



HAL
open science

Spectroscopie de nanosondes hybrides à coeur métallique

Matthieu Loumagne

► **To cite this version:**

Matthieu Loumagne. Spectroscopie de nanosondes hybrides à coeur métallique. Optique [physics.optics]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT: 2009PA112264. tel-00841260

HAL Id: tel-00841260

<https://theses.hal.science/tel-00841260>

Submitted on 4 Jul 2013

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.

UNIVERSITÉ PARIS SUD XI - U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD XI

Ecole doctorale : Onde et Matière

présentée par

Matthieu LOUMAIGNE

Sujet :

**Spectroscopie de nanosondes hybrides
à coeur métallique**

soutenue le 2009 à Orsay devant le jury composé de :

M. Antoine DELON	<i>Rapporteur</i>
M. Jérôme PLAIN	<i>Rapporteur</i>
Mme. Maria ALLEGRINI	<i>Examinatrice</i>
M. Jean-Jacques GREFFET	<i>Examineur</i>
Mme. Anne DEBARRE	<i>Co-Directrice de thèse</i>
M. Paul TCHENIO	<i>Directeur de thèse</i>
M. Martijn WERTS	<i>Invité</i>

Laboratoire Aimé Cotton - Campus d'Orsay
Bat 505, 91405 Orsay

Remerciements

Je remercie M. Pierre Pillet, directeur du laboratoire Aimé Cotton, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de mener à bien mon travail de thèse.

Je suis très reconnaissant à M. Antoine Delon et M. Jérôme Plain d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie vivement de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et à la lecture de mon manuscrit. Je remercie également Mme Maria Allegrini et M. Jean-Jacques Greffet d'avoir accepté d'être membres de mon jury. Merci enfin à Martijn Werts, présent dans mon jury de thèse, ainsi qu'à ses étudiants Raïssa Praho et Julien Navarro d'avoir élaboré une partie des échantillons étudiés dans cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Anne Debarre et Paul Tchénio pour m'avoir formé à la recherche expérimentale. J'ai choisi de faire une thèse pour apprendre le plus de choses possibles et grâce à eux cet objectif est plus que rempli. Je les remercie aussi pour leurs nombreuses relectures constructives de mon manuscrit. Merci à Daniele Nutarelli pour son soutien et pour toutes ses réponses à mes questions d'ordre général sur la physique. Je tiens également à remercier profondément Alain Richard dont la disponibilité, l'efficacité et l'ingéniosité m'ont été précieuses. J'aimerais avoir ne serait-ce qu'un dixième de son esprit pratique.

Merci également à Elodie Milhiet et Julien Laverdant aux côtés de qui j'ai eu plaisir à travailler.

Merci encore à l'ensemble du personnel du laboratoire et particulièrement aux membres de l'atelier de mécanique qui m'ont rendu de nombreux services.

Je remercie aussi Jérôme Leygnier qui m'a proposé de nombreux enseignements dans le cadre de mon monitorat. Je lui suis en particulier reconnaissant de m'avoir proposé les travaux dirigés d'informatique appliquée à la physique en Master 1 qui ont été pour moi une expérience très intéressante et très enrichissante.

TABLE DES MATIERES

Merci aussi à tous les doctorants du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de discuter ici et là, (souvent dans le RER) de physique, évidemment, et de bien d'autres choses. Merci donc à Nicolas, Hien, Fabienne, Dimitri et Hélène; Matthieu, Amodsen, Mariella, Guillaume, Aline, Michael et Pierre; Matthieu, Jérôme, Manu, Vianey, Romain, Vincent, Oussama, Leila, Medhi, Anne et Beatrice.

Je remercie évidemment ma famille pour leur constant soutien.

Enfin, merci à toi Cécile pour tout et bien plus encore.

Table des matières

Introduction	1
1 La microscopie confocale pour observer les fluctuations de la luminescence	7
1.1 Observer les fluctuations	7
1.2 Microscopie confocale et biphotonique	8
1.2.1 Principe de la microscopie confocale	9
1.2.2 Le profil d'excitation	10
1.2.2.1 Réponse percutionnelle de l'objectif	10
1.2.2.2 Approche phénoménologique	13
1.2.3 Profil de collection pour un dipole	13
1.2.3.1 Calcul à l'aide d'ondes planes	13
1.2.3.2 Modèle plus simple	16
1.2.4 Le profil d'efficacité de détection	17
1.2.4.1 Modèle phénoménologique	17
1.2.5 Microscopie biphotonique	18
1.2.5.1 Comparaison de la microscopie biphotonique et de la microscopie confocale	18
1.3 Montage expérimental	19
1.3.1 Voie d'excitation	21
1.3.1.1 Laser d'excitation	21
1.3.1.2 Agrandissement et filtrage spatial du faisceau laser	21
1.3.1.3 Alignement du faisceau laser	22
1.3.1.4 Polariseur	23
1.3.1.5 Choix de la lame dichroïque	23
1.3.1.6 lame de phase	24
1.3.1.7 Choix de l'objectif	26
1.3.1.8 Réglage de la bague de correction de l'objectif	26
1.3.1.9 Hauteur de travail dans l'échantillon	26
1.3.2 Voie de collection	27

TABLE DES MATIERES

1.3.2.1	Caméra CCD	28
1.3.2.2	Filtrage confocal	28
1.3.2.3	Séparation du signal sur différentes voies	29
1.3.2.4	Détecteur de photon unique	30
1.3.2.5	Carte de comptage	31
1.3.2.6	Logiciel de pilotage de l'expérience	31
1.3.3	Caractérisation du montage	32
1.3.3.1	Calibration du volume focal	32
1.3.3.2	Calibration des 2 voies de détection pour qu'elle soient symétriques	33
1.3.3.3	Saturation d'un fluorophore	35
1.3.3.4	La limite de la molécule unique	38
2	Analyse des fluctuations	41
2.1	Nature du signal	41
2.1.1	Filtrage du signal	42
2.2	Corrélation du signal	45
2.2.1	Définition	46
2.2.1.1	Définition générale	46
2.2.1.2	Corrélation dans le cadre de la microscopie confocale	46
2.2.2	Algorithmes de calcul	48
2.2.2.1	Théorème de Wiener-Khintchine	48
2.2.2.2	Algorithme type corrélateur électronique	49
2.2.3	Méthode brute	50
2.2.4	Algorithme proposé par Whal	51
2.2.5	Un autre algorithme relativement simple et efficace	51
2.2.6	Normalisation de la courbe	53
2.2.7	Corrélation de l'anisotropie	53
2.2.8	Corrélation du signal avec suppression de l'afterpulsing	55
2.2.9	Modèle théorique de la corrélation d'un signal obtenu par microscopie confocale	56
2.2.10	Signal collecté	61
2.2.11	La fonction de corrélation	62
2.2.11.1	Cas de la diffusion brownienne spatiale	63
2.2.11.2	Cas de la diffusion de deux espèces indépendantes	66
2.2.11.3	Cas du clignotement de la sonde	66
2.2.11.4	Cas de la diffusion brownienne spatiale et de rotation	68

2.2.11.5	Prise en compte de la réponse impulsionnelle du microscope dans le calcul de la fonction de corrélation	70
2.2.11.6	Fonction de corrélation avec séparation de polarisation	75
2.2.12	Précision statistique en FCS	79
3	Etude d'une sonde calcique par spectroscopie de fluctuation de fluorescence	83
3.1	Définition d'une sonde calcique	83
3.2	Méthode de caractérisation	85
3.3	Présentation de l'Oregon green bapta 5N	85
3.4	Principe de l'expérience	87
3.5	Préparation des échantillons	88
3.6	Résultats	89
3.6.1	Titration	89
3.6.2	Courbes de FCS	90
3.6.3	Etude photophysique complémentaire	92
3.7	Conclusion	95
4	Etude de la photoluminescence de nanoparticules d'or	97
4.1	Propriétés optiques des nanoparticules d'or	98
4.1.1	Structure de bande	98
4.1.2	Réponse optique de l'or massif	98
4.1.2.1	Fonction diélectrique	98
4.1.2.2	La photoluminescence des métaux nobles	102
4.1.3	Modification apportée par la taille nanométrique des objets étudiés	103
4.1.3.1	la nanoparticule	103
4.1.3.2	Effet de peau	104
4.1.4	Echauffement de la bille due à l'excitation laser	104
4.1.4.1	Changement de la fonction diélectrique	104
4.1.4.2	La résonance plasmon de surface	105
4.1.4.3	Réponse optique non linéaire des nanoparticules	106
4.1.4.4	Paramètres dont l'incidence n'est pas bien connue	107
4.2	Conclusion	107
4.3	Revue bibliographique des principaux résultats publiés sur la photoluminescence des métaux nobles	108
4.3.1	Points de caractérisation expérimentale	108
4.3.2	Conclusion	111
4.4	Description des échantillons étudiés	112
4.5	Caractérisation préliminaire des échantillons	113

TABLE DES MATIERES

4.5.1	Spectre d'extinction	113
4.5.2	Echantillon déposé sur une lamelle de verre	114
4.5.2.1	Loi de puissance	115
4.5.2.2	Sensibilité à la polarisation d'excitation	116
4.6	Caractérisation en solution à l'échelle de la particule unique	117
4.6.1	Mise en évidence de l'anisotropie de nanobilles d'or	117
4.6.2	Reproductibilité des courbes de corrélation de photoluminescence	119
4.6.3	Anisotropie à l'émission	120
4.6.4	Mise en évidence d'un effet de seuil par une méthode originale de corrélation diffusion Rayleigh/Photoluminescence	121
4.6.5	Spectres de luminescence	122
4.6.6	Évolution avec la viscosité de la solution	124
4.6.7	Excitation avec une polarisation circulaire	125
4.6.8	Étude de la polarisation à l'émission	127
4.6.9	Évolution de la brillance d'une nanobille avec son diamètre	130
4.6.10	Etude de l'anisotropie de forme des billes	131
4.6.11	Excitation dans l'UV	134
4.6.12	Echange de ligand	135
4.6.13	Évolution avec la puissance	135
4.6.14	Évolution de la polarisation d'émission avec la puissance	138
4.7	Discussion générale	140
4.7.1	Résumé des résultats obtenus	140
4.7.2	Proposition d'un mécanisme expliquant l'influence des ligands sur la photoluminescence	142
4.7.3	Conclusion	145
5	Caractérisation de sondes constituées de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des fluorophores	147
5.1	Interaction entre une nanoparticule métallique et un chromophore	147
5.2	Le projet européen	153
5.2.1	Objectifs du projet	154
5.2.2	Description du système de départ synthétisé par les chimistes	154
5.2.3	Prévision théorique	158
5.2.4	Objectifs des mesures à l'échelle de la particule unique	160
5.3	Caractérisation à l'échelle de la particule unique des sondes	161
5.3.1	Choix de l'excitation	161
5.3.2	Caractérisation des billes d'or	162
5.3.3	Caractérisation des ligands très dilués	163

TABLE DES MATIERES

5.3.4	Etude en FCS de la sonde	164
5.3.5	Analyse du temps de vie de fluorescence de la sonde	165
5.3.6	Etude par bouffées de photon	166
5.3.7	Expérience de comparaison du signal Rayleigh et de la fluorescence . .	169
5.3.7.1	Présentation de la méthode	169
5.3.7.2	Expériences préliminaires	170
5.3.7.3	Résultats	170
5.3.7.4	Extensions possibles de la méthode	172
5.3.8	Identification de l'espèce inconnue	175
5.3.9	Conclusion	178
	Conclusion et perspectives	181
	Bibliographie	183
	A Quelques rappels sur le phénomène de fluorescence	195
	B Simulation	201
	C Code en C de l'algorithme de corrélation	205
	D Changement de repère	209
	E Calcul des coefficients de rotation	211

TABLE DES MATIERES

Introduction

Le titre de ma thèse comporte les termes nano et spectroscopie. Le préfixe nano qui vient du grec *ναννο* ("d'une petitesse excessive") évoque aujourd'hui le domaine des nanotechnologies. La spectroscopie utilise la richesse de l'interaction lumière-matière qui, aussi bien pour les physiciens que pour l'être humain au quotidien, est un outil primordial pour sonder le monde qui nous entoure.

Les nanosciences

Le mot nanotechnologie est apparu en 1974. Il est devenu réalité dans les années 80 avec la mise au point du microscope à effet tunnel (STM) puis à force atomique (AFM) qui ont permis d'observer puis de déplacer des objets nanométriques voire des atomes ($\simeq 1/10$ de nanomètre). Etudier et manipuler des molécules (typiquement quelques nm) ou des atomes un par un est maintenant chose courante en laboratoire.

Les nanotechnologies évoquent en premier lieu le monde de l'électronique et de l'informatique où la diminution de la taille des processeurs (actuellement la finesse de gravure est de 45 nm) rend les ordinateurs toujours plus puissants. Cette impression première masque le fait que les nanosciences sont le paradigme du domaine interdisciplinaire. La chimie, la biologie, la science des matériaux, la médecine, l'ingénierie au sens large, et bien évidemment la physique travaillent de concert à la synthèse (chimie, science des matériaux), la caractérisation et la compréhension (la physique) pour l'utilisation (ingénierie, biologie et médecine) de nano-objets.

Les objets nanométriques ont des dimensions subcellulaires. Introduits dans un organisme, ils peuvent interagir avec les différents acteurs cellulaires et ce de façon plus subtile qu'un simple fluorophore. Une synthèse contrôlée de nano-objets ouvre la voie pour de nouvelles sondes biologiques dont les caractéristiques sont paramétrables.

Les nanoparticules

Le passage des micros aux nanotechnologies est certes un défi technologique considérable mais il s'accompagne également d'une étape conceptuelle cruciale : la physique qui régit les

INTRODUCTION

phénomènes à cette échelle se situe à la frontière entre le monde classique et le monde quantique. On parle de physique mésoscopique. Un exemple emblématique est l'apparition de ce qui est communément appelé résonance plasmon de surface. Cette nouvelle forme d'interaction lumière-matière tient au fait que la matière est confinée dans des dimensions inférieures à la longueur d'onde de la lumière visible (400-800nm). A cette échelle, la matière et les électrons qui la composent répondent collectivement à une excitation lumineuse.

Parmi les nombreux candidats pour réaliser des nanosondes biologiques (fluorophores, boîtes quantiques, ion terre rare,...) les nanoparticules formées à partir de métaux nobles retiennent particulièrement l'attention. Elles sont facilement synthétisables car beaucoup de réactifs conduisent à la réduction de sels de métaux nobles. Elles sont très stables. Elles sont relativement peu cytotoxiques¹ comparées aux autres type de sondes. Il existe de nombreux protocoles chimiques pour greffer des molécules à la surface de la nanoparticule. Cette dernière peut donc avoir de nombreux groupes chimiques qui permettent par exemple de reconnaître des sites biologiques comme le font les enzymes. Enfin, la résonance plasmon de surface et de façon plus générale les effets quantiques liés à la taille des objets étudiés offrent de nouvelles possibilités d'interactions très versatiles pour détecter la présence de la nanoparticule.

La synthèse de nano-objets se révèle très subtile. La moindre variation d'un paramètre de la synthèse conduit à des particules de taille et de forme différentes de celles attendues. Il est alors indispensable d'avoir des techniques de caractérisation qui vont de pair avec les méthodes de synthèse.

La première étape de caractérisation consiste à observer la morphologie des nanoparticules étudiées. Pour souligner l'importance de cette analyse, prenons l'exemple macroscopique d'une pièce d'or et d'un lingot d'or, l'analyse spectroscopique arrivera au même constat dans les deux cas : il s'agit d'or. En d'autres termes, les propriétés spectroscopiques d'un objet de taille macroscopique ne sont déterminées que par la nature du matériau. Les propriétés de petits agrégats ("seulement" quelques milliards d'atomes) dépendent non seulement du matériau mais aussi de leur taille et de leur forme. Une nanobille d'or de 3 nm de diamètre n'a absolument pas les mêmes caractéristiques spectrales qu'un nano bâtonnet d'or de 50 nm par 20 nm.

La microscopie conventionnelle montre ses limites en ce qui concerne la caractérisation de la morphologie de la nanoparticule. En effet, tout objet dont les dimensions sont inférieures à quelques fractions de la longueur d'onde λ de la lumière utilisée (typiquement $\frac{\lambda}{2}$) n'est plus résolu et est perçu comme un point de taille $\frac{\lambda}{2}$. La microscopie de champ proche permet de dépasser la limite de diffraction et d'atteindre quelques dizaines de nanomètres. En deçà, il faut utiliser la microscopie électronique ou la microscopie à force atomique. De façon générale, toutes ces techniques de type sublongueur d'ondes sont utiles pour caractériser les nanoparticules

¹Notons que les nanoparticules d'or ont été utilisées empiriquement par le passé pour "soigner" des déséquilibres mentaux[Higby, 1982]. Il existe encore des sites internet vantant les mérites de nanoparticules diverses et préconisant l'administration de nanoparticules par voie générale ou même en intraveineuse ...

avant leur utilisation. La caractérisation des sondes en situation d'utilisation, c'est à dire en solution aqueuse pour des sondes biologiques, ne peut se faire, pour des raisons pratiques, que par la spectroscopie optique en champ lointain.

Rappelons aussi que la granulométrie laser, par exemple, est l'une des techniques les plus employées, y compris dans l'industrie, pour caractériser la taille des nanoparticules. Les études en polarisation fournissent des informations précieuses sur l'anisotropie. Seule la détermination de la forme exacte des nanoparticules nécessite une technique d'imagerie haute résolution. Un dernier avantage de l'imagerie est de ne pas être perturbée par l'inhomogénéité éventuelle des échantillons étudiés. Celle-ci n'est souvent que partiellement prise en compte par les approches de spectroscopie traditionnelle, mais la nanospectroscopie permet comme l'imagerie d'éviter cet écueil.

La nanospectroscopie

La spectroscopie optique dispose de nombreux outils qui améliorent grandement la précision des caractéristiques obtenues. Il existe tout d'abord d'excellentes sources de radiation lumineuse, à savoir les lasers. L'apparition des lasers saphir titane permet maintenant avec un seul laser et en utilisant différents effets non linéaires comme le doublage ou la création de continuum dans des fibres microstructurées d'avoir une source en impulsion accordable sur l'ensemble du visible. La spectroscopie peut aussi s'appuyer sur une optique de grande qualité, utilisant principalement le verre, qui permet de former des images sans aberrations et de collecter efficacement la lumière émise par les échantillons. D'autre part, de nombreux outils optiques permettent au quotidien de séparer ou modifier l'intensité, la longueur d'onde, la polarisation, ... de la lumière utilisée. Enfin, on peut aussi citer l'existence de détecteurs, à base de silicium par exemple, dont la résolution temporelle et l'efficacité quantique sont très bonnes.

La nanospectroscopie vise à étudier des nanoparticules individuelles grâce à l'interaction lumière matière. Atteindre la limite de l'étude d'une particule unique permet de s'affranchir efficacement des effets de moyennes liés à des méthodes d'analyse spectroscopiques macroscopiques. Atteindre une telle limite demande un système de microscopie optimisé car l'une des difficultés majeures est l'atteinte d'une sensibilité suffisante pour obtenir un bon rapport signal sur bruit. Les montages de nanospectroscopie font souvent appel des montages optimisés de microscopie confocale ou de microscopie grand champ, en particulier TIRF², selon les échantillons étudiés. Ces méthodes sont utiles pour caractériser plus finement les propriétés intrinsèques des nanoobjets comme je le montrerai dans ce manuscrit. Dans ces conditions, les nanoobjets uniques deviennent alors des sondes de leur environnement. Un nanoobjet permet de sélectionner un site bien déterminé et d'analyser les propriétés spectroscopiques au voisinage de ce site.

²Total Internal Reflection Fluorescence ou microscopie à ondes évanescentes

La spectroscopie de corrélation de fluorescence

Lorsque l'on décrit une technique de spectroscopie il faut distinguer l'interaction lumière-matière mise en jeu (fluorescence, diffusion Raman, diffusion Rayleigh, effet non linéaire,...) et la technique optique mise au point pour engendrer puis collecter ce signal. Parmi toutes les techniques disponibles nous allons nous intéresser tout particulièrement à la spectroscopie de corrélation de fluctuations. Cette technique est très élégante. Elle consiste à observer les fluctuations d'un système tout en restant à l'équilibre thermodynamique. Cette technique met en lumière la dichotomie entre le monde macroscopique et le monde nanoscopique. Depuis, par exemple, les travaux de Berthelot sur la réaction d'estérification vers 1860, les scientifiques ont résolu le paradoxe apparent d'un équilibre chimique. Comment se fait-il que la réaction s'arrête alors qu'il reste encore des réactifs dans la solution ? A l'échelle microscopique la réaction a toujours lieu ; les molécules, animées d'un mouvement brownien, continuent d'entrer en collision et de se transformer chimiquement aussi bien dans le sens de création des produits que dans le sens de retour aux réactifs. En moyenne, c'est à dire à l'échelle macroscopique, la solution a atteint un statut quo que l'on appelle équilibre. La spectroscopie de corrélation de fluctuations (FCS) permet de dépasser ce simple constat de statut quo et d'observer les molécules, une à par une, alors qu'elles sont en train de réagir chimiquement entre elles. De façon plus générale, la FCS permet de caractériser temporellement toutes les fluctuations qui conduisent à une modulation de la lumière émise par le système étudié. Cette technique n'est donc pas spécifique à un seul type d'interaction lumière matière, elle est en quelque sorte universelle. Elle permet en outre d'accéder à la dynamique des fluctuations sur une très large gamme temporelle (de la centaine de nanosecondes à la seconde).

Plan de la thèse

Mon travail de thèse est essentiellement expérimental. Les résultats présentés dans ce manuscrit portent principalement sur la caractérisation optique de nanosondes individuelles à l'échelle de molécule unique. Le manuscrit est divisé en cinq chapitres. Les deux premiers visent à décrire les outils spectroscopiques employés et les méthodes d'analyse. Les trois derniers correspondent à la caractérisation de trois sondes de type différents.

Dans le premier chapitre nous verrons en quoi la microscopie confocale est très bien adaptée à l'observation des fluctuations d'objets lumineux. J'exposerai le principe de la microscopie confocale à l'aide de simulation numérique. La seconde partie de ce chapitre sera dédiée à la mise en oeuvre expérimentale de la microscopie confocale.

Le second chapitre est consacré à l'analyse des fluctuations de la luminescence collectée par microscopie confocale. Nous verrons tout d'abord quelle est la nature du signal détecté et comment le filtrer numériquement pour le séparer en différentes contributions. Après avoir vu ce que l'on entend par corrélation d'un signal discret comme cela est le cas pour une liste

INTRODUCTION

de temps d'arrivée de photons, je présenterai les principaux algorithmes permettant le calcul de la corrélation du signal. La dernière partie du chapitre présentera les modèles physiques permettant d'ajuster les courbes de corrélations obtenues. Je présenterai en particulier un modèle tenant compte de la réponse impulsionnelle du microscope.

Le troisième chapitre porte sur l'étude d'une sonde calcique moléculaire par spectroscopie de corrélation de fluorescence. Ce travail a été réalisé au début de ma thèse. Il a pour but de caractériser la dynamique de réaction entre la sonde calcique et le calcium, ce à l'échelle de la molécule unique. Je montrerai que l'on peut caractériser efficacement des sondes calciques par spectroscopie de corrélation de fluctuation en restant à l'équilibre.

Le quatrième chapitre s'intéresse au processus de luminescence des billes d'or entourés de ligands sans chromophores, sujet d'actualité dont les mécanismes ne sont pas complètement élucidés. Mes expériences montrent pour la première fois à l'échelle de la particule unique et en solution le rôle crucial joué par l'état de surface dans la photoluminescence des nanobilles d'or. Nous verrons que la photoluminescence de telles particules a un comportement très singulier.

Le dernier chapitre concerne la caractérisation des propriétés physicochimiques de nano-sondes synthétisées par des partenaires chimistes dans le cadre d'un projet européen. Elles sont constituées de nanobilles d'or fonctionnalisées avec des ligands tétraéthylèneglycol auxquels sont liés les chromophores. Ce type de sondes à coeur métallique est en plein développement et fait l'objet de nombreux travaux. Nous verrons en quoi les techniques de spectroscopie à l'échelle de la molécule unique jouent un rôle crucial dans la caractérisation de telles sondes.

INTRODUCTION

Chapitre 1

La microscopie confocale pour observer les fluctuations de la luminescence

1.1 Observer les fluctuations

Ce que l'on appelle un équilibre thermodynamique à l'échelle macroscopique n'est pas une situation figée à l'échelle microscopique. Autour d'une configuration d'équilibre qui est, de loin, la plus probable statistiquement, le système fluctue. Ces fluctuations apparaissent spontanément, et leur caractérisation conduit à la compréhension de leur cause. Tout en restant à l'équilibre thermodynamique macroscopique, on peut ainsi étudier le mouvement brownien, la cinétique d'une réaction chimique, et de façon générale, tout phénomène qui conduit à faire fluctuer le signal étudié.

Ces fluctuations sont cependant difficiles à observer. Dans $50 \mu\text{m}^3$ d'air il y a environ 1.2 pmol de particules soit $7,22 \times 10^{11}$ particules. Ces dernières sous l'effet de l'agitation thermique se répartissent en moyenne uniformément dans ces $50 \mu\text{m}^3$; disons 50 % à droite, 50 % gauche. Cette répartition fluctue autour de cette valeur moyenne, mais du fait du nombre colossal de particules dans le volume, la configuration la plus fréquente est toujours 50 % des particules à droite et 50 % gauche. Pour observer ne serait-ce que 49.999413% à droite 50.000587% à gauche il faut attendre l'âge de l'univers!¹.

Pour observer ces fluctuations, il faut donc d'une part limiter le volume d'observation, et d'autre part diminuer la concentration des particules à étudier. L'interaction lumière matière se prête très bien à ce type d'expérience, d'une part en focalisant la lumière dans une zone très restreinte de l'espace, et d'autre part en ne sélectionnant parmi un ensemble de particules que

¹Soit N le nombre de molécules, la probabilité d'avoir x molécules à droite est de $P = \frac{C^x N}{2^N}$, le temps caractéristique de réarrangement est environ $\tau = \frac{l}{v}$ où l est le libre parcourt moyen (70 nm) et v la vitesse cinétique obtenue avec l'équipartition de l'énergie ($624 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$). On obtient $\tau = 0.1 \text{ ns}$. Le temps moyen d'attente est de $T = \frac{\tau}{P}$

celles qui sont sensibles à la lumière utilisée.

L'observation de telles fluctuations est réalisable en milieu gazeux [Blum et al., 2006], mais elle est considérablement plus simple à réaliser en milieu liquide. De plus, les mesures en solution présentent un intérêt évident pour les phénomènes biologiques. En choisissant un solvant non sensible à la lumière utilisée, on peut diluer les particules d'intérêt pour obtenir des doses "quasi homéopathiques" i.e quelques unes dans la zone étudiée. La seule limite est alors la détection du signal d'une seule particule.

De tels microscopes ont été réalisés dès le début du 20ème siècle [Siedentopf and Zsigmondy, 1903] pour étudier, par exemple, des nanoparticules d'or de taille inférieure à 100 nm. Les fluctuations de la lumière diffusée par ces particules étaient alors observées directement à l'oeil dans l'obscurité. De tels systèmes ont permis à Perrin de confirmer la théorie d'Einstein et Smoluchowsky sur le mouvement Brownien [Einstein, 1905]. En 1972, Madge *et al* mettent au point la technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) [Magde et al., 1972]. Cependant, le matériel de l'époque rend la méthode peu sensible. En 1993, Rigler *et al* couplent la microscopie confocale à la FCS [Rigler et al., 1993]. Après quelques améliorations techniques, la limite de la molécule unique est atteinte. Le système optique est capable de suivre les fluctuations du système, et ce molécule par molécule.

1.2 Microscopie confocale et biphotonique

Observer les fluctuations nécessite donc de limiter le nombre de particules simultanément présentes dans le volume d'étude. Au delà, les fluctuations du signal d'une des particules sont noyées (i.e moyennées) dans les fluctuations des autres particules. On peut procéder de deux façons :

- On disperse les particules sur une surface. On observe ainsi une seule particule aussi longtemps que dure sa luminescence. Cependant, il est plus long de faire une statistique sur l'ensemble des particules. De plus, la particule est figée dans la position où elle a été déposée et les interactions avec le support et la chimie nécessaire à l'ancrage peuvent modifier les propriétés du nanoobjet. Ce type d'étude peut constituer une étape de caractérisation de la particule avant son utilisation en milieu liquide.
- On étudie les particules en solution très diluée. Il s'agit du régime d'étude de la biologie dont la plupart des processus se passe en milieu aqueux. Les particules animées d'un mouvement brownien diffusent, idéalement, une par une dans la zone d'étude². Les expériences portent donc sur un ensemble de particules. Mais, contrairement aux mesures

²De nouvelles techniques de suivi de particules en solution ont été récemment mises au point [Cang et al., 2006] [Levi et al., 2005]. Elles consistent à suivre en continu la diffusion brownienne de la particule. Pour ce faire, on asservit via trois céramiques piézoélectriques la position de l'échantillon pour que la particule se trouve en permanence au centre du volume d'étude.

macroscopiques, on peut observer les fluctuations car les particules passent une par une dans la zone d'étude. De plus, la particule tourne sur elle même de façon brownienne sous l'effet de l'agitation thermique. Cela permet alors de l'étudier sous plusieurs angles. Pour ces mesures en solution il est primordial de ne collecter que la luminescence provenant d'une zone assez petite pour ne contenir que quelques particules à la fois.

La microscopie confocale permet d'obtenir cette petite zone d'étude i.e grande par rapport à la particule mais assez petite pour n'en englober simultanément que quelques unes. D'autre part, le profil de la zone détectée est a priori bien déterminé. Typiquement le volume sondé est réduit à une fraction de femtolitre ($1 \mu\text{m}^3$). La microscopie confocale est par ailleurs très largement utilisée pour réaliser des images tridimensionnelles d'échantillons épais (quelques dizaines de μm). En balayant l'échantillon par point de $1 \mu\text{m}^2$, notamment dans la direction axiale, on reconstruit l'image 3D de la luminescence émise par l'échantillon.

1.2.1 Principe de la microscopie confocale

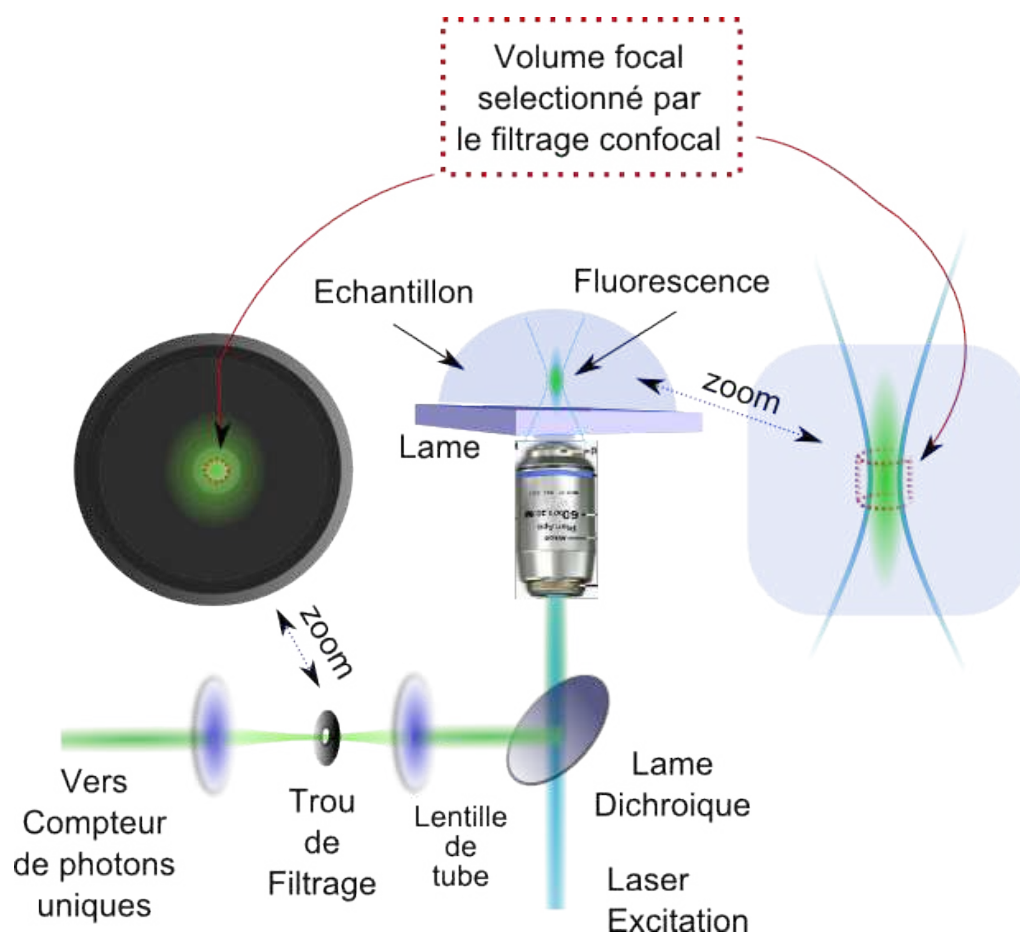


FIG. 1.1 – Principe de la microscopie confocale utilisée en solution. Afin de faciliter la lecture du schéma la dichroïque est ici utilisée en transmission et non en réflexion.

Un montage optique confocal a pour but de rejeter le signal hors foyer. Son principe, pour une utilisation en solution, est expliqué sur le schéma 1.1. Le signal récolté ne provient que d'un volume restreint pour deux raisons :

1. Le laser est focalisé très fortement par un objectif de grande ouverture numérique. La densité d'énergie n'est donc importante qu'autour d'une zone centrée sur le point de focalisation. Le nombre de particules excitées par unité de volume est maximal au plan focal de l'objectif.
2. Le même objectif forme l'image de la lumière émise par l'échantillon sur un trou de filtrage. Ce dernier ne laisse passer que le signal provenant d'un volume proche du point de focalisation.

La description du volume d'étude peut être scindée en trois parties : le profil d'excitation, le profil de collection, et le profil d'efficacité de détection.

1.2.2 Le profil d'excitation

1.2.2.1 Réponse percutielle de l'objectif

Les travaux de Richards et Wolf [Richards and Wolf, 1959] permettent de calculer le profil d'excitation créé par la focalisation du laser par l'objectif. Ce dernier est considéré comme une lentille aplanétique de grande ouverture numérique³. On cherche donc à calculer l'image d'un point source situé à l'infini en un point P de l'échantillon. Le calcul peut être mené avec des ondes planes tout en restant exact. Par conséquent, on associe à chaque point M de coordonnées (r, φ, z_0) se trouvant sur la pupille de sortie de l'objectif une onde plane se dirigeant vers 0 le point de focalisation de l'objectif se trouvant à la distance focale f de la pupille de sortie. Cette onde plane peut être considérée comme un rayon géométrique dont :

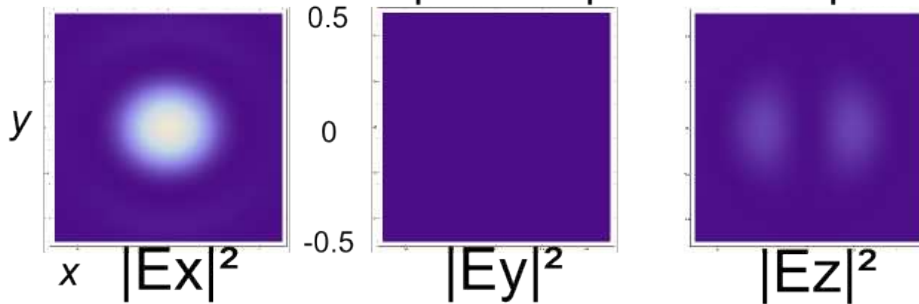
- la direction de propagation est caractérisée par le vecteur \mathbf{s}
- la phase est constante dans un plan perpendiculaire à la direction de propagation
- le champ électrique \mathbf{E} associé est transverse et peut s'écrire en un point P se situant en \mathbf{r} : $\mathbf{E}(P) = E_0 \exp(ik\mathbf{sr})\mathbf{e}$ où E_0 est l'intensité de l'onde plane, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ la norme du vecteur d'onde et \mathbf{e} le vecteur décrivant son état de polarisation.

Le champ électrique en P (x, y, z), où l'origine des coordonnées est le point de focalisation O , est alors donné par la somme de toutes les ondes planes émergeant de l'objectif et qui interfèrent au point P (voir figure 1.3) :

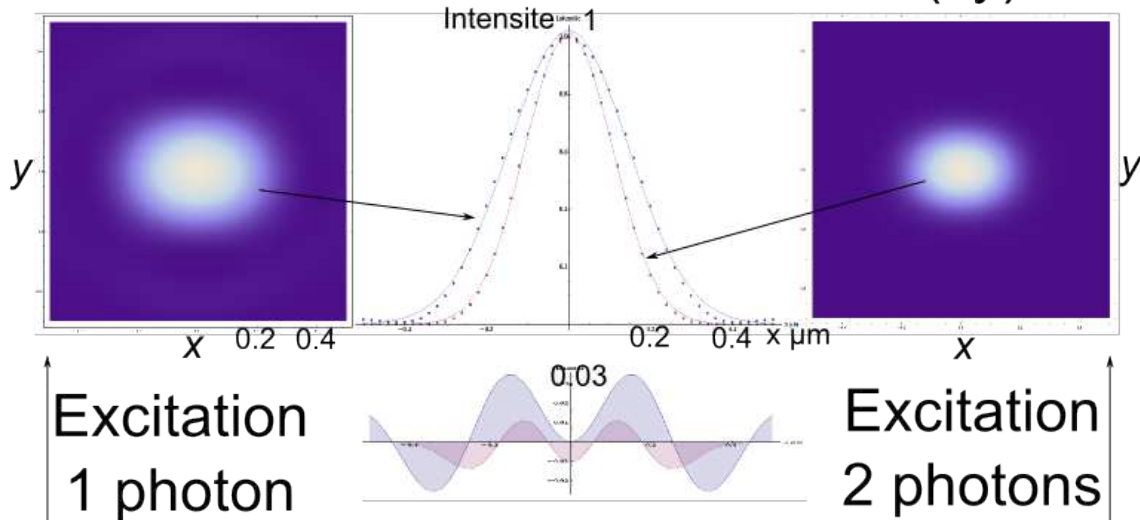
$$\mathbf{E}(P) = \frac{-ik}{2\pi} \iint d\Omega \mathbf{a}(M) \exp(ik(s_x x + s_y y + s_z z)) \quad (1.1)$$

³Les aberrations de l'objectif, en particulier l'astigmatisme peuvent aussi être prises en compte. Voir [Gregor and Enderlein, 2005]

a) Composantes de polarisation pour une excitation monophotonique dans le plan $z=0$



b) Intensité direction horizontale (xy)



Excitation
1 photon

Excitation
2 photons

c) Intensité direction axiale (z)

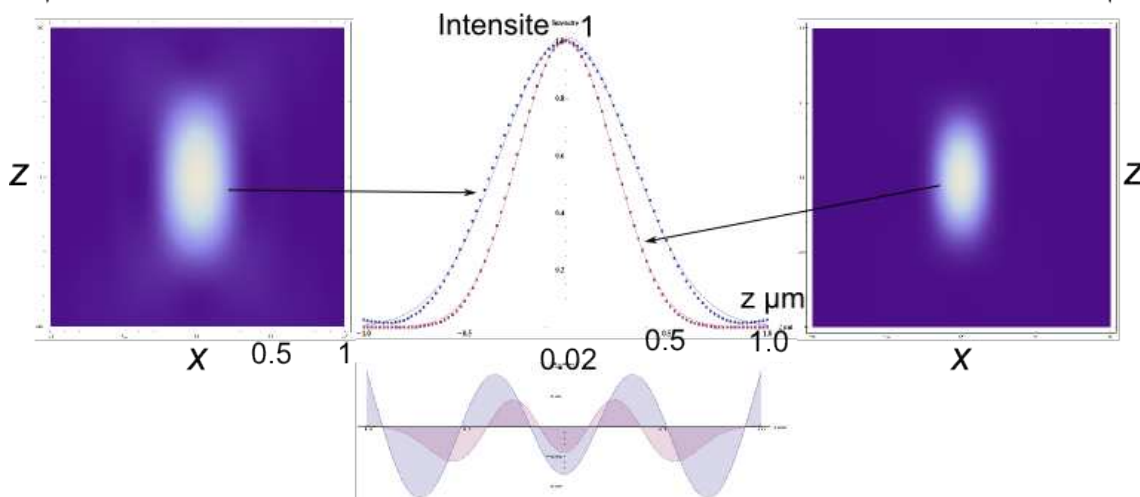


FIG. 1.2 – Simulation numérique du profil d'excitation avec un faisceau laser TEM_{00} , une longueur d'onde de 488 nm et une polarisation linéaire dirigée selon x . a) Répartition de l'intensité du champ électrique au plan focal. La composante en x est largement majoritaire. b) Intensité totale au focus ($z = 0$) à 1 et 2 photons. Un ajustement par une gaussienne donne un waist horizontal de $\omega_x = 290$ nm et 210 nm respectivement à 1 et 2 photons. c) Intensité totale dans le plan ($y = 0$) à 1 et 2 photons. Un ajustement par une gaussienne donne un waist axial de 640 nm et 465 nm respectivement à 1 et 2 photons. L'ajustement des profils selon la direction y donne des waists de 215 nm et 158 nm

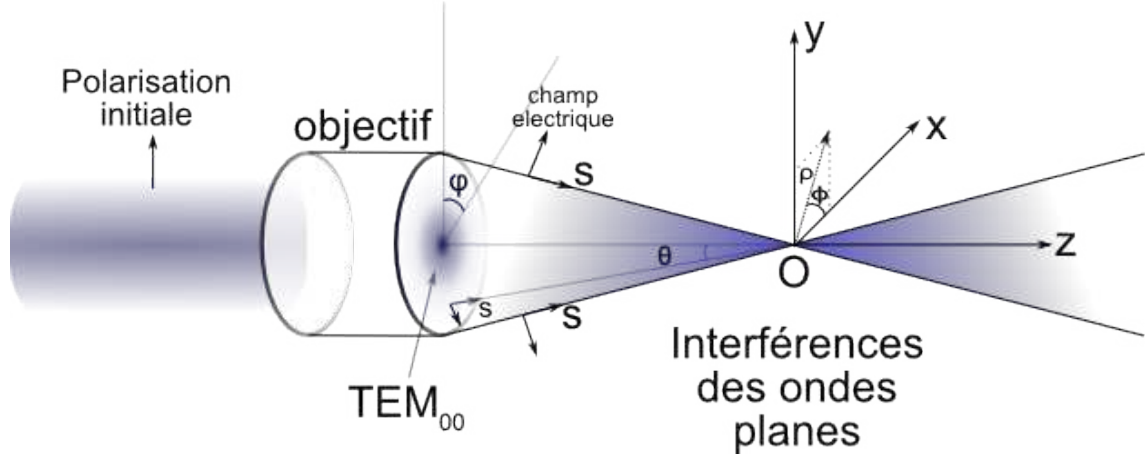


FIG. 1.3 – Schéma du principe du calcul de la réponse impulsionnelle de l'objectif.

où $\mathbf{a}(M)$ représente le champ électrique juste après la lentille, il ne dépend que du champ incident. Son intensité décrit le profil du faisceau excitateur. Pour un laser avec le mode TEM_{00} , le champ électrique est une gaussienne $a(M) = A \exp\left(-\frac{f^2 \sin^2 \theta}{\omega_l^2}\right)$ où A est l'amplitude, f la distance focale de l'objectif, ω_l est le waist du faisceau laser à l'entrée de l'objectif il vaut environ 0,35 cm, l'angle θ est indiqué sur la figure 1.3. La direction de $\mathbf{a}(M)$ donne la polarisation du faisceau se dirigeant vers 0. L'élément infinitésimal d'angle solide est $d\Omega$. L'intégrale englobe tous les rayons émergeant de l'objectif, sa limite est fixée par l'ouverture numérique de l'objectif. Dans la situation expérimentale actuelle nous étudions des objets en solution aqueuse et l'objectif a pour milieu d'immersion l'eau et il est corrigé pour la traversée d'une lamelle de verre. Nous négligeons donc l'effet de cette interface. Le champ en un point $P(\rho, \psi, z)$ (après un changement de coordonnées) du volume focal s'écrit [Débarre et al., 2004] :

$$\begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} e_{xx} & e_{xy} & 0 \\ e_{yx} & e_{yy} & 0 \\ e_{zx} & e_{zy} & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} p_x \\ p_y \\ 0 \end{pmatrix}$$

Avec, pour un laser polarisé linéairement selon x (i.e. $p_x = 1$ et $p_y = 0$) :

$$e_{xx} = \frac{-ik}{2\pi} \int_0^{\theta_m} Af \sqrt{\cos \theta} \exp\left(\frac{-f^2 \sin^2 \theta}{\omega_l^2}\right) \sin \theta \exp(ik \cos \theta z) [J_0(k\rho \sin \theta) (1 + \cos \theta) + J_2(k\rho \sin \theta) (1 - \cos \theta) \cos 2\psi] d\theta \quad (1.2)$$

$$e_{yx} = \frac{-ik}{2\pi} \sin 2\psi \int_0^{\theta_m} Af \sqrt{\cos \theta} \exp\left(\frac{-f^2 \sin^2 \theta}{\omega_l^2}\right) \sin \theta (\cos \theta - 1) J_2(k\rho \sin \theta) \exp(ik \cos \theta z) d\theta \quad (1.3)$$

$$e_{zx} = -k \cos \psi \int_0^{\theta_m} Af \sqrt{\cos \theta} \exp\left(\frac{-f^2 \sin^2 \theta}{\omega_l^2}\right) \sin^3 \theta J_1(k\rho \sin \theta) \exp(ik \cos \theta z) d\theta \quad (1.4)$$

où J_n est la fonction de Bessel d'ordre n , θ_m étant fixé par l'ouverture numérique NA de l'objectif et l'indice du milieu d'immersion n_{im} $\theta_m = \arcsin(NA/n_{im})$

La figure 1.2 montre le profil d'excitation obtenu avec un objectif d'ouverture numérique 1,2 excité par un laser de longueur d'onde 488 nm avec le mode TEM_{00} et une polarisation linéaire dirigée selon l'axe x . Au niveau du plan focal, la polarisation est principalement selon la direction x avec cependant une légère composante selon z [Débarre et al., 2004].

1.2.2.2 Approche phénoménologique

L'intensité d'un faisceau gaussien focalisé avec un objectif de grande ouverture numérique peut être décrit phénoménologiquement par un profil de type gaussien-gaussien :

$$I(r, z) = I_0 \exp\left(-2\frac{r^2}{\omega_r^e}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{\omega_z^e}\right)$$

où ω_r^e et ω_z^e traduisent l'étalement du faisceau dans la direction horizontale et axiale respectivement. Cette approche ne permet pas de connaître l'état de polarisation du laser exciteur au sein du volume d'étude. La figure 1.2 montre l'écart entre cette approche phénoménologique et les résultats obtenus à partir de la convolution de la réponse percutionnelle de l'objectif avec un faisceau laser de mode TEM_{00} . Un volume de type gaussien-gaussien ne décrit pas parfaitement le volume d'étude ; l'erreur est de quelques pourcents, notamment dans les ailes du profil. Avec les paramètres de calculs donnés au 1.2.2.1, on obtient un waist selon x de $\omega_x^e = 290$ nm et un waist selon y de $\omega_y^e = 215$ nm. Le volume gaussien-gaussien ne tient pas compte de la différence de profil selon x et y et fait l'hypothèse d'une symétrie de révolution, les deux waists en x et y sont égaux à ω_r^e . On obtient pour le waist axial $\omega_z^e = 640$ nm.

1.2.3 Profil de collection pour un dipole

1.2.3.1 Calcul à l'aide d'ondes planes

Le principe du calcul est schématisé sur la figure 1.4. Le moment dipolaire de la particule est relié au champ incident par un tenseur de polarisabilité $\boldsymbol{\mu} = \underline{\alpha}\mathbf{E}$. Ce tenseur de polarisabilité contient toute l'information sur la nature du dipôle.

D'autre part, la direction \mathbf{e} du champ électrique d'une onde plane de vecteur directeur \mathbf{s} provenant de l'émission d'un dipôle $\boldsymbol{\mu}$ est donnée par $\mathbf{e} = \mathbf{s} \times \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{s} = (\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{s})\mathbf{s} - (\mathbf{s} \cdot \mathbf{s})\boldsymbol{\mu}$.

L'objectif collimate la lumière provenant du dipôle qui se trouve au plan focal. Le faisceau collimaté est ensuite focalisé par la lentille de tube. Tous les faisceaux prennent l'orientation \mathbf{s}_2 On procède alors de la même façon que pour que le calcul du profil d'excitation en faisant interférer les ondes planes de direction \mathbf{s}_3 . On obtient ainsi le champ électrique dans le plan image émis par le dipôle dans le plan objet après le système objectif-lentille de tube. Le trou

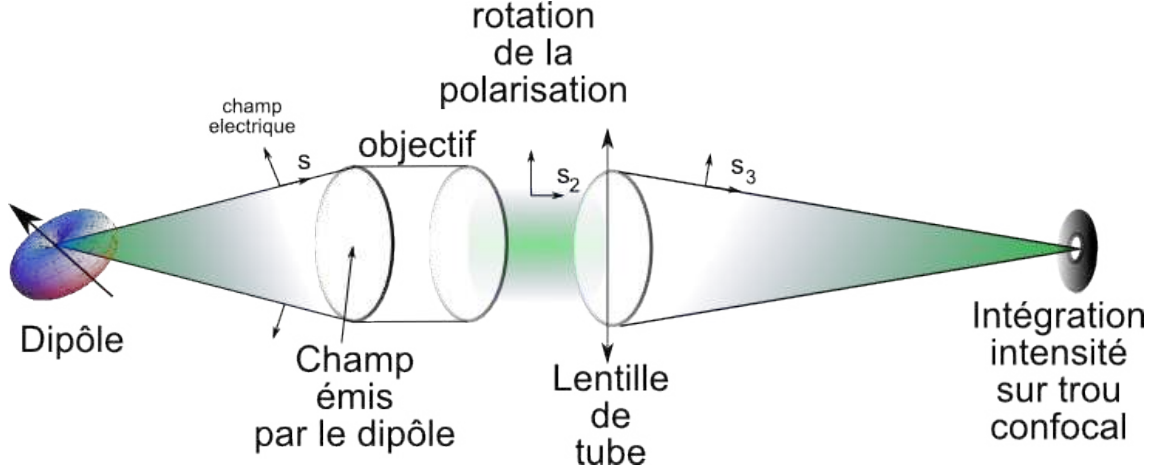


FIG. 1.4 – Schéma du principe du calcul de la collection de l'émission d'un dipôle par un microscope confocal.

de filtrage confocal est pris en compte en intégrant l'intensité du champ électrique dans le plan image sur la surface défini par le diamètre du trou confocal [Enderlein, 2000].

Le champ électrique \mathbf{E}^i au point $M(\rho, \phi, z)$ de l'espace image peut s'écrire en fonction de l'orientation du dipôle $\boldsymbol{\mu}$

$$\begin{pmatrix} E_x^i \\ E_y^i \\ E_z^i \end{pmatrix} = K \begin{pmatrix} c_{xx} & c_{xy} & c_{xz} \\ c_{yx} & c_{yy} & c_{yz} \\ c_{zx} & c_{zy} & c_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{pmatrix}$$

Avec

$$c_{xx} = I_0 + I_2 \cos 2\phi \quad c_{xy} = I_2 \sin 2\phi \quad c_{xz} = -iI_{11} \cos \phi \quad (1.5)$$

$$c_{yx} = I_2 \sin 2\phi \quad c_{yy} = I_0 - I_2 \cos 2\phi \quad c_{yz} = -iI_{11} \sin \phi \quad (1.6)$$

$$c_{zx} = +I_1 \cos \phi \quad c_{zy} = I_1 \sin \phi \quad c_{zz} = -I_{00} \quad (1.7)$$

$$\begin{aligned} I_0(\rho, z) &= \alpha \int_0^{\theta_M} (1 + \cos(\theta)) \sin(\theta) J_0 \left(\frac{k\rho}{M} \sin(\theta) \right) \sqrt{\cos(\theta)} \exp \left[-i \frac{k}{2} \left(\frac{z}{M^2} \right) \left(\frac{n_0}{n} \right) \sin(\theta)^2 \right] d\theta \\ I_2(\rho, z) &= \alpha \int_0^{\theta_M} (1 - \cos(\theta)) \sin(\theta) J_2 \left(\frac{k\rho}{M} \sin(\theta) \right) \sqrt{\cos(\theta)} \exp \left[-i \frac{k}{2} \left(\frac{z}{M^2} \right) \left(\frac{n_0}{n} \right) \sin(\theta)^2 \right] d\theta \\ I_1(\rho, z) &= 2i\alpha\gamma \int_0^{\theta_M} \left(\frac{n}{n_0} \right) \sin(\theta)^2 \cos(\theta) J_1 \left(\frac{k\rho}{M} \sin(\theta) \right) \sqrt{\cos(\theta)} \exp \left[-i \frac{k}{2} \left(\frac{z}{M^2} \right) \left(\frac{n_0}{n} \right) \sin(\theta)^2 \right] d\theta \\ I_{11}(\rho, z) &= 2i\alpha \int_0^{\theta_M} \sin(\theta)^2 J_1 \left(\frac{k\rho}{M} \sin(\theta) \right) \sqrt{\cos(\theta)} \exp \left[-i \frac{k}{2} \left(\frac{z}{M^2} \right) \left(\frac{n_0}{n} \right) \sin(\theta)^2 \right] d\theta \\ I_{00}(\rho, z) &= 2\alpha\gamma \int_0^{\theta_M} \left(\frac{n}{n_0} \right) \sin(\theta)^3 J_0 \left(\frac{k\rho}{M} \sin(\theta) \right) \sqrt{\cos(\theta)} \exp \left[-i \frac{k}{2} \left(\frac{z}{M^2} \right) \left(\frac{n_0}{n} \right) \sin(\theta)^2 \right] d\theta \end{aligned}$$

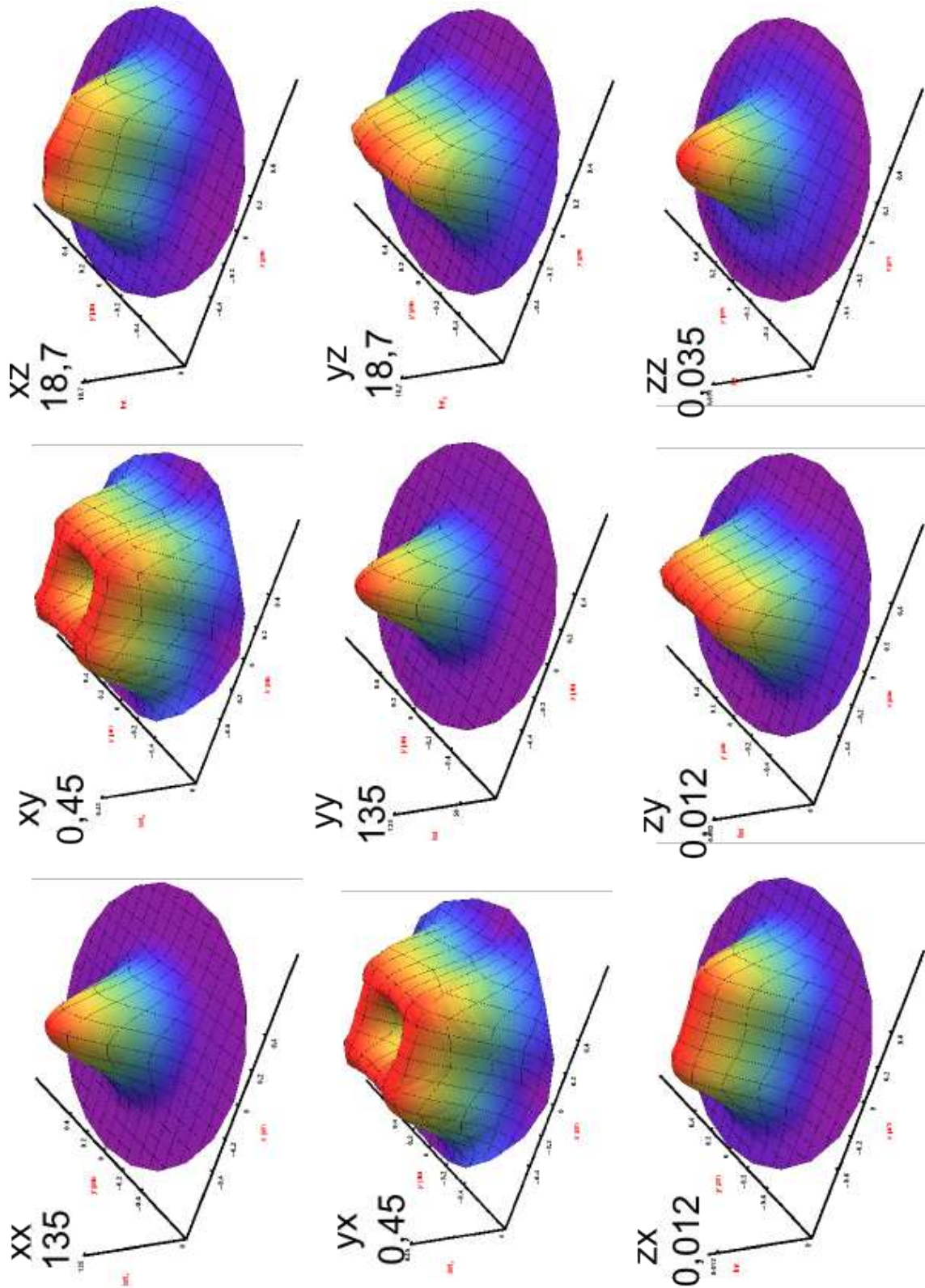


FIG. 1.5 – Profil de collection pour un dipôle dans le plan focal objet. Les 9 profils correspondent aux 9 termes de la matrice de transfert entre la direction du dipôle et l'intensité collectée. La notation ij se lit composante de l'intensité selon la direction de polarisation i alors que le dipôle à l'orientation j .

et K est une constante qui dépend de la focale de l'objectif et de la lentille de tube, des indices du milieu objet (eau) et image (air) et du grandissement $M = 48$ et de longueur d'onde d'émission du dipôle, k est le vecteur d'onde dans le milieu objet. $\alpha = e^{ikz_0^2 \frac{f_0^2}{f^2}}$ et $\gamma = \frac{f_0}{f}$ avec f_0 la distance focal de la lentille de l'objectif et f celle de la lentille de tube et où z_0 est la position axiale du dipôle dans le volume focal ($z_0 = \frac{z}{M^2} \frac{n_0}{n}$). Le champ dans le plan image est calculé à partir du champ collecté pour un dipôle placé sur l'axe optique et au plan focal $E^i(x, y, z)$ et en appliquant les lois d'un système imageur : il s'écrit $E^i(x - x_0M, y - y_0M, z - z_0 \frac{M^2n}{n_0})$.

La figure montre les profils de détection des différents terme⁴ $T_{ij} = \int_0^{\rho_t} \int_0^{2\pi} |c_{ij}|^2 \rho d\phi d\rho$ avec un trou confocal de $\rho_t = 12,5 \mu\text{m}$ pour un dipôle dans le plan focal objet.

Les termes T_{xx} et T_{yy} sont prédominants⁵. Le profil de collection peut alors être représenté avec une bonne approximation par une gaussienne de waist 380 nm

La collection⁶ d'un dipôle orienté selon l'axe optique (i.e. z) intervient cependant à hauteur de 7%. En toute rigueur le profil de collection n'est pas gaussien.

1.2.3.2 Modèle plus simple

Les auteurs de la référence [Qian and Elson, 1991] propose un profil de collection (CEF pour Collection Efficiency Function) plus simple à mettre en oeuvre. Il est obtenu en faisant l'approximation semigéométrique suivante :

$$CEF(r, z) = \int \frac{\text{circ}(\frac{r_a}{a}) \text{circ} \left[\frac{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_a|}{R(z)} \right]}{\pi R^2(z)} d\mathbf{r}_a \quad (1.8)$$

On pose $a = \frac{a_{fc}}{M}$ où a_{fc} est le diamètre du trou de filtrage confocal et M le grandissement du montage et Θ qui est relié à l'ouverture numérique NA de l'objectif par $\sin \Theta = \frac{NA}{n}$ et : avec :

$$\begin{aligned} \rho &= \sqrt{x^2 + y^2} \\ \omega &= \frac{\lambda_{em}}{\pi \tan \Theta} \\ R(z) &= \omega \sqrt{1 + \left(\frac{z \lambda_{em}}{\pi \omega^2} \right)^2} \end{aligned}$$

⁴En toute rigueur il faudrait calculer le flux du vecteur de Poynting $\mathbf{\Pi} = \frac{\mathbf{E} \times \mathbf{B}}{\mu_0}$ à travers le trou de filtrage confocal. La très faible composante du champ électrique (et magnétique) selon z dans le plan image permet de ne calculer que l'intensité du champ électrique.

⁵La très faible valeur de la composante de l'intensité selon la direction z est due au fait que l'ouverture numérique de la lentille de tube est très faible.

⁶Notons que lors des mesures de déclin de fluorescence dans des milieux très visqueux on ne voit pas le temps de rotation associé au passage du fluorophore selon l'axe z . Cela est une preuve expérimentale que la collection pour un dipôle orienté selon l'axe z n'est pas nulle avec un objectif de forte ouverture numérique.

L'approximation consiste à considérer l'émission du dipôle comme un faisceau gaussien (terme de divergence $R(z)$) dont l'extension est limitée par le trou de filtrage confocal. La résolution analytique conduit alors à la forme suivante :

$$CEF(\rho, z) = \begin{cases} 0 & \text{si } \rho \geq R + a \\ [\max(a, \omega)]^2 \frac{\theta_1 a^2 + \theta_2 R^2 - \Delta}{\pi a^2 R^2} & \text{si } |R - a| < \rho < R + a \\ \frac{[\max(a, \omega)]^2}{[\max(a, R)]^2} & \text{si } \rho \leq |R - a| \end{cases} \quad (1.9)$$

avec :

$$\begin{aligned} \theta_1 &= \arccos \left[\frac{a^2 + \rho^2 - R - 2}{2a\rho} \right] \\ \theta_2 &= \arccos \left[\frac{R^2 + \rho^2 - a^2}{2R\rho} \right] \\ \Delta &= \frac{\sqrt{(a + \rho + R)(-a + \rho + R)(a - \rho + R)(a + \rho - R)}}{2} \end{aligned}$$

Ce modèle semigéométrique revient à faire la moyenne sur toutes les orientations possibles du dipôle émetteur. On ne peut donc pas obtenir avec ce modèle la fonction de collection pour une direction de dipôle donnée ou selon une direction de polarisation fixée à la collection. Si on fait l'hypothèse que les dipôles tournent aléatoirement et beaucoup plus rapidement que la résolution temporelle du système pour observer les fluctuations, l'écart entre ce modèle semi-géométrique et le modèle présenté plus haut n'est que de quelques pourcents [Enderlein, 2000].

1.2.4 Le profil d'efficacité de détection

Le profil d'efficacité de détection est la cartographie au sein de la zone d'étude de la quantité moyenne de luminescence émise par un dipôle et collectée par le montage optique. Il s'agit donc du produit du profil d'excitation par le profil de collection⁷.

1.2.4.1 Modèle phénoménologique

Le profil d'efficacité de collection obtenu en multipliant le profil d'excitation et du profil de collection, qui ont été calculés précédemment en utilisant des ondes planes, n'a pas de forme analytique. Cela complique énormément l'analyse des données obtenues sur les fluctuations par microscopie confocale. Les auteurs de la référence [Qian and Elson, 1991] ont montré qu'il est possible de décrire approximativement le profil d'efficacité de détection par un volume gaussien-gaussien ou en d'autres termes par une ellipsoïde 3D avec un profil gaussien selon les directions x et y et un profil gaussien selon z mais avec un waist différent. Mathématiquement

⁷On ne prend pas en compte la saturation éventuelle du fluorophore

le profil $I(r, z)$ est de la forme :

$$I(r, z) = I_0 \exp\left(-2\frac{r^2}{\omega_{xy}^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{\omega_z^2}\right)$$

où r et z sont les coordonnées cylindriques d'un point du plan focal, le volume ayant une symétrie de révolution, I_0 est l'intensité maximale du profil d'excitation, ω_{xy} et ω_z sont des grandeurs qui caractérisent l'extension spatiale du profil respectivement radialement et verticalement⁸. L'ajustement par des gaussiennes des profils obtenus par modélisation fournit une valeur de $\omega_x^e = 290$ nm pour le profil d'excitation et en première approximation un profil de collection avec un waist de $(\omega^{\text{Sconf}})_x = 380$ nm. Le profil d'efficacité de détection résulte du produit des deux profils. Il a donc un waist effectif :

$$\omega_{x\text{eff}} = \sqrt{\frac{(\omega_x^e)^2 (\omega^{\text{Sconf}})^2}{(\omega_x^e)^2 + (\omega^{\text{Sconf}})^2}} = 230 \text{ nm} \quad (1.10)$$

de même :

$$\omega_{y\text{eff}} = 187 \text{ nm} \quad (1.11)$$

Les auteurs de la référence [Hess and Webb, 2002] montrent que le volume d'étude n'est pas gaussien-gaussien⁹ et que dans des cas extrêmes (sous illumination de la pupille arrière de l'objectif et filtrage confocal très faible) la description du volume d'étude par un profil gaussien-gaussien devient incorrecte. Dans des conditions normales de microscopie confocale, on peut tout de même utiliser le profil gaussien-gaussien pour analyser les résultats mais des mesures de calibration sont nécessaires et des tests doivent être effectués au préalable sur des particules dont le comportement est parfaitement connu. De telles mesures sont présentées à la section 1.3.3.

1.2.5 Microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique se fonde sur l'absorption à 2 photons (voir annexe A) pour n'exciter qu'une zone spatialement très restreinte dans l'échantillon. On utilise typiquement 2 photons infrarouges pour provoquer une transition électronique de la particule dans le domaine visible.

