

Caractérisation de l'organisation moléculaire par microscopie non-linéaire cohérente et incohérente

Véronique Le Floc'H

► To cite this version:

Véronique Le Floc'H. Caractérisation de l'organisation moléculaire par microscopie non-linéaire cohérente et incohérente. Physique [physics]. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2004. Français. NNT: . tel-00006217

HAL Id: tel-00006217 https://theses.hal.science/tel-00006217

Submitted on 8 Jun 2004

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.

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'École normale supérieure de Cachan (Spécialité Sciences Physiques)

par

Véronique LE FLOC'H

Caractérisation de l'organisation moléculaire par microscopie non-linéaire cohérente et incohérente

Soutenue publiquement le 7 mai 2004 devant la commission d'examen :

président du jury

J. Zyss

S. Brasselet	
A. Débarre	rapporteur
JJ. GREFFET	rapporteur
A. Ibanez	
JL. OUDAR	
JF. Roch	directeur de thèse

À ma famille

À Christophe

Remerciements

Je remercie Monsieur Joseph ZYSS, directeur du Laboratoire de Photonique Quantique et Moléculaire, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Jean-François ROCH, pour m'avoir encouragée à faire une thèse – expérience qui me sera utile pour la suite –, pour avoir dirigé ce travail et pour toute l'aide et les conseils qu'il m'a donnés, tant dans la recherche que dans l'enseignement et lors de la rédaction de cet ouvrage.

Je suis également très reconnaissante à Sophie BRASSELET, qui m'a encadrée au quotidien, pour sa disponibilité, son enthousiasme et la confiance qu'elle m'a témoignée durant ces trois années. Un grand merci !

Je tiens bien sûr à remercier Madame Anne DÉBARRE et Monsieur Jean-Jacques GREFFET, qui ont bien voulu rapporter sur cette thèse, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leur lecture attentive du manuscrit.

Je remercie également Monsieur Jean-Louis OUDAR d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie vivement Monsieur Alain IBANEZ, également membre du jury, pour sa lecture attentive du manuscrit et pour m'avoir permis d'analyser les nanocristaux de CMONS.

Je voudrais également remercier B.R. CHO, Jean-François NICOUD, D. KOBAYASHI, Estelle BOTZUNG-APPERT, Chantal LARPENT et Caroline CANNIZZO, qui m'ont fourni de précieux échantillons me permettant d'appliquer la technique d'analyse en polarisation. Je remercie aussi François TREUSSART, qui m'a initiée à l'étude des molécules uniques et pour avoir eu l'idée d'étudier les nanocristaux de CMONS.

Je remercie aussi André CLOUQUEUR, Rolland HIERLE, Jean-Pierre MADRANGE, Christian OLLIER et Jean-Luc LAGARDE, qui ont toujours été disponibles lorsque j'avais besoin d'eux, et auront de ce fait contribué pleinement à l'accomplissement de ce travail. Merci également à Agnès VIGNES pour ses superbes photographies.

Je remercie également Vincent de BEAUCOUDREY pour son aide précieuse lors de la mise en place de la détection cohérente, ainsi que Christelle ANCEAU pour le travail réalisé ensemble. Je tiens également à remercier Dan WRIGHT et Christophe HÉBRARD pour leur précieux coup de main en informatique, notamment en programmation.

Je remercie enfin tous les membres du laboratoire (en particulier Françoise MIL-LION) et du département de physique (en particulier Mireille TADJEDDINE et Jean-Baptiste DESMOULINS), ainsi que toutes les personnes qui ont assisté à ma soutenance.

Résumé

L'ingénierie moléculaire a développé au cours des dix dernières années, des structures moléculaires optimisées pour leur réponse non-linéaire quadratique. Dans ce travail, nous avons montré que l'analyse des propriétés de polarisation de la fluorescence à deux photons et de la génération du second harmonique constitue un moyen original de déterminer l'organisation et l'orientation de ces molécules lorsqu'elles sont disposées dans une matrice polymère ou lorsqu'elles forment un réseau cristallin. Cette analyse, menée dans une configuration de microscopie non-linéaire à deux photons, a permis d'étudier ces processus non-linéaires à des échelles réduites et d'identifier des symétries cristallines spécifiques. La nature cristalline d'agrégats moléculaires isolés de taille nanométrique a ainsi pu être mise en évidence. Il a également été possible de déterminer leur orientation à partir d'un modèle théorique. Enfin, un montage de détection cohérente de la génération du second harmonique collectée par microscopie a été mis en œuvre de façon à gagner encore en sensibilité.

Mots clés : microscope non-linéaire à deux photons, génération du second harmonique, fluorescence à deux photons, analyse en polarisation, organisation moléculaire, polymère, cristal, nanocristal, détection cohérente.

Abstract

Molecular engineering has been enriched by the design of optimized molecular structures for nonlinear quadratic optics the last decade. We present in this work high resolution two-photon excitation microscopy studies using both two-photon fluorescence and second harmonic generation, in order to probe molecular organization and nonlinear optical responses at sub-microscopic scales in different environments such as polymers and crystals. Polarization resolution of the two-photon excitation processes allowed us to retrieve unambiguous information on the crystalline structure and the orientation of nanometer size molecular aggregates, as well as micro-crystals of known symmetry, according to a theoretical model. An homodyne detection of second harmonic generation has also been developed in order to increase the sensitivity of our setup.

Keywords: nonlinear microscopy, second harmonic generation, two-photon excited fluorescence, polarization analysis, molecular arrangement, polymer, crystal, nanocrystal, homodyne detection.

Table des matières

Introduction

1	Pro	cessus	non-linéaires d'ordre deux	7
	1.1	Fluore	escence à un photon	7
		1.1.1	Diffusion élastique et inélastique de la lumière	7
		1.1.2	Fluorescence d'une molécule en matrice solide	9
	1.2	Fluore	escence à deux photons	10
		1.2.1	Cas particulier de l'excitation bi-photonique	10
		1.2.2	Expression de l'intensité de fluorescence à deux photons	11
	1.3	Génér	ation du second harmonique	12
		1.3.1	Processus d'émission au niveau moléculaire	12
		1.3.2	Propriété de cohérence du rayonnement de GSH	15
		1.3.3	Génération du second harmonique pour un ensemble statistique	19
		1.3.4	Expression de l'intensité de génération du second harmonique .	21
	1.4	Concl	usion du chapitre 1	23
2	Mo	ntara	de microscopie por linégire régely or polarisation	าะ
	1110.	mage	de incroscopie non-intearre resolu en polarisation	20
	2.1	Le dis	positif expérimental	25
	2.1	Le dis 2.1.1	positif expérimental Présentation du montage	25 25 25
	2.1	Le dis 2.1.1 2.1.2	positif expérimental	25 25 25 30
	2.1 2.2	Le dis 2.1.1 2.1.2 Princi	positif expérimental Présentation du montage La résolution spatiale pe de l'analyse en polarisation	 25 25 30 31
	2.1 2.2	Le dis 2.1.1 2.1.2 Princi 2.2.1	positif expérimental Présentation du montage La résolution spatiale pe de l'analyse en polarisation Principe	 25 25 25 30 31 31
	2.1 2.2	Le dis 2.1.1 2.1.2 Princi 2.2.1 2.2.2	Definitionpositif expérimentalPrésentation du montageLa résolution spatialeLa résolution spatialePrincipePrincipeLa résolution du repère (X,Y,Z)	 25 25 30 31 31 31
	2.1 2.2	Le dis 2.1.1 2.1.2 Princi 2.2.1 2.2.2 2.2.3	DescriptionDescriptionpositif expérimental	 25 25 30 31 31 31 31
	2.1 2.2 2.3	Le dis 2.1.1 2.1.2 Princi 2.2.1 2.2.2 2.2.3 Analy	positif expérimental \dots présentation du montage \dots présentation du montage \dots présentation du montage \dots présentation spatiale \dots principe de l'analyse en polarisation \dots principe \dots principe \dots principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots pri	 25 25 30 31 31 31 31 33
	2.1 2.2 2.3	Le dis 2.1.1 2.1.2 Princi 2.2.1 2.2.2 2.2.3 Analy 2.3.1	positif expérimental \dots positif en polarisation Présentation du montage \dots présentation spatiale \dots présentation spatiale \dots principe \dots polarisation \dots principe \dots principe \dots principe \dots principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe (X,Y,Z) principe (X,Y,Y,Z) principe (X,Y,Y,Z) principe (X,Y,Y,Z) principe (X,Y,Y,Z) principe (X,Y,Y,Z) principe (X,Y,Y,Y,Y) principe (X,Y,Y,Y) principe (X,Y,Y,Y) princi	25 25 30 31 31 31 31 31 33 33
	2.1 2.2 2.3	Le dis 2.1.1 2.1.2 Princi 2.2.1 2.2.2 2.2.3 Analy 2.3.1 2.3.2	positif expérimental \dots positif en polarisation Présentation du montage \dots présentation du montage \dots présentation spatiale \dots présentation spatiale \dots principe \dots polarisation \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe (X,Y,Z) principe (X,Y,Y,Z) principe (X,Y,Y,Y,Y) principe (X,Y,Y,Y,Y) principe (X,Y,Y,Y,Y) p	25 25 30 31 31 31 31 33 33 34
	2.1 2.2 2.3	Le dis 2.1.1 2.1.2 Princi 2.2.1 2.2.2 2.2.3 Analy 2.3.1 2.3.2 2.3.3	positif expérimental \dots positif en polarisation Présentation du montage \dots présentation du montage \dots présentation spatiale \dots présentation spatiale \dots principe \dots polarisation \dots principe \dots principe \dots principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe \dots principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe (X,Y,Z) principe \dots principe (X,Y,Z) principe $(X,Y,Z$	25 25 30 31 31 31 31 33 33 34 35

1

		2.3.5	Effet de l'objectif de microscope sur la polarisation	40
		2.3.6	Angle entre les dipôles d'absorption et d'émission $\ldots \ldots \ldots$	43
		2.3.7	Transfert d'énergie d'une molécule à l'autre	48
	2.4	Conclu	usion du chapitre 2	54
3	Ori	entatio	n de molécules sous champ électrique	57
	3.1	Applic	ation du champ électrique	58
		3.1.1	Structure de l'échantillon	58
		3.1.2	Procédé de fabrication des électrodes	59
		3.1.3	$Mise \ en \ œuvre \ldots \ldots$	62
	3.2	Analys	se en polarisation d'un échantillon placé sous champ électrique	64
		3.2.1	Fluorescence à deux photons	64
		3.2.2	Génération du second harmonique	66
		3.2.3	Bilan	68
	3.3	Étude	à l'échelle de la molécule unique	69
		3.3.1	Montage expérimental	69
		3.3.2	Échantillons étudiés	69
		3.3.3	Détermination de l'orientation des molécules et influence du champ	
			électrique	72
		3.3.4	Bilan	77
4	Analyse en polarisation de structures cristallines			79
	4.1	Généra	alités	80
		4.1.1	Orientation de la maille cristalline	80
		4.1.2	Fluorescence à deux photons	81
		4.1.3	Génération du second harmonique	84
	4.2	Cristal	l non-linéaire de référence : le POM	85
		4.2.1	Maille cristalline du POM et réponse non-linéaire $\ . \ . \ . \ .$	85
		4.2.2	Résultats expérimentaux	87
	4.3	Cristal	l octupolaire de TTB	91
		4.3.1	Maille cristalline du TTB	93
		4.3.2	Calcul théorique de la fluorescence à deux photons $\ldots \ldots \ldots$	96
		4.3.3	Calcul théorique de la génération du second harmonique	98
		4.3.4	Résultats expérimentaux	101
		4.3.5	Efficacité de la GSH : comparaison avec le cristal de POM	107
	4.4	Cristal	l non-linéaire ionique DAST	109
		4.4.1	Maille cristalline du DAST et réponse optique	110
		4.4.2	Résultats expérimentaux	114

5	Rép	oonse e	en polarisation d'objets nanométriques	117	
	5.1	Nanoc	ristaux de CMONS	117	
		5.1.1	Maille cristalline du CMONS et réponse optique	119	
		5.1.2	Mise en oeuvre de l'analyse en polarisation	121	
		5.1.3	Cas de nanocristaux monocristallins	124	
		5.1.4	Cas plus complexes : nanocristaux polycristallins	129	
		5.1.5	Bilan	133	
	5.2	es de latex contenant des molécules de DCM	135		
		5.2.1	Description de l'échantillon étudié	135	
		5.2.2	Sphères émettant uniquement de la fluorescence $\ . \ . \ . \ .$	135	
		5.2.3	Sphères émettant de la GSH en plus de la fluorescence $\ . \ . \ .$	137	
		5.2.4	Bilan	141	
6	Dét	ection	de la GSH par interférométrie	143	
	6.1	Étude	de faisabilité	144	
		6.1.1	Interférences entre deux ondes de GSH provenant d'un même		
			cristal non-linéaire	144	
		6.1.2	Exploitation des données	149	
	6.2	Monta	ge interférentiel incluant le microscope non-linéaire	151	
		6.2.1	Montage expérimental	151	
		6.2.2	Obtention des franges d'interférences avec le cristal de DAST	154	
		6.2.3	Application à l'analyse en polarisation de la GSH	156	
	6.3 Perspectives : vers une détection homodyne balancée de la GSH $\ . \ .$				
Co	onclu	ision		161	
Α	Rés	olutior	n spatiale du microscope à deux photons	165	
	A.1	Le vol	ume d'excitation	165	
	A.2	Déterr	nination expérimentale du volume d'excitation	165	
	A.3	Compa	araison avec la microscopie confocale	169	
в	Dét	Détermination de l'ellipticité ε et du dichroïsme δ par mesures ellip-			
	som	étriqu	es	171	
С	Pris	se en c	ompte de l'objectif de microscope	173	
	C.1	Foncti	ons permettant le calcul des coefficients K_1, K_2 et K_3	173	
	C.2	Expres	ssion complète des intensités de GSH détectées	174	
D	Exp	oression	n des fonctions $\cos(i, I)$	177	

\mathbf{E}	Exp	ressions des composantes des tenseurs $\alpha,\ \beta$ et γ dans le repère	
	mac	roscopique 1	L 7 9
	E.1	Cristal de POM	179
	E.2	Cristal de TTB	179
	E.3	Cristal de DAST	181
	E.4	Nanocristal de CMONS	183
Bi	bliog	raphie 1	185

Introduction

Si M. GÖPPERT MAYER a montré dès 1931, qu'un système quantique tel qu'un atome ou une molécule pouvait être excité par absorption multi-photonique [1], ce n'est qu'en 1961 et grâce à l'apparition des sources laser qu'un processus non-linéaire a pu être mis en évidence. Dans une première expérience marquant la naissance de l'optique non-linéaire, P.A. FRANKEN a réussi à générer une onde harmonique dans un cristal de quartz, en utilisant un laser à rubis [2]. Aujourd'hui, les processus non-linéaires en optique sont à la base de très nombreuses applications. Grâce aux techniques de conversion de fréquence, le domaine de longueur d'onde accessible aux lasers s'étend du térahertz jusqu'à l'ultraviolet lointain. La fabrication de guides d'onde non-linéaires et de composants électro-optiques aura très certainement d'importantes répercussions dans le domaine des télécommunications optiques. La spectroscopie non-linéaire est un moyen d'investigation des propriétés de la matière, depuis l'atome jusqu'à l'analyse des écoulements liquides et des jets de gaz.

L'optique non-linéaire est également à l'origine d'avancées majeures en microscopie optique, en particulier pour l'imagerie biologique [3, 4, 5, 6]. Ainsi, la microscopie à deux photons est aujourd'hui une technique couramment utilisée, depuis sa première réalisation en 1990 dans l'équipe de W.W. WEBB [7]. La microscopie sous excitation bi-photonique présente en effet de nombreux avantages par rapport à la microscopie confocale à un photon [8, 9]. Ce type de microscopie a une très bonne résolution spatiale intrinsèque, qui vient du fait que l'excitation à deux photons n'a lieu que dans un petit volume centré sur le point de focalisation du faisceau de pompe. Par une analyse point à point, elle permet de faire une imagerie tri-dimensionnelle en limitant le bruit de fond. De plus, l'utilisation d'une radiation infrarouge pour l'excitation augmente la profondeur de pénétration des milieux diffusants comme les tissus biologiques, tout en limitant la photodestruction des milieux cellulaires sondés. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont également bien séparées puisque dans la cas d'une excitation bi-photonique de la fluorescence, la longueur d'onde d'excitation est pratiquement le double de la longueur d'onde d'émission. On peut ainsi isoler facilement le rayonnement émis de la lumière diffusée par l'échantillon.

Une des raisons du succès de la fluorescence par absorption à deux photons tient au développement des sources laser impulsionnelles dans le domaine infrarouge [10]. L'utilisation du laser solide à saphir dopé titane (Ti:Sa), apparu pour la première fois en 1991 [11], a donné un souffle nouveau à toute l'optique non-linéaire. Surpassant les lasers à colorant, le laser Ti:Sa présente en effet une très grande accordabilité en longueur d'onde – de 700 nm à plus de 1 μ m – et une grande robustesse. Dans le régime de fonctionnement femtoseconde, il est possible d'obtenir par auto-blocage de mode des impulsions lumineuses très brèves, de l'ordre de 10 à 100 fs. Les puissances crêtes correspondantes sont alors suffisamment élevées pour induire une excitation efficace à deux photons des molécules.

L'ingénierie moléculaire a également joué un rôle déterminant grâce au développement de structures moléculaires optimisées pour leur efficacité vis-à-vis de la fluorescence à deux photons et/ou de la génération du second harmonique [12, 13, 14, 15]. Elle a ainsi permis la synthèse d'un certain nombre de molécules non-linéaires, caractérisées par des structures fortement conjuguées facilitant le transfert de charge. À l'échelle macroscopique, des matériaux organiques à base de polymère ont été développés pour leur coût et leurs performances en optique intégrée, tant pour des applications passives – guides d'onde, filtres – qu'actives comme la modulation électro-optique [16, 17]. Historiquement, les premiers matériaux non-linéaires sont des cristaux organiques moléculaires. Ceux-ci présentent un ordre moléculaire rigide et stable. Ils ont montré de bonnes performances dans des applications comme l'oscillation paramétrique optique (OPO). Ces matériaux renaissent aujourd'hui sous la forme de cristaux efficaces pour la génération de signaux térahertz basée sur l'effet paramétrique [18] mais aussi en tant que nanocristaux pour de nouvelles applications [19, 20].

Les nombreux avantages de la fluorescence à deux photons ont été mis à profit pour l'imagerie dans le domaine des neurosciences [21] et en biologie du développement [22]. La microscopie par génération du second harmonique étant plus spécifique aux ordres moléculaires non-centrosymétriques, elle est utilisée pour distinguer des arrangements ordonnés de molécules au niveau des membranes artificielles [23] ou cellulaires [24]. En effet, les molécules dispersées aléatoirement au sein de la cellule ne vont donner aucun signal de second harmonique, ce qui conduit à un bon contraste de détection de la membrane. Les premières applications qui émergent dans ce domaine sont la détection de potentiels membranaires [25, 26] et de potentiels d'action transitoires dans les neurones [27]. Ainsi, l'apparition d'un signal de second harmonique est la signature d'une modification de potentiel local. Parallèlement à ces études qui nécessitent des sondes fluorescentes et/ou non-linéaires, des travaux sur les réponses non-linéaires intrinsèques commencent à apparaître. Il est en effet possible d'utiliser de telles techniques sans marquage pour rendre compte du métabolisme cellulaire, en étudiant l'émission propre de certains composants des cellules et tissus [28, 29]. Ces travaux ont montré les forts potentiels de l'imagerie, mais les études plus poussées sur les renseignements apportés quant aux arrangements bio-moléculaires sont encore rares. Les réponses non-linéaires de génération du second harmonique et de fluorescence à deux photons contiennent cependant une large gamme d'informations sur la manière dont les molécules sont agencées et sur leur dynamique, ce qui peut amener à une meilleure compréhension des relations entre les structures et leurs fonctions biologiques. Comme nous le montrerons dans ce travail, ces effets permettent également d'ouvrir de nouvelles perspectives dans l'étude des nano-structures.

L'objectif de cette thèse est d'élaborer une méthode permettant de rendre compte du comportement orientationnel et structurel d'arrangements moléculaires à des échelles sub-millimétriques : *la microscopie non-linéaire polarisée*. Nous avons ainsi cherché à caractériser l'organisation locale des molécules à l'intérieur de divers matériaux, en utilisant la sensibilité de leurs réponses optiques non-linéaires, vis-à-vis des orientations des dipôles moléculaires. Nous montrerons que de nombreuses informations sur l'orientation des chromophores peuvent être déduites de la polarisation des champs rayonnés. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'orientation des molécules dans des milieux polymères et cristallins. Nous avons pour cela développé une technique d'analyse en polarisation des signaux de fluorescence à deux photons et de génération du second harmonique détectés dans un montage de microscopie non-linéaire à deux photons. Cette technique consiste à mesurer les variations des signaux émis dans deux directions de polarisation complémentaires, lorsqu'on change la direction de la polarisation du faisceau de pompe.

Après avoir validé cette technique, nous l'avons appliquée à des structures qu'il serait impossible d'étudier par des mesures macroscopiques. Nous nous sommes ainsi intéressés à des nanocristaux organiques et à des nanosphères de latex dopées en chromophores, la résolution du microscope permettant d'analyser ces nano-objets individuellement. La perspective de ces études est d'obtenir des nanosondes non-linéaires connues et caractérisées, présentant des propriétés optiques intéressantes. De telles structures seraient complémentaires des nanocristaux inorganiques fluorescents déjà utilisés en biologie [30, 31] ou des nanoparticules métalliques détectées par contraste thermique [32].

Plan de la thèse

Dans le premier chapitre, nous présenterons de manière synthétique les processus d'émission faisant intervenir une excitation bi-photonique. Cette partie permettra de mettre en évidence les différences fondamentales entre la fluorescence à deux photons et le rayonnement cohérent émis par génération du second harmonique.

Dans le chapitre 2, le montage de microscopie non-linéaire à deux photons sera décrit et nous présenterons la technique d'analyse en polarisation sur laquelle ce travail de thèse est fondé. Elle sera appliquée à un premier échantillon "modèle", composé de molécules fluorescentes orientées aléatoirement dans une matrice polymère. L'étude de la réponse optique de cet échantillon nous indiquera en particulier les biais liés aux spécificités du montage qu'il est nécessaire de prendre en compte dans la modélisation des données expérimentales.

Dans le chapitre 3, nous nous intéresserons à la réponse optique d'un ensemble de molécules orientées sous champ électrique grâce à leur moment dipolaire électrique permanent. En adaptant une méthode de photolithographie utilisée pour la gravure de modulateurs électro-optiques, nous détaillerons tout d'abord les étapes de fabrication des électrodes permettant d'appliquer le champ électrique. Nous procéderons ensuite à l'analyse en polarisation des rayonnements de fluorescence à deux photons et de génération du second harmonique. Nous mettrons en évidence leur complémentarité par rapport aux symétries moléculaires mises en jeu. Des mesures de contraste de polarisation effectuées avec un montage de microscopie confocale pour déterminer l'orientation de molécules isolées viendront compléter cette étude. Nous montrerons qu'il est ainsi possible d'explorer le comportement orientationnel des molécules sous champ électrique, à l'échelle d'une entité isolée.

Dans le chapitre 4, la technique d'analyse en polarisation sera appliquée à des structures cristallines. Nous nous intéresserons en particulier à trois cristaux non-linéaires organiques présentant des propriétés de symétrie très différentes. Les mesures conjointes de la fluorescence à deux photons et de la génération du second harmonique nous permettrons de retrouver l'orientation des molécules à l'intérieur de ces structures cristallines. L'analyse quantitative des niveaux de signaux détectés conduira également à une estimation de leur efficacité vis-à-vis du doublage de fréquence.

Dans le chapitre 5, nous tirerons profit de la résolution spatiale du microscope nonlinéaire à deux photons, pour étudier la réponse optique de nano-objets non-centrosymétriques tels que des nanocristaux organiques dispersés dans une couche mince de matériau sol-gel et des nanosphères de latex soumises à des contraintes mécaniques.

Enfin, nous montrerons dans le dernier chapitre, qu'il est possible de faire une détection cohérente des signaux de génération du second harmonique collectés par l'objectif de

microscope. Ce type de détection est le prolongement naturel des études précédentes. Il permet de caractériser l'orientation de structures moléculaires en mesurant à la fois l'intensité et la phase des signaux émis par génération du second harmonique. Ce type de détection est également un moyen puissant pour analyser des champs optiques cohérents ne contenant qu'un tout petit nombre de photons [33]. Cette expérience préliminaire ouvre ainsi des perspectives intéressantes sur la détection du rayonnement du second harmonique de nano-objets individuels et peut-être même d'une molécule unique !

Chapitre 1

Processus non-linéaires d'ordre deux

Dans le cadre de cette thèse, nous nous limiterons à l'étude des processus nonlinéaires faisant intervenir une excitation bi-photonique, c'est-à-dire la fluorescence par absorption à deux photons (FDP) et la génération du second harmonique (GSH). Le but de ce premier chapitre est donc de rappeler les mécanismes et les propriétés relatifs à ces deux processus, en les comparant à la fluorescence à un photon. Nous mettrons en évidence les propriétés de cohérence propres à chacun de ces rayonnements. Nous pourrons ainsi dégager les points clés des modèles qui nous permettront par la suite d'interpréter les données expérimentales obtenues avec des échantillons sondés par microscopie non-linéaire à deux photons.

1.1 Fluorescence à un photon

Nous allons faire ici une description simplifiée des processus de diffusion élastique et inélastique, afin d'esquisser ce qui fait l'intérêt de la fluorescence à deux photons et de la génération du second harmonique.

1.1.1 Diffusion élastique et inélastique de la lumière

La lumière émise par un système quantique tel qu'un atome ou une molécule, pilotée par une onde électromagnétique monochromatique, présente des propriétés très intéressantes.

Diffusion de la lumière élastique

Considérons un atome individuel au repos comportant deux niveaux d'énergie (g)et (e). On soumet cet atome à une onde électromagnétique monochromatique de pulsation ω , telle que $\hbar\omega$ soit très petit devant la différence d'énergie $E_e - E_g$ entre l'état fondamental et l'état excité (figure 1.1a). Dans ces conditions d'excitation hors résonance, l'atome va rayonner une onde à la même pulsation, selon un processus de diffusion élastique, appelée diffusion Rayleigh. Le spectre du rayonnement émis, tel qu'il peut être mesuré en utilisant une technique d'interférométrie hétérodyne, est dans ce cas composé d'un pic étroit centré autour de la pulsation incidente (figure 1.1b), la lumière diffusée étant cohérente vis-à-vis de l'excitation.



FIG. 1.1 – (a) Diffusion Rayleigh d'un atome à deux niveaux. (b) Spectre de diffusion élastique d'un ion ²⁴Mg⁺ piégé, obtenu par interférométrie hétérodyne. Cette courbe est issue de la Réf. [34].

Diffusion inélastique et fluorescence de résonance

On peut maintenant se demander ce qu'il advient lorsque la pulsation incidente se rapproche de la pulsation de résonance.

A faible intensité du faisceau excitateur, la diffusion résonnante reste cohérente¹. Celleci devient progressivement incohérente au fur et à mesure que l'intensité augmente [35, 36]. Ainsi, au voisinage de l'intensité de saturation, le pic de diffusion élastique se transforme en un pic de diffusion inélastique, dont la largeur est fixée par la durée de vie radiative du système (figure 1.2). Le processus peut alors être modélisé par une

^{1.} Dans ce cas, le processus de diffusion peut en effet être traité par le modèle classique de l'électron élastiquement lié, rayonnant à la même pulsation que le champ incident.

absorption d'un photon incident, suivi d'une réémission sans relation de phase. Dans ce cas, la lumière diffusée est appelée "fluorescence de résonance".



FIG. 1.2 – Fluorescence de résonance d'un atome à deux niveaux.

1.1.2 Fluorescence d'une molécule en matrice solide

Nous avons jusqu'à maintenant considéré un atome isolé. En pratique, nous allons plutôt nous intéresser au rayonnement de fluorescence émis par des molécules dispersées dans une matrice solide, qui peut être un matériau polymère ou un cristal hôte. Il faut alors prendre en compte les couplages non-radiatifs avec la matrice, qui ont comme conséquence que le dipôle d'émission a perdu toute information sur le processus d'excitation. Le rayonnement émis est par conséquent caractérisé par un déphasage aléatoire par rapport au rayonnement incident, correspondant ainsi à une émission de fluorescence totalement incohérente. Ces couplages non-radiatifs sont illustrés par le



FIG. 1.3 – (a) Diagramme de JABLOŃSKI (b) Spectre d'absorption à un photon et spectre d'émission d'une molécule fluorescente de Nile Red (cf. figure 1.4b).

diagramme de JABŁOŃSKI, représenté sur la figure 1.3a. Ils sont à l'origine du décalage

de Stokes puisque la longueur d'onde d'émission sera systématiquement plus grande que la longueur d'onde d'absorption. Ce décalage apparaît clairement dans le spectre d'absorption et d'émission des molécules fluorescentes (figure 1.3b). Enfin, l'émission de fluorescence est caractérisée par son rendement quantique η . Ce paramètre correspond à la probabilité d'émission d'un photon de fluorescence après excitation de la molécule, en prenant en compte les différents processus de désexcitations non radiatives à partir des niveaux excités peuplés par l'absorption du faisceau pompe [9].

1.2 Fluorescence à deux photons

1.2.1 Cas particulier de l'excitation bi-photonique

La fluorescence à deux photons correspond à l'émission d'un photon de fluorescence, après l'absorption résonnante et simultanée de deux photons [37]. L'énergie des photons incidents $\hbar\omega$ doit par conséquent être bien adaptée à la transition mise en jeu. C'est typiquement le cas avec une source d'excitation infrarouge et des molécules fluorescentes absorbant autour de 500 nm. L'efficacité de la fluorescence à deux photons est étroitement liée à la section efficace d'absorption à deux photons $\sigma^{(2)}$, qui se trouve être particulièrement importante dans les systèmes moléculaires fortement conjugués, caractérisés par de forts moments dipolaires de transition. Un exemple de molécule efficace vis-à-vis de la fluorescence à deux photons est représentée sur la figure 1.4b.



FIG. 1.4 - (a) Illustration du processus d'émission de fluorescence après absorption simultanée de deux photons. Les états (g) et (e) sont les états fondamental et excité de la molécule. Le niveau représenté en pointillé est un état virtuel. (b) Formule développée d'une molécule de Nile Red pour laquelle une excitation par absorption de deux photons infrarouges est réalisable.

Notons que les règles de sélection relatives à la transition vers l'état excité sont différentes de celles pour la fluorescence à un photon [38]. Cela peut notamment se répercuter sur les spectres d'absorption et d'émission de la molécule. Ceci est en particulier vrai pour les molécules centrosymétriques, pour lesquelles les niveaux à deux photons sont généralement plus haut en énergie que pour l'excitation à un photon. Il en résulte un décalage spectral vers le bleu du spectre d'excitation à deux photons [39]. Ainsi, la longueur d'onde correspondant à une absorption bi-photonique optimale n'est pas systématiquement égale au double de la longueur d'onde pour laquelle l'absorption à un photon est maximale.

1.2.2 Expression de l'intensité de fluorescence à deux photons

Dans le cas d'une absorption bi-photonique, le nombre de photons détectés par unité de temps et de volume s'écrit²:

$$\mathcal{N}^{\text{Fluo}} = N \times K \times \left[\eta \, \frac{1}{2} \, \sigma^{(2)} \, I_{\omega}^2 \right] \tag{1.1}$$

avec:

- -N: nombre de molécules fluorescentes par unité de volume en cm⁻³;
- -K: facteur expérimental détaillé plus loin;
- $-\sigma^{(2)}$: section efficace d'absorption à deux photons exprimée en cm⁴·s·photon⁻¹;
- $-\eta$: rendement quantique de fluorescence prenant en compte l'existence de transitions non-radiatives à partir du niveau excité;
- $-I_{\omega}$: flux de photons incidents exprimé en photon·cm⁻²·s⁻¹.

Faisons quelques commentaires sur l'expression (1.1):

- Le facteur 1/2 traduit le fait qu'un seul photon est émis lorsque deux photons du faisceau pompe à ω sont absorbés.
- La dépendance quadratique en I_{ω} est caractéristique d'un processus non-linéaire du second ordre. Cette dépendance implique que $\mathcal{N}^{\text{Fluo}}$ est proportionnel à $|\vec{E}_{\omega}|^4$, si \vec{E}_{ω} représente le champ incident monochromatique à la pulsation ω .
- Les sections efficaces d'absorption à deux photons sont typiquement de l'ordre de 10^{-49} cm⁴·s·photon⁻¹. Elles sont mesurées en comparant les niveaux des signaux de fluorescence émis avec ceux obtenus avec un chromophore de référence, ou en mesurant la dépendance en I^2_{ω} de l'absorption non-linéaire [40].

^{2.} Dans le cas de la fluorescence à un photon, on a $\mathcal{N}^{\text{Fluo}} \propto N\eta \sigma^{(1)} I_{\omega}$ où la section efficace d'absorption à un photon $\sigma^{(1)}$ est exprimée en cm². Elle est typiquement de l'ordre de 10⁻¹⁶ cm² pour un chromophore fluorescent efficace à température ambiante.

- On peut définir une section efficace de fluorescence à deux photons par le produit de la section efficace d'absorption à deux photons et du rendement quantique de fluorescence. Ce dernier étant souvent proche de l'unité pour les molécules considérées, la section efficace $\sigma_{\rm Fluo} = \eta \times \sigma^{(2)}$ sera également de l'ordre de 10^{-49} cm⁴·s·photon⁻¹.
- La section efficace d'absorption à deux photons $\sigma^{(2)}$ est proportionnelle à $|\vec{\mu}_{abs}|^4$, où $\vec{\mu}_{abs}$ représente le moment dipolaire de transition de $(g) \rightarrow (e)$, également appelé dipôle d'absorption.
- Le rendement quantique de fluorescence η dépend quant à lui du moment dipolaire de transition de $(e) \rightarrow (g)$, également appelé dipôle d'émission et noté $\vec{\mu}_{em}$.
- Le facteur expérimental K rend compte de l'efficacité de la collection, de la sensibilité du détecteur mais aussi de la polarisation de la lumière incidente (qui va rendre l'absorption à deux photons plus ou moins efficace suivant l'orientation relative des molécules fluorescentes [41]) et de la direction d'analyse \vec{u}_I . En notant $\hat{\mu}_{abs}$, $\hat{\mu}_{em}$ et \hat{E}_{ω} les vecteurs normalisés associés respectivement aux dipôles d'absorption, d'émission et au champ incident, le facteur expérimental K est tel que^{3,4}:

$$K \propto |\hat{\mu}_{\rm abs} \cdot \hat{E}_{\omega}|^4 \, |\hat{\mu}_{\rm em} \cdot \vec{u}_I|^2. \tag{1.2}$$

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'effet de la polarisation incidente et de la direction d'analyse sur l'intensité des signaux de fluorescence détectés. Nous modéliserons donc cette intensité par l'expression:

$$\mathcal{I}^{\text{Fluo}} \propto |\vec{\mu}_{\text{abs}} \cdot \vec{E}_{\omega}|^4 \, |\vec{\mu}_{\text{em}} \cdot \vec{u}_I|^2, \tag{1.3}$$

sans nous préoccuper du facteur de proportionnalité. Les termes $P_{\rm abs} = |\vec{\mu}_{\rm abs} \cdot \vec{E}_{\omega}|^4$ et $P_{\rm em} = |\vec{\mu}_{\rm em} \cdot \vec{u}_I|^2$ seront respectivement appelés probabilités d'absorption et probabilité d'émission.

1.3 Génération du second harmonique

1.3.1 Processus d'émission au niveau moléculaire

Lorsqu'elle est soumise à un rayonnement suffisamment intense de pulsation ω , une molécule non-linéaire partant de son état fondamental (g), peut absorber deux photons d'énergie $\hbar \omega$ et revenir simultanément à l'état (g) en émettant un seul photon

^{3.} Ceci n'est valable que dans le cas des molécules de type "bâtonnet". Pour des structures moléculaires plus complexes, on utilisera le formalisme tensoriel (cf. chapitre 4).

^{4.} Avec une excitation mono-photonique, on aurait eu $K \propto |\hat{\mu}_{abs} \cdot \hat{E}_{\omega}|^2 |\hat{\mu}_{em} \cdot \vec{u}_I|^2$.

d'énergie $2\hbar\omega$. Ce processus de génération du second harmonique, représenté sur la figure 1.5a, est appelé diffusion hyper-Rayleigh dans le cas d'une molécule isolée. En effet, l'analogie avec la diffusion linéaire Rayleigh est directe (cf. figure 1.1a). L'onde harmonique est émise immédiatement après excitation – il s'agit donc d'un processus d'émission *cohérent*⁵, contrairement à la fluorescence à un ou deux photons – et ce mécanisme peut avoir lieu hors résonance. Comme le montre la figure 1.5b, le spectre de la radiation émise est uniquement constitué d'un pic centré sur la pulsation 2ω , dont la largeur est fixée par la largeur spectrale du faisceau pompe. Dans le dernier chapitre



FIG. 1.5 - (a) Processus de génération du second harmonique pour un système quantique à deux niveaux. Les niveaux d'énergie de l'état fondamental (g) et de l'état excité (e) sont représentés en ligne continue. En pointillés, il ne s'agit pas de niveaux moléculaires, mais de niveaux du système global {molécule + champ électromagnétique}, appelés niveaux virtuels. (b) Spectre d'émission d'une molécule non-linéaire de DR1 (cf. figure 1.6) obtenu avec une radiation infrarouge incidente de 987 nm.

de ce mémoire, nous montrerons que ce pic correspond effectivement à une diffusion élastique du faisceau excitateur, puisque nous mettrons en évidence ses propriétés de cohérence au moyen d'une expérience d'interférométrie.

Les molécules capables d'émettre ce rayonnement harmonique sont caractérisées par une forte hyperpolarisabilité du second ordre β [42, 43]. Celle-ci est à l'origine du moment dipolaire induit, oscillant à la pulsation 2ω sous l'effet du champ local $\vec{E}_l(\omega)$ vu par la molécule:

$$\vec{\mu}^{(2)}(2\omega) = \varepsilon_0 \,\beta(2\omega) : \vec{E}_l(\omega) \vec{E}_l(\omega). \tag{1.4}$$

Insistons sur le fait que, contrairement à la fluorescence, l'oscillation du dipôle induit et son rayonnement se font de manière cohérente avec le champ incident. L'information

^{5.} en supposant l'intensité du faisceau incident inférieure à l'intensité de saturation

relative à la phase de $\vec{E}_l(\omega)$ est ainsi conservée dans l'expression (1.4).

L'hyperpolarisabilité β est un tenseur d'ordre 3 qui caractérise la réponse nonlinéaire du second ordre de la molécule. Cette réponse va fortement dépendre de la symétrie moléculaire puisque les valeurs relatives des 27 composantes du tenseur β sont fixées par la géométrie de la molécule considérée: dipolaire, octupolaire, etc. Ainsi, contrairement à la fluorescence à deux photons qui peut avoir lieu aussi bien avec des molécules centrosymétriques que non-centrosymétriques, l'émission du second harmonique ne peut avoir lieu que dans des systèmes non-centrosymétriques, puisqu'elle fait intervenir un tenseur d'ordre impair. Une molécule centrosymétrique aura donc une hyperpolarisabilité β nulle et ne pourra émettre de rayonnement harmonique. Les systèmes moléculaires développés par l'ingénierie moléculaire pour la génération du second harmonique sont des molécules de type *push-pull*, constituées d'un chemin de conjugaison électronique dont les extrémités sont des fonctions chimiques accepteur et donneur d'électrons (figure 1.6). Les molécules en forme de "bâtonnet", fortement unidimensionnelles, ne possèdent qu'une seule composante non-nulle (ou du moins nonnégligeable) β_{333} , l'axe 3 représentant la direction de l'axe moléculaire. Par la suite, nous considérerons également des molécules octupolaires planes où seulement quatre composantes du tenseur β sont non-nulles.

Un modèle quantique à deux niveaux développé par J.-L. OUDAR et D.S. CHEMLA dans le cas de molécules de type "bâtonnet" [44], permet d'exprimer, pour une excitation à la pulsation ω , la norme du tenseur hyperpolarisabilité sous la forme :

$$\beta(2\omega) = \underbrace{\frac{3(\mu_{ge})^2 \Delta \mu}{2(\hbar\omega_0)^2}}_{\beta^{(0)}} \underbrace{\frac{\omega_0^2}{(\omega_0^2 - 4\omega^2)(\omega_0^2 - \omega^2)}}_{F(\omega,\omega_0)}$$
(1.5)

avec:

- $-\mu_{ge}$: moment dipolaire de transition de l'état fondamental (g) vers l'état excité (e);
- $\Delta \mu = \mu_{ee} \mu_{gg}$: différence entre le moment dipolaire de l'état excité et celui de l'état fondamental, l'existence d'une valeur non nulle de ce paramètre correspond à la propriété de non-centrosymétrie de la molécule;
- $-\hbar\omega_0 = E_e E_g$: énergie de transition entre les deux états (la longueur d'onde d'absorption maximale est alors telle que $\lambda_{\text{max}} = \omega_0/2\pi c$).

Ce modèle est issu d'un calcul de perturbation dans lequel la molécule est modélisée par un système quantique à deux niveaux, le champ électromagnétique étant traité classiquement.



FIG. 1.6 – Schéma classique d'une molécule non-linéaire de type "bâtonnet" constituée de groupements accepteur et donneur d'électrons, séparés par une chaîne facilitant le transfert de charge. La molécule représentée ici est la molécule de DR1. Remarquons que cette molécule n'est pas fluorescente, comme le montre son spectre d'émission représenté sur la figure 1.5b après une excitation à deux photons. En effet, la présence du groupement azoïque -N=N- induit une photoisomérisation cis-trans et la molécule présente une forte probabilité de relaxer vers le niveau cis non-radiatif, ce qui réduit considérablement le rendement quantique de fluorescence.

On notera que la non-linéarité intrinsèque de la molécule est caractérisée par le terme $\beta^{(0)}$, appelée hyperpolarisabilité à fréquence nulle. Le terme $F(\omega,\omega_0)$, qui dépend de la pulsation incidente ω et de la pulsation de résonance ω_0 , est un facteur d'exaltation de la non-linéarité d'autant plus important que l'on est proche de la résonance. En pratique, pour comparer l'efficacité intrinsèque des molécules vis-à-vis de la génération du second harmonique, on corrigera les hyperpolarisabilités mesurées à une fréquence donnée de ce facteur d'exaltation.

L'expression de l'hyperpolarisabilité statique $\beta^{(0)}$ montre qu'une molécule est d'autant plus efficace que le terme $(\mu_{ge})^2 \Delta \mu$ est grand. Il faut pour cela qu'un fort transfert de charge soit possible au sein de la molécule, ce qui est le cas des molécules asymétriques de type *push-pull*. Les deux formes conjuguées de la molécule, qui correspondent approximativement aux états (g) et (e), présentent alors des moments dipolaires très différents.

1.3.2 Propriété de cohérence du rayonnement de GSH

Pour obtenir une réponse macroscopique cohérente de génération du second harmonique à partir d'un ensemble de molécules non-linéaires, il est nécessaire que les ondes harmoniques rayonnées par les différentes molécules interfèrent constructivement. Dans ce paragraphe, nous allons déterminer les conditions d'obtention de ces interférences constructives, lorsqu'un ensemble de N molécules non-linéaires sont réparties dans un volume de dimension caractéristique ΔL (figure 1.7). Nous allons supposer ΔL très petit à l'échelle de la longueur d'onde d'émission. En effet, dans le montage de microscopie non-linéaire que nous allons utiliser par la suite, nous collectons la lumière émise au niveau d'une zone très petite de l'échantillon, là où le champ excitateur, focalisé par l'objectif de microscope, est suffisamment intense pour induire les effets non-linéaires du second ordre. Nous verrons en particulier que le volume d'interaction a une distance caractéristique de l'ordre de 300 nm. Il n'est donc pas nécessaire de prendre en compte le couplage entre les ondes fondamentale et harmonique au travers d'une équation de propagation, ce traitement étant réservé à l'étude de la réponse non-linéaire d'un milieu optiquement épais [45]. Dans notre cas, le signal de second harmonique détecté en un point M de l'espace situé loin des molécules non-linéaires, correspond tout simplement à la somme des champs rayonnés dans le vide par les différents dipôles $\mu_n^{(2)}$ oscillant à la pulsation 2ω , induits dans les molécules par l'excitation à la pulsation ω .



FIG. 1.7 – Émission cohérente de génération du second harmonique par un ensemble de molécules non-linéaires contenues dans un volume de dimension caractéristique ΔL beaucoup plus petite que la longueur d'onde. La position de chaque dipôle émetteur est repérée par le vecteur $\vec{r_n}$.

Chaque molécule, caractérisée par sa position $\vec{r_n}$, a une orientation définie par Ω_n . Nous supposons que toutes ces molécules voient un même champ local $\vec{E_l}$ que l'on écrira sous la forme :

$$\vec{E}_l = \vec{E}_0 \exp\left(-i\omega t + i\vec{k}_\omega \cdot \vec{r}\right), \qquad (1.6)$$

où \vec{k}_{ω} représente le vecteur d'onde à la pulsation ω dans le milieu non-linéaire. D'après l'équation (1.4), le moment dipolaire induit associé à la molécule repérée par l'indice n s'écrit :

$$\vec{\mu}_n^{(2)}(\vec{r}_n,\Omega_n) = \varepsilon_0 \,\beta(\Omega_n) : \vec{E}_0 \,\vec{E}_0 \exp\left(-2i\omega t + 2i\vec{k}_\omega \cdot \vec{r}_n\right). \tag{1.7}$$

La phase du rayonnement émis par cette molécule est ainsi déterminée par la phase du champ incident au point $\vec{r_n}$. En utilisant la formule des potentiels retardés, le champ rayonné dans le vide au point M par la molécule n se met sous la forme :

$$\vec{\mathcal{E}}_{n}^{(2)}(M,t) \propto \vec{k} \wedge \left[\vec{k} \wedge \frac{\partial^{2} \vec{\mu}_{n}}{\partial t^{2}} \left(t - \frac{R_{n}}{c}\right)\right], \qquad (1.8)$$

où le vecteur \vec{k} représente le vecteur d'onde de l'onde rayonnée et $R_n = |\vec{r}(M) - \vec{r_n}|$. Dans une première approximation, on peut considérer que le champ rayonné est tel que:

$$\vec{\mathcal{E}}_{n}^{(2)}(M,t) = \vec{E}_{n}(\vec{r}_{n},\Omega_{n}) \exp\left[-i2\omega\left(t-\frac{R_{n}}{c}\right)\right],$$
(1.9)

avec:

$$\vec{E}_n(\vec{r}_n,\Omega_n) \propto \varepsilon_0 \,\beta(\Omega_n) : \vec{E}_0 \,\vec{E}_0 \exp\left(2i\vec{k}_\omega \cdot \vec{r}_n\right).$$
 (1.10)

Cette approximation suppose que la direction du champ rayonné est parallèle au moment dipolaire $\vec{\mu}_n^{(2)}$. Ainsi, le champ total rayonné par la distribution des dipôles induits à la pulsation 2ω s'écrit :

$$\vec{\mathcal{E}}^{(2)}(M,t) = \sum_{n=1}^{N} \vec{\mathcal{E}}_{n}^{(2)} = \sum_{n=1}^{N} \vec{E}_{n}(\vec{r}_{n},\Omega_{n}) \exp\left[-i2\omega\left(t - \frac{R_{n}}{c}\right)\right]$$
(1.11)

On en déduit l'expression de l'intensité totale émise :

$$\mathcal{I} = |\vec{\mathcal{E}}^{(2)}(M,t)|^2 = \sum_{n=1}^N \sum_{n'=1}^N \vec{\mathcal{E}}_n^{(2)} \cdot \vec{\mathcal{E}}_{n'}^{(2)*}$$
(1.12)

Cette dernière expression peut se décomposer en deux termes :

$$\mathcal{I} = \underbrace{\sum_{n} \vec{\mathcal{E}}_{n}^{(2)} \cdot \vec{\mathcal{E}}_{n}^{(2)*}}_{\mathcal{I}_{1}} + \underbrace{\sum_{n} \sum_{n' \neq n} \vec{\mathcal{E}}_{n}^{(2)} \cdot \vec{\mathcal{E}}_{n'}^{(2)*}}_{\mathcal{I}_{2}}$$
(1.13)

Le premier terme \mathcal{I}_1 n'est évidemment jamais nul. En revanche, le deuxième terme \mathcal{I}_2 dépend de l'orientation relative des molécules non-linéaires constituant l'échantillon. Nous allons distinguer deux cas correspondant respectivement à \mathcal{I}_2 nul ou non.

