augmentation du signal par un facteur 1,5 pour des conditions de mesures similaires. Cette augmentation de signal est liée au fait que la modulation sinusoïdale est plus efficace du point de vue énergétique, car il n'existe qu'un seul mode alors que le peigne de Dirac va exciter des fréquences harmoniques hors des modes de résonances. Malheureusement, il n'existe à l'heure actuelle aucun laser capable de réaliser ce type de modulation.

Bibliographie

- [1] A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian, and A. Muray, "Development of 500 angstrom spatial resolution light microscope," *Ultramicroscopy*, vol. 13, pp. 227-232, 1984.
- [2] D. W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz, "Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 44, no. 7, pp. 651-653, 1984.
- [3] M. K. Hong *et al.*, "Imaging single living cells with a scanning near-field infrared microscope based on a free electron laser," *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 144, no. 1-4, pp. 246-255, 1998.
- [4] C. A. Michaels, S. J. Stranick, L. J. Richter, and R. R. Cavanagh, "Scanning near-field infrared microscopy and spectroscopy with a broadband laser source," *J. Appl. Phys.*, vol. 88, no. 8, pp. 4832-4839, 2000.
- [5] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, "Atomic Force Microscope," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, no. 9, pp. 930-933, Mar. 1986.
- [6] A. Lahrech, R. Bachelot, P. Gleyzes, and A. C. Boccara, "Infrared-reflection-mode near-field microscopy using an apertureless probe with a resolution of $\lambda/600$," *Opt. Lett.*, vol. 21, no. 17, p. 1315, Sep. 1996.
- [7] A. Lahrech, R. Bachelot, P. Gleyzes, and A. C. Boccara, "Infrared near-field imaging of implanted semiconductors: Evidence of a pure dielectric contrast," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 71, no. 5, pp. 575-577, 1997.
- [8] F. Huth, M. Schnell, J. Wittborn, N. Ocelic, and R. Hillenbrand, "Infrared-spectroscopic nanoimaging with a thermal source," *Nat. Mater.*, vol. 10, no. 5, pp. 352-356, 2011.
- [9] B. Knoll and F. Keilmann, "Near-field probing of vibrational absorption for chemical microscopy," *Nature*, vol. 399, no. 6732, pp. 134-137, May 1999.
- [10] J. D' Archangel *et al.*, "Near- and far-field spectroscopic imaging investigation of resonant square-loop infrared metasurfaces," *Opt. Express*, vol. 21, no. 14, p. 17150, 2013.
- [11] A. Dazzi, R. Prazeres, F. Glotin, and J. M. Ortega, "Local infrared microspectroscopy with subwavelength spatial resolution with an atomic force microscope tip used as a photothermal sensor," *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 18, pp. 2388-2390, 2005.
- [12] A. Hammiche, H. M. Pollock, M. Reading, M. Claybourn, P. H. Turner, and K. Jewkes, "Photothermal FT-IR Spectroscopy: A Step towards FT-IR Microscopy at a Resolution Better Than the Diffraction Limit," *Appl. Spectrosc.*, vol. 53, no. 7, pp. 810-815, Jul. 1999.
- [13] A. Dazzi, F. Glotin, and R. Carminati, "Theory of infrared nanospectroscopy by photothermal induced resonance," *J. Appl. Phys.*, vol. 107, no. 12, p. 124519, 2010.
- [14] A. Dazzi and C. B. Prater, "AFM-IR: Technology and applications in nanoscale infrared spectroscopy and chemical imaging," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 7, pp. 5146-5173, 2017.
- [15] A. Centrone, "Infrared Imaging and Spectroscopy Beyond the Diffraction Limit," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 8, no. 1, pp. 101-126, 2015.
- [16] F. Lu and M. A. Belkin, "Infrared absorption nano-spectroscopy using sample photoexpansion induced by tunable quantum cascade lasers," *Opt. Express*, vol. 19, no. 21, p. 19942, 2011.

- [17] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd Edition. 2004.
- [18] N. J. Harrick, "Surface chemistry from spectral analysis of totally internally reflected radiation," *J. Phys. Chem.*, vol. 64, no. 9, pp. 1110–1114, 1960.
- [19] J. Fahrenfort, "Attenuated total reflection," *Spectrochim. Acta*, vol. 17, no. 7, pp. 698–709, Jan. 1961.
- [20] A. R. Hind, S. K. Bhargava, and A. McKinnon, "At the solid/liquid interface: FTIR/ATR - The tool of choice," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 93, no. 1–3, pp. 91–114, 2001.
- [21] G. L. Carr and G. P. Williams, "Infrared Microspectroscopy with Synchrotron Radiation source point," vol. 51, 1997.
- [22] P. Dumas, G. L. Carr, and G. P. Williams, "Enhancing the lateral resolution in infrared microspectrometry by using synchrotron radiation: applications and perspectives," *Analisis*, vol. 28, no. 1, pp. 68–68, Jan. 2000.
- [23] E. N. Lewis *et al.*, "Fourier Transform Spectroscopic Imaging Using an Infrared Focal-Plane Array Detector," *Anal. Chem.*, vol. 67, no. 19, pp. 3377–3381, Oct. 1995.
- [24] P. Lasch and D. Naumann, "Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues," vol. 1758, pp. 814–829, 2006.
- [25] N. Jamin *et al.*, "Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared microspectrometry.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 9, pp. 4837–40, Apr. 1998.
- [26] P. Dumas, G. L. Carr, and G. P. Williams, "Enhancing the lateral resolution in infrared microspectrometry by using synchrotron radiation: applications and perspectives," *Analisis*, vol. 28, no. 1, pp. 68–68, Jan. 2000.
- [27] L. M. Miller and R. J. Smith, "Synchrotrons versus globars, point-detectors versus focal plane arrays: Selecting the best source and detector for specific infrared microspectroscopy and imaging applications," *Vib. Spectrosc.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 237–240, 2005.
- [28] P. Colarusso, L. H. Kidder, I. W. Levin, J. C. Fraser, J. F. Arens, and E. N. Lewis, "Infrared Spectroscopic Imaging: From Planetary to Cellular Systems," *Appl. Spectrosc.*, vol. 52, no. 3, pp. 106A–120A, Mar. 1998.
- [29] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel, "Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 49, no. 1, pp. 57–61, Jul. 1982.
- [30] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, and V. B. Elings, "Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy," *Surf. Sci. Lett.*, vol. 290, no. 1–2, pp. L688–L692, Jun. 1993.
- [31] U. Rabe, K. Janser, and W. Arnold, "Vibrations of free and surface-coupled atomic force microscope cantilevers: Theory and experiment," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 67, no. 9, pp. 3281–3293, 1996.
- [32] S. N. Magonov, V. Elings, and M.-H. Whangbo, "Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy," *Surf. Sci.*, vol. 375, no. 2–3, pp. L385–L391, Apr. 1997.
- [33] C. A. J. Putman, K. O. Van der Werf, B. G. De Groot, N. F. Van Hulst, and J. Greve, "Tapping mode atomic force microscopy in liquid," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 64, no. 18, pp.