1.2.5.1 Comparaison de la microscopie biphotonique et de la microscopie confocale

La microscopie à 2 photons est par nature confocale en ce sens qu'elle permet une sélection latérale et axiale comme la microscopie confocale mais directement à l'excitation. Le signal

⁸on a $\omega_{xy} < \omega_r^e$ et $\omega_z < \omega_z^e$, par effet du filtrage confocal

⁹Sauf dans le cas de la microscopie biphotonique où l'écart est très faible (voir section suivante).

étant proportionnel à l'intensité excitatrice au carré, l'excitation n'a lieu qu'aux endroits de forte intensité i.e au point de focalisation du laser excitateur. En particulier, l'intensité n'a une valeur importante que dans une zone axiale limitée autour du plan focal. La figure 1.2 montre la différence des profils d'excitation obtenus par une excitation monophotonique d'une part et biphotonique¹⁰ d'autre part. Le profil d'excitation gaussien-gaussien (défini au 1.2.2.2) décrit bien le profil d'excitation à 2 photons (moins de 1% d'erreur). Avec le même système optique le waist horizontal et axial sont diminués de 30% par rapport à une excitation monophotonique. Le volume sondé est donc diminué de 60%.

La microscopie biphotonique possède de nombreux avantages par rapport à la microscopie confocale avec excitation monophotonique. Les photons infrarouges, moins énergétiques, sont d'une part moins absorbés, et d'autre part moins diffusés (la diffusion Rayleigh variant comme $\frac{1}{\lambda^4}$). C'est un avantage pour étudier les échantillons épais tels que les tissus biologiques. Cela se traduit par une profondeur de pénétration des photons infrarouges bien supérieure, de l'ordre de 400 à 1 000 microns. Etant moins énergétiques, ils sont aussi beaucoup moins photodestructeurs.

D'un point de vue expérimental, la microscopie biphotonique permet d'exciter une particule dans l'ultra violet sans avoir à utiliser d'optique UV spéciale si l'on collecte un signal de fluorescence visible. De plus, la séparation nette entre la longueur d'onde d'excitation (proche IR) et celle d'émission (visible) permet de collecter facilement et efficacement la luminescence de la particule. Cette séparation permet aussi de filtrer le bruit dû à la diffusion Raman des photons infrarouges. Enfin, de part sa nature confocale intrinsèque, il n'y a pas besoin a priori d'utiliser de trou de filtrage pour étudier les fluctuations de la luminescence ce qui facilite grandement les procédures d'alignement.

La microscopie biphotonique n'est cependant pas toujours possible car toutes les particules n'ont pas systématiquement une section efficace à 2 photons suffisante.

1.3 Montage expérimental

Le montage optique utilisé pour les expériences est schématisé sur la figure 1.6. L'acquisition d'un nouveau laser femtoseconde et d'une nouvelle table optique m'a donné l'occasion de pouvoir remonter élément par élément la totalité du montage optique. Le nouveau montage, du fait de l'expérience acquise avec l'ancien, de sources laser plus stables et de l'automatisation des points clés de l'expérience est désormais plus fiable et plus robuste.

¹⁰afin de pouvoir comparer les deux profils, les calculs ont été menés avec la même longueur d'onde pour l'excitation monophotonique et biphotonique, à savoir 488 nm

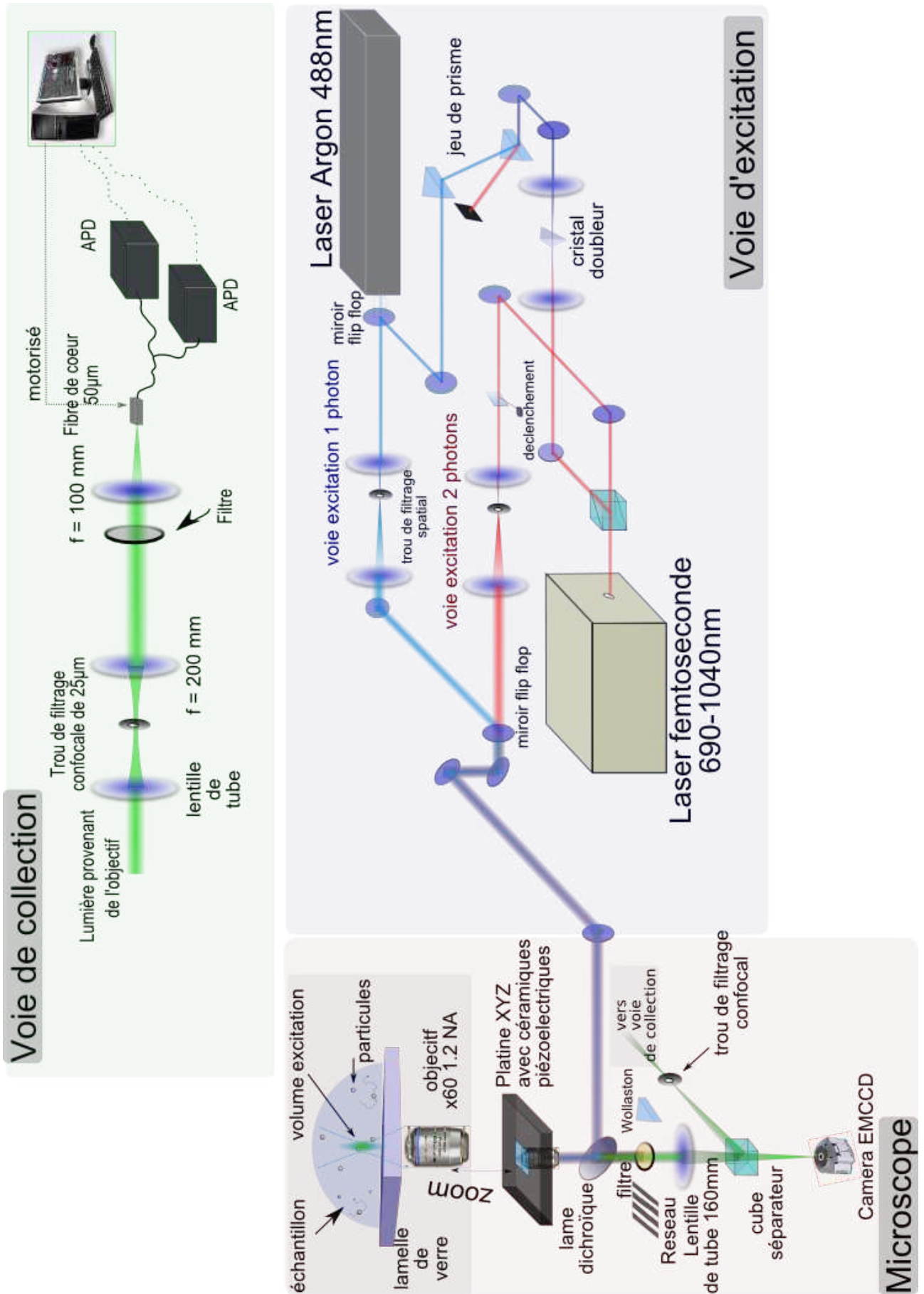


FIG. 1.6 – Schéma du montage expérimental

1.3.1 Voie d'excitation

1.3.1.1 Laser d'excitation

Différentes sources ont été utilisées pendant ma thèse.

Un laser Argon Ce laser à gaz comporte de nombreuses raies, en particulier celle à 488 nm qui permet d'exciter au mieux les fluorophores de type fluorescéine. La largeur très fine des raies d'un laser à gaz continu permet d'utiliser des filtres Notch holographiques sur la voie de détection permettant une réjection de l'ordre de 10^8 du signal et uniquement à la longueur d'onde du laser

Un laser Saphir titane en excitation biphotonique Il s'agit d'un laser Mai-Tai entièrement asservi et automatisé. Il est accordable sur la plage 690 – 1040 nm. Les impulsions ont une durée de 100 fs. La dispersion introduite ultérieurement par la chaîne optique peut être précompensée par un système à prismes motorisés.

Un laser Saphir titane doublé Le laser femtoseconde est doublé dans un cristal de BBO. A 976 nm on obtient un rendement de doublage vers 488 nm de 10%. La séparation entre la pompe et le signal doublé est assurée par un système de prismes car les filtres interférentiels laissent passer un signal résiduel infrarouge. Cette source fonctionne en impulsions ce qui permet de réaliser de la spectroscopie résolue en temps et donc des mesures de durée de vie. Sa plus grande largeur spectrale (4 nm) comparée à celle des raies du laser Argon ne permet pas d'utiliser des filtres Notch holographiques ou d'acquérir des spectres Raman suffisamment résolus.

1.3.1.2 Agrandissement et filtrage spatial du faisceau laser

Le filtrage spatial consiste à placer, au point de focalisation du laser, un trou de filtrage assez petit pour qu'il ne laisse passer que les basses fréquences spatiales. On choisit un trou de filtrage de diamètre $d = \frac{\lambda f}{a}$ où λ est la longueur d'onde du laser à filtrer, f la focale de la lentille de focalisation et a la taille du faisceau laser à l'entrée de la lentille. On gomme ainsi toutes les modulations rapides du profil du laser. Cependant, cette méthode ne permet pas facilement d'ôter les défauts liés aux aberrations comme l'astigmatisme du faisceau. Cela est particulièrement préoccupant lorsque le faisceau est au préalable fortement focalisé dans du verre, ce qui est par exemple le cas lorsque le laser est doublé engendrant beaucoup d'astigmatisme.

Sur le montage, afin d'éliminer au mieux l'astigmatisme, le faisceau n'est pas filtré mais plutôt diaphragmé par le trou de filtrage. Ce dernier joue alors le rôle de source ponctuelle cohérente, tout comme un laser fibré. Le faisceau ne présente alors plus qu'un astigmatisme résiduel minime et son profil est déterminé par la forme du trou. De plus, il diverge avec un angle λ/d où d est la taille du trou de filtrage. Cette méthode oblige par contre à perdre beaucoup de puissance, typiquement un facteur 10.

Le trou de filtrage est placé dans un système afocal qui a aussi pour but d'agrandir le faisceau laser. En effet, la taille du volume d'étude est conditionnée par celle du faisceau éclairant la pupille arrière de l'objectif. Une focalisation par l'objectif proche de la limite de diffraction ne peut être obtenue que si le faisceau incident, dont la taille initiale est de l'ordre du millimètre, est agrandi. Le faisceau ne doit pas non plus sur-illuminer la pupille arrière car cela introduit de nouveau des aberrations dans le profil du volume focal, comme l'ont montré les auteurs de la référence [Hess and Webb, 2002].

Une fois le faisceau élargi par le système afocal, sa taille est mesurée par foucaultage¹¹ (voir figure 1.7). On obtient un diamètre (hauteur à $1/e^2$) de 0.75 cm alors que le diamètre de la pupille arrière de l'objectif est de 1 cm. Les mesures présentées plus bas (1.9) montrent que l'on est très proche de la limite de diffraction. Le faisceau est également très précisément collimaté. Pour ce faire on s'assure qu'il ne diverge ou ne converge pas sur quelques dizaines de mètres.

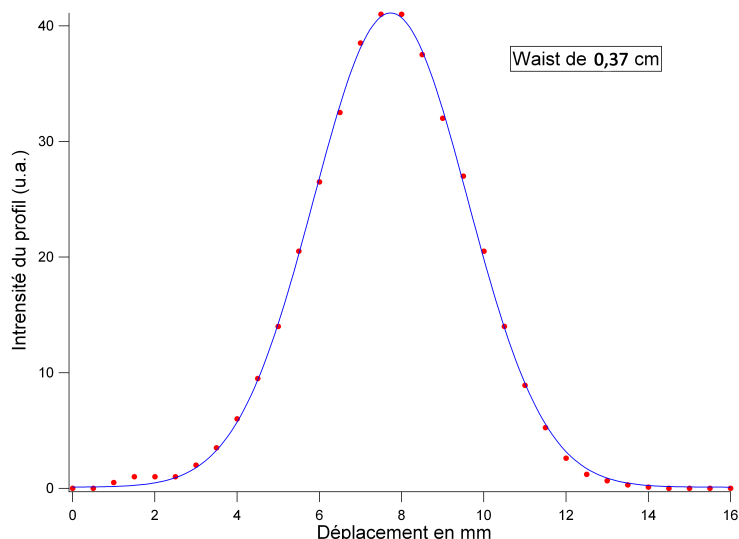


FIG. 1.7 – Profil d'intensité du laser obtenu par foucaultage. Le diamètre du faisceau, obtenu par ajustement (courbe bleue) est de 0,75 cm. Il ne remplit pas totalement la pupille arrière de l'objectif (1 cm). Cela permet d'être très proche de la limite de diffraction tout en limitant les aberrations.

1.3.1.3 Alignement du faisceau laser

Afin de minimiser les aberrations créées par l'objectif, le faisceau doit arriver centré sur la pupille arrière et parallèle à l'axe de ce dernier.

¹¹Le foucaultage consiste à mesurer la puissance d'un faisceau laser qui a une symétrie cylindrique alors que ce dernier est obstrué par un objet effilé (typiquement une lame de rasoir). On passe de la situation où le faisceau est totalement obstrué, à celle où on mesure l'intensité de la totalité de la tache laser par plusieurs positions de la lame de Foucault. La dérivée de la courbe ainsi obtenue (i.e. $S(r) = \int_0^r I(x)dx$ où I est le profil d'intensité et r la position de la lame de Foucault) conduit au profil d'intensité.

Ces deux réglages sont effectués en utilisant une caméra placée au plan focal image du système objectif-lentille de tube.

Centrage sur la pupille arrière Le faisceau laser cohérent et parallèle forme des anneaux de Newton sur le système constitué par la pupille arrière bombée et une des lentilles planes de l'objectif voir figure 1.8. Cette figure d'interférences permet de repérer le centre et les contours de l'objectif. L'éclairement symétrique de cette structure assure le bon centrage du faisceau sur la pupille arrière de l'objectif.

Parallélisme à l'axe optique Lorsque l'on déplace verticalement le point de focalisation du microscope, les interfaces eau-verre puis verre-air avec la lamelle de verre réfléchissent partiellement le faisceau laser. Cette réflexion apporte des informations sur l'état du profil d'excitation. En ce qui concerne la procédure d'alignement, cette réflexion permet de savoir si le faisceau incident arrive et repart parallèlement à l'axe optique de l'objectif. En effet, tant que cette réflexion n'est pas alignée avec l'axe de l'objectif (qui est repéré grâce aux anneaux de Newton), le faisceau fait un angle avec ce dernier. Un mauvais alignement conduit à de l'astigmatisme et de la comma dans le volume focal.

1.3.1.4 Polariseur

Le faisceau initialement polarisé linéairement en sortie de laser se dépolarise par les réflexions successives à 45 degrés sur les miroirs métalliques. On place en entrée de microscope un polariseur pour rétablir une polarisation linéaire sur l'échantillon.

1.3.1.5 Choix de la lame dichroïque

Les améliorations successives du montage expérimental effectuées au début de ma thèse nous ont montré que le défaut qui déforme et augmente le plus le volume focal était celui introduit par l'astigmatisme de la lame dichroïque que nous utilisions alors.

La plupart des lames dichroïques, mêmes neuves et sans aucune contrainte, introduisent de l'astigmatisme. Cela est probablement lié aux contraintes imposées lors de la réalisation de dépôts successifs sur des lames de trop faible épaisseur.

Parmi les dichroïques achetées et testées (la plupart ayant été retournées aux vendeurs), une dichroïque faite pour l'excitation biphotonique s'est montrée beaucoup moins astigmatique que les autres. Nous l'avons utilisée pour l'excitation dans l'infrarouge. Quant à l'excitation monophotonique, nous avons utilisé une lame séparatrice épaisse non traitée, qui, bien que faisant perdre une partie du signal d'excitation et, plus grave, une partie de l'émission, était de bonne qualité optique.

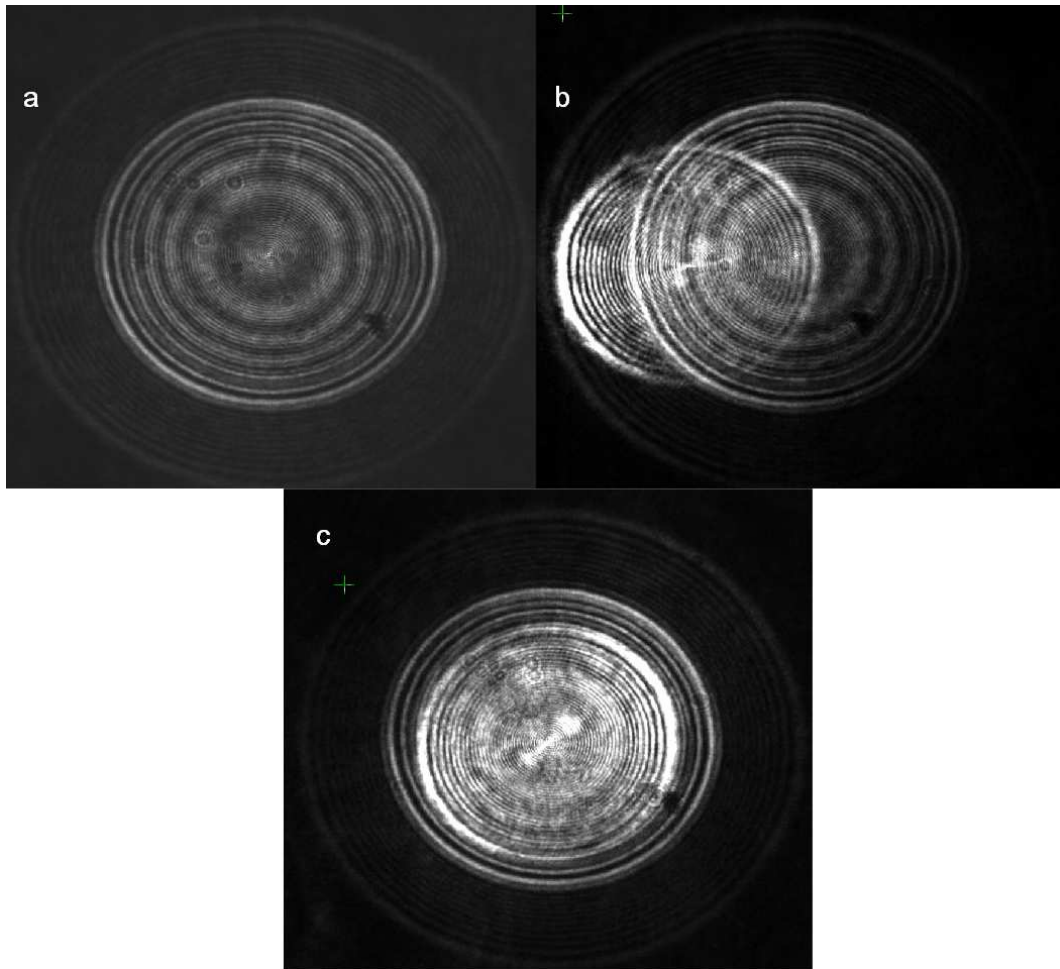


FIG. 1.8 – Procédure d’alignement du faisceau laser par rapport à l’objectif de microscope. a) Figure d’interférences de type anneaux de Newton qui permet de repérer le centre et les contours de l’objectif. b) Le faisceau n’est pas encore aligné car la réflexion du faisceau sur l’interface verre-air de la lamelle de verre ne passe pas par le centre de l’objectif. c) Le faisceau est aligné

1.3.1.6 lame de phase

La lame dichroïque modifie la polarisation du faisceau incident. Le faisceau réfléchi a une polarisation légèrement elliptique dès lors que l’axe de la polarisation linéaire du laser n’est pas précisément dans le plan d’incidence. Placer une lame quart d’onde à l’entrée du microscope ne permet pas de créer une polarisation purement circulaire. Le contraste entre les composantes E_x et E_y du champ électrique est au mieux de 90 %. Une solution pour améliorer le contrôle de la polarisation excitatrice consiste à utiliser une polarisation linéaire du faisceau incident de type "p" et de placer les lames de phase *après* la réflexion de l’onde sur la lame dichroïque (c’est à dire entre la lame dichroïque et l’objectif). Cette méthode a cependant un inconvénient évident : le signal de luminescence collecté par l’objectif traverse aussi la lame de phase. Cela

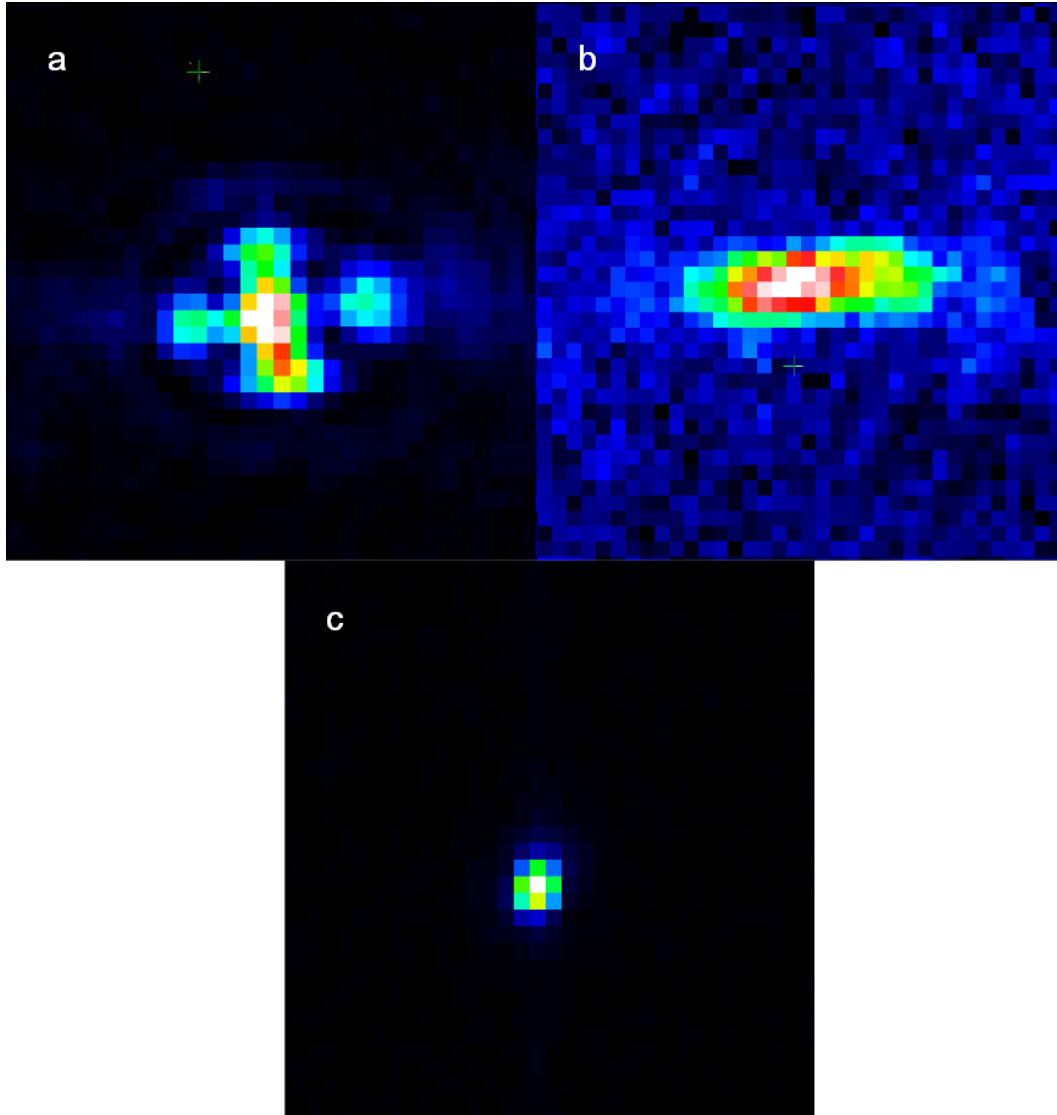


FIG. 1.9 – Réflexion du laser focalisé sur une lame de verre interface verre-eau pour 3 dichroïques différentes. a) dichroïque utilisée au tout début de la thèse avant d’avoir une caméra pour vérifier l’état du volume focal. b) Dichroïque neuve et sans contrainte. La dichroïque est astigmatique, la focalisation se fait sur deux foyers, le premier étalé horizontalement, le deuxième verticalement. c) Lame séparatrice épaisse utilisée pour les mesures à un photon. Sur l’image, un pixel fait 270 nm. L’image c) montre une focalisation sur un pixel et demi, on est donc très proche de la limite de diffraction.

n'a néanmoins pas d'importance lorsque l'on n'étudie pas la polarisation du signal émis.

1.3.1.7 Choix de l'objectif

L'objectif joue un double rôle. Il focalise au mieux (i.e. sans aberration) le faisceau laser et il collecte le signal émis par l'échantillon étudié. L'ouverture numérique, c'est à dire l'inclinaison maximale des faisceaux qui peuvent entrer et sortir de l'objectif, est un critère capital. Elle impose en particulier la taille limite de diffraction du laser focalisé.

L'objectif utilisé est un Nikon avec un grandissement de 60 s'il est associé à une lentille de tube de 200 mm. Il est apochromatique (il corrige efficacement les aberrations sphériques et chromatiques) et aplanétique (Il corrige les distorsions du champ en dehors de l'axe optique¹²). Son ouverture numérique est de 1,2 avec de l'eau comme milieu d'immersion.

1.3.1.8 Réglage de la bague de correction de l'objectif

Le faisceau focalisé par l'objectif traverse la lamelle sur laquelle on dépose l'échantillon. Cette traversée d'un dioptre avec des grands angles d'inclinaison crée des aberrations sphériques. Les objectifs de microscope précompensent cette traversée par une aberration sphérique négative. La plupart des objectifs prévoient la traversée d'épaisseur de 170 μm de verre usuel de type BK7 et certains sont munis d'une bague permettant de faire varier l'épaisseur de verre précompensée. Le réglage de cette bague à une incidence notable sur le profil du volume d'étude, notamment sur sa profondeur axiale.

Afin de la régler au mieux, le dispositif schématisé sur la figure 1.10 a été mis au point et automatisé. Il consiste à utiliser la réflexion du laser focalisé à l'interface verre-eau pour sonder la taille axiale du volume d'étude. La section du volume d'étude qui est réfléchi par l'interface est modulée en déplaçant la lamelle de verre via une platine piézoélectrique. On balaye alors point par point le profil vertical d'excitation du laser. On place la bague à la valeur conduisant au volume d'étude le plus faible qui est celui pour lequel les aberrations sphériques sont minimales. (voir figure 1.10).

1.3.1.9 Hauteur de travail dans l'échantillon

La platine piézoélectrique permet de fixer précisément la distance entre le point de focalisation du laser (i.e. la zone d'étude) et l'interface avec la lamelle de verre. Cette distance :

- ne doit pas être trop petite pour éviter les effets dus à la surface comme l'adsorption-désorption des particules sur la lamelle de verre. Les auteurs de la référence [Boutin et al., 2008] ont montré qu'au delà de 2,5 μm les effets dus à la surface ne se font plus sentir.

¹²cela n'est pas a priori indispensable pour de la microscopie confocale, mais devient très important lorsque l'éclairage est grand champ.

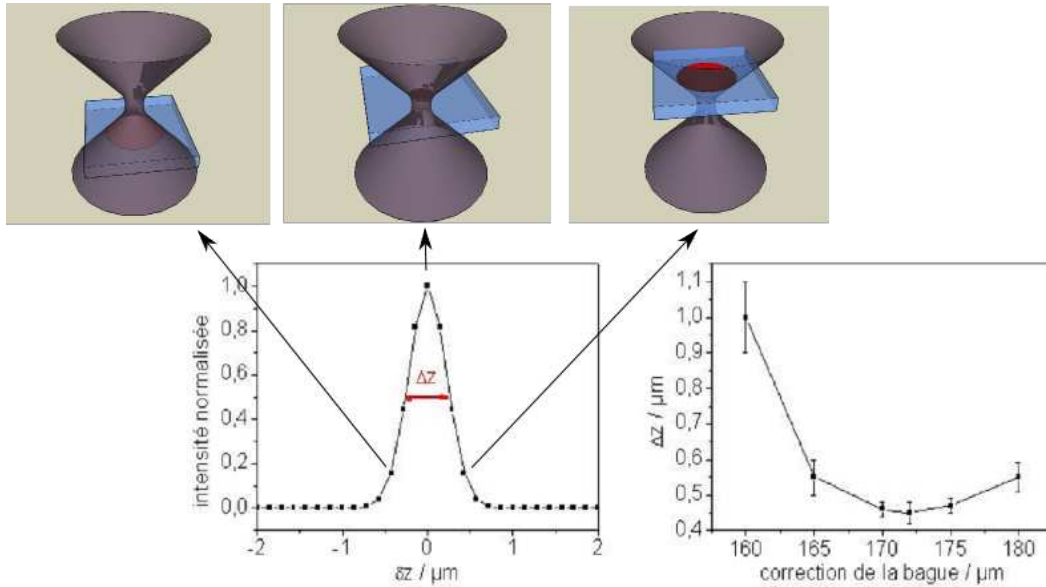


FIG. 1.10 – Courbes obtenues lors du réglages de la bague de correction de l’objectif. A gauche l’intensité réfléchiée par l’interface air-verre en fonction de la position de la lamelle de verre. Le profil permet de remonter à la longueur Rayleigh de notre focalisation. Cette longueur est reportée sur la figure de droite en fonction de la correction de la bague (1.70 correspond à 170 μm de verre). La correction qui correspond à la plus petite valeur Δz est celle pour laquelle l’aberration sphérique est minimale.

- ne doit pas être trop grande, car plus on pénètre dans l’échantillon, plus le volume d’étude est déformé dès que l’indice du milieu d’immersion et celui du solvant de l’échantillon ne sont pas exactement égaux (quelques pourcents de différence ont déjà une incidence notable). En effet, tout se passe comme si le faisceau traversait une épaisseur de verre supplémentaire, ce qui crée à nouveau une aberration sphérique.

Pour les échantillons dans l’eau, la hauteur de travail a été fixée à 20 μm . Pour des milieux d’indice différents, elle est de 10 μm afin de limiter la déformation du volume focal due à la différence d’indices optiques. Cette hauteur est vérifiée pour chaque mesure.

1.3.2 Voie de collection

Par définition, le volume d’étude se situe à la distance focale de l’objectif¹³. La lumière provenant du volume focal émerge donc parallèlement de l’objectif une fois collectée par ce dernier. On peut placer dans cette zone des éléments optiques à faces planes et parallèles sans déformer le front d’onde.

Filtre interférentiel Il coupe le laser exciteur tout en laissant passer le signal.

¹³Cela est le cas si le faisceau laser est parfaitement collimaté avant d’arriver sur l’objectif et si le trou de filtrage est parfaitement placé le long de l’axe optique

Prisme de Wollaston Il est constitué de deux prismes biréfringents accolés dont les axes optiques sont orthogonaux. Il joue le rôle de double analyseur de polarisation en séparant angulairement le signal en deux faisceaux. Il permet une étude rapide de la polarisation du signal en analysant l'intensité relative des deux images formées sur la CCD.

Réseau en transmission Il est blazé sur le premier ordre dans le visible. Le spectre est ensuite imagé par la lentille de tube sur la caméra CCD. On positionne cette dernière de telle sorte que l'ordre 0 déjà faible arrive en dehors de la matrice CCD.

1.3.2.1 Caméra CCD

La caméra est placée précisément au plan image du système objectif-lentille de tube. Pour ce faire, on met à la place de l'objectif un miroir et on forme l'image du faisceau laser parallèle par la lentille de tube sur la caméra.

1.3.2.2 Filtrage confocal

Le positionnement du trou de filtrage est, avec un volume focal bien défini, l'élément clef d'un montage confocal.

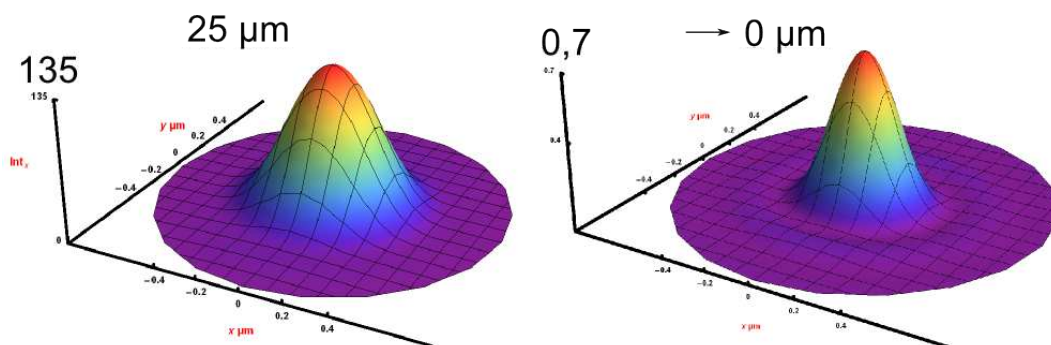


FIG. 1.11 – Profil de collection pour un dipôle orienté selon l'axe x avec à gauche un trou de filtrage de $25\ \mu\text{m}$ de diamètre et à droite un trou de filtrage dont le diamètre tend vers zéro. Le waist du premier profil est d'environ $380\ \text{nm}$, le waist du second est de $250\ \mu\text{m}$ et le signal a chuté d'un facteur 200

La taille du trou de filtrage est un compromis entre un filtrage confocal efficace et une quantité de signal suffisante pour effectuer la mesure. Un trou infiniment petit ne laisserait passer que le signal provenant d'une zone limitée par diffraction autour du point central du profil d'excitation assurant un filtrage confocal quasi-parfait, mais aurait une quantité de signal tendant vers zéro. Au contraire, un trou infiniment grand sélectionne la totalité du profil d'excitation, ce qui conduit évidemment à un filtrage confocal nul. Les profils de collection liés à ces deux situations sont présentés sur la figure 1.11.

La taille de ce trou filtrage est souvent exprimée en unité de tache d’Airy. Sa dimension est donc rapportée à une autre grandeur du montage : la taille horizontale du volume focal. Elle est donnée, dans le cas d’une excitation monophotonique, par la formule

$$A \simeq \frac{1,22\lambda}{N.A.}$$

Dans le cas d’un objectif d’ouverture numérique 1.2, $A \sim \lambda$. Le grossissement du montage étant de 48 (objectif X60 utilisé avec une lentille de tube de 160 mm au lieu de 200 mm). La tache d’Airy à la sortie du microscope vaut 48λ .

Nous avons choisi pour le trou de filtrage un diamètre d’une tache d’Airy¹⁴. Ce filtrage est assez sévère car les particules étudiées sont a priori relativement brillantes. Nous avons ainsi favorisé l’étude des particules une par une dans le volume focal sans avoir à diluer considérablement l’échantillon. Ce choix conduit aussi à des temps de diffusion relativement faibles ; au besoin, on peut augmenter la viscosité de la solution pour observer les particules plus longtemps dans le volume focal.

Dans un premier temps, le montage utilisait le coeur d’une fibre multimode de 50 μm comme trou de filtrage confocal. La taille du faisceau de sortie, de l’ordre de 24 μm était adapté au filtrage par le coeur de la fibre ($\simeq 50 \mu\text{m}$) après traversée d’un système afocal de grandissement 2. Nous avons par la suite opté pour un filtrage confocal par un trou de filtrage de diamètre 25 μm placé en sortie de microscope. Le signal ainsi filtré, "en amont", peut être envoyé sur différentes voies, en assurant le même filtrage confocal à chaque voie.

Le positionnement du trou confocal et de la fibre de collection ont été motorisés. Expérimentalement, une précision de $1/5 A$ est nécessaire dans le positionnement soit 5 μm pour le trou de filtrage et 10 μm pour la fibre. En deçà, la reproductibilité des résultats se détériore. On peut ainsi atteindre des mesures avec une incertitude inférieure à 10% pour différentes gouttes sur une même lame de microscope et moins de 5% sur un même échantillon, les résultats sur la fluctuation de luminescence étant par essence statistiques par ailleurs. Le placement est effectué en recherchant le maximum d’un signal provenant d’un volume focal *non saturé*, typiquement de la rhodamine $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Le positionnement "en z" i.e le long de l’axe optique est relativement délicat, tout écart au parallélisme du faisceau laser exciteur se traduira par un léger décalage en z du maximum par rapport à la distance focale de la lentille de tube. En passant d’un faisceau exciteur à un autre (excitation 1 photon à 2 photons) il faut reprendre le placement du trou confocal dans l’axe optique.

1.3.2.3 Séparation du signal sur différentes voies

Une fois le signal filtré confocalemment, il faut l’envoyer sur le(s) détecteur(s) de photons sans filtrage confocal supplémentaire. On utilise pour cela un système afocal de grandissement $\frac{1}{2}$.

¹⁴Ce n’est pas le cas avec les résultats présentés lors de l’étude de la sonde calcique (voir chapitre 3) où l’on a choisi 2 diamètres d’Airy car la sonde était relativement peu brillante

L'image formée sur la fibre optique a une dimension de $12.5 \mu\text{m}$ soit quatre fois moins grande que le coeur de la fibre de collection utilisée. On peut auparavant séparer le signal en plusieurs composantes.

Séparation en polarisation Un cube séparateur de polarisation précédé d'un rhomboèdre de Fresnel permet d'étudier les fluctuations de polarisation. Le rhomboèdre de Fresnel permet de faire tourner la polarisation incidente afin d'observer puis de compenser d'éventuelles asymétries entre les deux voies de détection.

Séparation spectrale Le signal est séparé en deux voies avec une lame séparatrice. Sur chaque voie, on place un filtre différent. On peut aussi utiliser une lame dichroïque à la place de la lame séparatrice.

1.3.2.4 Détecteur de photon unique

Le montage utilise des photodiodes à avalanche (APD en anglais) qui fonctionnent sur le même principe que les photomultiplicateurs¹⁵ mais avec, en général, un meilleur rendement quantique. Les APD créent de "l'afterpulsing" i.e. chaque signal produit par un photon a une probabilité d'être suivi par une autre impulsion qui n'a pas de réalité physique. Cet effet, dont le temps caractéristique est de l'ordre de la μs conduit à des artefacts dans l'étude des fluctuations de l'intensité, notamment lorsque l'on étudie la fonction d'autocorrélation du signal (voir chapitre 2). L'afterpulsing peut être en grande partie éliminé soit par un traitement numérique du signal a posteriori soit par un montage de corrélation croisée. En ce qui concerne les traitements numériques, les auteurs de la référence [Zhao et al., 2003] proposent de calibrer l'afterpulsing et de l'ôter numériquement des courbes de corrélations. Cette méthode est efficace lorsqu'il n'y a pas de fluctuations dont le temps caractéristique est comparable à celui de l'afterpulsing. Les auteurs de la référence [Enderlein and Gregor, 2005] proposent d'utiliser la courbe de déclin de fluorescence pour identifier les photons provenant d'afterpulsing (voir section 2.2.8). Expérimentalement, la technique la plus employée pour s'affranchir de l'afterpulsing consiste à utiliser deux détecteurs. L'afterpulsing des deux détecteurs est décorrélé et disparaît lors de la corrélation croisée des signaux des deux détecteurs. Cette méthode nécessite cependant de diviser le signal en deux. Au mieux, le temps d'acquisition doit être doublé, mais s'il y a très peu de signal, cette division peut rendre très délicate voire impossible l'obtention d'un bon rapport du signal sur bruit¹⁶.

Nous possédons deux types d'APD. Le premier type a un bon rendement quantique (0.6 à 550 nm), mais une réponse impulsionnelle de 600 ps. Le deuxième, d'acquisition récente, a

¹⁵Une APD est grosso modo une photodiode avec un gain interne. Un photon crée une paire électron-trou dans une jonction PN. Ils sont ensuite séparés par un champ électrique. L'électron est enfin amplifié dans une zone de fort champ électrique par impact sur les atomes du cristal et ionisation.

¹⁶la limite basse est donnée par le bruit noir des détecteurs, en l'occurrence 150 photons par secondes. Le bruit de diffusion Raman et Rayleigh peut être supprimé par post traitement (voir section 2.1.1)

un rendement quantique plus faible (0.4 à 550 nm) mais une réponse impulsionnelle bien meilleure¹⁷ de 50 ps.

1.3.2.5 Carte de comptage

La carte de comptage a pour rôle de mesurer et conserver le temps d'arrivée de chaque photon détecté par les APD. La carte utilisée sur notre montage, à savoir une SPC 630 (Becker-Hickl), conserve en fait deux temps.

le macrotime c'est la durée qui s'est écoulée entre le début de l'expérience et l'arrivée du photon considéré. Il est mesuré à une résolution de 50 ns.

le microtime C'est le temps séparant le photon considéré de la prochaine impulsion sur la voie de déclenchement. Il s'agit la plupart du temps de la prochaine impulsion laser (si le laser est en impulsions).

Cette carte possède une limite instantanée de 4 millions de coups par seconde, ce qui est à prendre en compte pour les particules très brillantes. Si nécessaire, on peut interposer des densités devant le détecteur pour abaisser l'intensité du signal détecté, au détriment du rapport signal sur bruit et du temps d'acquisition.

La liste des temps d'arrivée des photons constitue la matière brute pour la caractérisation des fluctuations de la luminescence.

1.3.2.6 Logiciel de pilotage de l'expérience

Les points clé du montage qui demandent un réglage avec une précision micrométrique sont automatisés et pilotés depuis un ordinateur via un logiciel que j'ai développé. Ce dernier permet de régler précisément la position du trou filtrage grâce à une platine motorisée (moteur pas à pas) 3 axes et la position de la fibre de collection avec une platine du même type. Le logiciel pilote aussi une carte de comptage NI6802 qui permet de suivre facilement le signal détecté par les APD même avec de très fort taux de comptage (la carte a pour limite 80 MHz). On peut enfin contrôler une platine de nanositionnement x, y, z avec des céramiques piézoélectriques sur laquelle repose l'échantillon avec une course de 200 μm et un repositionnement de 5 nm. L'utilisation conjointe de la carte de comptage et des platines permet de réaliser des images. On peut ainsi réaliser des balayages confocaux sur des échantillons déposés avec la platine de nanositionnement (voir par exemple section 4.5.2)¹⁸. Un balayage selon l'axe optique permet d'automatiser les mesures de profondeur de focus pour le réglage de la bague de correction présenté à la section 1.3.1.8.

¹⁷Lorsqu'elle est branchée en parallèle avec d'autre APD, le routeur de signaux augmente la réponse impulsionnelle à 250 ps.

¹⁸Le balayage des platines avec des moteurs pas à pas sur la voie de détection permet de cartographier l'échantillon lors d'un éclairage grand champ du microscope

1.3.3 Caractérisation du montage

1.3.3.1 Calibration du volume focal

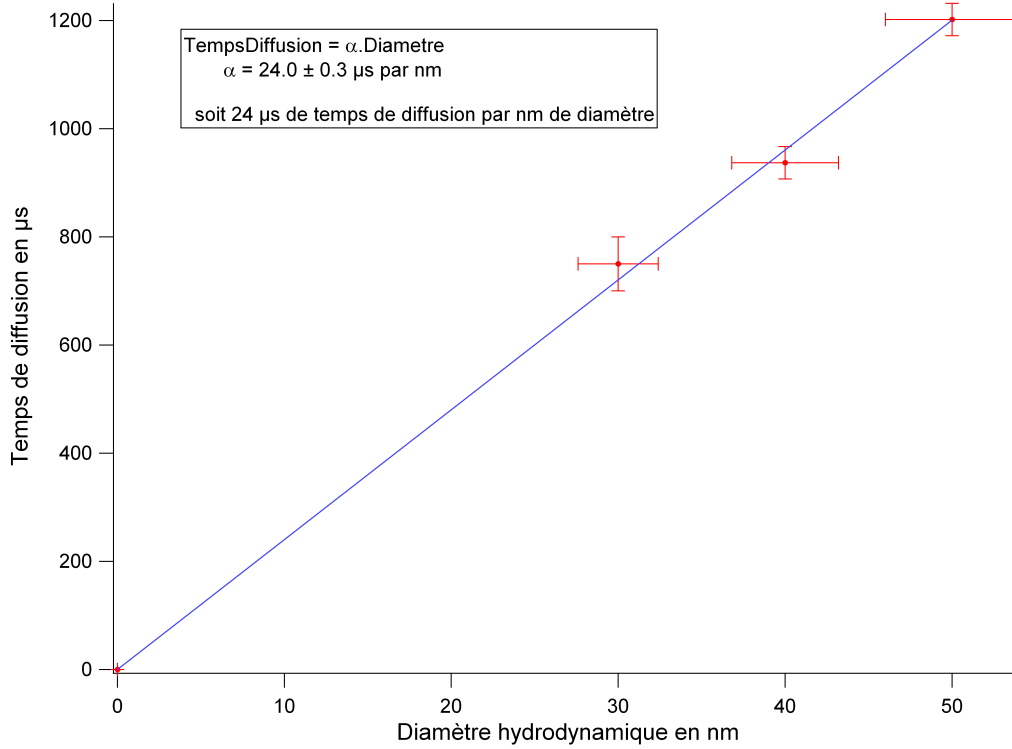


FIG. 1.12 – Courbe de calibration du volume focal à 1 photon (488 nm) avec la diffusion Rayleigh de billes d’or de diamètre variable. Les billes dont le diamètre est inférieur à 30 nm ne donnent pas un signal de diffusion Rayleigh suffisant. Le diamètre des billes est donné avec une variation inférieure à 8%)

Les dimensions caractéristiques du volume focal peuvent être estimées en étudiant les fluctuations temporelles de la luminescence d’objets diffusant selon un mouvement brownien¹⁹. Le diamètre de ces objets a au préalable été mesuré avec d’autres méthodes comme de l’image-rie par microscopie électronique à transmission (TEM) ou par microscopie de force atomique (AFM). Nous verrons au chapitre 2 que ce temps τ_d de diffusion est relié à la taille axiale ω_{xy} (largeur pour laquelle l’intensité est égale à $\frac{1}{e^2}$ de la valeur maximum) d’un volume gaussien-gaussien²⁰ par la relation :

$$\tau_d = \frac{\omega_{xy}^2}{4\gamma D}$$

¹⁹Il ne doit donc pas y avoir de mouvement de convection dans la solution étudiée

²⁰Le volume gaussien-gaussien considéré est défini par :

$$I(x, y, z) = I_0 \exp\left(-2\frac{(x^2 + y^2)}{\omega_{xy}^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{\omega_z^2}\right)$$

où γ vaut 1 pour une excitation monophotonique et 2 pour une excitation biphotonique, D est le coefficient de diffusion spatiale de l'objet qui est donné dans le cadre d'un mouvement brownien par la loi d'Einstein [Einstein, 1905] :

$$D = \frac{kT}{\mu}$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température et μ la mobilité de la sonde i.e le coefficient de proportionnalité entre la force visqueuse et la vitesse. Pour une sphère de diamètre hydrodynamique d , $\mu = 3\pi\eta d$ (loi de Stokes) où η est la viscosité dynamique de la solution. En regroupant ces différentes expressions, on a donc²¹ :

$$\omega_{xy}^2 = \frac{4\gamma kT\tau_d}{3\pi\eta d} \quad (1.12)$$

Pour une diffusion dans l'eau ($\eta_{eau} = 1 \times 10^{-3}$ Pas), à $T = 300$ K, on a $\omega_{xy}^{ennm} = 41.92\sqrt{\alpha}$ où α est la pente de la droite de calibration temps de diffusion vs diamètre de la bille exprimée en $\mu\text{s}\cdot\text{nm}^{-1}$ ($\tau_d = \alpha d$), pour une excitation monophotonique. En l'occurrence (figure 1.12), le waist du volume focal est de 205 nm. Cette valeur est en bon accord au valeur obtenue par modélisation à la section 1.2.3.2, où on a obtenu $\omega_{xeff} = 230$ nm et $\omega_{yeff} = 187$ nm.

Pour une excitation biphotonique²² à 815 nm le coefficient α de calibration (voir figure 1.13) est de $27 \mu\text{s}\cdot\text{nm}^{-1}$ ce qui donne un waist de volume focal *d'excitation à 2 photons*²³ de 218 nm qui est un peu plus petit que ceux obtenues par modélisation $\omega_{xeff}^{2\text{Photons}} = 260$ nm et $\omega_{yeff}^{2\text{Photons}} = 216$ nm, car la taille du faisceau IR à l'entrée de l'objectif de l'objectif est plus grand que celle à 1 photon. Ces données sont résumées dans le tableau 1.14.

Notons que les billes fluorescentes (fluorophores pris dans une matrice de latex) à notre disposition se sont révélées des systèmes peu fiables en ce qui concerne la caractérisation du volume focal. Les résultats ne sont alors pas reproductibles. Il est possible qu'au fil du temps de telles billes se désagrègent partiellement ou s'agglomèrent, rendant l'échantillon trop hétérogène.

1.3.3.2 Calibration des 2 voies de détection pour qu'elle soient symétriques

Comme évoqué auparavant, il existe a priori deux méthodes pour séparer le signal issu du volume d'étude vers deux voies de collection. On peut utiliser un filtrage spatial indépendant sur chaque voie. Pour cela on commence par séparer le signal issu du volume d'étude et chacune des deux contributions est ensuite filtrée par le coeur d'une fibre optique de 50 μm . On peut aussi commencer par filtrer confocalemment le signal par un trou de filtrage commun puis séparer

²¹Le waist ainsi obtenu correspond au profil IR lors d'une excitation à 2 photons

²²815 nm est la longueur d'onde pour laquelle la rhodamine B (la molécule choisi comme référence pour nos expériences) est excité au mieux à 2 photons

²³L'application de la formule 1.12 conduit à 307 nm qui est le waist moyen du profil d'efficacité de détection avec un profil d'excitation IR de 520 nm.

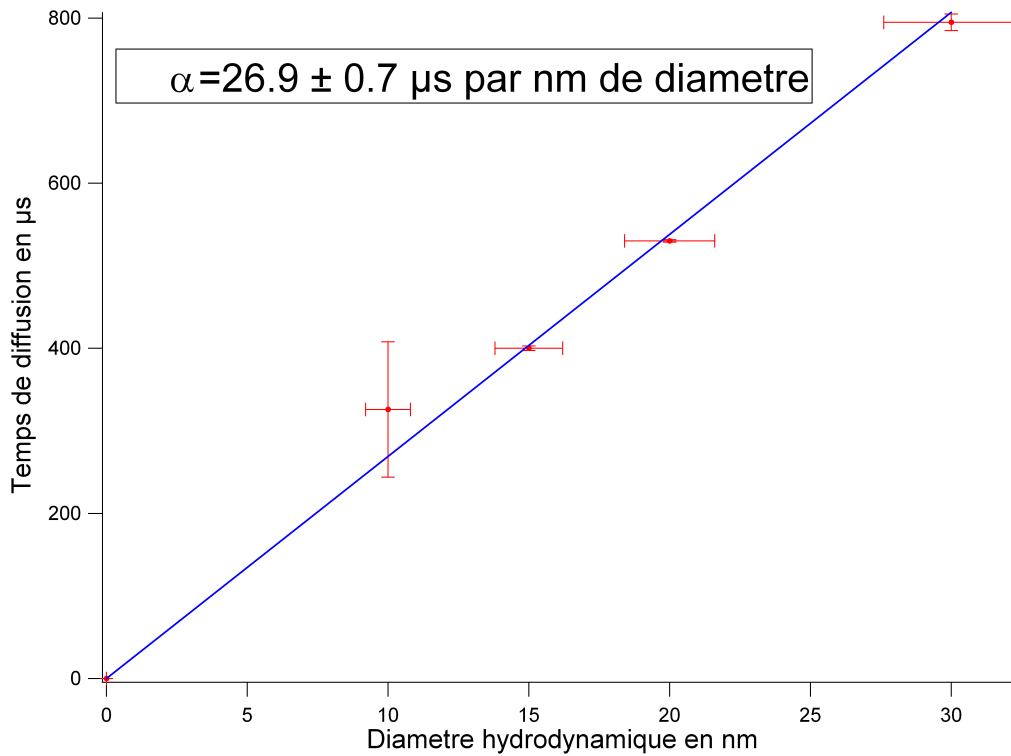


FIG. 1.13 – Courbe de calibration du volume focal à 2 photons (815 nm) avec la photoluminescence de billes d’or de diamètre variable (voir chapitre 4). Les billes dont le diamètre est supérieur à 30 nm sont piégées par le faisceau laser et ne peuvent être utilisées pour la calibration. Le diamètre des billes est donné avec une variation inférieure à 8%

	α en $\mu\text{s.nm}^{-1}$	w_r en nm
1 Photon	24	205
2 photons	27	218

FIG. 1.14 – Résumé des résultats de la calibration du volume focal à 1 et 2 photons

sur les deux voies. La première méthode est assez imprécise. Le placement des fibres optiques qui jouent le rôle de trou de filtrage confocal est délicat. Au final, les deux voies ne sondent pas exactement le même volume focal et par conséquent elles n’enregistrent pas exactement les mêmes fluctuations. Nous avons donc opté pour un filtrage confocal commun aux deux voies. L’utilisation d’un filtrage en amont de la séparation du signal conduit plus facilement à deux voies symétriques. La symétrie des volumes sondés est illustrée sur la figure 1.15 qui montre la corrélation du signal de fluorescence de billes de 40 nm de diamètre en latex incluant des chromophores dopant la bille en volume, excitées à 488 nm avec une puissance de 1 μW . Le

signal est séparé sur 2 voies avec un cube séparateur de polarisation²⁴. On voit que les courbes d'autocorrélation de chaque voie ainsi que la courbe de corrélation croisée sont superposées ce qui est la preuve que les deux voies sondent le même volume.

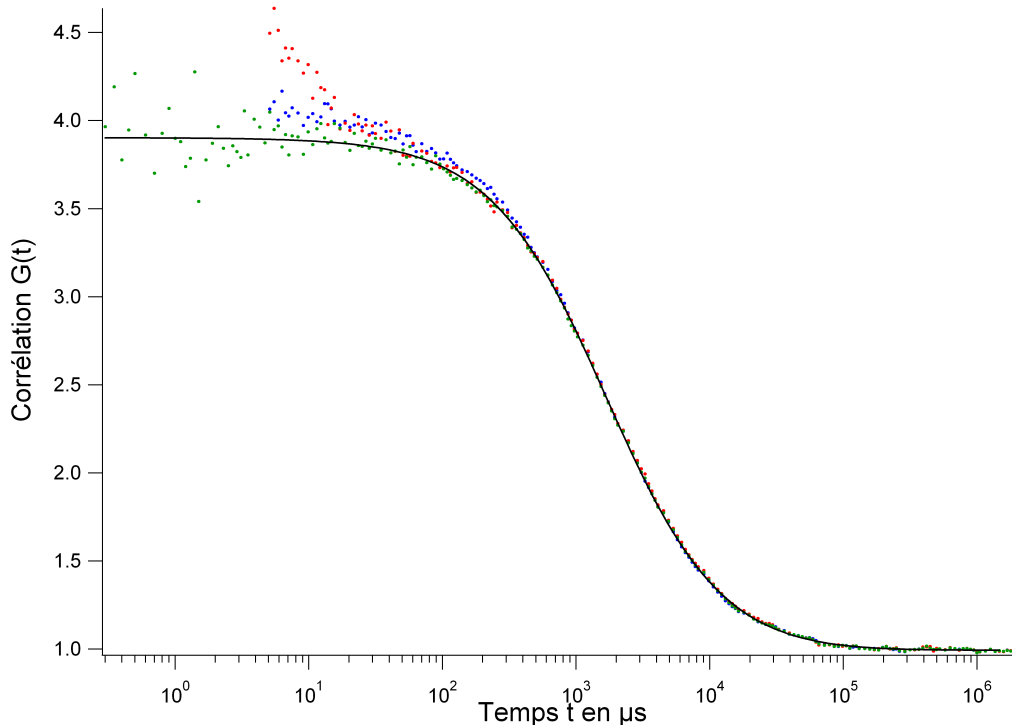


FIG. 1.15 – Courbe de corrélation de billes fluorescentes de 40 nm de diamètre excité à 2 photons à 815 nm avec une puissance de 1 mW. Le signal a été séparé en 2 voies via un cube séparateur de polarisation. Les courbes d'autocorrélation (en bleu et rouge) ainsi que la courbe de corrélation croisée des deux voies sont superposées. Ceci est la preuve que les deux voies de détection sondent le même volume focal. Les courbes d'autocorrélation ne sont présentées qu'à partir de 10 μ s, en deçà le signal est perturbé par l'afterpulsing des détecteurs.

1.3.3.3 Saturation d'un fluorophore

La confocalité du montage peut aussi être vérifiée par une courbe de saturation d'un fluorophore. Pour une densité d'intensité suffisante dans le volume focal, le temps passé par le fluorophore dans l'état fondamental représente une fraction de plus en plus faible du cycle de fluorescence. Dès que cette fraction n'est plus proche de l'unité le signal de fluorescence ne croît plus linéairement avec la puissance laser (dans le cas d'une absorption à un photon). En d'autres termes lorsque la puissance laser est supérieure à la valeur de saturation, le nombre de photons émis atteint une valeur limite, déterminée par le temps moyen de retour à l'état

²⁴compte tenu du grand nombre de fluorophore présents dans les billes, le signal de fluorescence d'un tel objet n'est pas polarisé. Un cube séparateur de polarisation est donc ici équivalent à une lame séparatrice

fondamental pour absorber un nouveau photon. Le passage dans l'état triplet est bien plus faible que la probabilité de désexcitation directe vers le niveau fondamental mais il conduit à l'impossibilité d'absorber un photon pendant un temps bien plus long que le temps de vie de la molécule (typiquement trois ordres de grandeur). Ce dernier peut donc jouer un rôle important sur le temps de cycle moyen.

L'allure de la courbe de saturation avec l'intensité excitatrice est différente si le laser est en impulsions. Supposons, par exemple, que le temps de vie du fluorophore est de 3 ns et que le laser en impulsions a une période de répétition de 12.5 ns. Plaçons nous dans le cas où l'intensité laser est telle que le fluorophore est excité continûment par le flux laser. En 12.5 ns un laser continu peut exciter en moyenne 4 fois le fluorophore alors que le laser en impulsions ne peut le faire cycliser qu'une fois. La puissance de saturation est globalement la même mais tout se passe comme si le fluorophore, une fois saturé émettait 4 fois moins de photons qu'avec un laser continu²⁵.

On modélise la saturation en exprimant le régime permanent de la dynamique d'absorption et d'émission d'un système à 3 niveaux en terme d'équations de population. On aboutit pour une excitation avec un laser continu à :

$$S(I) = C \frac{k_{ex}}{1 + \frac{k_{ex}}{k_{sat}}} \quad (1.13)$$

avec C est une constante en m^2J^{-1} , k_{ex} le taux d'excitation vers l'état excité, et

$$k_{sat} = \frac{k_{10}}{1 + \frac{k_{isc}}{k_{ph}}} \quad (1.14)$$

où k_{10} est le taux de désexcitation radiatif, k_{isc} le taux de passage de l'état excité vers l'état triplet et k_{ph} le taux de passage de l'état triplet vers l'état fondamental. Pour une excitation à un photon $k_{ex} = \sigma^{1\gamma} \frac{I}{h\nu}$, où $\sigma^{1\gamma}$ est la section efficace d'absorption à 1 photon et la loi de saturation devient :

$$I = C' \frac{I}{1 + \frac{I}{I_s}} \quad (1.15)$$

avec pour l'intensité de saturation I_s :

$$I_s = \frac{h\nu k_{sat}}{\sigma^{1\gamma}} \quad (1.16)$$

²⁵La situation est cependant différente si on peut diminuer la fréquence des impulsions laser excitatrice de telle sorte à ne pas exciter un fluorophore alors qu'il est dans l'état triplet. [Donnert et al., 2007] ont montré que pour une période des impulsions laser de l'ordre de 1 μs (soit une fréquence presque 100 fois faible que le laser utilisé lors de ces travaux de thèse), un fluorophore émet jusqu'à 20 fois plus de photon avant de photoblanchir qu'avec une excitation par un laser continu. Le temps de l'expérience est donc allongé d'une quantité égale à la diminution de la fréquence des impulsions laser. Néanmoins, dans le cadre de l'étude des fluctuations de fluorophores en solution, le temps d'exposition d'un chromophore au faisceau exciteur est fixé par le temps de diffusion spatial du fluorophore et non directement par l'expérimentateur.

Cette approche est cependant incorrecte en microscopie confocale. En effet, plus on augmente la puissance, plus le volume d'excitation augmente et plus les molécules hors focus sont à même d'être excitées sans pour autant atteindre le seuil de saturation car la puissance loin du point de focalisation reste trop faible. Bien que filtré confocalemment, ce signal hors focus et non saturé contribue pour partie au signal S . Pour tenir compte de cet effet, on décompose le signal confocal provenant du point $M(r, z)$ comme le produit du nombre de photons émis pendant le temps d'acquisition qui dépend du profil d'excitation $I(r, z)$, et de l'efficacité de collection de ces photons émis au point $M(r, z)$ qu'on note $CEF(r, z)$ comme Collection Efficiency Function. r et z sont les coordonnées cylindriques (symétrie de révolution autour de l'axe z). En sommant sur tous les points $M(r, z)$ du volume d'étude, on obtient la valeur du signal :

$$S(I) = \iint \frac{I(r, z)}{1 + \frac{I(r, z)}{I_s}} CEF(r, z) r dr dz \quad (1.17)$$

Le profil d'excitation $I(r, z)$ est gaussien-gaussien, et le profil de collection $CEF(r, z)$ est celui donné dans la section 1.2.3. La courbe du signal collectée S en fonction de l'intensité totale est ajustée par 1.17 dont l'intégrale est calculée numériquement. La courbe ainsi que l'ajustement sont présentés sur la figure 1.16. On trouve une puissance de saturation de $17,5 \mu\text{W}$ pour la rhodamine B à 488 nm ce qui correspond étant donné le rayon du volume focal de 205 nm à $I_s = \frac{17,5 \mu\text{W}}{\pi w_0^2} = 13,3 \text{ kWcm}^{-2}$. Cette valeur est compatible avec celle mesurée dans la référence [Azoulay, 2001].

Cette approche est valable pour un laser continu. Pour un laser pulsé, le modèle développé dans [Gregor et al., 2005] permet d'écrire le signal S_e émis par la molécule comme :

$$S_e = \frac{Qk_{10}\kappa}{1 + (k_{isc}/k_{ph})\kappa} \quad (1.18)$$

où Q est le rendement quantique multiplié par l'efficacité de détection du montage, κ est fonction de l'intensité laser et prend en compte la nature pulsée de l'excitation. Une courbe de saturation de la rhodamine B excitée à 2 photons à 815 nm est montrée sur la figure 1.17. Pour des puissances importantes l'excitation biphotonique conduit à la photodégradation du chromophore étudié comme l'ont montré les auteurs de la référence [Eggeling et al., 2005]. Le palier observé n'est pas celui du à l'excitation en impulsions mais à la photodégradation du fluorophore. La courbe de saturation est donc très difficile à ajuster. La valeur de la puissance de saturation peut néanmoins être estimée à environ 2 mW.

La puissance de saturation donne une indication sur la puissance à laquelle on doit travailler. La plupart des résultats obtenus dans cette thèse sur des fluorophores ont été menés à des puissances bien plus faibles que celle de saturation (typiquement $P_s/5$). A cette puissance, les effets de passage dans l'état triplet ne sont pas visibles dans les fluctuations de la fluorescence.

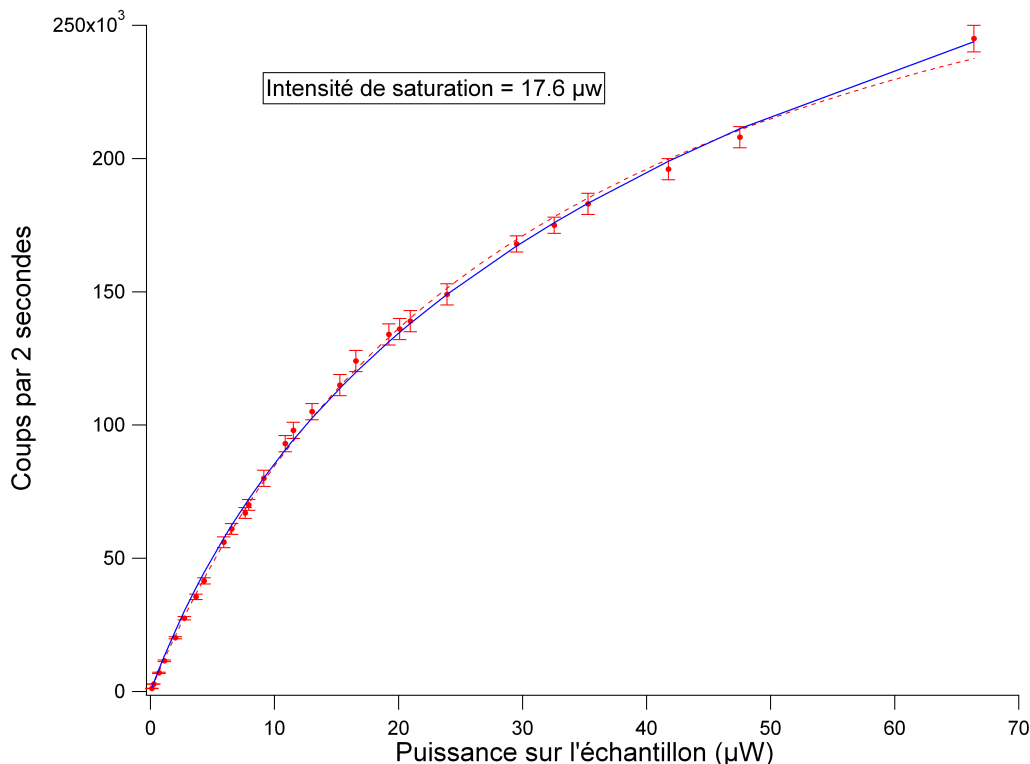


FIG. 1.16 – Courbe de saturation de la rhodamine B excitée à 1 photon à 488 nm avec un laser argon continu. En bleu l’ajustement prenant en compte le volume focal, en rouge et en pointillé l’ajustement correspondant à la formule 1.15.

De ce fait les courbes, qui comportent parfois la trace de nombreuses fluctuations temporelles, sont plus simples à analyser. D’autre part, les chromophores diffusent dans le volume focal en un temps de l’ordre de 30 μs . Avec un temps de vie de l’ordre de 3 ns, un fluorophore peut effectuer jusqu’à 10^5 cycles d’excitation lors de son passage dans le volume focal si la puissance est telle que le chromophore cycle continûment. Les fluorophores employés dans cette thèse sont relativement stables et peuvent effectuer en moyenne 10^6 cycles d’excitation avant de photoblanchir [Eggeling et al., 1998]. Le photoblanchiment n’est donc pas à prendre en compte lorsque l’on étudie des fluorophores diffusant librement dans le volume focal.