Cas de l'émission incohérente : diffusion hyper-Rayleigh

Dans le cas où les molécules ont des orientations aléatoires, le deuxième terme \mathcal{I}_2 s'annule et l'intensité totale \mathcal{I} s'identifie au terme \mathcal{I}_1 correspondant à la somme *in*cohérente des intensités diffusées par tous les dipôles indépendamment. Cette somme incohérente est également appelée diffusion hyper-Rayleigh. D'après les équations (1.10) et (1.11), \mathcal{I}_1 est tel que :

$$\mathcal{I}_1 \propto \sum_n |\varepsilon_0 \,\beta(\Omega_n) : \vec{E}_0 \,\vec{E}_0|^2 \tag{1.14}$$

Cette expression montre que l'intensité varie linéairement avec le nombre de molécules composant l'échantillon, comme dans le cas de la fluorescence à deux photons.

En pratique, on peut observer cette diffusion hyper-Rayleigh avec un échantillon constitué de poudres moléculaires dans lesquelles les émetteurs sont des microcristaux de molécules agencés aléatoirement. L'intensité détectée avec un tel échantillon permet d'obtenir un ordre de grandeur de l'hyperpolarisabilité β des molécules non-linéaires constituant les grains de poudre. Cette technique de mesure d'hyperpolarisabilité, développée par S.K. KURTZ et T.T. PERRY dès 1968 [46], est aujourd'hui couramment utilisée.

Une telle situation apparaît également dans les milieux liquides à cause des fluctuations temporelles de densités moléculaires qui peuvent avoir lieu. En effet, nous avons considéré jusqu'à maintenant un désordre structurel caractérisé par la disposition spatiale des molécules. Le temps d'intégration des détecteurs implique un moyennage temporel et le même raisonnement peut être fait, en vertu du théorème d'ergodicité. On a ainsi pu détecter un signal de diffusion hyper-Rayleigh émis dans différents liquides [47, 48].

Cas de l'émission cohérente : génération du second harmonique

Dans le cas simple où toutes les molécules ont la même orientation, le terme \mathcal{I}_2 est non-nul et l'intensité totale émise s'écrit :

$$\mathcal{I} \propto |\varepsilon_0 \beta : \vec{E}_0 \vec{E}_0|^2 \sum_{n,n'} \exp\left(2i\vec{k}_\omega \cdot (\vec{r}_n - \vec{r}_{n'})\right) \exp\left(i\frac{2\omega}{c}(R_n - R_{n'})\right)$$
(1.15)

En supposant $r(M) \gg \Delta L$, on montre facilement que $R_n - R_{n'} \simeq \vec{u} \cdot (\vec{r}_{n'} - \vec{r}_n)$, si le vecteur \vec{u} est le vecteur unitaire associé à $\vec{r}(M)$. On obtient ainsi :

$$\mathcal{I} \propto |\varepsilon_0 \beta : \vec{E}_0 \vec{E}_0|^2 \sum_{n,n'} \exp\left(i(2\vec{k}_\omega - \vec{k}) \cdot (\vec{r}_n - \vec{r}_{n'})\right)$$
(1.16)

avec $\vec{k} = (2\omega/c) \vec{u}$. Nous avons supposé que ΔL était très petit à l'échelle de la longueur d'onde d'émission, si bien que :

$$\mathcal{I} \propto N^2 |\varepsilon_0 \beta : \vec{E}_0 \vec{E}_0|^2 \tag{1.17}$$

L'intensité du signal varie maintenant quadratiquement avec le nombre de molécules N. Ce résultat est caractéristique d'un rayonnement cohérent. On parlera dans ce cas de génération du second harmonique.

1.3.3 Génération du second harmonique pour un ensemble statistique

Dans le précédent paragraphe, nous avons considéré un échantillon où toutes les molécules non-linéaires étaient orientées dans la même direction. Nous allons voir que cette condition n'est pas strictement nécessaire pour l'obtention d'un signal de génération du second harmonique cohérent.

Considérons le cas où les molécules ont des orientations différentes définies par les trois angles d'Euler $\Omega_n = (\theta_n, \phi_n, \psi_n)$. Nous allons là encore supposer ΔL négligeable devant la longueur d'onde d'émission, ce qui correspond à nos conditions expérimentales. Le volume occupé par les molécules peut alors être considéré comme un point ponctuel en lequel se trouve un dipôle macroscopique $\vec{P}^{(2)}$ rayonnant à la pulsation 2ω et tel que:

$$\vec{P}^{(2)} = \sum_{n=1}^{N} \vec{\mu}_{n}^{(2)}(\Omega_{n})$$
(1.18)

Cette somme peut être calculée à partir de la moyenne statistique des moments dipolaires $\vec{\mu}_n^{(2)}$ contenus dans le volume d'interaction, exprimée selon :

$$\sum_{n=1}^{N} \vec{\mu}_n^{(2)}(\Omega_n) = N \left\langle \vec{\mu}_n^{(2)}(\Omega_n) \right\rangle$$
(1.19)

Ce passage à la limite statistique permet de considérer des ensembles moléculaires caractérisés aussi bien par des fonctions de distribution continues (cas des milieux polymères) que par des fonctions de distribution discrètes (cas des milieux cristallins). Le volume d'interaction étant considéré comme un point ponctuel, toutes les molécules voient le même champ local \vec{E}_l avec le même déphasage, soit :

$$\vec{E}_l = \vec{E}_0 \exp\left(-i\omega t\right). \tag{1.20}$$

Ainsi, les champs rayonnés par les différents dipôles seront exactement en phase et l'expression du dipôle macroscopique $\vec{P}^{(2)}$ se simplifie:

$$\vec{P}^{(2)} = N\varepsilon_0 \left\langle \beta(\Omega_n) \right\rangle : \vec{E}_l \,\vec{E}_l \tag{1.21}$$

avec:

$$\langle \beta(\Omega_n) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^{N} \beta(\Omega_n).$$
 (1.22)

D'une façon générale, on préfère écrire le vecteur polarisation $\vec{P}^{(2)}$ en fonction du champ macroscopique \vec{E} , au lieu du champ local \vec{E}_l . On introduit pour cela le tenseur $\chi^{(2)}$, appelé susceptibilité non-linéaire du second ordre tel que :

$$\vec{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \,\chi^{(2)} \colon \vec{E}\vec{E}.\tag{1.23}$$

En identifiant les équations (1.21) et (1.23), on voit que le tenseur $\chi^{(2)}$ dépend de la moyenne statistique des tenseurs hyperpolarisabilités $\langle \beta(\Omega_n) \rangle$, de la densité moléculaire N ainsi que des facteurs de champ local⁶ f_I selon l'expression [49]:

$$\chi_{IJK}^{(2)} = N f_I^{2\omega} f_J^{\omega} f_K^{\omega} \langle \beta(\Omega_n) \rangle_{IJK}.$$
(1.24)

Cette susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$, qui est un tenseur de rang 3 comme le tenseur hyperpolarisabilité β , possède un certain nombre de propriétés [45]. En particulier, ses composantes s'annulent dès que le milieu devient centrosymétrique⁷. Dans ce cas, seule la contribution incohérente de l'intensité émise est non-nulle et le signal résultant est proportionnel à N. En pratique, ce signal est très faible devant la configuration d'émission cohérente. Dans le cas d'une configuration non-centrosymétrique, les composantes $\chi^{(2)}_{IJK}$ et $\chi^{(2)}_{IKJ}$ sont égales lorsque les champs couplés ont la même fréquence, le nombre de composantes indépendantes du tenseur $\chi^{(2)}$ est donc réduit à 18, au lieu de 27. On définit souvent le tenseur d par la relation :

$$d_{IJK} = \frac{1}{2} \chi^{(2)}_{IJK}, \qquad (1.25)$$

ce qui permet d'écrire la polarisation induite $\vec{P}^{(2)}$ sous la forme :

$$P_{I}^{(2)} = \varepsilon_{0} \sum_{J,K} 2 d_{IJK} E_{J} E_{K}.$$
 (1.26)

Dans le cas de milieux sans pertes, c'est-à-dire loin de la résonance, les composantes sont réelles. La symétrie de KLEINMAN indique alors que toutes les permutations d'indice sont permises [50], par exemple $\chi^{(2)}_{IJK}(-2\omega;\omega,\omega) = \chi^{(2)}_{JKI}(\omega;\omega,-2\omega)$. Enfin, lorsque $\omega \ll \omega_0$, ce qui est souvent le cas avec une excitation infrarouge, la susceptibilité non-linéaire devient indépendante de la fréquence d'excitation.

^{6.} D'après le modèle de LORENTZ-LORENZ, le facteur de champ local est tel que $f_i^{\omega} = ((n_i^{\omega})^2 + 2)/3$ où n_i^{ω} représente l'indice de réfraction du milieu.

^{7.} Cette propriété vient du fait que \vec{P} et \vec{E} sont des vecteurs polaires.

1.3.4 Expression de l'intensité de génération du second harmonique

L'intensité du signal de GSH peut être calculée en considérant le diagramme de rayonnement associé à la polarisation induite $\vec{P}^{(2)}$. Dans une première approximation, on pourra simplement considérer que l'intensité de GSH détectée suivant la direction d'analyse \vec{u}_I est proportionnelle à $|\vec{P}^{(2)}.\vec{u}_I|^2$. En tenant compte des équations (1.23) et (1.24) et en considérant les facteurs de champ local tous égaux entre eux⁸, on obtient :

$$\mathcal{I}^{\text{GSH}} \propto |P_I^{(2)}|^2 \propto N^2 \left| \varepsilon_0 \sum_{J,K} \langle \beta(\Omega_n) \rangle_{IJK} E_J E_K \right|^2.$$
(1.27)

Cette expression permettra par la suite d'étudier l'influence de la polarisation incidente et de la direction d'analyse sur l'intensité des signaux de GSH détectés, de la même façon que l'expression (1.3) pour la fluorescence à deux photons.

On peut définir de façon analogue à la fluorescence, une section efficace moléculaire de GSH qui est reliée à l'hyperpolarisabilité β par [23]:

$$\sigma_{\rm GSH} = \frac{4n_{2\omega}\hbar\omega^5}{3\pi n_{\omega}^2 \varepsilon_0^3 c^5} |\beta|^2.$$
(1.28)

Nous pouvons alors exprimer le nombre de photons détectés par unité de temps :

$$\mathcal{N}^{\rm GSH} = N^2 \times K \times \left[\frac{1}{2}\sigma_{\rm GSH}I_{\omega}^2\right]. \tag{1.29}$$

en fonction du nombre N de molécules actives. Cette expression est directement comparable à l'équation (1.1) relative à la fluorescence à deux photons. La section efficace de GSH est typiquement de l'ordre de 10^{-53} cm⁴·s·photon⁻¹ [23]. Elle est par conséquent très inférieure à la section efficace σ_{Fluo} de la FDP. Cependant, la dépendance quadratique en fonction du nombre d'émetteurs N permet d'obtenir des niveaux de signaux comparables à ceux de la fluorescence à deux photons, dès lors que la densité moléculaire est suffisamment élevée (figure 1.8a). C'est la raison pour laquelle un domaine d'imagerie cellulaire par génération du second harmonique se développe actuellement. Il est en particulier possible d'imager dans une cellule des chromophores non-linéaires, donnant un fort signal de GSH sur les membranes extérieures, là où ils sont bien alignés et par conséquent là où la propriété d'addition cohérente des réponses individuelles est la mieux marquée [23, 24].

^{8.} Ceci est vrai en toute rigueur dans le cas d'un milieu non-dispersif et isotrope, mais nous utiliserons cette simplification pour la clarté des calculs.

Dans le cas de nos mesures par microscopie non-linéaire, le volume d'interaction comporte typiquement un nombre N de molécules actives allant de 2×10^5 (cas des nanocristaux de CMONS étudiés au chapitre 5) à plus de 10^8 (cas des cristaux de taille millimétrique étudiés au chapitre 4). Avec une intensité incidente⁹ I_{ω} de l'ordre de 10^{24} photon·s⁻¹·cm⁻², on obtient des niveaux de signaux bien supérieurs au bruit du détecteur¹⁰, qui est de l'ordre de 100 photon·s⁻¹ pour notre expérience.



FIG. 1.8 – Estimation du nombre de photons détectés par unité de temps en fonction du nombre de molécules N constituant l'échantillon. Les courbes ont été tracées avec les équations (1.1), (1.29) et (1.30) en prenant $I_{\omega} = 3 \times 10^{24}$ photon·s⁻¹·cm⁻², $\sigma_{Fluo} = 10^{-49} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$, $\sigma_{GSH} = 10^{-53} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$ et un coefficient de détection de 10 %.

On peut de la même façon exprimer le nombre de photons émis par unité de temps par diffusion hyper-Rayleigh, lorsque les molécules sont orientées aléatoirement :

$$\mathcal{N}^{\text{DHR}} = N \times K \times \left[\frac{1}{2}\sigma_{\text{DHR}}I_{\omega}^{2}\right].$$
 (1.30)

La section efficace qui apparaît dans cette expression est la même que celle qui intervient dans l'équation (1.29). Les niveaux de signaux émis par diffusion hyper-Rayleigh sont par conséquent très faibles, compte tenu de la dépendance linéaire en N. La figure 1.8b montre en effet que le nombre de photons détectés reste négligeable par rapport au bruit du détecteur tant que N est inférieur à 10^8 . Dans tous les cas, il est négligeable devant le nombre de photons émis par génération cohérente du second harmonique.

^{9.} On utilisera typiquement des puissances moyennes incidentes de l'ordre de 10 μ W à 10 mW à une longueur d'onde de 1 μ m sur une focalisation de diamètre 300 nm.

^{10.} Les détecteurs utilisés sont des photodiodes à avalanche, fonctionnant dans un régime de comptage de photons.

1.4 Conclusion du chapitre 1

Jusqu'à maintenant, nous avons considéré séparément l'émission de fluorescence à deux photons et la génération du second harmonique. Certaines molécules peuvent pourtant émettre ces deux types de rayonnement à la fois. C'est le cas en particulier de la molécule de DCM, que nous étudierons par la suite. Cette molécule possède en effet de forts moments dipolaires de transition, tout en ayant une structure noncentrosymétrique (figure 1.9a). Ainsi, lorsqu'elle est excitée avec un faisceau infrarouge proche de la résonance, elle a une certaine probabilité d'émettre immédiatement un photon à la pulsation 2ω et une autre probabilité de relaxer vers un état moléculaire fluorescent. Dans ces conditions d'éclairement, le spectre d'émission de la molécule est constitué d'un pic étroit de GSH et d'une large bande de fluorescence induits par l'excitation à deux photons (figure 1.9b).



FIG. 1.9 - (a) Formule développée de la molécule de DCM qui est à la fois efficace vis-à-vis de la fluorescence à deux photons et de la génération du second harmonique.
(b) Spectre d'émission d'un échantillon comportant des molécules de DCM disposées selon un arrangement non-centrosymétrique. La longueur d'onde du faisceau incident est de 987 nm.

Les caractéristiques propres à l'émission de la FDP et de la GSH montrent qu'il est cependant possible d'étudier les deux rayonnements indépendamment. En effet, lorsque le pic de GSH est suffisamment éloigné de la bande de fluorescence à deux photons, un simple filtrage spectral est alors suffisant, à condition bien sûr de choisir convenablement la longueur d'onde du faisceau excitateur.

Lorsque la séparation spectrale des deux composantes est impossible, ces deux types de rayonnement peuvent être discriminés à partir de l'analyse temporelle des signaux émis [51, 52]. En enregistrant les instants d'arrivée des photons par rapport à l'impulsion excitatrice, le signal de génération du second harmonique (émis de façon cohérente
ou incohérente) apparaît comme un pic émis à l'instant d'excitation. La fluorescence à deux photons correspond quant à elle à une décroissance exponentielle, fonction de la durée de vie radiative du niveau excité (figure 1.10). Nous montrerons qu'une alternative à cette détection résolue en temps est d'utiliser une détection cohérente de la GSH (cf. chapitre 6), qui la discrimine automatiquement du rayonnement de fluorescence à deux photons.



FIG. 1.10 – Analyse temporelle des signaux de fluorescence à deux photons et de la diffusion hyper-Rayleigh émis par des molécules actives en solution. Les graphiques sont issus de la Réf. [51]

Les propriétés de cohérence intrinsèques à chacun des rayonnements devront d'ailleurs être prises en compte dans l'analyse des intensités détectées. Nous allons montrer également que les deux radiations dépendent fortement des symétries moléculaires mises en jeu et qu'elles apportent des renseignements complémentaires sur l'orientation des molécules et leur organisation au sein de l'échantillon considéré.

Chapitre 2

Montage de microscopie non-linéaire résolu en polarisation

Dans ce chapitre, nous allons décrire le montage de microscopie non-linéaire à deux photons et la technique d'analyse en polarisation que nous avons développée pour déterminer l'organisation moléculaire dans des échantillons comportant des molécules fluorescentes et/ou non-linéaires. Cette technique d'analyse est basée sur l'étude des variations des signaux de fluorescence à deux photons et de génération du second harmonique, en fonction de la direction de la polarisation linéaire du faisceau de pompe. Nous appliquerons dans un premier temps cette technique à un échantillon comportant des molécules fluorescentes orientées aléatoirement et nous développerons un modèle pour interpréter les signaux obtenus.

2.1 Le dispositif expérimental

2.1.1 Présentation du montage

Le montage de microscopie non-linéaire à deux photons est représenté sur la figure 2.1. Il est fondé sur l'utilisation d'un microscope en configuration inversée, montage dit d'épi-fluorescence [53]. Le faisceau excitateur incident provient d'un laser Ti:Sa femtoseconde. Il est focalisé au niveau de l'échantillon, grâce à un objectif de microscope à immersion de grande ouverture numérique. Les signaux de fluorescence à deux photons et de génération du second harmonique sont collectés par le même objectif et détectés par un système de deux photodiodes à avalanche, après avoir traversé un cube séparateur polarisant. Ils peuvent être sélectionnés séparément, au moyen de filtres optiques. Un polariseur placé à l'entrée du dispositif donne au faisceau laser incident une polarisation rectiligne. Une lame demi-onde disposée juste après ce polariseur et



FIG. 2.1 – Montage de microscopie non-linéaire: Filtre IR : filtre ne laissant passer que la lumière infrarouge; P : polariseur; $\lambda/2$: lame demi-onde dont l'orientation est contrôlée par ordinateur; Obj : objectif de microscope à immersion dans l'huile ×60, ON = 1,4; MD : miroir dichroïque; F : filtre sélectionnant soit le signal de génération du second harmonique, soit la fluorescence à deux photons; Filtre vis : filtres KG5 et BG38 rejetant la radiation infrarouge résiduelle due à la diffusion du faisceau laser incident; CP : cube polarisant permettant de séparer les signaux lumineux émis dans les deux états de polarisation X et Y; CNP : cube non polarisant permettant d'envoyer une partie du faisceau lumineux vers un spectrographe, sans affecter la polarisation des signaux étudiés; PDA1, PDA2 : photodiodes à avalanche fonctionnant en régime de comptage de photons.

dont l'orientation est commandée par ordinateur, permet de faire varier la direction de cette polarisation.

Le laser femtoseconde Ti:Sa

Le rayonnement infrarouge excitateur provient d'un laser saphir dopé titane (Tsunami, Spectra-Physics), pompé par un laser continu YAG doublé dans une cavité externe (Millenia, Spectra-Physics). Le laser Ti:Sa génère des impulsions de 80 fs avec un taux de répétition de 86 MHz, à une longueur d'onde ajustable entre 970 et 1060 nm. À 987 nm, longueur d'onde à laquelle nous avons travaillé, la puissance moyenne de sortie du laser est de l'ordre de 400 mW, soit une énergie par impulsion d'environ 4,7 nJ. Cette puissance est diminuée jusqu'à quelques mW typiquement dans les conditions habituelles de l'expérience, grâce à des densités optiques et à une lame demi-onde placées en amont du polariseur.

Le miroir dichroïque

Le faisceau laser est réfléchi par un miroir dichroïque, avant d'être focalisé par l'objectif du microscope au niveau de l'échantillon. Comme le montrent les spectres en transmission et en réflexion de la figure 2.2, ce miroir réfléchit le rayonnement infrarouge et transmet le rayonnement visible. Les signaux de FDP et de GSH émis au niveau de l'échantillon et collectés par l'objectif, sont ainsi transmis par ce miroir avec une efficacité de l'ordre de 70 %.



FIG. 2.2 – Spectres en réflexion et en transmission du miroir dichroïque utilisé dans le montage de microscopie non-linéaire à deux photons. Le miroir réfléchit les radiations infrarouges et transmet le rayonnement visible.

L'objectif de microscope

Un objectif de microscope à immersion dans l'huile (n = 1,5), de grande ouverture numérique $(ON = 1,4, \text{ grandissement} \times 60)$ est utilisé de façon à pouvoir sonder des milieux moléculaires sur des échelles spatiales réduites, de l'ordre de quelques centaines de nanomètres. Cet objectif est configuré pour travailler à l'infini, à travers des substrats de verre d'épaisseur 0,17 mm (épaisseur normalisée d'une lamelle de microscope) et d'indice de réfraction n = 1,5. Dans ces conditions, le demi-angle de collection des signaux lumineux θ_{obj} vaut 1,204 rad, soit 69°.

Détection et acquisition des données

Les signaux lumineux collectés par l'objectif sont focalisés sur la surface sensible de deux photodiodes à avalanche au silicium en régime de comptage de photons (SPCM-AQR-14, EG&G). Ces dernières ont un rendement quantique de 70 % à 700 nm et un nombre de coups d'obscurité de l'ordre de 100 coups/s. Pour les échantillons étudiés, qui sont fortement concentrés en molécules actives, ce bruit est négligeable. Lorsque les photodiodes à avalanche détectent un photon, elles envoient une impulsion de 2 V vers une carte de comptage. Un programme d'acquisition, fonctionnant avec le logiciel LABVIEW (figure 2.3), permet d'enregistrer le nombre de photons détectés au cours du temps, avec un temps d'intégration typique de 20 ms. Avec ces détecteurs, il est nécessaire de travailler avec des puissances incidentes suffisamment faibles pour ne pas dépasser le seuil critique de 10 MHz dans la fréquence des signaux de sortie, c'est-à-dire 2×10^5 photons détectés par 20 ms.

Structure typique des échantillons étudiés

Les échantillons, étudiés à température ambiante, sont constitués d'une lamelle de microscope recouverte d'une couche de polymère comportant des molécules actives (fluorescentes et/ou non-linéaires) ou sur laquelle on a simplement déposé un petit cristal moléculaire. La lamelle de microscope est fixée sur une platine piézo-électrique (Tritor 102 SG, Piezo Jena) dont la position en (X,Y,Z) est commandée par ordinateur. La position est asservie au moyen de capteurs (jauges de contraintes) dans la platine et d'une électronique de commande "maison". En déplaçant la platine piézo-électrique, le programme d'acquisition permet de réaliser une cartographie des signaux émis au niveau de l'échantillon, sur une étendue maximale de 76 μ m×76 μ m avec un pas variable allant de 15,3 nm à 242 nm.

L'analyse spectrale

A la sortie du microscope, il est possible de placer un cube séparateur non polarisant permettant d'envoyer une partie du faisceau lumineux vers un spectrographe, sans en affecter la polarisation. Le spectrographe est constitué d'une fente d'entrée de 100 μ m

mapping_8_test2images_LABVIEWversion2.vi

D:\PMU\VI Programmes complets\Nouvelle version\manip\mapping_8_test2images_LABVIEWversion2.vi Dernière modification le 17/01/2003 à 16:34

Imprimé le 11/02/2004 à 18:05





FIG. 2.4 – Spectres de transmission des filtres utilisés pour sélectionner soit la fluorescence à deux photons (a), soit le signal de génération du second harmonique (b).

de largeur, d'un réseau concave (Jobin Yvon) faisant une image spectrale sur une caméra CCD comportant 1024×128 pixels et refroidie à -60°C (Andor Technologies). La largeur de la fente source a été choisie pour que la résolution spectrale corresponde exactement à la largeur d'un pixel de la caméra CCD. On peut ainsi enregistrer le spectre du rayonnement émis avec un temps d'intégration variable allant de 0,5 s à 60 s. Le spectre obtenu comporte en géneral un pic de GSH et/ou une bande de fluorescence à deux photons selon la nature de l'échantillon. On peut alors sélectionner l'un ou l'autre des signaux - FDP ou GSH - en ajoutant dans le montage un filtre optique de transmission adaptée. La figure 2.4 donne le spectre de transmission des deux filtres utilisés lors de nos mesures. Le "filtre GSH" est un filtre interférentiel laissant passer le rayonnement de GSH à 493,5 nm avec un faisceau excitateur de longueur d'onde 987 nm¹. Le "filtre FLUO" est un filtre très large coupant toutes les radiations de longueur d'onde inférieure à 530 nm.

2.1.2 La résolution spatiale

Les sections efficaces d'excitation à deux photons étant généralement très faibles et la probabilité d'excitation étant proportionnelle au carré de l'intensité incidente, l'émission de FDP et de GSH n'a lieu que dans un volume d'excitation très restreint. Ce volume est centré sur le point de focalisation, là où l'intensité lumineuse est la plus intense. Le confinement de ce volume d'excitation conduit intrinsèquement à une très bonne résolution spatiale, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter un trou de confocalité. Ceci constitue l'un des nombreux avantages de la microscopie non-linéaire par rapport à la microscopie linéaire. Dans le cas de notre montage, les résolutions latérale et axiale sont de l'ordre de 300-600 nm et 860 nm-1,8 μ m respectivement. La détermination

^{1.} Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé préférentiellemnt avec des longueurs d'onde incidentes de 987 et 1028 nm, ce qui nous a permis d'utiliser les filtres disponibles au LPQM.

expérimentale du volume d'excitation est développée dans l'annexe A.

2.2 Principe de l'analyse en polarisation

2.2.1 Principe

L'analyse en polarisation consiste à enregistrer les signaux de FDP et de GSH dans deux états de polarisation perpendiculaires, lorsque la polarisation du faisceau excitateur tourne dans son plan. On place ainsi à l'entrée du microscope, un polariseur suivi d'une lame demi-onde, dont la rotation permet de faire tourner la direction de la polarisation incidente. L'orientation de la lame demi-onde est contrôlée par le programme d'acquisition, par l'intermédiaire d'un moteur pas à pas.

L'objectif de cette analyse en polarisation est d'étudier les réponses en polarisation d'ensembles moléculaires isotropes, orientés sous champ électrique ou bien cristallisés, et de déterminer, à partir des intensités détectées, l'orientation des molécules fluorescentes et/ou non-linéaires constituant l'échantillon.

2.2.2 Définition du repère (X,Y,Z)

Pour procéder à l'analyse des signaux recueillis, il est nécessaire de définir un repère macroscopique (X,Y,Z) associé à l'échantillon. L'axe Z, perpendiculaire à l'échantillon, est parallèle à l'axe optique de l'objectif. Les directions des deux axes X et Y, dans le plan de l'échantillon, sont fixées par les directions d'analyse du cube polarisant. Comme l'illustre la figure 2.1, la lumière transmise (respectivement réfléchie) par le cube d'analyse, est polarisée suivant l'axe Y (respectivement l'axe X) après l'objectif. On notera donc \mathcal{I}_Y et \mathcal{I}_X l'intensité du signal détecté par la première photodiode (PDA1) et la seconde (PDA2) respectivement. Remarquons que dans ce repère, les directions de polarisation p et s définies par rapport au miroir dichroïque correspondent aux axes X et Y respectivement.

2.2.3 Description de la polarisation du champ incident

Nous allons maintenant exprimer les composantes du champ incident dans le repère (X,Y,Z) défini précédemment. De nombreuses études ont montré que la structure du champ électromagnétique au foyer d'un objectif de grande ouverture numérique est loin d'être triviale [54, 55, 56, 57]. Écrivons le champ électrique sous la forme :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{-i\omega t} + \vec{E}_0^* e^{i\omega t}.$$
(2.1)

D'après le modèle de RICHARDS et WOLF [58], lorsque ce champ est polarisé parallèlement à l'axe X avant l'objectif, sa polarisation \vec{E}_0 en un point P de coordonnées (x_P, y_P) du plan focal image s'écrit :

$$\vec{E}_{0}(x_{P}, y_{P}) \propto \begin{bmatrix} -i[I_{0}(r_{P}) + I_{2}(r_{P})\cos 2\Phi_{P}] \\ -iI_{2}(r_{P})\sin 2\Phi_{P} \\ -2I_{1}(r_{P})\cos \Phi_{P} \end{bmatrix}, \qquad (2.2)$$

où Φ_P représente l'angle azymutal du point P par rapport à l'axe X et $r_P = \sqrt{x_P^2 + y_P^2}$ la distance du point P à l'axe optique. Les fonctions I_n définies par :

$$I_{0}(r_{P}) = \int_{0}^{\theta_{obj}} \sqrt{\cos\theta} \sin\theta (1 + \cos\theta) J_{0} \left(\frac{2\pi n}{\lambda} r_{P} \sin\theta\right) d\theta$$

$$I_{1}(r_{P}) = \int_{0}^{\theta_{obj}} \sqrt{\cos\theta} \sin^{2}\theta J_{1} \left(\frac{2\pi n}{\lambda} r_{P} \sin\theta\right) d\theta$$

$$I_{2}(r_{P}) = \int_{0}^{\theta_{obj}} \sqrt{\cos\theta} \sin\theta (1 - \cos\theta) J_{2} \left(\frac{2\pi n}{\lambda} r_{P} \sin\theta\right) d\theta$$
(2.3)

dépendent du demi-angle d'ouverture de l'objectif θ_{obj} et de la longueur d'onde. La figure 2.5 représente les rapports I_2/I_0 et I_1/I_0 en fonction de r_P , avec $\theta_{obj} = 69^\circ$ et $\lambda = 987$ nm. Les valeurs numériques obtenues montrent que l'on peut négliger I_1 et I_2 devant I_0 lorsque $r_P < 250$ nm. En tenant compte du profil gaussien du faisceau laser, cela conduit à une erreur inférieure à 10 %.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales où le diamètre du faisceau dans le plan de focalisation est de l'ordre de 300 nm, le terme I_2 est toujours négligeable. On a donc $E_{0Y} \approx 0$.

Pour simplifier l'analyse en polarisation des signaux de FDP et de GSH, on négligera également la composante longitudinale E_{0z} du champ excitateur, qui n'est rigoureusement nulle qu'au point focal. On négligera également le déphasage de Gouy. La plupart des échantillons étudiés ont en effet des épaisseurs très petites devant la longueur d'onde du faisceau incident. Ce n'est en revanche pas le cas des cristaux millimétriques et les différences que l'on observera entre les données expérimentales et la modélisation théorique pourront certainement s'expliquer par cette hypothèse trop simpliste.

Le fait d'avoir E_{0Y} et E_{0Z} nuls au point de focalisation lorsque le champ électrique est polarisé parallèlement à l'axe X avant l'objectif, nous indique finalement que la polarisation du faisceau avant l'objectif et au point de focalisation sont identiques. Nous allons ainsi écrire le champ électrique excitateur au niveau du volume d'interaction sous la forme :

$$\vec{E}(\Phi,t) = E \begin{bmatrix} \cos(\Phi)\cos(\omega t) \\ \sin(\Phi)\cos(\omega t) \\ 0 \end{bmatrix}, \qquad (2.4)$$



FIG. 2.5 – Graphiques représentant les fonctions I_1/I_0 (a) et I_2/I_0 (b) en fonction de r_P avec $\theta_{obj} = 69^\circ$ et $\lambda = 987$ nm.

où E représente l'amplitude du champ incident, ω la pulsation et Φ l'angle donnant la direction de la polarisation incidente par rapport à l'axe X.

Dans la section suivante, nous allons calibrer expérimentalement la polarisation du faisceau incident. Il sera pour cela nécessaire d'introduire deux paramètres expérimentaux supplémentaires, qui interviendront de façon importante dans la modélisation des signaux lumineux détectés sur les deux voies d'analyse en polarisation.

2.3 Analyse en polarisation d'un ensemble isotrope de molécules fluorescentes

Nous allons nous intéresser ici à la réponse en polarisation d'un ensemble de molécules fluorescentes, orientées aléatoirement dans une couche de polymère. Nous verrons que pour effectuer une modélisation correcte des signaux détectés, il est nécessaire d'inclure l'ellipticité introduite par le miroir dichroïque, l'effet de l'objectif de microscope sur la polarisation des signaux et des effets physiques tels que l'angle existant entre dipôle d'absorption et dipôle d'émission ainsi que le transfert d'énergie intermoléculaire.

2.3.1 Échantillon étudié

Nous avons étudié un échantillon comportant des molécules fluorescentes de 4-dicyanométhylène-2-méthyl-6- $(p-(\dim ethylamino)styryl)-4H$ -pyrane (DCM) dispersées dans une matrice de polymère, le polyméthyl-métacrylate (PMMA), dont la température de transition vitreuse T_g est de 120°C. La formule chimique de la molécule de DCM est représentée sur la figure 2.6.



FIG. 2.6 – (a) Formule développée de la molécule de 4-dicyanométhylène-2-méthyl-6-(p-(diméthylamino)styryl)-4H-pyrane (DCM). (b) Spectre d'absorption et spectre d'émission de la fluorescence à deux photons, obtenu avec un échantillon contenant des molécules de DCM dispersées dans une matrice de PMMA (concentration massique: 0,05 %). Le spectre d'émission a été obtenu avec un faisceau infrarouge incident de puissance moyenne de 950 μW à 987 nm.

L'échantillon utilisé est obtenu à partir d'une solution d'anisole et de PMMA (10 % en masse), dans laquelle on a dissout des molécules de DCM (concentration massique : 10 % par rapport au polymère). La couche de polymère dopée en DCM est déposée sur une lamelle de microscope par centrifugation, le solvant s'évaporant lors du dépôt. Ce dernier a été effectué à la vitesse de 2000 tours/min pendant 20 s, de façon à obtenir une couche dont l'épaisseur est d'environ 1 μ m. Après dépôt, cette épaisseur peut être contrôlée au moyen d'un profilomètre.

2.3.2 Réponse en polarisation

Nous avons enregistré les signaux de fluorescence émis par cet échantillon dans les états de polarisation X et Y, en faisant tourner la direction de polarisation du faisceau infrarouge incident. D'une façon générale, nous présenterons les intensités détectées \mathcal{I}_X et \mathcal{I}_Y en fonction de l'angle Φ , donnant l'orientation de la polarisation incidente par rapport à l'axe X, sous la forme d'un diagramme polaire. Les signaux obtenus expérimentalement sont présentés sur la figure 2.7. On obtient des diagrammes à quatre lobes dans les deux états de polarisation. La structure à quatre lobes qui en résulte pour la fluorescence totale apparaît cependant contradictoire avec une distribution isotrope des molécules fluorescentes. On s'attendrait en effet à une intensité indépendante de la polarisation incidente.



FIG. 2.7 – Diagrammes polaires donnant l'intensité de fluorescence à deux photons en fonction de la direction de la polarisation du faisceau incident, repérée par l'angle Φ variant de 0° à 360°. Les axes X et Y, pris conventionnellement selon l'horizontale et la verticale, ne seront pas systématiquement représentés par la suite. Les signaux ont été obtenus avec un échantillon de DCM/PMMA de concentration massique 10 %, avec un faisceau incident de 200 μ W à 987 nm. Le temps d'intégration est de 100 ms par point : le chiffre donné en bas de chaque graphe correspond au nombre de photons détectés durant ce temps d'intégration. (a) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $X : \mathcal{I}_X$ (b) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $X : \mathcal{I}_X$ (b) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $X : \mathcal{I}_X$ (b) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $X : \mathcal{I}_X$ (b) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $X : \mathcal{I}_X$ (b) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $X : \mathcal{I}_X$ (b) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $X : \mathcal{I}_X$ (b) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $X : \mathcal{I}_X$ (b) Fluorescence détectée dans l'état de polarisation $Y : \mathcal{I}_Y$ (c) Fluorescence totale : \mathcal{I}_X + \mathcal{I}_Y .

2.3.3 Modèle de l'émission de fluorescence

Pour analyser les diagrammes polaires expérimentaux obtenus précédemment, il est nécessaire de prendre en compte l'orientation des molécules fluorescentes constituant l'échantillon. Nous allons supposer que l'absorption et la fluorescence de chaque molécule sont associées à un même moment dipolaire de transition $\vec{\mu}$, dont l'orientation est donnée par deux angles $\Omega = (\theta, \phi)$ définis par rapport au repère macroscopique (X,Y,Z) (figure 2.8). Nous supposes ainsi implicitement que les dipôles d'absorption et d'émission de la molécule sont identiques, hypothèse sur laquelle nous reviendrons dans la suite. Les molécules de DCM étant dispersées dans un milieu polymère, leur orientation est de nature statistique. La fonction de distribution orientationnelle des molécules $f(\Omega)$ étant isotrope, elle est égale à $1/4\pi$, une fois normalisée. On a vu que l'intensité de fluorescence à deux photons émise suivant la direction d'analyse \vec{u}_I est le produit d'une probabilité d'absorption de deux photons $|\vec{\mu} \cdot \vec{E}|^4$ par la probabilité d'émission $|\vec{\mu} \cdot \vec{u}_{l}|^{2}$ (cf. chapitre 1). Du fait du caractère incohérent de l'émission de fluorescence, l'intensité totale détectée dans les états de polarisation I = X, Y s'obtient par intégration sur toutes les orientations moléculaires possibles, des intensités émises individuellement par les molécules:

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Phi) = \frac{1}{4\pi} \int \overline{|\vec{\mu}(\Omega) \cdot \vec{E}(\Phi, t)|^{4}} \, |\vec{\mu}(\Omega) \cdot \vec{u}_{I}|^{2} \mathrm{d}\Omega$$
(2.5)



FIG. 2.8 – Définition des angles (θ, ϕ) et (u, v) donnant l'orientation du moment dipolaire $\vec{\mu}$ d'une molécule et du vecteur d'onde \vec{k} du champ émis par fluorescence.

avec $d\Omega = \sin\theta \, d\theta \, d\phi$. (...) représente la moyenne temporelle effectuée lors de la détection des signaux optiques. Développons l'expression (2.5) en fonction des composantes du champ incident et des composantes du moment dipolaire $\vec{\mu}$ dans le repère (X,Y,Z):

$$\vec{\mu}(\theta,\phi) = \begin{bmatrix} \sin\theta\cos\phi\\ \sin\theta\sin\phi\\ \cos\theta \end{bmatrix}.$$
(2.6)

On obtient:

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Phi) = \frac{1}{4\pi} \int \overline{[\mu_{X}(\Omega) \cdot E_{X}(\Phi,t) + \mu_{Y}(\Omega) \cdot E_{Y}(\Phi,t)]^{4}} \mu_{I}^{2}(\Omega) d\Omega$$

$$= \frac{1}{4\pi} \int \mu_{I}^{2}(\Omega) \mu_{X}^{4}(\Omega) d\Omega \quad \overline{E_{X}^{4}}(\Phi)$$

$$+ \frac{1}{4\pi} \int \mu_{I}^{2}(\Omega) \mu_{Y}^{4}(\Omega) d\Omega \quad \overline{E_{Y}^{4}}(\Phi)$$

$$+ \frac{6}{4\pi} \int \mu_{I}^{2}(\Omega) \mu_{X}^{2}(\Omega) \mu_{Y}^{2}(\Omega) d\Omega \quad \overline{E_{X}^{2}E_{Y}^{2}}(\Phi)$$

$$+ \frac{1}{\pi} \int \mu_{I}^{2}(\Omega) \mu_{X}^{3}(\Omega) \mu_{Y}(\Omega) d\Omega \quad \overline{E_{X}^{3}E_{Y}}(\Phi)$$

$$+ \frac{1}{\pi} \int \mu_{I}^{2}(\Omega) \mu_{X}(\Omega) \mu_{Y}^{3}(\Omega) d\Omega \quad \overline{E_{X}E_{Y}^{3}}(\Phi).$$
(2.7)

La figure 2.9 représente les intensités $\mathcal{I}_X^{\text{Fluo}}$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{Fluo}}$ calculées avec l'équation (2.7), en fonction de l'angle Φ . Ces diagrammes polaires sont calculés et tracés avec le logiciel MATHCAD.

L'interprétation des diagrammes polaires ainsi obtenus est transparente. Avec une distribution orientationnelle isotrope, la fluorescence totale émise est effectivement in-



FIG. 2.9 – Diagrammes polaires représentant les intensités de fluorescence en fonction de Φ donnant la direction de la polarisation incidente. Ces intensités ont été calculées avec l'équation (2.7), pour une distribution orientationnelle isotrope. (a-b) Intensités de fluorescence dans les états de polarisation X et Y. (c) Intensité de fluorescence totale $\mathcal{I}_X^{Fluo} + \mathcal{I}_Y^{Fluo}$: le diagramme obtenu montre que la fluorescence totale émise est indépendante de Φ avec une distribution orientationnelle isotrope.

dépendante de la direction de la polarisation incidente (figure 2.9c). De plus, la photosélection qui a lieu lors de l'excitation des molécules, fait que l'intensité de fluorescence émise dans l'état de polarisation X (resp. Y) est plus importante lorsque la polarisation incidente est parallèle à l'axe X (resp. Y). On obtient donc pour $\mathcal{I}_X^{\text{Fluo}}$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{Fluo}}$ des structures à deux lobes orientés suivant les axes X et Y.

Les diagrammes polaires théoriques sont cependant très différents de ceux obtenus expérimentalement : la structure à quatre lobes de la figure 2.7c représentant la fluorescence totale détectée, traduit le fait que la polarisation incidente n'est pas rigoureusement rectiligne. Il est donc nécessaire de corriger l'expression de la polarisation du champ incident. De plus, les figures 2.7a et 2.7b comportent des lobes latéraux supplémentaires par rapport aux figures 2.9a et 2.9b : cela suggère qu'il apparaît un effet de dépolarisation des signaux lumineux émis. Il est donc nécessaire de compléter le modèle en considérant également l'effet de l'objectif de grande ouverture numérique, sur la polarisation de la lumière émise. Nous montrerons que d'autres effets doivent également être pris en compte, pour aboutir à une modélisation correcte des diagrammes polaires expérimentaux.

2.3.4 Calibration de la polarisation incidente

Écrivons la polarisation du champ incident sous la forme :

$$\vec{E}(\Phi,\varepsilon,\delta,t) = \frac{E}{\sqrt{1+(1-\delta)^2}} \begin{bmatrix} \cos(\Phi)\cos(\omega t) \\ (1-\delta)\sin(\Phi)\cos(\omega t+\varepsilon) \\ 0 \end{bmatrix}.$$
 (2.8)

Dans cette expression, Φ représente toujours la direction de la polarisation du faisceau laser. Les deux paramètres supplémentaires, l'ellipticité ε et le dichroïsme δ entre les deux voies rendent compte de la perturbation du miroir dichroïque sur la polarisation incidente, lors de la réflexion du faisceau infrarouge à l'entrée du microscope. Cette



FIG. 2.10 – Diagrammes polaires représentant les intensités de fluorescence en fonction de la direction de la polarisation incidente Φ . Ces intensités ont été calculées avec l'équation (2.7) pour une distribution orientationnelle isotrope, avec $\delta = 0,02$ et ε variable. En continu : $\varepsilon = 0$ rad. En pointillés : $\varepsilon = 0,7$ rad. En tirets : $\varepsilon = 1,5$ rad. (a-b) Intensités de fluorescence dans les états de polarisation X et Y. (c) Intensité de fluorescence totale $\mathcal{I}_X^{Fluo} + \mathcal{I}_Y^{Fluo}$: la fluorescence totale émise n'est plus indépendante de Φ . On obtient une structure à quatre lobes, qui est d'autant plus marquée que l'ellipticité ε est grande.

réflexion se fait en effet à 45° et le miroir dichroïque introduit un facteur de réflexion et un déphasage différents pour les deux états de polarisation p(X) et s(Y). Remarquons que seuls, les signaux détectés avec des polarisations d'excitation intermédiaires entre les axes X et Y sont affectés par l'ellipticité. Ceci permet d'expliquer la structure à quatre lobes de la figure 2.10c, représentant la fluorescence totale émise en fonction de l'angle Φ , pour différentes valeurs de l'ellipticité ε . En effet, pour les polarisations intermédiaires, l'excitation des molécules est moins efficace, l'effet étant maximal lorsque $\Phi = 45^{\circ}$. Nous avons vérifié expérimentalement, à l'aide d'une caméra infrarouge et d'un polariseur, que la polarisation du faisceau incident après le miroir dichroïque est bien rectiligne lorsque $\Phi = 0^{\circ}$ ou 90°, conformément à la modélisation du champ par l'expression (2.8). Les valeurs de ε et δ sont déterminées en ajustant le diagramme de la figure 2.7c donnant l'intensité totale de fluorescence. Le meilleur ajustement est obtenu avec $\varepsilon = 1,14$ rad et $\delta = 0,02$ (figure 2.11). Ces deux paramètres peuvent également



FIG. 2.11 – Détermination expérimentale de ε et δ par ajustement de la fonction $[\mathcal{I}_X^{Fluo} + \mathcal{I}_Y^{Fluo}](\Phi,\varepsilon,\delta)$ calculée avec l'équation (2.7) au diagramme expérimental de la figure 2.7c. On obtient $\varepsilon = 1,14$ rad et $\delta = 0,02$.

être mesurés séparément. Le spectre en réflexion du miroir dichroïque de la figure 2.2 donne les facteurs de réflexion R_s et R_p dans les deux états de polarisation s et p. À 987 nm, on a $R_s = 97,55$ % et $R_p = 99,97$ % d'où $\delta = 1 - \sqrt{R_s/R_p} = 0,012^2$. L'ellipticité ε peut être déterminée à partir de mesures ellipsométriques. Celles-ci sont développées dans l'annexe B, page 171.