2454–2456, May 1994.

- [34] F. J. Giessibl, “Atomic Resolution of the Silicon (111)-(7x7) Surface by Atomic Force Microscopy,” *Science* (80-.), vol. 267, no. 5194, pp. 68–71, Jan. 1995.
- [35] Y. F. Dufrène *et al.*, “Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 12, no. 4, pp. 295–307, 2017.
- [36] N. Jalili and K. Laxminarayana, “A review of atomic force microscopy imaging systems: Application to molecular metrology and biological sciences,” *Mechatronics*, vol. 14, no. 8, pp. 907–945, 2004.
- [37] D. Rugar *et al.*, “Magnetic force microscopy: General principles and application to longitudinal recording media,” *J. Appl. Phys.*, vol. 68, no. 3, pp. 1169–1183, 1990.
- [38] P. Girard, “Electrostatic force microscopy: principles and some applications to semiconductors,” *Nanotechnology*, vol. 12, no. 4, pp. 485–490, Dec. 2001.
- [39] A. Majumdar, “Scanning Thermal Microscopy,” *Ann. Rev. Mater. Sci.*, vol. 29, no. 1, pp. 505–585, 1999.
- [40] J. R. Felts, K. Kjoller, M. Lo, C. B. Prater, and W. P. King, “Nanometer-scale infrared spectroscopy of heterogeneous polymer nanostructures fabricated by tip-based nanofabrication,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 9, pp. 8015–8021, 2012.
- [41] S. Ghosh *et al.*, “Conducting polymer nanostructures for photocatalysis under visible light,” *Nat. Mater.*, vol. 14, no. 5, pp. 505–511, 2015.
- [42] S. Ghosh *et al.*, “PEDOT nanostructures synthesized in hexagonal mesophases,” *New J. Chem.*, vol. 38, no. 3, p. 1106, 2014.
- [43] A. Dazzi, R. Prazeres, F. Glotin, and J. M. Ortega, “Analysis of nano-chemical mapping performed by an AFM-based (‘AFMIR’) acousto-optic technique,” *Ultramicroscopy*, vol. 107, no. 12, pp. 1194–1200, 2007.
- [44] C. Policar *et al.*, “Subcellular IR imaging of a metal-carbonyl moiety using photothermally induced resonance,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 4, pp. 860–864, 2011.
- [45] C. Mayet, A. Deniset-Besseau, R. Prazeres, J. M. Ortega, and A. Dazzi, “Analysis of bacterial polyhydroxybutyrate production by multimodal nanoimaging,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 3, pp. 369–374, 2013.
- [46] C. Mayet, A. Dazzi, R. Prazeres, J.-M. Ortega, and D. Jaillard, “In situ identification and imaging of bacterial polymer nanogranules by infrared nanospectroscopy,” *Analyst*, vol. 135, no. 10, p. 2540, 2010.
- [47] G. Latour, L. Robinet, A. Dazzi, F. Portier, A. Deniset-Besseau, and M.-C. Schanne-Klein, “Correlative nonlinear optical microscopy and infrared nanoscopy reveals collagen degradation in altered parchments,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 26344, 2016.
- [48] B. Lahiri, G. Holland, V. Aksyuk, and A. Centrone, “Nanoscale imaging of plasmonic hot spots and dark modes with the photothermal-induced resonance technique,” *Nano Lett.*, vol. 13, no. 7, pp. 3218–3224, 2013.
- [49] A. M. Katzenmeyer, J. Chae, R. Kasica, G. Holland, B. Lahiri, and A. Centrone, “Nanoscale Imaging and Spectroscopy of Plasmonic Modes with the PTIR Technique,” *Adv. Opt. Mater.*, vol. 2, no. 8, pp. 718–722, 2014.
- [50] B. Lahiri, G. Holland, and A. Centrone, “Chemical imaging beyond the diffraction limit:

- Experimental validation of the PTIR technique," *Small*, vol. 9, no. 3, pp. 439–445, 2013.
- [51] A. Dazzi, R. Prazeres, F. Glotin, and J. M. Ortega, "Subwavelength infrared spectromicroscopy using an AFM as a local absorption sensor," *Infrared Phys. Technol.*, vol. 49, no. 1–2, pp. 113–121, 2006.
- [52] G. G. Adams and M. Nosonovsky, "Contact modeling - forces," *Tribol. Int.*, vol. 33, no. 5, pp. 431–442, 2000.
- [53] C. Mayet, "Spectromicroscopie infrarouge à l'échelle nanométrique. Application à l'étude d'objets biologiques.," 2010.
- [54] A. Deniset-Besseau, C. B. Prater, M.-J. Virolle, and A. Dazzi, "Monitoring TriAcylGlycerols Accumulation by Atomic Force Microscopy Based Infrared Spectroscopy in Streptomyces Species for Biodiesel Applications," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 5, no. 4, pp. 654–658, Feb. 2014.
- [55] H. Cho, J. R. Felts, M.-F. Yu, L. A. Bergman, A. F. Vakakis, and W. P. King, "Improved atomic force microscope infrared spectroscopy for rapid nanometer-scale chemical identification," *Nanotechnology*, vol. 24, no. 44, p. 444007, 2013.
- [56] J. R. Felts, H. Cho, M. F. Yu, L. A. Bergman, A. F. Vakakis, and W. P. King, "Atomic force microscope infrared spectroscopy on 15 nm scale polymer nanostructures," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 84, no. 2, 2013.
- [57] J. Chae *et al.*, "Nanophotonic Atomic Force Microscope Transducers Enable Chemical Composition and Thermal Conductivity Measurements at the Nanoscale," *Nano Lett.*, vol. 17, no. 9, pp. 5587–5594, 2017.
- [58] M. Jin, F. Lu, and M. A. Belkin, "High-sensitivity infrared vibrational nanospectroscopy in water," *Light Sci. Appl.*, vol. 6, no. 7, p. e17096, 2017.
- [59] G. Ramer, F. S. Ruggeri, A. Levin, T. P. J. Knowles, and A. Centrone, "Determination of Polypeptide Conformation with Nanoscale Resolution in Water," *ACS Nano*, vol. 12, pp. 6612–6619, 2018.
- [60] G. Ramer, V. A. Aksyuk, and A. Centrone, "Quantitative Chemical Analysis at the Nanoscale Using the Photothermal Induced Resonance Technique," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 24, pp. 13524–13531, 2017.
- [61] F. S. Ruggeri *et al.*, "Nanoscale studies link amyloid maturity with polyglutamine diseases onset," *Sci. Rep.*, vol. 6, pp. 1–11, 2016.
- [62] D. Partouche *et al.*, "Correlative infrared nanospectroscopy and transmission electron microscopy to investigate nanometric amyloid fibrils: prospects and challenges," *J. Microsc.*, vol. 00, no. 0, pp. 1–9, Jan. 2019.
- [63] C. Mayet, A. Dazzi, R. Prazeres, F. Allot, F. Glotin, and J. M. Ortega, "Sub-100 nm IR spectromicroscopy of living cells.," *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 14, pp. 1611–3, 2008.
- [64] P. Vitry *et al.*, "Combining infrared and mode synthesizing atomic force microscopy : Application to the study of lipid vesicles inside Streptomyces bacteria," vol. 9, no. 6, pp. 1674–1681, 2016.
- [65] R. Rebois, "Étude de la production de biomolécules par AFM-IR," 2016.
- [66] E. M. Miguélez, C. Hardisson, and M. B. Manzanal, "Hyphal Death during Colony Development in Streptomyces antibioticus : Morphological Evidence for the Existence of a Process of Cell Deletion in a," vol. 145, no. 3, pp. 515–525, 1999.

- [67] K. Yamanaka, H. Ogiso, and O. Kolosov, "Analysis of subsurface imaging and effect of contact elasticity in the ultrasonic force microscope," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 33, no. 5S, pp. 3197–3203, 1994.
- [68] K. Yamanaka and S. Nakano, "Ultrasonic atomic force microscope with overtone excitation of cantilever," *Japanese J. Appl. Physics, Part 1 Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.*, vol. 35, no. 6 SUPPL. B, pp. 3787–3792, 1996.
- [69] M. Kocun, A. Labuda, A. Gannepalli, and R. Proksch, "Contact resonance atomic force microscopy imaging in air and water using photothermal excitation," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 86, no. 8, 2015.
- [70] P. A. Yuya, D. C. Hurley, and J. A. Turner, "Contact-resonance atomic force microscopy for viscoelasticity," *J. Appl. Phys.*, vol. 104, no. 7, 2008.
- [71] A. B. Kos and D. C. Hurley, "Nanomechanical mapping with resonance tracking scanned probe microscope," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 19, no. 1, 2008.
- [72] A. B. Kos, J. P. Killgore, and D. C. Hurley, "SPRITE: A modern approach to scanning probe contact resonance imaging," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 25, no. 2, 2014.
- [73] G. Ramer, F. Reisenbauer, B. Steindl, W. Tomischko, and B. Lendl, "Implementation of Resonance Tracking for Assuring Reliability in Resonance Enhanced Photothermal Infrared Spectroscopy and Imaging," *Appl. Spectrosc.*, vol. 71, no. 8, pp. 2013–2020, 2017.
- [74] K. Kobayashi, H. Yamada, and K. Matsushige, "Resonance tracking ultrasonic atomic force microscopy," *Surf. Interface Anal.*, vol. 33, no. 2, pp. 89–91, 2002.
- [75] J. Waeytens, T. Doneux, and S. Napolitano, "Evaluating Mechanical Properties of Polymers at the Nanoscale Level via Atomic Force Microscopy–Infrared Spectroscopy," *ACS Appl. Polym. Mater.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–7, 2019.
- [76] S. A. Tatulian, "Structural Characterization of Membrane Proteins and Peptides by FTIR and ATR-FTIR Spectroscopy," vol. 974, no. February, 2013, pp. 177–218.
- [77] A. J. Kulik, F. S. Ruggeri, W. I. Gruszecki, and G. Dietler, "Nanoscale infrared spectroscopy of light harvesting proteins, amyloid structures and collagen fibres," *Microsc. Anal.*, vol. 28, no. 4, pp. 11–14, 2014.
- [78] T. Müller *et al.*, "Nanoscale spatially resolved infrared spectra from single microdroplets," *Lab Chip*, vol. 14, no. 7, pp. 1315–1319, 2014.
- [79] L. R. Volpatti *et al.*, "Micro- and nanoscale hierarchical structure of core-shell protein microgels," *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 48, pp. 7989–7999, 2016.
- [80] F. S. Ruggeri, G. Longo, S. Faggiano, E. Lipiec, A. Pastore, and G. Dietler, "Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7831, 2015.
- [81] V. Giliberti *et al.*, "Protein clustering in chemically stressed HeLa cells studied by infrared nanospectroscopy," *Nanoscale*, vol. 8, no. 40, pp. 17560–17567, 2016.
- [82] M. R. Alcaráz *et al.*, "External-Cavity Quantum Cascade Laser Spectroscopy for Mid-IR Transmission Measurements of Proteins in Aqueous Solution," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 13, pp. 6980–6987, 2015.
- [83] F. Lu, M. Jin, and M. A. Belkin, "Tip-enhanced infrared nanospectroscopy via molecular expansion force detection," *Nat. Photonics*, vol. 8, no. 4, pp. 307–312, 2014.
- [84] A. Dazzi, J. Saunier, K. Kjoller, and N. Yagoubi, "Resonance enhanced AFM-IR: A new