1.3.3.4 La limite de la molécule unique

Une fois le microscope réglé et étalonné, on peut tester sa sensibilité. La figure 1.18 montre le passage de molécules de rhodamine 6G de concentration $3 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ excitées à 488 nm avec une puissance²⁶ de 25 μW . Elles passent une par une dans le volume focal. Le rapport signal sur bruit est de l’ordre de 15. En d’autres termes, on est capable de détecter sans ambiguïté les bouffées de photons (burst) correspondant chacun au passage d’une seule molécule

²⁶A cette puissance qui est supérieure à la puissance de saturation de la rhodamine 6G, l’étude des fluctuations de la luminescence du fluorophore doit prendre en compte le passage par l’état triplet.

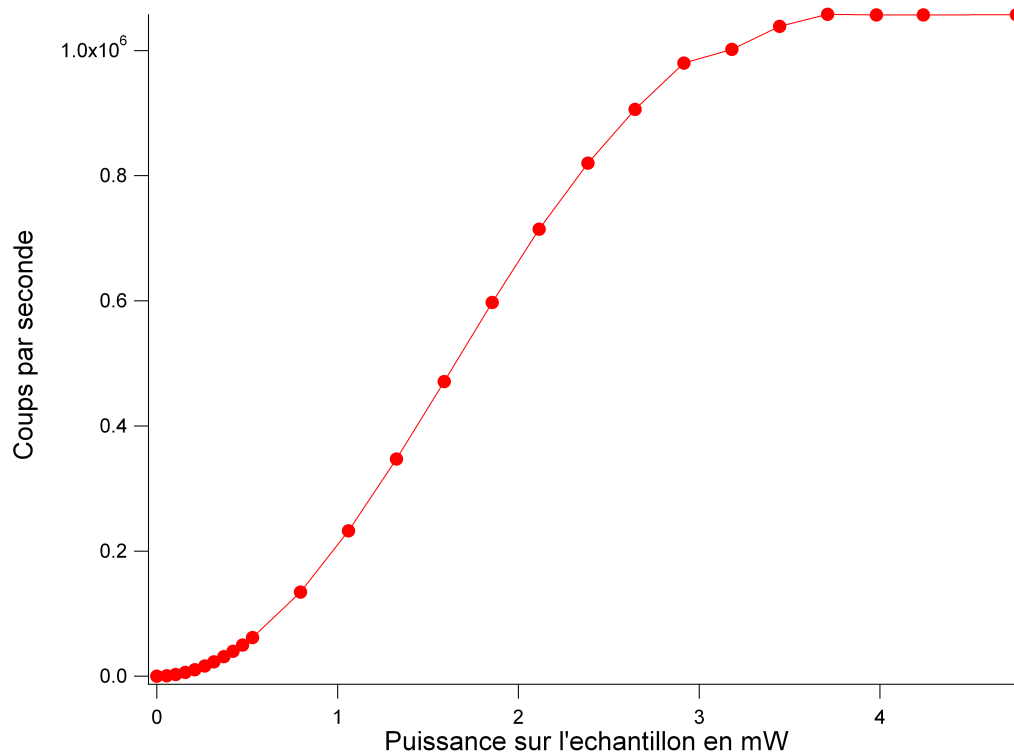


FIG. 1.17 – Courbe de saturation de la rhodamine B excitée à 2 photons 815 nm avec un laser en impulsions. On obtient une puissance de saturation d'environ 2 mW. La courbe de saturation présente une dépendance quadratique à basse puissance ce qui est la signature d'une excitation biphotonique. D'autre part la courbe présente un palier dès que l'on atteint 3 mW qui est dû au fait que le laser est en impulsions d'une part et que l'excitation biphotonique favorise la photodégradation du fluorephore étudié.

dans le volume focal.

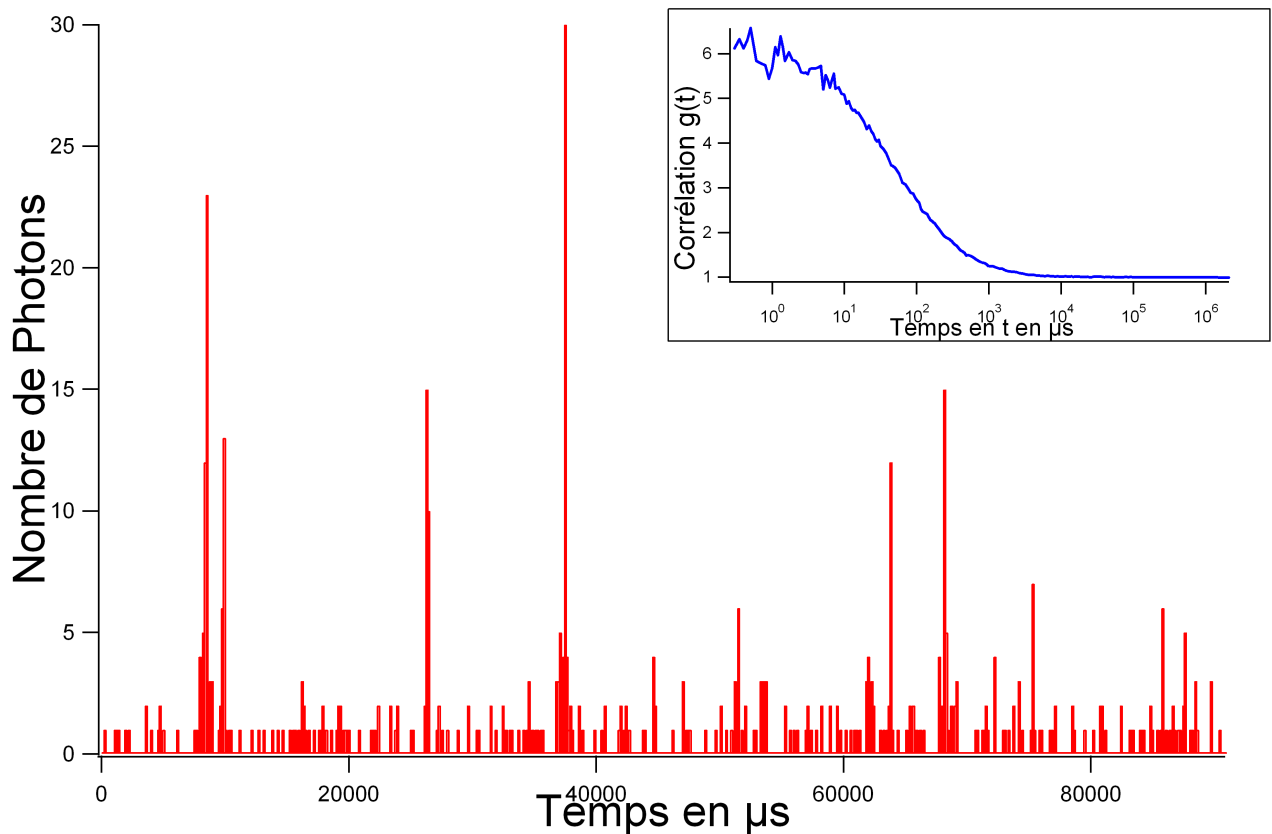


FIG. 1.18 – Chronogramme (voir chapitre 2) d'un signal de rhodamine 6G avec une concentration de $3 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ excitée à 488 nm avec une puissance de $25 \mu\text{W}$. Les bouffées de photons traduisent le passage d'une molécule dans la zone d'étude. Le pas du chronogramme est de $140 \mu\text{s}$. En encart la courbe de corrélation du signal (voir chapitre 2), son amplitude est inversement proportionnelle au nombre de molécule dans le volume focale. On a donc en moyenne 0,2 molécule.

Chapitre 2

Analyse des fluctuations

Le signal obtenu par microscopie confocale ne peut, en général, pas être utilisé directement. Dans la situation limite de particules nombreuses et peu luminescentes, les données collectées pourraient être prises pour du bruit. D'autre part, même si le rapport signal sur bruit est suffisant pour étudier les objets un à un, l'observation d'une seule fluctuation, par définition, n'est pas, à elle seule, significative du système étudié. Le chronogramme de la figure 1.18 montre par exemple des molécules diffusant une par une dans le volume focal. Du fait du mouvement brownien chaque passage d'une molécule n'est qu'une des possibilités parmi toutes les marches au hasard possibles. Seule une procédure conduisant à déterminer un temps moyen de diffusion permet de caractériser efficacement la particule étudiée. Le signal peut aussi être filtré au préalable pour séparer différentes contributions. Toutes ces procédures de traitement du signal ont été implémentées à travers un logiciel que j'ai développé tout au long de ma thèse.

Dans ce chapitre nous nous intéresserons plus particulièrement aux procédures de corrélation de l'intensité du signal. Nous verrons comment la calculer et comment ajuster les courbes ainsi obtenues.

2.1 Nature du signal

La carte de comptage permet de caractériser chaque photon non seulement par son temps d'arrivée depuis le début de l'expérience (macrotime) mais aussi par le microtime i.e. le temps qui s'est écoulé entre l'impulsion laser qui a excité la molécule et le temps où a été émis le photon¹. Ce microtime a une résolution temporelle bien plus fine, typiquement de quelques picosecondes². La reconstruction de l'histogramme du délai entre les cycles excitation émission

¹En fait, dans la mesure où l'arrivée est un phénomène bien plus rare que la détection d'une impulsion laser, la carte mesure la différence de temps entre l'arrivée du photon et l'impulsion suivante.

²Bien que ce temps soit mesuré avec un échantillonnage à la ps, la réponse impulsionnelle des détecteurs limite l'analyse des phénomènes à des temps de l'ordre de 50 ps.

permet d'étudier notamment la durée de vie d'un fluorophore.

Le macrotime est mesuré avec une résolution de 50 ns. Avec ce pas de mesure et des taux de comptage de photons ne dépassant pas 10^5 photons par seconde, l'arrivée d'un photon est un phénomène extrêmement rare. La représentation brute du signal serait une suite de 0 et de 1 avec statistiquement plus de 1 lorsqu'une molécule passe dans le volume focal. Il est donc nécessaire de regrouper les temps d'arrivée de photons avec un pas de temps plus grand. Cela fait apparaître, qualitativement, les fluctuations. Un tel graphe sera appelé chronogramme dans la suite de cette thèse.

Le signal étudié suit une statistique de Poisson³. D'une part parce que le passage des particules dans le volume focal est par essence un processus poissonnien. D'autre part parce que le signal collecté par les détecteurs suit la loi de Mandel [Mandel, 1958] relative au "bruit de grenaille" (shot noise). Des méthodes comme le Photon Counting Histogram (PCH) [Chen et al., 1999] ou Fluorescence Intensity Multiple Distributions Analysis (MAFID) [Palo et al., 2000] sont fondées sur ces constatations.

2.1.1 Filtrage du signal

Il est possible *avant* de réaliser l'expérience de séparer le signal provenant du volume focal en différentes contributions par des méthodes optiques (filtres, polariseurs). Le fait de conserver la liste des temps d'arrivée des photons, permet de réaliser, en plus, un filtrage du signal *après* l'expérience. Ce filtrage numérique a lui aussi pour but de séparer le signal en différentes contributions correspondant à différentes populations.

On peut filtrer les photons par leur macrotime. Le chronogramme fait facilement apparaître le passage d'objets relativement lumineux dans le volume focal. Il est donc possible de ne conserver du signal que ces bouffées de photons (bursts) ou, au contraire, de les supprimer pour n'étudier que le signal des objets moins lumineux. Ce filtrage est assez sommaire dans la mesure où un objet lumineux peut ne passer que furtivement dans le volume focal. D'autre part, le pas utilisé pour réaliser le chronogramme, qui est souvent choisi de façon assez arbitraire, intervient dans le processus de filtrage. Un algorithme plus efficace est décrit dans la référence [Zhang and Yang, 2005].

Néanmoins, un filtrage utilisant directement le chronogramme est largement suffisant pour supprimer certains artefacts. La plupart des systèmes étudiés présente une hétérogénéité importante. Il arrive parfois qu'un objet ayant des dimensions bien plus grandes que celles de la

³Le nombre de photons observés pendant 10 μ s, par exemple, suit la loi de probabilité $P(n)$

$$P(n) = \frac{\mu^n \exp(-\mu)}{n!}$$

où n est le nombre de photons effectivement mesuré, μ la valeur moyenne du nombre de photons mesuré en 10 μ s.

distribution nominale diffuse dans le volume d'étude. L'objet est souvent très lumineux. Cet accident perturbe alors notablement l'ensemble de l'expérience. Il est facilement filtré en ne prenant pas en compte dans le chronogramme le burst correspondant au passage de l'objet. De façon générale, il convient de filtrer tous les signaux qui vont à l'encontre de l'ergodicité de l'expérience (voir figure 2.1). Notons qu'une méthode de filtrage très similaire a été publiée très récemment [Persson et al., 2009].

Le filtrage par macrotime pose néanmoins un problème : le remplacement des photons filtrés. On peut :

ne pas remplacer les photons supprimés Cela conduit à une anticorrélation⁴ de la même durée que la tranche temporelle filtrée. En ne supprimant que des tranches de plusieurs millisecondes cette anticorrélation apparaît à des temps bien plus grands que ceux caractéristiques des dynamiques étudiées. Le filtrage n'introduit donc qu'un offset sur la courbe de corrélation qu'il est facile de corriger.

concaténer les photons En raccordant les parties tronquées de nouveaux bursts, totalement artificiels, peuvent se former à partir des "ailes" du burst filtré. Cela modifie fortement la courbe de corrélation. Cette solution est à proscrire avec un algorithme de détection des bursts trop sommaire.

introduire un bruit poissonnien pour remplacer les photons supprimés On crée un bruit poissonnien dont la moyenne est le taux moyen de comptage de l'expérience. Il n'y a pas alors d'artefacts. Le temps de calcul est cependant sensiblement allongé.

Lorsque l'on utilise plusieurs détecteurs il est préférable, en général, d'appliquer le même filtre à *tous* les détecteurs en même temps.

On peut aussi filtrer les photons par leur microtime [?]. Il est par exemple très facile de supprimer les photons provenant de phénomènes dont la désexcitation est beaucoup plus rapide que le temps de réponse du système de détection. Cela est le cas par exemple de la diffusion Rayleigh ou la diffusion Raman. Il suffit de ne pas prendre en compte les photons dont le microtime est compris entre le début de l'histogramme de temps de vie et la largeur de la réponse impulsionnelle du détecteur. Le rapport signal sur bruit est ainsi grandement amélioré⁵ (voir figure 2.2). Un photon filtré par son microtime est tout simplement retiré de la liste des temps d'arrivée des photons. Le microtime permet aussi de supprimer efficacement l'afterpulsing comme indiqué dans la section 2.2.8.

⁴Si le filtrage n'est effectué que sur une seule des deux 2 voies.

⁵De façon générale, un bruit non corrélé diminue l'amplitude des fluctuations d'un facteur $\left(1 + \frac{\langle b \rangle}{\langle f \rangle}\right)^2$ où $\langle f \rangle$ est le signal utile moyen et $\langle b \rangle$ le bruit moyen [?] []

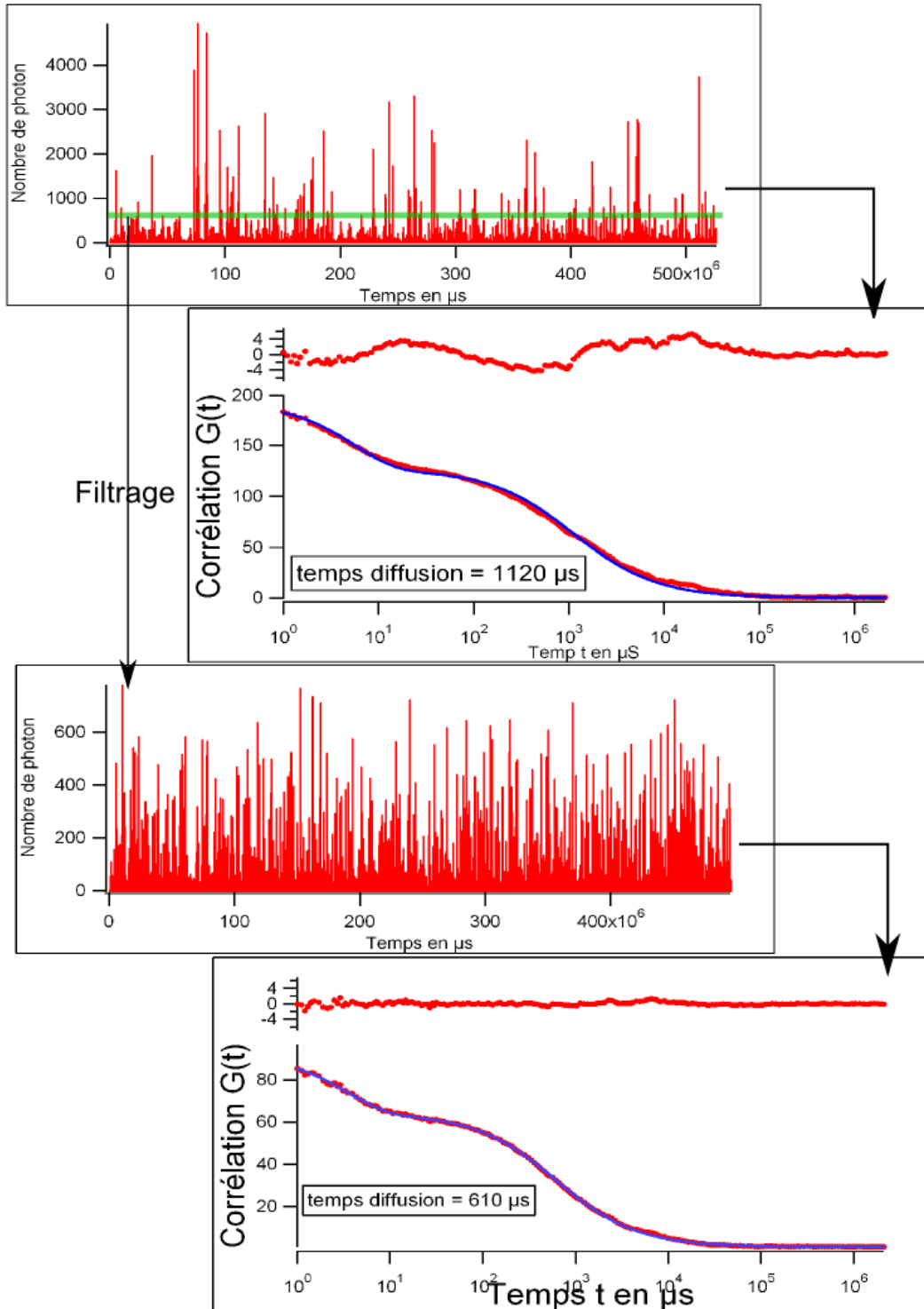


FIG. 2.1 – Courbes de corrélation et chronogrammes de photoluminescence de billes en or de 30 nm excitées à 815 nm à 2 photons (voir chapitre 4) avec une puissance de 7 mW. Le chronogramme initial conduit à une courbe de corrélation ne correspondant pas à un seul temps de diffusion. Le filtrage des plus gros bursts (qui correspond à une faible proportion de billes piégées par le laser) avec un seuil indiqué par la barre verte donne le deuxième chronogramme. Ce dernier conduit à la courbe de corrélation avec un seul temps de diffusion qui correspond bien à des nanoparticules de 30 nm.

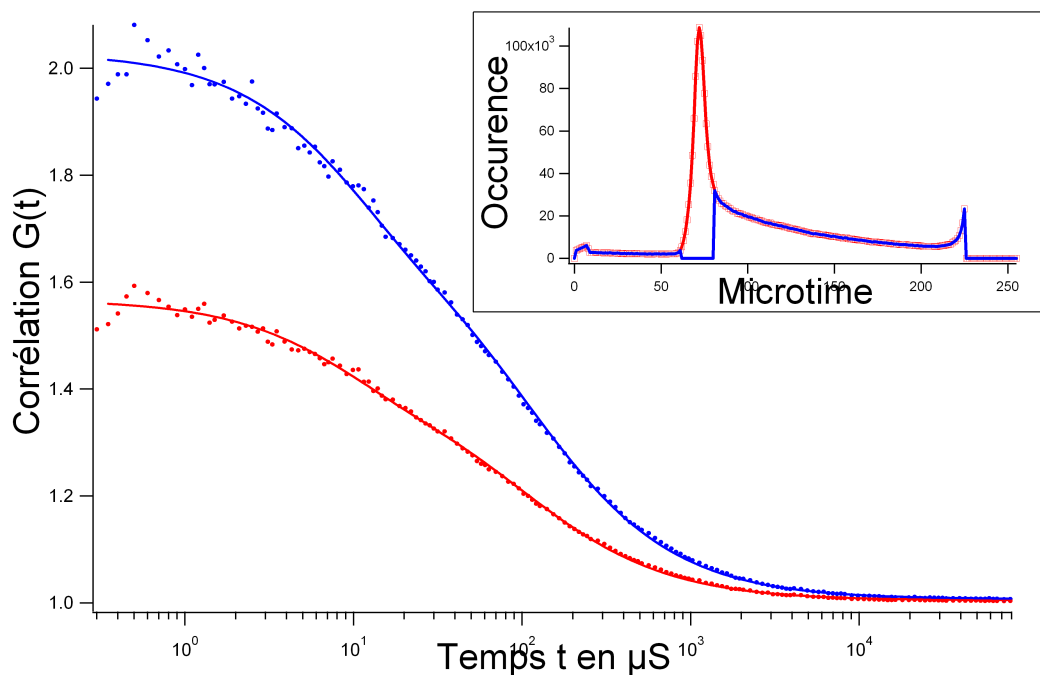


FIG. 2.2 – Courbes correspondant au signal de rhodamine 6G d’une solution de concentration $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ excité à 488 nm avec une puissance de $85 \mu\text{W}$. Une partie de la diffusion Rayleigh de l’échantillon n’a délibérément pas été filtrée sur le montage optique. En encart, l’histogramme de temps de vie non filtré numériquement (en rouge) traduit le déclin de fluorescence entaché dans les temps très courts par la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman de l’eau. On ne conserve de cet histogramme que les photons correspondant avec certitude à l’émission de fluorescence (en bleu). Les courbes de corrélation correspondantes sont montrées sur la figure principale : en rouge, la corrélation non filtrée de la diffusion Rayleigh, en bleu la courbe filtrée numériquement. L’amélioration du rapport signal sur bruit se traduit par une augmentation de l’amplitude de la corrélation. Dans le processus de filtrage, le temps de diffusion reste exactement le même. La carte de comptage échantillonne le microtime sur 8bits (elle possède aussi un mode 14 bits) avec une résolution de 60 ps par canal microtime.

2.2 Corrélation du signal

La corrélation du signal de fluorescence est associée à la technique appelée FCS pour Fluctuation Correlation Spectroscopy. Elle reste, de loin, la méthode la plus utilisée pour caractériser les fluctuations de la luminescence. On trouve désormais des équipements commerciaux tout intégrés (i.e. intégrant à la fois la partie optique du microscope et la partie électronique pour le comptage de photon) où l’analyse de l’échantillon est aussi simple que la caractérisation de l’absorption avec un spectrophotomètre. Ces appareils sont cependant onéreux, peu sensibles et très peu versatiles. La corrélation du signal renseigne sur les temps caractéristiques moyens des fluctuations ainsi que leurs amplitudes relatives.

L'analyse du signal par corrélation du signal a cependant un inconvénient : elle ne prend en compte que les fluctuations temporelles du signal. Elle ne permet donc pas d'obtenir directement des données sur la brillance des particules étudiées. En particulier, elle ne permet pas de distinguer un mélange de deux particules ayant la même dynamique temporelle mais une brillance différente. Le Photon Arrival-Time Interval Distribution (PAID) [Laurence et al., 2004] est une extension à la corrélation du signal qui permet d'obtenir non seulement le temps caractéristique des fluctuations ainsi que leur amplitude, mais aussi la brillance des particules qui ont créé ces fluctuations.

2.2.1 Définition

2.2.1.1 Définition générale

Par définition, l'autocorrélation $g(\tau)$ d'un signal $I(t)$ de durée totale T est⁶ :

$$g(\tau) = \frac{1}{T} \int_T I(t).I(t + \tau) \equiv \langle I(t)I(t + \tau) \rangle \quad (2.1)$$

que l'on utilise souvent sous une forme normalisée $G(\tau)$

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle} \quad (2.2)$$

de telle sorte que si le signal ne présente aucune corrélation alors

$$\langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle$$

et $G(\tau) = 1$. On peut réécrire $G(\tau)$ en faisant intervenir les fluctuations $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$ du signal :

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{\langle (\delta I(t) + \langle I(t) \rangle)(\delta I(t + \tau) + \langle I(t + \tau) \rangle) \rangle}{\langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle} \\ &= 1 + \frac{\langle \delta I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle + \langle \delta I(t + \tau) \rangle \langle I(t) \rangle}{\langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle} + \frac{\langle \delta I(t)\delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle} \\ &= 1 + \frac{\langle \delta I(t)\delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle} \end{aligned}$$

car $\langle \delta I(t) \rangle = 0$ par définition des fluctuations.

De façon générale, l'autocorrélation permet de repérer des régularités dans un signal, en particulier quand ces régularités sont noyées dans du bruit.

2.2.1.2 Corrélation dans le cadre de la microscopie confocale

Tout d'abord, du fait que l'on détecte les photons un par un, le signal $I(t)$, que l'on nomme intensité, est discret. D'autre part, la carte de comptage impose une résolution limite δt ⁷. Le

⁶Dans la définition mathématique les bornes de l'intégrale vont de plus à moins l'infini

⁷en l'occurrence $\delta t = 50ns$

signal $I(t)$ est le nombre de photons détectés divisé par cette résolution. En posant, n le numéro de la mesure depuis le début de l'expérience, $I(t)$ s'écrit :

$$I(n\delta t) = \begin{cases} 0 & \text{s'il n'y a pas de photon détecté durant } \delta t \\ 1/\delta t & \text{s'il y a un photon émis dans le volume focal puis détecté durant } \delta t \end{cases} \quad (2.3)$$

On peut réécrire $g(\tau)$ en tenant compte de la nature discrète du signal :

$$g(\tau) = \frac{1}{T} \int_T I(t).I(t + \tau)dt \longrightarrow g(\tau) = \frac{1}{T} \sum_{n=0}^M I(n\delta t).I(n\delta t + \tau)\delta t \quad (2.4)$$

avec $M = \frac{T}{\delta t}$ le nombre de mesures durant l'expérience de durée T .

Sur l'ensemble des M mesures effectuées durant l'enregistrement, l'arrivée d'un photon est un fait extrêmement rare. Cela est dû au fait que l'on étudie des molécules uniques. Quasi systématiquement $I(t) = 0$. On peut donc réécrire $g(\tau)$ en ne prenant en compte que les temps t_i où sont effectivement détectés un photon. On introduit aussi N , le nombre total de photons enregistrés durant T .

$$g(\tau) = \frac{1}{M} \sum_{i=0}^N I(t_i).I(t_i + \tau) \quad (2.5)$$

Étudions alors plus en détail le terme de corrélation $I(t_i).I(t_i + \tau)$

$$I(t_i) = 1/\delta t \quad \text{car par définition il y a un photon à } t_i$$

$$I(t_i + \tau) = \begin{cases} 0 & \text{s'il n'y a pas de photon à } t_i + \tau \\ 1/\delta t & \text{s'il y a un photon collecté à } t_i + \tau \end{cases}$$

Donc

$$I(t_i) \times I(t_i + \tau) = 1/\delta t^2$$

si et seulement si pour un temps t_i où on a détecté un photon, il y a aussi un photon au temps $t_i + \tau$ dans le fichier qui recense les temps d'arrivée des N photons. C'est à dire, si $I(t_i)$ et $I(t_i + \tau)$ sont corrélés.

Calculer le terme de corrélation revient donc à un "simple" inventaire des paires de photons⁸. De façon imagée, pour un temps τ donné de la courbe d'autocorrélation, il s'agit de mettre en contact tous les N photons de $I(t_i)$ avec ceux de $I(t_i + \tau)$. Pour résumer :

$$\begin{aligned} g(\tau) &= \frac{1}{M} \sum_{i=0}^N I(t_i).I(t_i + \tau) \\ &= \frac{\text{Nombres de paires de photons en coïncidence}}{M \delta t^2} \end{aligned}$$

⁸Alternativement, ce terme peut aussi être vue comme la probabilité conditionnelle de détecter un photon au temps $t + \tau$ alors que l'on a détecté un photon au temps t

La forme normalisée de la corrélation (voir aussi section 2.2.6) de l'intensité du signal a pour expression :

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle \langle I(t+\tau) \rangle} \\ &= M \frac{\text{Nombres de paires de photons en coïncidence}}{N^2} \end{aligned}$$

2.2.2 Algorithmes de calcul

2.2.2.1 Théorème de Wiener-Khintchine

Une première idée pour calculer la fonction d'autocorrélation d'un signal est d'appliquer le théorème de Wiener-Khintchine. Ce dernier stipule que le spectre d'un signal aléatoire et stationnaire est la transformée de Fourier (TF) de sa fonction d'autocorrélation. On peut donc utiliser les bibliothèques de Fast Fourier Transform (FFT) pour calculer le spectre du signal, puis prendre la FFT inverse pour obtenir la fonction d'autocorrélation.

Cela se révèle extrêmement coûteux en temps de calcul. Il faut d'abord transformer le signal des temps d'arrivée des photons t_i en un signal échantillonné continûment de pas Δt . Le spectre aura alors la fréquence maximale $f_{max} = \frac{1}{\Delta t}$. Pour $\Delta t = 50\text{ns}$ i.e. résolution maximale de notre carte il faut prendre en compte 20 millions de points de mesures par seconde d'enregistrement.

Au total, il faut $N_{multiplication}$ avec :

$$N_{multiplication} = M \log M + 2M + M \log M \text{ avec } M = \frac{T}{\Delta t} \gg N_{photons}$$

Le calcul de la courbe de corrélation par le théorème de Wiener-Khintchine permet de présenter les deux principaux écueils lors du calcul de la corrélation du signal :

1. Les fluctuations étudiées ont en général des temps caractéristiques qui vont de $0.1 \mu\text{s}$ à quelques ms. Avec une résolution de $\delta t = 50 \text{ ns}$ cela représente plus de $\frac{5 \times 10^6}{50} = 100\,000$ retards τ où il faut calculer la corrélation. Cependant, les fluctuations étudiées par FCS ne sont pas, en général, périodiques. En d'autres termes les particules étudiées ne sont pas des oscillateurs très stables et leur signal de corrélation ne présente pas de structure rapide dès que l'on dépasse des temps de l'ordre de la dizaine de microsecondes i.e. le signal ne présente pas pour un retard τ de structure $\Delta\tau$ avec $\Delta\tau \ll \tau$. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de calculer 100 000 points pour caractériser les fluctuations, une centaine est suffisante s'ils sont régulièrement répartis sur une échelle logarithmique. On diminue ainsi le temps de calcul par un facteur 100 pour un seul enregistrement.
2. Il y a deux façons de représenter les données. On peut conserver l'ensemble des mesures comme le ferait un chronogramme avec un pas de temps $\delta t = 50 \text{ ns}$. Il y a alors M évènements à prendre en compte. On peut aussi ne conserver que le temps d'arrivée des photons, il faut alors travailler avec N évènements. Comme nous l'avons vu précédemment

le taux de comptage pour des expériences en molécules uniques est faible. On a quasiment toujours $M \gg N$. Travailler avec l'ensemble des données, qui comporte essentiellement des zéros, demande beaucoup plus de calculs. Pour un taux de comptage de 10 000 Coups Par Seconde, on a $\frac{N}{M} = 5 \times 10^{-4}$. On diminue ainsi potentiellement d'un facteur 20 000 le temps de calcul si on travaille avec les temps d'arrivée et non avec le chronogramme.

Nous allons voir que l'algorithme type corrélateur électronique permet de répondre au premier problème et que des algorithmes plus "astucieux" mais gourmands en mémoire permettent de répondre également au deuxième point.

2.2.2.2 Algorithme type corrélateur électronique

Cet algorithme reprend la structure d'un corrélateur électronique. Ce dernier est composé de registres qui s'actualisent au cours de l'enregistrement tous les Δt . Chaque registre correspond à un retard différent pour lequel on calcule la corrélation. Une liste de temps de retard bien adaptés aux phénomènes étudiés est donnée par la suite suivante :

$$\tau_j = \begin{cases} 1 & \text{si } j = 1 \\ \tau_{j-1} + 2^{(j-1)/B} & \text{si } j > 1 \end{cases}$$

où B est un paramètre permettant de moduler le nombre de point calculés et la division $(j-1)/B$ est entière. Dans la plupart des courbes de corrélations présentées dans cette thèse $B = 10$. La liste des points où la corrélation est calculée est donc

$$\{\tau\} = 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25; 0.3; 0.35; 0.4; 0.45; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; 1; 1.1; 1.2; \\ 1.3; 1.4; 1.5; 1.7; \dots$$

On peut faire une analogie pour expliquer comment l'algorithme type corrélateur électronique recense les paires de photons corrélés. Il s'agit donc d'établir le nombre de paires de photons corrélés alors que l'expérience est en cours, c'est à dire alors que de nouveaux photons arrivent par milliers toutes les secondes. Il faut donc "mettre en contact" un nouveau photon détecté avec tous les photons détectés depuis le début de l'expérience; comme lors d'une fête, où quand un invité arrive, il va dire bonjour à tous ceux qui sont arrivés avant lui.

Imaginons alors une soirée festive très bizarre où les invités sont des photons, plusieurs millions de photons. A la porte d'entrée se trouve le portier qui, toutes les 50 nanosecondes, va voir si un photon a sonné pour entrer. Si oui, il note précisément son temps d'arrivée, et présente ce nouveau photon à tous ceux qui sont déjà arrivés. Ils échangent alors leurs temps d'arrivée respectifs. Si le premier est arrivé à t et le deuxième à $t + \tau$, il y a alors une paire au temps $(t, t + \tau)$. Au fur et à mesure de la soirée les invités oublient l'heure exacte de leur arrivée et on peut les grouper en temps d'arrivée plus grossiers par exemple "ceux qui sont arrivés il y a une heure", "ceux qui sont arrivés il y a deux heures" ...

Le coût de cet algorithme est linéaire avec le temps d'acquisition. Pour un enregistrement long i.e. dont le nombre de pas de temps $M \gg N_{\text{photon}}$, on peut le considérer comme lent. De plus, le code de cet algorithme est relativement difficile à écrire et son optimisation compliquée.

Comme nous l'avons vu précédemment le taux de comptage pour des expériences en molécules uniques est faible. En d'autre terme l'algorithme type corrélateur électronique permet de dépasser le premier écueil mais pas le second. Un algorithme efficace devrait plutôt être linéaire avec le nombre de photons enregistrés et non linéaire avec le nombre de pas de temps écoulés. Cela pose néanmoins un problème, ou plutôt posait un problème. Il faut stocker les millions de photons en mémoire vive (Random Access Memory RAM) de l'ordinateur. Avec 10 millions de photons acquis et 8 octets par photon (ce qui est un minimum), il faut 80 MegaOctets de RAM ce qui était impossible il y a une dizaine d'années. L'algorithme type corrélateur électronique, publié en 2001 [Wohland et al., 2001], nécessite de mettre en mémoire uniquement les registres. Cela correspond à autant de points que ceux où on calcule la corrélation, soit une centaine. La place prise en mémoire vive est donc insignifiante mais l'algorithme est linéaire avec le temps d'enregistrement. Obtenir plusieurs gigaoctets de mémoire vive n'est maintenant plus un problème (à peine 50 euros). Les algorithmes ont donc intérêt à mettre tous les photons en mémoire vive pour voir leur temps d'exécution être linéaire avec le nombre de photons enregistrés. C'est le cas des algorithmes présentés par la suite.

2.2.3 Méthode brute

Le calcul du nombre de paires de photons corrélés peut se faire facilement, mais brutalement. Soit $\{t_1, t_2, \dots, t_N\}$ notée $\{t\}$ la liste des temps d'arrivée des photons et $\{t'_1, t'_2, \dots, t'_N\}$ notée $\{t'\}$ la même liste décalée de τ telle que $t'_i = t_i + \tau$. Le calcul des paires de photons consiste à chercher toutes les coïncidences entre t et t' . Calculer la corrélation croisée consiste à prendre pour liste $\{t\}$ le temps d'arrivée des photons du premier détecteur, et pour $\{t'\}$ le temps d'arrivée des photons du deuxième détecteur. On a alors $t_i^{D2} = t_i^{D1} + \tau$.

On commence par le premier photon de $\{t\}$ i.e. t_0 et on regarde si parmi $\{t'\}$ il y a un photon j tel que $t_i = t'_j$ (voir figure 2.3). A chaque coïncidence temporelle il y a corrélation entre les deux photons au temps τ , la corrélation $g(\tau)$ au décalage τ est augmentée de 1.

Pour chaque photon de la liste $\{t\}$ il y a N_{photon} tests à effectuer sur la liste $\{t'\}$. Soit en considérant l'ensemble des photons $\{t\}$, il y a N_{photon}^2 tests et ceci pour R points de la courbe d'autocorrélation soit au final RN_{photon}^2 . Pour un fichier de 1 million de photons et une courbe de corrélation de 100 points, il faut donc 10^{14} tests. Cette méthode comporte évidemment de nombreux calculs inutiles.

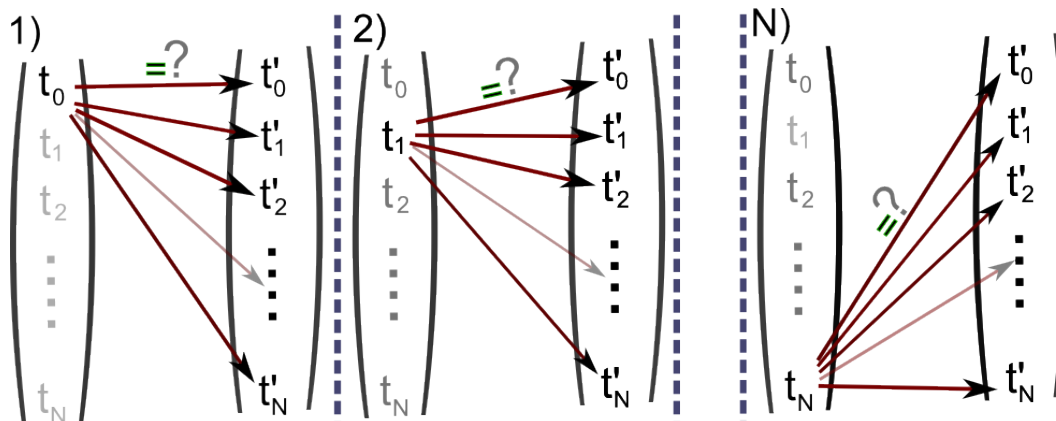


FIG. 2.3 – Calcul exhaustif des paires de photons. On forme la liste $\{t'\}$ telle que $\{t'_i = t_i + \tau\}$ où τ est l'un des temps de retard où on calcule la corrélation. On commence avec le premier retard τ_0 . A partir du temps t_0 d'arrivée du premier photon, on cherche parmi la liste décalée $\{t'\}$, s'il y a un photon i tel que $t'_i = t_0$ (étape 1)). Si c'est le cas on ajoute un à la corrélation au temps τ_0 . Une fois que l'on a parcouru tous les t' , on passe au temps suivant i.e. t_1 (étape 2)). Une fois que l'on a parcouru tous les temps de $\{t\}$ (étape N)), on passe au temps de retard τ suivant i.e. τ_1 . Ainsi de suite jusqu'à avoir calculé tous les temps de retard.

2.2.4 Algorithme proposé par Wahl

Wahl *et al.* [Wahl et al., 2003] proposent de compter les paires de photons corrélés par la manière⁹ expliquée sur la figure 2.4.

Afin de diminuer le temps de calcul ils proposent aussi de diviser par 2 les temps d'arrivée des photons tous les B points de temps de retard de la corrélation. Si deux photons ont alors le même temps d'arrivée on les regroupe en un seul photon dont la pondération est égale au produit de la pondération de chaque photon. Ainsi, au fur et à mesure des calculs, on a de moins en moins de photons à prendre en compte. En d'autres termes, cette solution réduit le nombre de calculs à effectuer pour les temps de corrélation. Cependant elle introduit dans l'algorithme des multiplications (pour les pondérations) qui sont plus coûteuses en termes de calcul processeur que les additions.

D'autre part, cet algorithme nécessite la connaissance préalable du temps d'arrivée de *tous* les photons. Il ne peut donc pas être utilisé alors que l'expérience est en cours.

2.2.5 Un autre algorithme relativement simple et efficace

La méthode brute présentée plus haut peut être transformée en un algorithme très efficace avec un peu de "bon sens". On utilise pour cela le fait que les listes de photons sont ordonnées

⁹Cet algorithme a fait l'objet d'un projet informatique pour des étudiants de Master1 de physique dans le cadre de mon monitorat

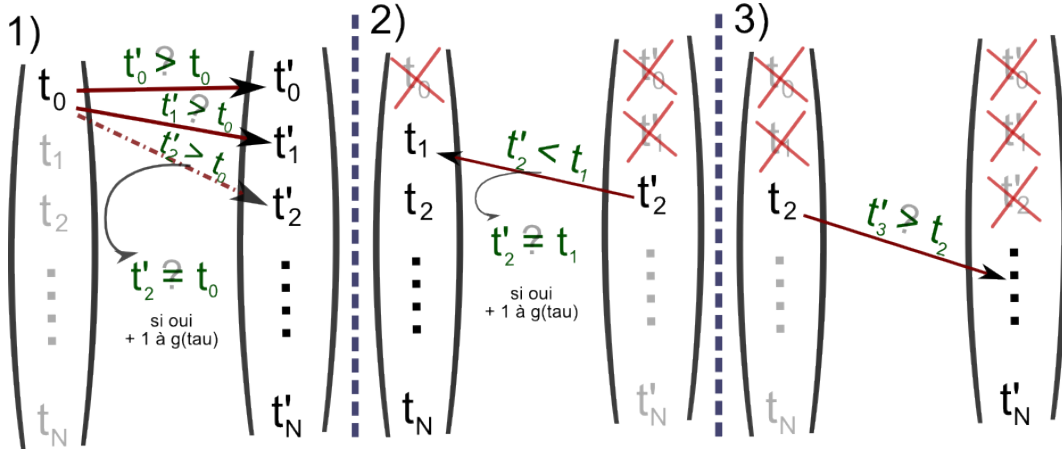


FIG. 2.4 – Calcul des paires de photons par la méthode présentée dans [Wahl et al., 2003]. L'algorithme commence à t_0 et cherche dans la liste $\{t'\}$ avec $\{t'_i = t_i + \tau\}$, le photon j tel que $t'_j \geq t_0$ si $t'_j = t_0$ alors les deux photons sont corrélés et la corrélation $g(\tau)$ au décalage τ est augmentée du produit de la pondération des deux photons (étape 1)). De façon symétrique, l'algorithme cherche ensuite dans la liste $\{t\}$ en commençant par t_1 le photon k tel que $t_k \geq t'_j$, si $t_k = t'_j$ la corrélation $g(\tau)$ est augmentée du produit de la pondération des deux photons (étape 2)). L'algorithme reprend avec la liste $\{t\}$ en commençant par $j + 1$ (étape 3)). Ainsi de suite jusqu'à ce que l'on atteigne la fin de la liste $\{t\}$ ou $\{t'\}$. On recommence ensuite toute la procédure avec le retard τ suivant.

dans le temps, pour $k > m$ on a $t'_k > t'_m$.

Tout d'abord, en reprenant les notations 2.2.3, il est inutile de chercher une corrélation entre le photon i de $\{t\}$ avec les photons j de $\{t'\}$ pour lesquels $j > i$ car pour ces photons on a systématiquement $t'_j > t_i$. D'autre part, pour un retard τ donné, dès que $t_i \geq t'_k$ il est inutile de comparer pour les photons suivants.

Ces simples constatations permettent d'obtenir le principe de l'algorithme publié dans la référence¹⁰ [Laurence et al., 2006]. Je le présente ici sous une forme différente qui, à mon avis, le rend plus simple à comprendre et à coder (voir figure 2.5). Le code correspondant est reporté en annexe C.

Tout d'abord on effectue une sorte de "changement de référentiel". On ne considère pas pour chaque temps de retard τ , la totalité des photons $\{t\}$, à l'inverse pour chaque photons t , on considère l'ensemble des retards $\{\tau\}$. D'autre part, on ne considère plus maintenant $g(\tau)$ comme une courbe mais plutôt comme un histogramme avec des barres de pas variable qui suivent la même évolution que τ . Avant deux photons i et j étaient corrélés si parmi la liste

¹⁰Il est d'ailleurs étonnant que ce ne soit pas le premier qui viennent à l'esprit. L'algorithme de [Wahl et al., 2003] présenté plus haut et qui a été publié 3 ans auparavant est bien plus sophistiqué sans être plus efficace

des temps retenus pour le calcul de la corrélation, il y avait un retard τ tel que $\Delta t = |t_j - t_i| = \tau$. Maintenant deux photons successifs sont toujours corrélés, reste à savoir quelle barre de l'histogramme correspond au retard Δt entre les deux photons. Soit t_i le temps d'arrivée du photon i dans la liste $\{t\}$ (appelée ici compteur start). Pour tous les photons k dont $t'_k > t_i$ de la liste $\{t'\}$ (appelée ici compteur stop), on ajoute un à la corrélation $g(\tau_m)$ avec $\tau_m \leq \Delta t < \tau_{m+1}$, jusqu'à ce que $\Delta t > \tau_R$ où R est le nombre de retards $\{\tau\}$ calculés. On répète ceci pour tous les photons du compteur start. Une fois l'ensemble des photons pris en compte, on normalise chaque barre d'histogramme en la divisant par sa taille. Notons que, de plus, cet algorithme peut être utilisé en même temps que l'acquisition. Pour chaque photon reçu (il joue le rôle de start), on évalue les δt avec les photons arrivés *avant* sur le compteur stop.

L'algorithme type autocorrélateur électronique m'a demandé 1200 lignes de code lors de sa programmation, celui de Whal 450, et seulement 75 pour l'algorithme simple présenté dans cette section. L'algorithme de Whal et l'algorithme simple ont un temps d'exécution comparable, on peut calculer la corrélation d'une expérience comportant 20 millions de photons en 70 secondes sur un ordinateur relativement modeste. Dès que l'expérience dépasse quelques secondes, l'algorithme type autocorrélateur électronique est bien plus lent. Les trois algorithmes aboutissent évidemment à la même courbe de corrélation. Le code pourrait être encore amélioré en parallélisant les calculs afin de tirer partie des processeurs à plusieurs coeurs ou des très nombreuses unités de calcul des cartes graphiques.

2.2.6 Normalisation de la courbe

Le calcul des nombres de paires de photons corrélés permet d'obtenir la fonction $g(\tau)$. Sa forme normalisée $G(\tau)$ est obtenue en divisant $g(\tau)$ par $\langle I(t) \rangle \langle I(t+\tau) \rangle$. En toute rigueur $\langle I(t) \rangle$ vaut $\frac{N'}{T - \tau}$ où N' est le nombre de photons dont le temps d'arrivée t_i est inférieur à $T - \tau$. Quant au terme $\langle I(t + \tau) \rangle$ il vaut $\frac{N'_\tau}{T - \tau}$ où N'_τ est le nombre de photons dont le temps d'arrivée est supérieur à τ . Cependant, dès que le temps d'enregistrement de l'expérience dépasse largement le temps de corrélation calculé ($T \gg \tau_R$) avec $\tau_R \sim 100$ ms on peut faire l'approximation que chacun de ces deux termes vaut $\frac{N}{T}$. $g(\tau)$ doit être divisé par $\frac{T^2}{N^2}$. Au final, on obtient $G(\tau)$ en calculant le nombre de paires corrélées et en le multipliant par $\frac{M}{N^2}$.

2.2.7 Corrélation de l'anisotropie

L'anisotropie du signal I_{an} est donnée par $I_{an} = I_{\parallel} - I_{\perp}$ où I_{\parallel} est le signal dont la polarisation est parallèle à une direction donnée (par exemple la polarisation du laser) et I_{\perp} est le signal dont la polarisation est perpendiculaire à cette même direction. La corrélation de l'anisotropie

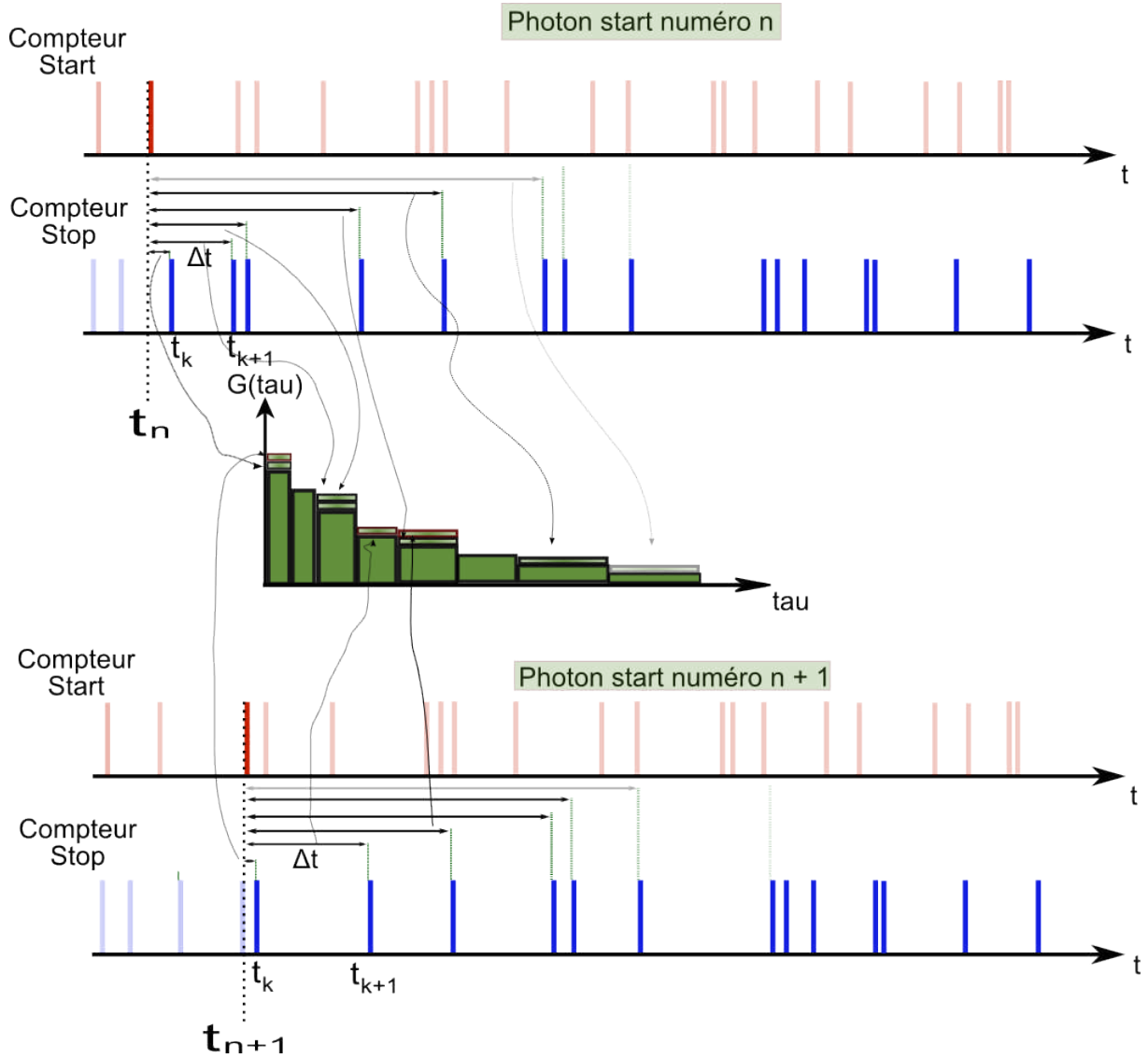


FIG. 2.5 – Calcul des paires de photons avec la "méthode brute" raffinée. On fixe tout d'abord une liste de temps de retard $\{\tau\}$ pour lesquels on va calculer la corrélation, on choisit par exemple la liste décrite au paragraphe 2.2.2.2. Cette liste forme les limites des barres de l'histogramme de la courbe de corrélation (en vert sur le schéma). On dénomme le premier compteur "compteur start", le deuxième "compteur stop". Dans le cas de l'autocorrélation les compteurs start et stop sont identiques. On considère les photons du compteur start un par un. Considérons le n ème photon du compteur start qui est arrivé au temps t_n . Pour chaque photon k du détecteur stop on ajoute 1 à la corrélation $g(\tau_j)$ avec τ_j le plus proche de $\Delta t = t_k - t_j$. Cela correspond aux flèches qui relient le retard $\Delta t = t_k - t_i$ à la case correspondante dans l'histogramme de corrélation. On réitère le processus pour tous les photons $k, k > i$ du détecteur stop avec j tel que $\tau_j > \Delta t$ tout en ayant $\tau_{j+1} < \Delta t$, et ce jusqu'à ce que $\Delta t > \max(\{\tau\})$. On passe ensuite au photon $n + 1$ du détecteur start et on continue à remplir l'histogramme. On continue jusqu'à arriver au dernier photon du compteur start. On normalise alors chaque barre de l'histogramme en la divisant par son pas.

est donc :

$$g_{an}(\tau) = \langle I_{an}(0)I_{an}(\tau) \rangle = \langle (I_{\parallel}(0) - I_{\perp}(0))(I_{\parallel}(\tau) - I_{\perp}(\tau)) \rangle$$

Le signal I est séparé par un cube séparateur de polarisation en I_{\parallel} sur le détecteur 1 et I_{\perp} sur le détecteur 2. On peut alors recréer le signal total I en concaténant les photons de 1 et 2. On peut aussi former I_{an} en regroupant les photons du détecteur 1 avec la pondération 1 et les photons du détecteur 2 avec la pondération -1 . Les données à *autocorréler* ne sont plus uniquement une liste de temps d'arrivée de photons. Il y a maintenant une pondération affectée à chaque photon. On peut utiliser les mêmes algorithmes que ceux décrits précédemment. Cependant, lorsque deux photons sont corrélés on ajoute $+1$ à la corrélation s'ils ont le même signe (i.e. ils viennent du même détecteur) et on retranche 1 s'ils sont de signe opposé. Ainsi s'il n'y pas d'anisotropie $g_{an}(\tau) = 0 \quad \forall \tau$. La forme utilisée pour $g_{an}(\tau)$ n'est pas normalisée. Néanmoins, cette méthode permet d'obtenir, de façon certaine, le temps des fluctuations ne provenant que de l'anisotropie. En effet même s'il y a d'autres processus qui ont la même dynamique que la rotation de la particule (le passage par le niveau triplet par exemple), ils ne conduisent pas à une modulation de la polarisation du signal. Ils ne sont donc pas pris en compte dans la corrélation de l'anisotropie.

Cette méthode souffre cependant d'un défaut : elle est très vulnérable à l'afterpulsing des détecteurs. Un rebond du détecteur peut être confondu avec une corrélation de l'anisotropie du signal. Il est heureusement possible de filtrer efficacement l'afterpulsing comme nous allons le voir maintenant.

2.2.8 Corrélation du signal avec suppression de l'afterpulsing

La discrimination entre un photon du vrai signal et un photon issu de l'afterpulsing du détecteur se fait sur la base de leur microtime. En effet, le photon de signal a un microtime qui s'inscrit dans une statistique : une courbe de déclin exponentiel pour la fluorescence ou alors confondue avec la réponse impulsionnelle du détecteur pour un signal de diffusion Rayleigh ou de photoluminescence de métaux nobles (voir chapitre 4). L'afterpulsing a une dynamique de l'ordre de la microseconde, à l'échelle du microtime qui est de la nanoseconde l'afterpulsing est uniformément réparti sur les N_{micro} canaux du microtime. En première approche le filtrage peut se faire très simplement dans le cas où le signal est confondu avec la réponse impulsionnelle du détecteur. Cette dernière s'étale sur n_d canaux microtime. Le filtrage consiste à ne conserver que ces n_d canaux, on filtre ainsi $(1 - n_d/N_{\text{micro}}) \times 100 \%$ de l'afterpulsing. Avec $n_d = 20$ et $N_{\text{micro}} = 4096$ on supprime 99,5 % de l'afterpulsing. Pour de la fluorescence, le filtrage est plus délicat. Les auteurs de la référence [Enderlein and Gregor, 2005] proposent de calculer la corrélation comme la somme des corrélations croisées des canaux microtime. Cela correspond

à l'expression :

$$g(\tau) = \sum_{j=1}^{N_{\text{micro}}} \sum_{k=1}^{N_{\text{micro}}} F_j F_k \langle I_j(0) I_k(\tau) \rangle$$

où F_j et F_k sont des coefficients pondérant chaque canal microtime¹¹. Ils sont obtenus à partir de l'histogramme des microtimes. Ils traduisent la probabilité que les photons arrivés dans le canal j soit du vrai signal et non de l'afterpulsing.

2.2.9 Modèle théorique de la corrélation d'un signal obtenu par microscopie confocale

On considère une solution constituée de deux types de particules¹² différentes B et N . Chaque particule est caractérisée par sa position $\mathbf{r}(t)$ et son orientation dans le repère du laboratoire par le jeu d'angle $\Omega(t)$. $\Omega(t)$ correspond aux deux angles sphériques (θ, ϕ) lorsque l'orientation de la particule peut être décrite par celle d'un point sur une sphère et par les 3 angles d'Euler dans les autres cas.

La solution est assez diluée pour être considérée comme idéale¹³. D'une part, la probabilité de présence de la particule dans le volume focal suit une loi de Poisson. D'autre part, le trajet d'une particule n'influe pas sur le trajet d'une autre particule.

Les deux types de particules sont caractérisés par leur brillance effective Q_B et Q_N qui est le produit de leur section efficace d'absorption par leur rendement quantique et par l'efficacité de collection moyenne du montage optique.

A l'échelle de temps utilisée pour calculer la corrélation, les particules étudiées réémettent un photon absorbé instantanément. En d'autres termes, le temps moyen durant lequel la molécule reste dans l'état excité, qui est de l'ordre de quelques nanosecondes pour la fluorescence, apparaît comme instantané comparé à la résolution maximale de nos mesures de fluctuation en l'occurrence 150 ns.

Le mouvement brownien des particules a deux origines : la diffusion spatiale caractérisée par une constante D en m^2s^{-1} et la diffusion rotationnelle caractérisée par une constante Θ pour une sphère et Θ_{\parallel} , Θ_{\perp} pour une particule de type toupie symétrique. Θ a pour dimensions des s^{-1} . Typiquement, les temps des fluctuations associés à la diffusion des objets étudiés dans cette thèse sont compris entre $\sim 20 \mu\text{s}$ et $\sim 2000 \mu\text{s}$. Les temps de rotation sont de l'ordre de quelques microsecondes.

¹¹Cette méthode de filtrage de l'afterpulsing s'inscrit dans la notion plus générale de FLCS (Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy) [?] qui utilise les données microtime pour pondérer chaque photon

¹²la généralisation à plus de types de molécule étant alors directe

¹³D'un point de vue pratique, la concentration pour laquelle il n'est plus possible d'observer les fluctuations de la luminescence est bien inférieur à celle de la solution idéale.

Le montage optique

Le profil du volume d'étude, i.e le profil d'efficacité de détection (voir section 1.2.4), indépendant à l'échelle de temps considéré¹⁴, est caractérisé par $I(\mathbf{r})$. Ce volume prend en compte le profil d'excitation et le profil de collection. Il est pratique, pour obtenir des expressions analytiques de la fonction de corrélation, qui permettent une comparaison simple avec la courbe expérimentale, de supposer un profil gaussien-gaussien (voir section 1.2.4.1) :

$$I^{\text{MDF}}(\mathbf{r}) = I_0^{\text{MDF}} \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_{xy}^2} - \frac{2z^2}{w_z^2}\right) \quad (2.6)$$

où I_0^{MDF} est l'intensité de l'excitation. On utilisera par la suite des profils normalisés $I_0^{\text{MDF}} = 1$. Ce profil a un volume $V = \iiint_{-\infty}^{\infty} I(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} = (\frac{\pi}{2})^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z$. La transformée de Fourier d'un tel profil est simple :

$$I^{\text{MDF}}(\mathbf{q}) = \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int d^3\mathbf{r} e^{i\mathbf{q}\mathbf{r}} I(\mathbf{r}) = \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \frac{\omega_{xy}^2 \omega_z}{8} \exp\left(-\frac{w_{xy}^2(q_x^2 + q_y^2)}{8} - \frac{w_z^2 q_z^2}{8}\right) \quad (2.7)$$

Nous distinguerons par la suite I^{exc} de I^{MDF} , I^{exc} étant un profil gaussien-gaussien qui ne tient compte que du laser exciteur. Sauf indication contraire, le laser est polarisé linéairement selon la direction ϵ_i et on détecte le signal selon une direction de polarisation ϵ_d .

Modulation de la luminescence lié à l'orientation de la particule

La probabilité d'absorption de la particule peut dépendre de l'orientation de son dipôle d'absorption à l'instant t . il en est de même de la probabilité d'émission puis de détection d'un photon qui dépend de l'orientation du dipôle d'émission à t .

On pose $A_{\Omega t}$ la probabilité d'absorption d'un photon de polarisation ϵ_i , à l'instant t alors que la particule a l'orientation Ω dans le référentiel du laboratoire et $E_{\Omega t}$ la probabilité d'émission puis de détection d'un photon à l'instant t alors que la particule à l'orientation Ω dans le référentiel du laboratoire.

L'expression de $A_{\Omega t}$ pour un dipôle est relativement simple :

$$A_{\Omega} = |\mathbf{E} \cdot \boldsymbol{\mu}_a|^{2\gamma} = \left| E_x \mu_{ax} + E_y \mu_{ay} + E_z \mu_{az} \right|^{2\gamma} \quad (2.8)$$

où \mathbf{E} est le champ électrique incident, $\boldsymbol{\mu}_a$ est le dipôle d'absorption et γ vaut 1 pour une excitation monophotonique et 2 pour une excitation biphotonique. Notons que A_{Ω} fait intervenir des termes croisés¹⁵ du type $\mu_i^a \mu_j^a$ avec i et j prenant les valeurs x, y, z soit 9 termes au total.

¹⁴Le taux du répétition du laser 80 MHz est plus petit que le plus petit temps considéré pour la corrélation i.e 50ns

¹⁵Dans le cas d'une excitation à 2 photons avec un champ polarisé selon la direction x et/ou y A_{Ω} peut s'écrire :

$$A_{\Omega} = \sum_{i,j=x,y} a_{ijj} \mu_i^a \mu_i^a \mu_j^a \mu_j^a$$

La probabilité d'émettre et de détecter un photon alors que le dipôle a l'angle Ω i.e E_Ω est plus délicate à évaluer. Sa forme générale est :

$$E_\Omega = |\mathbf{E}_d \cdot \boldsymbol{\epsilon}_d|^2$$

où \mathbf{E}_d est le champ électrique émis par le dipôle $\boldsymbol{\mu}^e$ alors qu'il a l'orientation Ω dans le repère associé au laboratoire puis collecté par le microscope (i.e objectif-lentille de tube plus éventuellement un filtrage confocal) et $\boldsymbol{\epsilon}_d$ est la direction d'une éventuelle analyse en polarisation du signal. Notons que E_Ω fait aussi intervenir des termes croisés de type $\mu_i^e \mu_j^e$.

La probabilité E_Ω a été calculée à la section 1.2.3 mais elle n'a pas de forme analytique simple.

A_Ω et E_Ω dépendent a priori de la position du dipôle dans le volume focal. D'une part la polarisation du laser exciteur n'est pas exactement constante dans tout le volume focal, on a donc une dépendance spatiale de $A_\Omega(\mathbf{r})$ et d'autre part la collection du signal émis par un dipôle n'est pas la même en tout point du volume focal à cause de l'ouverture numérique finie de l'objectif et d'un éventuel filtrage confocal. On a donc aussi $E_\Omega(\mathbf{r})$.

Orientation des dipôles d'absorption et d'émission

Evaluer le signal à l'instant t suppose de connaître l'orientation Ω des dipôles d'absorption et d'émission dans le repère du laboratoire en fonction de leur orientation Ω_{Mol} fixe dans le repère de la molécule. $A_{\Omega_{\text{Mol}}}$ et E_{Mol} peuvent se mettre sous la forme :

$$A_{\Omega_{\text{Mol}}} = \sum_{i,j} (\mu_i^a)_{\text{Mol}} (\mu_j^a)_{\text{Mol}} (a_{ij})_{\text{Mol}} \quad E_{\Omega_{\text{Mol}}} = \sum_{k,l} (\mu_k^e)_{\text{Mol}} (\mu_l^e)_{\text{Mol}} (e_{kl})_{\text{Mol}} \quad (2.9)$$

où les indices i, j, k et l peuvent prendre les valeurs x, y et z , $(\boldsymbol{\mu}^a)_{\text{Mol}}$ et $(\boldsymbol{\mu}^e)_{\text{Mol}}$ sont les dipôles d'absorption et d'émission dont les composantes sont exprimées dans le repère de la *particule*. $(a_{ij})_{\text{Mol}}$ et $(e_{kl})_{\text{Mol}}$ sont des coefficients qui dépendent de la polarisation d'excitation et des conditions de détection respectivement et qui varient avec $\Omega(t)$

Les coefficients $(\mu_k^e)_{\text{Mol}} (\mu_l^e)_{\text{Mol}}$ sont les composantes d'un tenseur cartésien symétrique d'ordre 2, qu'on peut exprimer en fonction de ses composantes sphériques $T_{l,m}^{\text{Mol}}(\Omega)$. On notera que pour un tenseur symétrique, seules les composantes d'indice pair interviennent. Les composantes sphériques dans le repère du laboratoire s'obtiennent par la transformation suivante :

$$T_{l,m}^{\text{Labo}}(\Omega) = \sum_{m'} T_{l,m'}^{\text{Mol}} D_{m',m}^l(\Omega) \quad (2.10)$$

On obtient ensuite $E_{\Omega_{\text{Labo}}}$ en passant des composantes sphériques du tenseur irréductible au tenseur cartésien de composantes $(\mu_k^e)_{\text{Labo}} (\mu_l^e)_{\text{Labo}}$.