Nous avons ainsi affiné l'expression de la polarisation du faisceau incident, qui joue un rôle très important dans la réponse en polarisation des signaux lumineux détectés. On notera cependant que le paramètre ε caractérisant l'ellipticité incidente a tendance à "amincir" les lobes des figures 2.10a et 2.10b. Il faut maintenant introduire les effets qui ont tendance au contraire à dépolariser la fluorescence, pour se rapprocher des structures à quatre lobes des figures 2.7a et 2.7b.

^{2.} Cette valeur est légèrement différente de celle obtenue à partir des diagrammes polaires expérimentaux. Cela peut s'expliquer par l'élargissement spectral introduit par les impulsions femtosecondes. De plus, les facteurs R_s et R_p ont été mesurés indirectement, à partir de mesures en transmission à 45° .

2.3.5 Effet de l'objectif de microscope sur la polarisation

Nous allons tout d'abord nous intéresser à l'effet de l'ouverture de l'objectif de microscope sur la polarisation des signaux de fluorescence. Il faut pour cela calculer le diagramme de rayonnement d'une molécule située au point de focalisation. L'amplitude réelle du champ lointain émis par le dipôle $\vec{\mu}(\theta,\phi)$ selon le vecteur d'onde $\vec{k}(u,v)$ est proportionnelle à :

$$\vec{\mathcal{E}}^{\,\text{émis}} = \vec{k} \wedge (\vec{\mu} \wedge \vec{k}). \tag{2.9}$$

En développant cette expression dans le repère macroscopique (X,Y,Z) avec (figure 2.8) :

$$\vec{k}(u,v) = \begin{bmatrix} \sin u \cos v \\ \sin u \sin v \\ \cos u \end{bmatrix}, \qquad (2.10)$$

on obtient:

$$\vec{\mathcal{E}}^{\text{ \acute{emis}}}(u,v,\theta,\phi) = \mu_X(\theta,\phi) \, \vec{U}_1(u,v) + \mu_Y(\theta,\phi) \, \vec{U}_2(u,v) + \mu_Z(\theta,\phi) \vec{U}_3(u,v), \tag{2.11}$$

où les vecteurs $\vec{U}_i(u,v)$ ne dépendent que des angles (u,v):

$$\vec{U}_{1}(u,v) = \begin{bmatrix} \sin^{2} u \sin^{2} v + \cos^{2} u \\ -\sin^{2} u \cos v \sin v \\ -\sin u \cos u \cos v \end{bmatrix}$$
$$\vec{U}_{2}(u,v) = \begin{bmatrix} -\sin^{2} u \sin v \cos v \\ \sin^{2} u \cos^{2} v + \cos^{2} u \\ -\sin u \cos u \sin v \end{bmatrix}$$
$$\vec{U}_{3}(u,v) = \begin{bmatrix} -\sin u \cos u \cos v \\ -\sin u \cos u \sin v \\ \sin^{2} u \end{bmatrix}.$$

L'objectif de microscope travaillant à l'infini, tout rayon incident dont la direction est selon le vecteur d'onde $\vec{k}(u,v)$ émerge de l'objectif parallèlement à l'axe optique Z. Comme le montre la figure 2.12, cet effet va affecter la polarisation du champ $\vec{\mathcal{E}}^{\text{ émis}}$. À partir de l'expression du champ rayonné par le dipôle $\vec{\mu}(\theta,\phi)$, on peut exprimer les composantes du champ $\vec{\mathcal{E}}^{\text{ transmis}}$ après l'objectif. La relation entre $\vec{\mathcal{E}}^{\text{ émis}}$ est donnée par l'équation [59] :

$$\vec{\mathcal{E}}^{\text{transmis}} = [\mathcal{R}] \, \vec{\mathcal{E}}^{\text{ émis}}.$$
(2.13)

Dans cette expression, la matrice $[\mathcal{R}]$ rend compte de l'effet de l'objectif travaillant à l'infini, sur les composantes du champ rayonné. Cette matrice est obtenue en faisant



FIG. 2.12 – Effet de l'objectif de microscope travaillant à l'infini. Le rayon lumineux dirigé selon la direction du vecteur d'onde $\vec{k}(u,v)$ et émis par le dipôle $\vec{\mu}$ situé au point focal objet, émerge de l'objectif parallèlement à l'axe optique.

le produit de trois matrices de rotation (rotation de -v autour de Z, rotation de -uautour de Y et rotation de v autour de Z):

$$\left[\mathcal{R}\right] = \begin{bmatrix} \cos u \, \cos^2 v + \sin^2 v & \cos v \, \sin v (\cos u - 1) & -\sin u \, \cos v \\ \cos v \, \sin v (\cos u - 1) & \cos u \, \sin^2 v + \cos^2 v & -\sin u \, \sin v \\ \sin u \, \cos v & \sin u \, \sin v & \cos u \end{bmatrix}.$$
(2.14)

Le vecteur $\vec{\mathcal{E}}^{\text{transmis}}$ peut donc se mettre sous la forme :

$$\vec{\mathcal{E}}_X^{\text{transmis}}(u,v,\theta,\phi) = f_X(u,v)\,\mu_X(\theta,\phi) + f_Y(u,v)\,\mu_Y(\theta,\phi) + f_Z(u,v)\,\mu_Z(\theta,\phi)$$
$$\vec{\mathcal{E}}_Y^{\text{transmis}}(u,v,\theta,\phi) = g_X(u,v)\,\mu_X(\theta,\phi) + g_Y(u,v)\,\mu_Y(\theta,\phi) + g_Z(u,v)\,\mu_Z(\theta,\phi), \quad (2.15)$$

où les fonctions f_X , f_Y , f_Z , g_X , g_Y et g_Z , déduites de (2.12) et (2.14), ne dépendent que des angles (u,v). Leur expression est donnée dans l'annexe C.1, page 173.

On va maintenant exprimer l'intensité lumineuse émise par le dipôle $\vec{\mu}(\theta,\phi)$ et détectée dans l'état de polarisation I = X, Y après l'objectif. Comme l'émission de fluorescence est un processus incohérent, il faut intégrer le carré des composantes du

champ $\vec{\mathcal{E}}^{\text{transmis}}$ sur les angles $(u,v)^3$:

$$J_{I=X,Y}(\theta,\phi) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_{\rm obj}} \left[\mathcal{E}_I^{\rm transmis}(u,v,\theta,\phi) \right]^2 \sin u \, \mathrm{d}u \, \mathrm{d}v.$$
(2.16)

Après intégration en prenant $\theta_{obj} = 1,204$ rad (69°), l'expression précédente se simplifie et s'écrit :

$$J_X(\theta,\phi) = K_1 \,\mu_X^2(\theta,\phi) + K_2 \,\mu_Y^2(\theta,\phi) + K_3 \,\mu_Z^2(\theta,\phi)$$

$$J_Y(\theta,\phi) = K_2 \,\mu_X^2(\theta,\phi) + K_1 \,\mu_Y^2(\theta,\phi) + K_3 \,\mu_Z^2(\theta,\phi)$$
(2.17)

avec:

$$K_{1} = \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{\theta_{obj}} f_{X}^{2}(u,v) \sin u \, du \, dv = \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{\theta_{obj}} g_{Y}^{2}(u,v) \sin u \, du \, dv = 2,945$$

$$K_{2} = \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{\theta_{obj}} f_{Y}^{2}(u,v) \sin u \, du \, dv = \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{\theta_{obj}} g_{X}^{2}(u,v) \sin u \, du \, dv = 0,069 \qquad (2.18)$$

$$K_{3} = \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{\theta_{obj}} f_{Z}^{2}(u,v) \sin u \, du \, dv = \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{\theta_{obj}} g_{Z}^{2}(u,v) \sin u \, du \, dv = 1,016.$$

L'expression (2.17) permet de comprendre l'effet de l'objectif sur les signaux émis. Non seulement, l'objectif introduit une légère dépolarisation (mélange des signaux émis dans les états de polarisation transverses X et Y), mais il collecte en plus une partie de la fluorescence émise selon la polarisation axiale Z, dans des proportions non négligeables. La fonction $J_I(\theta,\phi)$ correspond finalement à la probabilité de détection – et non plus d'émission – dans l'état de polarisation I, de la fluorescence émise par un dipôle $\vec{\mu}(\theta,\phi)$. On doit donc remplacer le terme $|\vec{\mu}.\vec{u}_I|^2 = \mu_I^2$ dans les équations (2.5) et (2.7) par $J_I(\theta,\phi)$. L'expression de l'intensité de fluorescence détectée suivant I s'écrit donc :

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Phi,\varepsilon,\delta) = \frac{1}{4\pi} \int \overline{|\vec{\mu}(\Omega) \cdot \vec{E}(\Phi,\varepsilon,\delta,t)|^4} J_I(\Omega) d\Omega.$$
(2.19)

Les diagrammes de la figure 2.13 représentent les intensités $\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Phi)$ calculées avec l'équation (2.19) en tenant compte de l'objectif, avec $\varepsilon = 1,14$ rad et $\delta = 0,02$. On voit que les structures à deux lobes ont bien tendance à s'élargir, avec l'apparition de lobes secondaires latéraux, visibles principalement sur $\mathcal{I}_{Y}^{\text{Fluo}}$. Cependant, l'effet n'est pas encore suffisamment marqué pour expliquer la structure à quatre lobes des figures 2.7a et 2.7b. Il faut donc chercher ailleurs la raison de la dépolarisation des signaux observée expérimentalement.

^{3.} Le diagramme de rayonnement est considéré ici comme une probabilité d'émission d'un photon dans la direction (u,v). Il y a alors deux interprétations possibles de cette formule. Soit on considère une seule molécule d'orientation (θ,ϕ) : le diagramme de rayonnement est alors entièrement décrit durant le temps d'intégration des détecteurs. Soit on considère un ensemble de molécules orientées dans la même direction et la mesure est effectuée à un instant t donné: le diagramme de rayonnement est alors entièrement décrit par l'ensemble des molécules. Ces deux interprétations sont équivalentes en vertu du théorème d'ergodicité.



FIG. 2.13 – Diagrammes polaires représentant les intensités de fluorescence en fonction de la direction de la polarisation incidente Φ . Ces intensités ont été calculées pour une distribution orientationnelle isotrope, avec $\delta = 0,02$ et $\varepsilon = 1,14$ rad, en tenant compte de l'objectif [en continu, équation (2.19)] ou non [en pointillés, équation (2.7)]. (ab) Intensités de fluorescence dans les états de polarisation X et Y. (c) Intensité de fluorescence totale $\mathcal{I}_X^{Fluo} + \mathcal{I}_Y^{Fluo}$.

2.3.6 Prise en compte de l'angle entre les dipôles d'absorption et d'émission

Une première idée émise pour expliquer les lobes latéraux de la figure 2.7, a été de revenir sur l'hypothèse selon laquelle les dipôles d'émission et d'absorption de la molécule de DCM sont identiques. En effet, les moments dipolaires d'absorption et d'émission peuvent différer car la structure de la molécule change entre l'état fondamental et l'état excité. S'il existe un angle entre les deux dipôles, les réponses en polarisation vont être modifiées et l'on va s'écarter de la structure à deux lobes obtenue précédemment. Dans cette partie, nous allons tout d'abord évaluer l'effet de cet angle sur les réponses en polarisation, puis nous déterminerons expérimentalement sa valeur par mesure d'anisotropie de fluorescence.

Modèle

Ecrivons l'expression de l'intensité de fluorescence détectée dans l'état de polarisation I, lorsque l'angle entre le dipôle d'absortion $\vec{\mu}_{abs}$ et le dipôle d'émission $\vec{\mu}_{em}$ est égal à ξ . Si la direction du dipôle d'émission est donnée par les angles d'Euler (θ, ϕ) , la probabilité de détection du rayonnement émis par $\vec{\mu}_{em}$ est toujours égale à :

$$J_X(\theta,\phi) = K_1 \,\mu_X^2(\theta,\phi) + K_2 \,\mu_Y^2(\theta,\phi) + K_3 \,\mu_Z^2(\theta,\phi)$$

$$J_Y(\theta,\phi) = K_2 \,\mu_X^2(\theta,\phi) + K_1 \,\mu_Y^2(\theta,\phi) + K_3 \,\mu_Z^2(\theta,\phi).$$
(2.20)

Exprimons maintenant les coordonées du vecteur $\vec{\mu}_{abs}$, qui interviennent dans la probabilité d'absorption à deux photons. Conformément à la figure 2.14, les coordonnées



FIG. 2.14 – Orientation des dipôles d'absortion et d'émission dans le repère macroscopique (X,Y,Z). $\vec{\mu}_{em}$ est repéré par les angles d'Euler (θ,ϕ) et constitue l'axe z du repère (x,y,z) associé à la molécule "bâtonnet". $\vec{\mu}_{abs}$ est repéré par les angles d'Euler (ξ,φ) dans le repère (x,y,z). Seul, l'angle ξ est fixé. Les autres angles peuvent prendre n'importe quelle valeur, dans le cas d'une distribution orientationnelle isotrope.

de ce vecteur dans le repère (x,y,z) sont données par les angles (ξ,φ) avec :

$$\vec{\mu}_{\rm abs} = \begin{bmatrix} \sin\xi\cos\varphi\\ \sin\xi\sin\varphi\\ \cos\xi \end{bmatrix}.$$
(2.21)

La matrice de passage du repère (x,y,z) au repère (X,Y,Z) s'écrit :

$$[\mathcal{M}]_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)} = \begin{bmatrix} \cos\theta\cos\phi & -\sin\phi & \sin\theta\cos\phi\\ \cos\theta\sin\phi & \cos\phi & \sin\theta\sin\phi\\ -\sin\theta & 0 & \cos\theta \end{bmatrix}, \quad (2.22)$$

ce qui permet d'exprimer les composantes μ_X^{abs} et μ_Y^{abs} en fonction de θ, ϕ, ξ et ϕ :

$$\mu_X^{\text{abs}}(\theta,\phi,\xi,\varphi) = \sin\xi\cos\varphi\cos\theta\cos\phi - \sin\xi\sin\varphi\sin\phi + \cos\xi\sin\theta\cos\phi \mu_Y^{\text{abs}}(\theta,\phi,\xi,\varphi) = \sin\xi\cos\varphi\cos\theta\sin\phi + \sin\xi\sin\varphi\cos\phi + \cos\xi\sin\theta\sin\phi.$$
(2.23)

Pour une fonction de distribution orientationnelle isotrope, les angles θ , ϕ et φ peuvent prendre des valeurs quelconques et l'expression de l'intensité détectée devient :

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Phi,\varepsilon,\delta,\xi) = \frac{1}{8\pi^{2}} \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{\pi} \overline{|\vec{\mu}_{\text{abs}}(\theta,\phi,\xi,\varphi) \cdot \vec{E}(\Phi,\varepsilon,\delta,t)|^{4}} J_{I}(\theta,\phi) \sin\theta \, \mathrm{d}\theta \mathrm{d}\phi \, \mathrm{d}\varphi.$$
(2.24)

Cette intensité dépend fortement de l'angle ξ , comme le montrent les diagrammes de la figure 2.15. Les signaux de fluorescence sont d'autant plus dépolarisés que l'angle



FIG. 2.15 – Diagrammes polaires représentant les intensités de fluorescence en fonction de la direction de la polarisation incidente Φ . Ces intensités ont été calculées avec l'équation (2.24) pour une distribution orientationnelle isotrope, avec $\delta = 0,02$ et $\varepsilon =$ 1,14 rad, en tenant compte de l'objectif et pour différentes valeurs de l'angle ξ entre les dipôles d'absorption et d'émission: $\xi = 0^{\circ}$ en continu, $\xi = 25^{\circ}$ en pointillés, $\xi = 50^{\circ}$ en tirets. (a-b) Intensités de fluorescence dans les états de polarisation X et Y. (c) Intensité de fluorescence totale $\mathcal{I}_X^{Fluo} + \mathcal{I}_Y^{Fluo}$.

 ξ est important : la base des lobes s'élargit pour former des structures à quatre lobes lorsque ξ atteint des valeurs élevées de l'ordre de 50°.

Détermination expérimentale de l'angle ξ par mesure d'anisotropie

Pour s'assurer que l'angle ξ est effectivement un des facteurs à l'origine de la dépolarisation de la fluorescence dans les signaux mesurés, nous avons déterminé expérimentalement sa valeur dans le cas de la molécule de DCM. Une valeur de cet angle peut être obtenue grâce à des mesures d'anisotropie de fluorescence à un photon, technique couramment employée par les chimistes et biologistes [60, 61]. Cette mesure a été effectuée sur le dispositif du Laboratoire de Photophysique et Photochimie Supra-moléculaires et Macromoléculaires à l'ENS de Cachan. En utilisant les notations de la



FIG. 2.16 – Principe de la mesure d'anisotropie de fluorescence à un photon: L'échantillon, constitué de molécules fluorescentes, est éclairé par un faisceau lumineux polarisé suivant l'axe Z et se propageant parallèlement à l'axe X. On mesure l'intensité lumineuse émise par l'échantillon dans la direction Y, dans les deux polarisations X et Z. Ces intensités, notées I_{\perp} et I_{\parallel} respectivement, permettent de calculer le paramètre d'anisotropie défini par l'équation (2.25). Cette mesure d'anisotropie peut être effectuée à différentes longueurs d'onde.

figure 2.16, le paramètre d'anisotropie de fluorescence est défini par :

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}.$$
(2.25)

Pour déterminer expérimentalement ce paramètre d'anisotropie, il faut que les molécules soient dissoutes dans un solvant très visqueux, de façon à limiter la diffusion rotationnelle. En pratique, nous avons dilué les molécules de DCM dans une solution de squalane dont la viscosité η est égale à $3,48 \times 10^{-2}$ kg·m⁻¹·s⁻¹ à 20°C [62]. On peut calculer le temps caractéristique de rotation, en évaluant le rapport :

$$\tau_{\rm c} = \frac{V_{\rm h}\eta}{k_{\rm B}T} \tag{2.26}$$

où $V_{\rm h}$ représente le volume hydraté de la molécule (4 × 10⁻²⁷ m³). On obtient alors :

$$\tau_{\rm c} \simeq \frac{4 \times 10^{-27} \times 3.48 \times 10^{-2}}{1.38 \times 10^{-23} \times 293} = 34 \,\rm{ns.}$$
(2.27)

Ce temps caractéristique est beaucoup plus grand que la durée de vie de l'état excité de la molécule de DCM $\tau_{\rm F} \simeq 3$ ns, si bien que l'on peut considérer que l'orientation de la molécule n'a pas changé entre l'excitation et l'émission. L'expression du paramètre d'anisotropie dépend alors uniquement de l'angle ξ selon⁴:

$$A = (3 \cos^2 \xi - 1)/5. \tag{2.28}$$

Lors de la mesure de l'anisotropie de fluorescence, il faut tenir compte des facteurs de transmission du monochromateur placé devant le détecteur. Ils sont en effet différents pour des signaux polarisés verticalement ou horizontalement. Ainsi, l'anisotropie est corrigée de cet effet expérimentalement en calculant [9]:

$$A = \frac{I_{\rm VV} - GI_{\rm VH}}{I_{\rm VV} + 2GI_{\rm VH}} \quad \text{avec} \quad G = \sqrt{\frac{I_{\rm VV} \times I_{\rm HV}}{I_{\rm VH} \times I_{\rm HH}}},\tag{2.29}$$

où $I_{\rm VH}$ correspond à l'intensité détectée dans la polarisation horizontale avec une excitation verticale (I_{\perp} sur la figure 2.16). Les mesures ont été effectuées à une longueur d'onde de détection de 550 nm avec une longueur d'onde d'excitation variable (figure 2.17a) ou à une longueur d'onde d'excitation de 460 nm et avec une longueur d'onde de détection variable (figure 2.17b). Dans les deux cas, on obtient une anisotro-



FIG. 2.17 – Courbes donnant les intensités I_{VV} et I_{VH} , le facteur G et l'anisotropie A en fonction de la longueur d'onde d'excitation (a) et d'émission (b).

^{4.} Lorsque la durée de vie de fluorescence $\tau_{\rm F}$ n'est plus négligeable devant le temps caractéristique de rotation $\tau_{\rm c}$, l'expression de l'anisotropie devient $A = (3 \cos^2 \xi - 1)/5(1 + \tau_{\rm F}/\tau_{\rm c})$.

pie A = 0,178, ce qui correspond à un angle $\xi = 37^{\circ}$. La valeur de cet angle ne suffit cependant pas à expliquer totalement la dépolarisation des signaux, comme le montre la figure 2.18.



FIG. 2.18 – Diagrammes polaires représentant les intensités de fluorescence en fonction de la direction de la polarisation incidente Φ . Ces intensités ont été calculées avec l'équation (2.24) pour une distribution orientationnelle isotrope, avec $\delta = 0,02$ et $\varepsilon =$ 1,14 rad, en tenant compte de l'objectif et avec un angle $\xi = 37^{\circ}$. (a-b) Intensités de fluorescence dans les états de polarisation X et Y. (c) Intensité de fluorescence totale $\mathcal{I}_X^{Fluo} + \mathcal{I}_Y^{Fluo}$.

2.3.7 Transfert d'énergie d'une molécule à l'autre

Une autre hypothèse pour expliquer la dépolarisation des signaux de fluorescence observée expérimentalement, est le transfert d'énergie qui peut se produire d'une molécule de DCM à l'autre. La concentration en colorant dans l'échantillon étudié est en effet de 10 % en masse dans le PMMA, ce qui correspond à des distances intermoléculaires de l'ordre de quelques dizaines d'Ångströms. Ce phénomène, étudié pour la première fois par FÖRSTER [63], correspond à un transfert d'énergie non radiatif d'un chromophore excité (appelé donneur) vers un autre chromophore (appelé accepteur), par l'intermédiaire d'un couplage intermoléculaire dipôle-dipôle. Un tel transfert est possible sur des distances inférieures à 100 Å, à condition que le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorbance de l'accepteur se recouvrent partiellement. Ce phénomène est par conséquent tout à fait envisageable dans le cas de notre échantillon.

Modèle du transfert

Le modèle présenté dans ce paragraphe reprend l'analyse classique de transfert d'énergie entre deux dipôles électriques, développé à partir de la référence [64]. L'efficacité



FIG. 2.19 – (a) Définition des grandeurs (r,ρ) permettant de calculer le champ $\vec{E_1}$ rayonné par le dipôle $\vec{\mu_1}$ au niveau du dipôle $\vec{\mu_2}$. (b) Orientation relative du dipôle $\vec{\mu_2}$ par rapport au dipôle $\vec{\mu_1}$ et définition des angles $(\theta_1, \phi_1, \rho, \psi, \theta_2, \phi_2)$.

du transfert d'énergie pouvant avoir lieu entre deux dipôles $\vec{\mu}_1$ et $\vec{\mu}_2$ dépend de la distance r qui les sépare et de leur orientation relative. En effet, l'énergie d'interaction entre ces deux dipôles $U_{\vec{\mu}_1 \rightarrow \vec{\mu}_2}$ s'écrit :

$$U_{\vec{\mu}_1 \to \vec{\mu}_2} = \vec{E}_1 \cdot \vec{\mu}_2 = \frac{\mu_1 \, \mu_2}{r^3} \big(2\cos\rho \, \hat{r} \cdot \hat{\mu}_2 + \sin\rho \, \hat{\rho} \cdot \hat{\mu}_2 \big), \tag{2.30}$$

où $\vec{E_1}$ correspond au champ électrique rayonné par le dipôle $\vec{\mu_1}$ au niveau du dipôle $\vec{\mu_2}$. L'angle ρ est l'angle formé par le dipôle $\vec{\mu_1}$ et le vecteur reliant les deux chromophores (figure 2.19a). Si l'orientation du dipôle accepteur $\vec{\mu_2}$ est défini dans le repère orthonormé $(\hat{r}, \hat{\rho}, \hat{\psi})$ par les angles d'Euler $\Omega_2 = (\theta_2, \phi_2)$, l'énergie d'interaction s'écrit :

$$U_{\vec{\mu}_1 \to \vec{\mu}_2} = \frac{\mu_1 \, \mu_2}{r^3} \Big(2\cos\rho \, \sin\theta_2 \cos\phi_2 + \sin\rho \, \sin\theta_2 \sin\phi_2 \Big). \tag{2.31}$$

Le taux de transfert $k_{\rm T}$ étant proportionnel à $U^2_{\vec{\mu}_1 \rightarrow \vec{\mu}_2}$, on a:

$$k_{\rm T} \propto \frac{\mu_1^2 \,\mu_2^2}{r^6} \kappa^2,$$
 (2.32)

où le facteur κ^2 dépend uniquement de l'orientation relative du dipôle $\vec{\mu}_2$ par rapport au dipôle $\vec{\mu}_1$ avec :

$$\kappa^2(\rho,\theta_2,\phi_2) = \left(2\cos\rho\,\sin\theta_2\cos\phi_2 + \sin\rho\,\sin\theta_2\sin\phi_2\right)^2.\tag{2.33}$$

On définit l'orientation du dipôle donneur $\vec{\mu}_1$ dans le repère macroscopique (X,Y,Z)par les angles d'Euler $\Omega_1 = (\theta_1, \phi_1)$, de sorte que la probabilité d'absorption à deux photons de la molécule s'écrit :

$$|\mu_{1x}(\theta_1,\phi_1) \cdot E_x + \mu_{1y}(\theta_1,\phi_1) \cdot E_y|^4.$$
(2.34)

Pour donner l'expression de la probabilité de détection de la fluorescence émise par le dipôle accepteur $\vec{\mu}_2$, il est nécessaire de calculer les coordonnées de ce vecteur dans le repère (X,Y,Z). Conformément à la figure 2.19b, ces coordonnées vont dépendre des angles $(\theta_2,\phi_2,\rho,\psi,\theta_1,\phi_1)$ puisque :

$$\begin{bmatrix} \mu_{2x} \\ \mu_{2y} \\ \mu_{2z} \end{bmatrix} = [\mathcal{M}]_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)} [\mathcal{M}]_{(\hat{r},\hat{\rho},\hat{\psi})\to(x,y,z)} \begin{bmatrix} \sin\theta_2\cos\phi_2 \\ \sin\theta_2\sin\phi_2 \\ \cos\theta_2 \end{bmatrix}, \quad (2.35)$$

où $[\mathcal{M}]_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)}$ représente la matrice de passage du repère (x,y,z) au repère (X,Y,Z)et $[\mathcal{M}]_{(\hat{r},\hat{\rho},\hat{\psi})\to(x,y,z)}$ la matrice de passage du repère $(\hat{r},\hat{\rho},\hat{\psi})$ au repère (x,y,z). On a ainsi :

$$[\mathcal{M}]_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)} = \begin{bmatrix} \cos\theta_1 \cos\phi_1 & -\sin\phi_1 & \sin\theta_1 \cos\phi_1 \\ \cos\theta_1 \sin\phi_1 & \cos\phi_1 & \sin\theta_1 \sin\phi_1 \\ -\sin\theta_1 & 0 & \cos\theta_1 \end{bmatrix}$$
(2.36)

 et

$$\left[\mathcal{M}\right]_{(\hat{r},\hat{\rho},\hat{\psi})\to(x,y,z)} = \begin{bmatrix} \sin\rho\cos\psi & \cos\rho\cos\psi & -\sin\psi\\ \sin\rho\sin\psi & \cos\rho\sin\psi & \cos\psi\\ \cos\rho & -\sin\rho & 0 \end{bmatrix}.$$
 (2.37)

Par conséquent, la probabilité de détection de la fluorescence émise par le dipôle $\vec{\mu_2}$ s'écrit :

$$J_X(\theta_2,\phi_2,\rho,\psi,\theta_1,\phi_1) = K_1 \,\mu_{2x}^2 + K_2 \,\mu_{2y}^2 + K_3 \,\mu_{2z}^2$$

$$J_Y(\theta_2,\phi_2,\rho,\psi,\theta_1,\phi_1) = K_2 \,\mu_{2x}^2 + K_1 \,\mu_{2y}^2 + K_3 \,\mu_{2z}^2.$$
(2.38)

On peut maintenant exprimer l'intensité de fluorescence détectée dans la polarisation I, en présence de transfert :

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Phi,\varepsilon,\delta,\xi,\mathbf{T}) = \mathcal{I}_{I}^{\text{direct}}(\Phi,\varepsilon,\delta,\xi) + \mathbf{T}\,\mathcal{I}_{I}^{\text{transfert}}(\Phi,\varepsilon,\delta).$$
(2.39)

Dans cette expression, $\mathcal{I}_{I}^{\text{direct}}$ est donnée par l'équation (2.24) et $\mathcal{I}_{I}^{\text{transfert}}$ s'écrit:

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{transfert}}(\Phi,\varepsilon,\delta) = \iiint \overline{|\vec{\mu_{1}}(\Omega_{1}) \cdot \vec{E}|^{4}} \, \kappa^{2}(\rho,\theta_{2},\phi_{2}) \, J_{I}(\Omega_{2},\Omega',\Omega_{1}) f(\Omega_{1}) f(\Omega_{2}) \mathrm{d}\Omega_{1} \mathrm{d}\Omega_{2} \mathrm{d}\Omega'$$

$$(2.40)$$

avec $\Omega' = (\rho, \psi).$

Il s'agit ici d'un modèle très simplifié dans lequel on considère que le transfert d'énergie intermoléculaire n'a lieu qu'entre plus proches voisins (le paramètre r est donc fixé pour chaque échantillon) et l'on néglige les transferts d'énergie secondaires. Le facteur **T** est donc proportionnel à $1/r^6$ et rend compte de l'efficacité du transfert étant donnée la distance intermoléculaire r. L'orientation relative des molécules est quant à elle prise en compte dans l'équation (2.40). Dans cette expression on suppose que la fonction de distribution orientationnelle des accepteurs est isotrope. En effet, on considère dans un premier temps l'ensemble des donneurs ayant une orientation Ω_1 fixée. Chacun de ces donneurs va exciter une molécule d'orientation $(\theta_2, \phi_2, \rho, \psi, \theta_1, \phi_1)$ avec une efficacité proportionnelle à $\kappa^2(\rho,\theta_2,\phi_2)$, la distance r étant fixée par la concentration de l'échantillon. L'intensité de fluorescence émise après transfert correspond alors à la somme incohérente de la fluorescence émise par toutes ces molécules affecté du coefficient κ^2 , d'où l'intégration sur les angles Ω_2 et Ω' avec $f(\Omega_2)$ isotrope (description statistique). On calcule ensuite la fluorescence totale émise après transfert en considérant l'ensemble des donneurs contenus dans le volume d'interaction par intégration sur toutes les orientations Ω_1 , avec $f(\Omega_1)$ isotrope.

Ce modèle est phénoménologique et n'a pas pour objectif de quantifier le taux de transfert exact dans l'échantillon. Il est par contre suffisant pour interpréter de façon satisfaisante nos résultats expérimentaux.

Remarquons que dans l'expression (2.40), on ne tient pas compte de l'angle ξ entre les dipôles d'absorption et d'émission. Le phénomène de transfert d'énergie est en effet majoritairement responsable de la très forte dépolarisation de la fluorescence émise, comme le montre la figure 2.20.

Influence de la distance intermoléculaire

Pour valider l'hypothèse de transfert d'énergie entre chromophores, nous avons étudié des échantillons de concentrations différentes (10 %, 0,83 %, 0,085 % et 0,022 % en masse dans le PMMA), de façon à faire varier la distance intermoléculaire r et par conséquent le facteur **T**. Les diagrammes expérimentaux, représentés sur la figure 2.21, montrent qu'effectivement la structure à quatre lobes tend vers une structure à deux lobes, orientés suivant l'axe de détection, lorsque l'on diminue fortement la concentration de l'échantillon.

Les ajustements, effectués à partir de l'équation (2.39) en tenant compte de l'ouverture numérique de l'objectif, pour une distribution orientationnelle isotrope, avec



FIG. 2.20 – Diagrammes polaires représentant $\mathcal{I}_X^{\text{transfert}}(a)$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{transfert}}(b)$ en fonction de la direction de la polarisation incidente Φ . Ces intensités ont été calculées avec l'équation (2.40) pour une distribution orientationnelle isotrope, avec $\delta = 0,02$, $\varepsilon =$ 1,14 rad et en tenant compte de l'ouverture de l'objectif.

 $\varepsilon = 1,14$ rad, $\delta = 0,02$ et $\xi = 30^{\circ 5}$, permettent l'évaluation du facteur **T** en fonction de la concentration. Pour vérifier que **T** suit bien une loi en $1/r^6$, il est nécessaire d'estimer la distance intermoléculaire r à partir de la concentration massique dans le polymère. Si l'on considère que chaque chromophore occupe un volume égal à $4/3\pi R^3$, alors r = 2R. La distance R, déterminée en faisant le rapport entre le volume de polymère et le nombre de molécules de DCM contenues dans ce volume est telle que :

$$\frac{4}{3}\pi R^3 = \frac{V_{\rm PMMA}}{n_{\rm DCM}} = \frac{M_{\rm DCM}}{cd\mathcal{N}},\tag{2.41}$$

où c représente le pourcentage massique des chromophores par rapport au polymère, d = 1,18 la densité du PMMA, $M_{\text{DCM}} = 303,36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ la masse molaire du DCM et \mathcal{N} le nombre d'Avogadro. Les résultats numériques obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

^{5.} Cette valeur, déterminée avec l'échantillon de plus faible concentration, est légèrement inférieure à la valeur obtenue par mesure d'anisotropie à un photon en solution. En effet les molécules de DCM se trouvent maintenant dans un milieu polymère et on analyse la fluorescence à deux photons.



FIG. 2.21 – Diagrammes polaires donnant l'intensité de fluorescence à deux photons, détectée dans l'état de polarisation X (en gris foncé) et Y (en gris clair), en fonction de la direction de la polarisation du faisceau incident, repérée par l'angle Φ variant de 0° à 360°. Le temps d'intégration est de 100 ms par point. Les quatre diagrammes ont été obtenus avec des échantillons comportant des molécules de DCM de concentration massique variable dans le PMMA. (a) 10 % (b) 0,83 % (c) 0,085 % (d) 0,022 %. Les ajustements théoriques, en ligne continue, ont été calculés avec l'équation (2.39), pour une distribution orientationnelle isotrope, en tenant compte de l'ouverture de l'objectif, avec $\varepsilon = 1,14$ rad, $\delta = 0,02$, $\xi = 30^{\circ}$. Le facteur **T** est ajusté pour chaque concentration : (a) **T** = 0,9 (b) **T** = 0,09 (c) **T** = 10⁻⁵ (d) **T** = 10⁻⁸.

Pourcentage massique	Distance intermoléculaire	Facteur
c~(%)	$r \ (\mathrm{nm})$	\mathbf{T}
10	2	0,9
0,83	5	$0,\!09$
$0,\!085$	15	10^{-5}
0,022	40	10^{-8}

La figure 2.22 représente le facteur **T** en fonction de la distance intermoléculaire r et l'on voit qu'il suit effectivement une loi en $1/r^6$, conformément à une interaction dipôle-dipôle.



FIG. 2.22 – Représentation du facteur **T**, déduit des ajustements de la figure 2.21, en fonction de la distance intermoléculaire estimée à partir de la concentration massique, en échelle log-log. La courbe continue correspond à une loi en $1/r^6$.

2.4 Conclusion du chapitre 2

Dans ce montage de microscopie non-linéaire, nous avons pu interpréter la réponse en polarisation d'un échantillon comportant des molécules fluorescentes orientées de façon isotrope dans une matrice polymère (figure 2.23). Pour rendre compte des signaux expérimentaux, il a fallu en particulier considérer l'effet du miroir dichroïque sur la polarisation incidente et l'effet de la grande ouverture numérique de l'objectif de microscope sur la polarisation des signaux lumineux émis. Les deux effets sont à prendre en compte simultanément. Les facteurs déterminés expérimentalement (ε et δ) seront gardés pour la suite de nos études. Nous allons en effet utiliser cette calibration pour analyser d'autres échantillons.

Cette première analyse a également permis de mettre en évidence des phénomènes physiques tels que l'existence d'un angle entre les dipôles d'absorption et d'émission



FIG. 2.23 – Résumé des étapes de la modélisation permettant de rendre compte de la réponse en polarisation d'un ensemble isotrope de molécules fluorescentes.

associés à la molécule de DCM, et la possibilité d'un transfert d'énergie d'un fluorophore à l'autre, dont l'intensité est fonction de la concentration en colorant dans l'échantillon. La signature de ces effets sera particulièrement utile pour l'interprétation de données provenant d'objets nanométriques isolés, lesquels ne peuvent être étudiés par des techniques d'optique non-linéaire non résolues spatialement.

Chapitre 3

Orientation de molécules sous champ électrique

Dans le précédent chapitre, nous avons étudié la dépendance à la polarisation incidente de la fluorescence émise par des molécules insérées dans un film polymère avec une distribution orientationnelle isotrope. Il serait maintenant intéressant de voir si inversement, cette réponse en polarisation permet d'obtenir des informations sur l'orientation des molécules lorsque leur répartition cesse d'être isotrope. L'étude de matériaux non-linéaires d'ordre 2 apparaît de ce point de vue très séduisante. L'arrangement noncentrosymétrique des molécules qui les constituent, conduit à l'émission d'une onde harmonique et la réponse en polarisation moléculaire au sein du matériau. Nous allons en effet montrer que fluorescence à deux photons et génération du second harmonique sont sensibles à des ordres différents de la fonction de distribution orientationnelle des molécules.

D'une façon générale, on peut obtenir des arrangements non-centrosymétriques de molécules non-linéaires en réalisant des films de Langmuir-Blodgett [65, 66], par cristallisation¹ ou encore, en orientant des molécules placées dans un milieu polymère avec un champ électrique [67]. C'est cette dernière méthode d'orientation qui va nous intéresser ici. Dans ce cas, l'orientation des molécules peut à l'équilibre thermodynamique être décrite par une fonction de distribution de BOLTZMANN [68]. Ce type de système est d'autre part étudié depuis longtemps au LPQM, pour la fabrication de composants électro-optiques à base de polymères non-linéaires orientés [69]. Nous l'avons donc considéré comme un système modèle.

^{1.} Ce type de matériau sera étudié de manière approfondie dans les chapitres suivants.

Dans ce chapitre, nous allons présenter le procédé de fabrication des électrodes permettant l'application du champ électrique dans une couche de polymère déposée sur une lamelle de microscope. On comparera alors les réponses en polarisation de la FDP et de la GSH en jouant en particulier sur l'amplitude et l'orientation du champ électrique. Cette étude basée sur des mesures d'ensemble sera complétée en déterminant l'orientation de molécules uniques placées sous le même champ électrique. Le diagnostic sera alors fondé sur la détection de la fluorescence à un photon par microscopie confocale.

3.1 Application du champ électrique

3.1.1 Structure de l'échantillon

Le champ électrique statique est appliqué dans le plan de l'échantillon (X,Y) grâce à des électrodes disposées dans le plan de la lamelle de microscope (figure 3.1). Elles sont constituées d'or et sont distantes de 10 μ m. Leur épaisseur est de 50 nm environ de façon à réduire au maximun les risques de claquage. En effet, les petites imperfections qui peuvent être à l'origine d'arcs électriques, augmentent fortement avec l'épaisseur des électrodes. On peut ainsi appliquer une tension allant jusqu'à 300 V sans trop de risques de claquage, ce qui correspond à un champ électrique entre électrodes de 3×10^7 V/m.



FIG. 3.1 – Échantillon comportant les électrodes en or, déposées sur une lamelle de microscope par photolithographie. L'échantillon comporte 15 couples d'électrodes identiques. Celles-ci sont alternativement reliées aux points de contact électrique.

3.1.2 Procédé de fabrication des électrodes

L'objectif du microscope est configuré pour travailler avec une lamelle de microscope en verre d'épaisseur 0,17 mm. Un travail important a donc consisté à transposer la technique de photolithographie couramment utilisée au laboratoire, pour graver des structures de modulateurs électro-optiques sur des substrats de silicium [70], afin d'arriver à la structure d'électrodes sur la lamelle de verre.

Préparation de la lamelle et dépôt d'or

La lamelle de microscope est préalablement nettoyée à l'acétone, à l'éthanol puis à l'eau ultra-pure, avant d'être séchée sous flux d'azote. Il est nécessaire de déposer par centrifugation, une couche intermédiaire de polyméthyl-méthacrylate de 300 nm d'épaisseur, afin que l'or adhère au substrat. On recouvre alors le substrat d'une couche de 50 nm d'or, en utilisant un bâti à pulvérisation.

Formation des électrodes par photolithographie

Le principe de la photolithographie est de transférer sur le substrat, un motif dessiné au chrome sur une plaque de verre, appelée masque. Nous avons utilisé un masque qui était disponible au LPQM et qui comportait 15 couples d'électrodes transverses. Les différentes étapes conduisant à la formation des électrodes sont résumées sur la figure 3.2.

- Dans un premier temps, on dépose par centrifugation sur la couche d'or, une couche de résine photosensible Microposit S1813 (Shipley UK)², avant de la recuire en posant l'échantillon sur une plaque chauffante à 95°C pendant trois minutes.
- 2. À l'aide d'un aligneur, on vient plaquer le masque contre l'échantillon pour exposer la résine non recouverte par les motifs du masque, à un rayonnement ultraviolet calibré en puissance pendant une durée de 7 secondes. Le motif du masque est alors transféré sur la couche de résine, en attaquant chimiquement la partie qui a été exposée à la lumière ultraviolette. On plonge pour cela l'échantillon pendant une minute, dans un bain thermostaté (dilution au sixième du révélateur Microposit 351) et on le rince à l'eau ultra-pure.
- 3. À ce stade de la fabrication, la résine est restée intacte à l'emplacement des électrodes et constitue une couche de protection pour l'or. Ailleurs, l'or n'est plus

^{2.} Paramètres pour la centrifugation : vitesse = 4000 tours/min, accélération = 5000 tours/min/s, durée = 30 s


FIG. 3.2 – Étapes de fabrication des électrodes par photolithographie sur la melle de microscope.

protégé: on va pouvoir l'attaquer en trempant l'échantillon pendant 30 secondes dans une solution d'iodure de potassium diluée au quart. Après rinçage à l'eau ultra-pure, on peut observer au microscope le système d'électrodes en or.

4. Les électrodes sont encore recouvertes de résine, que l'on va éliminer en exposant à nouveau l'échantillon au rayonnement ultraviolet, puis en le trempant dans le bain révélateur. On rince alors l'échantillon avec de l'eau ultra-pure et on le sèche sous flux d'azote.

Attaque RIE (pour l'orientation de molécules uniques)

Après toutes ces opérations, la couche d'accrochage de PMMA est toujours présente. Elle devrait être transparente, mais on observe en pratique un fort signal de fluorescence, lorsque l'échantillon est analysé en microscopie confocale sous excitation à un photon³. Des molécules de résine doivent probablement s'incruster à la surface de la couche de polymère et ne sont pas éliminées par le bain révélateur. Ce signal de fluorescence est gênant lorsque l'on travaille en molécules uniques, car il masque complètement la fluorescence des molécules que l'on cherche à orienter. Une astuce pour éliminer la fluorescence parasite, consiste à attaquer la surface de la couche d'accrochage par un bombardement ionique. Cette dernière étape, appelée "attaque RIE" pour *Reactive Ion Etching*, est en revanche inutile lorsque l'on travaille sous excitation infrarouge, car la résine ne fluoresce pas dans ces conditions d'éclairement.

Réalisation des contacts électriques

Les électrodes en or vont être reliées à une alimentation haute tension, par l'intermédiaire de petits fils conducteurs fixés à l'échantillon avec de la laque d'argent. Une soudure à chaud risquerait en effet de briser la lamelle de microscope. Les petits fils ainsi fixés seront à leur tour soudés aux câbles de sortie de l'alimentation HT, au moment de l'installation de l'échantillon sur le microscope (figure 3.3).

Dépôt de polymère dopé en colorant

Une fois que la laque d'argent a bien séché, on peut déposer par centrifugation, une couche de polymère comportant les molécules optiquement actives. On ne peut réaliser ce dépôt avant d'avoir fixé les fils électriques, car les points de contact prévus pour la connexion aux électrodes seraient alors inaccessibles.

^{3.} On s'intéressera par la suite à l'orientation de molécules uniques (cf. paragraphe 3.3, page 69).



FIG. 3.3 – Installation de l'échantillon comportant les électrodes sur la platine de translation du microscope et connexion des fils conducteurs à l'alimentation HT.



FIG. 3.4 – Formule développée de la molécule de 4-(N-éthyl-N-(2-hydroxyéthyl))amino-4'-nitro-azobenzène (DR1).

3.1.3 Mise en œuvre

Nous avons étudié deux types d'échantillon, l'un comportant des molécules de DCM, l'autre des molécules de 4-(N-éthyl-N-(2-hydroxyéthyl))amino-4'-nitro-azobenzène (DR1), dispersées dans une matrice de PMMA (concentration massique de 5 %). Ces deux molécules comportent en effet un dipôle électrique permanent ($\mu_{0 \text{ DCM}} =$ 10,2 D [71] et $\mu_{0 \text{ DR1}} = 8,7$ D [72]) leur permettant de s'orienter parallèlement au champ électrique. Ce sont également des molécules non-linéaires avec des hyperpolarisabilités quadratiques importantes puisque $\beta_{\text{DCM}}^{(0)} = 63,3 \times 10^{-30}$ esu [71] et $\beta_{\text{DR1}}^{(0)} =$ $69,0 \times 10^{-30}$ esu [72]. En revanche, la molécule de DR1, représentée sur la figure 3.4, n'est pas fluorescente. En effet, du fait de la liaison diazoïque, elle peut accéder à des niveaux non radiatifs de photoisomérisation rapide [73].

Les solutions utilisées pour le dépôt étaient fortement concentrées en polymère (concentration massique de 5 %), de façon à bien recouvrir les électrodes et limiter ainsi les phénomènes de claquage. Après le dépôt, nous n'avons pas recuit les échantillons,



FIG. 3.5 - (a) Spectre émis par un échantillon comportant des molécules de DCM. Lorsque le champ est appliqué, il apparaît un pic de GSH à côté de la bande de fluorescence. (b) Modulation du signal de GSH émis par les molécules de DCM par l'application d'un champ électrique variable. (c) Spectre d'émission d'un échantillon comportant des molécules de DR1 : il n'apparaît qu'un pic de GSH lorsque le champ est appliqué. (d) GSH émise par les molécules de DR1 et modulée par le champ électrique. La puissance infrarouge incidente est de 4 mW pour une longueur d'onde de 987 nm.

pour favoriser l'orientation des molécules en présence de champ électrique. Le claquage est de ce fait rendu plus probable. Néanmoins, il a été possible d'appliquer un champ électrique allant jusqu'à 50 V/m sur quelques échantillons. Une fois le champ électrique établi, un pic de GSH apparaît dans le spectre des signaux détectés (figure 3.5a et 3.5c). Ce rayonnement est la preuve directe de l'orientation des molécules sous l'effet du champ électrique, qui est à l'origine de la non-centrosymétrie dans la distribution orientationnelle des molécules.

Les figures 3.5b et 3.5d montrent l'évolution de l'intensité de la GSH émise, lorsque l'amplitude du champ électrique qui induit l'orientation, est modulée par un signal créneau. La variation brutale des signaux de GSH traduit une grande mobilité des molécules dans le PMMA, malgré sa température de transition vitreuse relativement élevée ($T_{\rm g} = 120^{\circ}$ C). Cette grande mobilité vient du fait que les chromophores ont simplement été dispersés dans la matrice polymère non recuite [17]. Notre échantillon va ainsi nous permettre d'étudier le comportement des molécules sous champ électrique et constituera à ce titre un système "modèle" d'échantillon non-centrosymétrique⁴.