- powerful way to characterize blooming on polymers used in medical devices," *Int. J. Pharm.*, vol. 484, no. 1–2, pp. 109–114, 2015.
- [85] A. Dazzi and C. Policar, "AFM-IR: photothermal infrared nanospectroscopy," in *Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy*, Elsevier, 2011, pp. 245–278.
- [86] A. Dazzi, "PhotoThermal Induced Resonance. Application to Infrared Spectromicroscopy," in *Thermal Nanosystems and Nanomaterials*, 2009, pp. 469–503.
- [87] H. Al Salloum *et al.*, "Characterization of the surface physico-chemistry of plasticized PVC used in blood bag and infusion tubing," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 317–334, 2017.
- [88] J. Chae *et al.*, "Nanophotonic Atomic Force Microscope Transducers Enable Chemical Composition and Thermal Conductivity Measurements at the Nanoscale," *Nano Lett.*, vol. 17, no. 9, pp. 5587–5594, 2017.
- [89] M. Asghari-Khiavi, B. R. Wood, P. Hojati-Talemi, A. Downes, D. McNaughton, and A. Mechler, "Exploring the origin of tip-enhanced Raman scattering; Preparation of efficient TERS probes with high yield," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 43, no. 2, pp. 173–180, 2012.
- [90] F. Lu, M. Jin, and M. A. Belkin, "Tip-enhanced infrared nanospectroscopy via molecular expansion force detection," *Nat. Photonics*, vol. 8, no. 4, pp. 307–312, 2014.
- [91] V. Giliberti *et al.*, "Heterogeneity of the Transmembrane Protein Conformation in Purple Membranes Identified by Infrared Nanospectroscopy," *Small*, vol. 13, no. 44, p. 1701181, Nov. 2017.
- [92] Y. Nishikawa, K. Fujiwara, K. ichi Ataka, and M. Osawa, "Surface-Enhanced Infrared External Reflection Spectroscopy at Low Reflective Surfaces and Its Application to Surface Analysis of Semiconductors, Glasses, and Polymers," *Anal. Chem.*, vol. 65, no. 5, pp. 556–562, 1993.
- [93] K. J. Rothschild, "FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: Toward a molecular model," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 24, no. 2, pp. 147–167, 1992.
- [94] T. Shaykhutdinov, S. D. Pop, A. Furchner, and K. Hinrichs, "Supramolecular Orientation in Anisotropic Assemblies by Infrared Nanopolarimetry," *ACS Macro Lett.*, vol. 6, no. 6, pp. 598–602, 2017.
- [95] A. Zheltikov, A. L'Huillier, and F. Krausz, "Nonlinear Optics," in *Springer Handbook of Lasers and Optics*, New York, NY: Springer New York, 2007, pp. 157–248.
- [96] K. A. Becraft and G. L. Richmond, "In Situ Vibrational Spectroscopic Studies of the CaF₂/H₂O Interface," *Langmuir*, vol. 17, no. 25, pp. 7721–7724, 2001.
- [97] A. Harstein, J. R. Kirtley, and J. C. Tsang, "Enhancement of the Infrared Absorption from Molecular Monolayers with Thin Metal Overlayers," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 45, no. 3, pp. 35–51, 1980.
- [98] D. Enders, S. Rupp, A. Küller, and A. Pucci, "Surface enhanced infrared absorption on Au nanoparticle films deposited on SiO₂/Si for optical biosensing: Detection of the antibody-antigen reaction," *Surf. Sci.*, vol. 600, no. 23, pp. 30–32, 2006.
- [99] M. Osawa and M. Ikeda, "Surface-enhanced infrared absorption of p-nitrobenzoic acid deposited on silver island films: Contributions of electromagnetic and chemical mechanisms," *J. Phys. Chem.*, vol. 95, no. 24, pp. 9914–9919, 1991.

- [100] A. Hatta, Y. Suzuki, and W. Suëtaka, "Infrared absorption enhancement of monolayer species on thin evaporated Ag films by use of a Kretschmann configuration: Evidence for two types of enhanced surface electric fields," *Appl. Phys. A Solids Surfaces*, vol. 35, no. 3, pp. 135–140, 1984.
- [101] N. Matsuda, K. Yoshii, K. ichi Ataka, M. Osawa, T. Matsue, and I. Uchida, "Surface-Enhanced Infrared and Raman Studies of Electrochemical Reduction of Self-Assembled Monolayers Formed from p-Nitrohiophenol at Silver," *Chem. Lett.*, pp. 1385–1388, 1992.
- [102] A. Hatta, N. Suzuki, Y. Suzuki, and W. Suëtaka, "Infrared Absorption of Polycyanoacrylate Enhanced by Ag Island Films in the Kretschmann's ATR Geometry: the Coverage Dependence," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 37, pp. 299–305, 1989.
- [103] M. Osawa, "Surface-Enhanced Infrared Absorption," *Near-f. Opt. Surf. Plasmon Polaritons*, vol. 187, pp. 163–187, 2001.
- [104] S. Badilescu, P. V. Ashrit, V. Van Truong, and I. I. Badilescu, "Enhanced infrared ATR spectra of o-, m-, and p-nitrobenzoic acid with Ag films," *Appl. Spectrosc.*, vol. 43, no. 3, pp. 549–552, 1989.
- [105] G. T. Merklin, L. T. He, and P. R. Griffiths, "Surface-enhanced infrared absorption spectrometry of p-nitrothiophenol and its disulfide," *Appl. Spectrosc.*, vol. 53, no. 11, pp. 1448–1453, 1999.
- [106] M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger, "Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 162, no. 1–2, pp. 87–106, 2011.
- [107] K. Nakanishi, T. Sakiyama, and K. Imamura, "On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 91, no. 3, pp. 233–244, 2001.
- [108] D. Faulón Marruecos, D. K. Schwartz, and J. L. Kaar, "Impact of Surface Interactions on Protein Conformation," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 38, pp. 45–55, 2018.
- [109] D. R. Lu and K. Park, "Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 144, no. 1, pp. 271–281, 1991.
- [110] P. Billsten, P. O. Freskgård, U. Carlsson, B. H. Jonsson, and H. Elwing, "Adsorption to silica nanoparticles of human carbonic anhydrase II and truncated forms induce a molten-globule-like structure," *FEBS Lett.*, vol. 402, no. 1, pp. 67–72, 1997.
- [111] J. R. Requena and H. Wille, "The structure of the infectious prion protein Experimental data and molecular models," *Prion*, vol. 8, no. 1, 2014.
- [112] H. Wille *et al.*, "Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 6, pp. 3563–3568, 2002.
- [113] J. Collinge, A. R. Clarke, J. Collinge, and A. R. Clarke, "A General Model of Prion Strains," *Science (80-.)*, vol. 318, no. November, pp. 930–936, 2007.
- [114] L. Jiali, B. Shawn, M. P Sukhvir, O. M Anja, and W. Charles, "Darwinian Evolution of Prions in Cell Culture," *Science (80-.)*, vol. 327, no. 5967, pp. 869–873, 2010.
- [115] L. G. Gonzalez and T. J. Wess, "The effects of hydration on the collagen and gelatine phases within parchment artefacts," *Herit. Sci.*, vol. 1, no. 1, p. 14, 2013.
- [116] D. R. Baselt and D. Baldeschwieler, "Subfibrillar Structure of Type I Collagen," vol. 65, no. December, pp. 2644–2655, 1993.
- [117] S. Strasser, A. Zink, M. Janko, W. M. Heckl, and S. Thalhammer, "Structural