Les composantes sphériques du tenseur irréductible en fonction des coordonnées du dipôle dans le référentiel de la particule (afin d'obtenir $T_{l,m'}^{\text{Mol}}$) et les équations permettant d'obtenir E_Ω en fonction de $T_{l,m}^{\text{Labo}}(\Omega)$ sont reportées en annexe D page 209.

On peut donc écrire :

$$A_{\Omega} = \sum_{i,j} \mu_i^a \mu_j^a a_{ij} \quad E_{\Omega} = \sum_{k,l} \mu_k^e \mu_l^e e_{kl} \quad (2.11)$$

où les indices i, j, k et l peuvent prendre les valeurs x, y et z , $\boldsymbol{\mu}^a$ et $\boldsymbol{\mu}^e$ sont les dipôle d'absorption et d'émission dont les composantes sont exprimées dans le repère du *laboratoire*. a_{ij} et e_{kl} sont des coefficients qui dépendent de la polarisation d'excitation et des conditions de détection respectivement.

D'autre part, la probabilité d'absorption A_{Ω} pour une excitation biphotonique avec deux photons de même énergie fait aussi intervenir des tenseurs cartésiens d'ordre 2 et il est possible d'utiliser le même principe de calcul pour le changement de repère mais les expressions obtenues sont plus complexes. Dans la suite, pour la clarté de l'écriture A_{Ω} sera écrit pour une excitation monophotonique.

Description des fluctuations par des probabilités conditionnelles

La corrélation de deux photons est ici considérée comme la probabilité conditionnelle qu'un photon soit détecté à $t + \tau$ alors qu'un photon a été détecté à t . Cette probabilité conditionnelle dépend dans les cas pris en compte dans ce travail de la position de la particule, de son orientation et de son type T . On définit par :

$$P(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}_{\tau}, \Omega_0, \Omega_{\tau}, T_0, T_{\tau}, \tau) \quad (2.12)$$

la probabilité conditionnelle qu'une particule se trouve à \mathbf{r}_{τ} avec l'orientation Ω_{τ} et qu'elle soit de type T_{τ} au temps τ alors qu'elle se trouvait en \mathbf{r}_0 avec l'orientation Ω_0 et qu'elle était de type T_0 à $t = 0$. L'évolution temporelle de cette probabilité conditionnelle est décomposée en trois contributions.

La diffusion brownienne spatiale des particules

La probabilité conditionnelle correspondante suit une loi de type diffusion¹⁶ déduite de la loi de Fick et de la distribution statistique des particules :

$$\frac{\partial P(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}_{\tau}, \tau)}{\partial t} = D \nabla^2 P(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}_{\tau}, \tau) \quad (2.13)$$

avec la condition initiale :

$$P_0(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}_{\tau}, 0) = \delta(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}_{\tau}) \quad (2.14)$$

Cette équation différentielle se résout en utilisant la transformée de Fourier \hat{P} de la probabilité conditionnelle P

$$\frac{\partial \hat{P}(\mathbf{q}, \tau)}{\partial t} = -Dq^2 \hat{P}(\mathbf{q}, \tau) \quad (2.15)$$

¹⁶les deux espèces A et B ont le même coefficient de diffusion spatiale D . Dans le cas contraire la fonction de corrélation ne prend pas systématiquement une forme analytique

et

$$P_0(\mathbf{q}, 0) = 1 \quad (2.16)$$

d'où :

$$\hat{P}(\mathbf{q}, \tau) = \exp[-Dq^2\tau] \quad (2.17)$$

donc par transformation de Fourier inverse :

$$P(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}_\tau, \tau) = \int d^3\mathbf{q} e^{-i\mathbf{q}\mathbf{r}} \exp[-Dq^2\tau] \quad (2.18)$$

La diffusion brownienne angulaire des particules

Dans le cas d'une particule de type toupie symétrique [Szabo, 1984]

$$\frac{\partial P(\Omega_0, \Omega_\tau)}{\partial t} = -(\Theta_\perp L^2 + \Theta_\parallel L_z^2) P(\Omega_0, \Omega_\tau) \quad (2.19)$$

où Θ_\perp et Θ_\parallel sont les coefficients de diffusion rotationnelle exprimés en s^{-1} . Pour une sphère, les deux constantes de diffusion rotationnelle sont égales à Θ et le temps moyen de diffusion rotationnel τ_r est donné¹⁷ par :

$$\tau_r = \frac{1}{6\Theta} \quad (2.20)$$

$$\Theta = \frac{kT}{\pi\eta d^3} \quad (2.21)$$

La solution générale de l'équation différentielle 2.19 du premier ordre sur l'opérateur moment cinétique \mathbf{L}^2 et \mathbf{L}_z^2 s'écrit comme la somme de chaque vecteur propre (ici les matrices de rotation de Wigner¹⁸) multipliée par l'exponentielle de l'opposé de sa valeur propre (ici $l(l+1)$ et m^2).

$$P(\Omega_0, \Omega_\tau, \tau) = \frac{(2l+1)}{8\pi^2} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \sum_{m'=-l}^l D_{m,m'}^{l*}(\Omega_0) D_{m,m'}^l(\Omega_\tau) \exp - \left([l(l+1)\Theta_\perp + m^2(\Theta_\parallel - \Theta_\perp)] \tau \right) \quad (2.22)$$

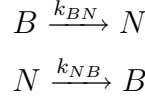
Les réactions chimiques entre différents types de particules

Lors de son passage dans le volume focal l'objet d'étude peut avoir des modulations dans sa luminosité. Ce clignotement peut avoir plusieurs origines : passage par l'état triplet, réaction chimique qui modifie la luminosité de la sonde, changement de conformation, etc. Le

¹⁷Les notations sont les mêmes qu'au chapitre précédent

¹⁸Les matrices de rotation de Wigner ont pour éléments $D_{m,m'}^l(\Omega)$ où Ω sont les angles d'Euler α, β, γ . Ces matrices sont utilisées dans l'algèbre des rotations comme base tensorielle irréductible. Les coefficients sont reliés aux harmoniques sphériques par la relation : $D_{m,0}^{l*}(\alpha, \beta, \gamma) = \sqrt{\frac{4\pi}{2l+1}} Y_l^m(\beta, \alpha)$ dans laquelle α, β, γ sont les angles d'Euler, notés Ω précédemment. Elles sont aussi reliées aux polynômes P de Legendre par la relation $D_{0,0}^l(\Omega) = P^l(\beta)$.

clignotement est modélisé en considérant l'état moins brillant N comme une nouvelle espèce de molécule, de même rayon hydrodynamique. Tout se passe comme s'il diffusait dans le volume d'étude deux espèces B et N avec un équilibre entre les populations B et N



On note k_{BN} et k_{NB} les taux de réactions en s^{-1} de la réaction de B vers N et N vers B respectivement. On suppose qu'autour de l'équilibre les taux de réaction qui mettent en jeu les concentrations de façon non linéaire peuvent être linéarisés [Elson and Magde, 1974]. On obtient le système d'équations différentielles décrivant les taux de transition entre les états B et N :

$$\frac{\partial P_B}{\partial t} = k_{NB}P_N - k_{BN}P_B \quad (2.23)$$

$$\frac{\partial P_N}{\partial t} = k_{BN}P_B - k_{NB}P_N \quad (2.24)$$

où P_T est la probabilité de trouver la particule dans l'état T . On a par ailleurs $P_B + P_N = 1$. On pose

$$\tau_c = \frac{1}{k_{BN} + k_{NB}} \quad (2.25)$$

le temps moyen pour faire un cycle $B \rightarrow N \rightarrow B$. On introduit enfin $P_B^0 = k_{NB}\tau_c$ et $P_N^0 = k_{BN}\tau_c$ les probabilités de trouver la particule dans l'état B et N respectivement à $t = 0$

Les probabilités conditionnelles de passer d'un état à l'autre de la particule sont données par :

$$P_{B/B}(\tau) = k_{NB}\tau_c + (1 - k_{NB}\tau_c)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} = P_B^0 + (1 - P_B^0)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} \quad (2.26)$$

$$P_{N/B}(\tau) = (1 - k_{NB}\tau_c)(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) = (1 - P_B^0)(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) \quad (2.27)$$

$$P_{B/N}(\tau) = (1 - k_{BN}\tau_c)(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) = (1 - P_N^0)(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) \quad (2.28)$$

$$P_{N/N}(\tau) = k_{BN}\tau_c + (1 - k_{BN}\tau_c)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} = P_N^0 + (1 - P_N^0)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} \quad (2.29)$$

2.2.10 Signal collecté

Le signal émis puis collecté pour l'espèce B s'écrit :

$$n_B(t) = Q_B \delta t \iint d^3\mathbf{r} d^3\Omega_t (I(\mathbf{r}))^\gamma \sum_{j=1}^{N_B} (A_{\Omega t})_j (E_{\Omega t})_j \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j(t)) \quad (2.30)$$

où $\gamma = \{1, 2\}$ prend en compte la nature de l'excitation (mono ou biphotonique) et N_A est le nombre total de particules qui sont indexées par j . La valeur moyenne du signal collecté pour l'espèce B $\langle n_B(t) \rangle$ s'écrit :

$$\langle n_B(t) \rangle = Q_B \overline{N_B} P(\Omega_0) P(\mathbf{r}_0) \delta t \iint d^3\mathbf{r} d^3\Omega_t (I(\mathbf{r}))^\gamma A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} \quad (2.31)$$

où $\overline{N_B}$ est le nombre moyen de particules dans l'état B , où $P(\Omega_0)$ est la probabilité que le dipôle d'absorption et d'émission de la particule aient l'orientation en Ω_0 en $t = 0$, que l'on considère isotrope sur l'espace $P(\Omega_0) = \frac{1}{8\pi^2}$, $P(\mathbf{r}_0)$ est la probabilité initiale que la particule se trouve en \mathbf{r}_0 , que l'on considère isotrope sur l'espace $P(\mathbf{r}_0) = \frac{1}{V}$.

Et de façon symétrique pour N :

$$n_N(t) = Q_N \delta t \iint d^3\mathbf{r} d^3\Omega_t (I(\mathbf{r}))^\gamma \sum_{k=1}^{N_N} A_{\Omega t} E_{\Omega t} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k(t)) \quad (2.32)$$

et

$$\langle n_N(t) \rangle = Q_N \overline{N_N} P(\Omega_0) P(\mathbf{r}_0) \delta t \iint d^3\mathbf{r} d^3\Omega_t (I(\mathbf{r}))^\gamma (A_{\Omega_0})_j (E_{\Omega_0})_j \quad (2.33)$$

2.2.11 La fonction de corrélation

Le terme de corrélation peut s'écrire :

$$\begin{aligned} g(\tau) &= \langle n(0)n(t) \rangle = \langle (n_B(0) + n_N(0))(n_B(\tau) + n_N(\tau)) \rangle \\ &= \langle n_B(0)n_B(\tau) \rangle + \langle n_B(0)n_N(\tau) \rangle + \langle n_N(0)n_B(\tau) \rangle + \langle n_N(0)n_N(\tau) \rangle \end{aligned} \quad (2.34)$$

Il fait donc apparaître 4 termes. Intéressons nous au premier :

$$\begin{aligned} g_{BB}(\tau) &= \langle n_B(0)n_B(t) \rangle = Q_B^2 \delta t^2 \iiint d\Omega_0 d\Omega_\tau d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma d^3\mathbf{r}' (I(\mathbf{r}'))^\gamma \\ &\quad \sum_{j=1}^{N_B} \sum_{k=1}^{N_B} \langle (A_{\Omega_0})_j (E_{\Omega_0})_j (A_{\Omega_\tau})_k (E_{\Omega_\tau})_k \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j(0)) \delta(\mathbf{r}' - \mathbf{r}_k(\tau)) \rangle \end{aligned} \quad (2.35)$$

où j et k sont les indices de couples de particules dans le calcul de la corrélation. On utilise alors le fait que la solution est idéale (voir page 56) : des particules différentes ont des mouvements décorrélés et il n'y a pas d'échange d'énergie entre les particules. Seuls les termes avec $j = k$ (il y en a $\overline{N_B}$) conduisent à une corrélation, les autres (il y en a $\overline{N_B(N_B - 1)}$) sont des corrélations fortuites qui ne dépendent plus du temps et n'ont qu'un effet moyen. On obtient :

$$\begin{aligned} g_{BB}(\tau) &= Q_B^2 \overline{N_B} \iiint d\Omega_0 d\Omega_\tau d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma d^3\mathbf{r}' (I(\mathbf{r}'))^\gamma \langle A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} A_{\Omega_\tau} E_{\Omega_\tau} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}(0)) \delta(\mathbf{r}' - \mathbf{r}(\tau)) \rangle \\ &\quad + Q_B^2 \overline{N_B(N_B - 1)} K \end{aligned} \quad (2.36)$$

où K vaut¹⁹ :

$$K = (P(\Omega_0))^2 (P(\mathbf{r}))^2 (P_T^0)^2 \left(\int d\Omega d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} \right)^2 = \frac{1}{V^2} \frac{1}{64\pi^4} (P_T^0)^2 \left(\int d\Omega d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} \right)^2 \quad (2.37)$$

où P_T^0 la probabilité que la particule soit du type T à $t = 0$.

¹⁹ K correspond au terme croisé j et k , il fait donc intervenir la probabilité que la particule soit en $\mathbf{r}_j(0)$ et la probabilité que l'autre particule soit en $\mathbf{r}_k(0)$

Le nombre de particules dans le volume focal suit une loi poissonnienne donc :

$$\overline{N(N-1)} = \overline{N^2} - \overline{N} = (\overline{N} + \overline{N^2}) - \overline{N} = \overline{N^2}$$

Avec la définition 2.30 du nombre de photons collectés on voit que :

$$Q_B^2 \overline{N_B^2} K = \langle n_B(t) \rangle^2 \quad Q_N^2 \overline{N_N^2} K = \langle n_N(t) \rangle^2 \quad Q_B Q_N \overline{N_B N_N} K = \langle n_B(t) \rangle \langle n_N(t) \rangle$$

et

$$\langle n(t) \rangle^2 = K \left(Q_B \overline{N_B} + Q_N \overline{N_N} \right)^2$$

Quant au terme de corrélation $\langle A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} A_{\Omega_\tau} E_{\Omega_\tau} \delta(\mathbf{r}' - \mathbf{r}) \rangle$ on peut l'expliciter en utilisant la probabilité conditionnelle $P(\mathbf{R}, \Omega_0, \Omega_\tau, T_0, T_\tau, \tau)$ introduite page 59 en posant $\mathbf{R} = \mathbf{r}_0 - \mathbf{r}_\tau$ et avec la condition initiale $P(\mathbf{R}, \Omega_0, \Omega_\tau, T_0, T_\tau, 0) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) \delta(\Omega - \Omega_0) P(\Omega_0) P(\mathbf{r}_0) P_T^0$. D'où ;

$$\begin{aligned} g_{BB}(\tau) &= Q_B^2 \overline{N_B} \iiint d\Omega_0 d\Omega_\tau d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma d^3\mathbf{r}' (I(\mathbf{r}'))^\gamma \\ &\quad A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} A_{\Omega_\tau} E_{\Omega_\tau} P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \Omega_0, \Omega_\tau, B_0, B_\tau, \tau) P(\Omega_0) P(\mathbf{r}_0) P_B^0 \\ &\quad + Q_B^2 \langle N_B \rangle^2 K \quad (2.38) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} g_{BB}(\tau) &= \frac{Q_B^2 \overline{N_B} P_B^0}{V 8\pi^2} \iiint d\Omega_0 d\Omega_\tau d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma d^3\mathbf{r}' (I(\mathbf{r}'))^\gamma \\ &\quad A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} A_{\Omega_\tau} E_{\Omega_\tau} P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \Omega_0, \Omega_\tau, B_0, B_\tau, \tau) \\ &\quad + Q_B^2 \overline{N_B}^2 K \quad (2.39) \end{aligned}$$

La fonction de corrélation normalisée $G_{BB}(\tau) = \frac{\langle n(0)n(t) \rangle}{\langle n(t) \rangle^2}$ prend la forme :

$$\begin{aligned} G_{BB}(\tau) &= \frac{Q_B^2 \overline{N_B}^2}{\left(Q_B \overline{N_B} + Q_N \overline{N_N} \right)^2} \\ &\quad + \frac{Q_B^2 \overline{N_B}}{KV 8\pi^2 \left(Q_B \overline{N_B} + Q_N \overline{N_N} \right)^2} \iiint d\Omega_0 d\Omega_\tau d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma d^3\mathbf{r}' (I(\mathbf{r}'))^\gamma \\ &\quad A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} A_{\Omega_\tau} E_{\Omega_\tau} P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \Omega_0, \Omega_\tau, B_0, B_\tau, \tau) P(\Omega_0,) \quad (2.40) \end{aligned}$$

Nous allons maintenant étudier différents cas de figure souvent rencontrés dans les expériences de corrélation des fluctuations en partant de la formule 2.40.

2.2.11.1 Cas de la diffusion brownienne spatiale

Supposons que la seule dynamique qui intervienne est la dynamique brownienne de diffusion spatiale d'un seul type de particule (la distinction B et N n'a plus lieu). Ne pas tenir compte de la rotation des particules revient à considérer que $A_\Omega = 1$ et $E_\Omega = 1$. Cela correspond

par exemple au cas d'une bille en latex avec des fluorophores pris en masse, ou aussi à des fluorophores libres si leur temps de rotation (de l'ordre de la centaine de ps dans l'eau) est bien plus court que la résolution macrotime de la carte de comptage. La probabilité conditionnelle P se résume à $P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \tau)$. La dynamique de P a été donnée dans l'équation 2.18 page 60 $P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \tau) = \int d^3\mathbf{q} e^{-i\mathbf{q}(\mathbf{r}' - \mathbf{r})} \exp[-Dq^2\tau]$; d'autre part dans ces conditions $K = 1$. On obtient pour la fonction de corrélation :

$$G_{\text{diff3D}}(\tau) = 1 + \frac{1}{\bar{N}V} \int d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma d^3\mathbf{r}' (I(\mathbf{r}'))^\gamma \int d^3\mathbf{q} e^{-i\mathbf{q}(\mathbf{r}' - \mathbf{r})} \exp[-Dq^2\tau] \quad (2.41)$$

on peut alors introduire la transformée de Fourier du volume d'étude :

$$G_{\text{diff3D}}(\tau) = 1 + \frac{1}{\bar{N}V} \int d^3\mathbf{q} |\hat{I}(\mathbf{q})|^\gamma \exp[-Dq^2\tau] \quad (2.42)$$

Avec un volume d'étude gaussien-gaussien (voir page 57) la fonction de corrélation se met sous la forme :

$$G_{\text{diff3D}}(\tau) = 1 + \frac{1}{\bar{N}V} \int d^3\mathbf{q} \left[\frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \frac{\omega_{xy}^2 \omega_z}{8\gamma^{3/2}} \exp\left(-\frac{w_{xy}^2(q_x^2 + q_y^2)}{8\gamma} - \frac{w_z^2 q_z^2}{8\gamma}\right) \right]^2 \exp[-Dq^2\tau]$$

$$G_{\text{diff3D}}(\tau) = 1 + \frac{1}{\bar{N}V} \frac{\pi^{3/2} w_{xy}^4 w_z^2}{8\gamma^3 \left(\frac{w_{xy}^2}{\gamma} + 4D\tau\right) \sqrt{\frac{w_z^2}{\gamma} + 4D\tau}} = 1 + \frac{1}{K\bar{N}V} \frac{\pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z}{8\gamma^{3/2} \left(1 + \frac{4\gamma D\tau}{w_{xy}^2}\right) \sqrt{1 + \frac{4\gamma D\tau}{w_z^2}}}$$

ce qui donne avec $V = \frac{\pi^{3/2}}{2\sqrt{2}\gamma^{3/2}} w_{xy}^2 w_z$

$$G_{\text{diff3D}}(\tau) = 1 + \frac{\Gamma}{\bar{N}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{4\gamma D\tau}{w_{xy}^2}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{4\gamma D\tau}{w_{xy}^2}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{4\gamma D\tau}{w_z^2}}} = 1 + \frac{\Gamma}{\bar{N}} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau'_d}}}$$

Avec $\tau_d = \frac{w_{xy}^2}{4\gamma D}$ le temps moyen de diffusion dans le plan xy et $\tau'_d = \frac{w_z^2}{4\gamma D}$ le temps de diffusion le long de la direction de l'ellipsoïde du profil d'efficacité de détection et $\Gamma = \frac{1}{2\sqrt{2}}$. On peut réécrire l'expression en introduisant un facteur géométrique r :

Soit l'expression²⁰

$$G'_{\text{diff3D}}(\tau) = \frac{\Gamma}{\bar{N}} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{r\tau_d}}} \quad (2.43)$$

avec

$$\tau_d = \frac{w_{xy}^2}{4\gamma D} \quad \text{et} \quad r = \frac{w_z^2}{w_{xy}^2} \quad \Gamma = \frac{1}{2\sqrt{2}}$$

τ_d est le temps caractéristique de diffusion de la particule dans le plan xy , r est carré du rapport de la dimension axiale à la dimension radiale du volume d'étude. Le phénomène de diffusion le long de la direction axiale est en quelque sorte considéré comme une propriété

²⁰ Avec $G'(\tau) = G(\tau) - 1$

géométrique du volume d'étude via la variable r . L'amplitude des fluctuations, obtenue à $\tau = 0$, est notée $G(0)$ est inversement proportionnelle au nombre moyen de particules présentes dans le volume d'étude. Ceci est logique car moins il y a de particules plus les fluctuations sont visibles²¹.

Pour une diffusion 2D, donc dans le plan xy , la fonction de corrélation se limite à

$$G'_{\text{diff2D}}(\tau) = \frac{\Gamma'}{\bar{N}} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \quad (2.44)$$

situation obtenue dans les conditions²² à :

$$r^2 = \frac{w_z^2}{w_{xy}^2} \gg 1 \quad \text{soit} \quad w_z^2 \gg w_{xy}^2$$

Le volume focal est très allongé dans la direction z ce qui peut sembler contradictoire avec une diffusion 2D. En fait, ce volume allongé en z ne conduit à aucune fluctuation de la luminescence selon la direction axiale. Tout se passe comme si la diffusion se faisait dans un plan. Expérimentalement, cette situation est rarement rencontrée. La diffusion de fluorophore dans les membranes biologiques, par exemple, conduit plutôt à des diffusions de type anormale [Schwille et al., 1999] [Boutin et al., 2008]. Le cas $r \rightarrow \infty$ a tout de même un intérêt. Selon [Hess and Webb, 2002] la possibilité d'ajuster une courbe de diffusion 3D par un modèle 2D (i.e. $r \rightarrow \infty$) correspond à un écart à un volume d'étude gaussien-gaussien. Nous avons vu au paragraphe 1.2.4 que le profil d'efficacité de détection avec un objectif sans aberration n'est déjà pas gaussien-gaussien. L'ajustement d'une courbe de corrélation avec un modèle qui tient compte d'un volume d'étude gaussien-gaussien est phénoménologique. En d'autres termes, l'exploitation du facteur r obtenue par ajustement d'une courbe de FCS avec la formule 2.43 n'est pas réellement pertinente puisque le volume d'étude n'est jamais gaussien-gaussien. La forme exacte du volume d'étude n'est donc pas parfaitement connue. Le volume d'étude peut néanmoins être calibré avec des objets dont la taille et/ou la concentration sont connues par d'autres méthodes (AFM ou TEM par exemple). On obtient ainsi un facteur r de référence lors de l'ajustement de ces courbes de calibration. Il ne correspond pas exactement au rapport de la taille axiale sur celle horizontale mais ce facteur r caractérise phénoménologiquement notre volume d'étude. Il est gardé constant à la valeur obtenue lors de la phase de calibration pour l'analyse de toutes les autres expériences. En l'occurrence l'ajustement de la partie diffusive des courbes de corrélation présentées dans cette thèse a été fait avec $r \rightarrow \infty$. La difficulté de calibrer les dimensions du volume d'étude est donc reportée sur la précision des dimensions et des concentrations des échantillons de calibration.

²¹les fluctuations $\frac{\delta N}{\bar{N}}$ sont en $\sqrt{\bar{N}}$ et la fonction de corrélation et de second ordre car elle fait intervenir deux fois l'intensité, on a donc une dépendance de la fonction de corrélation en $\frac{1}{\bar{N}}$.

²² $\Gamma' = \frac{1}{2}$

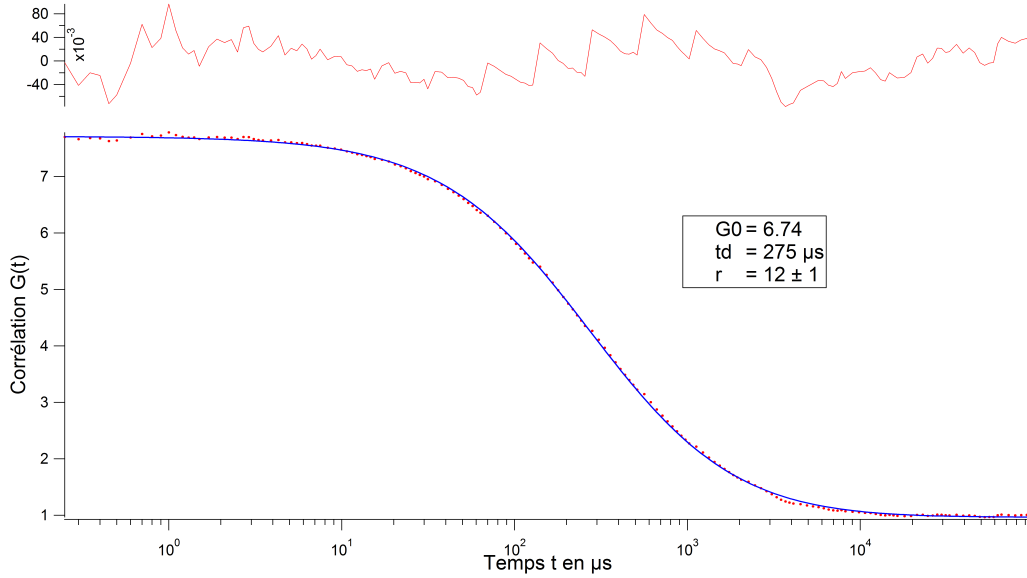


FIG. 2.6 – Courbe de corrélation obtenue à partir d’une simulation de type MonteCarlo (voir annexe B) pour des particules sphériques de 10 nm de diamètre diffusant selon un mouvement brownien dans un profil d’efficacité de collection gaussien-gaussien de waist horizontal de 220 nm et d’un waist vertical 2.2 fois plus grand. Il y a 5 particules dans $27 \mu\text{m}^3$. L’intensité du laser, l’efficacité de collection du montage et le rendement quantique des particules sont choisis tels qu’une particule émette 10 000 coups par seconde. La simulation correspond à une expérience de 60 secondes ce qui est un bon compromis entre le temps de calcul et le bruit sur la courbe de corrélation. L’ajustement de la courbe par la formule 2.43 est très bon. Il donne un temps de diffusion de 275 μs , on obtient avec $\tau_d = \frac{w_{xy}^2}{4\gamma D}$, 273 μs . La valeur obtenue avec le facteur r donne $\frac{w_z}{w_{xy}} = \sqrt{12} = 3.45$ supérieur à la valeur initiale. La concentration obtenue à partir de $G(0)$ est sûrement biaisée par les conditions aux limites utilisées pour les particules. La courbe du haut représente les résidus de l’ajustement.

2.2.11.2 Cas de la diffusion de deux espèces indépendantes

Pour deux espèces diffusant sans interagir entre elles il faut prendre en compte deux termes de corrélation G_{BB} et G_{NN} avec ici $B \leftrightarrow 1$ et $N \leftrightarrow 2$:

$$G'(\tau)_{2\text{esp}} = \frac{\Gamma Q_1^2 \bar{N}_1}{(Q_1 \bar{N}_1 + Q_2 \bar{N}_2)^2} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{d1}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{r\tau_{d1}}}} + \frac{\Gamma Q_2^2 \bar{N}_2}{(Q_1 \bar{N}_1 + Q_2 \bar{N}_2)^2} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{d2}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{r\tau_{d2}}}} \quad (2.45)$$

2.2.11.3 Cas du clignotement de la sonde

Il faut dans ce cas tenir compte des 4 termes dans la fonction de corrélation en particulier de ceux qui concernent un photon émis par une particule de type B corrélé à un photon émis

par la même particule mais de type N (et inversement).

En reprenant ce qui a été établi avec la diffusion spatiale sur le premier des 4 termes :

$$G_{BB}(\tau) = \frac{Q_B^2 \bar{N}_B^2}{(Q_B \bar{N}_B + Q_N \bar{N}_N)^2} + \frac{Q_B^2 \bar{N}_B}{V (Q_B \bar{N}_B + Q_N \bar{N}_N)^2} \int d^3 \mathbf{q} |\hat{I}(\mathbf{q})^\gamma|^2 \exp[-Dq^2 \tau] P_{B/B}(\tau) P_B^0$$

où $P(B, B, \tau)$ est la probabilité conditionnelle que la particule initialement dans l'état B reste dans l'état B au bout d'un temps τ et P_B^0 est la probabilité que la particule soit dans l'état B au temps $t = 0$. Ces probabilités ont été données dans l'équation 2.26 page 61. On obtient

$$G_{BB}(\tau) = \frac{Q_B^2 \bar{N}_B^2}{(Q_B \bar{N}_B + Q_N \bar{N}_N)^2} + \frac{Q_B^2 \bar{N}_B}{V (Q_B \bar{N}_B + Q_N \bar{N}_N)^2} \int d^3 \mathbf{q} |\hat{I}(\mathbf{q})^\gamma|^2 \exp[-Dq^2 \tau] (k_{NB} (\tau_c + (1 - k_{NB} \tau_c) e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) P_B^0$$

Il faut maintenant prendre en compte les termes $G_{BN}(\tau)$, $G_{NB}(\tau)$ et $G_{NN}(\tau)$

$$G_{\text{clign}} = 1 + \frac{1}{V (Q_B \bar{N}_B + Q_N \bar{N}_N)^2} \int d^3 \mathbf{q} |\hat{I}(\mathbf{q})^\gamma|^2 \exp[-Dq^2 \tau] [Q_B P_B^0 \bar{N}_B (Q_B P_{B/B}(\tau) + Q_N P_{B/N}(\tau)) + Q_N P_N^0 \bar{N}_N (Q_B P_{N/B}(\tau) + Q_N P_{N/N}(\tau))]$$

L'intégrale donne une fonction de corrélation de type diffusion spatiale 3D. Après quelques simplifications de ce terme, on aboutit à la relation :

$$G'_{\text{clign}} = G'_{\text{diff3D}}(\tau) \times \left[1 + P \exp\left(-\frac{t}{\tau_c}\right) \right] = \frac{\Gamma}{\bar{N}} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \frac{1}{\sqrt{1 + r \frac{\tau}{\tau_d}}} \times \left[1 + P \exp\left(-\frac{t}{\tau_c}\right) \right] \quad (2.46)$$

En posant :

$$P = \frac{k_{BN} k_{NB} (Q_N - Q_B)^2}{(k_{BN} Q_N + k_{NB} Q_B)^2} \quad (2.47)$$

le contraste du clignotement et

$$\tau_c = \frac{1}{k_{AB} + k_{BA}} \quad (2.48)$$

le temps moyen pour faire un cycle $B \rightarrow N \rightarrow B$.

Lorsque l'état N est totalement noir (i.e $Q_N = 0$) ce qui est par exemple le cas pour le passage vers l'état triplet, l'amplitude P prend une expression plus simple :

$$P^{Q_N=0} = \frac{k_{BN}}{k_{NB}} \quad (2.49)$$

P représente alors le ratio des particules dans l'état B (brillant) et de celles dans l'état N (noir). A $t = 0$, l'ordonnée à l'origine de la courbe de corrélation vaut $\frac{P}{\bar{N}} = \frac{1}{\bar{N}_B}$, qui est l'inverse du nombre de particules brillantes. Si le temps de clignotement τ_c est bien plus faible que le temps de diffusion τ_d , la courbe marque un palier dont l'amplitude est $\frac{1}{\bar{N}}$ car à des temps $\tau \gg \tau_c$ toutes les particules sont en moyenne brillantes.

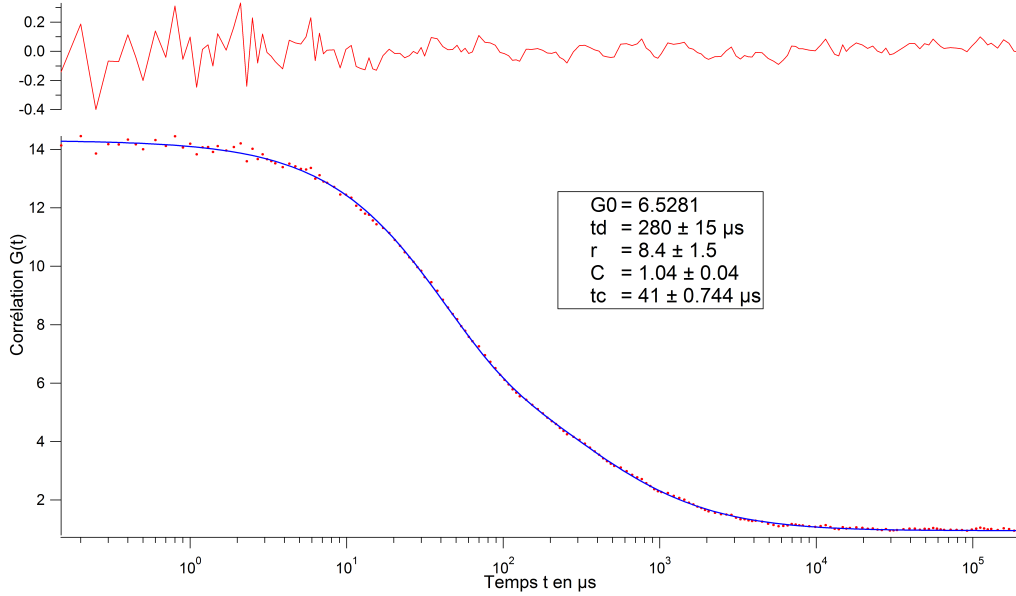


FIG. 2.7 – Courbe de corrélation obtenue à partir d'une simulation de type MonteCarlo dans les mêmes conditions qu'auparavant mais avec un clignotement de la sonde d'une durée de $40 \mu\text{s}$, un niveau N noir (i.e. $Q_N = 0$) et un contraste $P = 1$ (la molécule passe en moyenne autant de temps dans l'état brillant que dans l'état noir). L'ajustement de la courbe par la formule 2.46 est très bon. Il donne des paramètres similaires sur la partie diffusive de la courbe, un temps de clignotement de $\tau_c = 41 \mu\text{s}$ et un contraste de $P = 1$. La courbe du haut représente les résidus de l'ajustement.

2.2.11.4 Cas de la diffusion brownienne spatiale et de rotation

Nous nous intéressons maintenant à la diffusion brownienne complète associant la diffusion spatiale et la diffusion rotationnelle. On ne considère ici qu'un seul type de particule sans réaction chimique. La particule s'excite et se désexcite toujours *instantanément* par rapport l'échelle de temps de notre mesure.

Dans un premier temps, on considère les probabilités A_Ω et E_Ω *indépendantes* de la position

de la particule dans le volume d'étude. L'équation 2.40 devient dans ce cas :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{KV\bar{N}} \iiint d\Omega_0 d\Omega_\tau d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma d^3\mathbf{r}' (I(\mathbf{r}'))^\gamma A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} A_{\Omega_\tau} E_{\Omega_\tau} P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \Omega_0, \Omega_\tau, \tau) P(\Omega_0)$$

La probabilité conditionnelle se sépare en une partie de diffusion spatiale et une partie de diffusion de rotation :

$$P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \Omega_0, \Omega_\tau, \tau) = P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \tau) P(\Omega_0, \Omega_\tau, \tau)$$

avec (cf page 60 et 60) :

$$P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \tau) = \int d^3\mathbf{q} e^{-i\mathbf{q}(\mathbf{r}' - \mathbf{r})} \exp[-Dq^2\tau]$$

et

$$P(\Omega_0, \Omega_\tau, \tau) = \frac{(2l+1)}{8\pi^2} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \sum_{m'=-l}^l D_{m,m'}^{l*}(\Omega_0) D_{m,m'}^l(\Omega_\tau) \exp - \left([l(l+1)\Theta_\perp + m^2(\Theta_\parallel - \Theta_\perp)] \tau \right)$$

Dans ce modèle la partie diffusion spatiale ne dépend pas de l'orientation de la particule. Elle a la forme classique $\frac{\Gamma}{KN} \frac{1}{1+\frac{\tau}{\tau_d}} \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{r\tau_d}}}$. Intéressons nous à la partie liée à la rotation.

$$G'(\tau) = \frac{\Gamma}{KN} \frac{1}{1+\frac{\tau}{\tau_d}} \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{r\tau_d}}} \iiint d\Omega_0 d\Omega_\tau A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} A_{\Omega_\tau} E_{\Omega_\tau} \frac{(2l+1)}{(8\pi^2)^2} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \sum_{m'=-l}^l D_{m,m'}^{l*}(\Omega_0) D_{m,m'}^l(\Omega_\tau) \exp - \left([l(l+1)\Theta_\perp + m^2(\Theta_\parallel - \Theta_\perp)] \tau \right)$$

posons

$$b_{m,m'}^l = \frac{\sqrt{2l+1}}{8\pi^2} \int d\Omega A_\Omega E_\Omega D_{m,m'}^l(\Omega) \quad (2.50)$$

Notons que $b_{0,0}^0 = \frac{1}{8\pi^2} \int d\Omega A_\Omega E_\Omega$ par conséquent (voir équation 2.37) :

$$K = \frac{1}{V^2} \frac{1}{(8\pi^2)^2} \left(\int d\Omega d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} \right)^2 = \frac{1}{V^2} \left(\int d^3\mathbf{r} (I(\mathbf{r}))^\gamma \right)^2 \frac{1}{(8\pi^2)^2} \left(\int d\Omega A_{\Omega_0} E_{\Omega_0} \right)^2 = |b_{0,0}^0|^2 \quad (2.51)$$

On peut réécrire la fonction de corrélation sous la forme :

$$G(\tau) = 1 + \frac{\Gamma}{N|b_{0,0}^0|^2} \frac{1}{1+\frac{\tau}{\tau_d}} \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{r\tau_d}}} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left[\sum_{m'=-l}^l |b_{m,m'}^l|^2 \exp - \left([l(l+1)\Theta_\perp + m^2(\Theta_\parallel - \Theta_\perp)] \tau \right) \right]$$

On peut montrer (voir annexe D) que le fait que les termes A_Ω et E_Ω font intervenir les composants d'un tenseur symétrique implique que seul les termes avec l pairs interviennent dans le calculs des $b_{m,m'}^l$. D'autre part les termes avec $l > 4$ ont une contribution très faible et

peuvent être négligés. Par conséquent, en ne considérant que les termes $l = 0$, $l = 2$ et $l = 4$ la fonction de corrélation s'écrit :

$$G(\tau) = 1 + G'_{\text{diff3D}}(\tau) \left[1 + \sum_{m=-2}^2 \left[\sum_{m'=-2}^2 \frac{|b_{m,m'}^2|^2}{|b_{0,0}^0|^2} e^{-(6\Theta_{\perp} + m^2(\Theta_{\parallel} - \Theta_{\perp}))\tau} \right] + \sum_{m=-4}^4 \left[\sum_{m'=-4}^4 \frac{|b_{m,m'}^4|^2}{|b_{0,0}^0|^2} e^{-(20\Theta_{\perp} + m^2(\Theta_{\parallel} - \Theta_{\perp}))\tau} \right] \right] \quad (2.52)$$

Nous avons calculé les coefficients $b_{m,m'}^l$ pour différentes configurations expérimentales. Les résultats sont résumés dans l'annexe E.

Les coefficients de rotation $b_{m,m'}^l$ traduisent le contraste de rotation c'est à dire l'amplitude du terme de rotation. Plus le diagramme d'absorption ou d'émission se rapproche du cas isotrope ($A_{\Omega}, E_{\Omega} \rightarrow 1$) moins la perception de la rotation est efficace, et donc le contraste de rotation diminue. A contrario, plus l'absorption est sélective quant à la polarisation du laser et l'émission directive, plus le contraste de rotation augmente. Il est important de souligner que le temps de rotation n'est déterminé que par la forme de la particule.

2.2.11.5 Prise en compte de la réponse impulsionnelle du microscope dans le calcul de la fonction de corrélation

Nous tenons maintenant compte de la dépendance spatiale de $A_{\Omega}(\mathbf{r})$ et $E_{\Omega}(\mathbf{r})$ comme cela a été évoqué à la page 58. Au vu des calculs menés à la section 1.2.2.1, on peut considérer que la polarisation du champ exciteur est constante dans tout le volume d'étude²³. En d'autres termes, la variation de $A_{\Omega}(\mathbf{r})$ est faible avec (\mathbf{r}) . On la considère comme constante et $A_{\Omega} = \sum_{i,j} \mu_i^a \mu_j^a a_{ij}$ où les $\mu_i^a \mu_j^a$ sont exprimés dans le repère du laboratoire. Cela n'est pas le cas pour $E_{\Omega}(\mathbf{r})$ où la dépendance spatiale va jouer un rôle très important .

L'intensité, collectée par le microscope, du champ émis par un dipôle sur l'axe optique du microscope vaut :

$$|E(\rho, \varphi, z)|^2 = |E_x(\rho, \varphi, z)|^2 + |E_y(\rho, \varphi, z)|^2 + |E_z(\rho, \varphi, z)|^2 \quad (2.53)$$

avec :

$$|E_x(\rho, \varphi, z)|^2 = |(I_0 + I_2 \cos 2\varphi)\mu_x^e + I_2 \sin 2\varphi\mu_y^e - I_{11} \cos \varphi\mu_z^e|^2 \quad (2.54)$$

$$|E_y(\rho, \varphi, z)|^2 = |I_2 \sin 2\varphi\mu_x^e + (I_0 - I_2 \cos 2\varphi)\mu_y^e - I_{11} \sin \varphi\mu_z^e|^2 \quad (2.55)$$

$$|E_z(\rho, \varphi, z)|^2 = |I_1 \cos \varphi\mu_x^e + I_1 \sin \varphi\mu_y^e + I_{00}\mu_z^e|^2 \quad (2.56)$$

où les $I_i(\rho_0, z_0)$ sont les intégrales données à la section 1.2.3 page 13. On se place au plan focal image donc $z = 0$.

²³On pourrait tenir éventuellement compte de la légère composante de polarisation selon z dans les calculs numériques

Afin de calculer le terme $E_\Omega(\mathbf{r})$, on développe l'intensité dans le plan focal image (équation 2.53) sous la forme d'une combinaison linéaire de $\mu_i^e \mu_j^e$ comme cela est le cas pour $E_\Omega(\mathbf{r})$. En d'autres termes on exprime les coefficients e_{ij} de l'équation 2.11.

$$|E(\rho, \varphi, z')|^2 = \sum_{i=\{x,y,z\}} \mu_i^e \mu_i^e t_{ii} + \sum_{i \leq j} \mu_i^e \mu_j^e t_{ij} \quad (2.57)$$

avec

$$\begin{aligned} t_{xx} &= |I_1|^2 \cos(\varphi)^2 + (I_0 + I_2 \cos(2\varphi))^2 + (I_2 \sin(2\varphi))^2 \\ t_{yy} &= (I_0 - I_2 \cos(2\varphi))^2 + |I_1|^2 \sin(\varphi)^2 + I_2^2 \sin(\varphi)^2 \\ t_{zz} &= I_{00}^2 + |I_{11}|^2 \\ t_{xy} &= 4I_0 I_2 \sin(2\varphi) + |I_1|^2 \cos(\varphi) \sin(\varphi) \\ t_{xz} &= 0 \\ t_{yz} &= 0 \end{aligned}$$

En raison du filtrage confocal, l'intensité image n'est qu'en partie collectée. On pose :

$$e_{xx} = \text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r}) = \int_0^{\rho_t} \int_0^{2\pi} t_{xx} \rho \, d\rho d\varphi \quad (2.58)$$

Avec ρ_t le rayon du trou de filtrage confocal en l'occurrence $12,5 \mu\text{m}$. Le champ dans le plan image est calculé à partir du champ collecté pour un dipôle placé sur l'axe optique et au plan focal $E(x, y, z)$ et en appliquant les lois d'un système imageur : il s'écrit $E(x - x_0 M, y - y_0 M, z - z_0 \frac{M^2 n}{n_0})$. La notation Sconf rappelle qu'il s'agit d'une collection après filtrage confocal.

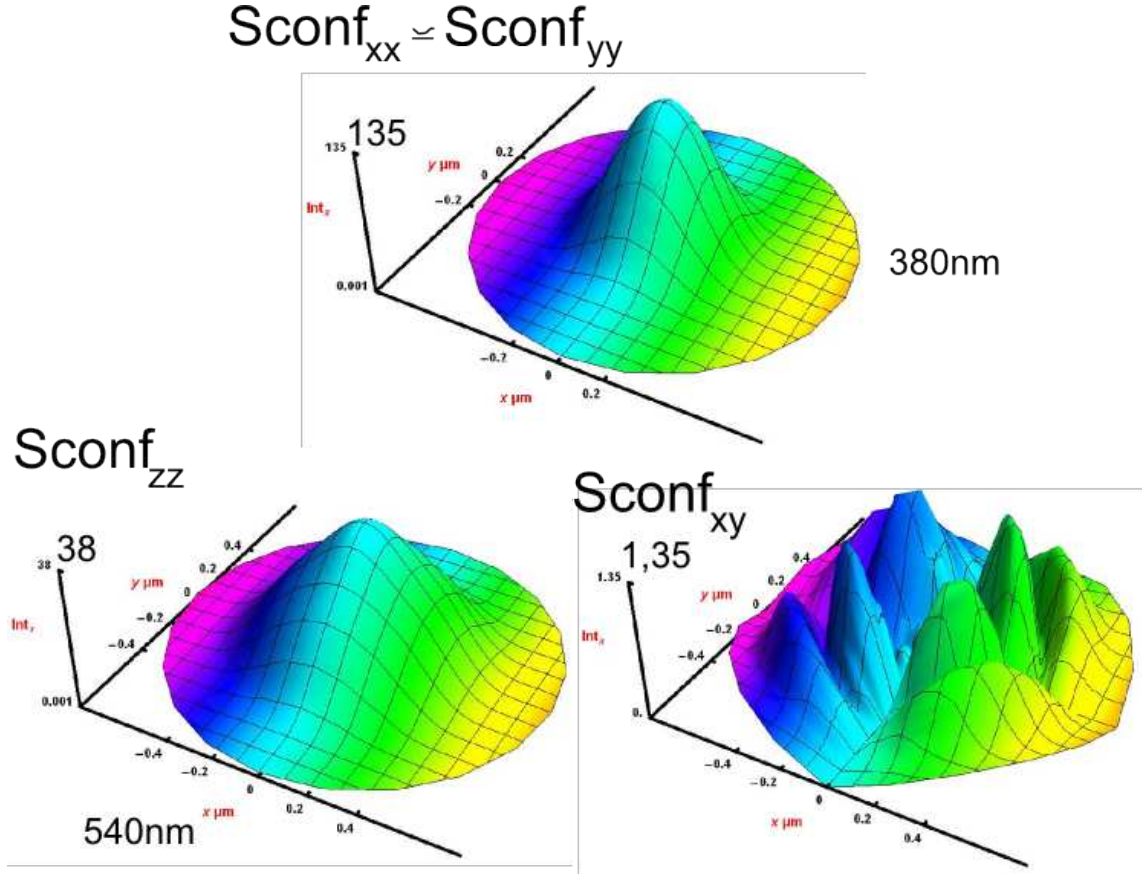
Les 4 fonctions de collection sont évaluées numériquement pour un dipôle se trouvant dans le plan focal objet. Les résultats sont présentés sur la figure 2.8. $\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r})$ et $\text{Sconf}^{yy}(\mathbf{r})$ sont très similaires et peuvent être représentées avec une approximation satisfaisante par une gaussienne de waist proche de 380 nm .

$\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r})$ a une amplitude qui atteint environ 30% de celle de $\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r})$. $\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r})$ a une symétrie de révolution. De nouveau, on peut la représenter par une gaussienne avec un waist de 540 nm mais l'approximation est moins satisfaisante.

En revanche la contribution de $\text{Sconf}^{xy}(\mathbf{r})$ peut être négligée puisque l'efficacité de collection n'atteint que 1% de la valeur de $\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r})$.

Au total on peut approcher $E_\Omega(\mathbf{r})$ par :

$$E_\Omega(\mathbf{r}) \simeq \text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r}) \mu_x^e \mu_x^e + \text{Sconf}^{yy}(\mathbf{r}) \mu_y^e \mu_y^e + \text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r}) (\mu_z^e \mu_z^e) \quad (2.59)$$

FIG. 2.8 – Réponses impulsionnelles $\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r})$, $\text{Sconf}^{yy}(\mathbf{r})$, $\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r})$,

Les coefficients $b_{m,m'}^l(\mathbf{r})$ s'écrivent donc :

$$b_{m,m'}^l(\mathbf{r}) = \int d\Omega \left[\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r}) \sum_{i,j} a_{ij} \mu_i^a \mu_j^a (\mu_x^e)^2 + \text{Sconf}^{yy}(\mathbf{r}) \sum_{i,j} a_{ij} \mu_i^a \mu_j^a (\mu_y^e)^2 + \text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r}) \sum_{i,j} a_{ij} \mu_i^a \mu_j^a (\mu_z^e)^2 \right] D_{m,m'}^{l*}(\Omega) \frac{\sqrt{2l+1}}{8\pi^2} \quad (2.60)$$

Posons

$$r_{m,m'}^l(ij, kl) = \int d\Omega \mu_i^a \mu_j^a \mu_k^e \mu_l^e D_{m,m'}^{l*}(\Omega) \frac{\sqrt{2l+1}}{8\pi^2} \quad (2.61)$$

puis

$$R_{m,m'}^l(b, b) = \left| \sum_{i,j} a_{ij} r_{m,m'}^l(ij, bb) \right|^2 \quad (2.62)$$

$$R_{m,m'}^l(b, d) = \sum_{i,j} a_{ij} r_{m,m'}^l(ij, bb) \times \sum_{i,j} a_{ij}^* r_{m,m'}^{l*}(ij, dd) + \sum_{i,j} a_{ij} r_{m,m'}^l(ij, dd) \times \sum_{i,j} a_{ij}^* r_{m,m'}^{l*}(ij, bb) \quad (2.63)$$

et développons l'expression de $b_{m,m'}^l(\mathbf{r}) b_{m,m'}^l(\mathbf{r}')$

$$b_{m,m'}^l(\mathbf{r}) b_{m,m'}^l(\mathbf{r}') = \sum_{i\{x,y,z\}} \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}) \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}') R_{m,m'}^l(i, i) + \sum_{i \neq j, i \leq j} \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}) \text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r}') R_{m,m'}^l(i, j) \quad (2.64)$$

On peut maintenant reprendre l'expression de la fonction de corrélation *non normalisée*. Pour plus de simplicité on considère la particule sphérique et on se limite au terme $l = 2$:

$$g(\tau) = \frac{Q^2 \bar{N}}{V} \iint d^3 \mathbf{r} d^3 \mathbf{r}' (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}))^\gamma (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}'))^\gamma \int d^3 \mathbf{q} e^{-i\mathbf{q}(\mathbf{r}'-\mathbf{r})} \exp[-Dq^2\tau] \left[b_{0,0}^0(\mathbf{r})b_{0,0}^0(\mathbf{r}') + \sum_{m,m'=-2}^2 b_{m,m'}^2(\mathbf{r})b_{m,m'}^2(\mathbf{r}')e^{-6\theta\tau} \right] + \frac{Q^2 \bar{N}^2}{V^2} \left(\int d^3 \mathbf{r} b_{0,0}^0(\mathbf{r}) (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}))^\gamma \right)^2 \quad (2.65)$$

Le nombre moyen de photons détectés s'écrit :

$$\langle n(t) \rangle = Q \frac{1}{V} \bar{N} \int d^3 \mathbf{r} b_{0,0}^0(\mathbf{r}) (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}))^\gamma$$

donc pour la fonction de corrélation normalisée :

$$G(\tau) = \frac{1}{V \bar{N} K'} \iint d^3 \mathbf{r} d^3 \mathbf{r}' (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}))^\gamma (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}'))^\gamma \int d^3 \mathbf{q} e^{-i\mathbf{q}(\mathbf{r}'-\mathbf{r})} \exp[-Dq^2\tau] \left[b_{0,0}^0(\mathbf{r})b_{0,0}^0(\mathbf{r}') + \sum_{m,m'=-2}^2 b_{m,m'}^2(\mathbf{r})b_{m,m'}^2(\mathbf{r}')e^{-6\theta\tau} \right] + 1 \quad (2.66)$$

avec

$$K' = \frac{\langle n(t) \rangle^2}{Q^2 \bar{N}^2} = \frac{1}{V^2} \left(\int d^3 \mathbf{r} b_{0,0}^0(\mathbf{r}) (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}))^\gamma \right)^2 \quad (2.67)$$

Posons

$$C_{bd}^l = \sum_{m,m'} R_{m,m'}^l(b, d) \quad (2.68)$$

on obtient :

$$G(\tau) = 1 + \iint d^3 \mathbf{r} d^3 \mathbf{r}' \frac{1}{\bar{N} V} (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}))^\gamma (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}'))^\gamma \int d^3 \mathbf{q} e^{-i\mathbf{q}(\mathbf{r}'-\mathbf{r})} \exp[-Dq^2\tau] \frac{1}{K'} \left[\sum_{i\{x,y,z\}} \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}) \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}') (C_{ii}^0 + C_{ii}^2 e^{-6\theta\tau}) + \sum_{i \neq j, i \leq j} \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}) \text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r}') (C_{ij}^0 + C_{ij}^2 e^{-6\theta\tau}) \right] \quad (2.69)$$

La fonction de corrélation fait maintenant apparaître la somme de 6 termes conduisant à des volumes d'études différents. En effet, la TF à considérer n'est plus celle de $I^{\text{MDF}}(\mathbf{r})$ mais celle de termes du type :

$$\frac{1}{K'} (C_{ii}^0 + C_{ii}^2 e^{-6\theta\tau}) \int d^3 \mathbf{q} \iint d^3 \mathbf{r} d^3 \mathbf{r}' (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}))^\gamma (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}'))^\gamma \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}) \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}') e^{-i\mathbf{q}(\mathbf{r}'-\mathbf{r})} \exp(-Dq^2\tau) \quad (2.70)$$

ou

$$\frac{1}{K'} (C_{ij}^0 + C_{ij}^2 e^{-6\theta\tau}) \int d^3 \mathbf{q} \iint d^3 \mathbf{r} d^3 \mathbf{r}' (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}))^\gamma (I^{\text{exc}}(\mathbf{r}'))^\gamma \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{r}) \text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r}') e^{-i\mathbf{q}(\mathbf{r}'-\mathbf{r})} \exp(-Dq^2\tau) \quad (2.71)$$

Ces volumes correspondent à différents profils d'efficacité de détection, ils sont de la forme PSF excitation \times PSF collection.

Analysons les contributions à la fonction de corrélation plus en détail. Les 6 termes sont de même forme mais leurs paramètres caractéristiques diffèrent. Nous faisons l'approximation que les fonctions Sconf^{jj} peuvent être décrites par une gaussienne avec une symétrie de révolution et que $I^{\text{exc}}(\mathbf{r})$ est décrit par une gaussienne ayant un waist w_x^{exc} selon la direction x et w_y^{exc} selon y (voir section 1.2.2.1).

Pour les 3 termes non croisés qui font intervenir $\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r})\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r}')$ le temps de diffusion τ_d^{eff} est défini par le volume qui résulte du profil d'excitation de waist w_x^{exc} et w_y^{exc} et du volume de détection²⁴ de waist w_x^{jj} et w_y^{jj} . Le volume du profil d'efficacité de détection est défini par des waist effectifs :

$$\omega_{x\text{eff}}^{jj} = \sqrt{\frac{(\omega_x^{\text{exc}})^2 (\omega_x^{jj})^2}{(\omega_x^{\text{exc}})^2 + (\omega_x^{jj})^2}} \quad \text{et} \quad \omega_{y\text{eff}}^{jj} = \sqrt{\frac{(\omega_y^{\text{exc}})^2 (\omega_y^{jj})^2}{(\omega_y^{\text{exc}})^2 + (\omega_y^{jj})^2}} \quad (2.72)$$

qui déterminent les temps de diffusion²⁵ observés :

$$\tau_x^{jj} = \frac{(\omega_{x\text{eff}}^{jj})^2}{4D} \quad \text{et} \quad \tau_y^{jj} = \frac{(\omega_{y\text{eff}}^{jj})^2}{4D} \quad (2.73)$$

La fonction de corrélation associée au terme $\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r})\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r}')$ est donc de la forme :

$$G(\tau)^{jj} = \frac{\Gamma}{\bar{N}} \frac{(\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{0}))^2}{\sqrt{1 + \frac{4\gamma D\tau}{\omega_z^2}} \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{(\omega_{x\text{eff}}^{jj})^2}} \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{(\omega_{y\text{eff}}^{jj})^2}}} \quad (2.74)$$

où $(\text{Sconf}^{jj}(0))^2 (C_{jj}^0 + C_{jj}^2 e^{-6\theta\tau})$ est le terme de pondération de cette partie de la fonction de corrélation par rapport aux 5 autres.

Pour les 3 termes croisés, les temps de diffusion sont gouvernés par deux volumes de détection différents dont l'extension latérale fait intervenir $\omega_{x\text{eff}}^{jj}$ et $\omega_{y\text{eff}}^{kk}$ (respectivement y). La fonction de corrélation de diffusion du terme $\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r})\text{Sconf}^{kk}(\mathbf{r}')$ s'écrit :

$$G(\tau)^{jk} = \frac{\Gamma_{jk}}{\bar{N}} \frac{\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{0})\text{Sconf}^{kk}(\mathbf{0})}{\sqrt{1 + \frac{4\gamma D\tau}{\omega_z^2}} \sqrt{1 + \frac{8D\tau}{(\omega_{x\text{eff}}^{jj})^2 + (\omega_{x\text{eff}}^{kk})^2}} \sqrt{1 + \frac{8D\tau}{(\omega_{y\text{eff}}^{jj})^2 + (\omega_{y\text{eff}}^{kk})^2}}} \quad (2.75)$$

²⁴Le profil d'excitation biphotonique i.e. $I^2(\mathbf{r})$ est ajusté par une gaussienne de la forme :

$$\exp\left(-2\frac{x^2}{(w_x^{\text{exc}})^2}\right) \exp\left(-2\frac{y^2}{(w_y^{\text{exc}})^2}\right)$$

²⁵Nous ne tenons pas compte des modifications des volumes dans la direction axiale. $w_{z\text{eff}} = w_z$ ici

où Γ_{jk} vaut :

$$\Gamma_{jk} = \frac{1}{2\sqrt{2}} \left(\frac{2\omega_{xeff}^{jj}\omega_{xeff}^{kk}}{(\omega_{xeff}^{jj})^2 + (\omega_{xeff}^{kk})^2} \right) \left(\frac{2\omega_{yeff}^{jj}\omega_{yeff}^{kk}}{(\omega_{yeff}^{jj})^2 + (\omega_{yeff}^{kk})^2} \right) \quad (2.76)$$

Au total :

$$G(\tau) = 1 + \sum_{i \leq j} G(\tau)^{ij} \frac{1}{K'} (C_{ij}^0 + C_{ij}^2 e^{-6\Theta\tau}) \quad (2.77)$$

Pour résumer, la prise en compte de la dépendance spatiale de la probabilité d'émission/détection avec l'orientation de la particule fait apparaître 6 fonctions de corrélations²⁶ de diffusion spatiale au lieu d'une seule. Le poids relatif de ces 6 fonctions dépend :

- D'une part du diagramme d'absorption et d'émission de la particule étudiée ainsi que des conditions expérimentales (polarisation, excitation mono ou biphotonique) qui conduisent à l'excitation de la particule. Cette contribution fixe les termes C_{ij}^l .
- D'autre part de la collection du signal. Les calculs ont été menés pour une émission de type dipolaire. Ils conduisent aux termes $\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r})$. Ces termes interviennent dans la pondération des différentes contributions via $\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{0})$, mais ils contiennent aussi l'information sur les dimensions spatiales des différentes contributions de la fonction de corrélation.

2.2.11.6 Fonction de corrélation avec séparation de polarisation

C_{xx}^2	$\frac{20}{441}$	C_{xx}^0	$\frac{1}{49}$
C_{yy}^2	$\frac{4}{6615}$	C_{yy}^0	$\frac{1}{1225}$
C_{zz}^2	$\frac{4}{6615}$	C_{zz}^0	$\frac{1}{1225}$
C_{xy}^2	$\frac{4}{441}$	C_{yx}^0	$\frac{2}{245}$
C_{xz}^2	$\frac{4}{441}$	C_{zx}^0	$\frac{2}{245}$
C_{yz}^2	$\frac{4}{6615}$	C_{yz}^0	$\frac{2}{1225}$

FIG. 2.9 – Tableau regroupant les coefficients C_{ij}^2 et C_{ij}^0 dans le cas où on étudie une particule possédant un dipôle d'absorption et un dipôle d'émission alignés que l'on excite avec une polarisation linéaire selon l'axe x et avec une excitation biphotonique.

Plaçons nous dans le cas où on étudie une particule possédant un dipôle d'absorption et un dipôle d'émission alignés que l'on excite avec une polarisation linéaire selon l'axe x et avec une excitation biphotonique. Cette configuration fixe les coefficients C_{ij} qui sont reportés dans le tableau 2.9.

²⁶ $G^{xx}, G^{yy}, G^{zz}, G^{xy}, G^{xz}, G^{yz}$

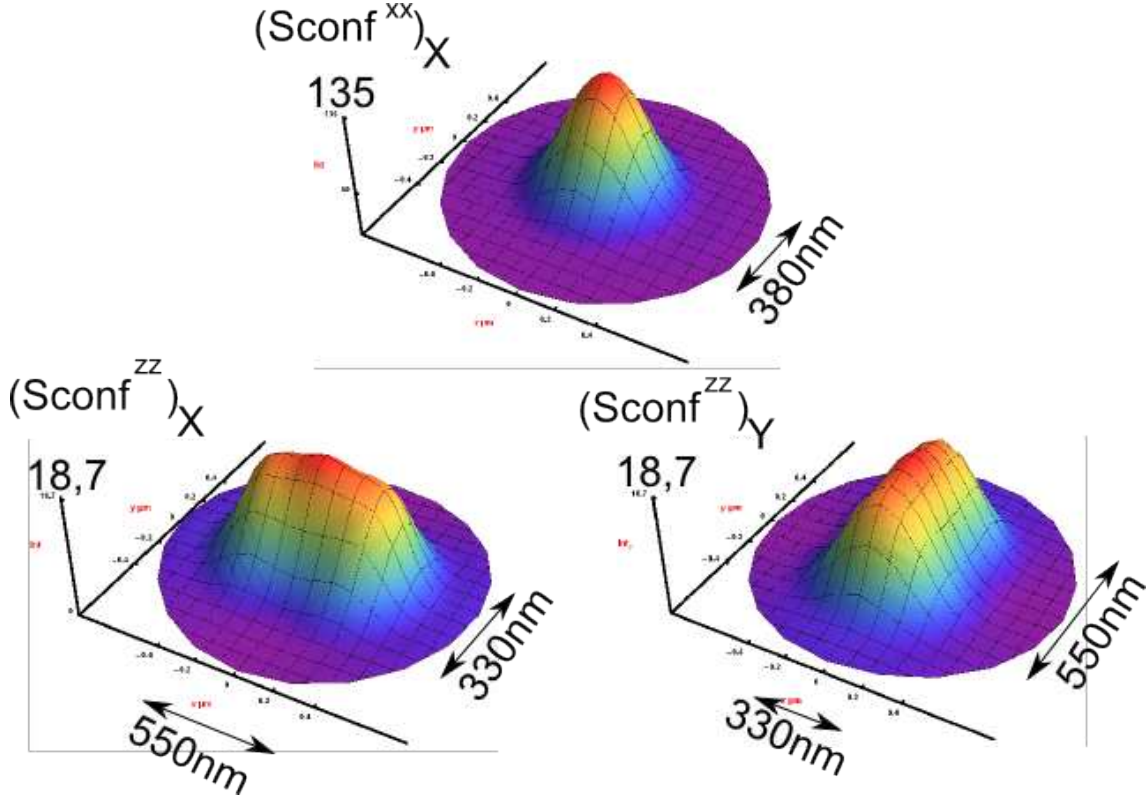


FIG. 2.10 – Profils de collection $(\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r}))_X$, $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r}))_X$, $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r}))_Y$

Dans un premier temps un polariseur dirigé selon l'axe x est placé dans la voie de détection. Ce polariseur modifie les profils de collection. Il ne faut plus considérer $\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r})$ mais $(\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r}))_X$ qui est la composante du profil de collection $\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{r})$ dont la polarisation est dirigée selon l'axe x . Par exemple²⁷ :

$$(\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r}))_X = \int_0^{\rho_t} \int_0^{2\pi} (I_0 + I_2 \cos 2\varphi) \rho \, d\rho d\varphi$$

Par raison de symétrie on a :

$$\begin{aligned} (\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r}))_X &= (\text{Sconf}^{yy}(\mathbf{r}))_Y \\ (\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{r}))_Y &= (\text{Sconf}^{yy}(\mathbf{r}))_X \\ (\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r}))_X &\rightarrow (\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{r}))_Y + \text{rotation de } \frac{\pi}{2} \end{aligned}$$

Les profils sont représentés sur la figure 2.10. L'amplitude maximale et les dimensions des profils sont reportées dans le tableau 2.11.