3.2 Analyse en polarisation d'un échantillon placé sous champ électrique

Nous allons maintenant étudier séparément la réponse en polarisation de la fluorescence à deux photons et de la GSH, lorsque l'orientation des molécules est caractérisée par une fonction de distribution statistique de BOLTZMANN. Nous allons voir en particulier que les diagrammes polaires associés aux deux types de rayonnement émis sont très différents et que la GSH est beaucoup plus sensible à l'orientation des molécules.

3.2.1 Fluorescence à deux photons

La figure 3.6 montre les variations des intensités $\mathcal{I}_X^{\text{Fluo}}$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{Fluo}}$ en fonction de la polarisation incidente, mesurées en sélectionnant spectralement le rayonnement de fluorescence émis par les molécules de DCM. On ne remarque pas de différence notable entre les différents diagrammes polaires lorsque l'on applique ou non un champ électrique. Ceci est confirmé par les diagrammes polaires théoriques, calculés pour différentes va-



FIG. 3.6 – Diagrammes polaires donnant les intensités de fluorescence \mathcal{I}_X^{Fluo} et \mathcal{I}_Y^{Fluo} en fonction de la polarisation incidente, lorsque $E_0 = 0$ (en noir) et $E_0 = 3 \times 10^7$ V/m (en gris) $(\vec{E}_0 / / \vec{u}_x)$.La puissance du faisceau incident était de 7 mW à 987 nm.

^{4.} Pour réaliser des composants optiques non-linéaires, on utilise au contraire des polymères greffés, de façon à augmenter la stabilité orientationnelle des molécules ainsi que leur concentration. De plus, le polymère greffé est soumis au champ électrique à une température supérieure à la température de transition vitreuse, puis il est refroidi à une température inférieure.

leurs du champ électrique \vec{E}_0 (figure 3.7). Ces diagrammes ont été traçés en évaluant l'expression :

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Phi,\varepsilon,\delta) = \int \overline{|\vec{\mu}(\Omega) \cdot \vec{E}(\Phi,\varepsilon,\delta,t)|^{4}} J_{I}(\Omega) f(\Omega) \,\mathrm{d}\Omega.$$
(3.1)

La fonction de distribution orientationnelle $f(\Omega)$ correspond ici à la fonction de distribution statistique de BOLTZMANN en présence du champ électrique \vec{E}_0 :

$$f(\Omega) = \frac{\exp(\vec{\mu}_0(\Omega) \cdot \vec{E}_0/k_{\rm B}T)}{\int \exp(\vec{\mu}_0(\Omega) \cdot \vec{E}_0/k_{\rm B}T) \,\mathrm{d}\Omega},\tag{3.2}$$

où $k_{\rm B}$ est la constante de BOLTZMANN, T la température égale à 293 K pour nos conditions expérimentales et $\vec{\mu}_0$ représente le moment dipolaire permanent de la molécule. Pour le calcul, on considère que les deux moments dipolaires $\vec{\mu}$ et $\vec{\mu}_0$ ont la même orientation définie par $\Omega = (\theta, \phi)$. On voit sur la figure 3.7 qu'il faudrait appliquer



FIG. 3.7 – Influence de l'amplitude du champ électrique $\vec{E_0}$, orienté parallèlement à l'axe X, sur la réponse en polarisation de la fluorescence à deux photons (en pointillés \mathcal{I}_X^{Fluo} , en continu \mathcal{I}_Y^{Fluo}). Les diagrammes polaires ont été calculés avec l'expression (3.1), sans tenir compte des effets de transfert d'énergie ni de l'angle existant entre les dipôles d'absorption et d'émission. Ils sont tracés à la même échelle. (a) Cas d'une fonction de distribution orientationnelle isotrope avec $E_0 = 0$. (b) Cas où $E_0 = 3 \times 10^7$ V/m, valeur correspondant à nos conditions expérimentales. (c) La présence du champ devient visible lorsque $E_0 = 3 \times 10^8$ V/m, soit une valeur du champ E_0 dix fois plus grande que celle que l'on peut appliquer expérimentalement, sans qu'il y ait un claquage entre les électrodes.

un champ de l'ordre de 3×10^8 V/m pour espérer voir un effet net sur la réponse en polarisation de la fluorescence. Nous sommes malheureusement limités par le claquage des électrodes, pour passer dans un régime où $|\vec{\mu}_0 \cdot \vec{E}_0| \sim k_{\rm B}T$. Ainsi, la faible sensibilité de la fluorescence à l'orientation des molécules vient du fait que l'on a seulement $|\vec{\mu}_0 \cdot \vec{E}_0| = 0.252 k_{\rm B}T$ avec nos conditions expérimentales, ce qui correspond à une fonction de distribution orientationnelle très large (figure 3.8).



FIG. 3.8 – Projection de la fonction de distribution statistique de BOLTZMANN, dans le plan (XY), calculée avec $\mu_0 = 10 D$ et $E_0 = 3 \times 10^7 V/m$ (soit $|\vec{\mu}_0 \cdot \vec{E}_0| = 0.252 k_B T$).

3.2.2 Génération du second harmonique

Nous allons montrer que la génération du second harmonique est, contrairement à la fluorescence à deux photons, très sensible à l'orientation des molécules. Nous avons pour cela choisi d'étudier un échantillon dopé en DR1, afin que les signaux de GSH ne soient pas noyés dans le fond de fluorescence comme dans le cas de la molécule de DCM. Les diagrammes polaires obtenus pour différentes orientations du champ électrique $\vec{E_0}$ sont présentés sur la figure 3.9.

Le modèle développé pour rendre compte des données expérimentales s'inspire de la Réf. [49], reliant hyperpolarisabilité moléculaire et susceptibilité macroscopique. La molécule de DR1 est une molécule de type bâtonnet (figure 3.4), si bien que la seule composante non-nulle du tenseur hyperpolarisabilité est la composante β_{333} où l'axe 3 est confondu avec l'axe de la molécule repéré par les angles $\Omega = (\theta, \phi)$. Les composantes du tenseur susceptibilité $\chi^{(2)}$, caractérisant les propriétés optiques non-linéaires macroscopiques de l'échantillon, sont reliées à l'hyperpolarisabilité β et à la fonction de distribution orientationnelle des molécules de DR1 par la relation :

$$\chi_{IJK}^{(2)}(2\omega;\omega,\omega) = N\beta_{333} \int \cos(3,I)\cos(3,J)\cos(3,K) f(\Omega) \,\mathrm{d}\Omega, \tag{3.3}$$

où N est le nombre de molécules non-linéaires par unité de volume (cf. équation (1.24), page 20). Les indices I, J, K se rapportent aux axes du repère macroscopique X, Y, Z. Le paramètre $\cos(3, I)$ correspond à la projection de l'axe 3 repérant la direction de la molécule bâtonnet, sur l'axe I. On peut raisonnablement négliger les facteurs de champ local $f_I(2\omega), f_J(\omega)$ et $f_K(\omega)$ car la concentration des molécules non-linéaires et l'amplitude du champ \vec{E}_0 sont relativement faibles [74]. On en déduit l'expression de



FIG. 3.9 – Signaux de génération du second harmonique \mathcal{I}_{X}^{GSH} (en gris foncé) et \mathcal{I}_{Y}^{GSH} (en gris clair) émis par un échantillon de DR1, en fonction de la polarisation incidente. La puissance infrarouge incidente était de 4 mW à 987 nm et le champ électrique appliqué avait une amplitude de 3×10^7 V/m. (a-b) \vec{E}_0 est orienté parallèlement à l'axe X. (c-d) \vec{E}_0 est orienté parallèlement à l'axe Y. (e) \vec{E}_0 est orienté suivant une direction intermédiaire, à 45° de l'axe X. Les courbes théoriques, en ligne continue, ont été calculées avec l'équation (C.9) et la fonction de distribution de BOLTZMANN (3.2), avec $\varepsilon = 1,14$ rad et $\delta = 0,02$.

la polarisation non-linéaire induite du second-ordre :

$$P_{I}^{(2)}(\Phi,\varepsilon,\delta,t) = \sum_{JK} \chi_{IJK}^{(2)}(2\omega;\omega,\omega) E_{J}(\Phi,\varepsilon,\delta,t) E_{K}(\Phi,\varepsilon,\delta,t).$$
(3.4)

Dans une première approximation, on peut considérer que l'intensité de GSH détectée est telle que (cf. chapitre 1):

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{GSH}}(\Phi,\varepsilon,\delta) \propto \overline{\left(P_{I}^{(2)}(\Phi,\varepsilon,\delta,t)\right)^{2}}.$$
 (3.5)

Cette expression peut être généralisée pour inclure les spécificités du montage (annexe C.2). Nous utiliserons par la suite l'expression (C.9) page 174, qui prend en compte notamment le demi-angle d'ouverture de l'objectif de microscope et le fait que la GSH est émise de façon cohérente. Cette expression permet de bien reproduire les données expérimentales de la figure 3.9. Le bon accord entre théorie et modélisation nous indique qu'il n'est pas nécessaire de prendre en compte des phénomènes de transfert d'énergie entre molécules dans la cas de la GSH. En effet, on est plus loin des résonances, donc l'effet de transfert d'excitation est beaucoup plus faible. De plus, ces phénomènes de transfert ont lieu à des échelles de temps de l'ordre de la durée de vie de l'état excité et donc supérieures au temps d'émission du second harmonique.

3.2.3 Bilan

L'expression (3.3) montre que le signal de GSH apparaît directement sur un fond nul, dès que la fonction de distribution $f(\Omega)$ devient non-centrosymétrique. C'est pourquoi il est possible de détecter une très légère modification de l'organisation moléculaire grâce au rayonnement de GSH. D'une façon générale, si on décompose la fonction de distribution orientationnelle en une somme de termes d'ordres pair et impair, le signal de GSH est relié aux termes d'ordre impair de la décomposition, tandis que la fluorescence à deux photons est sensible aux termes d'ordre pair, conformément à l'équation (3.1). L'étude simultanée des deux rayonnements permet ainsi d'obtenir des renseignements complémentaires sur les propriétés de symétrie du matériau considéré.

Dans le cas particulier où des molécules sont soumises à un champ électrique \vec{E}_0 , le développement limité de la fonction de distribution de BOLTZMANN :

$$f(\Omega) = \frac{1}{\int \exp(\vec{\mu}_0(\Omega) \cdot \vec{E}_0 / k_{\rm B}T) \,\mathrm{d}\Omega} \left[1 + \frac{\vec{\mu}_0(\Omega) \cdot \vec{E}_0}{k_{\rm B}T} + \frac{1}{2} \left(\frac{\vec{\mu}_0(\Omega) \cdot \vec{E}_0}{k_{\rm B}T} \right)^2 \right]$$
(3.6)

montre que la GSH est très sensible à l'orientation des molécules via le terme d'ordre 1 en \vec{E}_0 . Ce ne sera pas le cas de la fluorescence, tant que le terme d'ordre 2 en \vec{E}_0 sera négligeable devant le terme constant (qui correspond à une distribution isotrope). Le passage dans ce régime de "champ fort" a été malheureusement limité par les phénomènes de claquage au niveau de l'échantillon.

3.3 Étude à l'échelle de la molécule unique

Les mesures effectuées précédemment ont permis d'obtenir des renseignements sur la fonction de distribution orientationnelle des molécules à l'intérieur du polymère. Cette fonction de distribution est de nature statistique et ne renseigne pas sur l'orientation propre des molécules, dont on peut supposer qu'elle est fortement affectée par l'environnement local [75, 76]. La spectroscopie de molécules uniques permet de répondre à de nombreuses questions relatives aux comportements moléculaires qui seraient éventuellement cachés dans une mesure d'ensemble [77, 78]. En particulier, que est le comportement individuel de diffusion orientationnelle de molécules en l'absence de perturbation ou sous champ électrique? Des études récentes [79, 80] ont montré que dans un polymère de bas $T_{\rm g}$, les molécules suivaient individuellement des mouvements de fluctuation orientationnelle très similaires à ce qui avait été mesuré auparavant dans un ensemble de molécules. En particulier, les fluctuations observées en mesure d'ensemble ne sont pas dues à une moyenne de comportements hétérogènes, mais au fait que chaque molécule subit un comportement hétérogène dû à son environnement lui même hétérogène par diffusion dans les pores du polymère. Dans le cadre de notre étude, nous souhaitons obtenir le même type de renseignement sur le comportement de molécules sous champ électrique.

3.3.1 Montage expérimental

Le montage de microscopie confocale permettant de détecter la fluorescence à un photon émise par des molécules uniques, utilise le même microscope que celui auquel on a recours pour l'analyse en polarisation (figure 3.10). La source d'excitation est maintenant un laser à argon continu ($\lambda = 514$ nm), polarisé circulairement grâce à une lame quart-d'onde. Cet état de polarisation permet de s'affranchir de la photosélection : la probabilité d'excitation des molécules est ainsi indépendante de leur orientation dans le plan (X,Y). Le miroir dichroïque utilisé réfléchit le faisceau incident à 514 nm et transmet les signaux de fluorescence collectés par l'objectif. Le trou de confocalité qui est conjugué au plan de l'échantillon pour diminuer la profondeur de champ (cf. annexe A.3, page 169), a un diamètre de 50 μ m. Enfin, le cube polarisant permet de détecter simultanément la fluorescence émise dans les états de polarisation X et Y.

3.3.2 Échantillons étudiés

Les échantillons étudiés ont été obtenus à partir de solutions de chlorobenzène et de polymère (concentration massique 5 %), avec des molécules de 9-diéthylamino-5H-



FIG. 3.10 – Microscope confocal utilisé pour les expériences de molécules uniques. P : polariseur; $\lambda/4$: lame quart-d'onde permettant d'obtenir une polarisation circulaire; Obj: objectif de microscope à immersion dans l'huile ×60, ON = 1,4; MD : miroir dichroïque; L : lentille convergente; TC : trou de confocalité de diamètre 50 µm; FN : filtre notch supprimant les radiations résiduelles autour de 514 nm, issues du faisceau laser incident (laser argon continu); fo : fibre optique pour le filtrage spatial du mode; CP : cube polarisant permettant de séparer les signaux lumineux émis dans les deux états de polarisation X et Y; PDA1, PDA2 : photodiodes à avalanche fonctionnant en régime de comptage de photons.



benzo[alpha]phénoxazine-5-one (Nile Red) à la concentration de 8.4×10^{-14} mol·L⁻¹. Ce

FIG. 3.11 - (a) Formule développée de la molécule de 9-diéthylamino-5*H*benzo[alpha]phénoxazine-5-one (Nile Red). (b) Cartographie de la fluorescence obtenue avec un échantillon comportant des molécules de Nile Red. La puissance du laser Ar était de 2 μ W à 514 nm.

fluorophore comporte un moment dipolaire permanent de 7 D [81] permettant l'orientation sous champ électrique, ainsi qu'un rendement quantique de fluorescence de 0,7 [82]. La longueur d'onde d'absorption maximum est de 550 nm et l'émission de fluorescence se fait autour de 600 nm (figure 3.12). Nous avons choisi cette molécule car, contrairement à la molécule de DCM, elle est particulièrement stable, avec une probabilité nulle de photoisomérisation. Elle peut émettre de la fluorescence pendant plusieurs dizaines de secondes, avant d'être photodétruite, dans des conditions usuelles d'éclairement⁵. Les solutions ont été déposées par centrifugation⁶ sur des lamelles de microscope com-



FIG. 3.12 – Spectre d'absorption et d'émission de la molécule Nile Red. Ces courbes proviennent de la Réf. [83].

^{5.} La photodestruction qui reste un problème crucial dans les études de molécules uniques, est principalement due à la formation de radicaux par réaction avec l'oxygène diffusant dans le milieu.

portant des électrodes et préalablement nettoyées par attaque RIE. Plusieurs polymères de températures de transition vitreuse différentes, ont été employés afin de comparer le comportement des molécules lors de l'application du champ électrique:

- le poly(butylméthacrylate) $(T_{\rm g} = 15^{\circ} {\rm C});$
- le poly(butylméthacrylate-co-isobutylméthacrylate) $(T_g = 35^{\circ}C);$
- le PMMA ($T_{\rm g} = 120^{\circ}{\rm C}$).

3.3.3 Détermination de l'orientation des molécules et influence du champ électrique

À partir des intensités de fluorescence enregistrées au cours du temps sur les voies de détection X et Y, on peut calculer le paramètre de contraste de polarisation \mathcal{P} défini par :

$$\mathcal{P} = \frac{\mathcal{I}_{\parallel} - \mathcal{I}_{\perp}}{\mathcal{I}_{\parallel} + \mathcal{I}_{\perp}},\tag{3.7}$$

où \mathcal{I}_{\parallel} et \mathcal{I}_{\perp} correspondent aux intensités de fluorescence émises suivant les directions de polarisation parallèle et perpendiculaire au champ \vec{E}_0 respectivement. Si l'angle Θ donne la direction du dipôle d'émission de la molécule par rapport au champ \vec{E}_0 dans le plan (X,Y), alors on peut déterminer la valeur de Θ à partir du paramètre \mathcal{P} . En effet :

$$\mathcal{P} = \frac{\cos^2 \Theta - \sin^2 \Theta}{\cos^2 \Theta + \sin^2 \Theta} = \cos(2\Theta). \tag{3.8}$$

La figure 3.13 donne la séquence temporelle de trois molécules de Nile Red, ainsi que l'évolution de \mathcal{P} et Θ au cours du temps, lorsqu'un champ $E_0 = 3 \times 10^7$ V/m est appliqué. Les séquences temporelles sont caractéristiques de molécules uniques par l'arrêt soudain de l'émission par photoblanchiment. En effet, dans le cas d'une mesure d'ensemble, la décroissance du signal de fluorescence due au photoblanchiment a une allure exponentielle. On observe des comportement très distincts, qui montrent que l'orientation des molécules dépend énormément de son environnement. Certaines molécules conservent ainsi une orientation constante au cours du temps, tandis que d'autres oscillent entre deux orientations différentes. Remarquons que le phénomène de *blinking* (passage dans l'état triplet non radiatif) semble ne pas conduire à une modification de l'orientation de la molécule.

Pour mettre en évidence l'effet du champ électrique sur l'orientation des molécules uniques, nous avons représenté sous forme d'histogrammes, l'angle Θ déduit des sé-

^{6.} Paramètres pour la centrifugation : vitesse = 2000 tours/min, accélération = 5000 tours/min/s, durée = 30 s.



FIG. 3.13 – Exemples de séquences temporelles représentant \mathcal{I}_{\parallel} et \mathcal{I}_{\perp} en fonction du temps. Ces enregistrements permettent de calculer le contraste de polarisation \mathcal{P} et d'en déduire l'orientation Θ du dipôle associé à la molécule unique dans le plan de l'échantillon.

quences temporelles enregistrées en présence ou non du champ E_0 . Les histogrammes de la figure 3.14 ont été obtenus en considérant à chaque fois une centaine de molécules. Dans les trois polymères, la présence du champ électrique se manifeste par une valeur moyenne de l'angle Θ légèrement inférieure à celle obtenue en l'absence de champ électrique. Cet effet est malheureusement faible; il aurait fallu appliquer un champ électrique beaucoup plus important, mais nous étions limités par le claquage des électrodes.

Les histogrammes en cloche obtenus notamment en l'absence de champ E_0 , alors qu'on s'attendrait en théorie à des histogrammes plats, semblent au premier abord surprenants (figure 3.14). Pour interpréter ces résultats expérimentaux, nous avons considéré le produit de la fonction de distribution de Boltzmann $f(\Theta) \propto \exp(\mu_0 E_0 \cos \Theta/k_B T)$ par la probabilité d'excitation à un photon des molécules $|\vec{\mu}(\Theta).\vec{E}|^2$. Cette probabilité d'excitation dépend en effet de l'angle Θ car la réflexion du faisceau incident sur le miroir dichroïque modifie légèrement la polarisation incidente. Ainsi, au lieu d'être circulaire, cette polarisation devient elliptique:

$$\vec{E}(t,\varepsilon) = E \begin{bmatrix} \cos(\omega t) \\ \cos(\omega t - \frac{\pi}{2} + \varepsilon) \\ 0 \end{bmatrix}.$$
(3.9)

Cette ellipticité ($\varepsilon = 0.2$ rad) permet de reproduire les courbes en cloche obtenues en l'absence de champ, à la place d'une répartition angulaire uniforme. Mais ce modèle reste incomplet car d'autres effets tels que la diffusion rotationnelle des molécules doivent également intervenir. De plus, des biais tels qu'une erreur dans la calibration des deux voies peuvent également affecter les histogrammes. Notons enfin que le nombre de molécules considéré (N = 100) pour tracer les différents histogrammes reste petit pour une analyse statistique rigoureuse. Mais le but de notre étude ici est plus de voir la modification de l'histogramme induite par le champ électrique, que d'étudier la forme de l'histogramme.

À partir de la courbe donnant l'évolution de l'angle Θ en fonction du temps, on peut déterminer la plage de variation de cet angle, appelée $\delta\Theta$ et calculée à partir de la variance de l'ensemble des valeurs de Θ (figure 3.13a). On a mesuré $\delta\Theta$ pour un certain nombre de molécules, en présence ou non du champ électrique. Le tracé des histogrammes récapitulant les différentes valeurs de $\delta\Theta$ trouvées met en évidence l'influence du champ sur l'orientation des molécules (figure 3.15). Dans les trois polymères, on observe systématiquement que les fluctuations de l'angle d'orientation Θ des molécules diminuent lorsque le champ \vec{E}_0 est appliqué. Ce résultat signifie sans doute que les molécules oscillent autour d'une position d'équilibre, l'amplitude de ces oscillations diminuant sous la contrainte du champ électrique extérieur. On remarque en effet des



FIG. 3.14 – Histogrammes donnant l'orientation d'une centaine de molécules de Nile Red par rapport à la direction du champ électrique \vec{E}_0 . (a) Les molécules sont dispersées dans le polymère de poly(butylméthacrylate) dont la température de transition vitreuse est $T_g = 15^{\circ}$ C. (b) La matrice de polymère est du poly(butylméthacrylateco-isobutylméthacrylate) avec $T_g = 35^{\circ}$ C. (c) Les molécules sont dispersées dans du PMMA avec $\underline{T}_g = 120^{\circ}$ C. Les courbes en gris clair ont été tracées en calculant la fonction $f(\Theta) \times |\vec{\mu}(\Theta).\vec{E}(t,\varepsilon)|^2$, combinant la répartition angulaire $f(\Theta)$ et la probabilité d'excitation à un photon en fonction de l'angle Θ . Il est en effet nécessaire de prendre en compte l'ellipticité du faisceau incident pour interpréter les histogrammes en cloche. Mais d'autres effets interviennent probablement dans cette étude statistique comme la diffusion orientationnelle des molécules ou le nombre insuffisant de molécules pour une analyse statistique. Les courbes en pointillés ont été tracées avec $E_0 = 0$.



FIG. 3.15 – Histogrammes donnant les variations d'orientation $\delta\Theta$ d'une centaine de molécules de Nile Red, déterminées sur la durée d'émission des molécules avant la photodestruction. (a) Les molécules sont dispersées dans le polymère de poly(butylméthacrylate) dont la température de transition vitreuse est $T_g = 15^{\circ}C$. (b) La matrice de polymère est du poly(butylméthacrylate-co-isobutylméthacrylate) avec $T_g = 35^{\circ}C$. (c) Les molécules sont dispersées dans du PMMA avec $T_g = 120^{\circ}C$.

fluctuations des signaux de fluorescence supérieurs à ce qu'on attendrait si seul le bruit de photon des détecteurs intervenait. Ainsi, la tendance qui se dégage de cette étude est que l'application du champ électrique tend à restreindre la diffusion orientationnelle des molécules, mais il s'agit ici simplement d'une observation qualitative.

3.3.4 Bilan

Les mesures sur les molécules uniques ne nous ont pas permis de suivre la réorientation individuelle en temps réel des dipôles sous l'action du champ électrique, pour des raisons de limitations des valeurs des tensions appliquées. Cependant, un effet sur les fluctuations angulaires a été qualitativement mis en évidence. L'étude du comportement des molécules en présence du champ électrique pourrait maintenant être poursuivie en appliquant des champs plus intenses (cela nécessite notamment de revoir la structure des échantillons afin de limiter les phénomènes de claquage), en utilisant des polymères dont la température de transition vitreuse est encore plus basse (par exemple le poly(méthylacrylate) de $T_{\rm g} = 8^{\circ}$ C) et en regardant l'influence de la température de l'échantillon. Nous n'avons pas poursuivi dans cette voie car nous nous sommes plutôt intéressés aux processus non-linéaires d'ordre 2, pour la détermination de l'orientation des molécules, en particulier dans les cristaux moléculaires.

Chapitre 4

Analyse en polarisation de structures cristallines

Nous allons maintenant procéder à l'analyse en polarisation des signaux de FDP et de GSH émis par des matériaux cristallins non-linéaires. La modélisation de ces signaux nous apportera un moyen de sonder leur structure cristalline. En effet, l'additivité de la réponse non-linéaire des molécules qui composent ces matériaux, les rend très intéressants en raison de la rigidité de l'ordre cristallin, comparée à l'ordre de nature statistique dans un matériau polymère. De plus, ces cristaux présentent des seuils de dommage plus élevés ainsi qu'une meilleure stabilité thermique. Ils sont de ce fait plus commodes à étudier expérimentalement.

La principale difficulté à laquelle a été confrontée l'ingénierie moléculaire pour la fabrication de cristaux organiques non-linéaires, est la formation de structures cristallines stables non-centrosymétriques à l'échelle macroscopique, à partir d'éléments de base ayant une forte hyperpolarisabilité [84]. Nous allons en résumer brièvement les grandes étapes.

Dans les années 70, on s'est orienté vers les "diodes moléculaires", telle que la molécule de DR1. Mais ce type de molécules comporte généralement un moment dipolaire permanent. Elles vont avoir tendance à cristalliser de façon centrosymétrique, du fait des interactions dipolaires qui tendent à apparier les molécules en géométrie tête-bêche. Pour contourner cette difficulté, plusieurs stratégies ont été développées. La première, qui a abouti au cristal de 3-méthyl-4-nitropyridine-1-oxyde (POM), consiste à annuler le dipôle de l'état fondamental, tout en conservant une forte hyperpolarisabilité avec un dipôle de transition vers l'état excité élevé. Des molécules chirales telles que le MAP cristallisent également selon un arrangement non-centrosymétrique, malgré la présence d'un moment dipolaire permanent. Enfin, des molécules comportant un groupement alcool, telles que le N-(4-nitrophényl)-(L)-prolinol (NPP), forment des cristaux non-centrosymétriques grâce à la présence de liaisons hydrogène.

Dans les années 80-90, une alternative a été de développer des molécules octupolaires, dont la structure impose la nullité du moment dipolaire. Enfin, le développement de sels de stilbazolium a permis la synthèse de cristaux non-linéaires ioniques particulièrement efficaces pour la GSH et la modulation électro-optique, en tirant parti des interactions coulombiennes à l'origine de la non-centrosymétrie.

En amont des perspectives d'applications dans les domaines de l'information et de la communication, l'analyse des signaux non-linéaires générés par de tels matériaux est un outil important pour sonder leur structure cristalline. À titre d'exemple, une symétrie cristalline octupolaire se caractérise par un signal de GSH indépendant de la polarisation incidente [85]. Cette propriété a des applications importantes dans des domaines où les fonctions optiques sont requises quelle que soit la polarisation du fondamental. Nous allons voir que l'étude conjointe de la génération du second harmonique et de l'émission de fluorescence à deux photons donne des informations complémentaires sur les symétries du cristal, car elle fait intervenir des tenseurs d'ordre impair et pair respectivement. Leurs propriétés de cohérence permettent également de distinguer structures parfaitement ordonnées et structures plus complexes dans lesquelles existe un désordre. Nous verrons également que la présence de GSH incohérente peut être mise en évidence par notre technique d'analyse en polarisation.

4.1 Généralités

4.1.1 Orientation de la maille cristalline

Contrairement à un milieu polymère où la fonction de distribution orientationnelle est de nature statistique, un milieu cristallin parfait est un milieu très ordonné, constitué d'un arrangement triplement périodique de molécules selon les trois directions de l'espace. La structure d'un cristal moléculaire monocristallin se résume ainsi à la maille cristalline, qui est l'unité de base à partir de laquelle tout le cristal peut être engendré, en faisant subir à celle-ci différentes translations selon les trois axes cristallins définis par les vecteurs de base de la maille $(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$.

La maille cristalline est en général un parallélépipède quelconque et le trièdre $(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$ n'est pas nécessairement orthogonal. Pour simplifier l'analyse, on choisit de définir un trièdre orthonormé (1,2,3) adapté à la maille cristalline. L'orientation de ce dernier par rapport au repère macroscopique (X,Y,Z) est alors définie par les angles d'Euler (θ, ϕ, ψ) représentés sur la figure 4.1. Ainsi, la donnée du triplet $\Omega = (\theta, \phi, \psi)$ permet



FIG. 4.1 – Définition des angles d'Euler (θ, ϕ, ψ) permettant de caractériser l'orientation de la maille cristalline par rapport au repère macroscopique (X,Y,Z). Le repère (x,y,z)est un repère intermédiaire défini par les angles (θ, ϕ) . Dans le cas de maille cristalline plane, le plan de la maille coïncide avec le plan (x,y). Le trièdre (1,2,3) est obtenu après rotation du repère (x,y,z) d'un angle ψ autour de l'axe z.

de déterminer l'orientation de la maille cristalline, dont dépend l'intensité de FDP et de GSH émise dans les états de polarisation X et Y.

Dans toute la suite, nous supposerons la symétrie du cristal connue. En pratique, cette symétrie est préalablement déterminée à partir des spectres de diffraction en rayons X. Notre objectif sera donc de confirmer la symétrie prédite avec la technique d'analyse en polarisation, et de déterminer l'orientation du cristal.

4.1.2 Fluorescence à deux photons

Nous allons déterminer dans cette section l'expression de l'intensité de fluorescence détectée selon les états de polarisation X et Y pour un cristal donné. Rappelons tout d'abord l'expression générale donnant l'intensité de fluorescence à deux photons, émise par une molécule et détectée suivant l'état de polarisation I = X,Y:

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}} = |\vec{\mu} \cdot \vec{E}|^4 \ |\vec{\mu} \cdot \vec{u}_{I}|^2, \tag{4.1}$$

où $\vec{\mu}$ représente le moment dipolaire induit associé à la molécule.

Cette expression fait intervenir la probabilité d'excitation à deux photons proportionnelle à $|\vec{\mu} \cdot \vec{E}|^4$. Celle-ci peut s'écrire sous forme tensorielle :

$$|\vec{\mu} \cdot \vec{E}|^4 = |(\vec{\mu} \otimes \vec{\mu} \otimes \vec{\mu} \otimes \vec{\mu}) \bullet (\vec{E} \otimes \vec{E} \otimes \vec{E} \otimes \vec{E})| = \sum_{I,J,K,L} \gamma_{IJKL} E_I E_J E_K E_L, \quad (4.2)$$

où • représente le produit contracté entre deux tenseurs, et γ le tenseur cristallin d'ordre 4 exprimé dans le repère macroscopique (X,Y,Z). Dans le cas d'un monocristal, les composantes de ce tenseur γ_{IJKL} s'expriment en fonction des composantes γ_{ijkl} déduites de la maille cristalline et des angles d'Euler $\Omega = (\theta, \phi, \psi)$ selon :

$$\gamma_{IJKL}(\Omega) = \sum_{i,j,k,l} \gamma_{ijkl} \cos(i,I) \cos(j,J) \cos(k,K) \cos(l,L).$$
(4.3)

Dans cette expression, les indices I, J, K, L se rapportent aux axes du repère macroscopique (X, Y, Z), tandis que les indices i, j, k, l sont associés aux axes du repère cristallin (1,2,3). La fonction $\cos(i, I)$ donnée en annexe D, correspond à la projection de l'axe *i* sur l'axe *I*; elle dépend donc des trois paramètres d'Euler $\Omega = (\theta, \phi, \psi)$ définissant l'orientation du cristal.

Si l'on ne tient pas compte de l'ouverture numérique de l'objectif, on peut considérer que l'intensité détectée dans la polarisation I est proportionnelle à $|\vec{\mu} \cdot \vec{u}_I|^2$ où \vec{u}_I donne la direction d'analyse (X ou Y). Cette probabilité de détection peut également s'écrire sous forme tensorielle :

$$|\vec{\mu} \cdot \vec{u}_I|^2 = |(\vec{\mu} \otimes \vec{\mu}) \bullet (\vec{u}_I \otimes \vec{u}_I)| = \alpha_{II}(\Omega) \vec{u}_I \cdot \vec{u}_I = \alpha_{II}(\Omega), \qquad (4.4)$$

et fait ainsi intervenir le tenseur moléculaire α d'ordre 2 dans le repère macroscopique :

$$\alpha_{II}(\Omega) = \sum_{i,j} \alpha_{ij} \cos(i,I) \cos(j,I).$$
(4.5)

Si l'on prend maintenant en compte le diagramme de rayonnement et l'ouverture numérique de l'objectif, comme on l'a fait précédemment pour la détection de la fluorescence rayonnée par un dipôle (paragraphe 2.3.5, page 40), les intensités détectées $\mathcal{I}_{X}^{\text{Fluo}}$ et $\mathcal{I}_{Y}^{\text{Fluo}}$ sont proportionnelles aux fonctions :

$$P_{X} = K_{1} \alpha_{XX} + K_{2} \alpha_{YY} + K_{3} \alpha_{ZZ}$$

$$P_{Y} = K_{2} \alpha_{XX} + K_{1} \alpha_{YY} + K_{3} \alpha_{ZZ}.$$
(4.6)

Leur expression fait intervenir les mêmes constantes K_1 , K_2 et K_3 que celles apparaissant dans les fonctions J_X et J_Y du chapitre 2. Finalement, l'expression de l'intensité de fluorescence détectée par les photodiodes suivant la direction de polarisation I se réduit à :

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Omega, \Phi, \varepsilon, \delta) = P_{I}(\Omega) \sum_{J, K, L, M} \gamma_{JKLM}(\Omega) \ \overline{E_{J}E_{K}E_{L}E_{M}}(\Phi, \varepsilon, \delta).$$
(4.7)

Cette expression dépend des trois angles d'Euler (θ, ϕ, ψ) qui donnent l'orientation complète de la maille cristalline et de la polarisation du champ incident. En ajustant les diagrammes polaires $\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}(\Phi)$ aux données expérimentales¹, nous allons pouvoir déterminer les trois paramètres (θ, ϕ, ψ) . Cependant, le triplet de valeurs ainsi obtenu n'est pas forcément univoque et il est nécessaire de compléter cette étude par l'analyse du signal de GSH émis par le même cristal.

Notons que les tenseurs α et γ impliqués dans l'expression (4.7) sont fortement liés aux tenseurs de polarisabilité moléculaire d'ordre 1 et 3 respectivement : leurs expressions quantiques impliquant les moments de transition sont d'ailleurs identiques proche des résonances.

Remarquons que pour une orientation donnée du cristal, les diagrammes polaires $\mathcal{I}_X^{\text{Fluo}}(\Phi)$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{Fluo}}(\Phi)$ sont identiques à un facteur multiplicatif près. En effet, d'après l'expression (4.7), le rapport :

$$\frac{\mathcal{I}_{X}^{\text{Fluo}}(\Phi)}{\mathcal{I}_{Y}^{\text{Fluo}}(\Phi)} = \frac{P_{X}(\Omega)}{P_{Y}(\Omega)}$$
(4.8)

est indépendant de Φ . Cette propriété est due au fait que les processus d'excitation et d'émission sont découplés. Ainsi, l'observation de diagrammes polaires de forme différente pour $\mathcal{I}_{X}^{\text{Fluo}}(\Phi)$ et $\mathcal{I}_{Y}^{\text{Fluo}}(\Phi)$, indique immédiatement que le modèle ne s'applique pas. C'est en particulier le cas si la structure n'est pas parfaitement monocristalline. En effet, si plusieurs orientations cristallines sont impliquées, il est nécessaire de sommer l'expression (4.7) sur ces différentes orientations et la factorisation en Φ n'est plus possible.

Notons également que dans les cristaux, les effets de transfert non radiatif entre molécules n'ont pas d'effet sur les réponses en polarisation. En effet, les molécules sont toutes orientées avec des angles relatifs fixés et les signaux émis ne sont donc pas dépolarisés comme dans le cas des milieux polymères.

^{1.} Pour tracer les diagrammes polaires de l'intensité en fonction de la direction de polarisation Φ , on reprend les valeurs $\varepsilon = 1,14$ rad et $\delta = 0,02$ pour l'ellipticité et le dichroïsme, lorsque $\lambda = 987$ nm. Lorsque $\lambda = 1028$ nm, on prend $\varepsilon = 1,5$ rad et $\delta = -0,02$ (cf. annexe B).

4.1.3 Génération du second harmonique

Nous allons maintenant exprimer les intensités émises par génération du second harmonique. Il faut pour cela, exprimer les composantes $\mathcal{P}_X^{(2)}$ et $\mathcal{P}_Y^{(2)}$ du vecteur polarisation dans le repère macroscopique:

$$\mathcal{P}_X^{(2)} = \beta_{XXX} E_X^2 + \beta_{XYY} E_Y^2 + \beta_{XXY} E_X E_Y + \beta_{XYX} E_Y E_X$$

$$\mathcal{P}_Y^{(2)} = \beta_{YXX} E_X^2 + \beta_{YYY} E_Y^2 + \beta_{YXY} E_X E_Y + \beta_{YYX} E_Y E_X.$$

$$(4.9)$$

La polarisation induite à la pulsation 2ω fait intervenir le tenseur d'hyperpolarisabilité quadratique β dont les composantes sont exprimées dans le repère macroscopique. Celles-ci dépendent de l'orientation de la maille cristalline selon la formule classique de changement de repère :

$$\beta_{IJK}(\Omega) = \sum_{i,j,k} \beta_{ijk} \cos(i,I) \cos(j,J) \cos(k,K).$$
(4.10)

Dans une première approximation, on peut considérer que les intensités détectées $\mathcal{I}_X^{\text{GSH}}$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{GSH}}$ sont proportionnelles au carré des composantes du vecteur polarisation $\mathcal{P}_X^{(2)}$ et $\mathcal{P}_Y^{2\omega}$ respectivement. Ces intensités s'écrivent alors:

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{GSH}}(\Omega, \Phi, \varepsilon, \delta) = \sum_{J, K, L, M} \beta_{IJK}(\Omega) \beta_{ILM}(\Omega) \overline{E_J E_K E_L E_M}(\Phi, \varepsilon, \delta).$$
(4.11)

On peut aller plus loin dans la modélisation, en prenant en compte le diagramme de rayonnement et l'ouverture numérique de l'objectif (annexe C.2). Les calculs donnant des diagrammes (en fonction de Φ) quasiment identiques, les simulations pour la GSH seront effectués avec l'expression (4.11).

Un ajustement effectué avec les intensités obtenues expérimentalement permet là encore, de déterminer les valeurs du triplet (θ, ϕ, ψ) . Notons que contrairement à la fluorescence, les diagrammes polaires donnant l'intensité de GSH dans les états de polarisation X et Y sont différents. Ceci vient du fait que les processus d'excitation à deux photons et d'émission sont maintenant intimement liés, à cause du phénomène de dipôle induit. Le fait de trouver les mêmes angles d'Euler pour la fluorescence à deux photons et la génération du second harmonique nous donne une orientation du cristal de façon univoque. En effet, les deux processus mettent en jeu des tenseurs d'ordre pair et impair respectivement : la réponse en polarisation de la fluorescence est déterminée par les symétries paires du milieu, tandis que la GSH n'est sensible qu'aux non-centrosymétries.

4.2 Cristal non-linéaire de référence : le POM

Nous allons dans un premier temps, appliquer la technique d'analyse en polarisa-



FIG. 4.2 – Formule développée de la molécule de 3-méthyl-4-nitropyridine-1-oxyde (POM), correspondant à une réponse non-linéaire de type donneur-accepteur.

tion, à un cristal non-linéaire de référence dont la structure cristalline est très bien connue [12, 86]. Il s'agit d'un cristal moléculaire constitué de 3-méthyl-4-nitropyridine-1-oxyde (POM) dont la formule chimique est représentée sur la figure 4.2. Cette molécule a un moment dipolaire permanent nul et cristallise selon un schéma noncentrosymétrique. Elle comporte une hyperpolarisabilité quadratique non négligeable $(\beta=8,5 \times 10^{-30} \text{ esu à 1064 nm [87]})$, résultant du transfert de charge entre le groupement nitro (donneur d'électrons) et le groupement N-oxyde (accepteur d'électrons). La non-centrosymétrie de la molécule est introduite par le groupe méthyl. Le cristal de POM constitue ainsi un cristal non-linéaire efficace. Sa longueur d'absorption maximale étant égale à 343 nm [44], on excite la molécule très loin de la résonance. Comme le montre le spectre de la figure 4.3b obtenu avec notre montage de microscopie nonlinéaire, on obtient un pic de GSH. L'absence de rayonnement de fluorescence est due au faible rendement quantique de la molécule de POM.

4.2.1 Maille cristalline du POM et réponse non-linéaire

La cristallisation est obtenue à partir de solutions de POM dans le chloroforme et le méthylène chloride. Des cristaux de couleur jaune sont obtenus après évaporation du solvant (figure 4.4a). Ces cristaux nous ont été fournis par J.-F. NICOUD (université de Strasbourg). Des études par diffraction aux rayons X ont été réalisées sur ces cristaux et montrent que ces derniers appartiennent au groupe de symétrie orthorhombique P₂₂₂ [88]. La maille cristalline, représentée sur la figure 4.4b, comporte quatre molécules et a pour dimension a = 21,359 Å, b = 6,111 Å et c = 5,132 Å.

Comme il s'agit d'un groupe de symétrie orthorhombique, on confond le repère (1,2,3)avec le repère de la maille cristalline $(\vec{a},\vec{b},\vec{c})$. Pour le groupe de symétrie P222, seuls



FIG. 4.3 – (a) Spectre de transmission d'un cristal de POM de 400 μm d'épaisseur. Cette figure provient de la Réf. [12]. Le maximum d'absorption se situe à 343 nm. (b) Spectre d'émission d'un cristal de POM ne comportant qu'un pic de GSH à 493,5 nm. Ce spectre a été obtenu avec un faisceau infrarouge incident de 9 mW à 987 nm.



FIG. 4.4 - (a) Photographie des cristaux de POM, disposés selon leur plan (100). (b) Maille cristalline du cristal de POM, selon le plan (001) et le plan (010). Cette figure est issue de l'article [86].

les coefficients non-linéaires $\beta_{123} = \beta_{132}$, $\beta_{213} = \beta_{231}$ et $\beta_{312} = \beta_{321}$ sont non nuls. De plus, tous ces coefficients sont égaux entre eux, si on suppose vérifiées les relations de KLEINMAN, valides loin des résonances. Nous pouvons donc écrire :

$$\beta_{123} = \beta_{132} = \beta_{213} = \beta_{231} = \beta_{312} = \beta_{321} = 0,408 \tag{4.12}$$

si on normalise le tenseur d'hyperpolarisabilité β tel que $\|\beta\| = \sqrt{\sum_{i,j,k} \beta_{ijk}^2} = 1.$

Une fois exprimées les composantes du tenseur β dans le repère macroscopique (X,Y,Z)(cf. annexe E, page 179), nous pouvons calculer les intensités détectées $\mathcal{I}_X^{\text{GSH}}$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{GSH}}$ à partir de la relation (4.11).

4.2.2 Résultats expérimentaux

Analyse de la face (100) d'un cristal de POM

Il est possible de donner à la maille cristalline une orientation bien définie car les cristaux de POM se clivent naturellement selon la face (100). En posant simplement le cristal selon cette face sur une lamelle de microscope, on impose aux angles d'Euler les valeurs $\theta = 90^{\circ}$ et $\psi = 0^{\circ}$ (figure 4.5a). L'angle ϕ dépend quand à lui, de l'orientation du cristal dans le plan de la lamelle. L'orientation du cristal étant ainsi parfaitement déterminée, nous pouvons comparer les données expérimentales avec les courbes théoriques $\mathcal{I}_{I}^{\text{GSH}}(\Phi)$.



FIG. 4.5 – (a) Cristal de POM posé sur une lamelle de microscope suivant la face (100). Avec les axes (1,2,3) représentés comme sur le schéma, l'orientation du cristal est donnée par les angles d'Euler ($\theta = 90^{\circ}, \phi = -90^{\circ}, \psi = 0^{\circ}$). (b) Cartographie du signal de GSH lorque le cristal est posé selon la surface (100). Le faisceau incident avait une puissance de 6 mW à 987 nm.

La figure 4.5b donne une cartographie des niveaux de signaux de GSH, suivant la face (100) d'un cristal de POM. La région observée $(7,6 \,\mu\text{m} \times 7,6 \,\mu\text{m})$ est homogène. Les diagrammes polaires des figures 4.6 et 4.7 ont été obtenus avec deux cristaux que l'on a fait tourner dans le plan de la lamelle, parallèlement au plan cristallin (100). Les courbes théoriques calculées avec les angles d'Euler $\theta \sim 90^{\circ}$ et $\psi \sim 0^{\circ}$ permettent effectivement de reproduire les intensités détectées dans les états de polarisation X et Y. Remarquons que la forme des diagrammes polaires dépend fortement de l'angle d'inclinaison θ , ce qui montre la forte sensibilité de nos mesures. Notons cependant que les cristaux étudiés, synthétisés dans les années 70, n'ont pas très bien vieilli : leurs surfaces sont notamment rayées et parfois opaques. Ceci peut être à l'origine des écarts observés entre mesures théoriques et modélisation.

Ces résultats permettent néanmoins de valider la technique d'analyse en polarisation et la modélisation théorique que nous avons effectuée. On peut en particulier conclure que les polarisations du champ incident et du signal émis ne sont pas trop affectées par la présence de la double interface verre/air et air/cristal.



FIG. 4.6 – Diagrammes polaires représentant les intensités de GSH détectées selon les états de polarisation X (en gris foncé) et Y (en gris clair), en fonction de la direction de la polarisation incidente Φ . Le cristal de POM est simplement posé sur sa face (100). Son orientation dans le plan (X,Y) est donnée par les rectangles. Les points expérimentaux ont été obtenus avec une puissance incidente du faisceau infrarouge de 4,6 mW à 1028 nm. Les courbes théoriques, en ligne continue, ont été calculées avec $\varepsilon = 1,5$ rad, $\delta = -0,02$ et avec les angles d'Euler suivants: (a) (91°, $-1^{\circ},90^{\circ}$), (b) (91°, $-1^{\circ},55^{\circ}$) et (c) (91°, $-1^{\circ},0^{\circ}$).