- investigations on native collagen type I fibrils using AFM," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 354, no. 1, pp. 27–32, 2007.
- [118] B. B. Doyle, E. R. Blout, and E. G. Bendit, "Infrared spectroscopy of collagen and collagen like polypeptides," *Biopolymers*, vol. 14, no. 5, pp. 937–957, 1975.
- [119] K. J. Payne and A. Veis, "Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies," *Biopolymers*, vol. 27, no. 11, pp. 1749–1760, 1988.
- [120] A. E. Tuer *et al.*, "Nonlinear Optical Properties of Type I Collagen Fibers Studied by Polarization Dependent Second Harmonic Generation Microscopy," pp. 12759–12769, 2011.
- [121] C. P. Brown *et al.*, "Imaging and modeling collagen architecture from the nano to micro scale," *Biomed. Opt. Express*, vol. 5, no. 1, p. 233, 2014.
- [122] P. J. Campagnola and L. M. Loew, "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 11, pp. 1356–1360, 2003.
- [123] J. K. Delaney, T. E. Villafana, M. Palmer, W. S. Warren, M. C. Fischer, and W. P. Brown, "Femtosecond pump-probe microscopy generates virtual cross-sections in historic artwork," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 5, pp. 1708–1713, 2014.
- [124] I. G. Cormack *et al.*, "Lost writing uncovered by laser two-photon fluorescence provides a terminus post quem for Roman colonization of Hispania Citerior," *J. Archaeol. Sci.*, vol. 34, no. 10, pp. 1594–1600, 2007.
- [125] G. Latour, J.-P. Echard, M. Didier, and M.-C. Schanne-Klein, "In situ 3D characterization of historical coatings and wood using multimodal nonlinear optical microscopy.," *Opt. Express*, vol. 20, no. 22, pp. 24623–35, 2012.
- [126] G. Filippidis, E. J. Gualda, K. Melessanaki, and C. Fotakis, "Nonlinear imaging microscopy techniques as diagnostic tools for art conservation studies," *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 3, p. 240, 2008.
- [127] P. Samineni, A. DeCruz, T. E. Villafana, W. S. Warren, and M. C. Fischer, "Pump-probe imaging of historical pigments used in paintings," *Opt. Lett.*, vol. 37, no. 8, pp. 1310–1312, 2012.
- [128] D. A. Prystupa and A. M. Donald, "Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states," *Polym. Gels Networks*, vol. 4, no. 2, pp. 87–110, 1996.
- [129] C. J. Kennedy and T. J. Wess, "The Structure of Collagen within Parchment – A Review," *Restaurator*, vol. 24, no. 2, pp. 61–80, 2003.
- [130] A. Barth, "Infrared spectroscopy of proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1767, no. 9, pp. 1073–1101, 2007.
- [131] L. Bozec and M. Odlyha, "Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy," *Biophys. J.*, vol. 101, no. 1, pp. 228–236, 2011.
- [132] P. E. Dinwiddie, R.B.; Pylkki, R.J.; West, "Thermal conductivity contrast imaging with a scanning thermal microscope," in *Thermal Conductivity 22*, 1994, pp. 668–677.
- [133] W. Jeong, S. Hur, E. Meyhofer, and P. Reddy, "Scanning Probe Microscopy for Thermal Transport Measurements," *Nanoscale Microscale Thermophys. Eng.*, vol. 19, no. 4, pp. 279–302, 2015.