Notons que les profils $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_X$ et $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_Y$ ont une forte dissymétrie. La coupe du profil $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_X$ fournit une valeur de waist de $(\omega_x^{zz})_X = 550 \text{ nm}$ selon x et de seulement $(\omega_y^{zz})_X = 330 \text{ nm}$ dans la direction y . Insistons sur le fait que le profil $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_Y$ est obtenu par une rotation de 90 degrés de $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_X$ et donc $(\omega_x^{zz})_Y = 330 \text{ nm}$ et $(\omega_y^{zz})_Y = 550 \text{ nm}$.

²⁷Il s'agit en fait du terme T_{xx} de la section 1.2.3 dont le profil a été donné page 72

Terme	amplitude	waist en x en nm	waist en y en nm
$(\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{0}))_X$	135	380	380
$(\text{Sconf}^{yy}(\mathbf{0}))_X$	0,45	380	380
$(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_X$	18,7	550	330
$(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_Y$	18,7	330	550

FIG. 2.11 – Tableau regroupant les amplitudes (en unité arbitraire) et les dimensions (en nm) des profil de collection.

C'est de cette dissymétrie entre $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_X$ et $(\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_Y$ que vont naitre les différences entre les volumes d'étude lorsque l'on détecte la polarisation selon x ou y .

Nous pouvons donc calculer la pondération des 6 termes qui interviennent dans la fonction de corrélation du signal détecté selon la polarisation x (2.77).

$$\begin{aligned}
((\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{0}))_X)^2 C_{xx} &= 135 \times 135 \times \frac{20}{441} = 826,5 \\
((\text{Sconf}^{yy}(\mathbf{0}))_X)^2 C_{yy} &= 0,45 \times 0,45 \times \frac{4}{6615} = 0,0001 \\
((\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_X)^2 C_{zz} &= 18,7 \times 18,7 \times \frac{4}{6615} = 0,21 \\
(\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{0}))_X (\text{Sconf}^{yy}(\mathbf{0}))_X C_{xy} &= 135 \times 0,45 \times \frac{4}{441} = 0,55 \\
(\text{Sconf}^{xx}(\mathbf{0}))_X (\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_X C_{xz} &= 135 \times 18,7 \times \frac{4}{441} = 23 \\
(\text{Sconf}^{yy}(\mathbf{0}))_X (\text{Sconf}^{zz}(\mathbf{0}))_X C_{xy} &= 0,45 \times 18,7 \times \frac{4}{6615} = 0,05
\end{aligned}$$

On voit que le terme prépondérant est G^{xx} et qu'il faut aussi prendre en compte G^{xz} . Calculons les waists effectifs et les temps de diffusion associés à ces deux fonctions de corrélation.

$$\left(\omega_{x\text{eff}}^{xx}\right)_X = \sqrt{\frac{(\omega_x^{\text{exc}})^2 (\omega_x^{xx})^2}{(\omega_x^{\text{exc}})^2 + (\omega_x^{xx})^2}} = 386 \text{ nm} \quad \left(\omega_{y\text{eff}}^{xx}\right)_X = 268 \text{ nm}$$

et

$$\left(\omega_{x\text{eff}}^{zz}\right)_X = \sqrt{\frac{(\omega_x^{\text{exc}})^2 ((\omega_x^{zz})_X)^2}{(\omega_x^{\text{exc}})^2 + ((\omega_x^{zz})_X)^2}} = 449 \text{ nm} \quad \left(\omega_{y\text{eff}}^{zz}\right)_X = 296 \text{ nm}$$

avec, pour une excitation biphotonique à 815 nm, $\omega_x^{\text{exc}} = 360$ nm et $\omega_y^{\text{exc}} = 265$ nm. Le terme croisé xz a donc tendance à augmenter le volume d'étude.

Le terme²⁸ K' vaut dans cette configuration 393.

La fonction de corrélation normalisée d'une particule dont l'émission et/ou l'absorption sont anisotropes et en ne collectant que la polarisation selon x est finalement la somme de

²⁸ $K' = \sum_i (\text{Sconf}^{ii}(\mathbf{0}))^2 C_{ii}^0 + \sum_{i \neq j, i \leq j} \text{Sconf}^{ii}(\mathbf{0}) \text{Sconf}^{ij}(\mathbf{0}) C_{ij}^0 = 135 \times 135 \times \frac{1}{49} + 0,45 \times 0,45 \times \frac{1}{1225} + 18,7 \times 18,7 \times \frac{1}{1225} + 135 \times 0,45 \times \frac{2}{245} + 135 \times 18,7 \times \frac{2}{245} + 0,45 \times 18,7 \times \frac{1}{1225} = 393$

deux contributions :

$$G_X(\tau) = (0,94 + 2,1e^{-6\theta\tau}) G_X^{xx}(\tau) + (0,06 + 0,06e^{-6\theta\tau}) G_X^{xz}(\tau) \quad (2.78)$$

Pondération	Détection selon x	Détection selon y	Pas de polariseur
G^{xx}	827	0,009	827
G^{yy}	0,0001	11	11
G^{zz}	0,21	0,21	0,87
G^{xy}	0,55	0,55	0,55
G^{xz}	23	0,076	46,53
G^{yz}	0,05	1,52	3,1

FIG. 2.12 – Tableau regroupant l' amplitude associée à chaque G^{ij}

La même démarche peut être suivie pour obtenir la fonction de corrélation normalisée avec un polariseur placé dans la voie de détection et dirigé selon y (il faut alors utiliser les $(\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{0}))_y$) et lorsque la détection ne tient pas compte de la polarisation (il faut alors utiliser les $\text{Sconf}^{jj}(\mathbf{0})$). Les résultats sont regroupés dans le tableau 2.15 et 2.14. La fonction de corrélation d'une particule en en détectant que la polarisation selon y est finalement la somme de deux contributions :

$$G_Y(\tau) = (0,78 + 0,58e^{-6\theta\tau}) G_X^{xx}(\tau) + (0,22 + 0,081e^{-6\theta\tau}) G_X^{xz}(\tau) \quad (2.79)$$

$G_X(\tau)$ est quasiment semblable à $G(\tau)$ car le terme xz d'où provient la dissymétrie est faible par rapport à xx (seulement 2%). Au contraire, $G_Y(\tau)$ s'écarte de $G(\tau)$ car le terme croisé yz représente 15% du terme yy . Le volume d'étude sondé est plus petit ce qui conduit à un temps de diffusion plus court.

Temps diffusion	Détection selon x	Détection selon y	Pas de polariseur
G^{xx}	772 ; 536	772 ; 536	772 ; 536
G^{yy}	772 ; 536	772 ; 536	772 ; 536
G^{zz}	1023 ; 485	670 ; 646	1023 ; 646
G^{xy}	772 ; 536	772 ; 536	772 ; 536
G^{xz}	898 ; 510	721 ; 591	898 ; 591
G^{yz}	898 ; 510	721 ; 591	898 ; 591

FIG. 2.13 – Tableau regroupant le temps de diffusion radial d'une bille de 20 nm associé à chaque G^{ij} . Notons que les termes G^{xz} et G^{yz} correspondent à volumes

	selon x	Détection selon y	Pas de polariseur
K'	393	19.85	587

FIG. 2.14 – Tableau K'

Amplitude normalisée	Détection selon x	Détection selon y	Pas de polariseur
G^{xx}	2,08	0	1.4
G^{yy}	0	0,55	0.02
G^{zz}	0	0,01	0,001
G^{xy}	0,001	0,03	0.28
G^{xz}	0,06	0,003	0.07
G^{yz}	0	0.08	0.005

FIG. 2.15 – Tableau regroupant l'amplitude $/K'$ associée à chaque G^{ij}

Ces prédictions seront confrontés à l'expérience au chapitre 4 lors de l'étude de la photoluminescence de nanobille d'or dont l'absorption et l'émission sont anisotropes.

Pour résumer de tels effets sont dus au fait que la collection par un objectif de grande ouverture numérique de l'émission d'un dipôle orienté selon l'axe optique z n'est pas nulle. De plus, le profil issu de cette détection n'a pas la même dimension selon qu'il soit détecté avec un polariseur en x ou un polariseur en y . Il y a donc une dissymétrie entre le volume d'étude sondé en détectant la polarisation en x par rapport à la polarisation en y . Dans la configuration étudiée la dissymétrie reste faible.

Le modèle développé dans cette section pourrait être plus précis en tenant compte d'une part de la variation du volume selon la direction axiale²⁹ z et d'autre part en calculant les coefficients associés à $l = 4$. En outre la description des fonctions de collection du microscope par des gaussiennes est certainement à remettre en cause notamment pour les termes croisés xz et yz . Enfin, la prise en compte de $A_{\Omega}(\mathbf{r})$ notamment les lobes dont la direction de la polarisation est selon z , pourrait affiner le modèle. Ces travaux sont en cours.

2.2.12 Précision statistique en FCS

[Wohland et al., 2001] propose 3 méthodes pour mettre une barre d'erreur pour chaque point de la courbe de FCS :

1. Appliquer une formule analytique. Cette dernière est calculée avec un algorithme similaire

²⁹Cela joue finalement très peu à 2 photons car l'extension axiale du profil d'excitation est bien plus faible que l'extension axiale des profil de collection. La variation du volume selon la direction axiale doit être prise en compte si l'excitation est monophotonique et/ou si le filtrage confocal est très important/

à celui de la corrélation

2. Répéter N fois l'expérience.
3. Partitionner une seule expérience en N parties.

Les simulations faites dans [Wohland et al., 2001] montrent que ces 3 méthodes sont équivalentes avec un léger avantage pour la deuxième. Répéter N fois l'expérience demande cependant de multiplier par N le temps d'acquisition

Dans cette thèse, j'ai opté pour la troisième méthode pour sa simplicité. Les courbes de corrélation présentées ont été ajustées en pondérant chaque point par sa déviation standard. Cette courbe de corrélation est calculée avec l'expérience qui a duré un temps T , et afin d'obtenir la déviation standard, l'expérience est divisée en N expériences de durée T/N . La déviation standard est alors calculée comme suit.

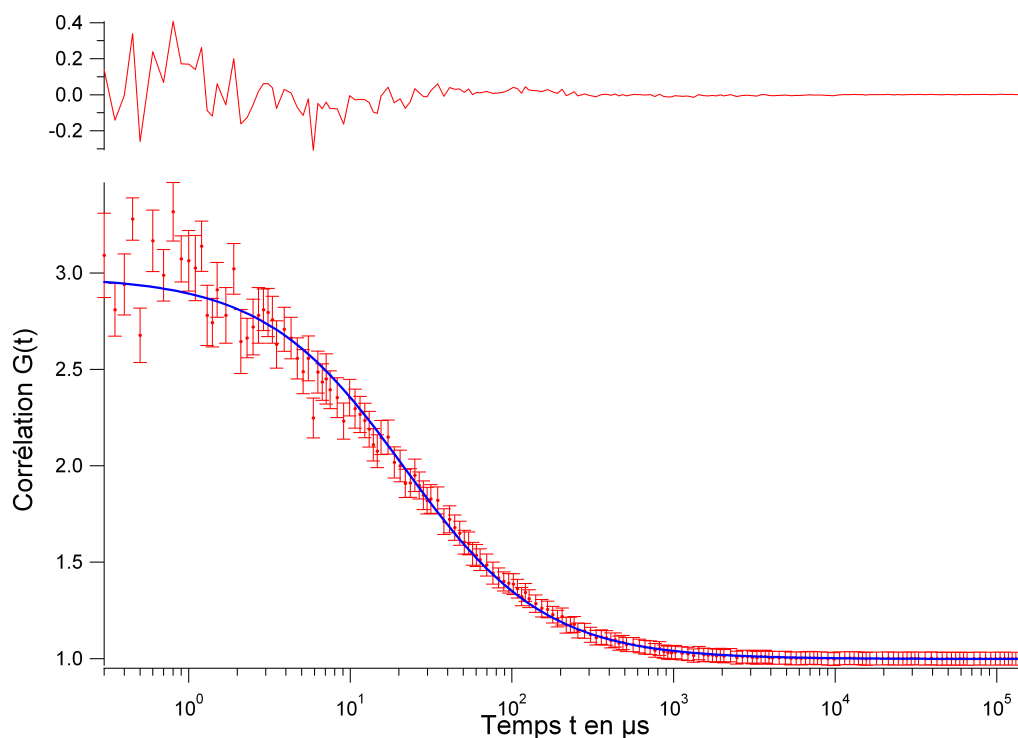


FIG. 2.16 – Courbe de corrélation de fluorescéine excité à 488 nm avec peu de puissance ($2 \mu\text{W}$) pour faire apparaître des barres d'erreur. Ces dernières sont la déviation standard calculée comme expliqué à la section 2.2.12. Dans la suite de cette thèse les courbes de corrélation sont montrées sans barre d'erreur, elles ont toutefois été ajustées en pondérant chaque point par sa déviation standard.

Tout d'abord, il ne faut considérer que le signal supérieur au niveau de signal des corrélations fortuites i.e la valeur de la corrélation à un temps infini G_∞ . C'est à dire au temps plus grand que celui caractéristique des fluctuations étudiées, typiquement la dizaine de milisecondes pour objet nanométrique diffusant dans l'eau. Ensuite, il faut prendre en compte le fait que pour

chaque sous partie n , le nombre de particules mesuré n'est pas le même (il peut y avoir une légère évaporation de la goutte de liquide par exemple), cela représente une erreur systématique qu'il ne faut pas prendre en compte dans la déviation standard. On normalise les courbes par ce nombre de molécules i.e. $G(0)$. On calcule alors la valeur moyenne de la corrélation normalisée $\bar{g}(\tau)$ sur les N sous divisions de l'expérience :

$$\bar{g}(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \frac{G_n(\tau) - G_{n,\infty}}{G_n(0) - G_{n,\infty}}$$

Puis la déviation standard :

$$\sigma(\tau)_n = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{n=1}^N \left(\frac{G_n(\tau) - G_{n,\infty}}{G_n(0) - G_{n,\infty}} - \bar{g}(\tau) \right)^2}$$

Ce calcul est valable pour un fichier de temps T/N , pour obtenir la déviation standard pour l'expérience de temps T il faut diviser par \sqrt{N} :

$$\sigma(\tau) = \frac{\sigma(\tau)_n}{\sqrt{N}}$$

Lorsque la fonction de corrélation n'est pas normalisée, la deviation standard doit être mise à l'échelle et donc multipliée par $G(0)$.

Un exemple est montré sur la figure [2.16](#).

Chapitre 3

Etude d'une sonde calcique par spectroscopie de fluctuation de fluorescence

Les techniques de spectroscopie de fluorescence sont très répandues en biophysique pour étudier l'évolution de la concentration des ions calcium. Ces derniers jouent un rôle important dans la plupart des processus physiologiques. Par exemple, le potentiel d'action d'un influx nerveux s'accompagne d'un afflux intracellulaire d'ions calcium ; observer par fluorescence cette modulation de Ca^{2+} permet de suivre et d'étudier les communications nerveuses. Quand on commence à analyser en détail ces processus, il faut un modèle biophysique de la sonde qui permet de relier la dynamique de la fluorescence à celle de la concentration calcique. Le modèle permet à la fois d'appréhender les perturbations engendrées par la sonde (tampon calcique) et de comprendre comment la réponse de la sonde filtre¹ la dynamique observée. La réponse de la sonde étant liée à la dynamique de la réaction de complexation des ions calcium et cette réaction entraînant un changement de fluorescence de la sonde, la FCS peut être un bon outil pour caractériser sa dynamique. L'enjeu de cette étude est d'évaluer l'intérêt et les limitations de la FCS sur une sonde communément employée mais relativement peu caractérisée, l'oregon green Bapta 5N [White and McGeown, 2002], .

3.1 Définition d'une sonde calcique

Les molécules dont les caractéristiques spectroscopiques telles que la luminosité, le spectre, le temps de vie, etc, sont fonction de la quantité d'ions calcium dans le milieu, sont appelées sondes calciques. Elles peuvent être synthétisées in-vitro puis injectées dans le milieu d'étude, ou alors synthétisées in-vivo par modification génétique de l'organisme en changeant son ADN

¹filtre passe-bas en général

de telle sorte qu'il synthétise des protéines dont la fluorescence est sensible aux ions Ca^{2+} . Ces sondes peuvent être caractérisées par leur :

Sensibilité c'est à dire la concentration minimum d'ions Ca^{2+} , appelée K_D , nécessaire pour changer l'état de fluorescence de la sonde. Le K_D de la sonde doit être choisi de façon à être plus grand que le niveau basal en ions Ca^{2+} de façon à ce que la sonde ne soit pas en permanence complexée. Le K_D doit être de l'ordre de la concentration calcique minimale attendue lors de la transmission nerveuse pour que cette dernière puisse être détectée.

Dynamique temporelle c'est à dire le temps τ_c nécessaire à la variation de l'état de fluorescence. Il n'est pas possible d'étudier des phénomènes entraînant des variations de concentration en ions Ca^{2+} dont le temps caractéristique est inférieur à τ_c . Un potentiel d'action dure en moyenne une fraction de ms. Un train de potentiel peut, quant à lui, durer de 10ms à quelques secondes.

Contraste c'est à dire la variation totale de fluorescence entre l'état sans ions Ca^{2+} et l'état avec ions Ca^{2+} . Un bon contraste permet d'étudier des petites variations de calcium si la concentration moyenne est dans la zone de virage de l'indicateur.

Spécificité c'est à dire la variation de fluorescence due à l'interaction avec d'autres ions que le calcium (en particulier les ions magnésium) mais aussi les perturbations apportées par les variations de pH.

Par rapport aux sondes synthétisées in-vivo (i.e. exprimées génétiquement), les sondes synthétisées in-vitro peuvent facilement être élaborées et possèdent des caractéristiques largement supérieures concernant la sensibilité (que l'on peut choisir dans une large gamme), le contraste et la résolution temporelle. Néanmoins, le domaine des sondes exprimées génétiquement est en plein essor et ces différences se réduisent. En contrepartie, l'injection de sondes dans le milieu est invasive et beaucoup moins bien contrôlée que dans le cas in-vivo, où on peut atteindre la résolution cellulaire.

Quoiqu'il en soit, la caractérisation des sondes est une étape préliminaire indispensable à leur utilisation. Sans ces informations, il n'est pas possible d'analyser de façon fiable les données obtenues avec la sonde. La situation est néanmoins compliquée par le fait que les caractéristiques de telles sondes sont *très* sensibles aux conditions d'étude (pH, force ionique, viscosité, température, ...) [Thomas et al., 2000]. Une caractérisation d'une sonde synthétisée in-vitro directement dans le milieu à étudier est donc la meilleure solution. Quant aux sondes synthétisées génétiquement in-vivo, la question ne se pose quasiment pas tant leur extraction du milieu d'étude est pénible.

3.2 Méthode de caractérisation

Les méthodes de caractérisation déjà existantes ne sont pas totalement satisfaisantes. Tout d'abord, elles nécessitent de mettre le système hors équilibre soit par des "stimulations électriques", soit par libération d'ions calcium par des flash UV ou par des augmentations brusques de température. Cette mise hors équilibre perturbe le système et donc potentiellement la caractérisation de la sonde. D'autre part, toutes ces techniques sont invasives et demandent une grande concentration en sondes dans le milieu, ce qui, à nouveau, peut le perturber par rapport à la situation d'étude. Enfin, à l'exception des flash UV [Nägerl et al., 2000], ces méthodes ont une résolution temporelle limitée.

La spectroscopie de corrélation de fluorescence présente quant à elle les caractéristiques inverses. Elle permet d'étudier les fluctuations du système qui reste à l'équilibre. Elle nécessite des concentrations très faibles en sondes, ce qui est un avantage en terme de non perturbation du milieu, mais peut aussi s'avérer être un défaut si la sonde n'était pas assez brillante pour se démarquer du niveau d'autofluorescence de la cellule. Elle peut être aussi moins toxique pour la cellule en travaillant notamment en excitation biphotonique. Enfin, elle permet d'accéder à des domaines temporels bien plus bas (1 μ s avec notre montage, jusqu'à la ns avec des montages adaptés)².

3.3 Présentation de l'Oregon green bapta 5N

La sonde étudiée ici est l'*oregon green Bapta 5N*, une des sondes de référence pour l'observation des évolutions rapides des ions calcium mais dont la dynamique n'a que peu été étudiée. Elle est composée d'un groupe fluorescent de type fluorescéine sur lequel est greffé un groupe Bapta qui complexe le calcium (voir figure 3.1). La sonde n'a pas été vraiment caractérisée photochimiquement mais elle est proche de la version précédente de ce senseur, le Calcium Green Bapta. Pour ce dernier, le contraste de brillance entre les formes complexées et non complexées par l'ion calcium est lié à un phototransfert d'électron de la partie bapta vers le fluorophore, qui annihile la fluorescence de la forme non complexée [Valeur, 2002]. Les données que nous avons obtenues sont en faveur d'un mécanisme semblable pour l'*oregon green Bapta 5 N*, comme nous le verrons plus loin.

On peut résumer l'interaction entre l'*oregon green 488 Bapta 5N* (notée désormais OGB) et le calcium par les deux actes élémentaires suivants.



²notons cependant que la FCS admet une borne supérieure quant aux caractérisations temporelles qui est le temps de diffusion de la sonde dans le volume focal. Si la sonde diffuse plus vite qu'elle ne réagit avec le calcium, alors elle ne pourra pas être caractérisée par FCS. On peut néanmoins augmenter le temps de transit de la sonde en élargissant le volume focal bien que cela ait tendance à diminuer le rapport signal sur bruit.

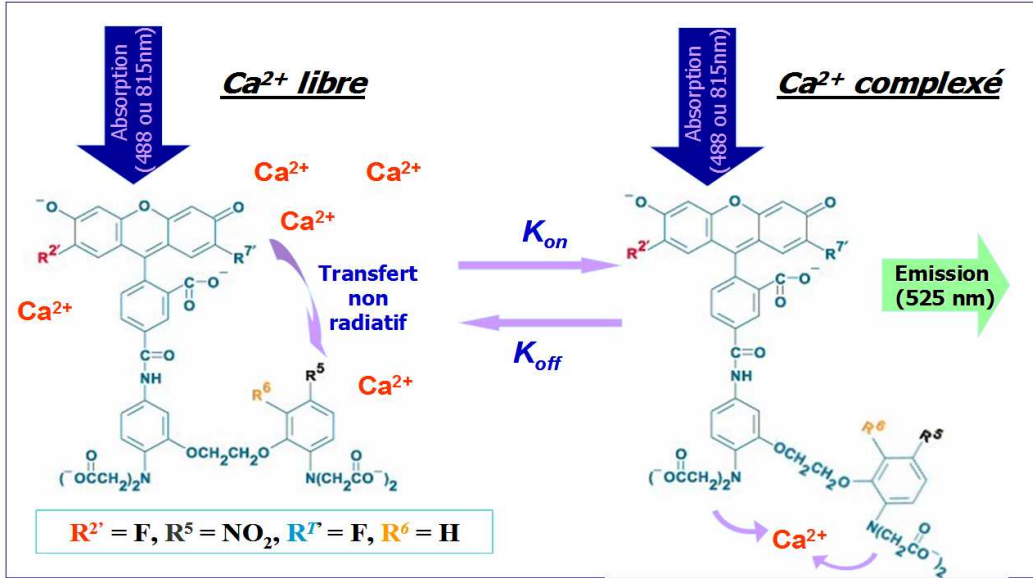


FIG. 3.1 – Formule chimique de l'oregon green Bapta 5N



où OG_L symbolise l'OGB libre i.e. non complexé avec le calcium et OG_C la forme complexée ; k_{on} et k_{off} les taux de réaction respectifs en s^{-1} .

L'équilibre entre les deux réactions est caractérisé par la constante thermodynamique de l'équilibre de *dissociation* K_D qui est donnée par la loi d'action de masse :

$$K_D = \frac{[OG_L][Ca^{2+}]}{[OG_C]} \quad (3.3)$$

La concentration en OGB est constante durant toutes les expériences. Dans un modèle simple de réaction bimoléculaire, (ce qui est réaliste pour cette sonde), $\frac{1}{k_{off}}$ i.e. le temps moyen mis par la sonde complexée pour relarguer le calcium au gré de l'agitation thermique, ne dépend pas de la concentration en calcium³. Quant à $\frac{1}{k_{on}}$ i.e. le temps moyen mis par la molécule pour complexer un ion calcium, il est inversement proportionnel à $[Ca^{2+}]$. La réaction 3.1 est d'ordre 1 (loi de Vant Hoff pour un acte élémentaire). On a donc $k_{on} = \alpha [Ca^{2+}]$ où α est une constante de proportionnalité qui est fonction, entre autres choses, de la température, de la viscosité, etc.

A l'équilibre du titrage on a, par définition, $[OG_F] = [OG_C]$. K_d devient

$$K_D = [Ca^{2+}]_{eq} \quad (3.4)$$

il correspond donc à la quantité de calcium nécessaire pour faire passer statistiquement une sonde sur deux dans l'état brillant. A l'équilibre du titrage, du fait que $[OG_F] = [OG_C]$ on a

³Il ne faut toutefois pas varier $[Ca^{2+}]$ dans un domaine trop large car il faut que la force ionique soit à peu près constante. En effet, la molécule est sous forme ionique et la force ionique joue directement sur sa conformation et donc sur les constantes k_{off} et k_{on} de la réaction.

aussi $k_{on}^{eq} = k_{off}$ ce qui permet d'écrire :

$$k_{off} = k_{on}^{eq} = \alpha [Ca^{2+}]_{eq} = \alpha K_D \quad (3.5)$$

3.4 Principe de l'expérience

En faisant l'hypothèse que la réaction chimique ne modifie pas la constante de diffusion de OGB [Widengren et al., 1999] et si l'on suppose que la sonde est la seule espèce fluorescente présente dans le milieu, la courbe de corrélation de fluorescence s'exprime comme le produit d'une partie diffusive et d'une partie liée à la réaction chimique (voir section 2.2.11.3).

$$G(\tau) = 1 + G'_{diff}(\tau)G_{chim}(\tau) \quad (3.6)$$

avec

$$G'_{diff}(\tau) = \frac{\Gamma}{\bar{N}} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{r\tau_d}}} \quad \text{et} \quad G_{chim}(\tau) = 1 + p \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_c}\right) \quad (3.7)$$

$G'_{diff}(\tau)$ est la fonction de corrélation qui correspond à un chromophore sans clignotement (voir section 2.2.11.1). On pourrait prendre pour la modéliser une forme analytique dérivée d'un modèle gaussien-gaussien (voir chapitre 2) mais les déviations expérimentales par rapport à ce modèle sont trop importantes pour par la suite analyser la partie chimique. On prend pour G_{diff} la fonction mesurée à partir des courbes de corrélation à haute concentration calcique pour lesquelles la partie chimique n'a pas de contribution dans la fenêtre temporelle étudiée. On définit aussi, le temps chimique τ_c de la réaction i.e. le temps caractéristique de retour à l'équilibre :

$$\tau_c = \frac{1}{k_{on} + k_{off}} \quad (3.8)$$

et l'amplitude p des fluctuations générées par la réaction chimique :

$$p = \frac{(b_C - b_L)^2}{(b_C p_C + b_L p_L)^2} p_C p_L \quad (3.9)$$

où b_C et b_L est la brillance effective des deux formes, produit de la brillance par l'efficacité de détection et p_C (respectivement p_L) est la probabilité de trouver la molécule dans sa forme complexée (respectivement libre) avec :

$$p_C = \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} = k_{on} \tau_c \quad \text{et} \quad p_L = 1 - p_C = k_{off} \tau_c \quad (3.10)$$

En mesurant la FCS pour plusieurs concentrations en ions calcium on peut :

- Etudier la sensibilité et le contraste de la sonde grâce au signal total collecté en fonction de la concentration en ions calcium. Il s'agit en fait d'un titrage de OG_C par fluorométrie.
- Accéder pour chaque concentration de calcium à la dynamique via la FCS et donc :
 - obtenir la valeur de k_{off} et vérifier qu'il est indépendant de la concentration en calcium
 - obtenir la valeur de k_{on} et vérifier qu'il est proportionnel à la concentration en calcium

3.5 Préparation des échantillons

Deux problèmes se posent :

1. Tout d'abord, *OGB* est une sonde très sensible (K_d est de l'ordre de la dizaine de micromoles). A ce niveau, le calcium résiduel dans de l'eau déionisée est suffisant pour faire passer la sonde dans l'état brillant, et ce de manière non contrôlée.

Nous avons effectué un titrage "en retour", en mettant initialement dans la solution un excès contrôlé de Ca^{2+} afin de rendre négligeable la quantité de calcium résiduel. L'excès est ensuite dosé par l'EDTA qui a une affinité⁴ pour le calcium encore plus forte que *OGB*.

2. Le temps de diffusion de la sonde dans l'eau à travers la zone étudiée est du même ordre de grandeur que le temps de la réaction avec le calcium (quelques dizaines de microsecondes). Nous avons choisi de ralentir la diffusion de la sonde en augmentant d'un facteur 10 la viscosité de la solution (10 *mPa.s*). L'augmentation de la viscosité a aussi comme intérêt de se rapprocher des conditions d'un milieu cellulaire. A priori, la vitesse de la réaction 3.1 est elle aussi linéaire avec la viscosité, car on est en régime diffusif et le temps de la réaction est dominé par le temps nécessaire à *OGB* et Ca^{2+} pour entrer en collision. Au contraire, la réaction 3.2 dépend de manière complexe de la viscosité. D'une part, la modification de la polarisabilité du milieu introduit par le glycérol peut modifier le temps moyen mis par *OGB* (qui est ionique) pour restituer Ca^{2+} . D'autre part, la libération de Ca^{2+} peut légèrement mettre en jeu des mouvements de reconformation moléculaire dont la dynamique est modifiée par la viscosité. L'expérience prouve que la vitesse de la réaction 3.2 est ici moins que linéaire avec la viscosité de la solution. Ainsi augmente-t-on plus le temps de diffusion que la vitesse de réaction, ce qui permet une mesure plus facile de cette dernière.

D'autre part, l'EDTA ayant aussi des propriétés acido-basiques, la solution a été tamponnée à $\text{pH} = 8$ pour ne pas observer des effets liés à la variation du pH tout en gardant une forte affinité effective pour les ions calcium et en restant dans des conditions voisines des conditions physiologiques. Enfin, l'*OGB* nécessite que la force ionique de la solution soit importante pour fonctionner comme un senseur calcique. Nous avons travaillé à une force ionique de 145mM qui est proche de la force ionique physiologique. Au final, la composition des échantillons est la suivante :

	$CaCl_2$	Tris HCl tampon pH=8	KCl	OGB	EDTA (pH 8)	Glycerol
quantité	180 μM	3 mM	144 mM	$2.10^{-8} M$	4 mM	60 % en masse

FIG. 3.2 – Tableau récapitulatif des concentrations utilisées pendant l'expérience

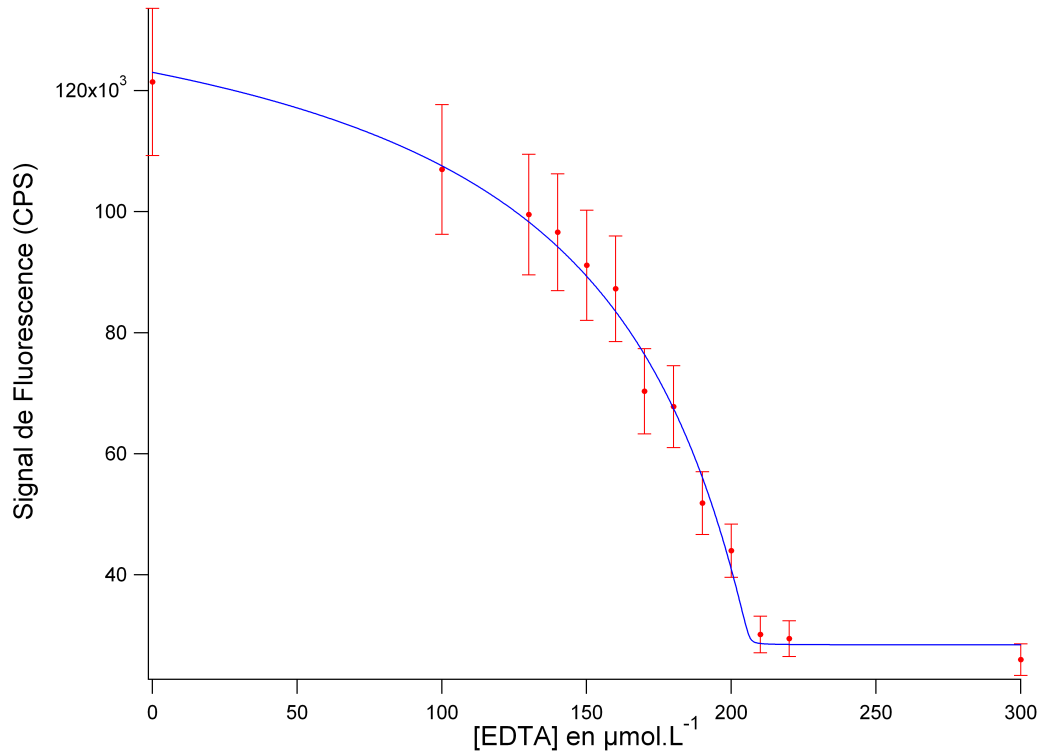


FIG. 3.3 – Courbe de titration en retour de OGB par l'EDTA.

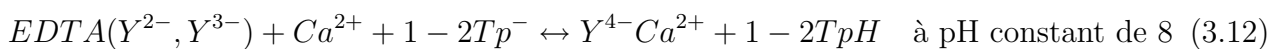
3.6 Résultats

3.6.1 Titration

La figure 3.3 présente le signal de fluorescence des échantillons étudiés en FCS en fonction de la quantité d'EDTA présente dans la solution (et donc de la quantité de Ca^{2+} restante). Ce dosage en retour est gouverné par deux équilibres chimiques :



et



où Tp^-/TpH est le couple acido-basique associé au tampon pH. La quantité de calcium est pilotée par la seconde équation car l'affinité de l'EDTA pour Ca^{2+} est largement plus grande

⁴Cette affinité est trois ordres de grandeur plus forte que celle d'OGB (cf. infra) ce qui empêche d'observer la réaction d'échange de calcium entre l'EDTA et OGB

que celle d'OGB et de plus les ions OGB sont en très faible concentration (nM) par rapport à l'EDTA et le calcium (μM). On peut donc écrire pour la concentration en Ca^{2+}

$$[\text{Ca}^{2+}] = -\frac{(c_{in} - c_{EDTA} - K_D^{EDTA}) + \sqrt{(c_{in} - c_{EDTA} - K_D^{EDTA})^2 + 4K_D^{EDTA}c_{in}}}{2} \quad (3.13)$$

où c_{in} est la concentration initiale en ions calcium, c_{EDTA} la concentration en EDTA de l'échantillon courant et K_D^{EDTA} la constante de dissociation de l'EDTA à pH 8. Si on pose $x = \frac{\text{Ca}^{2+}}{K_D}$, le signal de fluorescence F vaut :

$$F = A_{COG} \left(b_C \frac{x}{1+x} + b_L \frac{1}{1+x} \right) + B \quad (3.14)$$

où A est une constante proportionnelle à l'intensité d'excitation et au volume d'étude, c_{OG} la concentration *totale* en OGB introduite et B le signal résiduel de fluorescence et la diffusion Rayleigh de l'échantillon.

L'ajustement donne plusieurs résultats :

- $K_D = 53\mu\text{M} \pm 1$, ce qui est compatible avec la littérature⁵ où les valeurs sont comprises entre 15 et 80 μm [White and McGeown, 2002] [Haugland and Miller, 2002]
- $c_{in} = 204\mu\text{m}$. Dans la mesure où la quantité de calcium mis en excès est de 180 μm , il y a 24 μM de calcium dans l'eau doublement déionisée, ce qui, comme il est dit plus haut, est loin d'être négligeable devant K_D , d'où la nécessité de la titration en retour.
- $K_D^{EDTA} < 60\text{nM}$ ce qui est trois ordres de grandeur plus faible que celui de OGB. Cela confirme que l'EDTA a une bien plus grande affinité pour le calcium que l'OGB.
- un contraste apparent⁶ entre l'état complexé et l'état libre de 5 .

3.6.2 Courbes de FCS

La figure 3.4 montre l'évolution des courbes de FCS quand la concentration en EDTA augmente. Ces courbes ont été enregistrées avec un dispositif expérimental moins sophistiqué que celui présenté au chapitre 1. En particulier, le repositionnement de la fibre effectuant le filtrage confocal entre chaque échantillon était fait manuellement et entraînait une reproductibilité des mesures de l'ordre de 10 %. Chaque courbe correspond à une acquisition d'environ 20 secondes avec 2×10^6 photons. Il s'agit de courbes d'autocorrélation ; les 10 premières microsecondes ne sont pas présentées car elles sont affectées par l'afterpulsing du détecteur.

Jusqu'à 180 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ d'EDTA, les courbes peuvent être ajustées par le produit d'une courbe de diffusion et d'une réaction chimique. En principe, la partie diffusivité doit rester

⁵Le constructeur donne environ 53 μM dans des conditions qui ne sont pas vraiment précisées. Notons aussi que dans la même famille de molécules, il existe aussi des sondes calciques avec une sensibilité encore plus grande comme l'Oregon Green 488 Bapta 1, environ dix fois plus sensible.

⁶Ce contraste dépend fortement de la puissance excitatrice utilisée car OG_L et OG_C n'ont pas la même courbe de saturation. A très faible puissance, on retrouve le facteur 14 annoncé par le constructeur

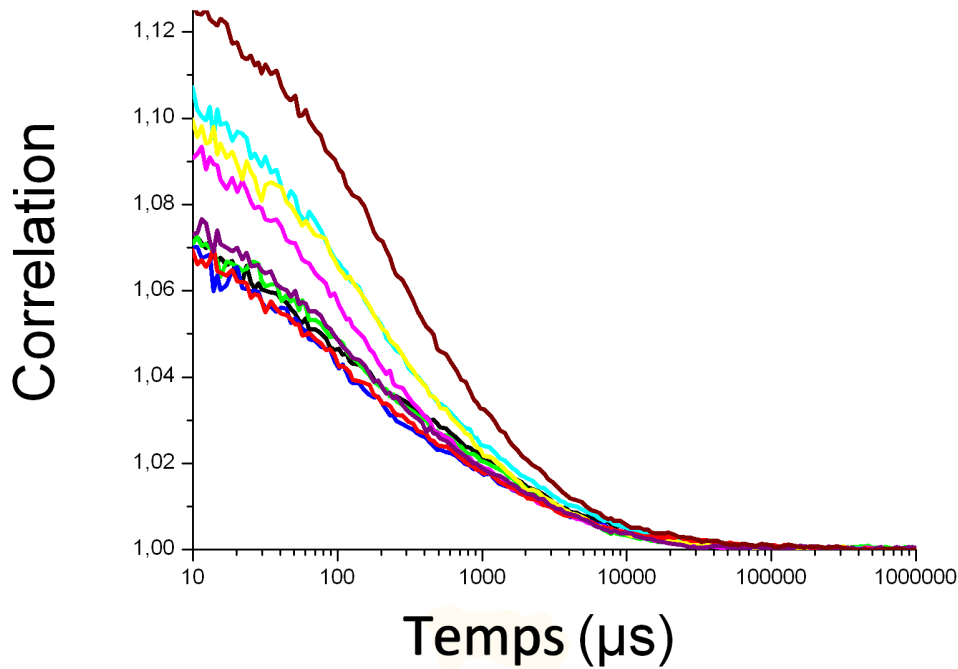


FIG. 3.4 – Courbe d'autocorrélation du signal de fluorescence de OGB excité à 488 nm avec une puissance de 25 μW pour plusieurs concentrations en EDTA à savoir 0,100,130,140,150,160,180,190 et 200 μmolL^{-1}

la même pour les différents échantillons. Cependant, en fonction du repositionnement de la fibre, le volume effectif sondé varie légèrement d'un échantillon à l'autre. Ainsi, pour chaque échantillon, les données sont ajustées en faisant varier τ_c , p et le volume effectif en conservant les autres paramètres de diffusion constants. Les courbes à 190 et 200 μM d'EDTA, donc à concentration calcique très basse, ne peuvent être ajustées qu'en introduisant la présence d'une impureté ayant un temps de diffusion similaire à celui de OGB.

L'évolution du temps chimique τ_c et de l'amplitude p avec la concentration en EDTA est présentée sur les figures 3.5 et 3.6.

Le principe de la modélisation, qui repose sur les équations 3.8 à 3.9, est le suivant : la contribution de la diffusion est extraite des expériences à forte concentration calcique. Les paramètres chimiques statiques, Kd , concentration en calcium libre en fonction de la quantité d'EDTA, et donc les concentrations relatives p_C et p_L des formes complexées et libres sont tirés du dosage. La seule quantité extractible du dosage qui n'est pas exploitée est le rapport b_C/b_L car le dosage ne peut pas différencier la contribution de la fluorescence résiduelle de l' OGB_L et celle d'éventuelles espèces minoritaires fluorescentes non sensibles au calcium. Or les courbes de FCS ne peuvent pas être ajustées correctement si on ne tient pas compte de leur contribution qui change le rapport b_C/b_L apparent. Les seules inconnues pour ajuster

l'ensemble des courbes sont la valeur de $G(0)$ qu'il faut déterminer pour chaque courbe et les valeurs de k_{off} et de b_C/b_L . Après ajustement des variations de p et τ_c en fonction du calcium libre, on peut déterminer⁷ les valeurs de b_C/b_L et k_{off} et par conséquent k_{on} .

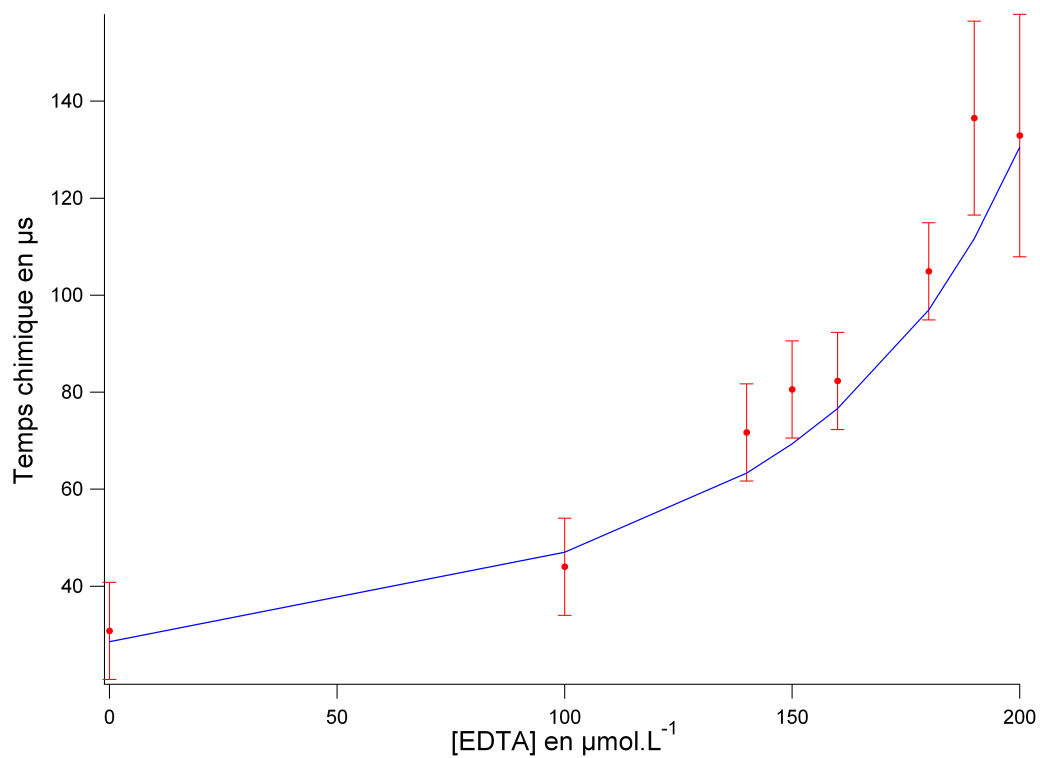
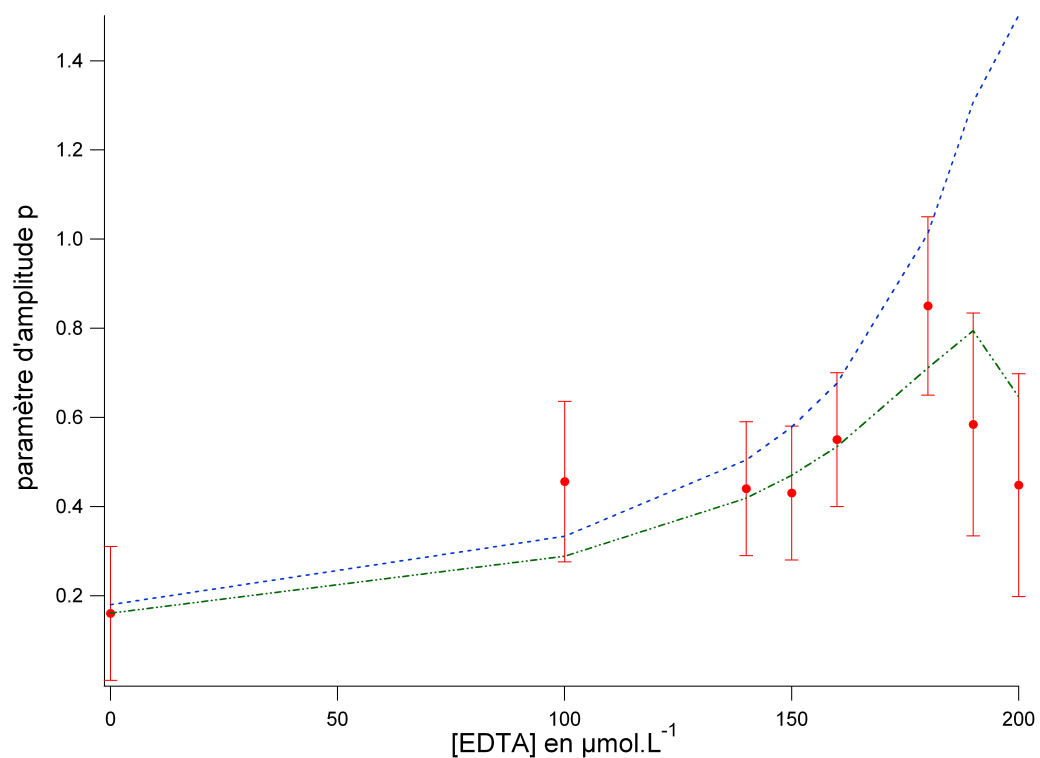
Le modèle décrit assez correctement l'évolution du temps chimique. On en déduit une valeur de $k_{off} = 6,6 \times 10^3 \pm 0,9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$. Le paramètre d'amplitude p est correctement décrit par l'équation qui ne tient pas compte d'une impureté jusqu'à $180 \mu\text{molL}^{-1}$ d'EDTA. Au-delà, le modèle s'écarte clairement des données expérimentales. Un deuxième ajustement tenant compte d'une impureté insensible au calcium et ayant une contribution purement diffusive est présenté sur la figure 3.6. Compte tenu des incertitudes, ce modèle est en accord avec l'expérience. On obtient un ratio $\frac{b_C}{b_F} = 6,8 \pm 0,9$ et une brillance relative de l'impureté de $1,25 \pm 0,25$ par rapport à OGC. L'impureté ne montre pas de dynamique autour de $10 \mu\text{s}$, comme cela est le cas sur courbe de corrélation avec $200 \mu\text{molL}^{-1}$ d'EDTA. Cela explique pourquoi le temps chimique est moins affecté par l'impureté que le facteur d'amplitude p . Des observations similaires sur le Calcium Green ont été publiés dans [Tessier et al., 1999].

3.6.3 Etude photophysique complémentaire

Le nouveau système optique permet maintenant d'une part d'étudier la corrélation jusqu'à des temps de 150 ns , et d'autre part de comparer l'amplitude des fluctuations entre deux courbes. La figure présente deux courbes complémentaires : une courbe de FCS avec beaucoup de calcium qui ne montre que la partie diffusive de l'OGB en permanence complexé, et une courbe avec beaucoup d'EDTA où seul l'OGB libre diffuse. Les deux échantillons ont la même concentration en OGB et pourtant leur amplitude (inversement proportionnelle au nombre de molécules) n'est pas la même. Ce résultat est en accord avec la présence d'une impureté qui n'est pas (ou très peu) sensible aux ions calcium dans la solution. Par ailleurs, l'impureté a un temps de diffusion très similaire à celui de OGB. Les deux molécules diffèrent seulement par leur dynamique temporelle pour les temps inférieurs à $10 \mu\text{s}$, qui correspond peut-être à un passage par l'état triplet.

L'hétérogénéité du système peut aussi être étudiée par des mesures de temps de vie. La figure 3.8 présente les mesures de déclin de fluorescence pour deux solutions de OGB de concentration

⁷En fait la courbe de diffusion n'est pas entièrement connue car la concentration calcique initiale n'est pas tout à fait assez haute pour négliger complètement la réaction chimique. Une procédure itérative est donc appliquée. On fixe le rapport b_C/b_L en prenant pour valeur initiale celle obtenue dans le titrage et pour la courbe de diffusion celle obtenue pour la plus haute concentration de calcium libre. On détermine alors par ajustement sur chaque courbe les valeurs de $G(0)$, p et τ_c . Après ajustement des variations de p et τ_c en fonction du calcium libre on peut déterminer les valeurs de b_C/b_L et k_{off} . On peut alors recalculer quelle serait la courbe de diffusion pour une valeur très élevée du calcium libre. On peut alors entamer un nouveau cycle d'ajustement. On recommence jusqu'à convergence, c'est à dire jusqu'au point où les paramètres n'évoluent plus compte tenu des incertitudes sur leur valeur.

FIG. 3.5 – Evolution du temps chimique τ_c avec la concentration d'EDTA.FIG. 3.6 – Evolution de l'amplitude chimique p avec la concentration d'EDTA. L'ajustement en bleu correspond à la formule 3.9. L'ajustement en vert prend en compte l'existence d'une impureté

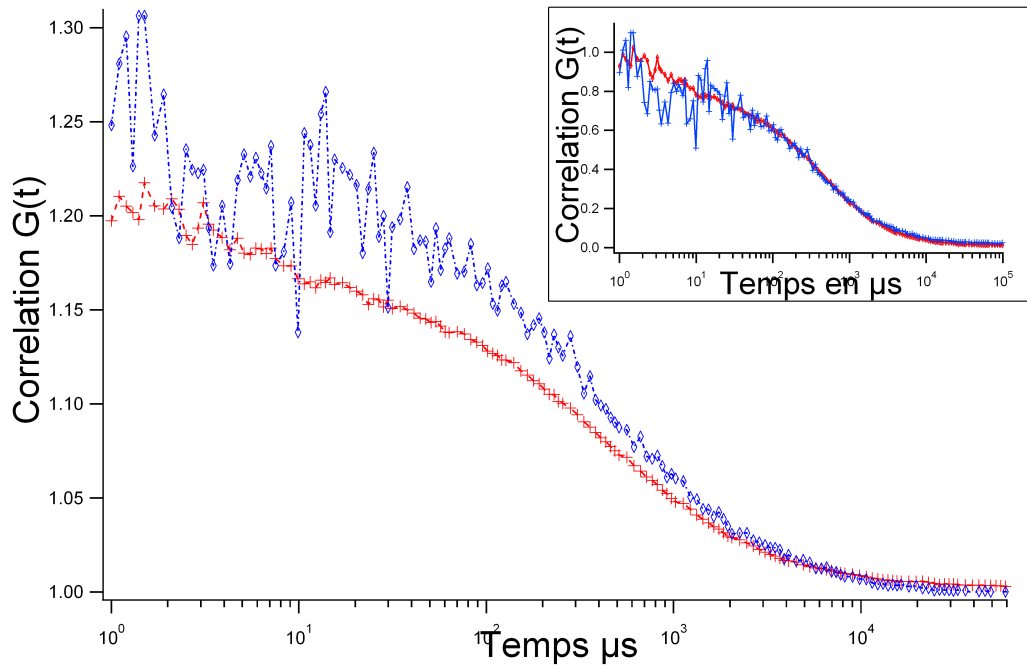


FIG. 3.7 – Courbe de corrélation de OG_C en rouge avec une forte concentration en calcium et OG_C en bleu avec une concentration en EDTA élevée (la courbe est plus bruitée car la molécule est très peu brillante). En encart, les mêmes courbes normalisées qui montrent que les deux espèces ont le même temps de diffusion

$10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ avec la même composition des échantillons. Le premier échantillon a une forte concentration de calcium, le deuxième a une concentration en EDTA élevée. L'échantillon est excité à 2 photons à 800 nm. Le taux de fluorescence est 4,2 fois plus élevé pour le niveau à forte concentration calcique que pour le niveau avec une faible concentration calcique. Ce ratio diminue avec la puissance laser (voir figure 3.9). Le déclin de fluorescence est monoexponentiel pour la sonde à forte concentration calcique avec un temps de 2,8 ns alors que le déclin de la sonde à faible concentration calcique peut être ajusté par un déclin biexponentiel avec des temps de $0,48 \pm 0,05 \text{ ns}$ et $2,1 \pm 0,15 \text{ ns}$ avec des amplitudes respectives de 83% et 17%. Nous avons aussi vérifié que l'absorption (à 1 photon) ne change pas entre le niveau haut et le niveau bas. La mesure de temps de vie de la sonde à faible concentration calcique prédit alors une diminution de la fluorescence d'un facteur 3,8. Ceci est en accord avec la valeur de 4,2 directement mesurée avec le taux de fluorescence compte tenu de l'incertitude sur la mesure du temps court qui est de l'ordre de grandeur de la réponse impulsionnelle du détecteur. Le temps de vie court correspond à OGB_f dont la fluorescence est partiellement annihilée et qui émet moins de fluorescence que OGB_c . Le temps long de la sonde à faible concentration calcique correspond à ce que l'on a appelé impureté, le temps de vie est proche de la forme complexée de OGB.

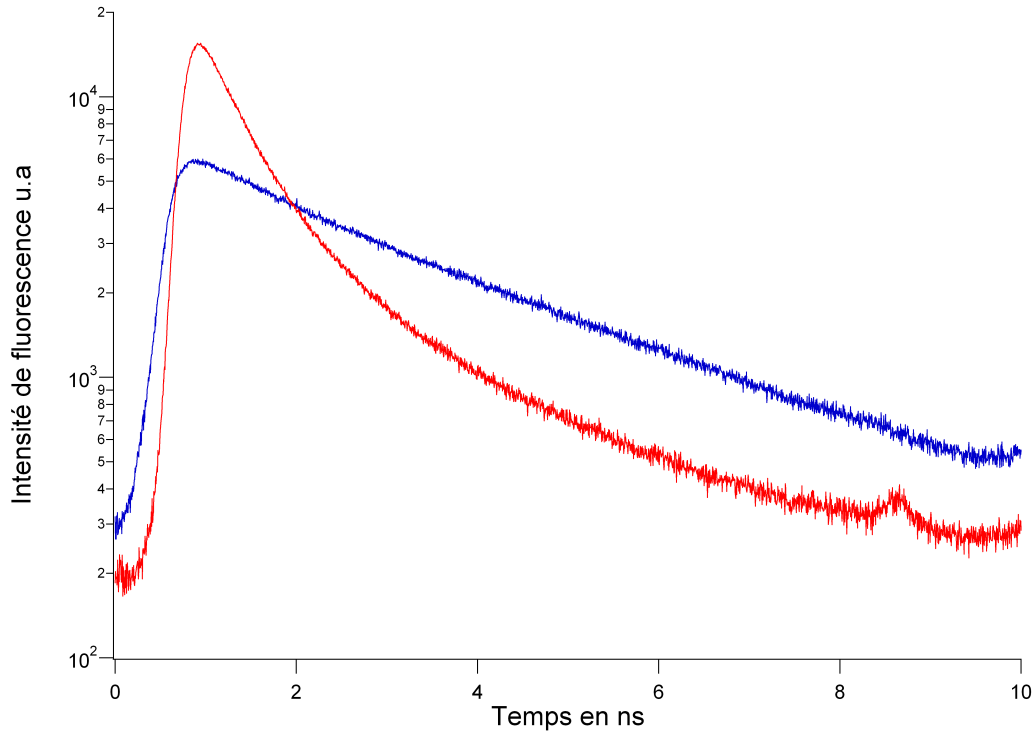


FIG. 3.8 – Courbe de déclin de fluorescence de OGB_c (en bleu) et OGB_l , (en rouge) excitée à 2 photons à 815 nm avec une puissance de 3 mW.

3.7 Conclusion

Les expériences ont mis en évidence la présence d'une impureté. Cette dernière pourrait être une forme photoisomérisée de OGB_l . Sous l'effet du laser, OGB_l devient une forme brillante et qui n'est plus sensible au calcium. La diminution du contraste de la sonde avec la puissance laser est en faveur de cette hypothèse. L'impureté pourrait être aussi un produit secondaire de la synthèse de OGB ou un conformère qui n'est plus sensible aux ions calcium. Nous avons conservé OGB à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ et un seul cycle de congélation-décongélation a peut-être créé ce produit secondaire.

Nos mesures montrent que l'on peut caractériser efficacement des sondes calciques par FCS en restant à l'équilibre, et ce malgré un fond de fluorescence important. Les résultats obtenus, en particulier k_{off} , sont en accord avec ceux obtenus par d'autres méthodes [Nägerl et al., 2000]. Il faut cependant nuancer ces conclusions. Tout d'abord, la précision des mesures obtenues ($\pm 15\%$) est moins bonne que celle qui est faite avec des flash UV. Cela est fondamentalement lié à la technique de FCS, où l'on doit se placer dans des conditions telles que l'on puisse observer les fluctuations autour de l'équilibre, et par conséquent utiliser des concentrations en sonde relativement faibles tout en étant suffisantes pour se démarquer du bruit de fond. La brillance de la sonde est donc un paramètre crucial pour permettre une mesure fiable de sa dynamique par FCS.

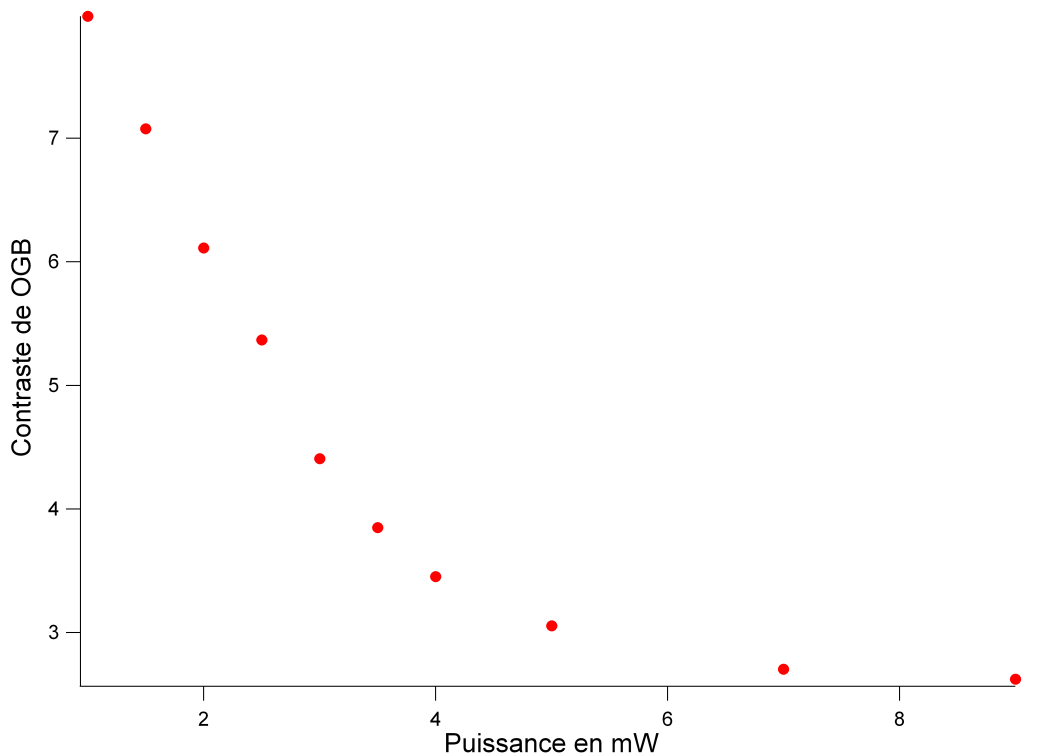


FIG. 3.9 – Evolution du rapport de la fluorescence excitée à 2 photons émise par la sonde à forte concentration calcique et celle émise par la sonde à faible concentration calcique en fonction de la puissance laser à 815 nm.

Un autre point fort de la FCS, qui peut devenir une faiblesse ici, est sa sensibilité à *toutes* les fluctuations, même liées à d'autres phénomènes que la réaction avec les ions calcium. La dynamique de la réaction peut donc se voir brouillée par d'autres phénomènes se produisant dans la même gamme temporelle (équilibre lié au pH, reconformation de la molécule, dynamique de l'état triplet, ...). Il est a priori possible de distinguer les différentes contributions en modifiant la concentration de calcium, mais cela peut s'avérer délicat dans des mesures in-vivo.

Enfin, le temps de réaction de la sonde avec le calcium doit être inférieur à son temps de diffusion dans le volume focal. Dans le milieu cellulaire, ce temps de diffusion est porté à la milliseconde. Cela est malheureusement encore trop peu pour les sondes synthétisées in-vivo, mais la situation pourrait rapidement changer car de nombreux efforts sont faits pour améliorer la dynamique de cette classe de sonde. De plus, au delà de la milliseconde, d'autres techniques viennent concurrencer la FCS comme par exemple le FRAP⁸ ou même une visualisation directe du clignotement de la sonde par une imagerie vidéo rapide.

⁸La redistribution de fluorescence après photoblanchiment (pour fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)

Chapitre 4

Etude de la photoluminescence de nanoparticules d'or

Les propriétés optiques des colloïdes de métaux nobles sont utilisées (empiriquement) depuis l'antiquité pour colorer des verres ou des vitraux. Leur couleur rouge, en particulier, provient de la résonance plasmon de nanoparticules d'or. A cet effet visible de façon macroscopique se superpose une très légère photoluminescence émanant du métal qui n'est perceptible que sous des conditions particulières.

La photoluminescence des nanoparticules d'or a un très mauvais rendement quantique (de l'ordre de 10^{-6} , au mieux égale à 0,001) mais la section efficace d'absorption est bien plus grande que celle d'un fluorophore, notamment à 2 photons. A l'échelle de la ns, qui est typique de la fluorescence, une nanoparticule d'or absorbe quasi continûment l'excitation laser mais elle ne restitue que très rarement cette énergie sous forme lumineuse. Au final, la grande absorption compense la très faible efficacité quantique et ce sont potentiellement des sondes très brillantes. La photoluminescence d'un nanobâtonnet d'or, par exemple, est 60 fois supérieure à la fluorescence d'une molécule de rhodamine excitée à 2 photons [Wang et al., 2005]. Il est intéressant d'étudier cette photoluminescence à plusieurs titres. Tout d'abord, grâce à leur cytotoxicité relativement faible, les nanoparticules peuvent être utilisées telles quelles comme nanosondes biologiques, comme cela a été montré par exemple dans [Huang et al., 2006] et [Durr et al., 2007] où des nanobâtonnets d'or sont utilisés pour visualiser des cellules cancéreuses, voire les traiter par augmentation très ciblée de la température (photothérapie). D'autre part, lorsqu'on fonctionnalise ces nanoparticules avec d'autres entités fluorescentes, la photoluminescence peut permettre de ne s'adresser qu'à la nanoparticule d'or mais peut aussi a contrario être un signal parasite qui perturbe le suivi de la fluorescence de la sonde.

Après un bref rappel des principales propriétés optiques de l'or massif, puis après avoir vu dans quelle mesure on peut transposer ces propriétés aux nanoparticules d'or, je passerai en revue les différents résultats sur la photoluminescence publiés à ce jour. Je présenterai ensuite

les résultats obtenus pendant ma thèse sur des nanoparticules sphériques en solution.

4.1 Propriétés optiques des nanoparticules d'or

4.1.1 Structure de bande

La configuration électronique de l'atome d'or Au_{79}^{197} est $[Xe] 4f^{14}5d^{10}6s^1$. Dans le solide, les atomes se répartissent en un réseau cristallin cubique faces centrées de pas de maille 0.408 nm. Le couplage des niveaux atomiques et la délocalisation périodique des électrons sur le réseau qui en découle fait apparaître, dans la zone d'énergie qui nous intéresse (le visible 1,25 – 3,2 eV), 5 bandes d'énergie d et une bande sp (hybridation de $6s^1$ et $6p^0$). La figure 4.1 montre le diagramme de la structure de bandes telle qu'elle a été calculée dans [Christensen and Seraphin, 1971]. En bleu, les 5 bandes d et en rouge la bande sp . Sur le graphe figure aussi l'énergie de Fermi (5,53 eV) i.e. l'énergie atteinte par le dernier électron si on remplit, en l'absence d'agitation thermique, les bandes d'énergie en suivant la statistique de Fermi-Dirac. Quel que soit le point de la zone de Brillouin, les bandes d sont au-dessous du niveau de Fermi et donc pleines. Par contre, au niveau des points X et L par exemple, la bande sp est en-dessous du niveau de Fermi alors qu'elle est au-dessus dans le reste de la zone de Brillouin. Elle n'est donc que partiellement pleine : sous l'action d'un champ électrique, les électrons de la bande sp peuvent être mis en mouvement, et l'on voit que l'or est donc bien un conducteur.