FIG. 4.7 – Diagrammes polaires représentant les intensités de GSH détectées selon les états de polarisation X (en gris foncé) et Y (en gris clair), en fonction de la direction de la polarisation incidente Φ . Ces courbes sont obtenues pour un autre cristal de POM, à nouveau simplement posé sur sa face (100). Son orientation dans le plan (X,Y) est donnée par les rectangles. Les points expérimentaux ont été obtenus avec une puissance incidente du faisceau infrarouge de 4,6 mW à 1028 nm. Les courbes théoriques, en ligne continue, ont été calculées avec $\varepsilon = 1,5$ rad, $\delta = -0,02$ et avec les angles d'Euler suivants: (a) (88°,1°,90°), (b) (88°,1°,60°), (c) (88°,1°,15°) et (d) (88°,1°,0°). La comparaison avec la figure 4.6 montre qu'une très faible variation de l'angle θ conduit à des structures en polarisation du champ rayonné à 2 ω totalement différentes.

Analyse de grains de poudre de POM

L'efficacité des molécules non-linéaires est en général évaluée en mesurant la GSH produite par une multitude de grains de poudre cristallisés. Cette technique a été développée par KURTZ et PERRY [46]. Nous nous sommes ainsi intéressés à la structure cristalline de grains de poudre de POM et nous avons pour cela procédé à l'analyse en polarisation de la GSH émise par des grains isolés, étudiés un par un de façon à s'affranchir du moyennage qui intervient dans l'application "traditionnelle" de cette technique.

Comme le POM est très soluble, en particulier dans l'eau et dans un certain nombre de solvants organiques, nous avons simplement dispersé les grains entre deux lamelles de microscope. La cartographie de la figure 4.8 permet d'estimer la taille des grains (~ 1 μ m) utilisés dans cette expérience.



FIG. 4.8 – Cartographie du signal de GSH généré par un grain de poudre de cristal de POM. Le faisceau incident avait une puissance de 8,2 mW à 987 nm.

La réponse en polarisation typique obtenue avec ces grains est représentée sur la figure 4.9. On obtient des structures à deux lobes très élargis et dirigés suivant X(resp. Y) pour $\mathcal{I}_X^{\text{GSH}}$ (resp. $\mathcal{I}_Y^{\text{GSH}}$). Ce résultat est la signature de l'addition incohérente de signaux de GSH émis par un agrégat polycristallin, c'est-à-dire un agrégat comportant plusieurs unités monocristallines avec des orientations différentes. On voit en effet que la forme des lobes ressemble fortement à celle d'un signal de fluorescence – donc incohérent – provenant d'une assemblée isotrope de dipôles. Ce phénomène d'addition incohérente de signaux de GSH a déjà été observé expérimentalement sur des membranes en suspension dans lesquelles des chromophores sont orientés aléatoirement [89]. Le modèle théorique développé dans le chapitre 1, montre que les champs rayonnés par les différentes unités interfèrent destructivement à cause du désordre structural dans le



FIG. 4.9 – Réponse en polarisation de la GSH émise par un grain de poudre de POM et détectée selon les états de polarisation X (a) et Y (b). Les données expérimentales, en pointillés, ont été obtenues avec une puissance incidente du faisceau de 8,2 mW à 987 nm. Les courbes théoriques, obtenues par addition incohérente de la réponse à 2ω d'une distribution angulaire isotrope de molécules de POM, sont représentées en ligne continue.

milieu. L'intensité de GSH détectée correspond ainsi à la somme des intensités émises par chacune des unités monocristallines.

Comme tous les grains de POM étudiés ont donné la même forme de signal, il est probable qu'ils contenaient tous un grand nombre d'unités monocristallines, orientées aléatoirement les unes par rapport aux autres. Les courbes théoriques représentées sur la figure 4.9 ont été calculées en intégrant $\mathcal{I}_{I}^{\text{GSH}}$ sur toutes les orientations possibles des unités monocristallines, conformément à l'équation (1.14):

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{poudre}} = \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{\pi} \mathcal{I}_{I}^{\text{GSH}}(\theta_{i}, \phi_{i}, \psi_{i}) \sin \theta_{i} \, \mathrm{d}\theta_{i} \, \mathrm{d}\phi_{i} \, \mathrm{d}\psi_{i}$$
(4.13)

On obtient bien alors des diagrammes polaires orientés suivant la direction d'analyse et symétriques en X et Y, conformément aux observations expérimentales. On peut en conclure que le processus de cristallisation a été plus "chaotique" lors de la formation des grains de poudre que lors de la formation des plus gros cristaux. Cette observation est impossible à mettre en œuvre avec la technique d'analyse traditionnelle utilisant un grand nombre de grains.

4.3 Cristal octupolaire de TTB

A partir de la précédente étude qui valide notre technique d'analyse en polarisation, nous avons cherché à mettre en évidence la structure octupolaire de nouveaux cristaux synthétisés dans le laboratoire de B.R. CHO à l'université de Séoul, à partir de molécules de symétrie D_{3h} . Ces cristaux, de taille millimétrique (figure 4.10), sont



FIG. 4.10 – Photographie des cristaux octupolaires synthétisés dans le laboratoire de B.R. CHO. Une propriété remarquable de ces structures cristallines est que la symétrie octupolaire de la molécule de TTB se retrouve à l'échelle macroscopique.

les premiers cristaux dont la structure a été optimisée pour être purement octupolaire plane. Les motivations qui ont porté la réalisation de telles structures sont nombreuses, avec notamment la perspective d'optimiser la réponse non-linéaire macroscopique par un agencement optimal des molécules octupolaires et la possibilité de réaliser des structures dont la réponse est indépendante de la polarisation incidente.

Les molécules octupolaires correspondent à des arrangements de symétrie d'ordre 3 dans le plan ou dans l'espace, comportant des groupements accepteurs et donneurs d'électrons, séparés de liaisons π assurant un transfert de charge efficace [90, 91]. Ce transfert de charge a lieu généralement entre le "cœur" central et les fonctions des trois branches assurant la symétrie D_{3h}. Un modèle à trois niveaux dégénérés [92, 93], introduit pour les molécules octupolaires planes, montre que la polarisabilité moléculaire α et les hyperpolarisabilités β et γ sont d'autant plus grandes que le transfert de charge est efficace. La non-linéarité sera donc optimisée avec des groupements accepteur/donneur forts et des longueurs de chaîne grandes. C'est le cas en particulier de la molécule octupolaire 1,3,5-tricyano-2,4,6-tris(*p*-diéthylaminostyryl)benzène (TTB), dont la formule développée est représentée sur la figure 4.11.

Cette molécule comporte un accepteur central (tricyano-benzène) et trois donneurs périphériques (groupement diéthylamine). Le transfert de charge est assuré, dans chacune des trois branches, par une liaison double et un noyau aromatique. Le spectre de la figure 4.12b montre que la molécule de TTB donne un fort signal de GSH. Elle est



FIG. 4.11 – Formule développée de la molécule 1,3,5-tricyano-2,4,6-tris(pdiéthylaminostyryl)benzène (TTB).

également fluorescente, avec une bande de fluorescence bien séparée du pic de GSH en excitation résonnante. Nous allons donc tirer profit de ces deux rayonnements pour sonder la structure d'un cristal de TTB, vérifier sa nature octupolaire et déterminer l'orientation des molécules à l'intérieur du cristal.



FIG. 4.12 - (a) Spectre d'absorption de la molécule de TTB dans le THF. Le maximum d'absorption se situe à 495 nm. (b) Spectre d'émission d'un cristal de TTB, obtenu avec une puissance infrarouge incidente de 1 mW à 987 nm. Ce spectre est composé d'une bande de fluorescence autour de 700 nm, bien séparée du pic de GSH à 493,5 nm.

4.3.1 Maille cristalline du TTB

La présence de noyaux benzeniques et de double-liaisons CC ainsi que l'hybridation sp^2 des fonctions amines assurent la planéité de la molécule de TTB. Lors de la formation du cristal, les molécules vont avoir tendance à se superposer les unes sur les autres avec leur "branches" parallèles entre elles, du fait des interactions $\pi - \pi$ intermoléculaires (figure 4.13). La cristallisation des molécules selon un arrangement



FIG. 4.13 - (a) Représentation tri-dimensionnelle de la maille cristalline du TTB.
(b) Représentation de la maille dans le plan (001).

non-centrosymétrique étendu au volume est ainsi favorisée. Elle est obtenue à partir d'une solution saturée de CH_2Cl_2 -EtOEt et donne des cristaux millimétriques de couleur rouge avec une base hexagonale (figure 4.14). Une étude par diffraction aux rayons



FIG. 4.14 - (a) Structure octupolaire étentue dans le plan (001). (b) Structure cristalline d'un cristal de TTB de base hexagonale. La base hexagonale est parallèle aux surfaces moléculaires (001). L'orientation des molécules dans le cristal est ici devinée; elle sera confirmée par les mesures en polarisation.

X montre que la maille cristalline, constituée d'un empilement de trois molécules, a pour paramètres géométriques a = 17,518 Å, b = 17,518 Å, c = 11,369 Å, $\alpha = 90^{\circ}$,

 $\beta = 90^{\circ}$ et $\gamma = 120^{\circ}$ (figure 4.13). Nous allons montrer, grâce à la technique d'analyse en polarisation, que la surface (001), correspondant aux plans moléculaires, est parallèle à la base hexagonale du cristal, ce qui nous permettra de déterminer l'orientation des molécules dans le cristal. On définit pour cela, le repère orthonormé (1,2,3) tel que l'axe 1 soit confondu avec l'un des axes C_2 , l'axe 3 étant perpendiculaire au plan (\vec{a}, \vec{b}) (figure 4.15). La molécule cristallisant selon la symétrie hexagonale P-6m2,



FIG. 4.15 – Définition du repère moléculaire (1,2,3) par rapport à une molécule de TTB. On choisit l'axe 1 parallèle à l'une des trois branches et l'axe 3 perpendiculaire au plan de la molécule. Vu le long de l'axe 3, on voit une symétrie octupolaire d'ordre 3. Par contre, vu le long de l'axe 1 ou 2, le système se comporte comme un dipôle.

on peut exprimer les composantes non nulles des tenseurs moléculaires α , β et γ dans le repère (1,2,3). Leurs valeurs normalisées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Tenseur	Composantes non nulles	Valeurs normalisées
α	$\alpha_{11} = \alpha_{22}$	$1/\sqrt{2}$
β	β_{111}	0,5
	$\beta_{122} = \beta_{221} = \beta_{212}$	-0,5
	$= -\beta_{111}$	
$\overline{\gamma}$	$\gamma_{1111} = \gamma_{2222}$	0,612
	$\gamma_{1122} = \gamma_{1212} = \gamma_{1221} = \gamma_{2112} = \gamma_{2121} = \gamma_{2211}$	0,204
	$=\gamma_{1111}/3$	

Remarquons que les valeurs relatives des composantes des tenseurs α , β , γ sont conformes à celles données par le modèle à trois niveaux dégénérés, développé pour calculer la réponse non-linéaire d'une molécule octupolaire plane [93].
4.3.2 Calcul théorique de la fluorescence à deux photons

Dans le paragraphe 4.1.2, nous avons montré qu'il est nécessaire, pour calculer les intensités de fluorescence à deux photons $\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}$, d'exprimer les composantes des tenseurs α et γ dans le repère macroscopique (X,Y,Z). Leurs expressions sont données dans l'annexe E.2, page 179. Nous allons détailler ici le résultat des calculs de $\mathcal{I}_{I}^{\text{Fluo}}$ pour différentes orientations du cristal.

Cas où le plan moléculaire (001) est dans le plan (X,Y)

Considérons le cas où le plan moléculaire (001) est contenu dans le plan macroscopique (X,Y), pour lequel $\theta = 0^{\circ}$. Les deux angles (ϕ,ψ) jouent alors le même rôle. On peut donc fixer de façon arbitraire $\psi = 0^{\circ}$ et faire varier ϕ pour simuler la rotation du cristal dans son plan. D'après les expressions (E.2), on montre facilement que $\alpha_{XX} = \alpha_{YY}$, quelque soit la valeur de ϕ (ce qui est logique pour un système de symétrie d'ordre 3, tous les tenseurs d'ordre inférieur à 3 étant isotropes) et on en déduit que les intensités émises dans les deux polarisations X et Y sont identiques. De plus, le diagramme polaire de la figure 4.16a montre que l'émission de fluorescence est indépendante de la direction de polarisation du faisceau infrarouge incident, lorsque celui-ci est polarisé rectilignement. Cette propriété d'insensibilité à la polarisation est caractéristique d'un milieu octupolaire. En revanche, dès que l'on introduit une ellipticité ε dans la polarisation du champ électrique incident, comme dans le cas de notre montage, la réponse en polarisation de la fluorescence correspond à une structure à quatre lobes (figure 4.16b). Remarquons également que la réponse en polarisation de la fluorescence est indépendante de l'orientation du cristal donnée par l'angle ϕ .



FIG. 4.16 – Diagrammes polaires de la fluorescence $\mathcal{I}_{I}^{Fluo}(\Phi)$ du cristal de TTB dans l'état de polarisation I = X, Y en fonction de la direction de polarisation du faisceau incident avec $\theta = 0^{\circ}$ (a) Le faisceau incident est supposé être parfaitement polarisé rectilignement ($\varepsilon = 0$). (b) Le faisceau incident a une ellipticité $\varepsilon = 1,14$ rad.

Cas où le plan (001) est perpendiculaire au plan (X,Y)

Considérons maintenant le cas où le plan moléculaire (001) est perpendiculaire au plan (X,Y), soit $\theta = 90^{\circ}$. Le calcul numérique montre que l'intensité de fluorescence ne dépend pas de l'angle ψ . La figure 4.17 représente les intensités de fluorescence détectées dans les deux états de polarisation pour différentes valeurs de l'angle ϕ . On obtient des diagrammes à deux lobes qui tournent avec l'angle ϕ . Ce résultat est caractéristique d'un comportement dipolaire, correspondant ici à la projection du plan moléculaire dans le plan (X,Y).



FIG. 4.17 – Diagrammes polaires de la fluorescence $\mathcal{I}_{I}^{Fluo}(\Phi)$ du cristal de TTB dans l'état de polarisation X (en continu) et Y (en pointillés), en fonction de la direction de polarisation du faisceau incident, avec $\varepsilon = 1,14$ rad et pour différentes orientations du cristal avec $\theta = 90^{\circ}$. (a) $\Omega = (90^{\circ}, 0^{\circ}, 30^{\circ})$. (b) $\Omega = (90^{\circ}, 30^{\circ}, 30^{\circ})$. (c) $\Omega = (90^{\circ}, 50^{\circ}, 30^{\circ})$. (d) $\Omega = (90^{\circ}, 90^{\circ}, 30^{\circ})$.

Cas intermédiaire

Lorsque les angles d'Euler prennent des valeurs quelconques, on obtient des diagrammes polaires très différents, comme le montre la figure 4.18. On note cependant que les diagrammes de FDP analysés selon les polarisations X et Y ont la même forme, étant donné la structure monocristalline.



FIG. 4.18 – Diagrammes polaires de la fluorescence $\mathcal{I}_{I}^{Fluo}(\Phi)$ pour un cristal de TTB dans l'état de polarisation X (en continu) et Y (en pointillés), en fonction de la direction de polarisation du faisceau incident, avec $\varepsilon = 1,14$ rad. (a) $\Omega = (30^{\circ},0^{\circ},60^{\circ})$. (b) $\Omega = (30^{\circ},70^{\circ},60^{\circ})$. (c) $\Omega = (45^{\circ},40^{\circ},60^{\circ})$.

Ces modélisations montrent que la structure octupolaire donne des réponses en polarisation tout-à-fait caractéristiques en fluorescence à deux photons. On peut notamment déterminer immédiatement si les octupoles sont dans le plan (X,Y), perpendiculaires au plan (X,Y) ou dans une position intermédiaire. Ce résultat est spécifique de la symétrie octupolaire plane du cristal.

4.3.3 Calcul théorique de la génération du second harmonique

Le calcul des intensités de GSH fait intervenir les composantes du tenseur hyperpolarisabilité β , dont les expressions sont données dans l'annexe E.2, page 179. Nous allons considérer à nouveau différents cas d'orientation du cristal.

Cas où le plan moléculaire (001) est dans le plan (X,Y)

Reprenons le cas où $\theta = 0^{\circ}$ et $\psi = 0^{\circ}$. Les molécules octupolaires se trouvent dans le plan (X,Y) dont l'orientation par rapport à l'axe X est donnée par l'angle ϕ . La figure 4.19 représente l'intensité totale de la GSH émise ($\mathcal{I}_{X}^{\text{GSH}}(\Phi) + \mathcal{I}_{Y}^{\text{GSH}}(\Phi)$) en fonction de la polarisation du faisceau incident. Le calcul montre que cette réponse totale de la GSH est invariante par rapport à ϕ . De plus, l'intensité totale de la GSH est indépendante de la direction de polarisation du faisceau incident, lorsque celui-ci est polarisé rectilignement. Cette propriété d'insensibilité à la polarisation des milieux octupolaires a déjà été étudiée et mise en évidence expérimentalement dans le contexte d'octupôles orientés par voie optique en matrice polymère [90]. Notons cependant qu'une légère ellipticité ε dans la polarisation incidente modifie la réponse et fait



FIG. 4.19 – Diagrammes polaires de la GSH totale $\mathcal{I}_{X}^{GSH}(\Phi) + \mathcal{I}_{Y}^{GSH}(\Phi)$ pour un cristal de TTB, en fonction de la direction de polarisation du faisceau incident avec $\theta = 0^{\circ}$. (a) Le faisceau incident est polarisé rectilignement ($\varepsilon = 0$). (b) Le faisceau incident a une ellipticité $\varepsilon = 1,14$ rad.

apparaître une courbe à quatre lobes. De ce point de vue, les réponses totales de la GSH et de la FDP sont tout-à-fait similaires. Par contre, en s'intéressant aux intensités émises dans les états de polarisation X et Y, nous constaterons que la réponse de la GSH est beaucoup plus riche en renseignements que celle de la fluorescence à deux photons.

La figure 4.20 nous donne les réponses en polarisation de la GSH pour différentes valeurs de l'angle ϕ comprises entre 0° et 60°. D'une façon générale, on obtient des diagrammes à quatre lobes tournant avec l'angle ϕ . Les diagrammes polaires obtenus avec $\phi \pmod{\pi/3}$ sont identiques, conformément à la symétrie d'ordre 6 du plan moléculaire (001), compte tenu du fait que la détection se fait en intensité et que l'on n'est pas sensible à la phase du rayonnement émis à la fréquence 2ω . Remarquons également que les angles ϕ et $\phi + \pi/6$ inversent exactement les réponses en polarisation $\mathcal{I}_X^{\text{GSH}}$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{GSH}}$. Ainsi, contrairement à la fluorescence à deux photons, l'examen des diagrammes polaires obtenus en GSH nous permettra de déterminer l'angle ϕ .



FIG. 4.20 – Diagrammes polaires $\mathcal{I}_{I}^{GSH}(\Phi)$ pour un cristal de TTB dans l'état de polarisation X (en continu) et Y (en pointillés), en fonction de la direction de polarisation du faisceau incident, avec $\varepsilon = 1,14$ rad. (a) $\Omega = (0^{\circ},0^{\circ},0^{\circ})$. (b) $\Omega = (0^{\circ},10^{\circ},0^{\circ})$. (c) $\Omega = (0^{\circ},20^{\circ},0^{\circ})$. (d) $\Omega = (0^{\circ},30^{\circ},0^{\circ})$. (e) $\Omega = (0^{\circ},40^{\circ},0^{\circ})$. (f) $\Omega = (0^{\circ},50^{\circ},0^{\circ})$.

Cas où le plan (001) est perpendiculaire au plan (X,Y)

Considérons à nouveau le cas où $\theta = 90^{\circ}$ et $\psi \neq 0^{\circ}$. Les diagrammes polaires obtenus pour la GSH correspondent typiquement à un comportement dipolaire, avec des structures à deux lobes orientés suivant la direction perpendiculaire à ϕ (figure 4.21). Comme pour la fluorescence à deux photons, ce comportement dipolaire provient de la projection du plan moléculaire dans le plan (X,Y).



FIG. 4.21 – Diagrammes polaires $\mathcal{I}_{I}^{GSH}(\Phi)$ pour un cristal de TTB dans l'état de polarisation X (en continu) et Y (en pointillés), en fonction de la direction de polarisation du faisceau incident, avec $\varepsilon = 1,14$ rad. (a) $\Omega = (90^{\circ},0^{\circ},30^{\circ})$. (b) $\Omega = (90^{\circ},30^{\circ},30^{\circ})$. (c) $\Omega = (90^{\circ},50^{\circ},30^{\circ})$. (d) $\Omega = (90^{\circ},90^{\circ},30^{\circ})$.

Cas intermédiaire

Comme pour la fluorescence à deux photons, avec des angles (θ, ϕ, ψ) quelconques, on obtient des réponses en polarisation de la GSH très variées (figure 4.22).



FIG. 4.22 – Diagrammes polaires $\mathcal{I}_{I}^{GSH}(\Phi)$ pour un cristal de TTB dans l'état de polarisation X (en continu) et Y (en pointillés), en fonction de la direction de polarisation du faisceau incident, avec $\varepsilon = 1,14$ rad. (a) $\Omega = (30^{\circ},0^{\circ},60^{\circ})$. (b) $\Omega = (30^{\circ},70^{\circ},60^{\circ})$. (c) $\Omega = (45^{\circ},40^{\circ},60^{\circ})$.

4.3.4 Résultats expérimentaux

Le pic de GSH étant bien séparé de la bande de fluorescence, nous avons procédé séparément à l'analyse de la fluorescence à deux photons et de la génération du second harmonique en ajoutant des filtres sélectionnant l'un ou l'autre des deux signaux. La figure 4.23 donne les spectres des signaux ainsi filtrés.



FIG. 4.23 – Filtrage de l'émission d'un cristal de TTB. On ajoute dans le dispositif, un filtre permettant de sélectionner soit la fluorescence (a), soit la GSH émise à une longueur d'onde de 493,5 nm (b).

Analyse d'un coté du cristal

On dispose tout d'abord le cristal de TTB suivant l'un de ses six côtés sur une lamelle de microscope et on enregistre la réponse en polarisation de la FDP et de la GSH.



FIG. 4.24 – Réponse en polarisation de la GSH (a1-b1-c1) et de la FDP (a2-b2-c2), lorsque le cristal de TTB est posé sur l'une de ses six faces. L'orientation du cristal dans le plan (X,Y) est donnée sur les figures par l'orientation du rectangle noir. Les données expérimentales \mathcal{I}_{X} (en gris foncé) et \mathcal{I}_{Y} (en gris clair) ont été obtenues avec une puissance incidente de 200 μW à 987 nm. Les courbes en trait continu ont été calculées avec les angles (90°, -5° ,30°) (a1-a2), (90°,88°,30°) (b1-b2) et (90°,115°,30°) (c1-c2), afin d'obtenir le meilleur ajustement avec les données expérimentales.

Les données expérimentales de la figure 4.24 ont été obtenues pour trois orientations différentes du cristal, dans le plan (X,Y). On remarque tout de suite le comportement dipolaire caractérisé par des diagrammes à deux lobes orientés dans la même direction pour les deux états de polarisation et pour les deux types de signaux (FDP et GSH). Les ajustements ont d'ailleurs été tracés avec $\theta = 90^{\circ}$, conformément à l'étude théorique précédente. On arrive à suivre la direction et l'amplitude relative des lobes en faisant varier l'angle ϕ , ce dernier coïncidant avec la direction du cristal. On peut donc conclure que le plan (001), parallèle à l'axe des lobes et perpendiculaire à la direction ϕ , est parallèle à la base hexagonale du cristal. Nous allons confirmer ce résultat en changeant le plan d'analyse du cristal.

Analyse d'une face hexagonale du cristal

La même analyse en polarisation est maintenant réalisée avec le cristal posé suivant sa base hexagonale. Les réponses en polarisation recueillies en différents points, pour une orientation donnée sont quasiments identiques, ce qui traduit une très bonne qualité optique du cristal.

Nous avons tout d'abord enregistré l'intensité totale des signaux en enlevant le cube polarisant, de manière à ne pas discriminer les polarisations d'émission. Les diagrammes obtenus nous donnent bien une figure à quatre lobes, tout à fait reproductible par calcul en prenant $\theta = 0^{\circ}$ (figure 4.25).



FIG. 4.25 – Intensité de GSH (a) et de FDP (b) pour le cristal de TTB, en fonction de la direction de polarisation du faisceau incident. Les mesures ont été effectuées avec une puissance incidente de 240 μW à 987 nm, en l'absence de cube polarisant. Les courbes théoriques ont été calculées avec $\theta = 0^{\circ}$ et $\varepsilon = 1,14$ rad.

Reprenons maintenant l'analyse en polarisation avec le cube polarisant. Les diagrammes polaires, obtenus lorsqu'un des côtés de la base hexagonale est parallèle à



FIG. 4.26 – Réponse en polarisation de la GSH (a-b) et de la fluorescence à deux photons (c-d), lorsque le cristal de TTB est posé sur sa base hexagonale, l'un des cotés étant quasiment parallèle à l'axe X. Les points expérimentaux \mathcal{I}_{X} (en gris foncé) et \mathcal{I}_{Y} (en gris clair) ont été obtenus avec une puissance infrarouge incidente de 56 μW à 1028 nm. Les mêmes formes de diagramme ont été obtenues après rotation du cristal d'un angle $\pi/3$ dans le plan (X,Y), vérifiant ainsi l'invariance par rotation due à la symétrie cristalline. Les courbes en trait continu ont été calculées avec les angles $\Omega = (0^{\circ}, 16^{\circ}, 0^{\circ}).$

l'axe X, sont rassemblés sur la figure 4.26. On vérifie expérimentalement que les signaux de GSH sont inchangés lorsque le cristal est tourné d'un angle $\pi/3$ par rapport à l'axe de la structure hexagonale. Nous avons également vérifié que lorsqu'on tourne le cristal d'un angle $\pi/6$ (l'un des côtés de la base hexagonale est alors parallèle à l'axe Y), les signaux de GSH détectés dans les états de polarisation X et Y étaient alors échangés. La symétrie d'ordre 6 est donc bien mise en évidence par nos mesures, ce qui confirme que la surface (001) est bien parallèle à la base hexagonale du cristal. Les ajustements de la figure 4.26 calculés avec les angles d'Euler (0°,16°,0°) reproduisent assez bien les données expérimentales. Tous ces résultats prouvent que les molécules octupolaires composant le cristal, ont leur plan moléculaire parallèle à la base hexagonale, et sont orientées dans la même direction, assurant ainsi la structure non-centrosymétrique du cristal (cf schéma de la figure 4.14b).

Notons que ces mesures sont faites à une longueur d'onde encore proche de la longueur d'onde d'absorption maximale λ_{max} par limitation expérimentale. Il faudrait en toute rigueur tenir compte du fait que nous ne pouvons pas intervertir tous les indices du tenseur moléculaire (cf. symétrie de Kleinman, paragraphe 1.3.3). Une étude théorique a cependant été effectuée à partir des valeurs issues de calculs de chimie quantique : on a vu que cet effet n'a pas d'incidence notable sur les réponses en polarisation.

Analyse plus fine de la structure cristalline

L'examen plus attentif de la figure 4.26 montre que les courbes théoriques ne rendent pas parfaitement compte de la direction et de la forme des lobes des diagrammes expérimentaux. Il est cependant impossible d'obtenir un ajustement meilleur, en prenant des valeurs $\theta \neq 0$ et $\psi \neq 0$, ou en considérant l'addition cohérente ou incohérente de signaux de GSH calculés pour deux orientations $\Omega_i = (\theta_i, \phi_i, \psi_i)$ différentes.

Nous avons alors enregistré les réponses en polarisation de la GSH pour différentes orientations du cristal, en le faisant tourner dans le plan de la lamelle de microscope. Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure 4.27. On remarque que pour certaines positions, la structure à quatre lobes disparaît pour l'un ou l'autre des signaux détectés dans les polarisations X et Y. Afin de reproduire l'ensemble de ces observations, nous avons considéré l'addition incohérente de la GSH émise par une distribution continue de molécules octupolaires dont l'orientation est donnée par l'angle ψ variant entre $\psi = 0$ et $\psi = \Delta \psi$, les angles $\theta = 0^\circ$ et ϕ étant fixés par l'orientation macroscopique du cristal. Le signal de GSH qui en résulte s'écrit alors :

$$\mathcal{J}_{I}(\Delta\psi,\phi,\Phi) = \int_{0}^{\Delta\psi} \mathcal{I}_{I}(\theta = 0^{\circ}, \phi, \psi, \Phi, \varepsilon, \delta) \,\mathrm{d}\psi, \qquad (4.14)$$

avec $\varepsilon = 1,14$ rad et $\delta = 0,02$. Une valeur $\Delta \psi = 45^{\circ}$ permet de reproduire l'orientation et la forme des lobes pour les six positions du cristal, comme le montrent les courbes théoriques de la figure 4.27. De plus, les valeurs des angles ϕ données par les ajustements rendent bien compte de l'orientation macroscopique du cristal dans son plan. Le bon accord entre notre modèle et les données expérimentales nous amène à penser que les molécules octupolaires constituant le cristal n'ont pas toutes la même direction quand on intègre sur la profondeur de focalisation. Tout en ayant leur plan moléculaire parallèle à la base hexagonale, leur direction ψ varie d'environ 45° sur une distance de l'ordre du micron, correspondant à la résolution verticale de notre analyse microscopique. Ceci vient probablement de l'empilement décalé des molécules au niveau de la



FIG. 4.27 – Diagrammes polaires donnant l'intensité de GSH émis par le cristal de TTB dans les deux états de polarisation X (en gris foncé) et Y (en gris clair) en fonction de la polarisation incidente, pour six orientations du cristal disposé sur sa face (001). La puissance du faisceau incident était de 56 μ W à 1028 nm. Les courbes théoriques ont été obtenues avec comme paramètres communs $\theta = 0^{\circ}$, $\Delta \psi = 45^{\circ}$. L'orientation du cristal dans chacun des cas est donnée par: (a) $\phi = -5^{\circ}$, (b) $\phi = -2^{\circ}$, (c) $\phi = 7^{\circ}$, (d) $\phi = 25^{\circ}$, (e) $\phi = 34^{\circ}$ et (f) $\phi = 90^{\circ}$.

maille cristalline. En effet, la figure 4.13b met en évidence un axe d'ordre 3 avec un miroir perpendiculaire qui conduit à un pseudo-axe hélicoïdal. Celui-ci est sans doute à l'origine du pouvoir rotatoire du cristal de TTB. Nous avons en effet observé qu'un cristal de quelques millimètres d'épaisseur fait tourner la polarisation d'un faisceau laser He:Ne d'environ 10° (mod π) lorsque sa base hexagonale est perpendiculaire au faisceau.

4.3.5 Efficacité de la GSH: comparaison avec le cristal de POM

A partir des précédentes mesures, nous allons comparer l'efficacité des cristaux de POM et de TTB pour la génération du second harmonique. Cela revient à comparer les valeurs relatives de la norme $||d|| = \sqrt{d_{ijk}^2}$ du tenseur macroscopique d défini pour chacun des cristaux par $d_{ijk} = \frac{1}{2}\chi_{ijk}^{(2)}$ [45], le facteur 1/2 étant conventionnellement lié à la dégénérescence du processus de mélange de fréquences à trois ondes $\omega + \omega \rightleftharpoons 2\omega$. En appliquant le modèle de gaz orienté [90], le tenseur de susceptibilité non-linéaire dest relié au tenseur d'hyperpolarisabilité β de la maille cristalline selon la relation :

$$d_{ijk} = N f_i^{2\omega} f_j^{\omega} f_k^{\omega} \beta_{ijk}, \qquad (4.15)$$

où N représente la densité moléculaire, et (f_i, f_j, f_k) les facteurs correctifs de champ local. Conformément au modèle de LORENTZ-LORENZ, ces facteurs s'expriment en fonction de l'indice de réfraction n_i par [94]:

$$f_i^{\omega} = \frac{(n_i^{\omega})^2 + 2}{3}.$$
(4.16)

Nous allons supposer que la dispersion des indices de réfraction n_i^{ω} est négligeable et qu'ils sont tous égaux à 1,5, négligeant également l'anisotropie du cristal². Les facteurs correctifs f_i sont alors tous égaux entre eux et les propriétés de symétrie du tenseur dsont les mêmes que celles du tenseur d'hyperpolarisabilité β . Ces approximations justifient l'expression (4.11) utilisée pour calculer l'intensité $\mathcal{I}_I^{\text{GSH}}$. Le facteur multiplicatif intervenant dans cette expression, où nous avons pris soin de normaliser à l'unité le tenseur β et le champ incident \vec{E} , est alors proportionnel à $||d||^2 P_{\text{inc}}^2$, où P_{inc} représente la puissance du faisceau infrarouge incident.

^{2.} Dans le cas de la molécule de TTB, la symétrie octupolaire conduit effectivement à $n_1 = n_2$ dans le plan (001) correspondant au plan moléculaire. Les indices de réfraction du cristal de POM sont $n_a = 1,750, n_b = 1,997$ et $n_c = 1,660$ à 532 nm [12].

Pour comparer les niveaux de signaux générés par les cristaux de POM et de TTB, nous avons travaillé dans les mêmes conditions expérimentales, c'est-à-dire à la même longueur d'onde d'excitation $\lambda = 1028$ nm, avec le même réglage des détecteurs et en utilisant le même filtre (figures 4.6-4.7 et 4.26). Nous avons cherché pour ces mesures à utiliser la longueur d'onde la plus grande possible, de façon à s'éloigner le plus possible de la bande d'absorption de la molécule de TBB, dont le maximum d'absorption se situe autour de 495 nm (figure 4.12a). L'ajustement des réponses en polarisation a donné un coefficient de proportionnalité égal à 10⁷ pour le cristal de POM et 4×10^5 pour le cristal de TTB. Les puissances infrarouges incidentes utilisées étaient en revanche très différentes : 4,6 mW et 56 μ W respectivement. De ces valeurs, on en déduit qu'à 1028 nm :

$$\|d\|_{\rm TTB} \approx \sqrt{\frac{4 \times 10^5}{10^7}} \frac{4.6}{0.056} \, \|d\|_{\rm POM} = 16 \times \|d\|_{\rm POM}. \tag{4.17}$$

Ce simple calcul montre que le TTB est un cristal non-linéaire particulièrement efficace. Nous sommes cependant encore très proches de la résonance du TTB et il est nécessaire de corriger cet effet en utilisant le modèle à deux niveaux avec $\lambda_{\text{max}} = 343$ nm pour le POM [44] et le modèle à trois niveaux dégénérés avec $\lambda_{\text{max}} = 495$ nm pour le TTB [93]. Le module du tenseur $||d||^{(0)}$ à la fréquence zéro est ainsi obtenu avec la relation :

$$\|d\| = \frac{\|d\|^{(0)}}{(1 - \frac{\lambda_{\max}^2}{\lambda^2})(1 - 4\frac{\lambda_{\max}^2}{\lambda^2})},\tag{4.18}$$

de sorte que finalement :

$$\|d\|_{\text{TTB}}^{(0)} \approx 1.8 \times \|d\|_{\text{POM}}^{(0)}.$$
 (4.19)

Connaissant les densités moléculaires des deux cristaux qui valent respectivement $5,97 \times 10^{21}$ et $9,92 \times 10^{20}$ molécules/cm³ pour le POM et pour le TTB et en négligeant tout effet dû au champ local, on peut comparer les normes des hyperpolarisabilités moléculaires et on obtient :

$$\|\beta\|_{\text{TTB}}^{(0)} \approx 11 \times \|\beta\|_{\text{POM}}^{(0)}.$$
 (4.20)

La structure octupolaire de la molécule de TTB permet donc effectivement d'obtenir une forte non-linéarité du second ordre. La comparaison effectuée doit cependant être prise de manière semi-quantitative, et les résultats obtenus ne constituent qu'un ordre de grandeur. En effet, notre dispositif expérimental n'est pas adapté pour faire des mesures précises d'hyperpolarisabilité, étant donné que les niveaux de signaux sont très sensibles à la focalisation du faisceau laser incident, au positionnement du cristal sur la lamelle de microscope, à l'absorption des cristaux et à la qualité optique des échantillons étudiés. Une partie du rayonnement de GSH à 514 nm émis par le cristal de TTB est en particulier absorbé, étant donnée la large bande d'absorption qui s'étend jusqu'à 550 nm. Une estimation de la longueur de pénétration optique de 60 nm – mesurée en translatant l'échantillon suivant l'axe Z – donne en tenant compte de l'absorption du cristal $\|\beta\|_{\text{TTB}}^{(0)} \approx 40 \times \|\beta\|_{\text{POM}}^{(0)}$.

4.4 Cristal non-linéaire ionique DAST

Dans cette dernière partie, nous allons étudier un cristal non-linéaire ionique, constitué du sel de 4-N,N-diméthylamino-4'-N'-méthyl-stilbazolium *p*-toluènesulfonate (DAST), dont la formule développée est représentée sur la figure 4.28a. Ce cristal est en effet particulièrement intéressant, car il constitue l'un des systèmes organiques les plus efficaces aujourd'hui pour l'optique non-linéaire, grâce à la conjugaison de deux effets : tandis que le cation stilbazolium comporte une forte hyperpolarisabilité β grâce à un transfert de charge facilité par la présence de la charge \oplus^3 , le contre-ion favorise la cristallisation selon une structure non-centrosymétrique du fait des interactions coulombiennes qui prennent le pas sur les interactions dipôle-dipôle.

Le sel ionique a été synthétisé indépendamment par l'équipe de S.R. MARDER [95] et



FIG. 4.28 – (a) Formule développée du sel ionique 4-N,N-diméthylamino-4'-N'-méthylstilbazolium p-toluènesulfonate (DAST). (b) Photographie du cristal de DAST fourni par D. KOBAYASHI.

celle de H. NAKANISHI [96] en 1989. À l'état de poudre, le DAST apparaît déjà très efficace vis-à-vis de la génération du second harmonique avec une hyperpolarisabilité $\beta = 360 \times 10^{-30}$ esu à 1064 nm dans le méthanol [97]. Pour comparaison, la molécule

^{3.} Les deux formes conjuguées du cation ont pratiquement la même énergie, contrairement aux molécules dont la forme conjuguée faisant apparaître des charges est plus haute en énergie que la forme neutre.

de DR1, réputée comme très efficace pour la génération du second harmonique, a une hyperpolarisabilité de 69×10^{-30} esu.

Le cristal de DAST que nous avons analysé (figure 4.28b) est celui synthétisé par



FIG. 4.29 – Spectre d'absorption d'un film cristallin de DAST. Cette figure provient de la Réf. [98].

l'équipe de D. KOBAYASHI (Tohoku Univ. Research Inst. of Electrical Communication – Japon). Il apparaît vert en réflexion et rouge en transmission. Le DAST absorbe en effet beaucoup dans le visible, comme le montre son spectre d'absorption (figure 4.29). Le cristal de DAST est à la fois fluorescent – le maximum de fluorescence se situe autour de 630 nm – et non-linéaire lorsque la longueur d'onde du faisceau incident est de l'ordre du micron.

4.4.1 Maille cristalline du DAST et réponse optique

La cristallisation du DAST est aujourd'hui bien maîtrisée, conduisant à la fabrication de cristaux relativement gros $(1 \times 1 \times 0.1 \text{ cm}^3)$ et de bonne qualité optique [99, 100, 101]. La structure cristalline a été étudiée en détail [103]. Elle appartient au groupe de symétrie monoclinique Cc et des études par diffraction aux rayons X ont montré que les grandes faces planes contiennent le plan (\vec{a}, \vec{b}) de la maille, les vecteurs \vec{a} et \vec{b} correspondant aux diagonales (figure 4.30a). La maille cristalline, représentée sur la figure 4.30b, comporte 4 cations/anions et a pour dimension a = 10,365 Å, b = 11,322 Å et c = 17,893 Å. On peut considérer que la maille est pratiquement orthorhombique puisque $\alpha = 90^{\circ}$, $\beta = 92,24^{\circ}$ et $\gamma = 90^{\circ}$, ce qui nous conduit à confondre le repère de la maille cristalline $(\vec{a},\vec{b},\vec{c})$ et le repère (1,2,3). La structure noncentrosymétrique du cristal provient de la formation de couches alternées de cations et d'anions. En effet, les interactions sont de nature coulombienne et la présence d'un anion intercalé entre deux cations permet à ceux-ci d'être orientés dans la même di-



FIG. 4.30 – (a) Orientation des axes $(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$ de la maille cristalline du DAST par rapport à la géométrie du cristal. Cette figure est issue de la Réf. [99]. (b) Représentation tridimensionnelle de la maille cristalline. Cette figure est issue de la Réf. [102].



FIG. $4.31 - Représentation schématique de la maille cristalline du DAST dans le plan <math>(\vec{a}, \vec{b})$. Cette figure provient de la Réf. [103].

rection, contrairement aux interactions purement dipolaires. Notons que le cristal de DAST perd ses propriétés non-linéaires lorsqu'il est hydraté, l'échantillon prenant alors une coloration orangée.



FIG. 4.32 – Orientation du moment dipolaire dans le cristal de DAST: (a) dans le plan (\vec{a}, \vec{b}) et (b) dans le plan (\vec{a}, \vec{c}) . Cette figure provient de la Réf. [104].

Il est possible de calculer géométriquement les composantes des tenseurs d'ordre 2, 3 et 4 correspondant aux susceptibilités α , β et γ de la maille cristalline. Elles sont données par la somme des tenseurs $\alpha^{(n)}$, $\beta^{(n)}$ et $\gamma^{(n)}$ associés à chacun des couples anions/cations constituant la maille et exprimés dans le repère (1,2,3):

$$\alpha_{ij} = \sum_{n=1}^{4} \alpha_{ij}^{(n)} \quad \text{avec} \quad \alpha_{ij}^{(n)} \propto \cos(i,n) \cos(j,n) \tag{4.21}$$

$$\beta_{ijk} = \sum_{n=1}^{4} \beta_{ijk}^{(n)} \quad \text{avec} \quad \beta_{ijk}^{(n)} \propto \cos(i,n) \cos(j,n) \cos(k,n) \tag{4.22}$$

$$\gamma_{ijkl} = \sum_{n=1}^{4} \gamma_{ijkl}^{(n)} \quad \text{avec} \quad \gamma_{ijkl}^{(n)} \propto \cos(i,n) \cos(j,n) \cos(k,n) \cos(l,n) \tag{4.23}$$

Dans ces expressions, $\cos(i,n)$ représente la projection de l'axe n sur l'axe i du repère cristallin (1,2,3). Les différents angles intervenant dans l'expression des tenseurs sont obtenus en considérant la projection de la maille cristalline dans le plan (\vec{a},\vec{b}) et dans le plan (\vec{a},\vec{c}) . Ces projections, représentées sur les figures 4.31 et 4.32, montrent que les moments dipolaires associés à chacun des couples anions/cations font un angle de $\pm 20^{\circ}$ par rapport à l'axe \vec{a} dans le plan (\vec{a},\vec{b}) et un angle de 35° par rapport à l'axe \vec{a} dans le plan (\vec{a},\vec{c}) . Les composantes non-nulles des tenseurs α , β et γ , calculées à partir des angles précédents, sont répertoriées dans le tableau ci-après :

Tenseur	Composantes non nulles	Valeurs normalisées
α	α_{11}	0,67
	α_{22}	0,13
	α_{33}	0,33
	$\alpha_{13} = \alpha_{31}$	$0,\!47$
β	β_{111}	0,54
	eta_{333}	0,18
	$\beta_{122} = \beta_{212} = \beta_{221}$	$0,\!11$
	$\beta_{133} = \beta_{313} = \beta_{331}$	0,26
	$\beta_{311} = \beta_{131} = \beta_{113}$	$0,\!38$
	$\beta_{322} = \beta_{232} = \beta_{223}$	$0,\!07$
γ	<i>γ</i> ₁₁₁₁	0,43
	γ_{2222}	$0,\!02$
	γ_{3333}	0,10
	$\gamma_{1333} = \gamma_{3133} = \gamma_{3313} = \gamma_{3331}$	$0,\!15$
	$\gamma_{1113} = \gamma_{1131} = \gamma_{1311} = \gamma_{3111}$	$0,\!30$
	$\gamma_{1122} = \gamma_{1212} = \gamma_{1221} = \gamma_{2112} = \gamma_{2121} = \gamma_{2211}$	0,08
	$\gamma_{1133} = \gamma_{1313} = \gamma_{1331} = \gamma_{3113} = \gamma_{3131} = \gamma_{3311}$	$0,\!21$
	$\gamma_{3322} = \gamma_{3232} = \gamma_{3223} = \gamma_{2332} = \gamma_{2323} = \gamma_{2233}$	0,04
	$\gamma_{2213} = \gamma_{2231} = \gamma_{2132} = \gamma_{2321} = \gamma_{2123} = \gamma_{2312}$	
	$= \gamma_{3221} = \gamma_{1223} = \gamma_{1232} = \gamma_{3212} = \gamma_{1322} = \gamma_{3122}$	0,06

Nous avons choisi de calculer de façon géométrique les composantes des tenseurs α , β et γ en utilisant le modèle de gaz orienté. En effet, les valeurs trouvées dans la littérature ne concernaient que le tenseur d pour des longueurs d'onde ne correspondant pas à notre radiation infrarouge incidente. Ces valeurs n'étaient d'ailleurs pas toujours cohérentes d'une publication à l'autre [103]. Notons cependant que les valeurs numériques obtenues sont de simples estimations. La symétrie de Kleinman n'est en particulier pas vérifiée dans le cas du cristal de DAST, car les longueurs d'onde d'absorption maximum ne sont pas identiques dans les trois directions de propagation liées aux axes (1,2,3) du cristal : $\lambda_1^{\max} = 700 \text{ nm}, \lambda_2^{\max} = 650 \text{ nm et } \lambda_3^{\max} = 590 \text{ nm [99]}.$ Cette propriété est certainement liée à la forte biréfringence du cristal.

À partir des composantes calculées précédemment, nous pouvons obtenir les expressions des tenseurs α , β et γ dans le repère (X,Y,Z) (cf. annexe E.3, page 181) et ensuite évaluer les intensités de fluorescence à deux photons et de GSH.

4.4.2 Résultats expérimentaux

Nous avons procédé à l'analyse en polarisation de la fluorescence à deux photons et de la GSH émises par un cristal de DAST disposé selon sa face (001) sur la lamelle de microscope. Les mesures ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles relatives au cristal octupolaire de TTB, de façon à pouvoir comparer l'efficacité des deux cristaux vis-à-vis de la génération du second harmonique. Avec une longueur d'onde incidente de 1028 nm, les signaux de FDP et de GSH sont bien séparés spectralement. Les diagrammes polaires, correspondant à différentes orientations du cristal et rassemblés sur la figure 4.33, ont été obtenus avec une puissance incidente de 212 μ W pour la FDP et de 18 μ W pour la GSH.

Nous avons dans un premier temps confirmé la très bonne qualité optique du cristal, en vérifiant que les mesures effectuées en différents points du cristal donnaient les mêmes diagrammes polaires.