- [134] P. Rivière, T. Nypelö, O. J. Rojas, A. Klug, N. Mundigler, and R. Wimmer, "Space-resolved thermal properties of thermoplastics reinforced with carbon nanotubes," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 127, no. 3, pp. 2059–2074, 2017.
- [135] M. Yavari, T. Le, and H. Lin, "Physical aging of glassy perfluoropolymers in thin film composite membranes. Part I. Gas transport properties," *J. Memb. Sci.*, vol. 525, pp. 387–398, 2017.
- [136] A. Hermelink, D. Naumann, J. Piesker, P. Lasch, M. Laue, and P. Hermann, "Towards a correlative approach for characterising single virus particles by transmission electron microscopy and nanoscale Raman spectroscopy," *Analyst*, vol. 142, no. 8, pp. 1342–1349, 2017.
- [137] M. Brehm, T. Taubner, R. Hillenbrand, and F. Keilmann, "Infrared spectroscopic mapping of single nanoparticles and viruses at nanoscale resolution," *Nano Lett.*, vol. 6, no. 7, pp. 1307–1310, 2006.
- [138] G. M. Cech *et al.*, "The Escherichia Coli Hfq Protein: An Unattended DNA-Transactions Regulator," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 3, 2016.
- [139] V. Arluison *et al.*, "Three-dimensional Structures of Fibrillar Sm Proteins: Hfq and Other Sm-like Proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 356, no. 1, pp. 86–96, Feb. 2006.
- [140] E. Fortas *et al.*, "New insight into the structure and function of Hfq C-terminus," *Biosci. Rep.*, vol. 35, no. 2, pp. 1–9, 2015.
- [141] A. Malabirade *et al.*, "Membrane association of the bacterial riboregulator Hfq and functional perspectives," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [142] A. Malabirade *et al.*, "Compaction and condensation of DNA mediated by the C-terminal domain of Hfq," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 12, pp. 7299–7308, 2017.
- [143] V. Militello, C. Casarino, A. Emanuele, A. Giostra, F. Pullara, and M. Leone, "Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering," *Biophys. Chem.*, vol. 107, no. 2, pp. 175–187, Feb. 2004.
- [144] G. Zandomenighi, M. R. H. Krebs, M. G. McCammon, and M. Fändrich, "FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils.," *Protein Sci.*, vol. 13, no. 12, pp. 3314–21, 2004.
- [145] H. Hiramatsu and T. Kitagawa, "FT-IR approaches on amyloid fibril structure," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1753, no. 1, pp. 100–107, Nov. 2005.
- [146] G. Hoffner, W. André, C. Sandt, and P. Djian, "Synchrotron-based infrared spectroscopy brings to light the structure of protein aggregates in neurodegenerative disease.," *Rev. Anal. Chem.*, vol. 33, pp. 231–243, 2014.
- [147] F. Ay and A. Aydinli, "Comparative investigation of hydrogen bonding in silicon based PECVD grown dielectrics for optical waveguides," *Opt. Mater. (Amst.)*, vol. 26, no. 1, pp. 33–46, 2004.
- [148] H. Gaussier, H. Morency, M. C. Lavoie, and M. Subirade, "Replacement of trifluoroacetic acid with HCl in the hydrophobic purification steps of pediocin PA-1: A structural effect," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 10, pp. 4803–4808, 2002.
- [149] L. E. Valenti, M. B. Paci, C. P. De Pauli, and C. E. Giacomelli, "Infrared study of trifluoroacetic acid unpurified synthetic peptides in aqueous solution: Trifluoroacetic acid removal and band assignment," *Anal. Biochem.*, vol. 410, no. 1, pp. 118–123, 2011.

- [150] A. V Purkina, A. I. Kol'tsov, and B. Z. Volchek, "Interaction of amides with strong organic acids," *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 15, no. 2, pp. 1051–1057, Aug. 1971.
- [151] R. L. Redington and K. C. Lin, "Infrared spectra of trifluoroacetic acid and trifluoroacetic anhydride," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.*, vol. 27, no. 12, pp. 2445–2460, 1971.
- [152] F. S. Ruggeri, J. Adamcik, J. S. Jeong, H. A. Lashuel, R. Mezzenga, and G. Dietler, "Influence of the β -sheet content on the mechanical properties of aggregates during amyloid fibrillization," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 54, no. 8, pp. 2462–2466, 2015.
- [153] H. Ftouni *et al.*, "Specific heat measurement of thin suspended SiN membrane from 8 K to 300 K using the 3ω -Völklein method," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 84, no. 9, 2013.
- [154] H. Ftouni *et al.*, "Thermal conductivity of silicon nitride membranes is not sensitive to stress," *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 92, no. 12, 2015.
- [155] G. Chen and P. Hui, "Thermal conductivities of evaporated gold films on silicon and glass," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 74, no. 20, pp. 2942–2944, 1999.
- [156] M. Brucherseifer, C. Kranz, and B. Mizaikoff, "Combined in situ atomic force microscopy-infrared-attenuated total reflection spectroscopy," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 22, pp. 8803–8806, 2007.
- [157] S. El-Kirat-Chatel and Y. F. Dufreïne, "Nanoscale imaging of the Candida-macrophage interaction using correlated fluorescence-atomic force microscopy," *ACS Nano*, vol. 6, no. 12, pp. 10792–10799, 2012.
- [158] J. Mathurin *et al.*, "How to unravel the chemical structure and component localization of individual drug-loaded polymeric nanoparticles by using tapping AFM-IR," *Analyst*, vol. 143, no. 24, pp. 5940–5949, 2018.
- [159] M. T. Cuberes, H. E. Assender, G. A. D. Briggs, and O. V Kolosov, "Heterodyne force microscopy of PMMA/rubber nanocomposites: nanomapping of viscoelastic response at ultrasonic frequencies," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 33, no. 19, pp. 2347–2355, Oct. 2000.
- [160] M. T. Cuberes, "Intermittent-Contact Heterodyne Force Microscopy," *J. Nanomater.*, vol. 5, 2009.
- [161] S. A. Cantrell, J. H. Cantrell, and P. T. Lillehei, "Nanoscale subsurface imaging via resonant difference-frequency atomic force ultrasonic microscopy," *J. Appl. Phys.*, vol. 101, no. 11, pp. 0–8, 2007.
- [162] S. K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, and V. Labhassetwar, "Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake.," *J. Control. Release*, vol. 82, no. 1, pp. 105–114, Jul. 2002.
- [163] J. Mathurin *et al.*, "Nanometre-scale infrared chemical imaging of organic matter in ultra-carbonaceous Antarctic micrometeorites (UCAMMs)," *Astron. Astrophys.*, vol. 622, p. A160, Feb. 2019.
- [164] E. Pancani *et al.*, "High-Resolution Label-Free Detection of Biocompatible Polymeric Nanoparticles in Cells," *Part. Part. Syst. Charact.*, vol. 35, no. 3, p. 1700457, Feb. 2018.
- [165] C. Ladavière and R. Gref, "Toward an optimized treatment of intracellular bacterial infections : input of nanoparticulate drug delivery systems," *Nanomedicine*, vol. 10, p. 1003, 2015.
- [166] X. Zhu, A. F. Radovic-Moreno, J. Wu, R. Langer, and J. Shi, "Nanomedicine in the