4.1.2 Réponse optique de l'or massif

4.1.2.1 Fonction diélectrique

L'énergie des photons (quelques eV dans le visible) provoque des transitions électroniques dans le métal. Le champ électrique met en mouvement les électrons. La constante diélectrique ϵ établit le lien entre le champ électrique appliqué et vecteur \mathbf{D} (polarisation plus champ initial). La fonction diélectrique des métaux nobles peut se décomposer, dans la région UV-visible, en deux parties : celle correspondant aux électrons quasi-libres dans la bande de conduction (bande sp) et celle correspondant aux électrons liés (dans la bande d). Par conséquent la fonction diélectrique peut s'écrire comme la somme des transitions intrabandes (i.e. transition au sein de la bande de conduction) et celles interbandes (transition de la bande d vers la bande sp).

$$\epsilon_m(\omega) = \epsilon^D(\omega) + \epsilon^{ib}(\omega) \quad (4.1)$$

Le seuil entre ces deux contributions correspond à l'énergie minimum d'un photon qui permet de réaliser une transition de la bande d vers un état libre la bande sp c'est à dire

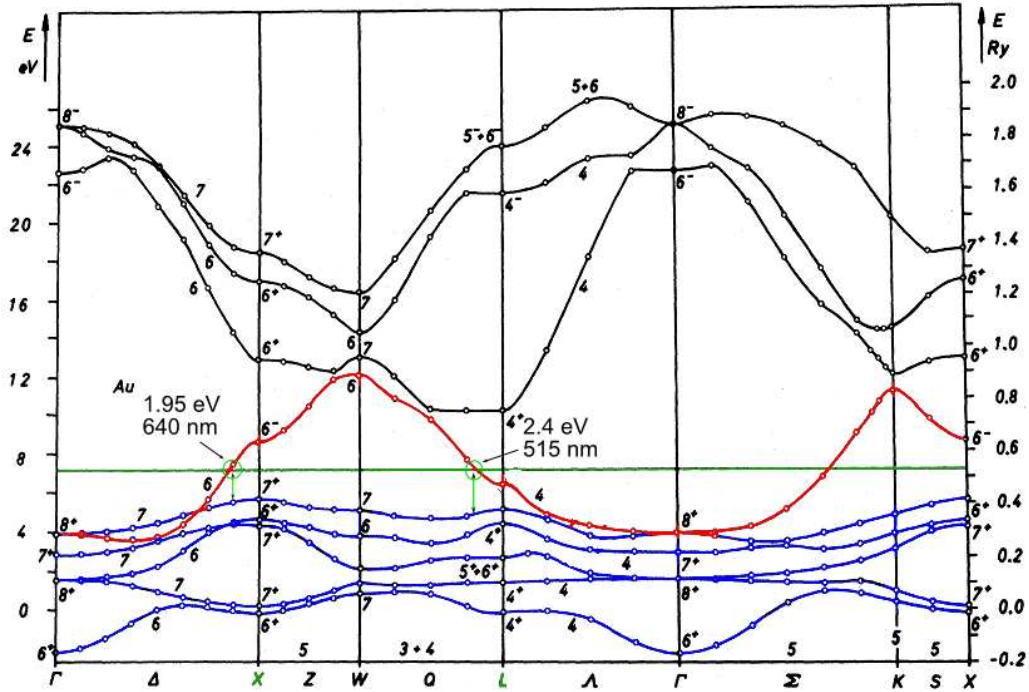


FIG. 4.1 – Diagramme de bandes de l'or calculé par [Christensen and Seraphin, 1971]. En bleu les 5 bandes d , en rouge la bande sp , en vert le niveau de Fermi de l'or. Sont aussi indiqués les deux seuils de transitions interbandes autour du point X et du point L de la zone de Brillouin

juste au dessus du niveau de Fermi. Au vu du diagramme de bandes pour l'or¹ ce seuil² [Aspnes et al., 1980] se situe autour de $E_{IB} = 2.4 \text{ eV}$ ($\lambda_{IB} = 515 \text{ nm}$) (près du point L de la zone de Brillouin). Cette grande modification de la fonction diélectrique pour les longueurs d'ondes inférieures à $\sim 515 \text{ nm}$ explique la couleur jaune-orange de l'or à l'état massif.

Transitions intrabandes : modèle de Drude

Les transitions intrabandes mettent en jeu des électrons quasi-libres de la bande de conduction. Le modèle phénoménologique introduit par Drude en 1900 [Drude, 1900] s'applique à cette situation. Il consiste à utiliser le principe fondamental de la dynamique à un électron soumis à deux forces : la force d'un champ électrique sinusoïdal, et une force visqueuse traduisant phénoménologiquement l'interaction de l'électron libre avec le reste du réseau cristallin (diffusion électron-électron et électron-phonon). On obtient :

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma)}$$

où γ est le coefficient phénoménologique de collision et ω_p la fréquence plasma de l'ordre de 9 eV (140 nm).

¹pour l'argent ce seuil se situe à $3,9 \text{ eV}$ soit $\lambda_{IB} = 318 \text{ nm}$

²La transition vers 1.9 eV près du point X est de faible intensité.

Transitions interbandes

Contrairement aux transitions intrabandes, les transitions interbandes ne peuvent pas être décrites via un modèle classique car les électrons mis en jeu (ils sont majoritaires par rapport aux électrons quasi-libres) sont fortement liés aux ions du réseau³. Pour obtenir une expression de ϵ^{ib} il faut prendre en compte toutes les transitions possibles entre un état occupé de la bande d vers un état libre de la bande sp . Une méthode consiste à calculer tout d'abord la partie imaginaire ϵ_2^{ib} de $\epsilon^{ib} = \epsilon_1^{ib} + i\epsilon_2^{ib}$ et à utiliser ensuite une relation de type Kramers-Kronig. Un tel calcul a été développé par Lindhard [Rosei, 1974]. On peut écrire la partie imaginaire de la fonction diélectrique des transitions interbandes comme :

$$\epsilon_2^{ib}(\omega) = \frac{K}{\omega} \sum_{i,j} \int_{ZB} d\mathbf{k} |M_{i \rightarrow j}(\mathbf{k})|^2 [f_i(\mathbf{k}) (1 - f_j(\mathbf{k}))] \delta[\omega_{ij}(\mathbf{k}) - \omega] \quad (4.2)$$

qui fait apparaître trois termes :

- $|M_{i \rightarrow j}(\mathbf{k})|$ est l'élément de matrice entre les états i et k (il s'agit ici de d vers sp), que l'on pourrait assimiler à une densité du moment dipolaire. Pour un solide on peut considérer qu'il dépend peu de \mathbf{k} .
- $\delta[\omega_{ij}(\mathbf{k}) - \omega]$ qui traduit la conservation de l'énergie. Le vecteur d'onde du photon est négligeable devant celui de l'électron mis en jeu dans la transition. La transition se fait donc à vecteur d'onde \mathbf{k} constant entre deux niveaux de même pseudovecteur d'onde. Sur le diagramme de bande la transition optique est verticale.
- $[f_i(\mathbf{k}) (1 - f_j(\mathbf{k}))]$ où $f_n(\mathbf{k})$ est le facteur d'occupation de l'état n qui dans le cas le plus simple suit la statistique de Fermi-Dirac. L'intensité de la transition interbande dépend donc fortement de la probabilité d'avoir un état occupé dans la bande d et un état vide dans la bande sp avec le même vecteur d'onde \mathbf{k} .

L'intégration se fait sur l'ensemble de la zone de Brillouin (ZB). Deux phénomènes permettent d'expliquer la brusque variation de $\epsilon_2^{ib}(\omega)$ (voir figure 4.2) au voisinage de l'énergie de transition interbande E^{IB} . La bande d étant relativement plate, les états accessibles à partir de la bande d dans la bande sp sont quasiment tous sous l'énergie de Fermi pour $\omega < \omega^{IB}$ et par contre au dessus de l'énergie de Fermi dès que $\omega > \omega^{IB}$. Le facteur $[f_i(\mathbf{k}) (1 - f_j(\mathbf{k}))]$ a donc une variation brusque autour de $\omega \simeq \omega^{IB}$. De plus c'est autour de cette fréquence que la densité d'états contribuant à la transition, i.e la région autour des point X et L de la zone de Brillouin, est importante (résonance de van Hove)

La fonction diélectrique ϵ_m et donc l'indice optique \tilde{n} ($\epsilon = \tilde{n}^2$) de l'or a fait l'objet de nombreuses mesures. La figure 4.2 montre les résultats obtenus par Johnson et Christy [Johnson and Christy, 1972].

³Les transitions interbandes entre la bande sp et une bande de conduction vide de plus haute énergie sont très faibles [Rosei, 1974]

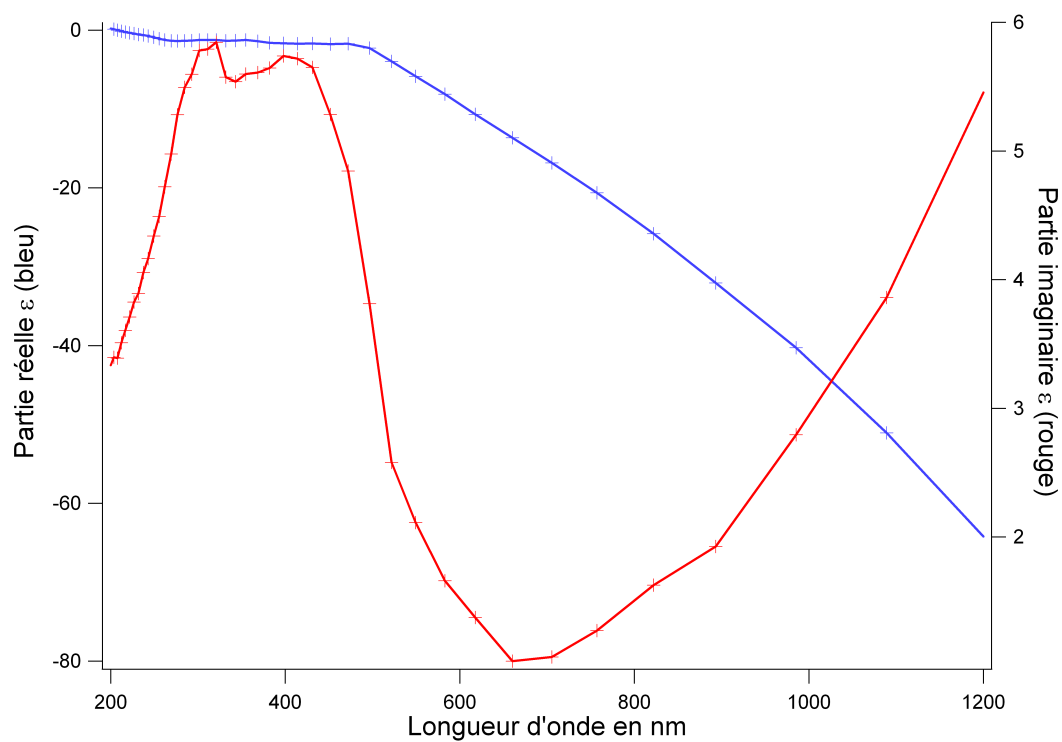


FIG. 4.2 – Valeurs expérimentales [Johnson and Christy, 1972] de l'indice optique et de la constante diélectrique de l'or en fonction de la longueur d'onde utilisée. En bleu la partie réelle, en rouge la partie imaginaire.

4.1.2.2 La photoluminescence des métaux nobles

La photoluminescence de métaux nobles a été observée pour la première fois par Mooradian en 1969 [Mooradian, 1969]. Les échantillons massifs d'or et de cuivre, excités par les différentes raies d'un laser argon ou d'une lampe à mercure produisent une très faible luminescence (efficacité 10^{-10}) avec un spectre très large (488 nm à 800 nm dans le cas d'une excitation par la raie à 488 nm du laser argon).

Le phénomène de photoluminescence⁴ des métaux nobles n'est pas encore parfaitement compris on peut néanmoins avancer le mécanisme suivant (voir figure 4.3).

1. L'excitation par des photons d'énergie $\hbar\omega_1$ porte les électrons des bandes d'énergie d vers les zones de la bande sp au dessus du niveau de Fermi (donc libre) pour tous les points de la zone de Brillouin dont la séparation en énergie entre la bande d et la bande sp vaut $\hbar\omega_1$.
2. Le trou laissé dans la bande d n'a pas initialement d'électron situé à sa verticale dans la bande de conduction avec lequel il peut se recombinaison (la bande sp pour le vecteur d'onde considéré est au dessus du niveau de Fermi, elle est donc vide, quant à l'électron qui vient d'être porté dans la bande de conduction, il relaxe très rapidement). Le trou diffuse donc le long de la bande d au gré des collisions avec les électrons et les phonons. Ce processus est très rapide, de l'ordre de la dizaine de fs.
3. Le trou diffuse jusqu'à arriver en dessous de l'endroit où la bande sp coupe le niveau de Fermi. Par définition les états de la bande sp situés à la verticale du trou sont alors peuplés. Le trou se recombine alors avec un de ces électrons de la bande sp . Quant à l'électron initialement excité dans la bande de conduction, il diffuse jusqu'à retomber au niveau de l'énergie de Fermi.

La recombinaison mentionnée au point 3 n'est qu'extrêmement rarement radiative pour un solide. L'efficacité du processus de photoluminescence pour un solide n'est que de 10^{-10} . Avec un si faible rendement quantique, l'utilisation de cette photoluminescence paraît restreinte. En 1969 Mooradian voit en cette photoluminescence un outil pour étudier la structure des bandes des métaux nobles. En 1986, lorsque Boyd *et al.* [Boyd et al., 1986] étudient plus exhaustivement le phénomène la photoluminescence est considérée comme un bruit de fond dans les expériences de SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) et de SHG sur des surfaces rugueuses. En 1998, Wilcoxon *et al.* [Wilcoxon et al., 1998] sont les premiers à publier sur la photoluminescence de nanoobjets métalliques (billes d'or de 5 nm excitées dans l'UV). La photoluminescence a un rendement quantique de l'ordre de (10^{-6}) soit 4 ordres de grandeur supérieur à celui observée sur les surfaces. En 2002, [Link et al., 2002] mesure un rendement quantique de $\sim 10^{-3}$ sur des nanobâtonnets d'or. Avec un tel rendement quantique associé à

⁴On s'intéresse ici à la photoluminescence émanant d'une transition interbande.

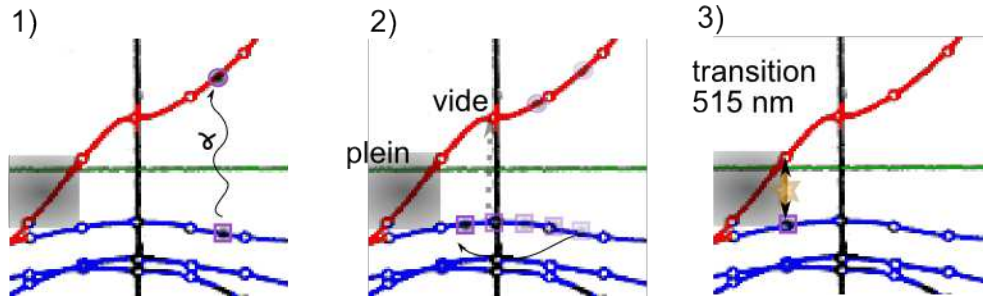


FIG. 4.3 – Schéma du mécanisme de la photoluminescence. En 1) un électron passe sous l'effet de l'excitation lumineuse d'un niveau de la bande d vers un niveau vide de la bande sp (quasi verticalement). Il laisse un trou dans la bande d . En 2) ce dernier diffuse dans la bande de valence, il n'a qu'une très faible probabilité de se recombiner avec un électron de la bande sp car la bande sp , à ce niveau, est vide puisqu'elle est au dessus du niveau de Fermi. En 3) le trou diffuse jusqu'à atteindre l'endroit où la bande sp coupe le niveau de Fermi (à l'agitation thermique près), il a alors une probabilité accrue de se recombiner avec un électron de conduction. Cette recombinaison est la plupart du temps non radiative.

une section efficace bien plus grande qu'un fluorophore la photoluminescence pourrait servir à suivre le mouvement de nanoparticules métalliques utilisées comme sondes.

Voyons pourquoi une nanoparticule permet d'obtenir un rendement quantique de photoluminescence jusqu'à 10^7 fois plus important que celle observée à l'état massif.

4.1.3 Modification apportée par la taille nanométrique des objets étudiés

4.1.3.1 la nanoparticule

La nanoparticule se trouve à la frontière entre l'atome quasi ponctuel, où les niveaux d'énergie sont discrets, et le solide, où la délocalisation des électrons conduit à l'existence de bandes d'énergie. Peut-on considérer la nanoparticule comme un morceau submicrométrique de massif? On peut facilement évaluer le nombre d'atomes N dans une nanoparticule sphérique; en effet, l'ordre du réseau permet d'utiliser la densité, grandeur macroscopique, pour obtenir :

$$N \simeq \frac{4}{3}\pi R^3 \frac{d}{M_0}$$

où d est la masse volumique de l'or ($19,3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$), M_0 la masse d'un atome et R_{nm} le rayon de la nanoparticule en nm. On obtient

$$N \simeq 250 R_{nm}^3$$

Pour une particule de 20 nm il y a donc environ 2 000 000 atomes dont une fraction non négligeable se trouve à la surface.

En fait, dès 3 nm de diamètre (environ 6 750 atomes), les nanoparticules d'or possèdent déjà une structure cristallographique très proche du métal massif, comme cela est montré par des études de diffraction X dans [Petkov et al., 2005].

4.1.3.2 Effet de peau

Le champ électrique optique oscille très vite (centaine de THz), il ne pénètre que très peu dans des objets métalliques. Un film métallique n'est excité qu'en surface. Quant à une nanoparticule si la profondeur de peau est inférieure au rayon de la bille seul le pourtour de la bille sera excité. La profondeur de pénétration δ , ou profondeur de peau est donnée par :

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi\kappa} \quad (4.3)$$

où κ est la partie imaginaire de l'indice de réfraction. Pour une excitation à 815 nm (où $\kappa \simeq 5$) la profondeur de peau est de 25 nm. L'or absorbe relativement peu à ces longueurs d'onde car la contribution intrabande est quasi nulle. On utilise d'ailleurs des miroirs à ces longueurs d'ondes.

Par conséquent, tant que l'on étudie des particules dont le diamètre est inférieur à 50 nm (ce qui est le cas dans ces travaux de thèse), la profondeur de peau ne pose pas de problème.

4.1.4 Echauffement de la bille due à l'excitation laser

Différentes études tant théorique [Palpant et al., 2008] que expérimentales [Hu and Hartland, 2002] [Roper et al., 2007] montrent qu'un nanoobjet métallique soumis à une impulsion brève (100 fs à 10 ps) et intense voit sa température brusquement augmenter puis décroître à cause des échanges d'énergies avec le milieu extérieur⁵ de façon multiexponentielle avec un temps de l'ordre de 120 ps pour des billes de 20 nm. La température maximale atteinte juste après l'impulsion laser peut être estimée en multipliant l'énergie reçue de l'excitation lumineuse par la capacité thermique de la nanobille (prise égale à celle du massif [Takahashi and Akiyama, 1986] soit $2.492 \text{ Jcm}^{-3}\text{K}^{-1}$). L'élévation de température est de l'ordre de la centaine de degrés.

D'autre part, une augmentation de la température de la surface change notablement la répartition des ligands sur la bille comme le montre les expériences de [Hardy and Richardson, 2008] et les calculs de [Ghorai and Glotzer, 2007]. A contrario à température ambiante les ligands ne se déplacent quasiment pas [Ionita et al., 2008] [Ionita et al., 2005].

4.1.4.1 Changement de la fonction diélectrique

Pour les petites nanoparticules dont le diamètre est très inférieur au libre parcours moyen des électrons ($L_{eff} = 42 \text{ nm}$ pour l'or à température ambiante), les effets quantiques jouent un

⁵Au vu de l'efficacité quantique de la photoluminescence les pertes d'énergies par voie radiatives peuvent être négligées

rôle important. Une approche phénoménologique consiste à modifier la constante diélectrique intrabande (celle obtenue avec le modèle de Drude) en ajoutant au terme de collision γ un nouveau terme qui rend compte des collisions des électrons avec la surface : $A_L \frac{v_F}{d}$ où A_L est un coefficient proche de 1, v_F la vitesse des électrons au niveau de Fermi, et d le diamètre de la bille. L'écart avec la fonction diélectrique du métal massif reste néanmoins faible.

Pour de très petites nanoparticules (de diamètres inférieurs à 5 nm), il faut aussi prendre en compte l'effet appelé "spill-out" qui traduit le fait que la fonction d'onde des électrons s'étend plus loin que le rayon de la nanoparticule. D'autre part, pour des particules aussi petites le confinement des électrons conduit à des modifications de la densité d'états par rapport au matériau massif. La localisation de l'électron dans la particule nanométrique lui accorde un plus grand choix en terme de vecteur d'ondes (localisation et vecteur d'onde étant reliés par une relation de type Heisenberg). Les règles de conservation du vecteur d'onde sont alors moins strictes ce qui modifie le diagramme de bande. Par conséquent, ces particules peuvent avoir une fonction diélectrique assez différente du métal massif.

Les plus petites nanoparticules étudiées dans ma thèse ont un diamètre de 10 nm. On peut considérer que la fonction diélectrique des particules étudiées est très proche de celle du métal massif et que le diagramme de bandes présenté sur la figure 4.1 s'applique dans ce cas.

4.1.4.2 La résonance plasmon de surface

La taille de la nanoparticule est largement inférieure à la longueur d'onde de la lumière excitatrice. Le champ électrique est donc quasi-uniforme dans la nanoparticule et les électrons répondent collectivement à l'excitation lumineuse. Il s'agit donc d'une excitation qui n'entre pas dans le cadre du modèle des électrons indépendants mais qui au contraire conduit à un état avec une forte corrélation entre les électrons. Cet effet donne naissance à la résonance plasmon de surface (RPS). A la RPS le champ local \mathbf{E}_l au sein de la nanoparticule est supérieur au champ initialement appliqué \mathbf{E}_0 ($f_l = \frac{E_l}{E_0} > 1$). On parle d'exaltation. Selon la géométrie de la nanoparticule on peut obtenir expérimentalement à la RPS des facteurs d'exaltation supérieurs à 20 [Schuck et al., 2005][Sonnichsen et al., 2002]. Dans le cas d'une sphère, en résolvant l'équation de Laplace pour une sphère métallique de fonction diélectrique ϵ_m^{nano} dans un milieu infini de fonction diélectrique ϵ_d , on obtient :

$$f_l = \frac{3\epsilon_d}{\epsilon_m^{\text{nano}} + 2\epsilon_d} \quad (4.4)$$

L'exaltation présente une résonance lorsque $|\epsilon_m^{\text{nano}} + 2\epsilon_d|$ est minimum.

On peut donner une image classique de la RPS. Le champ électrique, proche de la pulsation plasmon ω_{RPS} , polarise les électrons de conduction de la nanoparticule. Le déplacement de ce nuage électronique par rapport aux ions du réseau crée un champ électrique qui s'oppose au champ incident : le champ dépolarisant. S'en suit une oscillation du nuage électronique à la

pulsation ω_{RPS} qui s'amortit très rapidement (une dizaine de femtosecondes) par thermalisation des électrons (majoritaire) et par voie radiative (quelques %) [Sonnichsen et al., 2002].

L'intensité, la position spectrale et la largeur spectrale de la résonance dépendent de plusieurs facteurs.

- La nature du métal. Cela est dû au fait que la fonction diélectrique de l'or et de l'argent, par exemple, ont certes le même comportement mais pas les mêmes valeurs.
- L'indice optique du milieu extérieur. Comme on peut le voir sur la formule 4.4, lorsque l'indice optique du milieu extérieur augmente, la longueur d'onde associée au plasmon se décale vers le rouge. Cela éloigne la fréquence plasmon de la zone des transitions interbandes (voir figure 4.2), ce qui conduit à un amortissement plus faible du plasmon. Par conséquent, en augmentant l'indice du milieu extérieur, on augmente l'amplitude de la résonance plasmon et on diminue sa largeur.
- La taille de la nanoparticule, avec de façon générale, un décalage vers le bleu de la longueur d'onde du plasmon lorsque la taille du nanoobjet diminue.
- La forme de la particule. La formule 4.4 a été établie dans le cas d'une sphère. Les nanobâtonnets présentent par exemple deux plasmons. Celui correspondant à la direction longitudinale est le plus intense. Il est plus intense, plus étroit spectralement et plus rouge que celui d'une nanobille de taille équivalente[Sonnichsen et al., 2002].

L'exaltation du champ liée à la résonance plasmon joue deux rôles dans l'augmentation de la photoluminescence des nanoparticules. D'une part, la particule absorbe plus de photons lorsqu'elle est excitée à la longueur d'onde du plasmon⁶. D'autre part, l'exaltation du champ augmente aussi l'émission de la photoluminescence car les modes du champ associés au plasmon jouent le rôle d'adaptation d'impédance entre le champ électrique à l'intérieur de la nanoparticule et les modes du champ à l'extérieur dans le milieu d'étude.

4.1.4.3 Réponse optique non linéaire des nanoparticules

Les nanoparticules d'or peuvent aussi présenter des effets non linéaires intéressants comme par exemple la Génération de Seconde Harmonique (SHG) [Nappa et al., 2004] [?], voire une génération de 3ème harmonique (THG) pour les particules sphériques où pour des raisons de symétrie la SHG est très faible [Lippitz et al., 2005]. On peut aussi citer des cas de mélange à 4 ondes réalisés avec des nanobâtonnets [Jung et al., 2009]. Notons que ces nanoparticules ont aussi une section efficace d'absorption à 2 photons très importante, que nous exploiterons par la suite.

⁶Cela n'est pas possible avec des nanobilles excitée à 1 photon car la longueur d'onde plasmon se situe vers 530 nm et les photons avec une telle longueur d'onde n'ont pas l'énergie suffisante pour créer une transition interbande ($\lambda_{IB} \simeq 515$ nm)

4.1.4.4 Paramètres dont l'incidence n'est pas bien connue

Deux effets sont aussi à prendre en compte bien qu'il est difficile, a priori, de prédire précisément leurs conséquences sur la photoluminescence.

- Les défauts locaux de la cristallinité du nanoobjet conduisent à une modification locale de la densité d'états. Même si ces sites ne représentent qu'une fraction infime des millions d'atomes qui composent le nanoobjet, ils peuvent jouer un rôle particulier.
- Les nanoobjets sont entourés de ligands. Ces molécules ont pour but d'éviter l'agrégation des nanoobjets lorsqu'ils sont en solution. Lors de leur synthèse les nanoparticules métalliques sont recouvertes de ces molécules. Ces dernières peuvent être liées au nanoobjet par des liaisons électrostatiques comme cela est le cas avec des molécules de citrate [Turkevich et al., 1951] ou par des liaisons covalentes en particulier avec des molécules possédant un groupe thiol ($-SH$) [Brust et al., 1994] ou amine ($-NH_2$). Les atomes de soufre et d'azote forment, en effet, une liaison de type covalente avec les atomes d'or (ou d'argent) à la surface du nanoobjet. Ces molécules modifient la nanoparticule. Elles modifient d'abord l'indice optique local ce qui introduit entre en autre un décalage spectral et une augmentation de l'intensité de la résonance plasmon (voir formule 4.4). Cet effet reste cependant assez faible si on le moyenne sur un ensemble de billes (voir figure 5.3). Les ligands modifient surtout l'état de surface de la nanoparticule. La densité d'états devient très différente pour les atomes d'or en surface [Caruso et al., 2006]. Par conséquent les transitions interbandes et intrabandes qui affectent les atomes de surface peuvent être très différentes de celles qui affectent les atomes de volume. De nouveaux canaux radiatifs et non radiatifs peuvent apparaître qui favorisent ou annihilent la photoluminescence.

4.2 Conclusion

En terme de diagramme de bandes on peut considérer que la nanoparticule et le métal massif sont semblables à l'exception des atomes sur la surface de la nanoparticule. La modification majeure apportée par la nanoparticule est l'apparition d'une résonance plasmon de surface et de l'exaltation du champ électrique associé. Les mécanismes exacts qui gouvernent l'efficacité quantique du processus de photoluminescence d'une nanoparticule métallique ne sont cependant pas clairs. Quel est le rôle et l'importance du plasmon de surface dans l'exaltation de la photoluminescence ? En quoi les ligands présents à la surface d'une nanobille d'or modifient-ils l'émission de la photoluminescence ? *In fine*, cette photoluminescence peut elle être utilisée pour repérer des nanostructures d'or lors de leur caractérisation en solution ? Je vais essayer de répondre à ces questions d'une part en reprenant les principaux résultats publiés dans la littérature et ensuite en présentant les résultats de mes travaux de thèse sur la photoluminescence de nanobilles d'or en solution à l'échelle de la particule unique.

bliés sur la photoluminescence des métaux nobles

4.3.1 Points de caractérisation expérimentale

Je passe maintenant en revue les différents paramètres de la photoluminescence qu'on peut caractériser expérimentalement.

Durée du phénomène

Les processus de thermalisation des trous ou des électrons lorsqu'ils diffusent le long des bandes de conduction sont connus pour être très rapides (une dizaine de fs). [Varnavski et al., 2005] montre que la durée de cycle de la photoluminescence est inférieure à 50 fs. [Kohei et al., 2005] voient cependant un déclin de l'ordre de 1 ns sur des nanorods. L'interprétation qui est donnée du phénomène met en jeu des transitions des trous ayant réussi à diffuser jusqu'à la surface de Fermi sans se recombinaison. Arrivés là, ils ne trouvent plus de partenaires lors des collisions pour gagner encore de l'énergie et le temps de cycle s'allonge considérablement.

Lien entre taille et luminescence

L'enjeu est de savoir si la luminescence dépend du cube du rayon (effet de volume lié à l'excitation et à l'augmentation du nombre d'états accessibles), du carré du rayon (effet de surface), ou linéaire.

Les auteurs de [Farrer et al., 2005] n'observent pas de lien clair entre la taille de l'objet et la quantité de luminescence émise, il n'y a qu'un facteur 3 ou 4 entre la photoluminescence des particules sphériques de 60 nm et 2,5 nm excitées à 2 photons à 790 nm. Selon ce travail, les asymétries des objets ont plus d'importance que la taille de l'objet. [Dulkeith et al., 2004] ont mené des expériences sur des particules d'or sphériques de diamètre compris entre 2 nm et 40 nm, excitées à 376 nm. Ils observent une dépendance avec le volume de la particule.

Évolution de la quantité de luminescence avec la puissance excitatrice

Cette étude permet d'identifier le processus mis en jeu voire un mélange de processus si l'exposant de la puissance trouvée n'est pas entier.

Tous les auteurs observent une dépendance linéaire avec la puissance de la quantité de photoluminescence lorsque l'excitation se fait à un photon dans le proche UV et quadratique lorsque l'excitation est biphotonique dans le proche IR ; à l'exception de l'auteur de [Farrer et al., 2005] qui excite des particules sphériques déposées avec un laser femtoseconde dans l'IR, et qui obtient une évolution en puissance 3, et ce pour différentes tailles de billes. Ils expliquent cette dépendance par une densité d'états des bandes d plus importante à 200 nm qu'à 400 nm et donc

une section efficace à 3 photons plus grande. Cette hypothèse concernant la densité d'états est contredite par des mesures effectuées par [Varnavski et al., 2005].

Spectre d'émission

Le spectre informe sur la nature de la photoluminescence. Comme dit plus haut, il ne traduit pas une résonance électronique, mais la combinaison de plusieurs phénomènes physiques comme la densité d'états joints de la bande d et de la bande sp ou la résonance plasmon de surface.

[Farrer et al., 2005] observe un spectre très large qui n'évolue quasiment pas avec la taille de la particule ou l'indice du milieu d'étude. Cela tendrait à prouver que la partie excitation prime sur une désexcitation médiée par le plasmon.

[Beverluis et al., 2003] montrent que le spectre de nanoparticules d'or de 100 nm peut s'interpréter comme la convolution du spectre de photoluminescence d'un film d'or excité à 1 photon et du spectre du plasmon de la même particule de 100 nm. Notons que l'article aborde aussi une partie infrarouge du spectre de photoluminescence due à des transitions cette fois intrabandes. Les travaux présentés par la suite de ce manuscrit ne porteront pas sur cette partie IR de la luminescence.

[Bouhelier et al., 2005] observe sur des nanobâtonnets obtenus par lithographie électronique un spectre de photoluminescence excité à 2 photons très proche du spectre de diffusion observé en champ noir sur le même nanobâtonnet, en particulier au niveau de la résonance plasmon. Ces mêmes nanobâtonnets soumis à un flux lumineux important se déforment pour se rapprocher de sphères. Le spectre de luminescence change en conséquence, il se déplace vers le bleu et tend vers un spectre se rapprochant du plasmon d'une bille en or.

[Dulkeith et al., 2004] à 376 nm, donc très éloigné de la fréquence plasmon, étudient le spectre de la photoluminescence recueilli dans les 15 premières ps après l'excitation. Il est très proche du plasmon des particules, il suit d'ailleurs l'évolution du spectre du plasmon lorsque l'on change la taille des particules.

Pour [Varnavski et al., 2005] le spectre observé pour des billes ou des nanobâtonnets excités à 1 photon et collecté dans les 400 premières fs est centré sur le plasmon de l'objet étudié.

[Kohei et al., 2005] étudie avec un laser femtoseconde dans l'infrarouge, une excitation en champ proche et une collection en champ lointain, des nanobâtonnets qui présentent un spectre correspondant à l'émission consécutive à une désexcitation au niveau des points X et L . [Wang et al., 2005] avec une excitation confocale fait les mêmes observations. Le poids relatif des bosses évolue avec la longueur d'onde utilisée.

[Bouhelier et al., 2003] étudie un dimère de billes de 40 nm, formant une sorte de nanobâtonnet, avec excitation en champ lointain et collection en champ proche. La cartographie de la luminescence montre qu'elle est maximum à l'endroit de forte exaltation du champ (les pointes du dimère). Le spectre de photoluminescence présente un maximum à une longueur d'onde qui

correspond à la fréquence plasmon calculée pour un tel dimère. [Hossain et al., 2008] avec une excitation en champ proche et une collection en champ lointain observe sur une assemblée de billes des points chauds de photoluminescence qui globalement se situent aux points de contact des billes.

Profil d'excitation

[Wang et al., 2005] observe sur des nanobâtonnets dont le plasmon longitudinal se situe dans l'infrarouge que la photoluminescence est maximale lorsque la longueur d'onde IR correspond au maximum de la longueur d'onde plasmon.

Polarisation

Les études en polarisation permettent de comparer l'émission de photoluminescence à celle d'un dipôle.

[Kohei et al., 2005] observent sur des nanobâtonnets excités à 2 photons une photoluminescence qui a une dépendance en $\cos^2 \theta_{exc}$ avec la polarisation linéaire du laser exciteur alors que la SHG observée dans les mêmes conditions à une dépendance en $\cos^4 \theta_{exc}$, la photoluminescence étant maximum lorsque le laser est polarisé selon le grand axe du nanobâtonnet. Ils proposent alors un modèle d'excitation mettant en jeu deux transitions monophotoniques successives qui sera exposée dans la suite. En ce qui concerne la dépendance en polarisation à l'émission, les mêmes nanobâtonnets excités avec une polarisation parallèle à l'axe du nanorod, [Kohei et al., 2005] obtient une dépendance en $\cos^2 \theta_{emm}$ pour les photons de la zone X et partiellement polarisé selon L. [Bouhelier et al., 2005] observent aussi une dépendance en $\cos^2 \theta_{exc}$. Cependant [Wang et al., 2005] sur des nanorods voient une polarisation à l'excitation en $\cos^4 \theta_{exc}$ et pas de polarisation à l'émission. [Farrer et al., 2005] sur des billes en or observent une polarisation très faible à l'émission mais pas de polarisation à l'excitation. [Varnavski et al., 2005] observent une émission dépolarisée pour la partie très courte (<50 fs), partiellement polarisée au delà.

[Bouhelier et al., 2005] transforment avec de fortes puissances un nanobâtonnet en sphère. La photoluminescence de la bille est alors environ deux fois moins sensible à l'orientation de la polarisation excitatrice que le nanobâtonnet.

La dépendance, par [Kohei et al., 2005] et [Bouhelier et al., 2005], en $\cos^2 \theta_{exc}$, de la photoluminescence vis à vis de l'angle entre la polarisation du laser et l'axe d'un nanorod lors d'une excitation biphotonique, suggère que l'excitation biphotonique se déroule en fait en deux étapes monophotoniques. [Kohei et al., 2005] introduit donc un modèle en deux étapes pour l'excitation 4.4.

1. Le premier photon excite un électron de la bande *sp* en dessous du niveau de Fermi (pour que la bande soit peuplée) vers un niveau de la même bande *sp* mais au dessus du niveau

de Fermi. Il s'agit donc d'une transition intrabande qui est compatible avec l'énergie du photon IR

2. Quasi immédiatement, i.e. sans que le trou créé dans la première étape n'ait eu le temps de diffuser, le deuxième photon crée une transition entre un électron de la bande d et le trou précédemment créé dans la bande sp . Au final, on se retrouve comme pour une absorption à deux photons simultanés avec un trou dans la bande d mais celui n'a plus besoin de diffuser, il se trouve déjà à la verticale de l'endroit où la bande sp est au dessous du niveau de Fermi, il se recombine alors avec un électron de la bande sp .

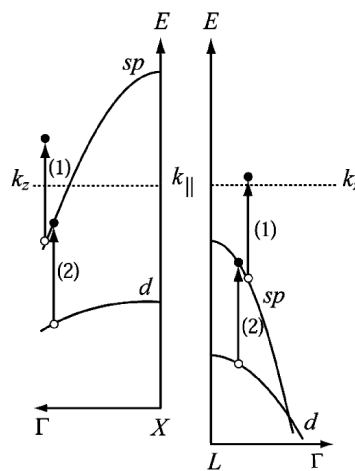


FIG. 4.4 – Schéma extrait de [Kohei et al., 2005] expliquant un mécanisme d'absorption à deux photons successifs

4.3.2 Conclusion

Les nanoparticules métalliques sont potentiellement d'excellentes sondes. Tout d'abord elles ne photoblanchissent pas comme les fluorophores et ne clignotent pas comme les boîtes quantiques. Ensuite elles sont relativement inertes chimiquement et n'interagissent que peu avec un milieu cellulaire. Elles peuvent aussi avoir, comme les boîtes quantiques, une gamme de spectres d'émission. Ainsi les nanorods, dont le plasmon longitudinal peut se situer dans l'infrarouge, peuvent être pressentis comme de très bonnes sondes biologiques car ils peuvent être excités à 2 photons IR et la photoluminescence⁷ se situe elle aussi dans l'IR. Enfin, ces particules peuvent être fonctionnalisées avec des ligands pour leur donner des fonctions chimiques très spécifiques.

Les résultats publiés sur la photoluminescence, bien que parfois contradictoires, sont globalement cohérents. Au vu de la comparaison des différentes expériences, on est cependant amené

⁷Une émission dans l'IR permet à la lumière émise dans des tissus biologiques de pouvoir facilement émerger pour être détectée. Cela pose néanmoins le problème d'avoir des détecteurs efficaces dans l'IR.

à penser que [Farrer et al., 2005] ont pu étudier des agrégats de nanoobjets ce qui expliquerait leur observations systématiquement différentes de celles des autres groupes.

Certains points de caractérisation semblent maintenant assez clairs. La photoluminescence est un processus extrêmement rapide (moins de 50 fs). La photoluminescence augmente comme le nombre d'électrons pouvant effectuer la transition d vers sp i.e comme le volume de l'objet. A 1 photon (resp 2 photons), la photoluminescence a une dépendance linéaire (resp quadratique) avec la puissance laser excitatrice, d'autre part aucun phénomène de saturation n'a été observé. La probabilité maximale d'excitation est obtenue lorsque la fréquence utilisée correspond à celle du plasmon, en raison de l'exaltation du champ à la surface du nanoobjet à cette fréquence. Le spectre d'émission est la combinaison de la densité d'état jointe des bandes d et sp de l'or (qui est très proche de celle du métal massif dès que la nanoparticule dépasse quelques nm de diamètre) et du plasmon de la particule étudié qui peut varier énormément d'une particule à l'autre notamment en fonction de sa forme.

Néanmoins il reste quelques interrogations notamment sur le mécanisme d'absorption à deux photons. D'autre part, toutes ces expériences ont été réalisées sur des échantillons déposés à l'exception de [Dulkeith et al., 2004] dont les résultats concernent des nanobilles d'or en solution mais avec une caractérisation à l'échelle macroscopique. Enfin dans toutes ces expériences il n'y a aucune mention du rôle de l'état de surface des particules.

A ma connaissance aucune étude poussée sur la photoluminescence de nanoparticules d'or n'a été réalisée en solution à l'échelle de la nanoparticule alors que cela est, in fine, la manière dont ces billes sont le plus souvent utilisées notamment comme sondes biologiques. Les études que j'ai réalisées pendant ma thèse se placent dans ce cadre. Elles apportent de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes de cette photoluminescence et notamment sur le rôle crucial joué par les ligands sur la nanoparticule.

4.4 Description des échantillons étudiés

Nous nous sommes principalement intéressés à la photoluminescence de nanobilles d'or. Nous avons choisi des objets sphériques car, d'une part, leur étude permet a priori d'écarter tout effet d'anisotropie dû à leur forme, d'autre part parce que l'on peut en obtenir facilement auprès de nombreux fournisseurs.

Les nanobilles utilisées pour les travaux présentés dans ce chapitre ont été achetées chez British BioCell International. Elles sont entourées d'ions citrates pour empêcher leur agrégation. Les données "constructeur" indiquent une dispersion en taille de 8% autour du diamètre nominal. Nous disposons de billes de 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 nm de diamètre.

Je vais maintenant aborder dans les sections 4.5 et 4.6 les différents résultats obtenus sur la photoluminescence de ces nanobilles d'or. La photoluminescence est multi-paramètres. Elle

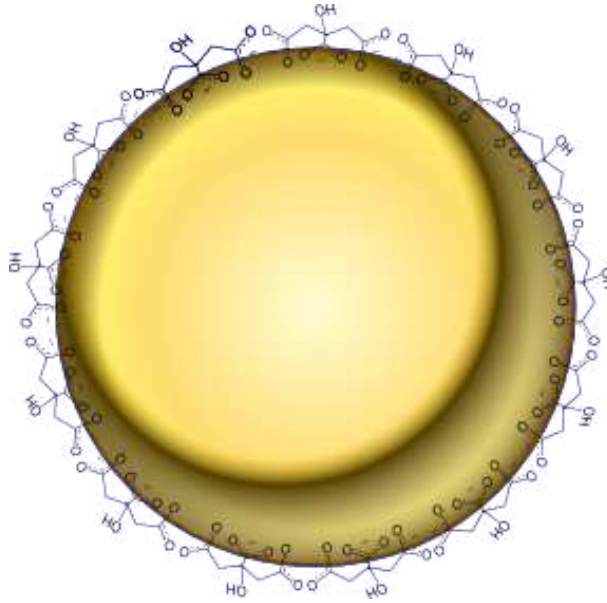


FIG. 4.5 – Une nanobille d’or entourée de ligands citrates

peut être caractérisée, entre autres, par son intensité, son spectre d’émission, sa polarisation d’émission et son diagramme d’émission. Comme nous allons le voir elle dépend fortement de la puissance excitatrice, de la viscosité du milieu d’étude, du type d’excitation employé (monophotonique ou biphotonique et de la polarisation utilisée) et des molécules entourant la bille en or. Dans la mesure du possible nous avons essayé de séparer les différents effets. Les résultats seront récapitulés et discutés à la section 4.7.

4.5 Caractérisation préliminaire des échantillons

4.5.1 Spectre d’extinction

Les nanoparticules sont caractérisées au préalable par une mesure d’ensemble d’extinction au spectrophotomètre. Cette extinction (i.e absorption et diffusion) est gouvernée par la loi de Mie [Mie, 1908]. Ces mesures permettent d’estimer la taille moyenne des billes ainsi que leur concentration [Khlebtsov, 2008] [Haiss et al., 2007]. La formule :

$$d = \frac{\sqrt{(\lambda_{SPR} - 500) - 17} - 1}{0.06} \quad (4.5)$$

où d est le diamètre de la particule (inférieur à 23 nm) , λ_{SPR} la longueur d’onde d’absorption maximale, a été obtenue en regroupant et en *interpolant* les données expérimentales d’une quinzaine d’articles par [Khlebtsov, 2008]. Elle est valable pour des nanobilles d’or entourées d’ions citrates en solution aqueuse. Elle est très proche des résultats obtenus avec la théorie de Mie. En l’occurrence, sur les spectres d’absorption de billes d’or de 20 nm et 50 nm présentés

sur la figure 4.6 on trouve une taille de billes de 24 ± 2 nm et 42 ± 1 nm, ce qui diffère des données constructeur et ne peut pas provenir d'une erreur systématique du spectrophotomètre puisque l'écart est supérieur pour les billes de 20 nm et inférieur pour les billes de 50 nm. Les résultats obtenus par FCS dans la suite donnent des tailles beaucoup plus proches des données constructeurs⁸. Les mesures d'absorption réalisées avec notre spectrophotomètre ne sont donc qu'approximatives. Des mesures du diamètre des nanobilles par microscopie électronique ou en FCS avec un volume focal bien calibré sont plus fiables.

Le tableau donné dans l'article [Haiss et al., 2007] permet éventuellement de remonter aussi à la concentration des nanobilles.

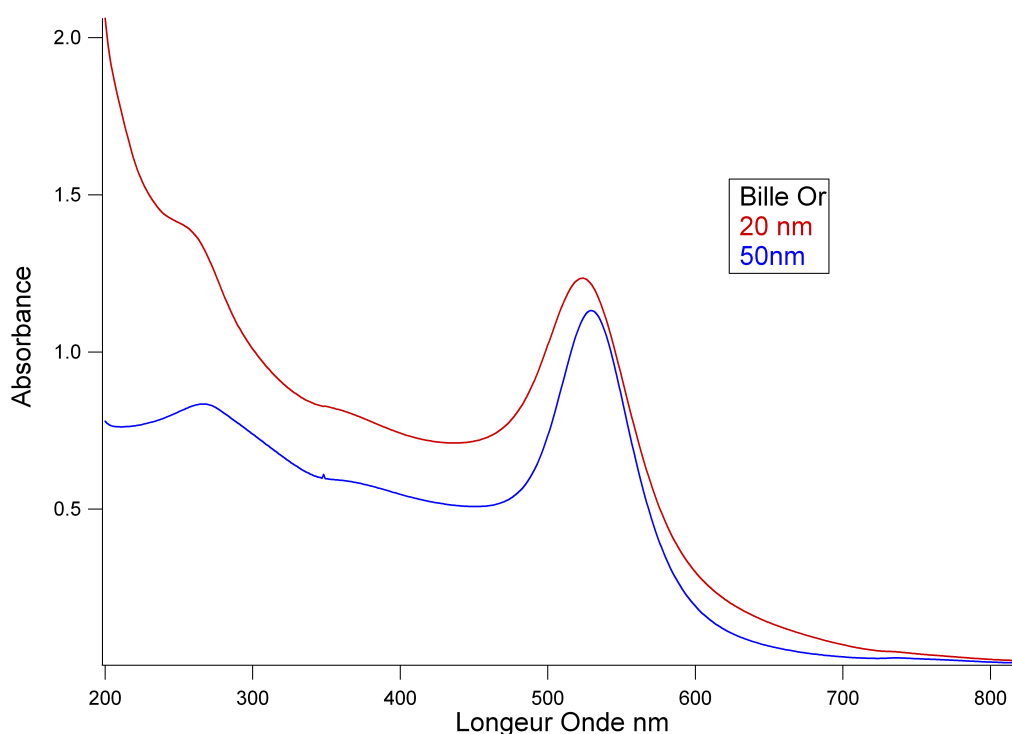


FIG. 4.6 – Spectre d'absorption de nanobilles d'or de 20 et 50 nm.

4.5.2 Echantillon déposé sur une lamelle de verre

Les billes d'or de 20, 50 et 60nm sont déposées sur des lamelles de verre à la tournette avec une vitesse de 1 000 tours par minute. On s'assure ensuite de la bonne répartition des billes par imagerie AFM. Il faut qu'elles soient assez dispersées pour qu'il y ait moins d'une particule par μm^2 afin que le spot laser n'englobe qu'une particule à la fois. On fait ensuite un repérage préalable des particules par balayage confocal de l'échantillon (voir figure 4.7). Le trou de filtrage n'est a priori pas nécessaire pour ces expériences sur une lamelle de verre, mais il est maintenu par commodité.

⁸Sauf pour le temps de rotation des billes de 20 nm qui lui aussi donne une taille d'environ 24 nm

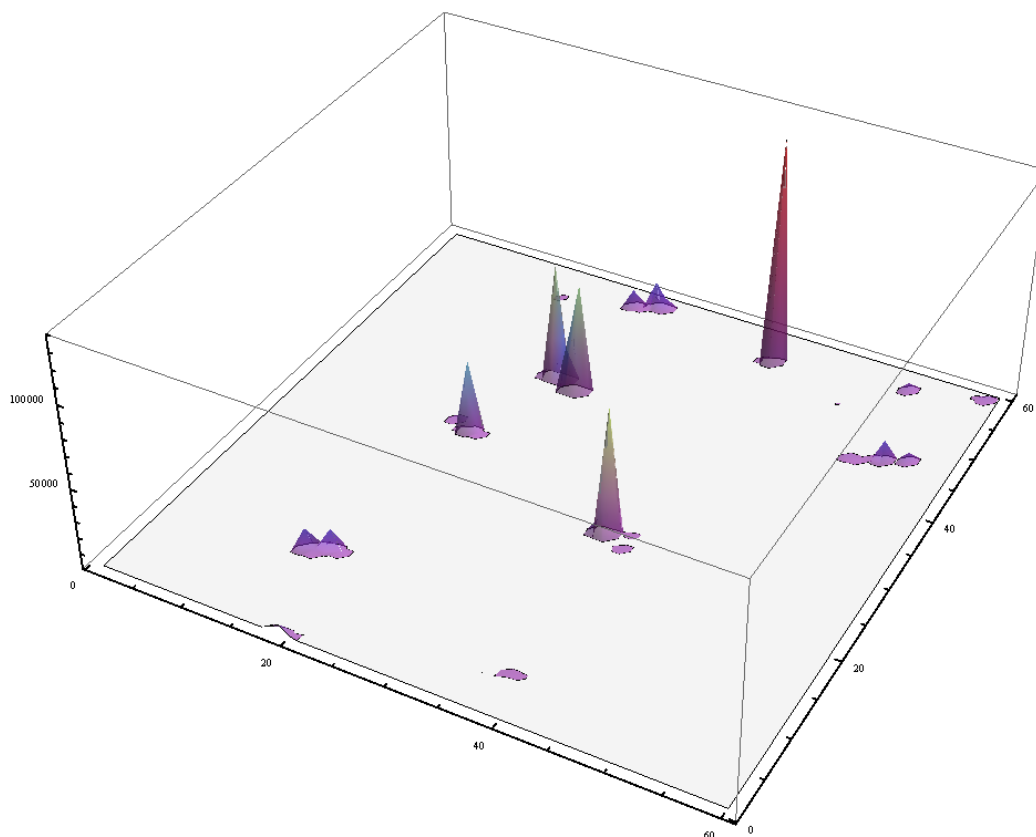


FIG. 4.7 – Image obtenue par balayage confocal de billes de 50 nm déposées sur une lamelle de verre excitée à 2 photons à 815 nm avec une puissance de 16 mW. Chaque pixel de l'image fait $0.5 \mu\text{m}^2$, les dimensions de l'image sont $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. Le contraste entre le fond et le signal de photoluminescence est de l'ordre de 10^5 .

Lorsque les billes sont soumises à de fortes puissances trop longtemps (environ 30 mW pendant 100 ms) elles sont déplacées par le faisceau laser. Les mesures sont donc menées d'une part à une puissance inférieure à 30 mW et d'autre part en effectuant des balayages autour de la particule pour ne pas la soumettre trop longtemps au flux laser. Ces constatations sont en faveur de l'étude d'objets individuels. En effet, lorsque l'on étudie des agrégats de nanobilles d'or⁹, le signal est très stable pendant plusieurs minutes, et ce même à des puissances importantes.

4.5.2.1 Loi de puissance

En faisant varier la puissance sur l'échantillon, on mesure l'évolution du signal détecté. Afin de prendre en compte tout phénomène d'hystérésis tel la déformation de la particule sous l'effet du laser, l'expérience est ensuite réitérée mais en décroissant la puissance. On observe un

⁹On peut obtenir ces agrégats en déposant sans précaution particulière une goutte de solution de billes d'or sur une lamelle de verre

signal qui dépend du carré de l'intensité laser ¹⁰ (voir figure 4.8 sur des billes de 60 nm) ce qui confirme l'excitation des transitions *sp* vers *d* dans le proche UV par deux photons infrarouge. Par ailleurs, aucun phénomène de saturation n'est observé dans cette gamme de puissance.

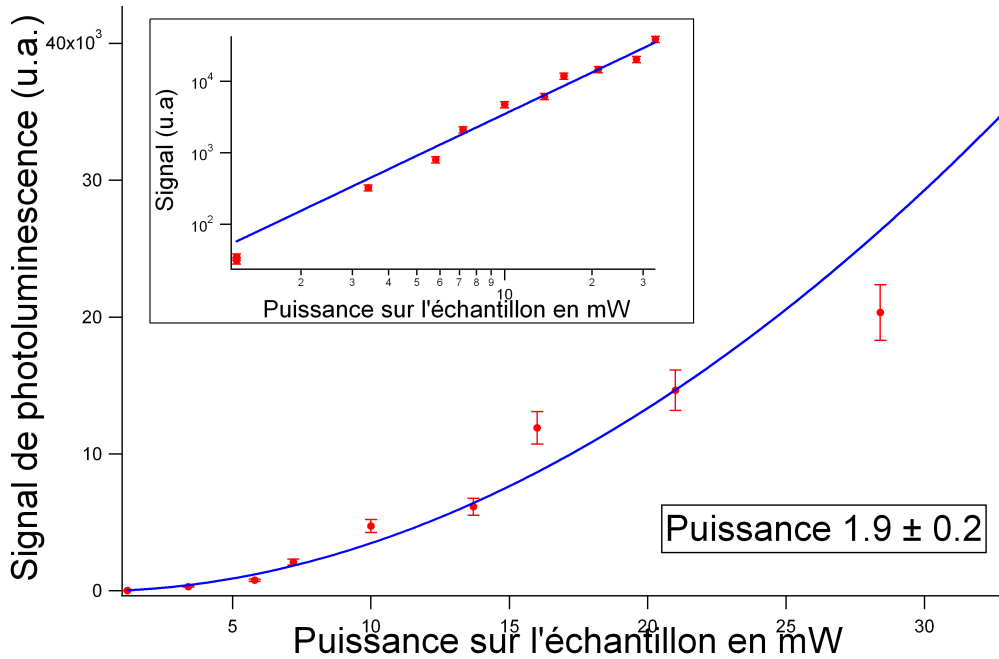


FIG. 4.8 – Evolution de la quantité de photoluminescence excitée à 2 photons avec la puissance du laser excitateur pour des billes d'or de 60 nm. En encart la même courbe en échelle logarithmique. L'ajustement est astreint à passer par l'origine.

4.5.2.2 Sensibilité à la polarisation d'excitation

Le diagramme de l'intensité de la photoluminescence en fonction de la polarisation d'excitation est réalisé en intercalant une lame $\lambda/2$ entre la lame dichroïque et l'objectif. Un tel diagramme est présenté sur la figure 4.9 sur une bille de 20 nm excitée à 2 photons à 815 nm avec une puissance de 8 mW. Malgré l'incertitude expérimentale importante, la forme de la courbe est mieux ajustée par une fonction $\cos^2 \theta_{exc}$, que par $\cos^4 \theta_{exc}$. Cette expérience est en effet relativement délicate. Elle suppose une stabilité axiale du microscope de l'ordre de la centaine de nm pendant une dizaine de minutes. Nous avons donc contrôlé le positionnement en *z* avant et après chaque mesure. Une dépendance $\cos^2 \theta_{exc}$ conduirait à un processus d'excitation à deux photons successifs comme il est expliqué à la page 111. Cette expérience a été réitérée sur une dizaine de particules de même taille, la plupart sont polarisées. Le résultat majeur de

¹⁰L'expérience est faite avec un filtre qui coupe une éventuelle génération de seconde harmonique pour ne prendre en compte que la photoluminescence de la particule

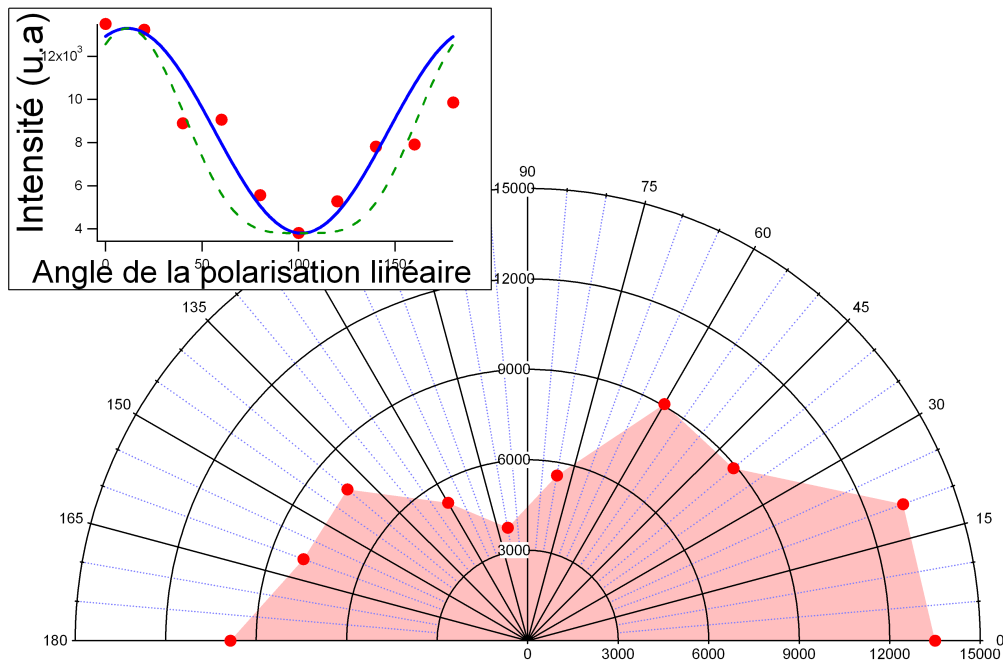


FIG. 4.9 – Graphe en coordonnées polaires de l'intensité de photoluminescence (en unités arbitraires) en fonction de l'angle de la polarisation linéaire du laser excitateur. Il s'agit d'une bille de 20 nm excitée à 815 nm à 2 photons avec une puissance de 8 mW. En encart, les mêmes données avec, en bleu, un ajustement suivant une loi en $\cos^2 \theta_{exc}$ et en vert pointillé une loi en $\cos^4 \theta_{exc}$

cette étude est que la luminescence des nanobilles d'or, bien que sphériques, est sensible à la polarisation du laser excitateur.

4.6 Caractérisation en solution à l'échelle de la particule unique

4.6.1 Mise en évidence de l'anisotropie de nanobilles d'or

La corrélation d'un signal de photoluminescence de billes - des objets a priori sphériques - d'or de 20 nm de diamètre excitées à 2 photons à 815 nm avec 3 mW de puissance est présentée sur la figure 4.10. Outre la contribution de la diffusion spatiale permettant d'évaluer la taille de la bille, la courbe comporte une forte évolution au temps courts (de l'ordre de la microseconde). Une dilution des billes permet de montrer qu'il ne s'agit pas d'interaction entre les billes.

En changeant la polarisation linéaire pour une polarisation circulaire, l'amplitude de la corrélation diminue sans que le temps caractéristique de la dynamique ne change (voir 4.6.7

¹²voir la calibration 1.3.3.1 qui donne $\alpha = 26.7 \mu\text{s} \cdot \text{nm}^{-1}$

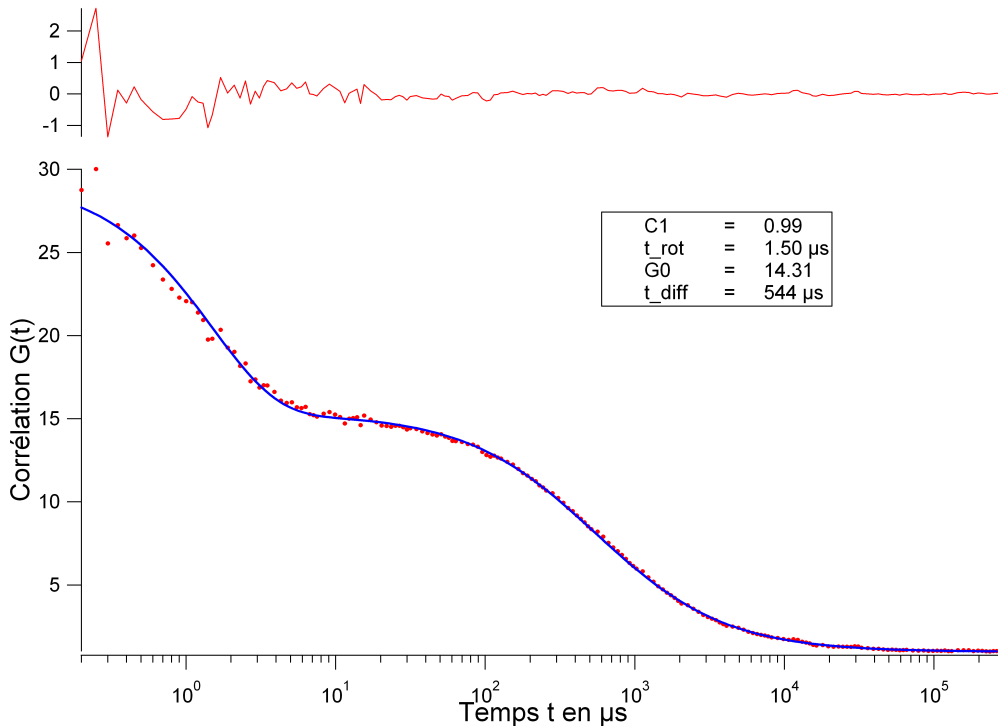


FIG. 4.10 – Courbe de corrélation de nanobilles d'or de 20 nm excitées à 2 photons à 815 nm avec 3 mW de puissance. La courbe est ajustée avec un modèle prenant en compte la rotation de la bille. Le temps de rotation brownien obtenu 1.5 μs , soit une taille 23 nm, est compatible avec le temps de diffusion de translation (544 μs) qui donne une taille¹² de 20 nm

pour une étude quantitative). Ce résultat suggère fortement que cette corrélation correspond à la dynamique de rotation de la bille, même si l'observation de ce processus est inattendu.

La bille sous l'effet des collisions avec les molécules du solvant tourne par rapport au référentiel du laboratoire. A l'échelle d'observation de l'expérience, qui est de l'ordre de la microseconde, cette rotation apparaît erratique. Tout se passe comme si la bille passait instantanément d'une direction angulaire à une autre. Cela est vrai quel que soit l'objet étudié, mais ici, chaque orientation s'accompagne d'une probabilité d'excitation et/ou d'émission différente. L'intensité émise est donc modulée avec un temps caractéristique égal au temps de rotation (voir section 2.2.11.4) et se traduit finalement sur la courbe de corrélation par ce temps court.

L'analyse de la fonction de corrélation montre que le temps de diffusion spatiale conduit à la taille nominale de la bille, à savoir 20 nm. Le temps court, s'il est interprété comme un terme de rotation, conduit à un objet de diamètre de $d = \sqrt[3]{\frac{6kT\tau_r}{\pi\eta}} = 23 \text{ nm}$ ce qui est compatible avec le temps déduit de la diffusion spatiale.

Ce temps court n'est par contre pas observé sur le signal de diffusion Rayleigh. Il n'est pas observé non plus par la méthode "photothermal correlation spectroscopy" [Octeau et al., 2009]¹³.

¹³Cette technique consiste à suivre la variation locale d'indice optique du milieu entourant la bille. L'échauf-

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

Notons aussi que [Wang et al., 2005] n'observe pas de rotation sur la photoluminescence de nanobâtonnets; cette observation est à corrélérer avec le fait qu'ils n'observent pas non plus de polarisation à l'émission de la photoluminescence.

L'observation d'une contribution de rotation brownienne dans la courbe de corrélation est néanmoins surprenante car contradictoire avec l'hypothèse d'isotropie du tenseur de polarisabilité de la bille sphérique. On peut avancer trois causes d'anisotropie d'origines différentes :

- Anisotropie de forme : certaines billes seraient en fait oblates induisant une anisotropie du tenseur polarisabilité
- Anisotropie liée à la présence de sites particuliers à la surface de la bille en présence de ligands. En ce type de sites, les processus d'excitation et de déséxcitation des électrons peuvent être fortement modifiés, entraînant des anisotropies locales.
- Anisotropie de la densité d'états électroniques due à des défauts sur la bille. Ajoutons que de telles billes ont été observées en microscopie électronique à haute résolution et par diffraction. Ces deux techniques n'ont pas révélé de défauts de structure en volume.

L'anisotropie de forme sera étudiée à la section 4.6.10 et nous verrons qu'elle n'est pas responsable du terme de rotation. Les effets liés au ligands seront étudiés aux sections 4.6.6 et 4.6.12.

4.6.2 Reproductibilité des courbes de corrélation de photoluminescence

Les échantillons de nanobilles d'or ont une certaine hétérogénéité, d'une part en ce qui concerne la taille des objets mais surtout, comme nous allons le voir par la suite, en terme de rendement de photoluminescence. On écarte tout d'abord les signaux provenant de grosses particules par filtrage (voir section 2.1.1). Les courbes de corrélation présentées sont donc une moyenne des billes restantes. On enregistre le signal sur des temps d'acquisition longs de l'ordre de quelques minutes, non pas pour améliorer le rapport signal sur bruit de la courbe de corrélation qui est déjà très bon, mais pour observer une population significative d'objets. La figure 4.11 détaille ce processus de moyenne. Il s'agit de 11 courbes de corrélation d'un signal de photoluminescence provenant de billes de 20 nm excitées à 815 nm avec une puissance de 11 mW. Ces courbes proviennent du même enregistrement qui a été divisé en 11 sous parties. Chaque courbe de corrélation correspond à une de ces 11 sous parties. Cette présentation met en évidence l'hétérogénéité des échantillons étudiés¹⁴. La déviation standard autour de la valeur moyenne des différents paramètres obtenus par ajustement de la courbe est de l'ordre de 10%. En particulier le contraste de la rotation oscille entre 0,65 et 0,85. Insistons sur deux points.

fement provoqué par l'absorption de la bille change l'indice du milieu d'étude ce qui dévie un faisceau laser de référence. La corrélation du signal de déviation permet de suivre les fluctuations du signal provenant des billes.