Les ajustements théoriques, calculés avec les angles $\theta = 3,2^{\circ}, \phi = 0^{\circ}$ et en variant l'angle ψ , permettent d'une part, de restituer l'orientation donnée au cristal lors des mesures, et d'autre part, de reproduire relativement bien les diagrammes expérimentaux. On remarque cependant que les ajustements relatifs à la fluorescence à deux photons sont moins bons que ceux concernant la GSH. Nous attribuons cela au caractère biréfringent du cristal ($n_1 = 2,46, n_2 = 1,68$ et $n_3 = 1,61$ à 805 nm d'après la Réf. [105]) et au coefficient d'absorption qui est différent suivant la direction de propagation [99]. Ces deux phénomènes, qui ne sont pas pris en compte dans notre modèle, affectent davantage les signaux de fluorescence. Nous avons en effet observé expérimentalement que le point de focalisation, pour lequel l'intensité de FDP détectée est maximale, est situé plus profondément dans le volume du cristal que pour la GSH, avec un écart de l'ordre de 5 μ m. La raison de cette différence est certainement le compromis entre émission et absorption.

Nous pouvons finalement faire une comparaison entre l'efficacité des différents cristaux non-linéaires étudiés. L'ajustement des réponses en polarisation de la génération du second harmonique donne un coefficient de proportionnalité égal à $2,5 \times 10^4$ avec une puissance incidente de 18 μ W à 1028 nm (cf. page 108 pour la comparaison avec les cristaux de POM et de TTB). On en déduit qu'à cette longueur d'onde :

$$\|d\|_{\text{DAST}} \approx 13 \times \|d\|_{\text{POM}} \approx 0.8 \times \|d\|_{\text{TTB}},\tag{4.24}$$

en négligeant les contributions des facteurs de champ local et de la forte absorption de la GSH par le cristal de DAST à 514 nm. En utilisant le modèle à deux niveaux avec



FIG. 4.33 – Diagrammes polaires représentant les intensités de fluorescence et de GSH dans les états de polarisation X et Y émises par un cristal de DAST disposé selon sa face (001). Les points expérimentaux ont été obtenus avec une longueur d'onde incidente de 1028 nm et une puissance incidente de 212 μ W pour la fluorescence et de 18 μ W pour la GSH. Les courbes théoriques ont été calculées avec $\theta = 3,2^{\circ}, \phi = 0^{\circ}$ et $\psi = -45^{\circ}, -25^{\circ}, -3^{\circ},0^{\circ},11^{\circ}$ et 42°, comme indiqué schématiquement sur la figure.

une longueur d'onde d'absorption maximale de 650 nm, on obtient à la fréquence zéro :

$$\|d\|_{\text{DAST}}^{(0)} = 9 \times \|d\|_{\text{POM}}^{(0)} = 5 \times \|d\|_{\text{TTB}}^{(0)}.$$
(4.25)

La densité moléculaire du cristal de DAST étant égale à 5.25×10^{20} molécules/cm³, on obtient finalement une estimation des hyperpolarisabilités :

$$\|\beta\|_{\text{DAST}}^{(0)} = 100 \times \|\beta\|_{\text{POM}}^{(0)} = 9 \times \|\beta\|_{\text{TTB}}^{(0)}.$$
(4.26)

Le cristal de DAST est donc un cristal non-linéaire particulièrement efficace, alors que l'arrangement des molécules dans la structure cristalline de DAST est moins bien optimisée que dans celle du cristal octupolaire de TTB. Par ailleurs, il présente un seuil de dommage beaucoup plus élevé que le cristal de TTB et il est possible de l'exposer à une fluence de 0,4 J·cm⁻² à la cadence de répétition de 86 Mz (soit une puissance incidente moyenne de l'ordre de 100 mW), sans qu'il n'apparaisse de phénomène de photo-destruction. Le cristal de DAST offre ainsi des perspectives d'applications très intéressantes, comme convertisseur de fréquences dans les guides d'onde ou comme modulateur électro-optique [106]. Ce cristal présente en effet de larges coefficients électrooptiques [103]. Notons qu'aujourd'hui, des laboratoires tentent d'obtenir des nanocristaux organiques de DAST, par photomodification sous impulsion laser intense [107]. Ces recherches pourraient aboutir à la réalisation de nanocristaux moléculaires nonlinéaires efficaces et manipulables. Compte tenu de la robustesse et de l'efficacité de ce cristal, nous l'avons pour notre part utilisé comme système modèle pour la détection cohérente de la GSH (cf. chapitre 6).

Chapitre 5

Réponse en polarisation d'objets nanométriques

Les études précédentes ont montré l'utilité de mesures conjointes de la génération du second harmonique et de la fluorescence à deux photons, et de leur analyse en polarisation. À partir des symétries cristallines plus ou moins simples, il a été possible de mettre en évidence l'orientation des molécules à l'intérieur des cristaux de taille millimétrique. Dans ce chapitre, nous allons décrire des mesures du même type, effectuées maintenant sur des objets de très petite taille, en tirant parti de la bonne résolution du montage de microscopie à deux photons.

Nous nous intéresserons dans un premier temps à l'étude de nanocristaux organiques. La connaissance précise de leur orientation permettrait en effet de les utiliser comme des sondes, pour étudier des dynamiques de diffusion orientationnelle ou des effets de ré-orientations à l'approche de champs électriques. Nous allons également voir que d'autres informations peuvent être tirées de ces mesures, en particulier la nature monoou poly-cristalline des structures moléculaires analysées.

La technique d'analyse en polarisation sera ensuite appliquée à des sphères de latex chargées en molécules fluorescentes et non-linéaires, de taille nanométrique. Nous chercherons à interpréter les résultats obtenus, en modélisant l'orientation des molécules à l'intérieur des sphères.

5.1 Nanocristaux de CMONS

Nous avons analysé des échantillons comportant des nanocristaux constitués de molécules de α -[(4-méthoxyphényl)méthylène]-4-nitrobenzèneacétonitrile (CMONS), dont la formule développée est représentée sur la figure 5.1. Cette molécule, qui comporte un groupe donneur (-nitro), un groupe accepteur d'électrons (méthoxy-) ainsi



FIG. 5.1 – Formule développée de la molécule de CMONS.

qu'un système conjugué permettant le transfert de charge intramoléculaire, a été conçue pour ses propriétés non-linéaires du second ordre [108, 109]. De plus, si le CMONS n'est pas fluorescent en solution due à une photoisomérisation rapide [110], il le devient à l'état solide, comme le montre le spectre de la figure 5.2 obtenu en enregistrant le spectre d'émission d'un nanocristal.



FIG. 5.2 – Spectre d'émission d'un nanocristal de CMONS, composé d'une large bande de fluorescence avec un maximum d'émission autour de 570 nm et d'un pic de GSH à 493,5 nm. Ce spectre a été obtenu avec un faisceau infrarouge incident de 4,2 mW à 987 nm.

Les échantillons étudiés ont été élaborés dans le cadre de la thèse de E. BOTZUNG-APPERT au Laboratoire de Cristallographie de Grenoble dirigé par A. IBANEZ, selon une méthode originale de nanocristallisation des molécules de CMONS dans les pores d'une matrice sol-gel [111, 112]. Ces films sont obtenus en déposant par centrifugation sur une lamelle de microscope, une solution d'alkoxydes de silicium précurseurs du gel (tétraméthoxysilane et méthyltriméthoxysilane), d'eau et de CMONS dans un solvant organique de tétrahydrofurane. La nucléation, la croissance de la phase organique ainsi que la polymérisation de la matrice sol-gel qui empêche la coalescence des nanocristaux se font simultanément au moment du dépôt. Les échantillons sont alors recuits afin d'éliminer les solvants résiduels et d'améliorer la qualité cristalline



FIG. 5.3 – (a) Image réalisée en microscopie optique confocale d'une couche mince contenant des nanocristaux de CMONS dans une matrice sol-gel. (b) Coupe verticale de la couche mince de sol-gel précédente. Images fournies par A. IBANEZ.

des agrégats. On obtient ainsi des films minces d'épaisseur 1 μ m environ. Les agrégats moléculaires peuvent être visualisés par microscopie confocale (figure 5.3), leur taille et leur concentration variant avec la vitesse de rotation de la tournette et la fraction molaire CMONS:alkoxydes dans la solution de départ.

5.1.1 Maille cristalline du CMONS et réponse optique

Les différentes phases cristallines ont été identifiées par N. SANZ [113]. De plus, une étude par diffraction aux rayons X a montré que le CMONS, dans sa conformation trans, peut cristalliser selon trois variétés allotropiques I, II et III [114]. La molécule étant à peu près planaire et les interactions intermoléculaires faibles – elles sont essentiellement créées par des forces de van der Waals –, les trois formes cristallines sont constituées d'une superposition de plans moléculaires correspondant à une structure en feuillets (figure 5.4). Seules les formes II et III, appartenant au groupe de symétrie monoclinique Cc, ont une structure non-centrosymétrique et peuvent par conséquent



FIG. 5.4 – Représentation de la maille cristalline selon un plan molculaire: (a) forme I: plan ($10\overline{5}$), (b) forme II: plan ($10\overline{2}$), (c) forme III: plan ($11\overline{1}$). Ces figures sont issues de la réf. [114].

émettre de la GSH¹. Leur structure cristalline étant très proche, un même modèle de maille sera utilisé. Celui-ci, défini dans le repère cristallin (1,2,3), est constitué de quatre molécules de CMONS considérées comme des molécules de type "bâtonnet" et disposées en chevron dans le plan (1,2), avec un angle d'inclinaison de 25,5° par rapport à l'axe 2, l'inclinaison des molécules par rapport au plan (1,2) étant négligée (figure 5.5). À partir de ce modèle, il est possible de calculer les composantes des ten-



FIG. 5.5 – Représentation de la maille des cristaux II et III de CMONS dans le repère cristallin (1,2,3). Elle est constituée de quatre molécules contenues dans le plan (1,2) et inclinées d'un angle de 25,5° par rapport à l'axe 2. Nous négligeons ici l'inclinaison des molécules par rapport au plan (1,2), celle-ci étant très faible (inférieure à 10°).

seurs d'ordre 2, 3 et 4, représentant les susceptibilités non-linéaires α , β , γ , comme cela

^{1.} La phase I centrosymétrique appartient au groupe de symétrie $P_{2_{1/n}}$.

Tenseur	Composantes non nulles	Valeurs normalisées
$\overline{\alpha}$	α_{11}	0,22
	$lpha_{22}$	$0,\!98$
$\overline{\beta}$	β_{222}	0,93
	$\beta_{112} = \beta_{121} = \beta_{211}$	$0,\!21$
$\overline{\gamma}$	γ_{1111}	0,05
	γ_{2222}	$0,\!87$
	$\gamma_{1122} = \gamma_{1212} = \gamma_{1221} = \gamma_{2112} = \gamma_{2121} = \gamma_{221}$	0,20

a été fait pour le cristal de DAST. Les composantes normalisées de ces tenseurs sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

A partir des composantes calculées précédemment, nous pouvons obtenir les expressions des tenseurs α , β et γ dans le repère macroscopique (X,Y,Z) (cf. annexe E.4, page 183) et ensuite évaluer les intensités de FDP et de GSH dans les états de polarisation Xet Y.

5.1.2 Mise en oeuvre de l'analyse en polarisation

Pour procéder séparément à l'analyse en polarisation des signaux de GSH et de FDP, on a introduit dans le dispositif expérimental un filtre supplémentaire qui sélectionne l'un ou l'autre des signaux, comme le montre la figure 5.6. On remarque cependant, sur



FIG. 5.6 – Spectre des signaux émis par un nanocristal de CMONS et détectés par les photodiodes, lorsque l'on ajoute dans le dispositif un filtre permettant de sélectionner soit la FDP (a), soit la GSH produite par une excitation à 987 nm (b).

la figure 5.2 que le pic de GSH à 493,5 nm n'est pas parfaitement séparé de la bande de fluorescence. En effet, il n'a pas été possible expérimentalement de l'en écarter davantage, compte tenu de la limitation en longueur d'onde du laser Ti:Sa². Il est donc nécessaire, pour traiter les données relatives au second harmonique, de soustraire la partie résiduelle de fluorescence à deux photons transmise par le filtre. Des mesures en polarisation, effectuées sur un nanocristal ne donnant que de la fluorescence, ont permis d'évaluer ce biais dans la mesure de la GSH. Il correspond à 7 % des signaux reccueillis avec le filtre de fluorescence sur les deux voies X et Y. Les données présentées par la suite tiennent compte de cette correction.

La figure 5.7 rassemble quelques cartographies des signaux de FDP et de GSH, obtenues avec différents échantillons. Ces échantillons diffèrent par la fraction molaire CMONS:alkoxydes (variant de 2×10^{-3} à 6×10^{-3}) des solutions utilisées lors du dépôt. On observe ainsi l'influence de cette fraction molaire sur la répartition et la taille des nanocristaux. Dans le cas des échantillons de plus faible fraction molaire, la forme des "spots" n'est pas reliée à celle des nanocristaux qui peuvent être considérés comme quasiment ponctuels par rapport à la résolution du microscope, mais à la répartition de l'intensité du faisceau laser, dans le plan focal de l'objectif.

La présence d'un ordre cristallin non-centrosymétrique se traduit directement par l'émission de GSH. Sur les cartographies présentées ici, la plupart des nanocristaux donnent à la fois de la FDP et de la GSH, preuve de l'existence d'une structure cristalline non-centrosymétrique correspondant aux variétés allotropiques II et III du cristal de CMONS et favorisée par les conditions expérimentales du dépôt par centrifugation. En fait, une étude statistique effectuée à partir des spectres d'un grand nombre de nanocristaux montre qu'environ 40 % d'entre eux émettent effectivement de la GSH. Ceux qui sont fluorescents et inactifs en GSH peuvent comporter une structure cristalline centrosymétrique (forme I) ou correspondre à un amas de molécules de CMONS non cristallisé et centrosymétrique (la diffusion hyper-Rayleigh n'est pas détectable non plus). Par la suite, tous les diagrammes polaires donnant les intensités \mathcal{I}_x et \mathcal{I}_Y de FDP et de GSH en fonction de la polarisation incidente (figures 5.8, 5.12 et 5.13), sont issus de nanocristaux uniques, bien isolés dans le film sol-gel. Ils ont été obtenus avec un faisceau infrarouge incident de quelques mW, sans qu'il n'apparaisse de photodestruction.

^{2.} Le laser femtoseconde Tsunami Spectra Physics utilisé est équipé d'un jeu de miroirs adapté à l'infrarouge lointain, en dehors de la plage de fonctionnement plus habituelle de ce laser.



FIG. 5.7 – Cartographies des signaux de FDP et de GSH de trois échantillons de CMONS, qui diffèrent par la fraction molaire d = CMONS: alkoxydes de la solution utilisée lors du dépôt. La longueur d'onde du faisceau infrarouge incident était de 987 nm. (a) $d = 2 \times 10^{-3}$, $P_{(\text{Ti:Sa})} = 18 \text{ mW}$. (b) $d = 4 \times 10^{-3}$, $P_{(\text{Ti:Sa})} = 12 \text{ mW}$. (c) $d = 6 \times 10^{-3}$, $P_{(\text{Ti:Sa})} = 640 \mu W$.

5.1.3 Cas de nanocristaux monocristallins

Analyse en polarisation

Environ 30 % des nanocristaux générant du second harmonique, fournissent des diagrammes en FDP proportionnels dans les deux états de polarisation X et Y (figure 5.8). Compte tenu de la modélisation effectuée au chapitre 4 (cf. paragraphe 4.1.2, page 81), cette observation est la signature directe d'une structure monocristalline. Pour ces cas, il est effectivement possible de déterminer un triplet (θ, ϕ, ψ) tel que les fonctions $\mathcal{I}_X^{\text{GSH}}$, $\mathcal{I}_Y^{\text{GSH}}$, $\mathcal{I}_X^{\text{Fluo}}$ et $\mathcal{I}_Y^{\text{Fluo}}$ reproduisent la forme des diagrammes obtenus. Le tableau suivant répertorie les valeurs des trois angles déterminés à partir des diagrammes de la figure 5.8:

Nanocristal	$\theta(^{\circ})$	$\phi(^{\circ})$	$\psi(^{\circ})$
CMONS 1	80	80	110
CMONS 3	55	170	74
CMONS 4	60	115	5
CMONS 6	45	30	90
CMONS 11	80	0	140
CMONS 12	45	45	40
CMONS 14	50	60	70

Le fait d'analyser simultanément les données relatives au second harmonique et à la fluorescence à deux photons dans les deux états de polarisation X et Y, a ainsi permis de déterminer de façon univoque le triplet (θ, ϕ, ψ) . En effet, les trois paramètres sont déterminés à partir de l'ajustement de quatre courbes.



FIG. 5.8 – Diagrammes polaires représentant les intensités de FDP et de GSH dans les états de polarisation X et Y de nanocristaux monocristallins, en fonction de la polarisation incidente. Dans ce cas, les deux diagrammes obtenus avec la FDP sont proportionnels. Pour chaque nanocristal, un seul et même triplet (θ, ϕ, ψ) a été utilisé pour tracer les quatre courbes théoriques modélisant les observations expérimentales.

Comparaison avec les mesures d'anisotropie de fluorescence

Nous allons montrer que cette technique d'analyse en polarisation apporte des informations supplémentaires par rapport aux mesures d'anisotropie traditionnelles. Avec notre dispositif, il est possible de mesurer, aussi bien avec la GSH qu'avec la FDP, deux types de contraste de polarisation définis comme suit :

$$\mathcal{P}_{1}(\theta, \phi, \psi) = \frac{I_{X}(\alpha = 0^{\circ}) - I_{Y}(\alpha = 90^{\circ})}{I_{X}(\alpha = 0^{\circ}) + I_{Y}(\alpha = 90^{\circ})}$$
(5.1)

$$\mathcal{P}_{2}(\theta,\phi,\psi) = \frac{I_{X}(\alpha=0^{\circ}) - I_{Y}(\alpha=0^{\circ})}{I_{X}(\alpha=0^{\circ}) + I_{Y}(\alpha=0^{\circ})}.$$
(5.2)

Ces contrastes de polarisation sont couramment utilisés en mesure de fluorescence polarisée. On peut alors tracer, pour une valeur donnée de l'angle θ , les points dans le plan (ϕ, ψ) tels que les valeurs des contrastes de polarisation $\mathcal{P}_1^{\text{GSH}}$, $\mathcal{P}_1^{\text{Fluo}}$ $\mathcal{P}_2^{\text{GSH}}$ et $\mathcal{P}_2^{\text{Fluo}}$ correspondent à celles mesurées expérimentalement. Remarquons que ces courbes se décomposent en deux tronçons symétriques. En effet, les triplets (θ, ϕ, ψ) et $(\theta, \pi - \phi, \pi - \psi)$ sont associés aux mêmes contrastes de polarisation. Or, ces deux triplets correspondent à des diagrammes polaires différents, puisqu'ils sont dans ce cas symétriques par rapport à l'axe X. On voit d'ores et déja que l'analyse en polarisation est beaucoup plus sélective pour la détermination du triplet (θ, ϕ, ψ) . Comme le montrent les figures 5.9 et 5.10, l'intersection des courbes $\mathcal{P}_1^{\text{GSH}}$ et $\mathcal{P}_1^{\text{Fluo}}$ conduisent à un grand nombre de couples de valeurs (ϕ, ψ) . Par contre, les courbes $\mathcal{P}_2^{\text{GSH}}$ et $\mathcal{P}_2^{\text{Fluo}}$ se croisent en un nombre fini de doublets (ϕ, ψ) , en l'occurence quatre doublets dans les deux cas étudiés ici. Si l'on trace les réponses en polarisation associés à ces points (on se restreint à deux points du fait de la symétrie des courbes), on se rend compte en pratique qu'un seul d'entre eux permet de reproduire correctement les données expérimentales. Ceci montre bien l'efficacité de notre analyse en polarisation pour la détermination de l'orientation de la structure monocristalline au sein de la matrice sol-gel.



FIG. 5.9 – (a) Courbes expérimentales et ajustements théoriques de la réponse en polarisation d'un nanocristal de CMONS dont l'orientation est $(55^{\circ}, 170^{\circ}, 74^{\circ})$. Le nanocristal considéré est le n°3 de la figure 5.8. (b) Courbes $\phi(\psi)$ tracées avec $\theta = 55^{\circ}$, $\mathcal{P}_1^{GSH} = -0,44, \mathcal{P}_1^{Fluo} = -0,388, \mathcal{P}_2^{GSH} = -0,92$ et $\mathcal{P}_2^{Fluo} = -0,054$. Les points relatifs à la GSH (resp. FDP) sont tracés en gris (resp. noir). Réponses en polarisation correspondant aux points d'intersection des courbes grise et noire: (c) $(55^{\circ},170^{\circ},74^{\circ})$ et (d) $(55^{\circ},134^{\circ},86^{\circ})$.



FIG. 5.10 – (a) Courbes expérimentales et ajustements théoriques de la réponse en polarisation d'un nanocristal de CMONS dont l'orientation est $(45^{\circ}, 45^{\circ}, 40^{\circ})$. Le nanocristal considéré est le n°12 de la figure 5.8. (b) Courbes $\phi(\psi)$ tracées avec $\theta = 45^{\circ}$, $\mathcal{P}_1^{GSH} = 0.942, \mathcal{P}_1^{Fluo} = 0.911, \mathcal{P}_2^{GSH} = 0.844$ et $\mathcal{P}_2^{Fluo} = 0.451$. Les points relatifs à la GSH (resp. FDP) sont tracés en gris (resp. noir). Réponses en polarisation correspondant aux points d'intersection des courbes grise et noire: (c) $(45^{\circ}, 45^{\circ}, 40^{\circ})$ et (d) $(45^{\circ}, 100^{\circ}, 20^{\circ})$.

Précision dans la détermination du triplet (θ, ϕ, ψ)

Nous avons montré qu'il était possible de déterminer l'orientation de la maille cristalline d'un nanocristal monocristallin, en analysant à la fois les signaux de FDP et de GSH. Remarquons que les intensités calculées donnent des diagrammes polaires très différents dès que l'on change l'un des trois angles d'Euler de plus de 5°, comme le montrent les calculs de la figure 5.11. La précision des valeurs obtenues pour les trois angles θ , ϕ et ψ peut alors être estimée à 5° environ, ce qui est relativement précis. Bien sûr, les triplets ($\theta, \phi + \pi, \psi$) et ($\theta, \phi, \psi + \pi$) donnent les mêmes diagrammes que ceux donnés par les angles (θ, ϕ, ψ). Ceci résulte de la symétrie de la maille et du fait que nos mesures ne sont pas sensibles à la phase du rayonnement émis. C'est pourquoi nous avons donné les angles d'Euler dans l'intervalle [$0,\pi$].

5.1.4 Cas plus complexes : nanocristaux polycristallins

Parmi les nanocristaux générant de la GSH, environ 70 % d'entre eux ne correspondent pas à des diagrammes de fluorescence identiques, à un coefficient multiplicatif près, dans les deux états de polarisation X et Y. Or, dans le paragraphe 4.1.2, page 81, nous avons montré que dans le cas d'un cristal monocristallin, ces intensités de fluorescence sont nécessairement proportionnelles. Ce résultat va nous permettre de distinguer par le simple examen à l'œil des diagrammes expérimentaux, une structure monocristalline à l'échelle nanométrique d'une structure polycristalline plus complexe.

Pour un certain nombre d'entre eux, il est possible de reproduire les intensités détectées, en ajoutant de façon incohérente les signaux correspondant à deux orientations différentes de la maille cristalline (cf. paragraphe 1.3.2, page 18):

$$\mathcal{I}_{I}^{(2)}(\Phi) = \mathcal{I}_{I}(\theta_{1},\phi_{1},\psi_{1},\Phi,\varepsilon,\delta) + \mathcal{I}_{I}(\theta_{2},\phi_{2},\psi_{2},\Phi,\varepsilon,\delta).$$
(5.3)

Les diagrammes polaires de ces nanocristaux sont rassemblés sur la figure 5.12, les orientations Ω_1 , Ω_2 utilisées pour tracer les courbes théoriques étant reportées dans le tableau ci-dessous.

Nanocristal	$\theta_1(^\circ)$	$\phi_1(^\circ)$	$\psi_1(^\circ)$	$\theta_2(^\circ)$	$\phi_2(^\circ)$	$\psi_2(^\circ)$
CMONS 2	80	85	-20	80	-2	-102
CMONS 10	80	0	70	80	90	110
CMONS 13	20	30	27	80	0	55
CMONS 20	70	-20	60	70	55	65
CMONS 21	60	0	90	60	30	120
CMONS 22	80	85	-10	80	-2	-113
CMONS 23	80	90	10	80	-30	-122



FIG. 5.11 – Diagrammes polaires donnant les intensités de GSH et de FDP dans les états de polarisation X (en continu) et Y (en pointillés) en fonction de la direction de polarisation Φ . Les calculs ont été menés avec (θ =50°, ϕ =170°, ψ =70°) (a) et (θ =65°, ϕ =175°, ψ =80°) (b).



FIG. 5.12 – Diagrammes polaires typiques représentant les intensités de FDP et de GSH dans les états de polarisation X et Y émis par des nanocristaux polycristallins. Les deux diagrammes obtenus avec la fluorescence à deux photons sont différents. Les courbes peuvent être ajustées en considérant l'addition incohérente de signaux caractérisés par les triplets $(\theta_1, \phi_1, \psi_1)$ et $(\theta_2, \phi_2, \psi_2)$.
Remarquons toutefois que plusieurs orientations Ω_1 et Ω_2 permettent de reproduire les diagrammes polaires obtenus expérimentalement. Nous n'avons pas non plus introduit de coefficients multiplicateurs pour quantifier la contribution de chacune des unités monocristallines. Nous avons en effet un trop grand nombre de paramètres à déterminer, pour seulement quatre courbes. Cependant, si certains ajustements ne reproduisent pas parfaitement les courbes expérimentales, elles montrent clairement le comportement polycristallin des nanocristaux étudiés ici.

Les signaux lumineux émis par un certain nombre de cristaux ne peuvent pas toujours être modélisés par l'addition incohérente de signaux associés à seulement deux orientations cristallines (figure 5.13). Dans ces cas là, l'émission de FDP et de GSH donne des diagrammes où les intensités \mathcal{I}_x et \mathcal{I}_Y forment des lobes systématiquement perpendiculaires entre eux, comparables à ceux obtenus avec une distribution isotrope de dipôles.



FIG. 5.13 – Diagrammes polaires typiques représentant la réponse en FDP et en GSH dans les états de polarisation X et Y des nanocristaux polycristallins constitués d'un grand nombre d'unités monocristallines. Les signaux détectés suivant les deux états de polarisation forment des lobes perpendiculaires entre eux, avec une symétrie dans l'échange entre X et Y. L'ajustement de ces courbes peut être réalisé en considérant l'addition incohérente des signaux émis par des unités monocristallines à l'intérieur de la nanoparticule. Dans le cas présent, nous avons considéré dix unités monocristallines d'orientation aléatoire.

Ces agrégats moléculaires sont probablement constitués d'un nombre N > 2 d'unités monocristallines d'orientation $(\theta_i, \phi_i, \psi_i)$ différentes et aléatoires. L'intensité des signaux émis peut ainsi s'écrire :

$$\mathcal{I}_{I}^{(N)}(\Phi) = \sum_{i=1}^{N} \mathcal{I}_{I}(\theta_{i}, \phi_{i}, \psi_{i}, \Phi, \varepsilon, \delta).$$
(5.4)

Nous avons simulé la réponse d'agrégats comprenant un nombre croissant (N = 3, N = 5 et N = 10) d'unités monocristallines. La figure 5.14 montre comment les

diagrammes polaires $\mathcal{I}_{I}^{(N)}(\Phi)$ évoluent vers une structure à 2 lobes orientée dans la direction I aussi bien pour la FDP que pour la GSH, lorsque l'on augmente le nombre d'unités monocristallines constituant le nanocristal. Pour $N \geq 10$, on obtient presque systématiquement des lobes perperdiculaires entre eux, conformément aux données expérimentales de la figure 5.13.

Notons qu'à ce stade, il n'est pas possible de distinguer la présence d'agrégats en s'intéressant uniquement au niveau de signal qui doit en théorie être proportionnel à N^2 pour les nanocristaux monocristallins et proportionnel à N pour les agrégats. En effet, les nanocristaux ont apparemment des tailles différentes étant donnés les niveaux des signaux des figures 5.8 et 5.12.

5.1.5 Bilan

Cette analyse en polarisation permet ainsi de bien différentier une structure monocristalline d'une structure polycristalline. Un tel diagnostic in situ à l'échelle de la nanoparticule était impossible à effectuer au moyen des techniques usuelles de caractérisation physico-chimique des structures cristallines. La qualité cristalline des nanoparticules peut en effet être vérifiée en explorant les nanocristaux de CMONS un par un. Une mesure d'ensemble ne le permettrait pas. Les applications de ces nanocristaux sont multiples : ils viennent compléter les propriétés des nanocristaux semiconducteurs existants, qui sont utilisés comme sondes fluorescentes. L'émission de GSH présente également plusieurs avantages comme l'absence de *photobleaching* en dehors de la résonance et une très forte sensibilité à l'orientation du nanocristal. Une perspective intéressante serait de développer des nanocristaux sensibles à la présence de champ – par effet électro-optique pour sonder la structure du champ électrique au voisinage de structures complexes – ou bien possédant des propriétés magnétiques pour combiner les techniques d'imagerie magnétique et d'imagerie optique.



FIG. 5.14 – Intensités de FDP et de GSH dans les états de polarisation X (en continu) et Y (en pointillés) émis par quatre agrégats constitués de N=3, 5 et 10 unités cristallines dont l'orientation a été tirée au hasard.

5.2 Sphères de latex contenant des molécules de DCM

Le but de ce travail est exploratoire. Nous envisageons d'utiliser les outils développés précédemment, afin de comprendre le comportement d'arrangements moléculaires dans d'autres types de nano-objets. Plus précisément, nous allons nous intéresser ici à des nano-sphères de latex comportant des molécules non-linéaires, dont l'émission de GSH peut être interprétée par des déformations non-centrosymétriques.

5.2.1 Description de l'échantillon étudié

Les sphères nanométriques que nous avons étudiées ont été synthétisées par C. CAN-NIZZO dans l'équipe dirigée par C. LARPENT au laboratoire SIRCOB à l'université de Versailles-Saint Quentin. Nous nous sommes en particulier intéressés aux sphères à base de polymère nommées SA175, de diamètre 150 nm. Elles peuvent en effet contenir un nombre suffisant de molécules actives (environ 5500 molécules de DCM par particule) pour détecter des signaux lumineux non négligeables.

Les particules sphériques dopées en DCM sont dispersées dans une solution contenant un mélange d'eau et d'éthanol ainsi que du PVA à la concentration massique de 5 %. La présence de polymère est nécessaire pour permettre à la solution d'adhérer à la surface du substrat lors du dépôt par centrifugation et d'immobiliser les sphères après évaporation du solvant. Toutes les mesures présentées ici proviennent d'un même échantillon obtenu à partir d'une solution dont la concentration est de 1,8 sphères/ μ m³.

5.2.2 Sphères émettant uniquement de la fluorescence

Comme le montre la figure 5.15a, la dilution dans le polymère permet de bien séparer les particules, et il est ainsi possible de les étudier individuellement. Le spectre des signaux émis par les sphères isolées montre une large bande de fluorescence mais aucun pic caractéristique de la GSH (figure 5.15b). Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où il s'exerce peu de contraintes sur les particules, qui conservent ainsi une forme sphérique. La distribution des molécules de DCM à l'intérieur des particules reste par conséquent centrosymétrique.

Nous avons procédé à l'analyse en polarisation des signaux de fluorescence à deux photons émis par les sphères (figure 5.16). On reconnaît la forme typique des diagrammes polaires obtenus en considérant une distribution isotrope de molécules de DCM, avec un angle $\xi = 37^{\circ}$ entre les dipôles d'absorption et d'émission qui leurs sont associés (cf. paragraphe 2.3.6, page 43). Ces diagrammes polaires montrent aussi



FIG. 5.15 - (a) Cartographie des signaux lumineux émis par une zone de l'échantillon où les particules sont bien isolées. Le faisceau incident a une puissance de 7,7 mW à 987 nm. (b) Spectre d'émission d'une sphère isolée, obtenu avec une puissance incidente de 6,4 mW à 987 nm.



FIG. 5.16 – Diagrammes polaires donnant les intensités de fluorescence \mathcal{I}_{x} et \mathcal{I}_{Y} émises par une sphère isolée en fonction de la direction de la polarisation incidente. La puissance du faisceau laser à $\lambda = 987$ nm est de 7,7 mW. Les ajustements théoriques ont été calculés avec l'équation (2.24) en considérant une distribution orientationnelle isotrope, avec $\varepsilon = 1,14$ rad, $\delta = 0,02$ et un angle $\xi = 37^{\circ}$ entre les dipôles d'absorption et d'émission associés à la molécule de DCM. On note la présence de photoblanchiment au cours de la mesure, qui dure typiquement une dizaine de minutes.

qu'il n'y a pas ou très peu de transfert d'énergie entre les molécules de colorant. Cette observation concorde avec la distance intermoléculaire qui est de l'ordre de 40 Å, en considérant que les molécules sont réparties uniformément à l'intérieur des sphères. On observe également un effet de photodestruction des molécules de colorant dû à la forte intensité du faisceau incident. Il est en effet nécessaire d'appliquer des puissances de l'ordre de la dizaine de mW pour obtenir des niveaux de signaux détectables. Notons que le nombre de molécules est beaucoup trop faible pour espérer détecter de la diffusion hyper-Rayleigh.

5.2.3 Sphères émettant de la GSH en plus de la fluorescence

Dans certaines zones de l'échantillon, on observe des amas de sphères qui peuvent émettre à la fois de la FDP et de la GSH, comme le montre le spectre de la figure 5.17. Les signaux de fluorescence à deux photons et de génération du second harmonique



FIG. 5.17 – Spectre d'émission provenant d'un amas de particules sphériques. La puissance du faisceau incident est de 8 mW à 987 nm.

sont alors mesurés successivement en utilisant des filtres adaptés. Les cartographies de la figure 5.18 montrent que dans la zone de l'échantillon considérée, les particules se sont agglomérées, sans doute autour d'un défaut du substrat. Remarquons que la GSH émise n'apparaît pas exactement aux mêmes endroits que la fluorescence à deux photons. Les contraintes exercées entre particules, déformant légèrement les surfaces sphériques et brisant ainsi la centrosymétrie pourraient expliquer l'émission de GSH.

La fonction de distribution orientationnelle $f(\theta, \phi)$ permettant de modéliser l'orientation des molécules sous l'effet des contraintes doit comporter deux contributions :

- l'une centrosymétrique (isotrope) relative aux molécules situées à l'intérieur de la sphère (soit 80 % environ des molécules de DCM, si celles-ci sont réparties uniformément);
- l'autre non-centrosymétrique correspondant aux molécules situées sur l'interface (soit 20 % des molécules environ).

Pour les ajustements des diagrammes polaires, nous prendrons comme fonction de



FIG. 5.18 – Cartographie des signaux de FDP (a) et de GSH (b) provenant d'une même zone de l'échantillon où se sont agrégées quelques particules. Le faisceau incident a une puissance de 7,7 mW à 987 nm.

distribution, la fonction générique suivante, en oubliant le facteur de normalisation :

$$f(\theta,\phi) = 1 + \sum_{i} \frac{A_i}{\left(1 + \left(\frac{\sin(\theta - \theta_i)/2}{\Delta_i}\right)^2\right) \left(1 + \left(\frac{\sin(\phi - \phi_i)/2}{\Delta_i}\right)^2\right)}.$$
(5.5)

Dans cette expression, les angles (θ_i, ϕ_i) donnent l'orientation privilégiée des molécules induite par la contrainte *i*. Les paramètres A_i et Δ_i sont des paramètres ajustables rendant la contribution du terme non-centrosymétrique *i* plus ou moins importante. Cette approche ne vise pas ici à déterminer une géométrie spécifique de l'interface. Cependant, si les molécules périphériques sont orientées perpendiculairement à l'interface, un applatissement ponctuel de la surface ferait apparaître un pic dans la fonction de distribution orientationnelle, dans la direction perpendiculaire au plan de l'interface.

Particules légèrement déformées Si la particule sphérique est très légèrement déformée, la réponse en polarisation de la fluorescence à deux photons reste similaire à celle de la figure 5.16, puisque la part des molécules orientées de façon isotrope reste prépondérante. Il apparaît néanmoins un signal de GSH. Un exemple typique est présenté sur la figure 5.19a. La fonction de distribution orientationnelle qui a permis de tracer les ajustements théoriques est dessinée sur la figure 5.19b. L'émission de GSH est due au petit pic qui se trouve dans la direction ($\theta_1 = 45^\circ, \phi_1 = 37^\circ$). Il peut s'interpréter par un aplatissement de la surface à cet endroit, en supposant que les molécules de colorant sont normales à la surface. On peut observer ici que la GSH est extrêmement sensible à un changement d'ordre moléculaire, puisque très peu de molécules participent à ce signal.



FIG. 5.19 – (a) Réponse en polarisation d'une sphère émettant de la GSH. L'ajustement des diagrammes relatifs à la FDP a été calculé avec l'équation (2.24). L'ajustement des diagrammes relatifs à la GSH a été calculé avec l'équation (C.9). Dans les deux cas, on a utilisé la fonction de distribution (5.5) avec $\theta_1 = 45^\circ$, $\phi_1 = 37^\circ$, $A_1 = 5$ et $\Delta_1 = 0,01$. (b) Représentation de la fonction de distribution $f(\theta,\phi)$ donnée par l'équation (5.5).

Particules avec deux déformations ponctuelles Dans certains cas, il est nécessaire de prendre en compte deux orientations privilégiées pour pouvoir reproduire les diagrammes polaires de la GSH. C'est le cas de la sphère dont les réponses en polarisation sont représentées sur la figure 5.20a. Les contraintes exercées sur cette particule n'induisent que des déformations légères, puisque la réponse de la fluorescence correspond là encore à une distribution orientationnelle isotrope. La fonction de distribution qui a permis de tracer les ajustements théoriques est dessinée sur la figure 5.20b.



FIG. 5.20 – (a) Réponse en polarisation d'une sphère émettant de la GSH. L'ajustement des diagrammes relatifs à la FDP a été calculé avec l'équation (2.24). L'ajustement des diagrammes relatifs à la GSH a été calculé avec l'équation (C.9). Dans les deux cas, on a utilisé la fonction de distribution (5.5) avec $\theta_1 = 90^\circ$, $\theta_2 = 90^\circ$, $\phi_1 = 134^\circ$, $\phi_2 = 225^\circ$, $A_1 = 20$, $A_2 = 4$, $\Delta_1 = 0,005$ et $\Delta_2 = 0,005$. (b) Représentation de la fonction de distribution $f(\theta,\phi)$ donnée par l'équation (5.5).

Particules très déformées voire complètement aplaties Dans certains cas, on détecte un fort signal de GSH et la réponse en polarisation de la fluorescence à deux photons est caractéristique d'une distribution moléculaire fortement anisotrope (figure 5.21a). Pour reproduire cette structure de diagrammes polaires, il est nécesaire de considérer une orientation privilégiée pour les molécules de DCM et de négliger la contribution centrosymétrique dans la fonction de distribution (figure 5.21b). Pour ce type de sphères, les molécules seraient toutes plus ou moins orientées dans la même direction. Il peut par exemple s'agir d'une sphère complètement aplatie. En effet, les contributions de surface dominent alors les contributions de volume et si les molécules sont orientées perpendiculairement à l'interface, elles ont alors toutes la même direction (θ_1, ϕ_1). Cet exemple correspondant à l'émission d'une structure ordonnée présente de très fortes analogies avec l'émission d'un arrangement cristallin.



FIG. 5.21 – (a) Réponse en polarisation d'une sphère émettant de la GSH. L'ajustement des diagrammes relatifs à la FDP a été calculé avec l'équation (2.24). L'ajustement des diagrammes relatifs à la GSH a été calculé avec l'équation (C.9). Dans les deux cas, on a utilisé la fonction de distribution (5.5) avec $\theta_1 = 45^\circ$, $\phi_1 = 37^\circ$, $A_1 = 10^6$ et $\Delta_1 = 0,01$. (b) Représentation de la fonction de distribution $f(\theta,\phi)$ donnée par l'équation (5.5).

5.2.4 Bilan

Dans cette analyse appliquée à des nano-sphères de latex, nous formulons un certain nombre d'hypothèses qu'il n'est pas possible de vérifier. Néanmoins, nous montrons par ces exemples que l'analyse en polarisation est un outil important pour révéler si les molécules s'orientent suivant un axe privilégié ou non et si leur distribution orientationnelle est large angulairement ou non. Il serait maintenant intéressant de poursuivre cette étude avec des objets dont la géométrie ou la structure est mieux connue, comme par exemple une sphère isolée soumise à un champ électrique, des billes métalliques [115, 116] ou bien des vésicules dans lesquelles les chromophores sont localisés au niveau de la couche lipidique. Notre technique d'analyse en polarisation pourrait dès lors venir compléter les techniques d'imagerie de milieux biologiques.

Chapitre 6

Détection de la GSH par interférométrie

Nous avons vu dans les précédents chapitres, qu'il était possible de déterminer la direction dans laquelle sont orientées les molécules non-linéaires constituant divers matériaux: molécules insérées dans une matrice polymère, cristaux non-linéaires de taille millimétrique et nanométrique. L'analyse en polarisation des signaux de FDP et de GSH ne permet cependant pas de déterminer le sens d'orientation des molécules. S'il ne peut être fourni par l'étude du rayonnement de fluorescence du fait de son caractère incohérent, ce renseignement est contenu dans la phase de la GSH émise au niveau de l'échantillon. Il apparaît dès lors très intéressant de mesurer simultanément l'amplitude et la phase de la GSH grâce à un dispositif interférométrique. De telles mesures ont déjà été effectuées sur de la GSH de surface provenant d'un cristal de silicium [117]. L'originalité de notre travail est d'intégrer sur l'une des voies de l'interféromètre, le microscope comportant un objectif de grande ouverture numérique. Les signaux d'interférences ainsi obtenus permettront par la suite de mettre en œuvre une détection homodyne balancée de la GSH émise par des nano-objets, comme par exemple des nanocristaux ou même des molécules uniques. Ce type de technique est en effet particulièrement adapté à la détection de signaux jusqu'au bruit de photons [33, 118]. De plus, la génération du second harmonique possède un atout de taille par rapport à la fluorescence. Il s'agit d'un rayonnement particulièrement stable, qui subsiste même après photodestruction des molécules. En effet, dans les systèmes moléculaires, l'émission du second harmonique ne requiert pas de transfert de population vers l'état excité. En se plaçant à un désaccord suffisamment grand par rapport à la résonance, le photoblanchiment du système illuminé est ainsi très fortement réduit et le système peut être observé pendant une durée beaucoup plus longue qu'en fluorescence.

Dans un premier temps, nous avons procédé à une étude de faisabilité sur une confi-

guration expérimentale simple, en faisant interférer deux faisceaux de GSH issus d'un même cristal non-linéaire indépendamment du microscope. Cette première expérience a permis de nous assurer de la bonne stabilité de notre dispositif (stabilité du laser, des pièces mécaniques) et de l'adéquation du détecteur (sensibilité vis-à-vis du niveau de signal, bruit). Nous avons ensuite obtenu des interférences entre la GSH détectée en microscopie sur un cristal de DAST de taille millimétrique, et l'onde harmonique issue d'un cristal de référence servant d'oscillateur local. Nous verrons que l'enregistrement de l'amplitude des signaux d'interférences permet de retrouver les réponses en polarisation de l'émission du second harmonique du cristal de DAST, lesquelles ont été caractérisées de manière détaillée au chapitre 3.

6.1 Étude de faisabilité

Avant de mettre en place le dispositif incluant le microscope, nous avons commencé par faire interférer deux faisceaux issus d'un même cristal non-linéaire, dans un interféromètre de type MACH-ZEHNDER. La difficulté était en effet d'obtenir le recouvrement temporel des impulsions, qui ont une durée de l'ordre de 100 fs, avec des trajets optiques de l'ordre du mètre¹. Cette première expérience nous a ainsi permis de travailler avec des intensités lumineuses assez élevées, ce qui était très appréciable pour "se faire la main" sur les réglages : recouvrement spatial des faisceaux, égalisation de la courbure des fronts d'onde dans le champ d'interférences.

6.1.1 Interférences entre deux ondes de GSH provenant d'un même cristal non-linéaire

Dispositif interférométrique

Le montage interférométrique est représenté sur la figure 6.6. L'onde fondamentale, qui provient du laser Ti:Sa, est focalisée sur un cristal de BBO (longueur de 1,5 mm, accord de phase de type I, Casix) avec une lentille de focale 50 mm. La lame demi-onde placée à l'entrée du dispositif permet de faire varier l'intensité de l'onde harmonique, en optimisant plus ou moins bien le doublage de fréquence. Le faisceau de GSH provenant du cristal de BBO est alors collimaté grâce à une lentille de focale 100 mm, avant d'être envoyé sur un cube séparateur non polarisant. Il est ainsi séparé en deux faisceaux de polarisation et d'intensité identiques, que l'on appellera respectivement *signal* et *oscillateur local* pour cette expérience. Après plusieurs réflexions, les deux faisceaux

^{1.} Cette grande longueur est imposée par l'expérience suivante, dans laquelle le faisceau passera par le microscope.



FIG. 6.1 – Interféromètre de type MACH-ZEHNDER. $\lambda/2$: lame demi-onde infrarouge; f₁, f₂: lentilles convergentes de focales 50 et 100 mm; BBO: cristal non-linéaire de BBO générant l'onde harmonique à partir du faisceau infrarouge; CS: cube séparateur non polarisant; CM: coin de miroir monté sur platine de translation motorisée; PZT: miroir monté sur une cale de translation piézo-électrique; F: filtre KG5 rejetant la radiation infrarouge; PD: photodiode; CCD: barette CCD.

sont recombinés à la sortie de l'interféromètre avec un cube non polarisant, puis focalisés sur la surface sensible d'une photodiode au silicium (BPX65, Fiber Optic Series). Le signal délivré par la photodiode est amplifié avant d'être visualisé à l'oscilloscope. Un filtre placé à la sortie du cube permet d'éliminer les radiations infrarouges provenant de l'onde fondamentale.

Sur le trajet de l'oscillateur local, on a disposé un coin de miroir sur une platine de translation motorisée (Physik Instrumente), afin de pouvoir ajuster finement la différence de marche entre les deux bras et superposer temporellement les deux impulsions lumineuses à la sortie de l'interféromètre². Le dernier miroir, placé juste avant le cube de recombinaison des deux faisceaux, est monté sur un transducteur piézo-électrique (tube de titanates-zirconates de plomb P4-68, Quartz et Silice) pour introduire une modulation de phase entre le signal et l'oscillateur.

Principe de la modulation de phase

Ecrivons l'amplitude complexe des faisceaux harmoniques du signal et de l'oscillateur local sous la forme :

$$\vec{\mathcal{E}}_{\rm s} = \vec{E}_{\rm s} \,\mathrm{e}^{-2i\omega t + i\vec{k}_{\rm s}.\vec{r} + \phi_{\rm s}} \quad \text{et} \quad \vec{\mathcal{E}}_{\rm ol} = \vec{E}_{\rm ol} \,\mathrm{e}^{-2i\omega t + i\vec{k}_{\rm ol}.\vec{r} + \phi_{\rm ol} + \frac{i4\pi\delta}{\lambda}} \tag{6.1}$$

avec:

- $-\omega$ et λ : pulsation et longueur d'onde de l'onde fondamentale, en négligeant les effets liés à la durée des impulsions;
- $-\vec{k}_{s}$ et \vec{k}_{ol} : vecteurs d'onde associés au signal et à l'oscillateur local;
- $-\phi_{\rm s}$ et $\phi_{\rm ol}$: déphasage du signal et de l'oscillateur au niveau du cube de recombinaison ;
- $-\delta$: différence de marche introduite par le déplacement du miroir monté sur la cale piézo-électrique dans le bras de l'oscillateur local.