- management of microbial infection – Overview and perspectives,” *Nano Today*, vol. 9, no. 4, pp. 478–498, Aug. 2014.
- [167] O. C. Farokhzad and R. Langer, “Impact of nanotechnology on drug delivery,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, pp. 16–20, Jan. 2009.
- [168] S. Wilhelm *et al.*, “Analysis of nanoparticle delivery to tumours,” *Nat. Rev. Mater.*, vol. 1, no. 5, p. 16014, Apr. 2016.
- [169] R. Gref, Y. Minamitake, M. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, and R. Langer, “Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres,” *Science (80-.)*, vol. 263, no. 5153, pp. 1600–1603, Mar. 1994.
- [170] J. Costa-Gouveia *et al.*, “Combination therapy for tuberculosis treatment: pulmonary administration of ethionamide and booster co-loaded nanoparticles,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 5390, 2017.
- [171] O. C. Farokhzad and R. Langer, “Impact of Nanotechnology on Drug Delivery,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, pp. 16–20, 2009.
- [172] P. Pietzonka, B. Rothen-Rutishauser, P. Langguth, H. Wunderli-Allenspach, E. Walter, and H. P. Merkle, “Transfer of lipophilic markers from PLGA and polystyrene nanoparticles to Caco-2 monolayers mimics particle uptake,” *Pharm. Res.*, vol. 19, no. 5, pp. 595–601, 2002.
- [173] C. Simonsson *et al.*, “Inter-nanocarrier and nanocarrier-to-cell transfer assays demonstrate the risk of an immediate unloading of dye from labeled lipid nanocapsules,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 98, no. October, pp. 47–56, 2016.
- [174] T. Tenuta *et al.*, “Elution of labile fluorescent dye from nanoparticles during biological use,” *PLoS One*, vol. 6, no. 10, 2011.
- [175] E. Hinde *et al.*, “Pair correlation microscopy reveals the role of nanoparticle shape in intracellular transport and site of drug release,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 12, no. 1, pp. 81–89, 2016.
- [176] M. Diem *et al.*, “Infrared and Raman Spectroscopy and Spectral Imaging of Individual Cells,” no. 2007, pp. 173–203, 2009.
- [177] A. A. Van Apeldoorn, H. J. Van Manen, J. M. Bezemer, J. D. De Bruijn, C. A. Van Blitterswijk, and C. Otto, “Raman imaging of PLGA microsphere degradation inside macrophages,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 41, pp. 13226–13227, 2004.
- [178] M. Maurette, C. Hammer, N. Reeh, D. E. Brownlee, and H. H. Thomsen, “Placers of Cosmic Dust in the Blue Ice Lakes of Greenland,” *Science (80-.)*, vol. 233, no. 4766, pp. 869–872, Aug. 1986.
- [179] M. Maurette, C. Jéhanno, E. Robin, and C. Hammer, “Characteristics and mass distribution of extraterrestrial dust from the Greenland ice cap,” *Nature*, vol. 328, no. 6132, pp. 699–702, Aug. 1987.
- [180] J. Duprat, C. Engrand, M. Maurette, G. Kurat, M. Gounelle, and C. Hammer, “Micrometeorites from Central Antarctic snow: The CONCORDIA collection,” *Adv. Sp. Res.*, vol. 39, no. 4, pp. 605–611, 2007.
- [181] J. Duprat *et al.*, “Extreme Deuterium Excesses in Ultracarbonaceous Micrometeorites from Central Antarctic Snow,” *Science (80-.)*, vol. 328, no. 5979, pp. 742–745, May 2010.
- [182] E. Dobrica, C. Engrand, J. Duprat, and M. Gounelle, “A statistical overview of

- CONCORDIA Antarctic Micrometeorites," *Meteorit. Planet. Sci.*, vol. 45 suppl., no. A46, p. #5213, 2010.
- [183] T. Nakamura, T. Noguchi, Y. Ozono, T. Osawa, and K. Nagao, "Mineralogy of ultracarbonaceous large micrometeorites," *Meteorit. Planet. Sci.*, vol. 40 supplement, p. 5046, 2005.
- [184] H. Yabuta, S. Itoh, T. Noguchi, N. Sakamoto, and M. Hashiguchi, "Finding of Nitrogen-Rich Organic Material in Antractic Ultracarbonaceous Micrometeorite," *43rd Lunar Planet. Sci. Conf.*, pp. 2-3, 2012.
- [185] H. Yabuta *et al.*, "Formation of an ultracarbonaceous Antarctic micrometeorite through minimal aqueous alteration in a small porous icy body," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 214, pp. 172-190, Oct. 2017.
- [186] E. Dartois *et al.*, "UltraCarbonaceous Antarctic micrometeorites, probing the Solar System beyond the nitrogen snow-line," *Icarus*, vol. 224, no. 1, pp. 243-252, 2013.
- [187] E. Dartois *et al.*, "Dome C ultracarbonaceous Antarctic micrometeorites," *Astron. Astrophys.*, vol. 609, p. A65, Jan. 2018.
- [188] D. Ricci and P. C. Braga, "Recognizing and Avoiding Artifacts in AFM Imaging," *At. Force Microsc.*, vol. 242, pp. 25-38.
- [189] F. Golek, P. Mazur, Z. Ryszka, and S. Zuber, "AFM image artifacts," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 304, pp. 11-19, 2014.
- [190] S. Li, T. He, X. Liao, Q. Yang, and G. Li, "Structural changes and crystallization kinetics of polylactide under CO₂ investigated using high-pressure Fourier transform infrared spectroscopy," no. August, 2015.
- [191] M. Unger, H. Sato, Y. Ozaki, D. Fischer, and H. W. Siesler, "Temperature-dependent fourier transform infrared spectroscopy and Raman mapping spectroscopy of phase-separation in a poly(3-hydroxybutyrate)-poly(L- lactic acid) blend," *Appl. Spectrosc.*, vol. 67, no. 2, pp. 141-148, 2013.
- [192] F. Borondics *et al.*, "Supercontinuum-based Fourier transform infrared spectromicroscopy," *Optica*, vol. 5, no. 4, p. 378, 2018.
- [193] A. Hammiche, L. Bozec, H. M. Pollock, M. German, and M. Reading, "Progress in near-field photothermal infra-red microspectroscopy," *J. Microsc.*, vol. 213, no. 2, pp. 129-134, 2004.
- [194] L. Bozec, A. Hammiche, M. J. Tobin, J. M. Chalmers, N. J. Everall, and H. M. Pollock, "Near-field photothermal Fourier transform infrared spectroscopy using synchrotron radiation," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 13, no. 8, pp. 1217-1222, 2002.
- [195] P. M. Donaldson, C. S. Kelley, M. D. Frogley, J. Filik, K. Wehbe, and G. Cinque, "Broadband near-field infrared spectromicroscopy using photothermal probes and synchrotron radiation," *Opt. Express*, vol. 24, no. 3, p. 1852, 2016.
- [196] G. Cinque, M. Frogley, K. Wehbe, J. Filik, and J. Pijanka, "Multimode infrared imaging and microspectroscopy (MIRIAM) beamline at diamond," *Synchrotron Radiat. News*, vol. 24, no. 5, pp. 24-33, 2011.
- [197] S. Krimm, C. Y. Liang, and G. B. B. M. Sutherland, "Infrared spectra of high polymers. II. Polyethylene," *J. Chem. Phys.*, vol. 25, no. 3, pp. 549-562, 1956.
- [198] J. . Gulmine, P. . Janissek, H. . Heise, and L. Akcelrud, "Polyethylene characterization