¹⁴Une telle opération sur un signal de fluorescence de molécules conduit à 11 courbes identiques

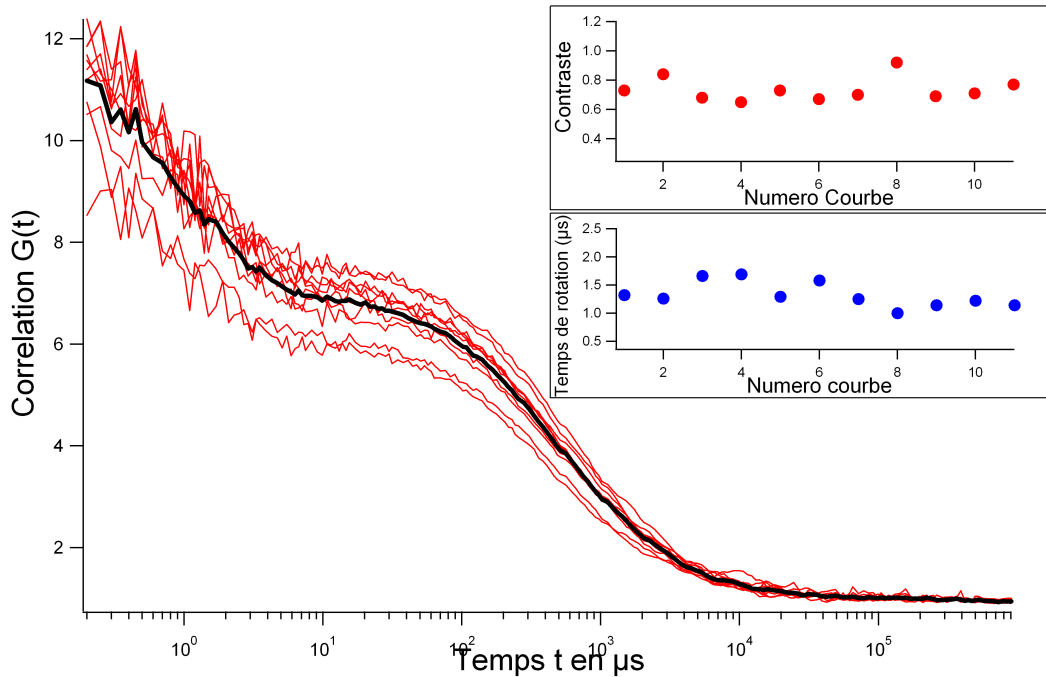


FIG. 4.11 – Réseau de 12 courbes de corrélation d'un signal de photoluminescence provenant de billes de 20 nm excitées à 2 photons à 815 nm avec une puissance de 11 mW. Le signal de l'expérience a été divisé en 11 sous parties dont chaque courbe montre la corrélation. La courbe en noir correspond à la moyenne des 11 autres. En encart, l'évolution du contraste de rotation et du temps de rotation en fonction du numéro de la courbe de corrélation.

D'une part, ces écarts entre les différentes valeurs sont dus à la nature hétérogène en terme de photoluminescence des objets étudiés. D'autre part, les courbes de corrélations présentées dans ce manuscrit sont moyennées sur un nombre important de nanoobjets de telle sorte qu'il n'y a qu'un écart de moins de 10% entre les résultats d'une même expérience répétée plusieurs fois.

4.6.3 Anisotropie à l'émission

On peut qualitativement mettre en évidence l'anisotropie de l'émission de photoluminescence des billes d'or en solution. Dans ce but, on intercale un prisme de Wollaston entre l'objectif et la lentille de tube et on observe l'image du rayonnement sur la CCD. On augmente la viscosité de la solution par ajout de glycérol afin d'enregistrer plusieurs images de la bille lors de son passage dans le spot laser. On observe (voir figure 4.12), pour des billes de 50 nm excitées à 815 nm avec une puissance de 10 mW, une évolution de la polarisation émise par une même bille. Cela indique que le diagramme d'émission de la bille a une direction privilégiée qui tourne en même temps que la bille. Par conséquent, le processus d'absorption-émission ne peut pas être réduit à celui d'un dipôle induit par l'excitation laser qui conduirait à une

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

direction fixe d'émission, et donc une répartition constante du signal relatif entre les deux taches après traversée du Wollaston. On peut donc déduire une information essentielle : la bille possède donc un ou plusieurs dipôles propres. Les expériences sont reprises quantitativement à la section 4.6.8. En reprenant les notations de la section 2.2.11.4 page 57, on peut déduire que la probabilité d'émettre un photon alors que la particule à la direction Ω par rapport au référentiel du laboratoire n'est pas isotrope i.e $E_{\Omega} \neq 1$

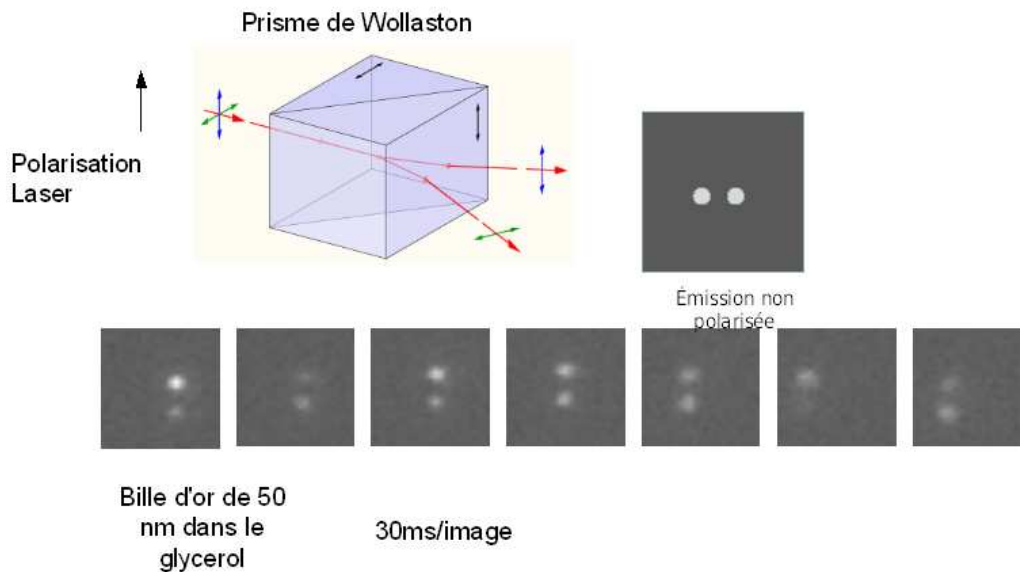


FIG. 4.12 – Evolution du signal de photoluminescence d'une bille d'or de 50 nm dans du glycérol excitée à 815 nm. Bien que stroboscopée, la signature de la rotation de la bille est donnée par les modulations de la polarisation d'émission. Ces dernières sont repérées grâce à un prisme de Wollaston qui sépare spatialement la polarisation parallèle au laser de celle qui est perpendiculaire. La même expérience réalisée avec des billes fluorescentes ne conduit à aucune modulation en intensité relative des deux faisceaux issus du Wollaston.

4.6.4 Mise en évidence d'un effet de seuil par une méthode originale de corrélation diffusion Rayleigh/Photoluminescence

Une autre observation intéressante est la sensibilité des nanoobjets en solution à la puissance excitatrice. L'expérience schématisée sur la figure 4.13 a pour but de comparer photon par photon et en simultané le signal de diffusion Rayleigh de billes de 50 nm à celui issu de la photoluminescence des mêmes billes. Cela permet de comparer un signal dont la nature physique est bien connue (la diffusion Rayleigh) à celui de la photoluminescence qui n'est que partiellement compris. L'excitation se fait à 2 photons à 815 nm avec une puissance variable.

Le signal est séparé en 2 voies.

1. dans la première un filtre rejette le signal en dessous de 780 nm soit la quasi totalité de la photoluminescence (voir section 4.6.5) et laisse donc passer le signal de diffusion Rayleigh à la longueur d'onde du laser excitateur soit 815nm.
2. Sur la deuxième voie un filtre passe bande 500 – 720 nm ne laisse passer que la photoluminescence.

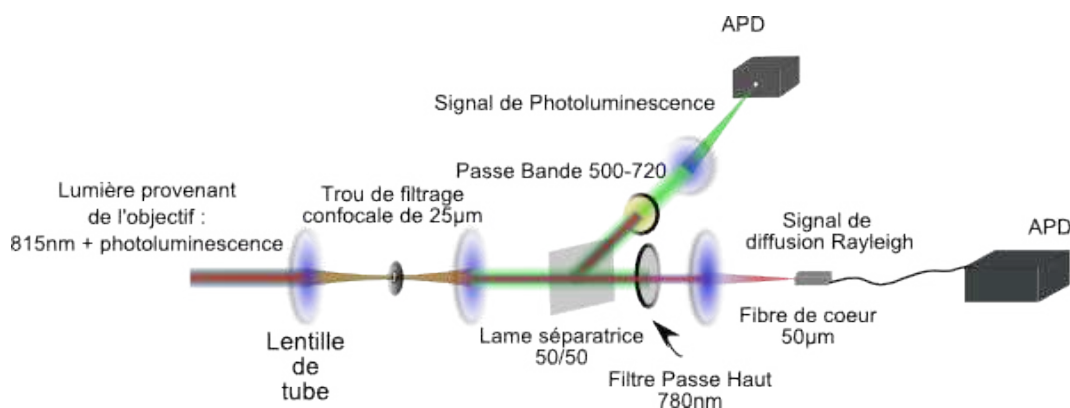


FIG. 4.13 – Schéma du montage optique permettant la comparaison simultanée du signal de photoluminescence et du signal de diffusion Rayleigh

La figure 4.14 montre les chronogrammes du signal observé. Une première analyse qualitative montre qu'à chaque burst de signal Rayleigh ne correspond pas un burst de luminescence. En d'autres termes, toutes les billes ne luminescent pas nécessairement lors de leur passage dans le volume focal. En augmentant la puissance laser avec une puissance de départ de 3 mW, le ratio bille luminescente sur bille noire augmente. En partant d'une situation où quasiment aucune bille ne luminesce, on induit une luminescence pour 80 % des billes à des puissances plus importantes (9 mW), et sûrement 100 % avec des puissances encore plus importantes. Notons qu'à ces puissances, les billes de 50 nm commencent à montrer la signature d'un piégeage par le faisceau laser. Cette expérience est reprise quantitativement à la section 4.6.13.

4.6.5 Spectres de luminescence

Les billes en or de 60 nm de diamètre, sous une excitation relativement importante (plus de 70 % de billes luminescentes), émettent assez de lumière en un seul passage dans le volume focal pour permettre une analyse de leur spectre d'émission avec un bon rapport signal sur bruit. L'échantillon est assez dilué pour que la probabilité d'avoir deux billes en même temps dans le volume focal soit négligeable. Les spectres sont présentés figure 4.15. La plupart des billes ont un spectre très large et centré sur la fréquence plasmon des particules i.e. 530 nm. Ces observations sont en accord avec ceux présentés à la section 4.3 et confirme l'importance du rôle joué par le plasmon dans le processus de désexcitation radiative.

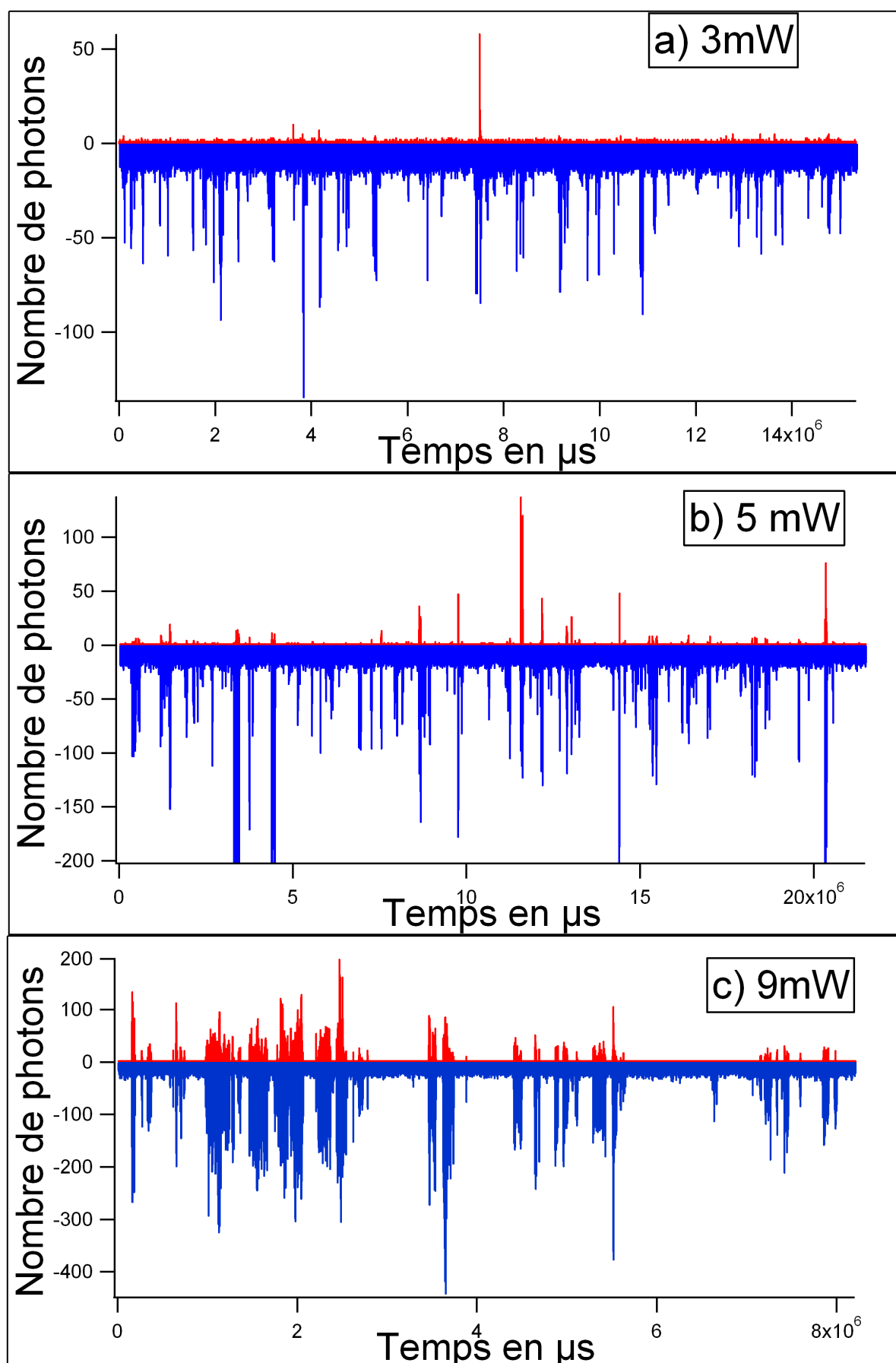


FIG. 4.14 – Chronogramme de l'intensité du signal de photoluminescence (en rouge) comparé au signal de diffusion Rayleigh (en bleu avec une échelle négative) pour des nanobilles d'or excitées à 2 photons à 815 nm avec en a) une puissance de 3 mW, en b) 5 mW, en c) 9 mW.

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

Cette technique originale de spectroscopie au vol en solution nous assure que l'on étudie un seul objet à la fois et sous différents angles. L'expérience permet de réaliser facilement un spectre moyen de l'échantillon tout en conservant l'information sur son hétérogénéité. Notons que l'excitation biphotonique est ici primordiale. L'image formée sur la caméra n'est pas filtrée confocalemment et seule l'excitation à 2 photons nous assure que l'on n'image pas des particules excitées loin du plan focal. De telles particules produiraient un spectre flou sur la CCD et conduiraient donc à un spectre déformé. Le montage a d'abord été étalonné avec des billes fluorescentes dont le spectre est connu pour s'assurer que l'on observe bien le spectre attendu pour ces objets.

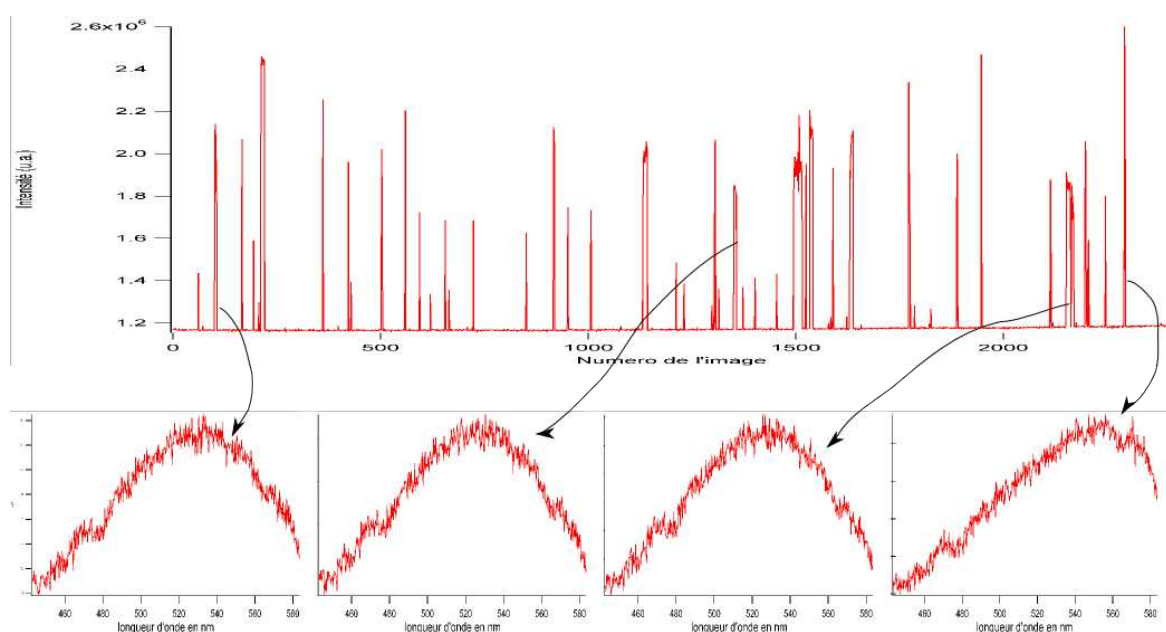


FIG. 4.15 – Spectre de billes de 60 nm excitées à 850 nm à 2 photons avec une puissance de 50 mW. Le temps d'exposition est de 3 ms. En haut, le tracé temporel de l'intensité spectrale intégrée qui fait apparaître le passage des billes une à une dans le volume focal. En bas, les spectres de certains bursts représentatifs de l'expérience. Au milieu, les trois premiers bursts donne un spectre similaire centré autour de 530 nm, soit sur le plasmon de la bille, le dernier montre un spectre différent centré vers 560 nm.

4.6.6 Évolution avec la viscosité de la solution

L'évolution du temps de rotation en fonction de la viscosité de la solution est présentée en encart de la figure 4.16. Les différentes viscosités sont obtenues par ajout de glycérol à l'eau. Il est cependant relativement difficile de préparer des solutions très visqueuses avec une viscosité précise, car la moindre adjonction d'eau fait chuter considérablement la viscosité. On peut néanmoins préparer des solutions dont la valeur de la viscosité est approximative et utiliser les

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

mesures de FCS comme viscosimètre. En effet, le temps de diffusion de la bille est proportionnel à la viscosité¹⁵. Le temps de rotation est donc tracé en fonction du temps de diffusion spatiale de la particule c'est à dire à un coefficient près la viscosité de la solution. Ce temps de rotation est lui aussi proportionnel à la viscosité, en accord avec un processus de la rotation de la bille.

D'autre part, on constate qu'il y a aussi une modification d'un facteur 2,3 du contraste de la rotation lorsqu'on étudie la photoluminescence de billes de 20 nm de diamètre excitée à 2 photons à 815 nm sous une puissance de 7 mW dans une solution 7 fois plus visqueuse que l'eau (voir figure 4.16). Un changement du contraste de rotation peut provenir d'une modification de la collection et/ou de l'excitation du montage ou d'un changement du diagramme de rayonnement de la particule. La première hypothèse peut être éliminée. Le changement d'indice de la solution intervient lors de la transmission du faisceau au niveau de l'interface dont l'effet n'est plus parfaitement compensé par l'objectif dont le milieu d'immersion est de l'eau. Cette modification, mineure, change le volume d'excitation et les facteurs spatiaux qui interviennent dans la collection, mais elle ne peut pas expliquer un changement du contraste de rotation d'une telle amplitude. Le diagramme d'émission de la particule est donc modifié par la viscosité du milieu qui l'entoure. La probabilité d'émission puis de détection d'un photon E_Ω est donc modifiée. Utilisons la variance comme un outil mathématique pour décrire à quel point l'émission est anisotrope. E_Ω devient E'_Ω avec une variance sur tous les angles ($var(E'_\Omega) < var(E_\Omega)$). Le contraste de rotation obtenu¹⁶ est de 2,6. Un dipôle excité à 2 photons dans les mêmes conditions (polarisation linéaire et aucune analyse de polarisation à la détection) conduirait à un contraste de 2,16. L'émission de photoluminescence de la bille dans une solution visqueuse apparaît donc comme plus directive que celle d'un dipôle. Cette observation sera discutée dans la section 4.7.

4.6.7 Excitation avec une polarisation circulaire

La figure 4.17 montre l'évolution de la courbe de corrélation de bille de $d = 20$ nm excitées à 2 photons à 789 nm et une puissance de 4 mW lorsque l'on passe d'une polarisation d'excitation linéaire à une excitation circulaire. On remarque que le contraste de la rotation chute lorsque la bille est excitée par une polarisation circulaire. Il passe de 1,1 à 0,38. On peut émettre deux hypothèses :

1. La bille a une émission isotrope et le laser induit un dipôle dans la bille. La polarisation du laser exciteur n'a pas d'influence sur le processus d'absorption. On a donc $A_\Omega = 1$. Une polarisation linéaire crée un dipôle induit dirigé selon le laser alors qu'une polarisation circulaire engendre une couronne de dipôles. La superposition de l'émission

¹⁵Cela est vrai tant que l'indice optique de la solution visqueuse n'est pas trop différent de l'eau, sinon, le volume focal serait différent du fait des aberrations causées par ce changement d'indice.

¹⁶L'ajustement conduit à un coefficient de contraste de rotation pour les termes avec $l = 4$ $c_{l=4} \simeq 0$

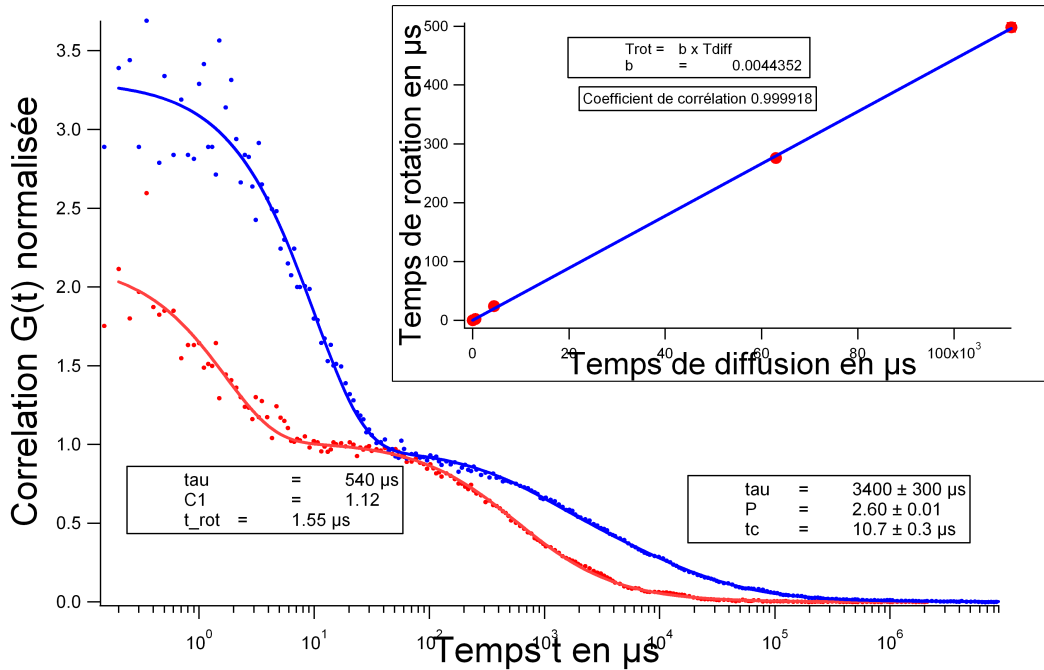


FIG. 4.16 – Courbes de corrélation de photoluminescence de nanobilles d’or de 20 nm de diamètre excitées à 2 photons à 815 nm sous une puissance de 7 mW. La courbe en rouge correspond à une diffusion dans l’eau (viscosité : 1 mPas), la courbe bleue dans un mélange eau éthylène-glycol en concentration telle qu’il est environ 7 fois plus visqueux. Les temps de diffusion et de rotation sont en accord avec ce changement de viscosité. Ce changement de viscosité s’accompagne aussi d’un changement du contraste de la rotation d’un facteur 2,3. En encart la variation du temps de rotation des mêmes billes en fonction du temps de diffusion qui est proportionnel à la viscosité de la solution

des dipôles conduit à un diagramme d’émission plus isotrope avec une polarisation circulaire ($var(E_{\Omega}^{circ}) < var(E_{\Omega}^{lin})$). Le contraste de rotation est donc plus faible avec une polarisation circulaire.

2. La molécule possède un dipôle d’absorption et un seul dipôle d’émission. Le dipôle d’absorption est plus souvent excité en moyenne par une polarisation circulaire qu’une polarisation linéaire. On a donc ($var(A_{\Omega}^{circ}) < var(A_{\Omega}^{lin})$). Quant-à l’émission elle reste inchangée ($E_{\Omega}^{circ} = E_{\Omega}^{lin}$).

L’expérience invalide la première hypothèse car l’émission d’une couronne de dipôles serait quasiment isotrope, or, le contraste de rotation avec une polarisation circulaire n’est pas nul.

Les calculs menées à la section 2.2.11.5 prévoient une baisse du contraste de rotation d’une particule ayant un dipôle d’absorption et d’émission alignés et excitée à 2 photons d’un facteur 2,5 entre une polarisation linéaire et une polarisation circulaire. L’expérience donne un facteur de 2.9 ce qui est en bon accord avec la théorie.

En conclusion, cette expérience montre de façon claire que, en solution, l'absorption de la bille n'est pas isotrope. Elle suggère aussi que le rayonnement est de type dipolaire en première approximation. Cette observation indique que la nature dipolaire du rayonnement émis par les billes déposées (4.5.2.2) n'est pas liée à l'interaction entre la bille et la surface. Il s'agit d'une propriété intrinsèque des billes entourées de leur cortège de citrates. Cette conclusion complète les observations des différents travaux réalisés sans exception sur les billes déposées présentés à la section 4.3.

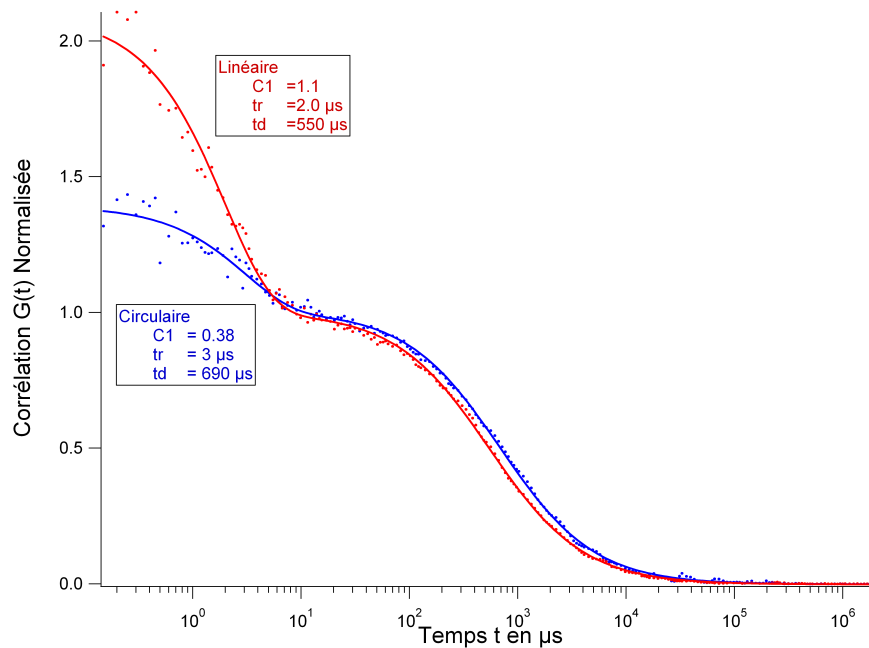


FIG. 4.17 – Courbe de corrélation d'un signal de photoluminescence de billes de $d = 20$ nm de diamètre excité à 2 photons à 789 nm (longueur d'onde pour laquelle les polariseurs utilisés ont des caractéristiques correctes) et une puissance de 4 mW. En bleu, la polarisation d'excitation est linéaire, en rouge, toutes choses égales par ailleurs, la polarisation est circulaire. Il n'y a pas d'analyse de polarisation à la détection.

Notons par ailleurs que le temps de diffusion pour la polarisation circulaire (690 µs) est supérieur à celui pour une la polarisation linéaire (550 µs).

4.6.8 Étude de la polarisation à l'émission

L'anisotropie de la polarisation à l'émission a été montrée qualitativement au paragraphe 4.6.3. Nous en faisons ici une étude plus quantitative. Le signal de photoluminescence de billes d'or de 20 nm de diamètre excitées à 2 photons à 789 nm avec une puissance de 3 mW est séparé selon la polarisation parallèle à celle du laser (direction x) et celle perpendiculaire (direction y) par un cube séparateur de polarisation. Les courbes d'autocorrélation, filtrées de l'afterpulsing,

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

sont présentées sur la figure 4.18. On observe que la corrélation du signal n'est pas la même sur les deux voies contrairement au cas d'objets non polarisés comme par exemple des billes fluorescentes (voir figure 1.15 réalisée dans les mêmes conditions). La corrélation du signal émis selon x à un plus grand contraste de rotation, un temps de diffusion apparent plus long et une amplitude de fluctuation plus grande que le signal émis selon y .

Le changement de contraste¹⁷ de 2 à 1 fournit une indication très forte sur l'orientation relative du dipôle d'absorption et celui d'émission : ils sont quasiment *alignés*. Plaçons nous d'abord dans le cas où on ne collecte que la photoluminescence avec une analyse en polarisation du signal dirigée selon x . Lorsque l'axe d'émission du dipôle est orienté selon x l'axe d'absorption du dipôle est aligné avec le champ électrique du laser et l'excitation est maximale. Le contraste de rotation est donc très élevé entre les phases où l'axe d'émission dipôle est aligné avec x et les autres phases. Plaçons nous maintenant dans le cas où on ne collecte que la photoluminescence avec une analyse en polarisation du signal dirigée selon y . Lorsque l'axe d'émission du dipôle est orienté selon y l'axe d'absorption du dipôle est perpendiculaire au champ électrique du laser et l'excitation est quasi-nulle. Le contraste de rotation est donc très faible car on ne distingue que très peu les phases où l'axe d'émission du dipôle est orienté selon y des autres phases. Si le dipôle d'émission faisait un angle de $\frac{\pi}{2}$ avec le dipôle d'absorption, la situation serait inversée.

De façon plus quantitative, les résultats du calcul présenté à la section 2.2.11.4 donnent pour le cas d'une particule avec un seul dipôle d'absorption excité à 2 photons et aligné avec le dipôle d'émission sont regroupés dans le tableau 4.19 afin de les confronter à l'expérience. Notons tout de suite que la comparaison ne peut être que semi-quantitative car d'une part l'émission de la bille n'est sûrement pas purement dipolaire, d'autre part, comme nous le verrons à la section 4.6.13 et 4.6.14, le contraste de la rotation dépend très fortement de la puissance laser excitatrice utilisée. Compte tenu de l'hétérogénéité des échantillons étudiés en terme de photoluminescence et du fait que le contraste de rotation dépend fortement de la puissance¹⁸ (voir section 4.6.14) l'accord avec la théorie est satisfaisant et même meilleur si on considère un angle moyen de 12 degrés entre le dipôle d'absorption et le dipôle d'émission. Cela confirme l'hypothèse que le rayonnement de la photoluminescence est, en première approximation de type dipolaire, et qu'il n'y a qu'un faible angle entre la direction d'absorption et la direction d'émission. Cependant le contraste de rotation pour une détection qui ne tient pas compte de la polarisation est trop faible.

En outre, l'expérience montre, d'une part qu'il y a un décalage vertical des amplitudes des courbes de corrélations entre la voie x et y et d'autre part que le temps de diffusion apparent

¹⁷Le contraste de 1,5 est plus grand que ceux présentés auparavant ($\simeq 1$) car ici la détection tient compte de la polarisation d'émission ce qui augmente le contraste de rotation.

¹⁸Je présente ici une courbe obtenue avec une puissance de 3 mW. A cette puissance un nombre suffisant de billes émettent de la luminescence sans que le contraste n'ait encore beaucoup chuté.

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

n'est pas exactement le même entre la voie en x et la voie en y . Le modèle décrit à la section 2.2.11.5 prévoit ces changements mais avec une amplitude moindre. L'étude présentée à la fin du chapitre 2 servira de piste pour comprendre ces phénomènes. La compréhension du décalage entre les différentes courbes pourrait étayer l'utilisation des coefficients de contraste de rotation dans l'analyse du diagramme d'absorption/émission de la particule.

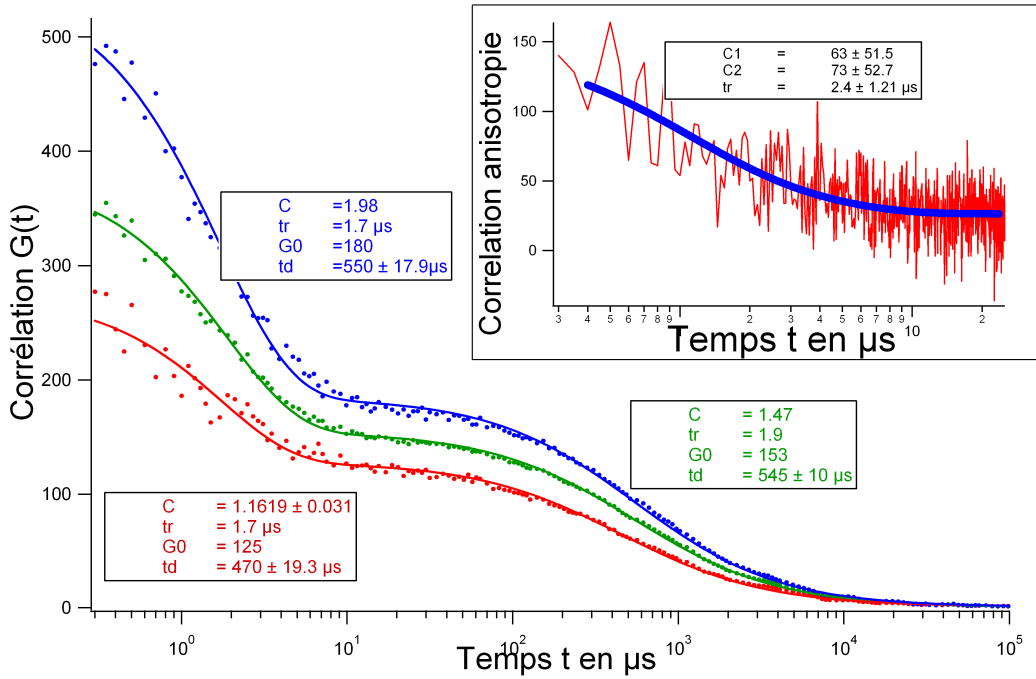


FIG. 4.18 – Courbes de corrélation du signal de photoluminescence de billes de 20 nm excitées à $d = 789$ nm avec une puissance de 3 mW. Le signal est séparé par cube séparateur avec une voie de polarisation parallèle au laser (courbe en bleu) et une voie de polarisation croisée (en rouge). En vert la somme des deux voies i.e une courbe équivalente à celle présentée sur la figure 4.10. En encart, la corrélation de l'anisotropie de la même expérience.

	x	y	$x + y$
Expérience	2	1	1.47
Dipôle excité à 2 photons alignés	2,14	0,63	1,8
Dipôle excité à 2 photons avec un angle de 12 degré	2.1	1	1,79

FIG. 4.19 – Tableau récapitulant les coefficients de contraste de rotation normalisés mesurés expérimentalement et les coefficients calculés à la section 2.2.11.5. x est la direction de polarisation du laser, y la direction perpendiculaire.

En encart de la figure 4.18 est présenté la corrélation d'anisotropie du même signal. Cette dernière est non nulle. Il s'agit d'une nouvelle preuve que l'on observe effectivement la rotation

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

des billes. Cette méthode a l'intérêt de ne faire apparaître que les fluctuations en polarisation du signal, tout autre aspect temporel comme la diffusion ou un hypothétique mouvement des ligands causant un clignotement de la particule avec un temps caractéristique de la μs n'apparaissent pas sur la corrélation de l'anisotropie.

4.6.9 Évolution de la brillance d'une nanobille avec son diamètre

La figure 4.20 montre l'évolution de la brillance des billes en fonction du diamètre de la particule ¹⁹. Cette expérience a été réalisée avec des billes de 10,15,20 et 30 nm, car au delà, le piégeage des billes par le laser rend l'interprétation des résultats très délicate. L'expérience est réalisée pendant un temps assez long pour qu'il y ait une bonne statistique i.e. qu'un nombre significatif de billes ait traversé dans le volume focal. La brillance est obtenue en divisant le nombre total de photons collectés par :

1. le temps de l'acquisition
2. le taux d'occupation²⁰ moyen dans le volume focal par les billes, obtenu par ajustement de la courbe de corrélation ($1/G_0$ à un facteur près).

L'analyse de la courbe montre que la dépendance en puissance de l'intensité du signal peut être décrit par une loi de puissance 3,5. Ce résultat est à comparer aux expériences de [Dulkeith et al., 2004] réalisées sur des billes similaires avec une excitation à un photon où la photoluminescence augmente avec le volume de la bille. Au vu de l'interprétation de l'ensemble des résultats qui sera discutée à la section 4.7, l'ajustement de la courbe 4.20 par une loi de puissance est phénoménologique et la puissance obtenue ne traduit pas de réalité physique particulière.

Même si la mesure n'est pas parfaite, la méthode reste très efficace car elle arrive à dégager une tendance à partir d'échantillons a priori hétérogènes en terme de photoluminescence. En effet, la comparaison directe de deux billes de tailles différentes n'a pas vraiment de sens car, comme ont pu le montrer les expériences du 4.6.4, il y a une grande disparité en terme de luminescence d'une bille à une autre, et ce même pour des billes de même taille. La même expérience sur des échantillons déposés serait longue et délicate dans la mesure où pour chaque bille il faudrait retrouver la polarisation pour laquelle le signal est optimum (ce qui est encore plus difficile quand on considère les particules dont le dipôle est hors plan).

¹⁹L'évolution du temps de diffusion en fonction de la taille, obtenue avec ces mêmes données, est présentée au paragraphe 1.3.3.1

²⁰Diviser par le taux d'occupation revient à comparer le signal d'une bille de 30 nm diffusant dans le volume focal avec un temps 3τ au signal de 3 billes de 10 nm diffusant dans le volume focal avec un temps τ

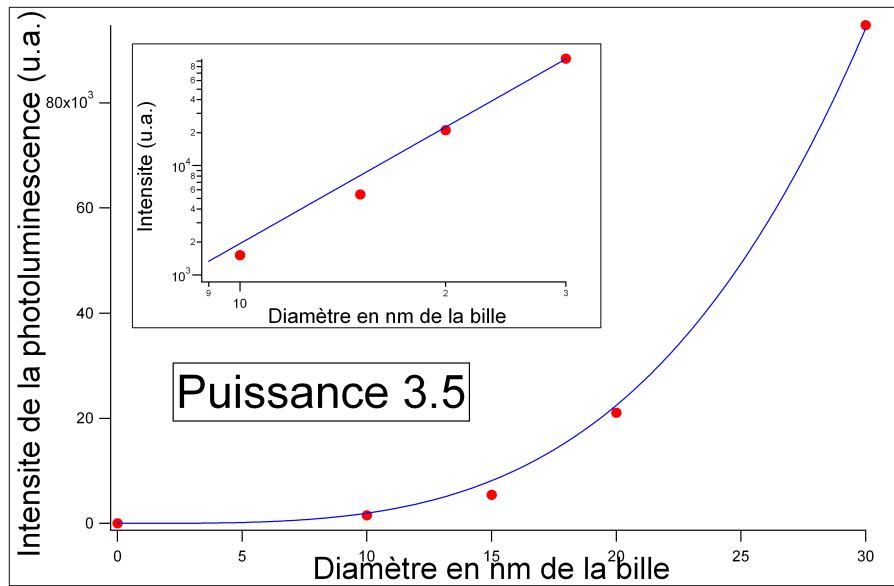


FIG. 4.20 –Évolution de la brillance moyenne de la photoluminescence excitée à 2 photons à 815 nm de la bille (en unité arbitraire) en fonction de son rayon. La puissance laser est de 13 mW. L’ajustement par une loi de puissance donne une évolution avec une puissance 3,5 de la luminescence des nanobilles avec leur diamètre. L’ajustement est astreint à passer par le point (0,0)

4.6.10 Etude de l’anisotropie de forme des billes

L’expérience présentée au 4.6.4 peut être analysée en ne sélectionnant parmi les bursts de diffusion Rayleigh que ceux ayant une contrepartie en luminescence. Il est ainsi possible en analysant le signal Rayleigh, dont on connaît presque parfaitement la physique, d’obtenir des informations sur la forme des objets qui ont photoluminescé. En particulier, l’observation d’une composante de rotation dans la corrélation d’un signal Rayleigh traduit le fait que la particule est anisotrope ; a contrario, l’absence de cette contribution prouve que la particule est sphérique.

La corrélation du signal total de diffusion Rayleigh des billes ne montre absolument aucun signe d’anisotropie. Cependant, certaines billes, minoritaires, en particulier celles qui ont émis de la luminescence, pourraient être anisotropes mais voir leur contribution inobservable par effet de moyenne par la majorité des billes qui, elles, sont sphériques. Insistons sur le fait que cette mesure est assez originale. En utilisant la corrélation croisée des fluctuations de deux signaux de nature physique différente (diffusion Rayleigh et photoluminescence des métaux nobles) la connaissance du comportement du premier (ici la diffusion Rayleigh) permet d’obtenir des informations nouvelles sur le second.

La comparaison quantitative du signal de diffusion Rayleigh et la photoluminescence présente cependant une difficulté expérimentale. Une bille d’or doit avoir un diamètre de l’ordre

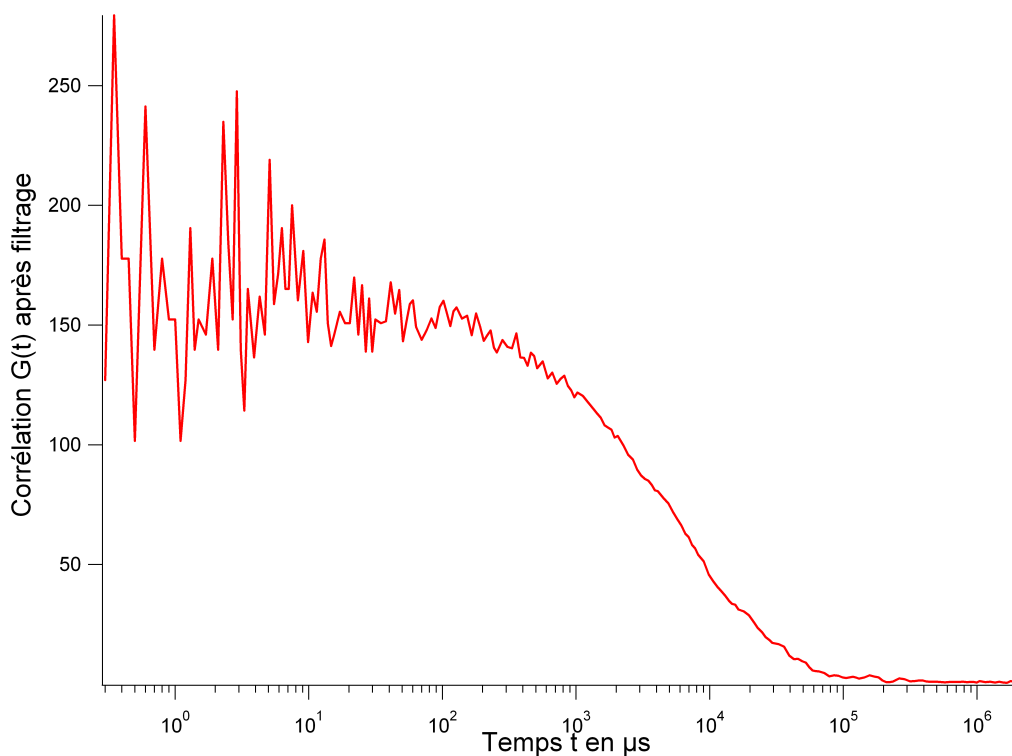


FIG. 4.21 – Courbe de corrélation du signal de diffusion Rayleigh à 815 nm de billes d’or de 50 nm de diamètre. Les billes ont été triées pour ne conserver que celles qui ont émis de la luminescence. La puissance sur l’échantillon est de 2 mW, l’effet de piégeage bien que présent, est faible

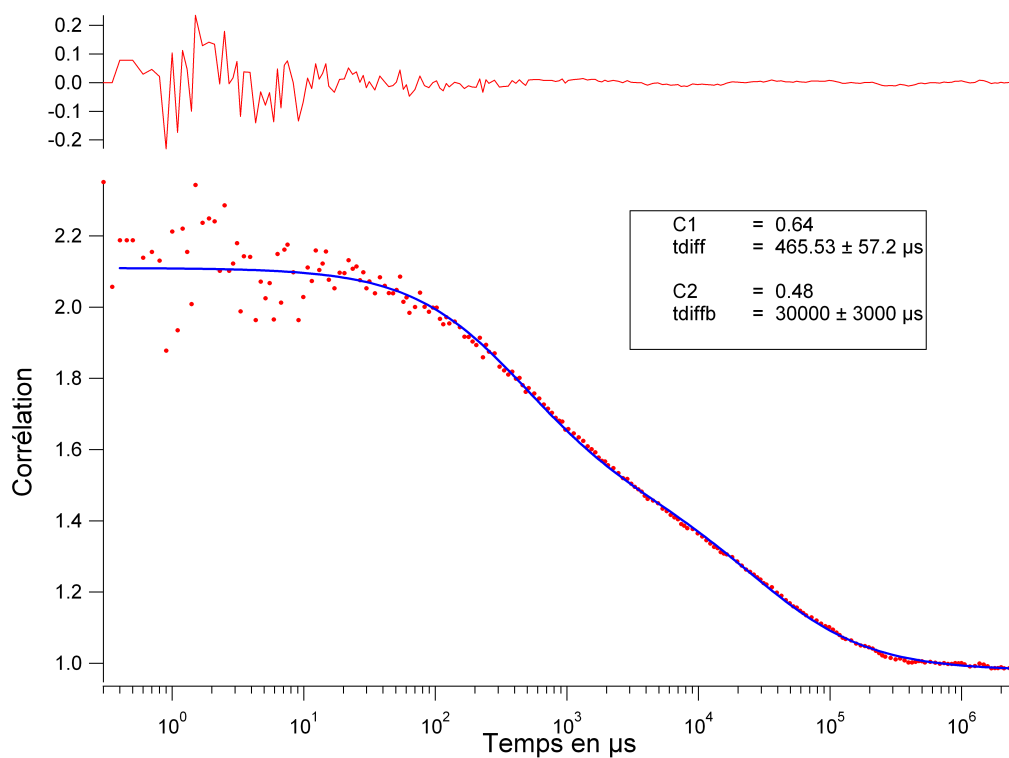


FIG. 4.22 – Courbe de corrélation du signal de diffusion Rayleigh à 976 nm de billes d’or de 50 nm de diamètre ayant émis de la luminescence. La puissance sur l’échantillon est de 9 mW. A cette puissance une très large majorité de billes émettent de la luminescence

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

de 50 nm pour être observée avec un rapport signal sur bruit suffisant à 815 nm en diffusion Rayleigh (cette dernière évolue comme d^6). Cette taille correspond aussi à l'apparition d'un piégeage de la bille²¹. Il s'agit alors de trouver une fenêtre de puissance pour laquelle un pourcentage suffisant de billes luminescent sans pour autant que les effets du piégeage ne perturbent l'analyse.

Les figures 4.21 et 4.22 présentent la corrélation du signal de diffusion Rayleigh de billes d'or de 50 nm luminescentes. Cette population de billes a été sélectionnée par un filtrage synchrone avec le signal de luminescence sur l'autre voie du montage. L'expérience a été réalisée avec une puissance de 2 mW. Bien que la courbe montre que les billes sont légèrement piégées (le temps de diffusion est un peu long pour des billes de ce diamètre), elles ne possèdent pas de contribution à la fonction de corrélation aux temps courts (i.e. inférieurs à $\sim 10 \mu\text{s}$). En d'autres termes, les billes luminescentes ne présentent pas d'anisotropie de forme. La courbe de corrélation présente du bruit car à 2 mW la plupart des billes ne luminescent pas et par conséquent la courbe de corrélation de diffusion Rayleigh n'a été calculée qu'à partir du signal de quelques dizaines de billes seulement.

Une autre manière de procéder pour ne conserver que les billes luminescentes consiste à augmenter la puissance jusqu'au seuil pour lequel presque toutes les billes luminescent. Le signal de diffusion Rayleigh dans de telles conditions est présenté sur la figure 4.22 (il y a alors 9 mW sur l'échantillon). Le piégeage est alors manifeste, cependant aucun signe de corrélation dû à une rotation n'est visible.

La même expérience²² serait encore plus sensible en comparant le signal de luminescence non pas à la diffusion Rayleigh mais au signal de génération de seconde harmonique (SHG). Ce dernier est extrêmement sensible à toute anisotropie de forme de la bille. Nous n'avons cependant pas détecté de signal exploitable de SHG sur les billes d'or en solution en les excitant à 976 nm pour des puissances allant jusqu'à 15 mW, ce qui est d'ailleurs une autre preuve de leur isotropie de forme.

Ces expériences prouvent donc que l'anisotropie observée sur le signal de luminescence ne

²¹Rappelons que les deux n'ont a priori aucun lien comme le montre les billes de 20 nm qui luminescent sans être piégées

²²Il existe a priori une troisième méthode. Si on suppose que l'émission et l'absorption de la nanoparticule sont de type dipolaire (cela a été montré dans les sections précédentes), l'anisotropie de forme de la nanoparticule donne naissance à 3 temps de rotation dans la courbe de FCS : $\left\{ \tau_r, \frac{6}{5+r^3} \tau_r, \frac{6}{2+4r^3} \tau_r \right\}$ où τ_r est le temps de rotation de la particule sphérique et $r = \frac{l_{vert}}{l_{horiz}}$ est le rapport de forme ($r > 1$) de la particule. Ces 3 temps doivent être assez distincts pour pouvoir être résolus dans la courbe de corrélation. Cependant avec $\tau_r \sim 1 \mu\text{s}$ il faudrait un temps de rotation plus court d'environ un facteur 2 soit $\tau_r \sim 0.5 \mu\text{s}$ qui nous entraîne dans les limites de résolution du montage. Avec une carte de comptage ayant une meilleure résolution temporelle et des temps mort d'APD plus faibles on pourrait utiliser directement la courbe de FCS de la photoluminescence pour obtenir des informations sur l'anisotropie des objets étudiés. Notons que dans un milieu visqueux la courbe de corrélation ne présente qu'un seul temps de rotation.

provient pas de billes "diffformes". Les billes sont bien sphériques : il faut chercher les causes d'anisotropie ailleurs.

4.6.11 Excitation dans l'UV

L'excitation à 2 photons à 800 nm peut a priori s'effectuer à un photon avec une longueur d'onde voisine de 400 nm. On utilise le rayonnement obtenu par doublage de la fréquence laser. L'expérience est cependant délicate à réaliser car à ces longueurs d'onde, la plupart des éléments du montage optique (lentille, ressort pour tenir le cube de filtrage, lamelle de verre, ...) deviennent fluorescents. Ce signal peut partiellement être filtré temporellement grâce au microtime. On s'assure que le signal mesuré est bien linéaire avec la puissance sur des billes déposées sur des lamelles de verre. Le spectre d'émission de la bille n'est pas mesurable car noyé dans le bruit de fluorescence du montage.

Première constatation, le signal émis par les billes est beaucoup moins intense que pour l'excitation à 2 photons. Il faut des puissances relativement importantes pour une excitation à un photon (1 mW sur l'échantillon) pour arriver à détecter la luminescence des billes de 50 nm dans l'eau. Ce besoin de puissance oblige à retirer le trou de filtrage sur la partie excitation du montage, ce qui conduit à un faisceau excitateur très éloigné d'un mode TEM_{00} . Deuxièmement, le signal est très dépendant de la longueur d'onde utilisée. Le signal n'est plus détectable au delà de 420 nm. Il augmente jusqu'à 390 nm, qui est la limite de notre montage, car en deçà le rendement du cristal doubleur n'est plus suffisant. Notons qu'avec des photons avec une longueur d'onde de 488 nm (soit inférieur à $\lambda_{IB} \simeq 515$ nm) on ne détecte pas de photoluminescence des nanoparticule métalliques²³. Contrairement aux expériences de [Varnavski et al., 2005], la luminosité des bille d'or dépend de la longueur d'onde d'excitation lors d'une excitation monophotonique²⁴.

Les courbes de corrélations obtenues ne sont pas présentées. D'une part le bruit de la fluorescence parasite est assez important et on ne peut pas conclure sur la partie de la courbe de corrélation liée à la rotation de la bille. D'autre part, la puissance utilisée de plus de 1 mW à 400 nm engendre un signal de diffusion Rayleigh très important qui ne peut plus être totalement filtré par les filtres interférentiels.

Le mécanisme d'absorption à 2 fois un photon présenté dans la section 4.3 [Kohei et al., 2005] est une piste pour expliquer la différence de luminosité des billes entre l'excitation biphotonique et monophotonique. L'absorption à 2 fois un photon est en effet un mécanisme encore plus rapide que le mécanisme de photoluminescence décrit à la section 4.3 car une fois la paire

²³L'expérience présentée à la section 5.3.7 est peut-être une méthode pour détecter le très faible signal de photoluminescence qui dans des conditions normales d'utilisation du microscope est noyé dans le bruit.

²⁴Nous n'avons pas de changement de brillance des nanoparticules en modifiant la longueur d'onde de l'excitation biphotonique

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

électron trou crée par un photon, le trou n'a pas besoin de diffuser pour se recombinaison avec un électron de la bande *sp* au dessous du niveau de Fermi. Selon ce modèle, les billes excitées à 2 fois un photon cyclent donc plus vite et absorbent plus de photons par unité de temps qu'avec une excitation monophotonique.

4.6.12 Echange de ligand

Afin d'évaluer l'effet des ligands sur la luminescence, on peut remplacer les ligands existant sur les billes commerciales (à savoir des ions citrates), par d'autres types de ligands. Les ligands de substitution sont ici des ligands thiol avec une chaîne TetraEthyleneGlycol (TEG). Ils seront étudiés plus en détail dans le chapitre 5. La liaison thiol or est plus stable que la liaison électrostatique entre l'ion citrate et l'or [Vericat et al., 2005]. En incubant sous agitation pendant une nuit, une solution de billes d'or dans l'eau avec une solution de ligands TEG dans l'éthanol, la substitution des ligands est totale.

Les courbes de corrélations correspondant à la photoluminescence excitée à 2 photons à 815 nm avec une puissance de 5 mW de billes d'or de 20 nm avec des ligands citrates et des ligands TEG sont présentées sur la figure 4.23. Les billes fonctionnalisées TEG, sont 6 fois plus luminescentes que les billes citrates initiales. D'autre part, les billes sont beaucoup plus facilement piégeables, elles sont a priori devenues beaucoup plus polarisables. En travaillant à une puissance où l'effet de piégeage est négligeable, on peut mesurer l'augmentation du temps de diffusion du à la présence de la chaîne TEG. Le rayon hydrodynamique augmente de 3.6 ± 0.4 nm, ce qui est compatible avec les calculs des chimistes qui ont synthétisé le ligand TEG et qui prévoient 3.1 nm.

Cette expérience confirme donc le rôle important que joue les ligands dans le processus de photoluminescence. De tels effets ont déjà été observés mais à une échelle macroscopique [Lee et al., 2004].

4.6.13 Évolution avec la puissance

L'expérience qualitative présentée 4.6.4 consistant à étudier le nombre de billes qui luminescent en fonction de la puissance excitatrice est reprise quantitativement avec des billes de 20 nm (avec des ligands citrate). A ce diamètre, le signal de diffusion Rayleigh n'est plus observable, mais on a l'assurance que les billes ne sont pas piégées. L'effet de seuil est alors suivi par FCS. L'évolution de la corrélation de la photoluminescence de billes d'or de 20 nm de diamètre excitée à 2 photons à 815 nm en fonction de la puissance excitatrice est montrée figure 4.24.

L'ajustement des courbes de corrélation permet de suivre en fonction de la puissance :

Le temps de diffusion spatiale Il évolue légèrement d'une mesure à l'autre, ne donne pas de signe de piégeage des billes par le faisceau laser ; le temps moyenné sur les 23 mesures

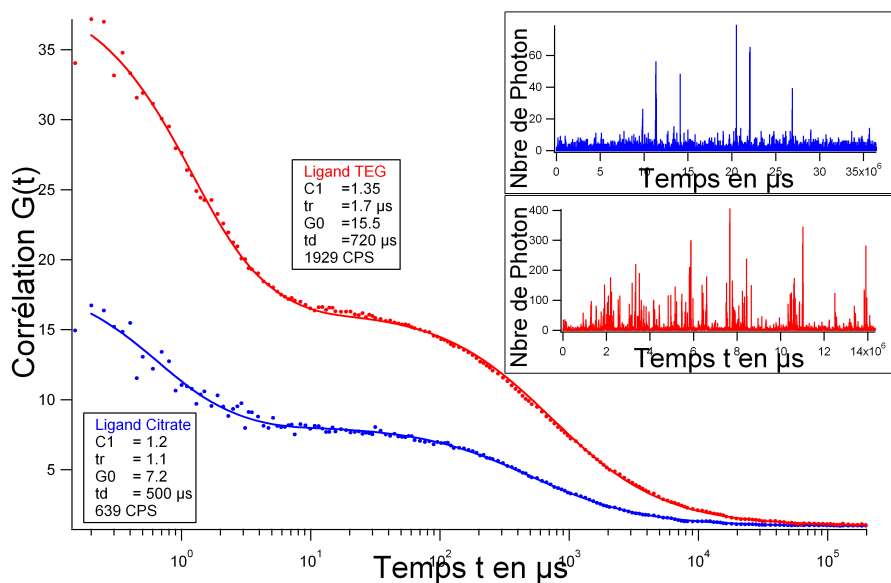


FIG. 4.23 – Courbe de corrélation de billes d’or 20 nm de diamètre excitées à 2 photons à 815 nm avec une puissance de 5 mW. En bleu, les billes ont des ligands citrate, en rouge de ligand TEG. Ces dernières sont diluées par rapport aux billes avec les ligands citrate. Le changement de ligand TEG pour citrate augmente la brillance de photoluminescence des billes d’un facteur 6. Les billes avec ligand TEG commencent à montrer des signes de piégeage, l’expérience a du être filtrée de quelques gros burst et la courbe présente un léger écart avec un modèle à un seul temps de diffusion.

est de 550 μs soit une taille de bille de 20.4 nm.

Le temps de rotation Il fluctue lui aussi mais reste stable²⁵ autour de la valeur moyenne de 1,65 μs ce qui donne une taille de 23.7 nm encore compatible avec la taille obtenue par diffusion translationnelle.

Le nombre de billes luminescentes Il augmente car l’amplitude de la corrélation diminue. On ne peut plus comparer le signal de luminescence au signal Rayleigh comme au 4.6.4, mais on peut supposer un comportement analogue et une saturation du nombre de billes luminescentes à 100%. L’accroissement du nombre de billes luminescentes de 20 nm (figure 4.25) montre d’ailleurs qualitativement le même comportement qu’avec les billes de 50 nm. Le nombre moyen de billes observées dans le volume focal est, au minimum, de 0,54; les données constructeur des billes donnent une concentration en billes de 7×10^{11} mL soit 0.7 billes pour un femtolitre, on atteint presque le seuil pour lequel

²⁵La constance du temps de rotation avec la puissance à un temps correspondant à la rotation brownienne est la preuve que l’on n’observe bien la rotation de la bille et non le réarrangement des ligands. L’augmentation de la puissance s’accompagne d’une augmentation de la température à la surface de la bille qui augmente la vitesse de mouvement des ligands.

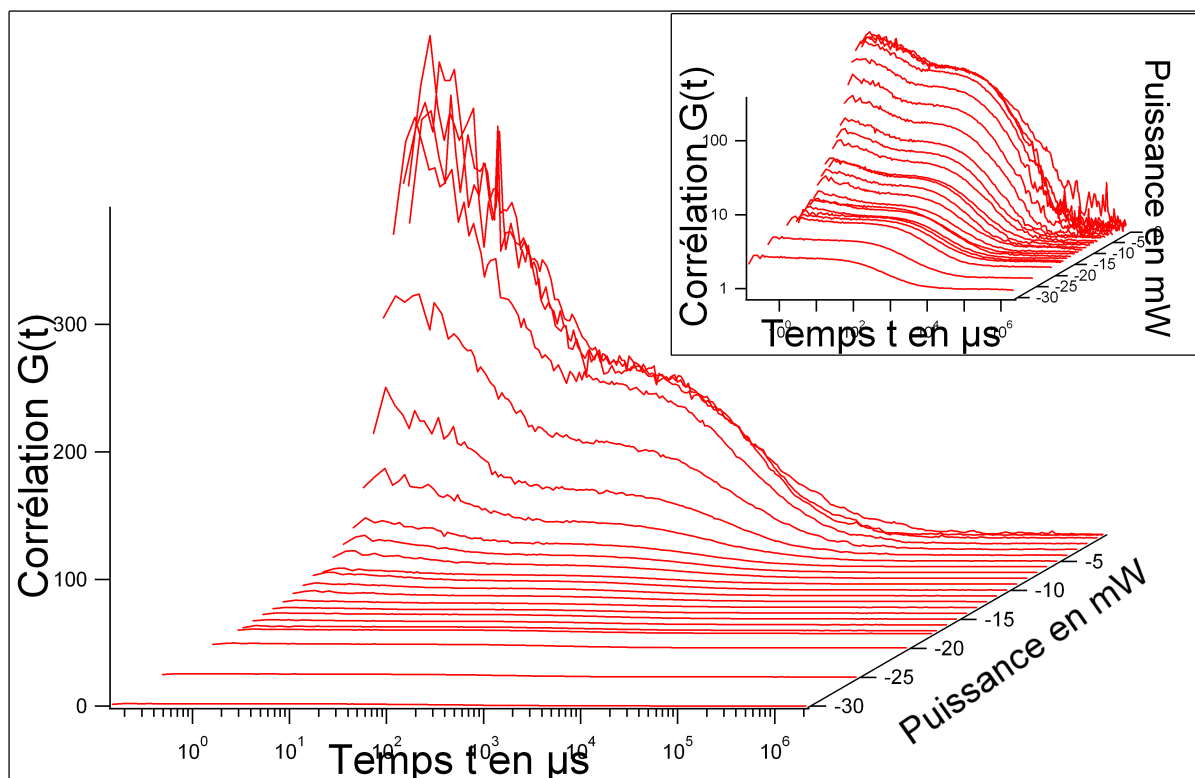


FIG. 4.24 – Évolution de la corrélation du signal de photoluminescence de billes de 20 nm excitées à 2 photons à 815 nm en fonction de la puissance d'excitation. En encart, le même réseau de courbes avec une échelle logarithmique pour la corrélation.

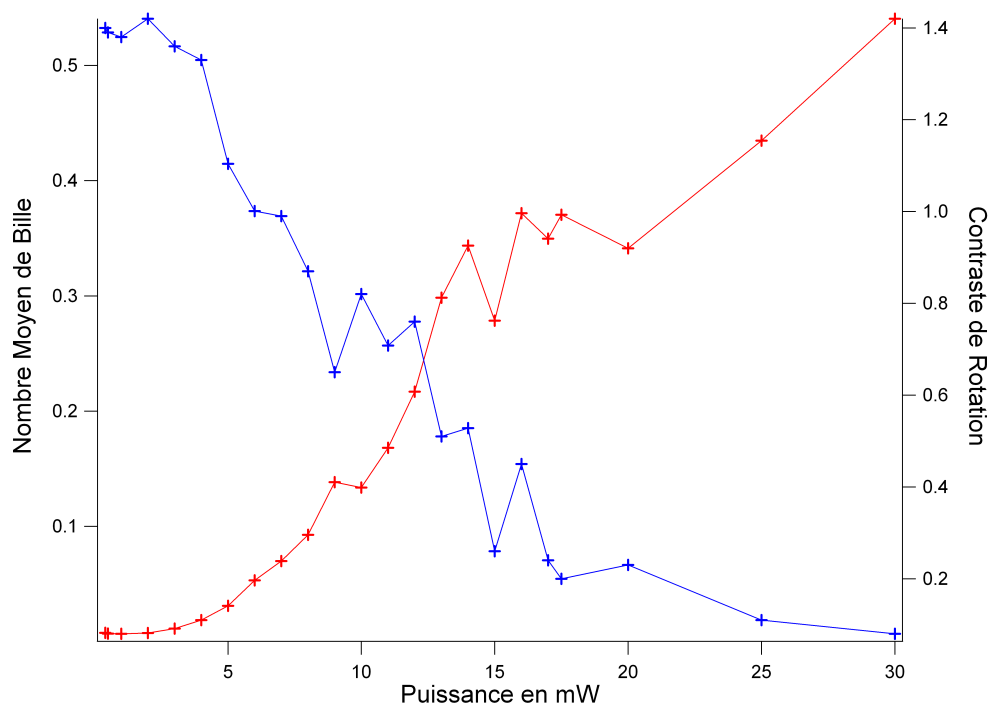


FIG. 4.25 – Evolution du nombre moyen de billes lumineuses dans le volume focal (en rouge) et du contraste de rotation (en bleu) en fonction de la puissance excitatrice. Ces courbes sont obtenues par ajustement du réseau de courbes [4.24](#)

100% des billes luminescent.