La superposition des deux faisceaux à la sortie de l'interféromètre permet de rendre les vecteurs d'onde \vec{k}_s et \vec{k}_{ol} identiques. De plus, une fois que la longueur optique des bras de l'oscillateur local et du signal a été égalisée en positionnant convenablement le coin de miroir, les déphasages ϕ_s et ϕ_{ol} sont alors identiques et le signal intégré sur la réponse temporelle de la photodiode devient proportionnel à:

$$S = (\vec{\mathcal{E}}_{s} + \vec{\mathcal{E}}_{ol})(\vec{\mathcal{E}}_{s}^{*} + \vec{\mathcal{E}}_{ol}^{*}) = |\vec{\mathcal{E}}_{s}|^{2} + |\vec{\mathcal{E}}_{ol}|^{2} + 2\vec{\mathcal{E}}_{s}.\vec{\mathcal{E}}_{ol}\cos\left(\frac{4\pi\delta}{\lambda}\right).$$
(6.2)

^{2.} On doit veiller à ce que la direction du faisceau lumineux arrivant sur le coin de miroir soit bien parallèle à l'axe de translation de la platine. Ce réglage est évidemment crucial afin d'éviter toute modification de l'inclinaison du faisceau émergeant lors du déplacement de la platine de translation.

On doit alors observer des franges d'interférences lorsque l'on applique une tension variable à la cale piézo-électrique. En particulier, si on applique une tension triangulaire d'amplitude ΔU et de fréquence f, la différence de marche $\delta(t)$ s'écrit :

$$\delta(t) = \pm 2f\Delta L t = \pm 2f \, k \, \Delta U \, t \quad \text{(sur une demi-période)}, \tag{6.3}$$

où le coefficient k relie l'allongement ΔL de la céramique piézo-électrique à la tension ΔU qui lui est appliquée. Ainsi, le signal $\mathcal{S}(t)$ varie sinusoïdalement dans le temps à la fréquence :

$$F = \frac{4k\Delta U}{\lambda}f.$$
(6.4)

D'après l'équation (6.2), le contraste des franges d'interférence est donné par le rapport :

$$V = \frac{2\vec{E}_{\rm s}.\vec{E}_{\rm ol}}{|\vec{E}_{\rm s}|^2 + |\vec{E}_{\rm ol}|^2}.$$
(6.5)

Il est donc nécessaire que le signal et l'oscillateur aient la même polarisation et la même intensité pour optimiser ce contraste.

Superposition des deux faisceaux

On a vu dans le calcul précédent que la superposition de l'oscillateur et du signal était une étape importante, avant de pouvoir observer les interférences. En effet, il est nécessaire que les directions des deux faisceaux et leurs fronts d'onde soient parfaitement confondus. Dans un premier temps, on effectue ce réglage par étapes successives, en superposant les deux faisceaux :

- au niveau du cube séparateur qui recombine les deux faisceaux, en jouant sur le réglage d'un miroir situé loin du cube;
- et à l'infini, en jouant sur le réglage d'un miroir proche du cube ainsi que sur l'orientation du cube.

On affine ensuite les réglages, en disposant sur la deuxième voie du cube de recombinaison, une barette CCD placée derrière une lentille convergente, à une distance variable. Cette barette enregistre directement le profil des deux faisceaux; on peut donc en déduire le waist et la divergence du signal et de l'oscillateur local. On peut alors jouer sur la position de la lentille f_2 après le cristal de BBO, pour faire coïncider les deux fronts d'onde en dimension et en rayon de courbure. La figure 6.2 montre les profils transverses et longitudinaux du signal et de l'oscillateur local, mesurés au moment où l'on détectait des interférences avec la photodiode. Les deux faisceaux étaient alors adaptés (mode matching).



FIG. 6.2 – (a) Profils transverses des deux faisceaux mesurés au niveau du col avec une barette CCD. (b) Profils longitudinaux des deux faisceaux. Les points expérimentaux ont été déterminés à partir des ajustements des profils transverses par une fonction gaussienne. Les courbes continues ont été tracées par ajustement de la fonction $w(z) = w_0 \sqrt{1 + (z/z_r)^2}$, caractéristique de l'évolution spatiale d'un faisceau gaussien.

Interférences entre le signal et l'oscillateur local

Une fois cette adaptation des fronts d'onde effectuée, on peut commencer à rechercher les franges d'interférences en appliquant une tension variable au tube piézoélectrique et en déplaçant lentement le coin de miroir³. Remarquons que la longueur des deux bras de l'interféromètre est de l'ordre 1,40 m. On ne risque donc pas de superposer des impulsions de GSH générées par deux impulsions successives du laser Ti:Sa. En effet, le taux de répétition du laser est de 86 MHz et deux impulsions successives sont séparées spatialement de 3,75 m.

La figure 6.3 représente l'oscillogramme obtenu lors de l'égalisation des deux bras de l'interféromètre. On obtient ainsi un signal variant sinusoïdalement dans le temps, conformément à l'équation (6.2). Le contraste des franges d'interférences est de l'ordre de 8 %, ce qui est relativement faible, compte tenu du fait que le signal et l'oscillateur proviennent d'un même faisceau incident. Les puissances de l'oscillateur et du signal étaient quasiment identiques puisque qu'elles étaient de 1,25 et 1,15 μ W respectivement, après le filtre IR. Le faible contraste peut donc s'expliquer par les diverses réflexions sur les deux voies, qui ont pu affecter l'homogénéïté des fronts d'onde et la polarisation des deux faisceaux. En effet, certains miroirs utilisés pour cette expérience préliminaire étaient de qualité imparfaite et nous n'avons pas rajouté de polariseur à la sortie de l'interféromètre.

Lors de l'acquisition des données, on observe de légères fluctuations temporelles qui

^{3.} Nous avons déplacé le coin de miroir à la vitesse de 34 μ m·s⁻¹ environ, lors de la recherche des franges d'interférences.



FIG. 6.3 – Oscillogramme représentant l'alimentation haute-tension du piézo-électrique et le signal détecté par la photodiode.

se traduisent par un glissement des franges par rapport au signal triangulaire, qui est l'image de la tension appliquée au piézo-électrique. Ces fluctuations proviennent notamment des instabilités mécaniques introduites par le montage. Remarquons également que pour la modulation de phase, nous avons appliqué un signal triangulaire de faible fréquence (de l'ordre de 170 Hz), pour être dans le régime de fonctionnement linéaire de la cale piézo-électrique. Cette faible féquence de modulation rend le dispositif très sensible aux bruits de basse fréquence. Ce défaut pourra être corrigé dans un montage de détection homodyne balancée, où seuls les signaux oscillant à la fréquence de modulation seront détectés.

6.1.2 Exploitation des données

Calibration de l'allongement du tube piézo-électrique

À partir de l'oscillogramme de la figure 6.3, on peut déduire le facteur k reliant l'allongement du piézo-électrique à la tension appliquée. En effet, d'après l'équation (6.4), le nombre de franges N observées pendant la montée (ou la descente) du signal triangulaire est donné par :

$$N = \frac{F}{2f} = \frac{2k\Delta U}{\lambda},\tag{6.6}$$

où λ est la longueur d'onde fondamentale (987 nm). La figure 6.4 représente le nombre de franges en fonction de l'amplitude ΔU . On obtient bien une droite de pente égale à 4×10^{-3} franges/V, soit un facteur k = 2 nm/V.



FIG. 6.4 – Graphique représentant le nombre de franges observé pendant une demipériode du signal triangulaire appliqué à la cale piézo-électrique, en fonction de l'amplitude de ce signal.

Durée des impulsions lumineuses

Nous avons enregistré le signal délivré par la photodiode en fonction de la position du coin de miroir, en l'absence de modulation de phase introduite par la vibration du tube piézo-électrique (figure 6.5). On observe là encore des franges d'interférences,



FIG. 6.5 – Oscillogramme donnant la tension détectée par la photodiode en fonction de la différence de marche δ . L'enregistrement de la courbe a été effectuée avec une vitesse de balayage de 5236 nm/s. Ce sont les franges d'interférences qui nous ont permis de déterminer cette vitesse, et ainsi de calibrer les vitesses de déplacement de la platine motorisée.

dont l'amplitude est modulée par le facteur de contraste, qui dépend de la superposition temporelle des impulsions. L'enveloppe de la courbe va ainsi nous permettre de déterminer la largeur des impulsions lumineuses. Supposons que ces impulsions ont des profils gaussiens de la forme :

$$P(x) = E_0 e^{-\left(\frac{x-x_0}{A}\right)^2},$$
(6.7)

où x_0 donne la position de l'impulsion à l'instant t, A sa largeur spatiale et E_0 son amplitude. L'enveloppe de la courbe va alors être décrite par le produit de convolution :

$$C(x,A) = E_0^2 \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-(\frac{x-x'}{A})^2} e^{-(\frac{x'}{A})^2} \, \mathrm{d}x'.$$
 (6.8)

L'ajustement de cette enveloppe nous donne $A = 14 \ \mu\text{m}$. On en déduit la largeur à mi-hauteur d'une impulsion donnée par $\Delta x = 2A\sqrt{\ln 2}$. Cette largeur à mi-hauteur est ainsi égale à 24 μ m, ce qui correspond à une largeur temporelle de 80 fs. Cette valeur n'est cependant qu'un ordre de grandeur, car sa détermination a négligé toute structure spectrale dans l'impulsion, en particulier l'existence d'un éventuel glissement de fréquence le long de l'impulsion (*chirp*).

6.2 Montage interférentiel incluant le microscope non-linéaire

6.2.1 Montage expérimental

Le montage interférométrique incluant le microscope non-linéaire à deux photons est représenté sur la figure 6.6. L'onde harmonique générée par le cristal de BBO précédent constitue toujours l'oscillateur local. Le signal correspond quant à lui, à la GSH émise par un cristal de DAST et collectée à travers l'objectif de microscope. Nous avons choisi ce cristal, car il est non seulement très efficace vis à vis de la génération du second harmonique (cf. chapitre 3), mais aussi très robuste vis-à-vis du photoblanchiment. Il résiste notamment à des puissances incidentes élevées de l'ordre de 100 mW, qu'il est commode d'appliquer pour obtenir des signaux visibles à l'œil et rendre les réglages plus aisés. C'est pourquoi on utilise une lame de verre⁴ à la place d'une lame séparatrice pour diviser le faisceau infrarouge incident, de façon à injecter le maximum de puissance dans le microscope. On place également un filtre permettant d'éliminer la fluorescence à deux photons émise par le cristal, après l'objectif de microscope. Enfin, un polariseur disposé juste après le cube de recombinaison des deux faisceaux, permet d'augmenter le contraste des franges d'interférences: une fois l'orientation du polariseur fixée, on égalise la puissance de l'oscillateur et du signal en jouant sur l'orientation de la lame demi-onde située avant le cristal de BBO.

^{4.} Le facteur de transmission T vaut 96 %, tandis que le facteur de réflexion R n'est que de 4 %.



FIG. 6.6 – Montage incluant le microscope. BK7 : lame de verre; P : polariseur; $\lambda/2$: lame demi-onde; DM : miroir dichroïque; obj : objectif de microscope; Filtre GSH : filtre sélectionnant l'onde harmonique émise par le cristal non-linéaire de DAST (signal); f₁, f₂ : lentilles convergentes de focales 50 et 100 mm; BBO : cristal non-linéaire de BBO générant l'onde harmonique (oscillateur local); C : cube séparateur non polarisant; CM : coin de miroir monté sur platine de translation motorisée; PZT : miroir monté sur une cale de translation piézo-électrique; F : filtre RG5 rejetant la radiation IR; PD : photodiode.



FIG. 6.7 – Photographies du montage interférentiel incluant le microscope.

6.2.2 Obtention des franges d'interférences avec le cristal de DAST

En procédant aux mêmes réglages que précédemment, c'est-à-dire en superposant les deux faisceaux, en veillant à l'égalisation de la courbure des fronts d'onde et des chemins optiques, on obtient des franges d'interférences avec un contraste de 25 % environ, lorsque l'on applique une modulation de phase (figure 6.8). Ce qui est remarquable,



FIG. 6.8 – Oscillogramme représentant l'alimentation haute-tension du piézo-électrique et le signal détecté par la photodiode.

c'est que l'on obtient des interférences entre deux faisceaux harmoniques issus de deux cristaux non-linéaires *distincts* – preuve que la GSH est un rayonnement cohérent – et qui ont traversé des milieux très différents. En particulier, le passage à travers l'objectif de microscope de grande ouverture numérique n'a pas trop altéré le front d'onde du signal. Le contraste des franges dépend aussi fortement de la focalisation du faisceau infrarouge sur le cristal de DAST, car elle modifie fortement la divergence du faisceau de sortie.

On observe là encore de très fortes fluctuations, introduites par des instabilités mécaniques sur le bras du signal. Il est ainsi impossible de mesurer des déphasages. Il faudrait pour cela enregistrer simultanément la figure d'interférences associée aux deux ondes fondamentales [117, 119]. Malheureusement, les faisceaux infrarouges ne sont pas superposés à la sortie de l'interféromètre et il serait nécessaire de compléter le dispositif par un cube et des miroirs supplémentaires.

De la même façon que dans le paragraphe 6.1.2, nous avons enregistré les variations de l'amplitude du signal en translatant lentement le coin de miroir. Du fait des instabilités mécaniques plus importantes que dans le montage précédent, on n'observe plus aussi distinctement les franges qui défilent (figure 6.9). L'analyse de l'enveloppe permet



FIG. 6.9 – Oscillogramme donnant la tension détectée par la photodiode en fonction de la différence de marche δ .

néanmoins d'évaluer la largeur des impulsions de GSH, après traversée de l'objectif. Si on note A' la largeur spatiale de ces impulsions, l'enveloppe de la courbe est décrite par le produit de convolution :

$$C(x,A,A') = E_0^2 \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-(\frac{x-x'}{A})^2} e^{-(\frac{x'}{A'})^2} dx',$$
(6.9)

où $A = 14 \ \mu m$ correspond à la largeur spatiale des impulsions provenant du BBO. L'ajustement de cette fonction conduit à $A' = 58 \ \mu m$, soit une largeur à mi-hauteur de 96 μm (320 fs). Cette mesure permet ainsi de mettre en évidence la dispersion introduite par l'objectif de microscope, au niveau des impulsions infrarouges lors de l'excitation puis au niveau des impulsions de GSH lors de la collection. Cette dispersion paraît importante par rapport aux données publiées concernant des objectifs similaires [120]. Notons qu'elle pourrait être réduite en introduisant avant l'objectif un système optique de compensation du glissement de fréquence au moyen de prismes de manière à optimiser la durée de l'impulsion infrarouge après l'objectif de microscope. Cette mesure pourrait par exemple être effectuée par autocorrélation, en utilisant le photocourant induit à deux photons dans une photodiode [121].

6.2.3 Application à l'analyse en polarisation de la GSH

Les figures 6.10 et 6.11 montrent qu'il est possible, à partir du signal d'interférence, de reproduire les diagrammes polaires des signaux de GSH obtenus avec la technique d'analyse en polarisation décrite précédemment (cf. chapitre 3). Il suffit pour cela d'enregistrer le signal délivré par la photodiode, lorsque la direction de la polarisation incidente à l'entrée du microscope tourne dans son plan, le polariseur placé après le cube de recombinaison étant orienté parallèlement à l'axe X ou Y. On peut en effet représenter sous la forme d'un diagramme polaire, l'amplitude du terme d'interférences qui est proportionnelle au produit scalaire $\vec{E}_{s}.\vec{E}_{ol}$, et par conséquent proportionnelle à l'amplitude du signal de GSH émis par le cristal de DAST.

Remarquons que dans le cas où l'intensité de la GSH provenant du microscope est très faible, on peut toujours augmenter l'intensité de l'oscillateur local et travailler dans une configuration de détection balancée entre les deux voies de l'interféromètre pour conserver un contraste constant des franges d'interférences. On voit ainsi tout l'intérêt de la détection en phase de la GSH, puisqu'il permet de détecter et de procéder à l'analyse en polarisation de signaux de GSH très faibles. C'est le principe de la détection homodyne balancée, qui est développée dans le prochain paragraphe.



FIG. 6.10 – Le cristal de DAST est orienté à 45° des axes X et Y. (a) et (b): Signal délivré par la photodiode, lorsque l'angle Φ donnant l'orientation de la polarisation incidente, à l'entrée du microscope, varie de 0 à 360°. Le polariseur est orienté parallèlement à l'axe X (a) et à l'axe Y (b). Les courbes en blanc, obtenues en effectuant une moyenne, correspondent à $|\vec{E}_s|^2 + |\vec{E}_{ol}|^2$. (c) et (d): Amplitude du terme d'interférences proportionnelle à $\vec{E}_s.\vec{E}_{ol}$ et mesurée avec le polariseur parallèle à l'axe X (c) et Y (d). Elle est représentée en fonction de l'angle Φ . Les courbes blanches représentent les réponses en polarisation correspondantes mesurées en appliquant la technique d'analyse en polarisation (cf. figure 4.33).



FIG. 6.11 – Le cristal de DAST est orienté parallèlement aux axes X et Y. (a) et (b): Signal délivré par la photodiode, lorsque l'angle Φ donnant l'orientation de la polarisation incidente, à l'entrée du microscope, varie de 0 à 360°. Le polariseur est orienté parallèlement à l'axe X (a) et à l'axe Y (b). Les courbes en blanc, obtenues en effectuant une moyenne, correspondent à $|\vec{E}_s|^2 + |\vec{E}_{ol}|^2$. (c) et (d): Amplitude du terme d'interférences proportionnelle à $\vec{E}_s.\vec{E}_{ol}$ et mesurée avec le polariseur parallèle à l'axe X (c) et Y (d). Elle est représentée en fonction de l'angle Φ . Les courbes blanches représentent les réponses en polarisation correspondantes mesurées en appliquant la technique d'analyse en polarisation (cf. figure 4.33).

6.3 Perspectives : vers une détection homodyne balancée de la GSH

Le principe de la détection homodyne balancée est d'enregistrer sur les deux voies complémentaires les interférences entre le signal et l'oscillateur local, lorsque l'on introduit une modulation de phase $\phi(t)$ entre les deux faisceaux lumineux. En effet, le terme d'interférences étant proportionnel à $\vec{E_s}.\vec{E_{ol}}$, un faible signal peut être détecté grâce à un oscillateur local très intense, le rapport signal à bruit de la mesure étant fixé par l'amplitude de l'oscillateur local et non plus par celle du signal à détecter [122].

Pour ce faire, on enregistre simultanément les intensités I_{\pm} des faisceaux émergeant du cube de recombinaison et on effectue la différence $\delta I = I_+ - I_-$ avec un dispositif électronique (figure 6.12). En effet, l'intensité détectée par les photodiodes placée sur les deux voies de sortie du cube s'écrit :

$$I_{\pm} = |\vec{\mathcal{E}}_{\rm s} \pm \vec{\mathcal{E}}_{\rm ol})|^2 = |\vec{E}_{\rm s}|^2 + |\vec{E}_{\rm ol}|^2 \pm 2\vec{E}_{\rm s}.\vec{E}_{\rm ol}\,\cos(\phi),\tag{6.10}$$

de sorte que le signal δI enregistré est tel que :

$$\delta I = 4 \,\vec{E}_{\rm s}.\vec{E}_{\rm ol}\,\cos(\phi).\tag{6.11}$$



FIG. 6.12 – Principe de la détection homodyne.

Conclusion

Ce travail de thèse a consisté à mettre en place une expérience de microscopie nonlinéaire à deux photons contrôlée en polarisation, à la fois au niveau de l'excitation et au niveau du chemin de détection. Nous avons développé des modèles associés à cette expérience permettant de calculer les intensités de fluorescence à deux photons et de génération du second harmonique émises par des assemblages moléculaires variés, caractérisés par des ordres statistiques ou cristallins. Ces modèles prennent également en compte les spécificités du montage de microscopie non-linéaire à deux photons tels que l'influence du miroir dichroïque sur la polarisation incidente et l'effet de l'ouverture numérique de l'objectif sur la polarisation des signaux émis.

Nous avons tout d'abord considéré un échantillon "modèle" contenant des molécules fluorescentes orientées aléatoirement dans une matrice polymère. Cette première étude a permis de mettre en évidence l'existence d'un transfert d'énergie intermoléculaire à l'origine de la dépolarisation des signaux de fluorescence dans le cas où la densité moléculaire est importante.

Un cas d'assemblée moléculaire non-centrosymétrique a été réalisé par orientation sous champ électrique de molécules fluorescentes et non-linéaires diluées dans une matrice polymère. Nous avons en particulier montré que dans le cas d'une distribution orientationnelle large de type Boltzmann, les signaux de GSH étaient beaucoup plus sensibles à l'orientation des molécules que ceux de FDP. En effet, la fluorescence à deux photons est sensible aux symétries d'ordre pair tandis que la génération du second harmonique est sensible aux symétries d'ordre impair. Ainsi, les signaux de GSH apparaissent sur un "fond noir", car ils sont spécifiques des molécules ayant été orientées par le champ électrique. L'analyse simultanée des deux rayonnements est donc bien adaptée à la caractérisation des arrangements moléculaires.

Après avoir obtenu une modélisation satisfaisante de la réponse optique des molécules en milieu polymère, nous avons poursuivi avec l'étude de cristaux non-linéaires de structure connue. L'analyse en polarisation a permis de retrouver leurs propriétés de symétrie ainsi que l'orientation des molécules à l'intérieur des cristaux. Le calcul des intensités de FDP et de GSH fait en effet intervenir les tenseurs α , β et γ relatifs à la maille cristalline dont l'orientation est donnée par les angles d'Euler (θ, ϕ, ψ) . Ces études menées à une échelle sub-microscopique, mais sur des ensembles moléculaires de plus grande échelle, sont une première démonstration d'une technique d'analyse capable de révéler des informations sur des structures complexes; on peut en effet dire si l'arrangement moléculaire est de nature statistique, cristalline, ordonnée ou totalement désordonnée.

Ces études, qui se sont concentrées sur des systèmes "modèles", constituent une étape importante pour la compréhension d'arrangements moléculaires plus complexes. Nous nous sommes en particulier intéressés à des nano-objets, puisque la résolution intrinsèque du montage de microscopie non-linéaire nous le permettait. Nous avons ainsi mis en évidence la nature cristalline d'agrégats moléculaires isolés et interprété les réponses en polarisation de nanosphères de latex. Remarquons que les informations obtenues ici, au niveau d'un nano-objet individuel, étaient inaccessibles par des mesures d'ensemble.

Pour améliorer la sensibilité de nos mesures et fournir des renseignements supplémentaires sur la phase des signaux de second harmonique émis, nous avons complété notre dispositif de façon à détecter la GSH par interférométrie homodyne. La mise en place de cette détection cohérente a été plus délicate car nous travaillions en régime femtoseconde, avec des trajets optiques de l'ordre du mètre et traversant des milieux très différents. L'obtention des franges d'interférences nous ouvre désormais la perspective de quantifier le degré de cohérence des signaux de GSH, et au moyen d'une détection homodyne balancée, d'étudier des objets non-linéaires encore plus petits contenant un nombre limité d'émetteurs.

À partir de ces résultats, il est tout-à-fait envisageable d'appliquer la technique d'analyse en polarisation à des milieux complexes tels que des milieux biologiques ou des nanostructures actives pour l'optique non-linéaire. Dans le contexte de la biologie, elle viendrait compléter les techniques d'imagerie par microscopie non-linéaire, qui ne renseignent que sur la position des chromophores et non sur leur orientation dans leur milieu. On s'intéresse en effet de plus en plus à l'orientation des molécules dans les tissus biologiques. Récemment, la structure macromoléculaire de la cellulose a été étudiée par des mesures en polarisation [123]. Un modèle théorique a également été développé afin d'étudier l'orientation de sondes fluorescentes dans des fibres musculaires à partir de leur rayonnement de fluorescence [124].

Les études menées sur les nanocristaux organiques ouvrent également la voie à un nouveau type de sonde. Contrairement aux nanocristaux inorganiques fluorescents ou aux nanoparticules métalliques déjà utilisés pour la localisation dans des environnements biologiques [31, 32], les nano-objets non-linéaires peuvent par leur rayonnement renseigner à la fois sur leur position et leur orientation. De plus, leur efficacité non-linéaire peut être mise à profit pour constituer des sondes de champ local par effet électrooptique. En l'occurence, des nanocristaux monocristallins sensibles à la présence de champs électriques commencent déjà à voir le jour [20]. Ces particules pourraient être utilisées en tant que marqueurs pour l'étude de la diffusion orientationnelle à l'approche de champs électriques par exemple.

Cette technique est également prometteuse pour l'analyse du rayonnement de second harmonique émis par des nanostructures asymétriques. Des premiers travaux ont montré la possibilité de détecter la GSH en champ proche [125] et également dans la configuration du montage de microscopie non-linéaire décrite dans cette thèse [126]. Il est en effet possible de générer localement un signal de GSH par une exaltation du champ local, créée soit au moyen d'un effet de pointe métallique [127] ou dans une structure métallique au seuil de percolation [128].

Ainsi, l'étude de l'optique non-linéaire aux échelles nanométriques utilisant des concepts et des matériaux déjà existants, nous ouvre une nouvelle voie d'exploration dans des domaines très divers tels que la physique ou la biologie.

Annexe A

Résolution spatiale du microscope à deux photons

A.1 Le volume d'excitation

Le volume d'excitation multiphotonique permet de donner un ordre de grandeur de la résolution spatiale. Dans le cas d'un microscope à deux photons et à la limite de diffraction, ce volume d'excitation dépend de la longueur d'onde λ , de l'ouverture numérique de l'objectif ON et de l'indice de réfraction n du milieu selon [129]:

$$V_2 = \frac{33 \, n \, \lambda^3}{\pi^3 \, ON^4}.\tag{A.1}$$

Cette expression a été déterminée en utilisant un modèle de propagation d'onde plane. Elle donne donc un ordre de grandeur seulement, puisque le caractère gaussien de l'enveloppe intervient dans le cas d'une forte focalisation avec un objectif de grande ouverture numérique. Dans le cas de notre montage, avec $\lambda = 987$ nm, ON = 1,4 et n = 1,5, on a $V_2 = 0,4 \ \mu \text{m}^3$. Un tel volume d'excitation est obtenu en pratique en travaillant à la limite de diffraction, c'est-à-dire en utilisant un faisceau suffisamment large pour qu'il éclaire totalement et uniformément la pupille d'entrée de l'objectif de microscope.

A.2 Détermination expérimentale du volume d'excitation

Pour déterminer expérimentalement si l'ordre de grandeur de ce volume d'excitation est bien correct, nous allons supposer que l'excitation des molécules situées au point de coordonnées (x,y,z) par rapport au point de focalisation de coordonnées (0,0,0) est proportionnelle à :

$$\exp\left(-\frac{x^2+y^2}{R_{\rm exc}^2}\right)\,\exp\left(-\frac{z^2}{Z_{\rm exc}^2}\right)\,,\tag{A.2}$$

le plan (X,Y) étant transverse au faisceau laser et l'axe Z parallèle à l'axe optique. Ainsi, le volume d'excitation sera approximativement égal à $V_2 = \pi R_{\text{exc}}^2 Z_{\text{exc}}$, les paramètres R_{exc} et Z_{exc} donnant respectivement l'ordre de grandeur des résolutions latérale et axiale.

Nous avons mesuré les dimensions du volume d'excitation dans le cas de la fluorescence à deux photons, avec un échantillon comportant des sphères fluorescentes (Nile Red-Fluorospheres, Molecular Probes) diluées dans une solution aqueuse et déposées par centrifugation sur une lamelle de microscope. Après dépôt, les sphères se fixent sur la surface de verre. Ces sphères en latex, comportant un grand nombre de molécules fluorescentes, ont un diamètre calibré de 100 nm. Deux cartographies d'un échantillon contenant de telles sphères sont présentées sur la figure A.1. À partir de



FIG. A.1 – Cartographie de la fluorescence à deux photons émise par une sphère fluorescente de diamètre calibré égal à 100 nm. Chaque pixel correspond à un temps d'intégration de 20 ms. (a) Les mesures ont été réalisées avec un système afocal comportant deux lentilles de focales $f_1 = 25,4$ mm et $f_2 = 120,5$ mm, de façon à élargir le faisceau laser incident et éclairer totalement et le plus uniformément possible l'objectif de microscope. (b) Les mesures ont été faites sans le système afocal.

ces cartographies, on peut tracer le profil horizontal (suivant l'axe X) et vertical (suivant l'axe Y) du signal de fluorescence émis par une sphère fluorescente. Les courbes obtenues, représentées sur les figures A.2 et A.3, donnent ainsi les variations du signal de fluorescence lorsque l'échantillon se déplace verticalement et horizontalement, le point de focalisation du faisceau laser restant quant à lui immobile. Ces courbes correspondent donc au produit de convolution de la fonction (A.2) rendant compte du

profil transverse du faisceau laser, par une fonction "porte" de largeur d = 100 nm modélisant la sphère. Ce produit de convolution dans la direction x s'écrit :

$$f(x) \propto \int_{x}^{x+d} \exp\left[-\left(\frac{X}{R_{\text{exc}}}\right)^{2}\right] \mathrm{d}X.$$
 (A.3)

En introduisant la fonction $\operatorname{Erf}(x)$ définie par :

$$\operatorname{Erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp\left(-t^2\right) \, \mathrm{d}t,\tag{A.4}$$

l'expression (A.3) se met sous la forme:

$$f(x) \propto \operatorname{Erf}\left(\frac{d+x-x_0}{R_{\operatorname{exc}}}\right) - \operatorname{Erf}\left(\frac{x-x_0}{R_{\operatorname{exc}}}\right),$$
 (A.5)

où x_0 correspond à la position centrale du pic.



FIG. A.2 – Signal de fluorescence à deux photons émis par une sphère fluorescente de Nile Red dans un échantillon qui se déplace suivant l'axe X (a) et l'axe Y (b), le faisceau laser restant immobile. Les points expérimentaux sont déduits de la cartographie A.1a, effectuée en présence du système de grandissement afocal. Les ajustements théoriques, tracés en ligne continue, ont été réalisés avec l'équation (A.5) et on obtient $R_{exc} =$ 280 nm suivant l'axe X (a) et $R_{exc} = 320$ nm suivant l'axe Y (b).

L'ajustement des courbes de la figure A.2 permet de déterminer le paramètre R_{exc} . Les valeurs obtenues sont de 280 nm et 320 nm pour les profils vertical et horizontal respectivement. Ces valeurs numériques nous donnent ainsi un ordre de grandeur de la résolution latérale. Elles ont été obtenues en disposant à l'entrée du microscope, un système de grandissement afocal constitué de deux lentilles convergentes, de telle sorte que le faisceau laser recouvre intégralement la pupille d'entrée de l'objectif. On travaille ainsi à la limite de diffraction. En l'absence de ce système, seule la partie centrale de l'objectif est éclairée et on obtient des valeurs de R_{exc} bien supérieures, de l'ordre de 600 nm, comme le montre la figure A.3. Le niveau de bruit plus important de la figure A.2 est dû à une intensité incidente plus faible.


FIG. A.3 – Signal de fluorescence à deux photons émise par une sphère fluorescente de Nile Red dans un échantillon qui se déplace suivant l'axe X (a) et l'axe Y (b), le faisceau laser restant immobile. Les points expérimentaux sont déduits de la cartographie A.1b, effectuée sans le système de grandissement afocal. Les ajustements théoriques, en ligne continue, ont été réalisés avec l'équation (A.5). On obtient ainsi l'ordre de grandeur de la résolution $R_{exc} = 550$ nm suivant l'axe X (a) et $R_{exc} = 610$ nm suivant l'axe Y (b). La remontée du signal visible sur la figure (a) est due à la présence d'une sphère voisine.

On détermine de la même façon la résolution axiale. Le signal de fluorescence émis par une sphère centrée sur le faisceau laser est enregistré pour différents points de focalisation, en déplaçant l'échantillon suivant l'axe Z. Les points expérimentaux correspondants sont présentés sur la figure A.4. On procède alors à l'ajustement du paramètre Z_{exc} avec l'équation :

$$g(z) = \operatorname{Erf}\left(\frac{d+z-z_0}{Z_{\operatorname{exc}}}\right) - \operatorname{Erf}\left(\frac{z-z_0}{Z_{\operatorname{exc}}}\right).$$
(A.6)

Cette ajustement conduit à une résolution axiale de 860 nm lorsque l'objectif est totalement éclairé. Par contre, en l'absence du système afocal, la résolution axiale est seulement de l'ordre de 1.8 μ m.



FIG. A.4 – Signal de fluorescence à deux photons émis par une sphère lorsque l'on fait varier le point de focalisation suivant Z. (a) Avec le système de grandissement afocal à l'entrée du microscope $Z_{exc} = 860$ nm. (b) Sans ce système $Z_{exc} = 1,780$ µm.

Les valeurs numériques obtenues pour R_{exc} et Z_{exc} à la limite de diffraction, c'est-àdire en présence du système afocal, donnent un volume d'excitation $V_2 = 0.24 \ \mu\text{m}^3$, ce qui est du même ordre de grandeur que l'estimation théorique effectuée précédemment.

A.3 Comparaison avec la microscopie confocale

En microscopie à un photon, le critère de RAYLEIGH permet de donner un ordre de grandeur de la résolution spatiale, à la limite de la diffraction. Les résolutions latérale r_{Airy} et axiale z_{\min} , dépendent ainsi de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique de l'objectif selon [53]:

$$r_{\text{Airy}} = 0.61 \frac{\lambda}{ON}$$
 et $z_{\min} = \frac{2\lambda n}{ON^2}$. (A.7)

Avec une longueur d'onde de 500 nm, on a $r_{\text{Airy}} = 220$ nm et $z_{\min} = 770$ nm. Les résolutions latérale et axiale sont donc du même ordre de grandeur que celles déterminées précédemment dans le cas de notre microscope à deux photons. Il est cependant nécessaire de rajouter, dans le montage de microscopie linéaire, un trou de confocalité supplémentaire de façon à obtenir un bon rapport signal à bruit dans les signaux détectés. En pratique, ce diaphragme doit avoir un diamètre d'autant plus petit, qu'on cherche à atteindre une résolution élevée. En effet, les molécules situées le long du trajet du faisceau laser excitateur peuvent émettre de la lumière parasite et la matrice peut diffuser la lumière d'excitation. Ce problème ne se pose pas en microscopie non-linéaire puisque seules les molécules contenues dans le volume d'excitation – qui prend en compte la dépendance au carré de l'intensité incidente – peuvent émettre des signaux lumineux suffisamment intenses. En outre, malgré la présence du trou de confocalité, la microscopie linéaire est très sensible aux impuretés, contrairement à la microscopie non-linéaire. Celle-ci fait en effet intervenir des sections efficaces d'excitation à deux photons qui sont extrêmement faibles dans le cas des impuretés.

Annexe B

Détermination de l'ellipticité ε et du dichroïsme δ par mesures ellipsométriques

L'ellipsométrie est une technique d'analyse de surface fondée sur la mesure du changement de l'état de polarisation de la lumière après réflexion sur une surface plane [130]. Cette technique a permis de déterminer, indépendamment du montage de microscopie, l'ellipticité ε et le dichroïsme δ introduits par le miroir dichroïque et qui affectent la polarisation du faisceau infrarouge incident (cf. § 2.3.4, page 38). La mesure consiste à déterminer le rapport des coefficients de réflexion r_p et r_s associés aux polarisations pet s, sous un angle d'incidence de 45°. Avec les notations du chapitre 2, ce rapport se met sous la forme :

$$\frac{r_p}{r_s} = \frac{r_x}{r_y} = \frac{1}{1-\delta} \exp(-j\varepsilon). \tag{B.1}$$

Les mesures présentées sur la figure B.1, ont été effectuées par C. ANCEAU au LPQM [126].



FIG. B.1 – Mesures ellipsométriques avec le miroir dichroïque utilisé dans le microscope à deux photons, sous un angle d'incidence de 45°. (a) Rapport $|r_p/r_s|$ et dichroïsme δ en fonction de la longueur d'onde. (b) Ellipticité ε en fonction de la longueur d'onde.

On en déduit les valeurs de δ et ε aux longueurs d'onde utilisées lors des mesures en polarisation :

$\overline{\lambda} \ (\mathrm{nm})$	Ellipticité ε (rad)	Dichroïsme δ
987	1,4	0,014
1028	1,07	-0,013

Ces valeurs sont tout-à-fait compatibles avec celles obtenues par ajustement de la réponse en polarisation d'un échantillon de DCM :

λ (nm)	Ellipticité ε (rad)	Dichroïsme δ
987	1,14	0,02
1028	1,5	-0,02

On notera en particulier que les valeurs obtenues pour δ sont très proches. En ce qui concerne l'ellipticité ε , la figure B.1b montre qu'autour de $\lambda = 987$ nm et $\lambda = 1028$ nm, ε varie énormément avec la longueur d'onde, ce qui explique l'écart entre les différentes valeurs. Notons d'ailleurs que la longueur d'onde du laser Ti:Sa n'est pas réglée très précisément et que les impulsions femtosecondes sont associées à une largeur spectrale que nous pouvons estimer à 20 nm.

Annexe C

Prise en compte de l'objectif de microscope

C.1 Fonctions permettant le calcul des coefficients K_1, K_2 et K_3

$$\begin{split} f_{X}(u,v) &= (\cos u \cos^{2} v + \sin^{2} v)(\cos^{2} u + \sin^{2} u \sin^{2} v) \\ &- \cos^{2} v \sin^{2} v(\cos u - 1) \sin^{2} u + \cos u \sin^{2} u \cos^{2} v \\ f_{Y}(u,v) &= -\sin^{2} u \sin v \cos v(\cos u \cos^{2} v + \sin^{2} v) \\ &+ \cos v \sin v(\cos u - 1)(\cos^{2} u + \sin^{2} u \cos^{2} v) + \cos v \sin^{2} u \sin v \cos u \\ f_{Z}(u,v) &= -\sin u \cos u \cos v (\sin^{2} v + \cos u \cos^{2} v) \\ &- \sin u \cos u \cos v \sin^{2} v (\cos u - 1) - \cos v \sin^{3} u \\ g_{X}(u,v) &= \cos v \sin v (\cos u - 1)(\cos^{2} u + \sin^{2} u \sin^{2} v) \\ &- (\cos^{2} v + \sin^{2} v \cos u) \sin^{2} u \sin b \cos b + \sin^{2} u \sin v \cos v \cos u \\ g_{Y}(u,v) &= -\cos v \sin v (\cos u - 1) \sin^{2} u \sin v \cos v \\ &+ (\cos^{2} v + \sin^{2} v \cos u)(\sin^{2} u \cos^{2} v + \cos^{2} u) + \sin^{2} u \sin^{2} v \cos u \\ g_{Z}(u,v) &= -\cos^{2} v \sin v (\cos u - 1) \sin u \cos u \\ &- (\cos^{2} v + \sin^{2} v \cos u) \sin u \cos u \sin v - \sin v \sin^{3} u \end{split}$$

C.2 Expression complète des intensités de GSH détectées

Pour calculer le champ rayonné par GSH, il suffit de remplacer dans l'expression du champ lointain (2.9), le moment dipolaire $\vec{\mu}$ par la polarisation induite du second ordre $\vec{P}^{(2)}$, ce qui conduit à:

$$\vec{\mathcal{E}}^{\text{GSH}(\text{rayonn}\acute{e})}(u,v) \propto \vec{k} \wedge (\vec{P}^{(2)} \wedge \vec{k})$$
(C.1)

avec:

$$\vec{P}^{(2)} = \begin{bmatrix} \chi_{XXX}^{(2)} \\ \chi_{YXX}^{(2)} \\ \chi_{ZXX}^{(2)} \end{bmatrix} E_x^2 + \begin{bmatrix} \chi_{XYY}^{(2)} \\ \chi_{YYY}^{(2)} \\ \chi_{ZYY}^{(2)} \end{bmatrix} E_y^2 + 2 \begin{bmatrix} \chi_{XXY}^{(2)} \\ \chi_{YXY}^{(2)} \\ \chi_{YXY}^{(2)} \\ \chi_{ZXY}^{(2)} \end{bmatrix} E_x E_y$$
(C.2)

où $\chi^{(2)}$ représente le tenseur susceptibilité d'ordre 2. En développant cette expression, le champ rayonné $\vec{\mathcal{E}}^{\text{GSH}(\text{rayonné})}$ se met sous la forme :

$$\vec{\mathcal{E}}^{\text{GSH}(\text{rayonn}\acute{e})}(u,v) = \begin{bmatrix} A_{XXX} & A_{XYY} & A_{XXY} \\ A_{YXX} & A_{YYY} & A_{YXY} \\ A_{ZXX} & A_{ZYY} & A_{ZXY} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_X^2 \\ E_Y^2 \\ E_X E_Y \end{bmatrix}$$
(C.3)

où les coefficients A_{IJK} dépendent uniquement des angles (u,v) donnant la direction du vecteur d'onde \vec{k} , caractéristique de la direction d'émission :

$$\begin{aligned} A_{XXX}(u,v) &= \left[\sin^2 u \sin^2 v + \cos^2 u\right] \chi_{XXX}^{(2)} - \sin^2 u \sin v \cos v \,\chi_{YXX}^{(2)} - \cos u \sin u \cos v \,\chi_{ZXX}^{(2)} \\ A_{XYY}(u,v) &= \left[\sin^2 u \sin^2 v + \cos^2 u\right] \chi_{XYY}^{(2)} - \sin^2 u \sin v \cos v \,\chi_{YYY}^{(2)} - \cos u \sin u \cos v \,\chi_{ZYY}^{(2)} \\ A_{XXY}(u,v) &= 2 \left[\sin^2 u \sin^2 v + \cos^2 u\right] \chi_{XXY}^{(2)} - 2 \sin^2 u \sin v \cos v \,\chi_{YXY}^{(2)} - 2 \cos u \sin u \cos v \,\chi_{ZXX}^{(2)} \\ A_{YXX}(u,v) &= -\sin^2 u \cos v \sin v \,\chi_{XXX}^{(2)} + \left[\sin^2 u \cos^2 v + \cos^2 u\right] \chi_{YXY}^{(2)} - \cos u \sin u \sin v \,\chi_{ZXX}^{(2)} \\ A_{YYY}(u,v) &= -\sin^2 u \cos v \sin v \,\chi_{XXY}^{(2)} + \left[\sin^2 u \cos^2 v + \cos^2 u\right] \chi_{YYY}^{(2)} - \cos u \sin u \sin v \,\chi_{ZYY}^{(2)} \\ A_{YXY}(u,v) &= -2 \sin^2 u \cos v \sin v \,\chi_{XXY}^{(2)} + 2 \left[\sin^2 u \cos^2 v + \cos^2 u\right] \chi_{YXY}^{(2)} - 2 \cos u \sin u \sin v \,\chi_{ZYY}^{(2)} \\ A_{ZXX}(u,v) &= -\cos u \sin u \cos v \,\chi_{XXX}^{(2)} - \cos u \sin u \sin v \,\chi_{YXY}^{(2)} + \sin^2 u \,\chi_{ZXX}^{(2)} \\ A_{ZYY}(u,v) &= -\cos u \sin u \cos v \,\chi_{XYY}^{(2)} - \cos u \sin u \sin v \,\chi_{YYY}^{(2)} + \sin^2 u \,\chi_{ZXX}^{(2)} \\ A_{ZXY}(u,v) &= -\cos u \sin u \cos v \,\chi_{XYY}^{(2)} - \cos u \sin u \sin v \,\chi_{YYY}^{(2)} + \sin^2 u \,\chi_{ZXY}^{(2)} \\ A_{ZXY}(u,v) &= -\cos u \sin u \cos v \,\chi_{XYY}^{(2)} - \cos u \sin u \sin v \,\chi_{YYY}^{(2)} + \sin^2 u \,\chi_{ZYY}^{(2)} \\ A_{ZXY}(u,v) &= -2 \cos u \sin u \cos v \,\chi_{XYY}^{(2)} - 2 \cos u \sin u \sin v \,\chi_{YYY}^{(2)} + 2 \sin^2 u \,\chi_{ZYY}^{(2)} \end{aligned}$$

Si on prend en compte l'objectif de microscope qui va affecter la polarisation de la radiation émise (cf Éq. (2.14)), on peut écrire:

$$\vec{\mathcal{E}}^{\text{GSH}}(u,v) = [\mathcal{R}] \vec{\mathcal{E}}^{\text{GSH (rayonné)}}, \qquad (C.4)$$

 soit :

$$\vec{\mathcal{E}}^{\text{GSH}}(u,v) = \begin{bmatrix} B_{XXX} & B_{XYY} & B_{XXY} \\ B_{YXX} & B_{YYY} & B_{YXY} \\ B_{ZXX} & B_{ZYY} & B_{ZXY} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_X^2 \\ E_Y^2 \\ E_X E_Y \end{bmatrix}$$
(C.5)

où la matrice [B], qui ne dépend que des angles (u,v), est le produit de la matrice $[\mathcal{R}]$ par la matrice [A] précédente :

$$[B] = [\mathcal{R}][A]. \tag{C.6}$$

Cependant, la GSH est émise de façon cohérente, contrairement à la fluorescence. Il est donc nécessaire d'intégrer l'amplitude du champ rayonné sur les angles (u,v) avant de calculer l'intensité transmise par l'objectif. Ainsi, le champ total collecté $\vec{\mathcal{E}}_{tot}^{\text{GSH}}$ s'écrit :

$$\vec{\mathcal{E}}_{\text{tot}}^{\text{GSH}} = \begin{bmatrix} b_{XXX} & b_{XYY} & b_{XXY} \\ b_{YXX} & b_{YYY} & b_{YXY} \\ b_{ZXX} & b_{ZYY} & b_{ZXY} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_X^2 \\ E_Y^2 \\ E_X E_Y \end{bmatrix}$$
(C.7)

avec:

$$b_{IJK} = \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_{\rm obj}} B_{IJK}(u,v) \sin u \, \mathrm{d}u \, \mathrm{d}v.$$
 (C.8)

Comme l'intensité détectée est proportionnelle à $\overline{|\vec{\mathcal{E}}_{tot}^{GSH}|^2}$, les expressions de \mathcal{I}_X et \mathcal{I}_Y s'écrivent finalement :

$$\mathcal{I}_{I}^{\text{GSH}} = b_{IXX}^{2} \overline{E_{X}^{4}} + b_{IYY}^{2} \overline{E_{Y}^{4}} + (2 \, b_{IXX} \, b_{IYY} + b_{IXY}^{2}) \overline{E_{X}^{2} E_{Y}^{2}}
+ 2 \, b_{IXX} \, b_{IXY} \overline{E_{X}^{3} E_{Y}} + 2 \, b_{IYY} \, b_{IXY} \overline{E_{X} E_{Y}^{3}}$$
(C.9)

avec I = X ou Y.