- by FTIR," *Polym. Test.*, vol. 21, no. 5, pp. 557–563, 2002.
- [199] G. L. Carr, J. A. Reffner, and G. P. Williams, "Performance of an infrared microspectrometer at the NSLS," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 66, no. 2, pp. 1490–1492, 1995.
- [200] G. L. Carr, P. Dumas, C. J. Hirschmug, and G. P. Williams, "Infrared synchrotron radiation programs at the National Synchrotron Light Source," *Nuovo Cim. D*, vol. 20, no. 4, pp. 375–395, Apr. 1998.
- [201] P. Roy *et al.*, "Infrared synchrotron radiation from an undulator," *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. A*, vol. 325, no. 3, pp. 568–573, 1993.
- [202] P. Dumas, L. M. Miller, and M. J. Tobin, "Challenges in biology and medicine with synchrotron infrared light," *Acta Phys. Pol. A*, vol. 115, no. 2, pp. 446–454, 2009.
- [203] P. Dumas, F. Polack, B. Lagarde, O. Chubar, J. L. Giorgetta, and S. Lefrançois, "Synchrotron infrared microscopy at the French Synchrotron Facility SOLEIL," *Infrared Phys. Technol.*, vol. 49, no. 1–2, pp. 152–160, 2006.
- [204] J. Adamcik, A. Berquand, and R. Mezzenga, "Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by peak force quantitative nanomechanical atomic force microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 98, no. 19, pp. 1–4, 2011.
- [205] P. Trtik, J. Kaufmann, and U. Volz, "On the use of peak-force tapping atomic force microscopy for quantification of the local elastic modulus in hardened cement paste," *Cem. Concr. Res.*, vol. 42, no. 1, pp. 215–221, 2012.
- [206] D. Alsteens, V. Dupres, S. Yunus, J. P. Latgé, J. J. Heinisch, and Y. F. Dufreîne, "High-resolution imaging of chemical and biological sites on living cells using peak force tapping atomic force microscopy," *Langmuir*, vol. 28, no. 49, pp. 16738–16744, 2012.
- [207] L. Wang, H. Wang, M. Wagner, Y. Yan, D. S. Jakob, and X. G. Xu, "Nanoscale simultaneous chemical and mechanical imaging via peak force infrared microscopy," *Sci. Adv.*, vol. 3, no. 6, p. e1700255, 2017.
- [208] G. Claire, C. Federico, L. S. Deborah, and Y. C. Alfred, "Recent progress in quantum cascade lasers and applications," *Reports Prog. Phys.*, vol. 64, no. 11, p. 1533, 2001.
- [209] J. Faist, F. Capasso, D. L. Sivco, C. Sirtori, A. L. Hutchinson, and A. Y. Cho, "Quantum Cascade Laser," *Science (80-.)*, vol. 264, no. 5158, pp. 553–556, Apr. 1994.
- [210] F. Capasso, "High-performance midinfrared quantum cascade lasers," *Opt. Eng.*, vol. 49, no. 11, p. 111102, 2010.
- [211] A. Tredicucci, C. Gmachl, F. Capasso, D. L. Sivco, A. L. Hutchinson, and A. Y. Cho, "A multiwavelength semiconductor laser," *Nature*, vol. 396, no. 6709, pp. 350–353, Nov. 1998.
- [212] J. Faist, M. Beck, T. Aellen, and E. Gini, "Quantum-cascade lasers based on a bound-to-continuum transition," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 78, no. 2, pp. 147–149, 2001.
- [213] M. B. Pushkarsky, I. G. Dunayevskiy, M. Prasanna, A. G. Tsekoun, R. Go, and C. K. N. Patel, "High-sensitivity detection of TNT," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 52, pp. 19630–19634, 2006.
- [214] M. Pushkarsky *et al.*, "High-power tunable external cavity quantum cascade laser in the 5-11 micron regime," no. March, p. 68711X, 2008.
- [215] G. Wysocki, R. F. Curl, F. K. Tittel, R. Maulini, J. M. Bulliard, and J. Faist, "Widely tunable mode-hop free external cavity quantum cascade laser for high resolution

- spectroscopic applications," *Appl. Phys. B*, vol. 81, no. 6, pp. 769–777, Oct. 2005.
- [216] R. R. Alfano and S. L. Shapiro, "Emission in the Region 4000 to 7000 Å Via Four-Photon Coupling in Glass," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 24, no. 11, pp. 584–587, Mar. 1970.
- [217] J. M. Dudley, G. Genty, and S. Coen, "Supercontinuum generation in photonic crystal fiber," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 78, no. 4, pp. 1135–1184, 2006.