Annexe D

Expression des fonctions $\cos(i, I)$



FIG. D.1. Définition des angles (θ, ϕ, ψ) qui fixent l'orientation du cristal par rapport au repère macroscopique (X, Y, Z)

Nous allons dans cette annexe exprimer la projection des axes (1,2,3) définissant le repère associé à la maille cristalline sur les axes du repère macroscopique (X,Y,Z). Il suffit pour cela, d'exprimer les coordonnées des vecteurs \vec{u}_1 , \vec{u}_2 et \vec{u}_3 dans le repère (X,Y,Z):

$$\vec{u}_1(\theta,\phi,\psi) = \mathcal{M}_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)}\mathcal{M}_{(1,2,3)\to(x,y,z)} \begin{pmatrix} 1\\0\\0 \end{pmatrix}$$

$$\vec{u}_{2}(\theta,\phi,\psi) = \mathcal{M}_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)}\mathcal{M}_{(1,2,3)\to(x,y,z)} \begin{pmatrix} 0\\1\\0 \end{pmatrix}$$
$$\vec{u}_{3}(\theta,\phi,\psi) = \mathcal{M}_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)}\mathcal{M}_{(1,2,3)\to(x,y,z)} \begin{pmatrix} 0\\0\\1 \end{pmatrix}$$

Dans ces expressions, $\mathcal{M}_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)}$ et $\mathcal{M}_{(1,2,3)\to(x,y,z)}$ représentent respectivement les matrices de passage du repère (x,y,z) vers le repère macroscopique (X,Y,Z) et du repère cristallin orthonormé (1,2,3) vers le repère (x,y,z). Ces matrices s'écrivent :

$$\mathcal{M}_{(x,y,z)\to(X,Y,Z)} = \begin{pmatrix} \cos\theta\cos\phi & -\sin\phi & \sin\theta\cos\phi \\ \cos\theta\sin\phi & \cos\phi & \sin\theta\sin\phi \\ -\sin\theta & 0 & \cos\theta \end{pmatrix}$$

 et :

$$\mathcal{M}_{(1,2,3)\to(x,y,z)} = \left(\begin{array}{ccc} \cos\psi & -\sin\psi & 0\\ \sin\psi & \cos\psi & 0\\ 0 & 0 & 1 \end{array}\right)$$

On en déduit donc les différentes expressions de $\cos(i,I)$:

$$\cos(1,X) = \cos\psi\cos\theta\cos\phi - \sin\psi\sin\phi$$

$$\cos(1,Y) = \cos\psi\cos\theta\sin\phi + \sin\psi\cos\phi$$

$$\cos(1,Z) = -\cos\psi\sin\theta$$

 $\cos(2,X) = -\sin\psi\cos\theta\cos\phi - \cos\psi\sin\phi$ $\cos(2,Y) = -\sin\psi\cos\theta\sin\phi + \cos\psi\cos\phi$ $\cos(2,Z) = \sin\psi\sin\theta$

 $cos(3,X) = \sin \theta \cos \phi$ $cos(3,Y) = \sin \theta \sin \phi$ $cos(3,Z) = \cos \theta$

Annexe E

Expressions des composantes des tenseurs α , β et γ dans le repère macroscopique

E.1 Cristal de POM

$$\begin{split} \beta_{XXX} &= 6 \,\beta_{123} \cos(1,X) \cos(2,X) \cos(3,X) \\ \beta_{YYY} &= 6 \,\beta_{123} \cos(1,Y) \cos(2,Y) \cos(3,Y) \\ \beta_{XYY} &= \beta_{YXY} = \beta_{YYX} \\ &= 2 \,\beta_{123} \left[\cos(1,X) \cos(2,Y) \cos(3,Y) \right. \\ \left. + \cos(2,X) \cos(1,Y) \cos(2,Y) \right] \\ \beta_{XXY} &= \beta_{XYX} = \beta_{YXX} \\ &= 2 \,\beta_{123} \left[\cos(1,X) \cos(2,X) \cos(3,Y) \right. \\ \left. + \cos(1,X) \cos(3,X) \cos(2,Y) \right] \\ \left. + \cos(2,X) \cos(3,X) \cos(1,Y) \right] \\ (E.1) \end{split}$$

E.2 Cristal de TTB

Tenseur α

$$\begin{cases} \alpha_{XX} = \alpha_{11} \left[\cos(1,X)^2 + \cos(2,X)^2 \right] \\ \alpha_{YY} = \alpha_{11} \left[\cos(1,Y)^2 + \cos(2,Y)^2 \right] \\ \alpha_{ZZ} = \alpha_{11} \left[\cos(1,Z)^2 + \cos(2,Z)^2 \right] \end{cases}$$
(E.2)

Tenseur β

$$\begin{cases} \beta_{XXX} &= \beta_{111} \left[\cos(1,X)^3 - 3 \cos(1,X) \cos(2,X)^2 \right] \\ \beta_{YYY} &= \beta_{111} \left[\cos(1,Y)^3 - 3 \cos(1,Y) \cos(2,Y)^2 \right] \\ \beta_{XYY} &= \beta_{YYX} = \beta_{YXY} \\ &= \beta_{111} \left[\cos(1,X) \cos(1,Y)^2 - \cos(1,X) \cos(2,Y)^2 \right] \\ -2 \cos(2,X) \cos(2,Y) \cos(1,Y) \right] \\ \beta_{XXY} &= \beta_{XYX} = \beta_{YXX} \\ &= \beta_{111} \left[\cos(1,X)^2 \cos(1,Y) - \cos(2,X)^2 \cos(1,Y) \right] \\ -2 \cos(2,X) \cos(1,X) \cos(2,Y) \right] \end{cases}$$
(E.3)

Tenseur γ

$$\begin{aligned} \gamma_{XXXX} &= \gamma_{1111} \left[\cos(1,X)^4 + \cos(2,X)^4 + 2\cos(1,X)^2\cos(2,X)^2 \right] \\ \gamma_{YYYY} &= \gamma_{1111} \left[\cos(1,Y)^4 + \cos(2,Y)^4 + 2\cos(1,Y)^2\cos(2,Y)^2 \right] \\ \gamma_{XXYY} &= \gamma_{YYXX} = \gamma_{XYXY} = \gamma_{XYYX} = \gamma_{YXYX} = \gamma_{YXXY} \\ &= \gamma_{1111} \left[\cos(1,X)^2\cos(1,Y)^2 + \cos(2,X)^2\cos(2,Y)^2 + 4/3\cos(1,X)\cos(2,X)\cos(1,Y)\cos(2,Y) + 1/3\cos(1,X)^2\cos(2,Y)^2 + 1/3\cos(2,X)^2\cos(1,Y)^2 \right] \\ \gamma_{XXXY} &= \gamma_{XXYX} = \gamma_{XYXX} = \gamma_{YXXX} \\ &= \gamma_{1111} \left[\cos(1,X)^3\cos(1,Y) + \cos(2,X)^3\cos(2,Y) + \cos(2,X)\cos(2,Y) \right] \\ \gamma_{XYYY} &= \gamma_{YXYY} = \gamma_{YYXY} = \gamma_{YYXY} = \gamma_{YYYX} \\ &= \gamma_{1111} \left[\cos(1,Y)^3\cos(1,X) + \cos(2,Y)^3\cos(2,X) + \cos(1,X)\cos(2,Y)\cos(2,Y) \right] \\ \gamma_{XYYY} &= \gamma_{XXYY} = \gamma_{YXYY} = \gamma_{YYYX} \\ &= \gamma_{1111} \left[\cos(1,Y)^3\cos(1,X) + \cos(2,Y)^3\cos(2,X) + \cos(1,X)\cos(2,Y)\cos(2,Y)\cos(1,Y)^2 \right] \\ (E.4) \end{aligned}$$

E.3 Cristal de DAST

Tenseur α

$$\begin{cases}
\alpha_{XX} = \alpha_{11} \cos(1,X)^2 + \alpha_{22} \cos(2,X)^2 + \alpha_{33} \cos(3,X)^2 \\
+ 2 \alpha_{13} \cos(1,X) \cos(3,X) \\
\alpha_{YY} = \alpha_{11} \cos(1,Y)^2 + \alpha_{22} \cos(2,Y)^2 + \alpha_{33} \cos(3,Y)^2 \\
+ 2 \alpha_{13} \cos(1,Y) \cos(3,Y) \\
\alpha_{ZZ} = \alpha_{11} \cos(1,Z)^2 + \alpha_{22} \cos(2,Z)^2 + \alpha_{33} \cos(3,Z)^2 \\
+ 2 \alpha_{13} \cos(1,Z) \cos(3,Z)
\end{cases}$$
(E.5)

Tenseur β

$$\begin{split} \beta_{XXX} &= \beta_{111} \cos(1,X)^3 + \beta_{333} \cos(3,X)^3 + 3\beta_{122} \cos(1,X) \cos(2,X)^2 \\ &+ 3\beta_{133} \cos(1,X) \cos(3,X)^2 + 3\beta_{311} \cos(3,X) \cos(1,X)^2 \\ &+ 3\beta_{322} \cos(3,X) \cos(2,X)^2 \\ \beta_{YYY} &= \beta_{111} \cos(1,Y)^3 + \beta_{333} \cos(3,Y)^3 + 3\beta_{122} \cos(1,Y) \cos(2,Y)^2 \\ &+ 3\beta_{133} \cos(1,Y) \cos(3,Y)^2 + 3\beta_{311} \cos(3,Y) \cos(1,Y)^2 \\ &+ 3\beta_{322} \cos(3,Y) \cos(2,Y)^2 \\ \beta_{XYY} &= \beta_{YXY} = \beta_{YYX} \\ &= \beta_{111} \cos(1,X) \cos(1,Y)^2 + \beta_{333} \cos(3,X) \cos(3,Y)^2 \\ &+ \beta_{122} [\cos(1,X) \cos(2,Y)^2 + 2 \cos(2,X) \cos(1,Y) \cos(2,Y)] \\ &+ \beta_{313} [\cos(1,X) \cos(3,Y)^2 + 2 \cos(3,X) \cos(1,Y) \cos(3,Y)] \\ &+ \beta_{311} [\cos(3,X) \cos(1,Y)^2 + 2 \cos(1,X) \cos(3,Y) \cos(1,Y)] \\ &+ \beta_{322} [\cos(3,X) \cos(2,Y)^2 + 2 \cos(2,X) \cos(3,Y) \cos(1,Y)] \\ &+ \beta_{322} [\cos(3,X) \cos(2,Y)^2 + 2 \cos(2,X) \cos(3,Y) \cos(2,Y)] \\ \end{split}$$

$$(E.6)$$

$$\beta_{XXY} &= \beta_{XYX} = \beta_{YXX} \\ &= \beta_{111} \cos(1,X)^2 \cos(1,Y) + \beta_{333} \cos(3,X)^2 \cos(3,Y) \\ &+ \beta_{122} [2 \cos(1,X) \cos(2,X) \cos(2,Y) + \cos(2,X)^2 \cos(1,Y)] \\ &+ \beta_{133} [2 \cos(1,X) \cos(3,X) \cos(3,Y) + \cos(3,X)^2 \cos(1,Y)] \\ &+ \beta_{311} [2 \cos(3,X) \cos(1,X) \cos(1,Y) + \cos(1,X)^2 \cos(3,Y)] \\ &+ \beta_{322} [2 \cos(3,X) \cos(2,X) \cos(2,Y) + \cos(2,X)^2 \cos(3,Y)] \\ \end{cases}$$

Tenseur γ

$$\begin{split} \gamma_{XXXX} &= & \gamma_{1111} \cos(1, X)^4 + \gamma_{2222} \cos(2, X)^4 + \gamma_{3333} \cos(3, X)^4 \\ &+ 4\gamma_{1333} \cos(1, X) \cos(3, X)^3 + 4\gamma_{1113} \cos(1, X)^3 \cos(3, X) \\ &+ 6\gamma_{1122} \cos(1, X)^2 \cos(2, X)^2 + 6\gamma_{1133} \cos(1, X)^2 \cos(3, X)^2 \\ &+ 6\gamma_{3322} \cos(3, X)^2 \cos(2, Y)^2 + 12\gamma_{2213} \cos(2, X)^2 \cos(1, X) \cos(3, X) \\ \gamma_{YYYY} &= & \gamma_{1111} \cos(1, Y)^4 + \gamma_{2222} \cos(2, Y)^4 + \gamma_{3333} \cos(3, Y)^4 \\ &+ 4\gamma_{1333} \cos(1, Y) \cos(3, Y)^3 + 4\gamma_{1113} \cos(1, Y)^3 \cos(3, Y) \\ &+ 6\gamma_{1122} \cos(1, Y)^2 \cos(2, Y)^2 + 6\gamma_{1133} \cos(1, Y)^2 \cos(3, X) \\ &+ 6\gamma_{1122} \cos(3, Y)^2 \cos(2, Y)^2 + 12\gamma_{2213} \cos(2, Y)^2 \cos(2, X) \cos(3, X) \\ &\gamma_{XYYY} &= & \gamma_{1111} \cos(1, X)^2 \cos(1, Y) \cos(3, Y) + 2\gamma_{2222} \cos(2, Y)^2 + \gamma_{3333} \cos(3, X)^2 \cos(3, Y)^2 \\ &+ \gamma_{1333} [2 \cos(1, X)^2 \cos(1, Y) \cos(3, Y) + 2 \cos(3, X) \cos(1, X) \cos(3, X)] \\ &+ \gamma_{1133} [2 \cos(1, X)^2 \cos(1, Y) \cos(3, Y) + 2 \cos(3, X) \cos(1, X) \cos(1, Y)^2] \\ &+ \gamma_{1122} [\cos(1, X)^2 \cos(1, Y) \cos(3, Y) + 2 \cos(3, X) \cos(1, X) \cos(1, Y)^2] \\ &+ \gamma_{1133} [\cos(1, X)^2 \cos(1, Y) \cos(3, Y) + 2 \cos(3, X) \cos(1, X) \cos(1, Y)^2] \\ &+ \gamma_{1133} [\cos(1, X)^2 \cos(3, Y) \cos(2, Y) \cos(3, Y)] \\ &+ \gamma_{1223} [\cos(2, X)^2 \cos(3, Y) + \cos(3, X)^2 \cos(2, Y)^2 \\ &+ 4 \cos(2, X) \cos(3, X) \cos(2, Y) \cos(3, Y)] \\ &+ \gamma_{2233} [2 \cos(2, X)^2 \cos(1, Y) \cos(3, Y)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, X) \cos(3, X) \cos(2, Y) \cos(3, Y)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, X) \cos(3, X) \cos(2, Y) \cos(3, Y)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, X) \cos(3, X) \cos(2, Y) \cos(3, Y)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, X) \cos(3, X) \cos(2, Y) \cos(1, X)] \cos(1, X)] \cos(3, X) \cos(3, Y) \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, X) \cos(3, X) \cos(3, Y) + 3 \cos(3, X)^2 \cos(1, X) \cos(1, Y)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, X) \cos(3, X) \cos(3, Y) + 3 \cos(3, X)^2 \cos(1, X) \cos(1, Y)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, X) \cos(3, X) \cos(3, Y) + 3 \cos(3, X)^2 \cos(1, X) \cos(1, Y)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, X) \cos(3, X) \cos(3, Y) + 3 \cos(3, X)^2 \cos(1, X) \cos(1, Y)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, Y)^2 \cos(3, X) \cos(3, X) + 3 \cos(3, X)^2 \cos(1, X)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, Y)^2 \cos(3, X) \cos(3, X) + 3 \cos(3, X)^2 \cos(1, X)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, Y)^2 \cos(3, X) \cos(3, X) + 3 \cos(3, Y)^2 \cos(1, X)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, Y)^2 \cos(3, X) \cos(3, X) + 3 \cos(3, Y)^2 \cos(1, X)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, Y)^2 \cos(3, Y) \cos(3, X) + 3 \cos(3, Y)^2 \cos(2, X)] \\ &+ \gamma_{1133} [3 \cos(1, Y)^2 \cos(3, Y) \cos(3, X) + 3 \cos(3, Y)^2$$

E.4 Nanocristal de CMONS

Tenseur α

$$\begin{cases} \alpha_{XX} = \alpha_{11} \cos(1,X)^2 + \alpha_{22} \cos(2,X)^2 \\ \alpha_{YY} = \alpha_{11} \cos(1,Y)^2 + \alpha_{22} \cos(2,Y)^2 \\ \alpha_{ZZ} = \alpha_{11} \cos(1,Z)^2 + \alpha_{22} \cos(2,Z)^2 \end{cases}$$
(E.8)

Tenseur β

$$\begin{cases}
\beta_{XXX} = \beta_{222} \cos(2,X)^3 + 3 \beta_{211} \cos(2,X) \cos(1,X)^2 \\
\beta_{YYY} = \beta_{222} \cos(1,Y)^3 + 3 \beta_{211} \cos(2,Y) \cos(1,Y)^2)] \\
\beta_{XXY} = \beta_{XYX} = \beta_{YXX} \\
= \beta_{222} \cos(2,X)^2 \cos(2,Y) \\
+ \beta_{211} [\cos(1,X)^2 \cos(2,Y) + 2 \cos(1,X) \cos(2,X) \cos(1,Y)] \\
\beta_{XYY} = \beta_{YYX} = \beta_{YXY} \\
= \beta_{222} \cos(2,X) \cos(2,Y)^2 \\
+ \beta_{211} [\cos(2,X) \cos(1,Y)^2 + 2 \cos(1,X) \cos(1,Y) \cos(2,Y)]
\end{cases}$$
(E.9)

Tenseur γ

$$\begin{split} \gamma_{XXXX} &= \gamma_{1111} \cos(1,X)^4 + \gamma_{2222} \cos(2,X)^4 + 6 \gamma_{1122} \cos(1,X)^2 \cos(2,X)^2 \\ \gamma_{YYYY} &= \gamma_{1111} \cos(1,Y)^4 + \gamma_{2222} \cos(2,Y)^4 + 6 \gamma_{1122} \cos(1,Y)^2 \cos(2,Y)^2 \\ \gamma_{XXYY} &= \gamma_{XYXY} = \gamma_{XYYX} = \gamma_{YXYX} = \gamma_{YXXY} = \gamma_{YYXX} \\ &= \gamma_{1111} \cos(1,X)^2 \cos(1,Y)^2 + \gamma_{2222} \cos(2,X)^2 \cos(2,Y)^2 \\ &+ 4 \gamma_{1212} \cos(1,X) \cos(2,X) \cos(1,Y) \cos(2,Y) \\ &+ \gamma_{1122} \cos(1,X)^2 \cos(2,Y)^2 + \gamma_{2211} \cos(2,X)^2 \cos(1,Y)^2 \\ \gamma_{XXXY} &= \gamma_{XXYX} = \gamma_{XYXX} = \gamma_{YXXX} \\ &= \gamma_{1111} \cos(1,X)^3 \cos(1,Y) + \gamma_{2222} \cos(2,X)^3 \cos(2,Y) \\ &+ 3 \gamma_{2121} \cos(2,X)^2 \cos(1,X) \cos(1,Y) \\ &+ 3 \gamma_{1212} \cos(1,X)^2 \cos(2,X) \cos(2,Y) \\ \gamma_{XYYY} &= \gamma_{YXYY} = \gamma_{YYXY} = \gamma_{YYXX} \\ &= \gamma_{1111} \cos(1,X) \cos(1,Y)^3 + \gamma_{2222} \cos(2,X) \cos(2,Y)^3 \\ &+ 3 \gamma_{1212} \cos(1,X) \cos(1,Y)^3 + \gamma_{2222} \cos(2,X) \cos(2,Y)^3 \\ &+ 3 \gamma_{1212} \cos(1,X) \cos(2,Y)^2 \cos(1,Y) \\ &+ 3 \gamma_{2121} \cos(2,X) \cos(1,Y)^2 \cos(2,Y) \\ (E.10) \end{split}$$

Bibliographie

- M. GÖPPERT MAYER. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. Ann. Phys., 9: p. 273–294, 1931.
- [2] P.A. FRANKEN A.E. HILL C.W. PETERS G. WEINREICH. Generation of optical harmonics. *Phys. Rev. Lett.*, 7(4): p. 118–119, 1961.
- [3] W. DENK D.W. PISTON W.W. WEBB. "Two-photon molecular excitation in laser scanning microscopy", *Handbook of biological confocal microscopy*. Edited by J.B. Pawley, Plenum Press, New York, second edition, 1995.
- [4] J. SQUIER M. MÜLLER. High resolution nonlinear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging. *Rev. Sci. Instrum.*, 72(7): p. 2855–2867, 2001.
- [5] J. MERTZ. Nonlinear microscopy. C. R. Acad. Sci. Paris série IV, 2(8): p. 1153– 1160, 2001.
- [6] F. LAGUGNÉ-LABARTHET R. SHEN. "Nonlinear Optical Microscopy", Optical Imaging and Microscopy: Techniques and advanced systems, volume 87 of Springer Series in Optical Sciences. Edited by F.J. Kao and P. Torok, Springer Verlag, 2003.
- [7] W. DENK J.H. STRICKLER W.W. WEBB. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248: p. 73–76, 1990.
- [8] T. BASCHE W.E. MOERNER M. ORRIT U.P. WILD. "Fundamentals of Single-Molecule Spectroscopy in Solids", Single Molecule Optical Detection, Imaging, and Spectroscopy. Verlag Chemie, Munich, 1997.
- J.R. LAKOWICZ. Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, second edition, 1999.
- [10] N. BLOEMBERGEN. From nanosecond to femtosecond science. *Rev. Mod. Phys.*, 71(2): p. S283–S287, 1999.
- [11] D.E. SPENCE P.N. KEAN W. SIBBETT. 60-fsec pulse generation from a selfmode-locked ti:sapphire laser. Opt. Lett., 16: p. 42–44, 1991.
- [12] J. ZYSS D.S.CHEMLA J.-F. NICOUD. Demonstration of efficient nonlinear optical crystals with vanishing molecular dipole moment: Second-harmonic genera-

tion in 3-methyl-4-nitropyridine-1-oxide. J. Chem. Phys., 74(9): p. 4800–4811, 1981.

- [13] I. LEDOUX J. ZYSS. "Polar and non-polar organic molecules, crystals and Langmuir-Blodgett films for quadratic nonlinear optics", Organic Molecules for Nonlinear Optics and Photonics. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1991.
- [14] C. ANDRAUD T. BROTIN C. GARCIA F. PELLÉ P. GOLDNER B. BIGOT and A. COLLET. Theoretical investigation of the nonlinear optical properties of vanillin, polyenovanillin and bisvanillin derivatives. J. Am. Chem. Soc., 116: p. 2094– 2102, 1994.
- [15] M. BLANCHARD-DESCE. Molecular engineering of NLO-phores for new NLO microscopies. C. R. Physique, 3(4): p. 439–448, 2002.
- [16] D. CHEN H.R. FETTERMAN A. CHEN W.H. STEIER L.R. DALTON W. WANG Y. SHI. Demonstration of 110 Ghz electro-optic polymer modulators. *Appl. Phys. Lett.*, 70: p. 3335–3337, 1997.
- [17] C. BOSSHARD M. BÖSCH I. LIAKATAS M. JÄGER P. GÜNTER. Second-Order Nonlinear Optical Organic Materials: Recent Developments, volume 72 of Springer Series in Optical Sciences. Edited by P. Günter, Germany, 2000.
- [18] T. TANIUCHI J. SHIKATA H. ITO. Tunable Thz-wave generation in DAST crystal with a dual-wavelength KTP optical parametric oscillator. *Electron. Lett.*, 36: p. 1414, 2000.
- [19] A. IBANEZ S. MAXIMOV A. GUIU C. CHAILLOUT P.L. BALDECK. Controlled nanocrystallization of organic molecules in sol-gel glasses. Adv. Mater., 10: p. 1540–1543, 1998.
- [20] K. BABA H. KASAI S. OKADA H. OIKAWA H. NAKANISHI. Fabrication of organic nanocrystals using microwave irradiation and their optical properties. *Opt. Mater.*, 21: p. 591–564, 2002.
- [21] K. SVOBODA W. DENK D. KLEINFELD D.W. TANK. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*, 385: p. 161–165, 1997.
- [22] J.M. SQUIRRELL D.L. WOKOSIN J.G. WHITE B.D. BAVISTER. Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nat. Biotechnol.*, 17: p. 763–767, 1999.
- [23] L. MOREAUX O. SANDRE J. MERTZ. Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. J. Opt. Soc. Am. B, 17(10): p. 1685–1694, 2000.
- [24] P.J. CAMPAGNOLA M. WEI A. LEWIS L.M. LOEW. High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second-harmonic generation. *Biophys. J.*, 77: p. 3341–3349, 1999.

- [25] O. BOUEVITCH A. LEWIS I. PINEVSKY J.P. WUSKELL L.M. LOEW. Probing membrane potential with nonlinear optics. *Biophys. J.*, 65: p. 672–679, 1993.
- [26] L. MOREAUX T. PONS V. DAMBRIN M. BLANCHARD-DESCE J. MERTZ. Electro-optic response of second harmonic generation membrane potential sensors. *Opt. Lett.*, 28: p. 625–627, 2003.
- [27] D.A. DOMBECK M. BLANCHARD-DESCE W.W. WEBB. Optical recording of action potentials with second harmonic generation microscopy. J. Neurosci., 24(4): p. 999–1003, 2004.
- [28] W.R. ZIPFEL R.M. WILLIAMS R. CHRISTIE A.Y. NIKITIN B.T. HYMAN W.W. WEBB. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphotonexcited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(12): p. 7075–7080, 2003.
- [29] D.A. DOMBECK K.A. KASISCHKE H.D. VISHWASRAO M. INGELSSON, B.T. HYMAN W.W. WEBB. Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second harmonic generation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(12): p. 7081–7086, 2003.
- [30] M. DAHAN S. LÉVI C. LUCCARDINI P. ROSTAING B. RIVEAU A. TRILLER. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single quantum dot tracking. *Science*, 302: p. 442–445, 2003.
- [31] P. ALIVISATOS. The use of nanocrystals in biological detection. Nat. Biotechnol., 22(1): p. 47–52, 2004.
- [32] L. COGNET C. TARDIN D. BOYER D. CHOQUET P. TAMARAT B. LOUNIS. Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(20): p. 11350–11355, 2003.
- [33] H. HANSEN T. AICHELE C. HETTICH P. LODAHL A.I. LVOVSKY J. MLYNEK S. SCHILLER. Ultrasensitive pulsed, balanced homodyne detector: application to time-domain quantum measurements. *Opt. Lett.*, 26(21): p. 1714–1716, 2001.
- [34] J.T. HÖFFGES H.W. BALDAUF T. EICHLER S.R. HELMFRID H. WALTHER. Heterodyne measurement of the fluorescent radiation of a single trapped ion. *Opt. Comm.*, 133(1-6): p. 170–174, 1997.
- [35] R. LOUDON. The quantum theory of light. Clarendon Press, Oxford, 1983.
- [36] C. COHEN-TANNOUDJI J. DUPONT-ROC G. GRYNBERG. Processus d'interaction entre photons et atomes. InterEditions/CNRS, Paris, 1988.
- [37] B. KIERDASZUK I. GRYCZYNSKI J.R. LAKOWICZ. Two-Photon Induced Fluorescence of Proteins, volume 5: Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence of Topics in Fluorescence Spectroscopy. J. Lakowicz. Plenum Press, New York, 1997.

- [38] W. KAISER C.G.B. GARRETT. Two-photon excitation in CaF₂:Eu²⁺. Phys. Rev. Lett., 7: p. 229–231, 1961.
- [39] C. XU W. ZIPFEL J.B. SHEAR R.M. WILLIAMS W.W. WEBB. Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: p. 10763–10768, 1996.
- [40] C. XU W.W. WEBB. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. J. Opt. Soc. Am. B, 13(3): p. 481–491, 1996.
- [41] P.R. MONSON W.M. MCCLAIN. Polarization dependence of the two-photon absorption of tumbling molecules with application to liquid 1-chloronaphthalene and benzene. J. Chem. Phys., 53(1): p. 29–37, 1970.
- [42] D.S. CHEMLA J. ZYSS. Nonlinear Optical Properties of Organic Molecules and Crystals, volume 1,2. Academic Press, Orlando, 1987.
- [43] C. DHENAUT. Réalisation et utilisation d'une expérience de Diffusion Harmonique de la Lumière pour la sélection de nouvelles molécules à forte non-linéarité optique. Thèse de doctorat, université Paris XI, juillet 1995.
- [44] J.-L. OUDAR D.S. CHEMLA. Hyperpolarizabilities of the nitroanilines and their relations to the excited state dipole moment. J. Chem. Phys., 66(6): p. 2664– 2668, 1977.
- [45] R.W. BOYD. Nonlinear Optics. Academic Press, New York, 1992.
- [46] S.K. KURTZ T.T. PERRY. A powder technique for the evaluation of nonlinear optical materials. J. Appl. Phys., 39: p. 3798–3813, 1968.
- [47] R.W. TERHUNE P.D. MAKER C.M. SAVAGE. Measurements of nonlinear light scattering. *Phys. Rev. Lett.*, 14(17): p. 681–684, 1965.
- [48] P.D. MAKER. Spectral broadening of elastic second-harmonic light scattering in liquids. *Phys. Rev. A*, 1(3): p. 923–951, 1970.
- [49] K.D. SINGER M.G. KUZYK J.E. SOHN. Second-order nonlinear-optical processes in orientationally ordered materials: relationship between molecular and macroscopic properties. J. Opt. Soc. Am. B, 4(6): p. 968–976, 1987.
- [50] N. BLOEMBERGEN. Nonlinear Optics. World Scientific, 4th edition, 1965.
- [51] O.F.J. NOORDMAN N.F. VAN HULST. Time-resolved hyper-Rayleigh scattering: measuring first hyperpolarizabilities β of fluorescent molecules. *Chem. Phys. Lett.*, 253: p. 145–150, 1996.
- [52] G. OLBRECHTS R. STROBBE K. CLAYS A. PERSOONS. High-frequency demodulation of multi-photon fluorescence in hyper-Rayleigh scattering. *Rev. Sci. Instrum.*, 69(6): p. 2233–2241, 1998.

- [53] S. INOUÉ. Handbook of Biological Confocal Microscopy: Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. J.B. Pawley. Plenum Press, New York, second edition, 1995.
- [54] C.J.R. SHEPPARD H.J. MATTEWS. Imaging in high aperture optical systems. J. Opt. Soc. Am. A, 3: p. 1354–1360, 1987.
- [55] J. MERTZ. Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy. E. P. J. D., 3: p. 53–66, 1998.
- [56] E.O. POTMA W.P. DE BOEIJ D.A. WIERSMA. Nonlinear coherent four-wavemixing in optical microscopy. J. Opt. Soc. Am. B, 17: p. 1678–1684, 2000.
- [57] J. AZOULAY. Méthodes spectroscopiques originales pour exploiter les propriétés de sonde locale d'un nanoobjet individuel. Thèse de doctorat, université Paris XI, juillet 2001.
- [58] B. RICHARDS E. WOLF. Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanetic system. *Proc. Roy. Soc. A*, 253: p. 358–379, 1959.
- [59] D. AXELROD. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys. J.*, 26: p. 557–573, 1979.
- [60] C.R. CANTOR P.R. SCHIMMEL. Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the study of biological structure and function. W.H. Freeman and Company, New York, 1998.
- [61] E. DEPREZ P. TAUC H. LEH J.F. MOUSCADET C. AUCLAIR J.-C. BROCHON. Oligomeric states of the hiv-1 integrase as measured by time-resoved fluorescence anisotropy. *Biochemistry*, 39: p. 9275–9284, 2000.
- [62] A. OLEA J.K. THOMAS. Rate constants for reactions in viscous media: correlation between the viscosity of the solvents and the rate constant of the diffusioncontrolled reactions. J. Am. Chem. Soc., 110: p. 4494–4502, 1988.
- [63] T. FÖRSTER. Energiewanderung und fluoreszenz. Naturwissenschaften,
 6: p. 166–175, 1946.
- [64] R.M. CLEGG. Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy: Fluorecence Resonance Energy Transfer, volume 137 of Chemical Analysis. Wiley, New York, 1996.
- [65] I. LEDOUX D. JOSSE P. VIDAKOVIC J. ZYSS R. HANN P. GORDON D. BO-THWELL S. GUPTA S. ALLEN P. ROBIN E. CHASTAING J.C. DUBOIS. Second harmonic generation by langmuir-blodgett multilayers of an organic azo dye. *Europhys. Lett.*, 3(7): p. 803–809, 1987.

- [66] V. DENTAN I. LEDOUX R. HIERLE J. ZYSS. Determination of molecular orientation in langmuir-blodgett films through second-harmonic generation experiments. *Nonlinear Optics*, 5: p. 407–412, 1993.
- [67] C.P.J.M. VAN DER VORST S.J. PICKEN. Electric field poling of acceptor-donor molecules. J. Opt. Soc. Am. B., 7(3): p. 320–325, 1990.
- [68] B. DIU C. GUTHMANN D. LEDERER, B. ROULET. Éléments de physique statistique. Hermann, Collection Enseignement des sciences, Paris, 1997.
- [69] I. LEDOUX R. PINSARD-LEVENSON J. ZYSS. Matériaux organiques pour les réseaux de communications optiques: de la molécule aux composants. L'écho des recherches, 162: p. 35–48, 1995.
- [70] A. DONVAL. Conception et réalisation de composants électrooptiques polymères insensibles à la polarisation. Thèse de doctorat, université Paris XI, mars 1999.
- [71] C.R. MOYLAN S. ERMER S.M. LOVEJOY I.-H.MCCOMB D.S. LEUNG R. WORTMANN P. KRDMER R.J. TWIEG. (dicyanomethylene)pyran derivatives with c2v symmetry: an unusual class of nonlinear optical chromophores. J. Am. Chem. Soc., 118: p. 21950–21955, 1996.
- [72] K.D. SINGER J.E. SOHN L.A. KING H.M. GORDON H.E. KATZ C.W. DIRK. Second-order nonlinear-optical properties of donor- and acceptor-substituted aromatic compounds. J. Opt. Soc. Am. B, 6: p. 1339–1350, 1989.
- [73] R.J. SENSION S.T. REPINEC A.Z. SZARKA R.M. HOCHSTRASSER. Femtosecond laser studies of the /cis/-stilbene photoisomerization reactions. J. Chem. Phys., 98(8): p. 6291–6315, 1993.
- [74] T. PLISKA W.-R. CHO J. MEIER A.C. LE DUFF V. RICCI A. OTOMO M. CANVA G.I. STEGEMAN P. RAIMOND F. KAJZAR. Comparative study of nonlinear-optical polymers for guided-wave second harmonic generation at telecommunication wavelength. J. Opt. Soc. Am. B, 17(9): p. 1554–1564, 2000.
- [75] W.E. MOERNER. Examining nanoenvironments in solids on the scale of a single, isolated impurity molecule. *Science*, 265: p. 46–53, 1994.
- [76] D.S. ENGLISH E.J. HARBRON P.F. BARBARA. Role of rare sites in single molecule spectroscopy measurements of spectral diffusion. J. Chem. Phys., 114(23): p. 10479–10485, 2001.
- [77] T. HA T.A. LAURENCE D.S. CHEMLA S. WEISS. Polarization spectroscopy of single fluorescent molecules. J. Phys. Chem. B, 103(33): p. 6839–6850, 1999.
- [78] M. PRUMMER B. SICK B. HECHT U.P. WILD. Three-dimensional optical polarization tomography of single molecules. J. Chem. Phys., 118(21): p. 9824– 9829, 2003.

- [79] L.A. DESCHENES D.A. VANDEN BOUT. Single-molecule studies of heterogeneous dynamics in polymer melts near the glass transition. *Science*, 292: p. 255– 258, 2001.
- [80] A.P. BARTKO K. XU R.M. DICKSON. Three-dimensional single molecule rotational diffusion in glassy state polymer films. *Phys. Rev. Lett.*, 89: p. 026101/1– 026101/4, 2002.
- [81] D. REISER A. LAUBEREAU. Ber. Bunsenges Phys. Chem., 86: p. 1106, 1982.
- [82] D.L. SACKETT J. WOLFF. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. Anal. Biochem., 167: p. 228–234, 1987.
- [83] H. DU R.A. FUH J. LI A. CORKAN J.S. LINDSEY. Photochemicad: A computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochemistry and Photobiology*, 68: p. 141–142, 1998.
- [84] J. ZYSS I. LEDOUX. Molécules organiques et traitement du signal optique. L'écho des recherches, 127: p. 19–30, 1987.
- [85] S. BRASSELET J. ZYSS. Multipolar molecules and multipolar fields: probing and controlling the tensorial nature of nonlinear molecular media. J. Opt. Soc. Am., 15(1): p. 257–288, 1998.
- [86] R. HIERLE J. BADAN J. ZYSS. Growth and characterization of a new material for nonlinear optics: methyl-3-nitro-4-pyridine-1-oxide (pom). J. of Crystal Growth, 69: p. 545–554, 1984.
- [87] J. ZYSS J.L. OUDAR. Relations between microscopic and macroscopic lowestorder optical nonlinearities of molecular crystals with one- or two-dimensional units. *Phys. Rev. A*, 26(4): p. 2028–2048, 1982.
- [88] M. SHIRO M. YAMAKAWA T. KUBOTA. The crystal and molecular structures of 3-methyl-4-nitropyridine n-oxide and 3,5-dimethyl-4-nitropyridine n-oxide. Acta Cryst. B, 33: p. 1549–1556, 1977.
- [89] Q. SONG C. WAN C.K. JOHNSON. Time-resolved second harmonic generation in the randomly oriented purple membrane. J. Phys. Chem., 98(8): p. 1999–2001, 1994.
- [90] J. ZYSS S. BRASSELET V.R. THALLADI G.R. DESIRAJU. Octupolar versus dipolar crystalline structures for nonlinear optics: A dual crystal and propagative engineering approach. J. Chem. Phys., 109(2): p. 658–669, 1998.
- [91] M. CHO S.-Y. AN H. LEE I. LEDOUX J. ZYSS. Nonlinear optical properties of tetrahedral donor-acceptor octupolar molecules: Effective five-state model approach. J. Chem. Phys., 116(21): p. 9165–9173, 2002.
- [92] M. JOFFRE D. YARON R. SILBEY J. ZYSS. Second order optical nonlinearity in octupolar aromatic systems. J. Chem. Phys., 97(8): p. 5607–5615, 1992.

- [93] M. CHO H.-S. KIM S.-J. JEON. An elementary description of nonlinear optical properties of octupolar molecules: Four-state model for guanidinium-type molecules. J. Chem. Phys., 108(17): p. 7114–7120, 1998.
- [94] C. KITTEL. Physique de l'état solide. Dunod, 7^{ème} edition, 1998.
- [95] S.R. MARDER J.W. PERRY W.P. SCHAEFER. Synthesis of organic salts with large second-order nonlinearities. *Science*, 245: p. 626–628, 1989.
- [96] H. NAKANISHI H. MATSUDA S. OKADA M. KATO. Mater. Res. Soc. Int. Sym. Proc., Int. Meeting Adv. Mater., 1: p. 97, 1989.
- [97] X.-M. DUAN S. OKADA H. NAKANISHI A. WATANABE M. MATSUDA K. CLAYS A. PERSOONS H. MATSUDA. Evaluation of |β| of Stilbazolium p-Toluenesulfonates by the Hyper Rayleigh Scattering Method, volume 2143 of Organic, Metallo-Organic, and Polymeric Materials for Nonlinear Optical Applications (Proc. SPIE), pages p. 41–51. S.R. Marder and J.W. Perry Ed., SPIE, Washington, 1994.
- [98] K. KOMATSU H. NANJO Y. YAMAGISHI T. KAINO. Oriented thin film fabrication of organic non-linear optical crystals. *Thin Solid Films*, 393: p. 1–6, 2001.
- [99] F. PAN M.S. WONG C. BOSSHARD P. GÜNTER. Crystal growth and characterisation of the organic salt 4-n,n-dimethylamino-4'-n'-methyl-stilbazolium tosylate (dast). Adv. Mater., 8(7): p. 592–595, 1996.
- [100] S. SOHMA H. TAKAHASHI T. TANIUCHI H. ITO. Organic nonlinear optical crystal dast growth and its device applications. *Chem. Phys.*, 245: p. 359–364, 1999.
- [101] F. TSUNESADA T. IWAI T. WATANABE H. ADACHI M. YOSHIMURA Y. MORI T. SASAKI. High-quality crystal growth of organic nonlinear optical crystal dast. J. of Crystal Growth, 237-239: p. 2104–2106, 2002.
- [102] M. DEUTSCH M.C. GERSTENBERG H.F. GOSSENBERGER V.S. BAN S.R. FORREST. Macroscopically ordered thin films of an organic salt grown by lowpressure organic vapor-phase deposition. J. of Crystal Growth, 203: p. 412–420, 1999.
- [103] S.R. MARDER J.W. PERRY C.P. YAKYMYSHYN. Organic salts with large second-order optical nonlinearities. *Chem. Mat.*, 6(8): p. 1137–1147, 1994.
- [104] H. OIKAWA S. FUJITA H. KASAI S. OKADA S.K. TRIPATHY H. NAKANISHI. Electric field-induced orientation of organic microcristals with large dipole moment in dispersion liquid. *Colloids and Surfaces A : Physicochem Eng. Aspects*, 169: p. 251–258, 2000.

- [105] G. KNÖPFLE R. SCHLESSER R. DUCRET P. GÜNTER. Optical and nonlinear optical properties of 4'-dimethylamino-n-methyl-4-stilbazolium tosylate (dast) crystals. *Nonlinear Opt.*, 9(1-4): p. 143–149, 1995.
- [106] P.Y. HAN M. TANI F. PAN X.-C. ZHANG. Use of the organic crystal dast for terahertz beam applications. Opt. Lett., 25(9): p. 675–677, 2000.
- [107] http://dolphin.ap.eng.osaka-u.ac.jp/web/index-e.html.
- [108] Y. WANG W. TAM S.H. STEVENSON R.A. CLEMENT J. CALABRESE. New organic non-linear optical materials of stilbene and diphenylacetylene derivatives. *Chem. Phys. Lett.*, 148(2-3): p. 136–141, 1988.
- [109] S.N. OLIVER P. PANTELIS P.L. DUNN. Polymorphism and crystalcrystal transformations of the highly optically nonlinear organic compound α -[(4'-methoxyphenyl)methylene]-4-nitro-benzeneacetonitrile. *Appl. Phys. Lett.*, 56(4): p. 307–309, 1990.
- [110] D.H. WALDECK. Photoisomerization dynamics of stilbenes. Chem. Rev., 91: p. 415–436, 1991.
- [111] F. TREUSSART E. BOTZUNG-APPERT N.-T. HA-DUONG A. IBANEZ J.-F. ROCH R. PANSU. Second harmonic generation and fluorescence of cmons dye nanocrystals grown in a sol-gel thin film. *Chem. Phys. Chem.*, 4(7): p. 757– 760, 2003.
- [112] E. BOTZUNG-APPERT. Nanocristaux organiques inclus dans des couches minces sol-gel: Contrôle de leur distribution spatiale pour la réalisation de mémoires optiques, Spectrochimie de luminescence pour la mise au point de capteurs chimiques ou biologiques. Thèse de doctorat, université Joseph Fourier-Grenoble I, juin 2003.
- [113] N. SANZ P.L. BALDECK J.-F. NICOUD Y. LE FUR A. IBANEZ. Polymorphism and luminescence properties of CMONS organic crystals: Bulk crystals and nanocrystals confined in gel-glasses. *Solid State Sci.*, 3: p. 867–875, 2001.
- [114] R.M. VRCELJ E.E.A. SHEPHERD C.-S. YOON J.N. SHERWOOD A.R. KEN-NEDY. Preparation and structural evaluation of the conformational polymorphs of α -[(4-methoxyphenyl) methylene]-4-nitrobenzeneacetonitrile. *Crystal Growth* and Design, 2(6): p. 609–617, 2002.
- [115] M.L. SANDROCK C.D. PIBEL F.M. GEIGER C.A. FOSS. Synthesis and secondharmonic generation studies of noncentrosymmetric gold nanostructures. J. Phys. Chem. B, 103(14): p. 2668–2673, 1999.
- [116] E.V. MAKEEV S.E. SKIPETROV. Second harmonic generation in suspensions of spherical particles. Opt. Commun., 224(1-3): p. 139–147, 2003.

- [117] J. CHEN S. MACHIDA Y. YAMAMOTO. Simultaneous measurement of amplitude and phase in surface second-harmonic generation. *Opt. Lett.*, 23(9): p. 676–678, 1998.
- [118] F. GROSSHANS. Communication et cryptographie quantique avec des variables continues. Thèse de doctorat, université Paris XI, décembre 2002.
- [119] S. KLUGE F. BUDDE I. DOHNKE P. RECHSTEINER J. HULLIGER. Phasesensitive second-harmonic microscopy reveals polarity of topologically centrosymmetric molecular crystals. App. Phys. Lett., 81(2): p. 274–249, 2002.
- [120] J.B. GUILD C. XU W.W. WEBB. Measurement of group delay dispersion of high numerical aperture objective lenses using two-photon excited fluorescence. *App. Opt.*, 36(1): p. 397–401, 1997.
- [121] J.K. RANKA A.L. GAETA A. BALTUSKA M.S. PSHENICHNIKOV D.A. WIERSMA. Autocorrelation measurement of 6-fs pulses based on the two-photon-induced photocurrent in a GaAsP photodiode. *Opt. Lett.*, 22: p. 1344–1346, 1997.
- [122] J.I. DADAP J. SHAN A.S. WELING J.A. MISEWICH T.F. HEINZ. Homodyne detection of second-harmonic generation as a probe of electric fields. *App. Phys. B*, 68: p. 333–341, 1999.
- [123] R.M. BROWN A.C. MILLARD P.J. CAMPAGNOLA. Macromolecular structure of cellulose studied by second-harmonic generation imaging microscopy. *Opt. Lett.*, 28(22): p. 2207–2209, 2003.
- [124] R.E. DALE S.C. HOPKINS U.A. AN DER HEIDE T. MARSZALEK M. IRVING Y.E. GOLDMAN. Model-independant analysis of the orientation of fluorescent probes with restricted mobility in muscle fibers. *Biophys. J.*, 76: p. 1606–1618, 1999.
- [125] S.I. BOZHEVOLNYI B. VOHNSEN K. PEDERSEN. Near-field optical microscopy of nonlinear susceptibilities. Opt. Commun., 150: p. 49–55, 1998.
- [126] C. ANCEAU. Réponse non-linéaire locale de monocouches moléculaires ordonnées et effets d'exaltations sur des structures métalliques granulaires, sondés par microscopie à deux photons. Thèse de doctorat, université de Versailles Saint-Quentin, octobre 2002.
- [127] S. TAKAHASHI A.V. ZAYATS. Near-field second-harmonic generation at a metal tip atex. Appl. Phys. Lett., 80: p. 3479–3481, 2002.
- [128] C. ANCEAU S. BRASSELET J. ZYSS P. GADENNE. Local second-harmonic generation enhancement on gold nanostructures probed by two-photon microscopy. *Opt. Lett.*, 28(9): p. 713–715, 2003.

- [129] C. XU W.W. WEBB. Multiphoton Excitation of Molecular Fluorophores and Nonlinear Laser Microscopy, volume 5: Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence of Topics in Fluorescence Spectroscopy. J. Lakowicz. Plenum Press, New York, 1997.
- [130] F. BERNOUX J.-P. PIEL J.-H. LECAT J.L. STEHLÉ. Ellipsométrie. *Techniques de l'ingénieur, traité Mesures et Contrôle*, R 6 490(1): p. 16.