Le contraste de rotation Il diminue (voir figure 4.25), l'émission et/ou l'absorption de la bille est donc de plus en plus isotrope.

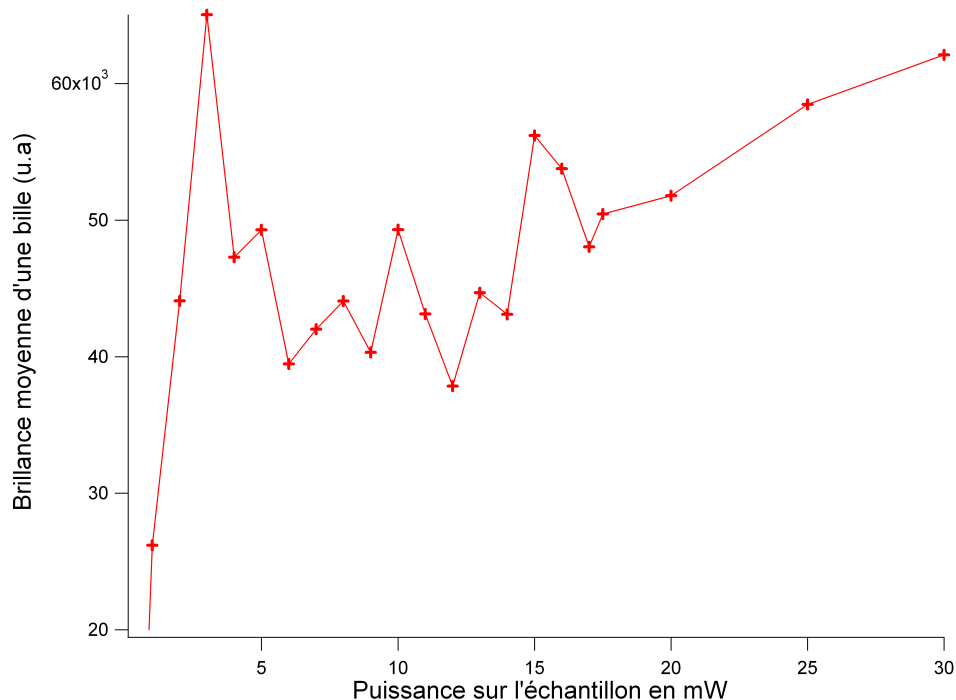


FIG. 4.26 – Évolution de la brillance moyenne des billes en fonction de la puissance laser. Cette courbes sont obtenues après ajustement du réseau de courbes 4.24

Le seuil en puissance nécessaire à l'apparition de la photoluminescence excitée à 2 photons de nanobille d'or est un grave écueil pour leur utilisation comme nanosonde. En effet, pour une puissance laser donnée le nombre de billes détectées par la photoluminescence dans une cellule par exemple est en dessous du nombre réel de billes présentes dans la cellule.

Un autre point intrigant est le fait que la brillance²⁶ de photoluminescence (figure 4.26) n'évolue pas du tout comme le carré de la puissance comme cela a été observé pour une nanobille déposée sur une lamelle de verre (figure 4.5.2.1). De même en regardant le chronogramme de l'intensité pour différentes puissances, on observe que l'intensité maximale émise durant le passage d'une bille dans le volume focal reste quasiment constant (figure 4.27).

4.6.14 Évolution de la polarisation d'émission avec la puissance

Les courbes de corrélations similaires à la section précédente mais avec une analyse en polarisation sur la voie de détection sont présentées sur la figure 4.28. On observe un compor-

²⁶i.e le nombre total de photon mesuré divisé par le temps de l'expérience divisé par le nombre de bille mis en jeu et enfin divisé par le temps de diffusion (voir aussi section 4.6.9)

4.6. CARACTÉRISATION EN SOLUTION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE

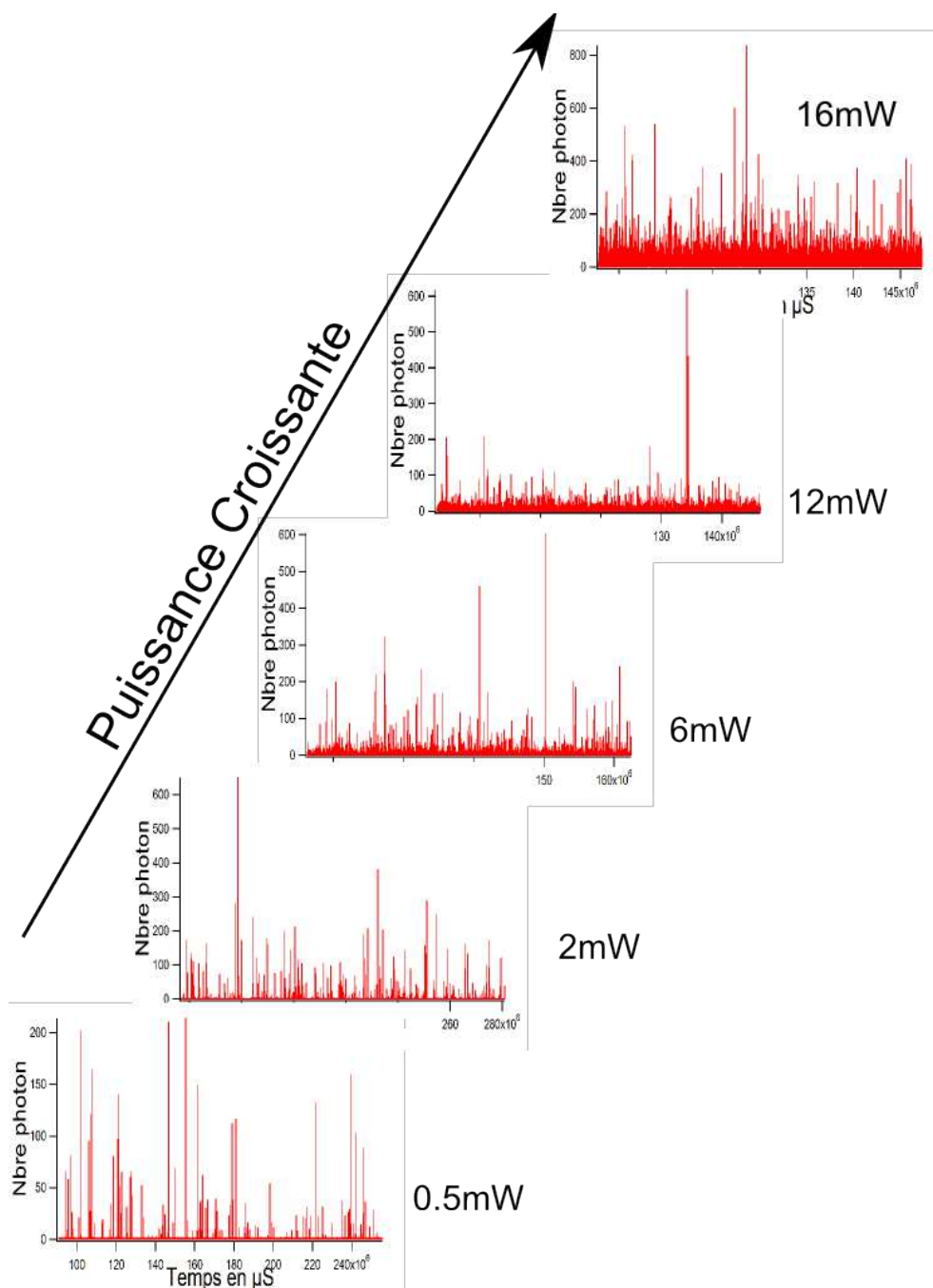


FIG. 4.27 – Chronogramme du signal de photoluminescence de billes de 20 nm excitées à 2 photons à 815 nm pour différentes puissances du laser excitateur.

tement similaire en augmentant la puissance. Le nombre de billes luminescentes augmente et le contraste de rotation diminue. On peut néanmoins ici séparer dans cette chute du contraste ce qui tient de la modification de E_{Ω} de ce qui est dû à la modification de A_{Ω} .

En augmentant la puissance, l'émission devient de plus en plus isotrope. Notons aussi que le temps de diffusion des courbes en x et y devient de plus en plus proche en augmentant la puissance. En d'autres termes les différences entre le volume d'étude apparent pour la direction de polarisation parallèle au laser et celui perpendiculaire s'estompe. La chute de contraste constatée à la section précédente est donc due à la fois à une modification de l'émission de la particule mais aussi à une modification de son absorption. Les deux devenant de plus en plus isotropes au fur et à mesure que l'on augmente la puissance.

4.7 Discussion générale

4.7.1 Résumé des résultats obtenus

L'expérience 4.6.1 de FCS a mis en évidence que l'émission ou l'absorption des nanobilles d'or excitées à 2 photons est anisotrope. L'expérience 4.6.10 de corrélation croisée du signal de photoluminescence et du signal de diffusion Rayleigh a montré qu'il ne s'agit pas d'une anisotropie de forme : les billes sont bien sphériques. L'anisotropie doit donc provenir de l'état de surface de la bille.

Les expériences d'étude de la photoluminescence en fonction de la puissance avec des billes de 50 nm 4.6.4, 20 nm 4.6.13 et en tenant compte de la polarisation d'émission 4.6.14 ont montré qu'à faible puissance la plupart des billes ne luminescent pas et qu'en augmentant la puissance de plus en plus de billes luminescent. Cette augmentation du nombre de billes luminescentes s'accompagne d'une diminution de l'anisotropie de l'émission/absorption. Les expériences 4.6.6 montrent qu'à l'inverse d'une augmentation de puissance, une augmentation de la viscosité augmente l'anisotropie de l'émission.

L'expérience d'étude de la photoluminescence en fonction de la puissance 4.6.13 montre aussi que lorsque l'on augmente la puissance laser excitatrice ce qui augmente a priori le nombre de photons absorbés par bille, l'intensité moyenne de photoluminescence émise par une bille n'augmente pas. Il existe donc un mécanisme qui sature l'émission de photoluminescence de la nanobille d'or. L'expérience d'échange de ligand 4.6.12 prouve qu'un changement des molécules à la surface des nanobilles affecte l'efficacité du processus de photoluminescence. On peut conclure de ces résultats que les ligands sur la surface de la bille jouent sûrement un rôle dans l'anisotropie de la photoluminescence des billes d'or.

Par ailleurs, les expériences avec une polarisation d'excitation circulaire 4.6.7 et avec une analyse de la polarisation d'émission sur la voie de détection 4.6.8 montrent que les billes ont un rayonnement dont le comportement est très proche de celui attendu pour une molécule

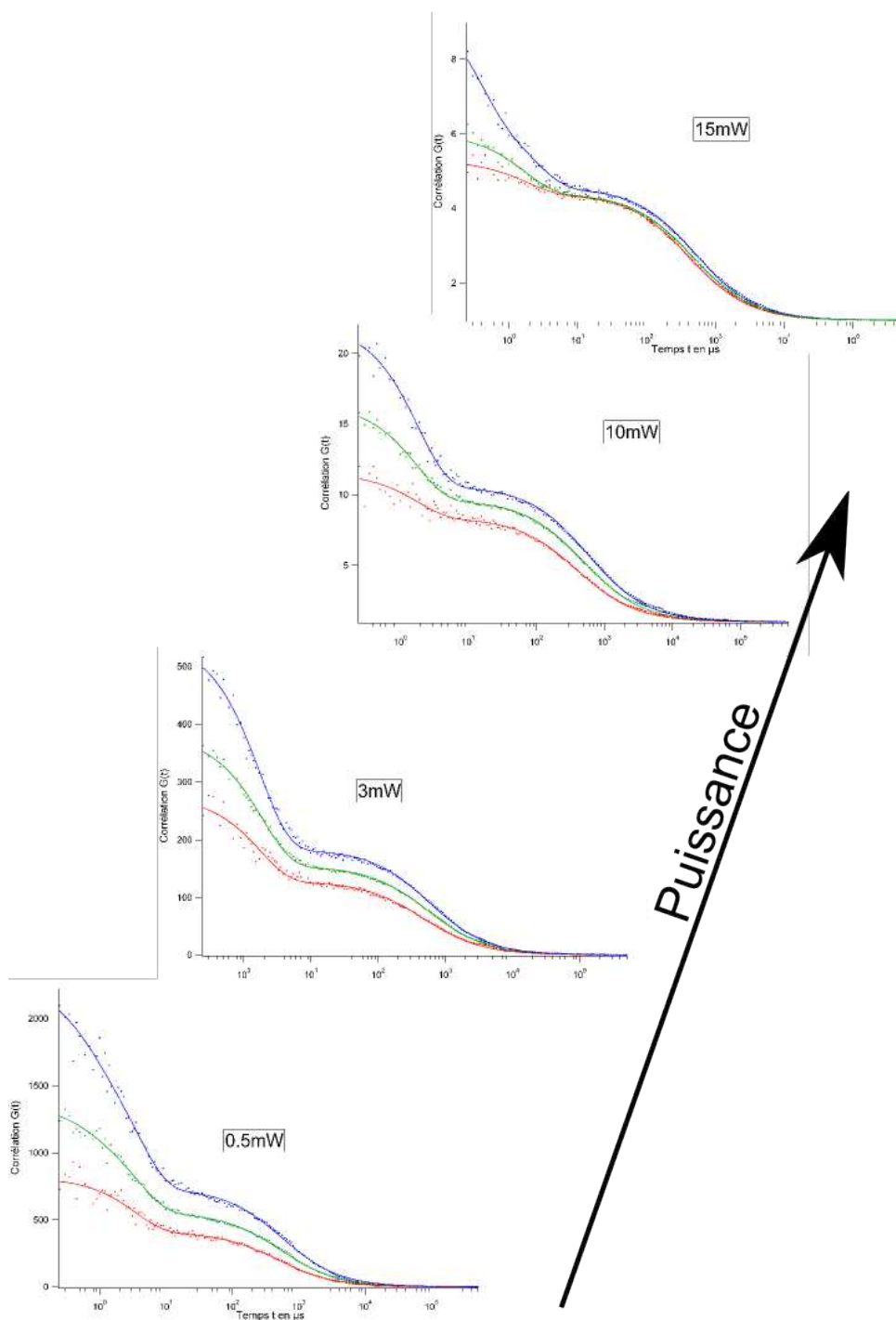


FIG. 4.28 – Évolution de la corrélation du signal de photoluminescence de billes de 20 nm excitées à 2 photon à 815 nm en fonction de la puissance d’excitation en détectant la polarisation d’émission. En bleu, le signal de photoluminescence émis dans la direction parallèle au laser, en rouge dans la direction perpendiculaire, en vert la corrélation de la somme des deux signaux.

ayant un dipôle d'absorption et un dipôle d'émission.

Enfin, l'expérience de dépendance de la photoluminescence en fonction du rayon de la nanoparticule d'or 4.6.9 montre que la luminescence augmente avec la taille de la bille avec une loi de puissance 3,5. L'expérience d'excitation de la photoluminescence excitée à 1 photon 4.6.11 montre que les billes sont plus brillantes lorsqu'elles sont excitées à 2 photons, ce qui pourrait être lié à un mécanisme d'absorption à deux photons en deux étapes plutôt que simultanés.

4.7.2 Proposition d'un mécanisme expliquant l'influence des ligands sur la photoluminescence

Le modèle que nous proposons pour interpréter ces résultats (voir schéma 4.29) consiste à faire l'hypothèse qu'il existe des sites émetteurs sur la surface de la bille (des défauts de cristallinité par exemple) pour lesquels le canal de désexcitation radiatif des électrons excités est prépondérant par rapport aux canaux de désexcitation non radiatifs s'il n'y a pas de ligand présent sur le site²⁷ en question. En d'autres termes, l'efficacité la désexcitation radiative des nanoobjets d'or serait modulée par le positionnement des ligands par rapport aux défauts de la surface de la bille. De tels défauts pourraient être des terrasses ou des aspérités, au même titre que les points chauds en spectroscopie Raman SERS. A un temps t et une température T seule une certaine population des billes sont aptes à émettre de la photoluminescence efficacement. Il s'agit des quelques billes qui luminescent à faible puissance comme par exemple celles qui apparaissent sur les chronogrammes 4.14 et 4.27. Cette population a plus de défauts à sa surface et/ou ses ligands se trouvent statistiquement à des positions favorables à l'apparition de la luminescence. L'augmentation de la puissance laser tend à augmenter la température de la surface de la bille, favorisant la mise en mouvement des ligands sur la surface. Le mouvement des ligands et leur possible désorption peut libérer ou masquer des sites émetteurs. Du fait de ce réarrangement de nouvelles billes sont aptes à émettre de la photoluminescence comme on peut le voir sur la figure 4.25 ou sur les chronogrammes. Mais le mouvement aléatoire des ligands entraîne aussi une dynamique de masquage aléatoire des sites actifs. La conséquence est une orientation aléatoire du dipôle qui émet en fonction du site temporairement actif. En effet, au fur et à mesure que la puissance (et donc la température) augmente la direction du dipôle d'absorption et d'émission du dipôle change de plus en plus rapidement ce qui entraîne la chute du contraste de rotation observée expérimentalement (figure 4.25). Le rayonnement a alors une apparence isotrope (voir figure 4.28).

L'émission de photoluminescence est limitée par le nombre de sites émetteurs possibles. Une fois les ligands mis en mouvement la totalité des billes luminescent mais l'augmentation de puissance ne se traduit pas par une augmentation de l'intensité de la luminescence d'une

²⁷Rappelons qu'un ligand se place entre trois atomes d'or dans la structure hexagonale compacte.

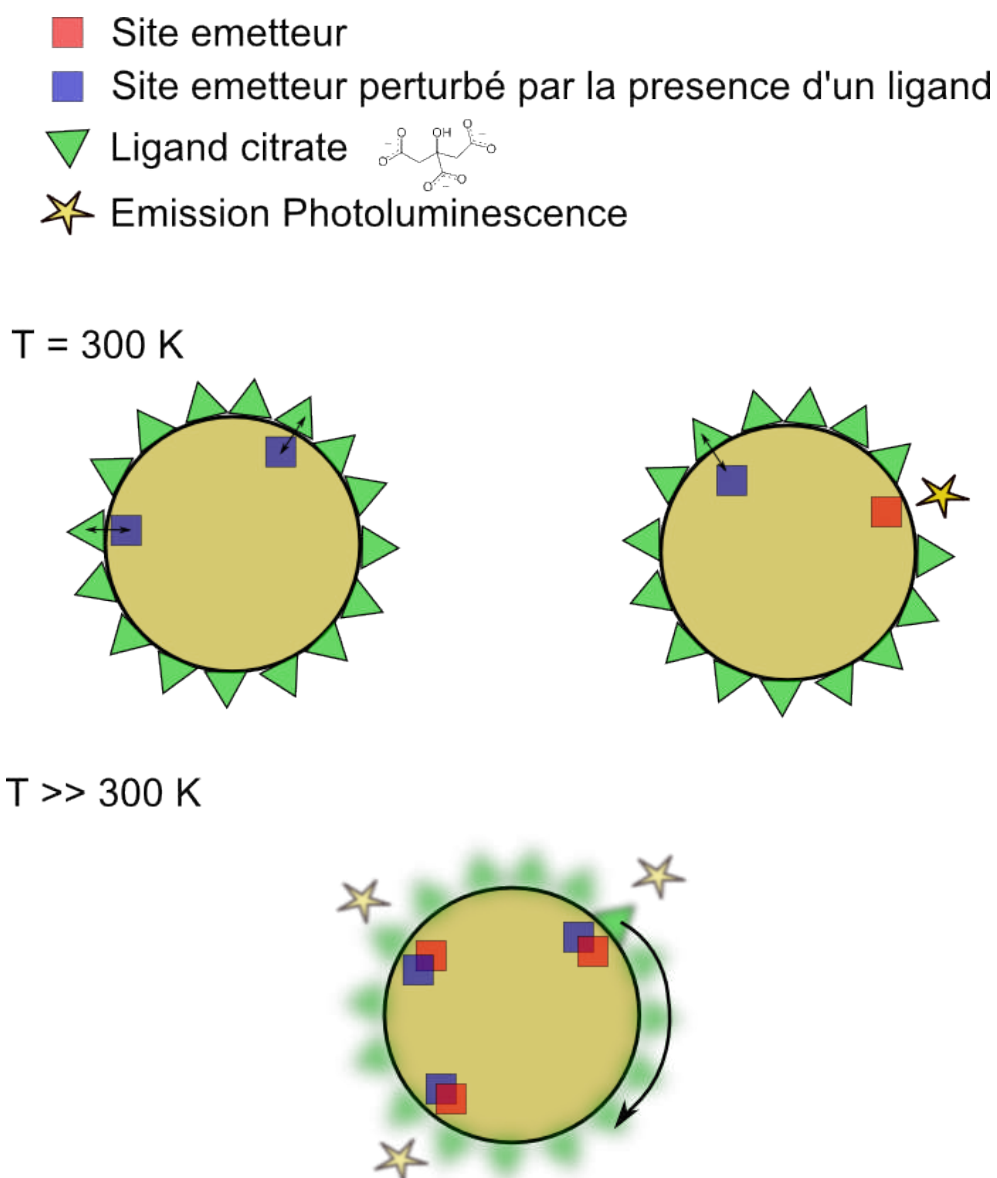


FIG. 4.29 – Schéma du mécanisme envisagé. Pour une particule à température ambiante la plupart des particules sont celles de gauche. Leurs sites émetteurs sont recouverts d'un ligand qui bloque leur émission. Il existe cependant quelques particules comme celle de droite qui ont un site émetteur qui n'est pas recouvert. Ces billes sont luminescentes. Lorsque la température augmente à cause de l'excitation laser, les ligands se mettent en mouvement toutes les particules sont dans la situation schématisée par la particule du bas. Les ligands se déplacent au hasard et activent ou désactivent les sites émetteurs. Toutes les billes luminescent. En moyenne, la brillance est égale à une fraction de ce que la bille pourrait émettre si tous les sites émettaient simultanément. Au delà d'un seuil, la puissance n'entraîne pas d'augmentation de la luminescence émise par la bille car le mouvement des ligands est désordonné.

bille donnée. En effet, augmenter la vitesse de déplacement des ligands conduit au fait qu'ils découvrent transitoirement autant de sites qu'ils en recouvrent. Le nombre moyen de sites émetteurs n'augmente donc pas avec la puissance une fois que les ligands ont été mis en mouvement. Le modèle explique donc aussi le phénomène de saturation de l'efficacité quantique de photoluminescence des billes (voir figure 4.26). Le nombre de sites augmente avec le diamètre de la bille, néanmoins il n'y a pas a priori de loi qui relie directement le nombre de défauts moyens à la taille de la bille. En effet, les processus mis en jeu lors de la synthèse de la nanoparticule font qu'une nanobille d'or de 30 nm n'est pas une simple homothétie d'une bille de 10 nm par un facteur 3. L'augmentation du nombre de défauts lors du passage d'une bille de 10 nm à 30 nm est supérieure à la simple augmentation relative de la surface.

L'augmentation du contraste de rotation de l'émission de photoluminescence dans un milieu visqueux au delà de la valeur limite atteinte pour un dipôle émetteur unique suggère que l'émission est très directive. Ce phénomène est délicat à expliquer. Nous pouvons avancer l'hypothèse suivante. Lorsque le milieu est très visqueux la bille reste plus longtemps dans la situation où son dipôle d'absorption est aligné avec la polarisation du laser. Les ligands se déplacent a priori relativement vite car la température à la surface de la bille est élevée et la viscosité locale est donc faible. La bille dans le milieu visqueux est excitée par N fois plus d'impulsions laser que dans le cas où elle est dans l'eau, et N est le rapport de la viscosité du milieu et celui de l'eau. Durant ces nombreuses impulsions un ligand peut recouvrir le site émetteur sans que la bille n'ait tournée d'un angle important. Tout se passe comme si l'émission et l'absorption de la particule avaient alors un diagramme plus directif que celui d'un dipôle. Le mouvement des ligands libère probablement un nouveau site dans le même temps, mais la lenteur relative de la rotation de la bille empêche une absorption efficace en ce nouveau site et la température à la surface de la bille retombe à la température du milieu où la viscosité est telle que la dynamique des ligands est très lente. Tout se passe comme si l'émission de photoluminescence d'une bille dans un milieu plus visqueux était plus erratique que dans l'eau.

Si la dynamique des ligands peut être raisonnablement évoquée dans le processus de luminescence, le rôle des différents processus mis en jeu nécessite d'être exploré en particulier d'un point de vue expérimental pour confirmer cette hypothèse et la préciser. Un des processus, mal connu, qui peut intervenir est la désorption des ligands et leur rattachement. Les données de la littérature indiquent une stabilité importante de liaison entre les thiols et l'or mais moindre en présence d'oxygène [Yang and Morin, 1997]. Un autre processus pourrait également jouer un rôle. Si les sites actifs présentent des effets géométriques de pointe en raison de leur aspérité, leur activité pourrait être modifiée à une puissance suffisante pour que la géométrie du site soit modifiée. Ces processus seront étudiés dans la suite du projet.

4.7.3 Conclusion

L'état de surface des nanoparticules joue donc un rôle crucial dans la photoluminescence des nanoparticules d'or en solution. La nature des ligands et leur position sur la surface conditionne l'efficacité de la photoluminescence de ces objets.

Nos études montrent que les nanobilles d'or ne peuvent pas être utilisées telles quelles comme nanosondes fiables. En effet, le nombre de nanoobjets détectés dépend fortement de la puissance laser utilisée. Cette conclusion doit cependant être nuancée. Tout d'abord, on peut calibrer la population des nanoobjets métalliques afin de savoir pour quelle puissance la totalité des billes luminescent. D'autre part, un choix judicieux de ligands pourrait peut-être abaisser ce seuil de puissance où toutes les billes luminescent à une puissance de travail compatible avec l'échantillon étudié.

Ces effets ont pu être mis clairement en évidence car nous avons travaillé d'une part avec les nanoobjets les plus simples à savoir des nanobilles et d'autre part avec des études multiparamètres sur des objets individuels. En particulier, l'expérience de corrélation croisée entre le signal de diffusion Rayleigh et la photoluminescence dont les résultats ont permis d'exclure le rôle de l'anisotropie de forme au profit du rôle de l'anisotropie des ligands a été déterminante. Ces effets restent néanmoins à confirmer sur d'autres types de nanoparticules, en particulier des nanobâtonnets qui sont pressentis dans une utilisation en photothérapie. Ces expériences seront réalisées dès que nous aurons des batônnetts en notre possession.

Chapitre 5

Caractérisation de sondes constituées de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des fluorophores

Le projet "MOlecule and Light in Individual MEtal Nanostructure" (MOLIMEN), débuté en janvier 2008, a pour but de rassembler des connaissances fondamentales sur l'interaction entre la lumière et des chromophores attachés à des nanostructures métalliques. L'équipe de Nanospectroscopie a pour rôle de caractériser les échantillons synthétisés par les chimistes à *l'échelle de la particule unique*. A terme, les caractérisations seront faites à la fois sur la fluorescence et le signal de diffusion Raman des particules.

De telles sondes, qui allient la robustesse et la flexibilité en terme de possibilité de fonctionnalisation des nanoparticules métalliques, et la signature spectroscopique propre à chaque fluorophore auraient de nombreuses applications biologiques. Ces sondes pourraient tirer parti de la photoluminescence des nanoparticules métalliques, de la fluorescence des chromophores mais aussi de leurs signaux de diffusion Raman.

5.1 Interaction entre une nanoparticule métallique et un chromophore

L'idée directrice est de modifier la dynamique interne d'un fluorophore pour l'amener à émettre le plus de photons possible.

La présence d'une surface métallique ou d'une nanoparticule métallique près (i.e. jusqu'à un éloignement de plusieurs dizaines de nm) d'une molécule peut changer considérablement la réponse optique de cette dernière. Cela a été montré expérimentalement dans les années 1960 par Drexhage *et al.* [Drexhage, 1968] pour le temps de vie de fluorescence d'un chromophore près d'une surface plane et métallique. Ces travaux ont aussi mis en avant l'annihilation partielle

de la fluorescence ("quenching" en anglais) qui accompagne la diminution du temps de déclin radiatif. Ces effets ont rapidement été expliqués par des modèles théoriques mettant en jeu l'électrodynamique classique [Drexhage, 1968]. Dans les années 1970, de nombreux travaux ont mis en évidence le fait que les surfaces métalliques rugueuses et les nanoparticules peuvent amplifier la réponse optique des molécules, en particulier la diffusion Raman (jusqu'à 5 ordres de grandeur) à travers l'effet nommé Surface Enhanced Raman Scattering (SERS). Là encore, l'un des phénomènes contribuant à cet effet est la modification locale du champ électrique induit par la présence du métal rugueux.

Dans le milieu des années 1990, l'essor de la synthèse contrôlée de NPM fonctionnalisées avec différentes molécules [Brust et al., 1994] a ouvert la voie à l'étude de sondes constituées de fluorophores attachés chimiquement par le biais de ligands à une NPM.

Cependant, les effets d'une NPM sur les propriétés physico-chimiques du fluorophore restent encore difficiles à interpréter et apparaissent de fait comme parfois contradictoires. Les expériences de principe réalisées sur des échantillons déposés montrent la plupart du temps une exaltation de la fluorescence. A contrario, les expériences mettant en jeu des sondes similaires mais en solution montrent quasi systématiquement l'annihilation partielle voire totale de la fluorescence.

Cet axe de recherche a fait et fait encore l'objet de nombreux travaux théoriques qui ont permis de mettre en évidence le rôle des différents paramètres importants comme la nature et la taille de la NPM, la distance entre la molécule et la NPM, l'orientation du dipôle et le recouvrement spectral du spectre d'absorption et de polarisabilité de la NPM et du spectre d'absorption et d'émission du chromophore [Thomas et al., 2004] [Gersten and Nitzan, 1981] [Vukovic et al., 2009].

Afin de décrire les principaux effets de l'interaction NPM-fluorophore à un niveau simple, intéressons-nous tout d'abord aux deux constituants mis en jeu. Nous avons vu au paragraphe 4.1.3 que la réponse optique d'une NPM de taille supérieure à environ 5 nm était relativement¹ bien décrite par la fonction diélectrique $\epsilon(\omega)$ du métal massif. L'absorption de la NPM est liée à la partie imaginaire de la fonction diélectrique. La polarisabilité² de la NPM est fonction de $\epsilon(\omega)$. Les effets de la NPM sont particulièrement sensibles autour de la résonance plasmon. En première approximation, le fluorophore peut-être considéré comme un dipôle ponctuel. Il absorbe la lumière autour de λ_{abs} et la réémet autour de λ_{em} .

¹On peut en particulier rajouter un terme de collision supplémentaire dans le modèle de Drude pour tenir compte du fait que le libre parcours moyen d'un électron est inférieur à la taille de la particule

²En première approximation la polarisabilité est reliée à la fonction diélectrique par une relation de type Clausius-Mossotti :

$$\alpha = 3V' \frac{\hat{\epsilon} - \epsilon_m}{\hat{\epsilon} + 2\epsilon_m}$$

où V est le volume de la NPM, $\epsilon(\omega)$ la fonction diélectrique de la NPM, ϵ_m la fonction diélectrique du milieu. La présence de ligands peut modifier ϵ_m .

La NPM a principalement trois actions sur le fluorophore.

La NPM peut tout d'abord jouer le rôle d'accepteur de l'énergie du fluorophore photoexcité. On peut prendre en compte cet effet par le biais d'un nouveau taux Γ^{NonRad} de désexcitation non radiatif de la molécule vers la particule. Cet échange est très dépendant du recouvrement spectral du donneur, c'est à dire le spectre d'émission du fluorophore, et du spectre d'absorption de l'accepteur, c'est à dire la NPM à travers l'indice imaginaire de la fonction diélectrique et la résonance plasmon. L'échange d'énergie qui en première approximation est de type coulombien, dépend très fortement de la distance d du fluorophore à la NPM. Lorsque le fluorophore est très près ($d \ll R$ où R est le rayon de la NPM) de la NPM, tout se passe comme si le chromophore interagissait avec une surface métallique plane. Dans le cadre d'un modèle dipolaire, la dépendance de l'échange d'énergie pour $d \ll R$ est en $\frac{1}{d^3}$ mais la contribution des termes multipolaires décroissant très vite, pour une particule sphérique, la décroissance effective dès que l'on s'éloigne de quelques nanomètres de la particule s'avère plus rapide, quasi exponentielle [Vukovic et al., 2009].

La NPM peut au contraire faciliter la désexcitation radiative du fluorophore photoexcité. L'interaction électrostatique mutuelle entre la molécule et la NPM se traduit par le fait que le champ électrique du fluorophore polarise la NPM et le champ électrique de la NPM polarisé influence en retour l'émission du fluorophore. On parle de régime de couplage fort. La NPM joue alors le rôle d'antenne pour l'émission du fluorophore. En effet, la NPM rayonne beaucoup plus efficacement que la molécule, car du fait de sa taille et de sa nature métallique, elle peut donner naissance à une grande séparation de charges et donc à un dipôle important. En première approximation, cet effet dépend de la polarisabilité de la NPM qui varie en R^3 et très fortement autour de la résonance plasmon.

La NPM peut enfin augmenter l'absorption du fluorophore. L'effet d'antenne³ joue de façon symétrique à l'excitation. Le champ électrique lumineux polarise la NPM qui à son tour polarise la molécule. La NPM a une plus grande section efficace que la molécule et le nombre de photons absorbés par la molécule peut être plus grand en présence de la NPM si le système est en régime de couplage fort.

Pour résumer, les paramètres qui favorisent l'annihilation de la fluorescence sont :

- Le recouvrement spectral du spectre d'émission du fluorophore et le spectre d'absorption de la NPM.
- La distance entre le fluorophore et la NPM. L'efficacité du transfert d'énergie non radiatif entre le fluorophore et la NPM décroît "exponentiellement" avec la distance métal-molécule. La distance pour laquelle le transfert non radiatif est efficace s'étend de quelques nanomètres jusqu'à une petite dizaine de nanomètres dans les cas les plus défavorables,

³Notons que de façon équivalente, l'augmentation de l'absorption et du taux radiatif est parfois aussi expliquée en termes d'amplification liée à l'interaction du champ avec la NPM sur le champ incident ou émis par la molécule

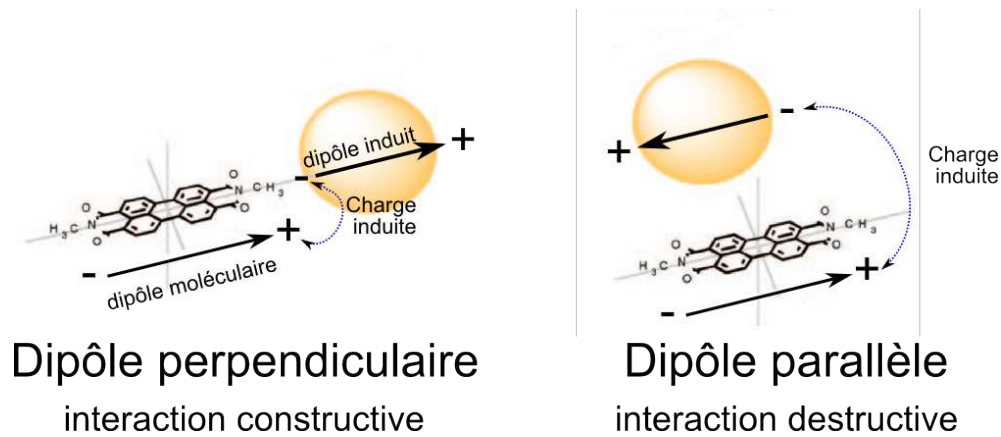


FIG. 5.1 – Orientation du dipôle de la molécule relativement à la surface de la bille. Lorsque le dipôle molécule est perpendiculaire à la surface de la bille crée des charges miroirs sur la bille qui conduisent à une interaction constructive entre le dipôle moléculaire et le dipôle induit. A contrario lorsque le dipôle moléculaire est parallèle à la surface de la bille l'interaction est destructive.

i.e quand le spectre d'émission du fluorophore coïncide avec la résonance plasmon de la NPM.

- La taille de la NPM. Le transfert d'énergie augmente avec la taille de la NPM.

et les paramètres qui favorisent l'exaltation de la fluorescence sont :

- L'intensité du couplage électrostatique entre la NPM et la molécule qui dépend :
 - de la polarisabilité de la NPM qui dépend principalement du volume de la NPM.
 - du recouvrement spectral de la dispersion de la polarisabilité et du spectre d'absorption (respectivement d'émission) de la molécule. Le recouvrement favorise l'absorption (respectivement l'émission) de la molécule par effet d'antenne avec la NPM.
 - de l'orientation de l'axe du dipôle du chromophore relativement à la bille⁴ (voir figure 5.1). Le cas favorable au couplage étant lorsque l'axe dipôle est perpendiculaire à la surface de la NPM. Dans le cas contraire (axe du dipôle parallèle à la surface de la NPM) le couplage entre le fluorophore et la NPM diminue l'émission du fluorophore.
- La distance entre le fluorophore et la NPM. L'augmentation du taux radiatif décroît lorsque l'on s'éloigne de la nanoparticule. La dépendance avec la distance de séparation n'est pas la même que pour le taux non radiatif l'exaltation peut avoir lieu jusqu'à typiquement 20 nm si le système est en régime de couplage fort.

Notons que l'annihilation partielle et l'exaltation sont liées à l'accroissement de taux radiatifs et non radiatifs et qu'ils conduisent tous les deux à une diminution du temps de vie du fluorophore.

Il est donc indispensable de contrôler la distance entre le fluorophore et le métal. Il faut

⁴ Γ^{NonRad} ne dépend quasiment pas de l'orientation du dipôle relativement à la NPM.

éloigner le chromophore suffisamment pour limiter les transferts d'énergie du fluorophore vers la NPM tout en conservant une distance suffisante pour bénéficier encore d'une augmentation du taux radiatif. D'autre part, le ligand qui sépare le chromophore de la NPM joue aussi le rôle d'isolateur électronique entre le fluorophore et la NPM, on ne prendra donc pas en compte les phénomènes d'exaltation/inhibition de type chimique.

En outre, il est important de réfléchir en terme de couple NPM-fluorophore. Si le fluorophore est imposé, il faut choisir une nanoparticule ayant une absorption qui coïncide le moins possible avec le spectre d'émission du chromophore et une polarisabilité la plus grande possible à la fois autour des fréquences d'absorption et autour des fréquences d'émission du chromophore. La réponse spectrale de la NPM dépend de son matériau (principalement l'or ou l'argent voire des alliages [Li et al., 2009]) et de sa forme (nano bâtonnets [Sonnichsen and Alivisatos, 2005], étoile [Nehl et al., 2006], plot [Barbillon et al., 2009], sphère creuse [Liang et al., 2005], triangle [McFarland and Van Duyne, 2003], cube [Sherry et al., 2005], nanocage [Chen et al., 2006], etc.). Si la NPM est imposée, on peut utiliser des fluorophores possédant de grands écarts Stokes entre les bandes d'absorption et d'émission. En effet, l'absorption d'une NPM est relativement étroite autour de la résonance plasmon alors que la polarisabilité chute plus lentement autour de la fréquence de la résonance plasmon. Le fluorophore idéal a donc :

- un spectre d'absorption se trouvant plus haut en énergie que la résonance plasmon, tout en étant dans une zone où la polarisabilité de la particule est encore affectée par la résonance plasmon ainsi le chromophore bénéficie d'une section efficace effective augmentée par rapport au chromophore libre.
- un décalage Stokes tel que le spectre d'émission se trouve plus bas en énergie que la résonance plasmon tout en étant dans une zone où la polarisabilité de la particule est encore importante.

Parmi les travaux sur ce thème, je me limiterai à rappeler les résultats de quatre articles qui illustrent bien le rôle des différents paramètres.

Les travaux de Ginger *et al.* [Chen et al., 2007] mettent en évidence l'importance du recouvrement spectral du fluorophore et la NPM. Ils ont étudié par microscopie de champ noir⁵ le spectre plasmon de nanotriangles d'argent uniques déposés sur une lamelle de verre. Les mêmes NPM sont ensuite fonctionnalisées par des fluorophores se trouvant à l'extrémité d'un brin d'ADN de 5,5 nm. Ils observent une exaltation maximale de la fluorescence d'un facteur 10 lorsque que le pic de la résonance plasmon d'un nanotriangle se situe dans la zone spectrale correspondant à l'écart Stokes entre la bande d'absorption et la bande d'émission du fluorophore.

⁵La microscopie en champ noir consiste à éclairer les échantillons avec un cône de lumière qui converge vers les échantillons. Ainsi, les échantillons sont excités mais la lumière excitatrice n'est pas collectée par l'objectif. La lumière émise ou diffusée par les particules qui en temps normal (i.e. microscopie par transmission) est masquée par la lumière excitatrice, apparaît ici sur fond noir.

Novotny et al [Anger et al., 2006] ont mis au point un système permettant d'étudier très précisément l'influence de la distance sur l'interaction NPM-fluorophore. Les fluorophores sont inclus dans une matrice de PMMA de 2 nm d'épaisseur. Une nanobille d'or de 80 nm diamètre est fixée à l'extrémité d'une fibre optique. La distance entre la nanobille d'or et la surface peut être contrôlée à mieux qu'un nanomètre par un dispositif utilisé en champ proche optique. Les fluorophores sont excités par un laser polarisé radialement au plan focal [Débarre et al., 2004]. En fonction de la distance de la particule à la surface, l'interaction fluorophore-NPM passe continument de l'annihilation partielle de la fluorescence (pour $d < 2$ nm) à l'exaltation de la fluorescence d'un facteur 8 pour $d \simeq 5$ nm. Pour $d \simeq 30$ nm la NPM n'a plus d'influence. Sandoghdar *et al.* obtiennent des résultats similaires dans [Kuhn et al., 2006]. L'exaltation de la fluorescence s'accompagne alors d'une diminution du temps de vie. Cette expérience illustre aussi le rôle de la polarisation. En effet, un laser polarisé radialement crée un champ électrique axial au point de focalisation, c'est à dire selon l'axe nanoparticule-molécule. Seules sont efficacement excitées les molécules ayant un dipôle orienté perpendiculairement à la surface.

Dans [Seelig et al., 2007] Sandoghdar *et al.* étudie l'influence de la distance de séparation entre le fluorophore et des nanobilles de 15 nm de diamètre sur le temps de vie du fluorophore. Cette distance, qui va de 15 nm à 40 nm est contrôlée par le nombre de paires de base d'un brin d'ADN. La diminution du temps de vie pourrait être utilisée pour mesurer très finement la distance fluorophore-NPM.

Lakowicz *et al.* [Zhang et al., 2007] mettent en évidence l'intérêt de NPM plus complexes qu'une simple sphère. Ils étudient l'interaction entre une molécule Cy5 et des nanoparticules de 20 nm de diamètre et des dimères des mêmes particules. Le Cy5 est greffé sur une base d'un brin d'ADN. L'exaltation de la fluorescence est plus importante (exaltation d'un facteur 13 par rapport au Cy5 seul) lorsque le fluorophore se trouve au milieu d'un dimère que lorsqu'il est fixé à un monomère (exaltation d'un facteur 7).

Les expériences présentées plus haut restent néanmoins des expériences de principe dans des situations modèles. D'autres études se focalisent plus sur l'interaction chromophore-NPM dans le cadre de leur utilisation comme sondes. La plupart utilisent des nanostructures d'or sphériques comme coeur de la sonde. Quasi systématiquement, on observe l'annihilation partielle voire totale de la fluorescence des chromophores sur la sonde. Les fluorophores peuvent être fixés aux nanoparticules par un simple mélange d'une solution de nano-objets et d'une solution de fluorophores. Ces derniers se fixent par une interaction de type électrostatique à la surface des nanoparticules. Cette méthode n'est pas vraiment satisfaisante dans la mesure où on ne peut pas contrôler la distance entre le fluorophore et la nanoparticule et qu'il reste une incertitude quant à la solidité de la liaison électrostatique. La meilleure solution est a priori d'utiliser des ligands qui établissent une liaison covalente entre l'or et le ligand d'une part, et le ligand et le fluorophore d'autre part. Les premiers résultats portant sur une sonde de ce type

ont été publiés en 1997 par [Buining et al., 1997]. Dukeith et al. dans [Dulkeith et al., 2002] et [Dulkeith et al., 2005] observent l’annihilation quasi-totale de la fluorescence de la lysamine et du Cy5. Dans une première expérience [Dulkeith et al., 2002], ils fixent la distance fluorophore-NPM avec un ligand à 1 nm et il font varier le rayon de la NPM. Dans une deuxième expérience [Dulkeith et al., 2005], le diamètre de la bille est fixé à 6 nm mais la distance du fluorophore à la bille est modulée par le nombre de paires de base d’un brin d’ADN utilisé comme ligand (de 2 nm à 16 nm). Dans les deux cas, ils observent l’annihilation presque totale (à plus de 99%) de la fluorescence. Notons que la plupart de ces études sont réalisées à l’échelle macroscopique. Ces études font en particulier l’hypothèse que la solution étudiée ne contient que les NPM fonctionnalisées dont la fluorescence est annihilée et éventuellement des fluorophores libres qui se sont détachés des particules. La méthode, très répandue, qui consiste à comparer l’intensité de fluorescence des ligands seuls puis des particules fonctionnalisées n’est pas robuste dès lors qu’il existe une espèce non fluorescente qui n’interagit pas avec l’or. Les études à l’échelle de la molécule unique permettent d’étudier les sondes une par une et d’éliminer par filtrage numérique tout objet dont les propriétés spectroscopiques ou morphologiques ne correspondent pas à celles de la sonde.

L’annihilation partielle de la fluorescence induite par la nanoparticule n’est pas nécessairement un écueil. En prenant le problème à l’envers, ces sondes peuvent devenir des outils extrêmement sensibles en suivant le *retour* de la fluorescence. On peut citer par exemple [Darbha et al., 2007] où les auteurs utilisent des sondes constituées de molécules de rhodamine simplement (i.e. électrostatiquement) adsorbées sur la surface de nanobilles d’or. L’annihilation de fluorescence est quasi-totale. En mélangeant ces sondes à de l’eau du Mississippi, le mercure présent en faible quantité se substitue à la rhodamine et la fluorescence réapparaît. L’utilisation d’un ligand plus spécifique au mercure permet d’avoir une sonde extrêmement sensible dont le taux de fluorescence est proportionnel au mercure présent dans la solution.

5.2 Le projet européen

Le projet européen met en commun les compétences de 4 équipes de recherche.

1. Une équipe de physico-chimistes d’Amsterdam chargés de la synthèse de ligands fonctionnalisés et de spectroscopie.
2. Une équipe de chimistes de l’antenne de Bretagne de l’ENS Cachan, chargés de la synthèse et de la fonctionnalisation de nanoparticules.
3. Une équipe de Pise, à savoir des théoriciens de chimie quantique qui développent des modèles pour caractériser l’interaction entre un objet métallique et des molécules fluorescentes.

4. L'équipe du laboratoire Aimé Cotton chargée de caractériser à l'échelle de la particule unique les propriétés optiques des nanosondes.

5.2.1 Objectifs du projet

La première étape du projet vise à étudier les éléments de base : les ligands avec les chromophores, les nanobilles d'or nues et enfin les sondes composées des nanobilles d'or fonctionnalisées par les ligands portant des chromophores. Un des points importants est de vérifier l'accrochage effectif des ligand-fluorophores aux nanobilles, et ce à l'échelle de la particule unique. Comme nous allons le voir, la première étape du projet s'est révélée plus délicate que prévue. L'étape suivante concernera l'étude de chromophores greffés sur des nanoparticules composées de plusieurs billes. De tels échantillons font apparaître des points chauds qui devraient permettre d'observer des effets d'exaltation du signal de diffusion Raman (SERS). Dans la troisième étape, les études porteront sur des nanoparticules non sphériques.

5.2.2 Description du système de départ synthétisé par les chimistes

Les différentes molécules synthétisées par les chimistes sont présentées sur la figure 5.2. Le ligand fonctionnalisé (FITC-TEG) est composé :

d'un chromophore : la FITC Ce fluorophore possède deux pKa à respectivement 6 et 7, par conséquent il se trouve très majoritairement sous sa forme déprotonée à la valeur du pH où la sonde a été synthétisée, à savoir 9.

d'une chaîne éthylène glycol TEG qui a pour but d'éloigner le chromophore de la bille. La chaîne est composée de 22 atomes. Elle doit a priori conduire à une distance de séparation de l'ordre de 3 nm. La chaîne n'est pas rigide mais la gêne stérique due à l'encombrement des ligands sur la bille limite le mouvement des ligands et les oblige à être déployés.

d'un groupe disulfure il est placé en début de chaîne, il a pour rôle de former une liaison covalente avec un des atomes d'or de la bille⁶. Cette opération rompt la liaison disulfure et déprotone le groupe thiol qui se transforme en thiolate. Notons qu'en solution aqueuse, le groupe thiol possède un pKa de 9.

La fonctionnalisation de la NPM est effectuée en mélangeant des molécules de FITC-TEG et des TEG à une solution aqueuse contenant les nanobilles d'or stabilisées par des ions citrates. Le mélange est laissé toute une nuit sous agitation. Les nanobilles d'or sont plus stables lorsqu'elles sont protégées par ligands de type alkylthiol. Il y a donc échange des ligands citrates par les molécules de TEG et FITC-TEG de sorte à former une monocouche protectrice tout autour de

⁶Des simulations ainsi que de l'imagerie STM ont montré que le thiol partage la liaison covalente avec trois atomes d'or. Le thiol se place dans un interstice de la surface de la structure hexagonale compacte de l'or [Vericat et al., 2005]

la bille. On parle alors de Self Assembled Monolayer (SAM) [Vericat et al., 2005]. On peut faire varier le nombre de FITC-TEG sur la bille en faisant varier le ratio des concentrations FITC-TEG/TEG [Werts et al., 2004]. Les molécules de FITC-TEG non accrochées aux nanobilles d'or sont séparées des nanobilles fonctionnalisées par centrifugation et/ou chromatographie par exclusion de taille. On utilise pour cela des colonnes contenant des billes de silice nanoporeuse. Soumis à la gravité, les différentes composantes de la solution diffusent à travers les billes de silice. Les petites particules (moins de $\simeq 5$ nm) comme les molécules de FITC-TEG explorent les nanopores, alors que les plus grosses particules comme les nanobilles fonctionnalisées ne peuvent y pénétrer. Elles restent donc moins longtemps dans la phase mobile et sont éluées plus vite que les petites particules. Par conséquent, en ne recueillant que les premières gouttes de la solution filtrée par la colonne de chromatographie on ne conserve que les nanobilles fonctionnalisées.

Les chimistes ont effectué les premières mesures de caractérisations macroscopiques. Le spectre d'absorption renseigne sur le nombre de billes (voir section 4.5.1) ainsi que sur la fonctionnalisation effective des billes. En effet, la fonctionnalisation par des ligands TEG change l'indice optique près de la nanobille ce qui se traduit par un décalage de la fréquence plasmon (voir figure 5.3). Des mesures de temps de vie de fluorescence permettent d'observer la diminution de ce dernier pour les sondes fonctionnalisées (voir tableau 5.4). Enfin, l'étude comparée des spectres d'émission entre les fluorophores libres et les fluorophores accrochés aux billes permette de remonter au taux d'annihilation de la fluorescence des molécules de FITC liées aux billes. La méthode employée pour quantifier la diminution de fluorescence consiste à introduire en excès du mercaptoethanol dans la solution de sondes. Cette petite molécule qui possède un thiol prend rapidement la place des ligands qui sont alors libérés dans la solution. Par conséquent, le niveau de fluorescence remonte a priori à celui qu'il serait en l'absence de nanobille d'or. En ce qui concerne les sondes à base de FITC-TEG, la valeur de ce facteur d'annihilation de la fluorescence a été mesuré⁷ à environ 7. Le nombre de FITC-TEG présents sur les billes peut être estimé en connaissant le nombre de sites d'accrochage sur une nanobille d'or. Le nombre de sites peut être obtenu par extrapolation de données expérimentales [Nerambourg et al., 2008] :

$$N_{\text{sites}} = 77.9 \left(\frac{d}{2}\right)^2 \quad (5.1)$$

où d est le diamètre de la particule. Selon cette loi le nombre de FITC attendues sur une nanoparticule de 13 nm avec un mélange de FITC-TEG et TEG dans les proportions 1/9 est :

$$N_{\text{FITC-TEG}} = 330$$

⁷Remarquons que cette méthode est vulnérable à la présence de particules fluorescentes autres que FITC-TEG-AuNP encore présentes dans la solution. En effet, bien que ces particules soient minoritaires, elles peuvent apporter une contribution non négligeable au signal de fluorescence, notamment lorsque la fluorescence des sondes est fortement annihilée.

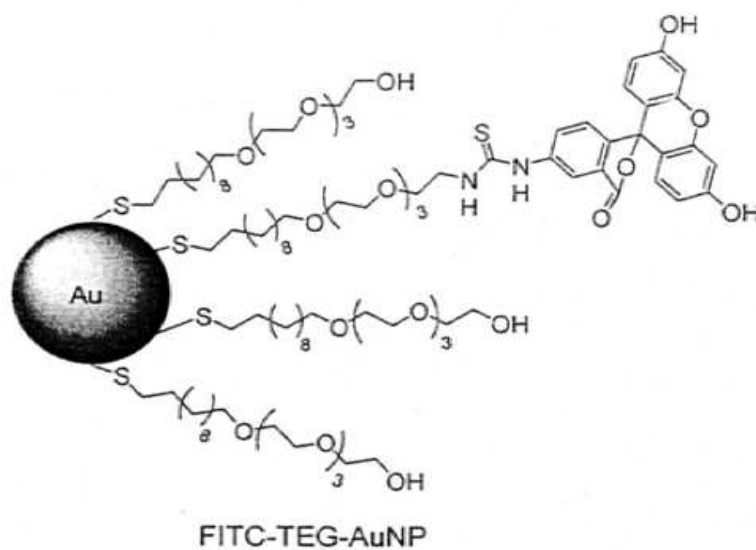
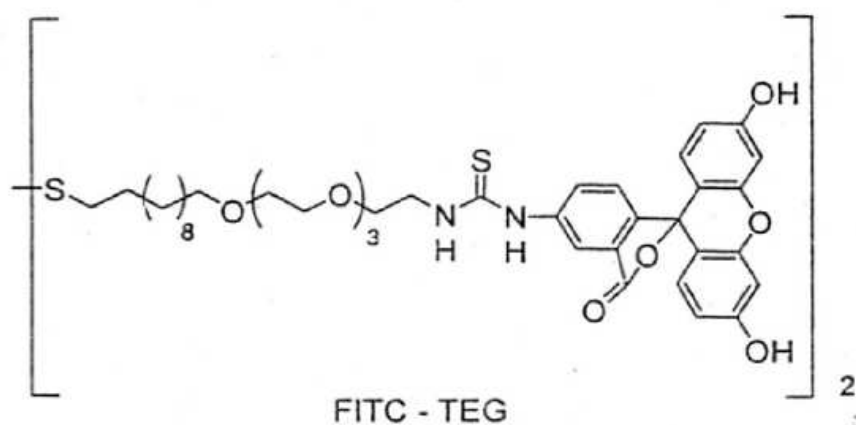
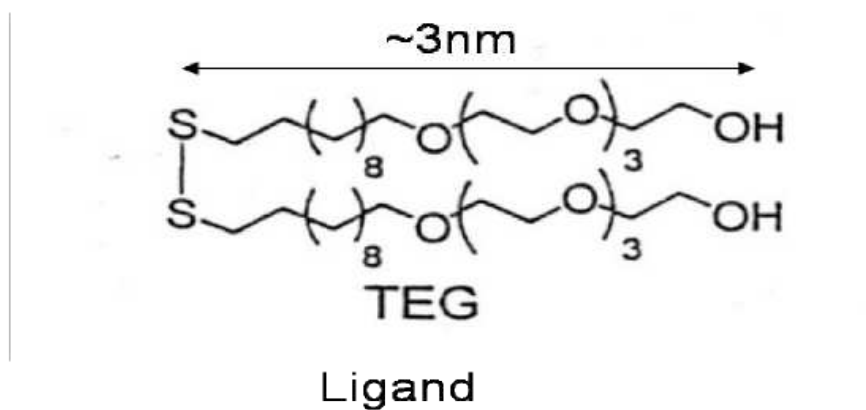


FIG. 5.2 – Formule chimique des molécules utilisées dans ce chapitre. Les dimensions de la bille d'or (13 nm) ne sont pas à l'échelle.

Avec une annihilation de la fluorescence d'un facteur 7, la particule est équivalente à 47 chromophores. Compte tenu de la sensibilité de notre montage optique, elle doit être particulièrement brillante.

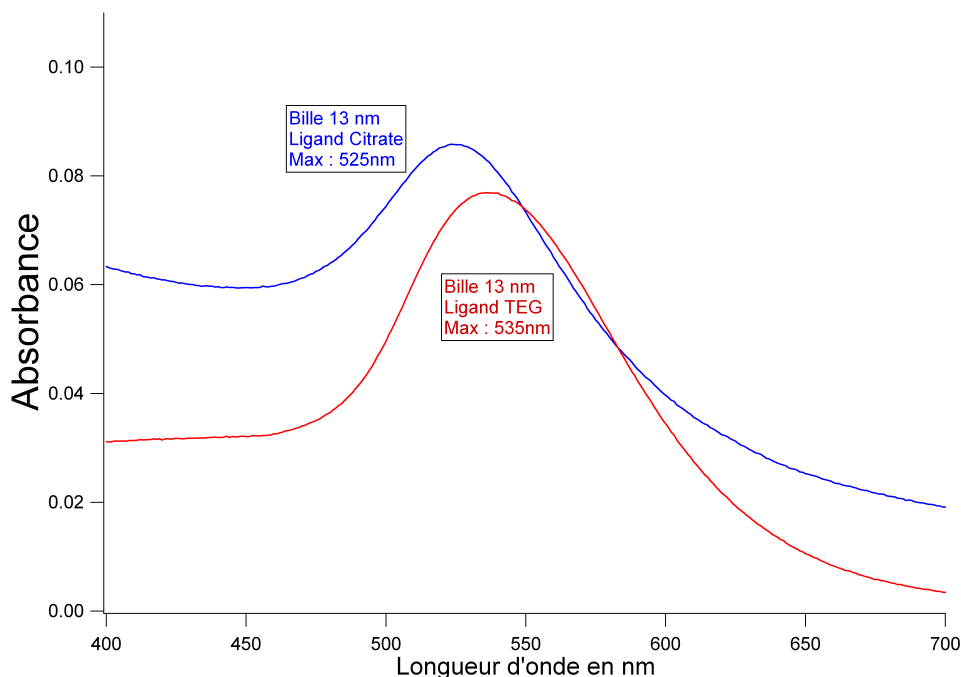


FIG. 5.3 – Courbe d'absorption de billes d'or de 13 nm avec des ligands citrates (en bleu) et des ligands TEG (en rouge). Le changement d'indice optique à la surface de la nanoparticule décale le plasmon vers le rouge. Ceci est la preuve macroscopique que la réaction d'échange de ligands a bien eu lieu.

	ϵ en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Φ_F	τ_F en ns	Φ_f^{Mercapto}	τ_f^{Mercapto}
FITC	8.0×10^4	0.87	4.1	0.87	4.0
butyl-FITC	7.9×10^4	0.54	3.5*	0.52	3.4*
FITC-TEG	1.4×10^5	0.1	2.0*	0.45	2.6*

FIG. 5.4 – Tableau résumant les caractéristiques spectroscopiques mesurées à l'échelle macroscopique des molécules synthétisées. ϵ est l'absorbance, Φ_F le rendement quantique, τ_F le temps de déclin de fluorescence. "Mercapto" signifie que l'on a introduit un excès de mercaptoéthanol dans la solution. La présence d'une astérisque * sur le temps de vie indique que le déclin est biexponentiel, la valeur présentée est alors la valeur moyenne.

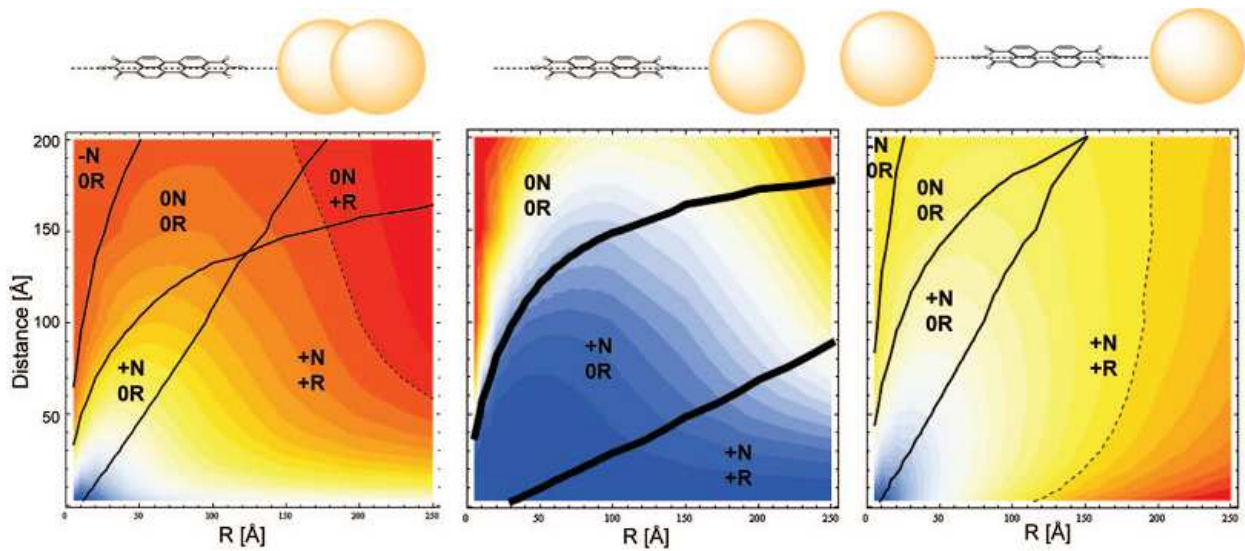


FIG. 5.5 – Prévion théorique de l’effet de billes d’or sur la fluorescence d’une molécule de N,N-diméthylperylene-3,4,9,10-dicarboximide pour différentes tailles de bille, différentes séparations entre le fluorophore et la bille, et différentes configurations de placement des billes (extrait de [Vukovic et al., 2009]). N et R correspond respectivement au taux non radiatif et radiatif, and +,0,- indique une augmentation, une absence de modification ou une diminution du taux par rapport au fluorophore libre. Les traits en pointillés représentent les zones où la brillance d’un fluorophore sur la nanoparticule devient supérieure au fluorophore libre. Les traits en gras délimitent les différentes zones. La couleur code la brillance relative de la sonde i.e le rapport du nombre de photons émis par une molécule libre et une molécule interagissant avec une NPM. Les échelles de couleur ne sont pas comparables entre les 3 graphes

5.2.3 Prévion théorique

Les résultats des calculs menés par le groupe de théoriciens sont publiés dans [Vukovic et al., 2009]. Dans ces simulations, le métal est considéré comme un milieu continu diélectrique caractérisé par sa fonction diélectrique qui a été mesurée expérimentalement. Le chromophore et par conséquent les atomes qui le composent sont traités au niveau quantique. L’interaction entre la molécule et le métal est électrostatique et met en jeu la polarisation mutuelle entre les deux systèmes. La molécule est décrite par un hamiltonien effectif obtenu en additionnant le hamiltonien dans le vide et celui qui correspond aux interactions électrostatiques entre la densité de charge moléculaire (électron plus noyau) et la polarisation du métal qui a été induite par la densité de charge de la molécule. La polarisation de la NPM est exprimée en terme de charges apparentes placées à la surface du métal (et sur la surface d’une cavité abritant la molécule si l’on tient compte du solvant). L’interaction avec la NPM fait apparaître des énergies de transition dont la partie imaginaire est liée à l’absorption de l’énergie du fluorophore par la NPM.

On calcule ainsi le taux de désexcitation non radiative dû à la NPM Γ^{NonRad} . L'exaltation de fluorescence liée à la présence de la NPM est interprétée en terme de dipôle de la NPM induit par le fluorophore. En reprenant les notations de [Vukovic et al., 2009], le taux de désexcitation radiatif Γ^{Rad} ainsi que le coefficient d'absorption A ont pour expression.

$$\Gamma^{\text{Rad}} = \frac{4\omega^3 n}{3\hbar c^3} |\boldsymbol{\mu}_{K0}|^2 \quad A = \frac{2\pi}{3\hbar^2 c n} |\boldsymbol{\mu}_{K0}|^2$$

où ω est la pulsation, c la vitesse de la lumière dans le vide, n l'indice du milieu et $\boldsymbol{\mu}_{K0}$ est le moment dipolaire de la transition entre le niveau fondamental et le niveau excité de la molécule. Ce dernier est la somme vectorielle du moment de transition de la molécule et de celui créé par l'interaction avec la NPM

$$\boldsymbol{\mu}_{K0} = \boldsymbol{\mu}_{K0}^{\text{mol}} + \boldsymbol{\mu}_{K0}^{\text{metal}}$$

Les principaux résultats sont résumés sur la figure 5.5. Notons tout de suite qu'il s'agit du cas où le dipôle de la particule est perpendiculaire à la surface de la bille, de telle sorte que Γ^{Rad} et A sont augmentés par la présence de la NPM. Dans le cas contraire (dipôle de la molécule parallèle à la surface de la bille), la NPM augmenterait Γ^{NonRad} tout en diminuant Γ^{Rad} et A ce qui conduit nécessairement à l'annihilation partielle de la fluorescence. Les simulations concernent la molécule de N,N-diméthylperylene-3,4,9,10-dicarboximide dont l'absorption est centrée à 515 nm et l'émission à 525 nm. Intéressons-nous tout d'abord à la figure du milieu qui concerne le cas d'une seule NPM sphérique en or. L'absorption de l'or à 525 nm est très forte à cause du plasmon de surface. Remarquons qu'il n'y a pas de zone où la fluorescence est exaltée. Cela s'explique par l'inadéquation de la réponse spectrale de la NPM et du fluorophore. Avec le même chromophore mais une bille en argent, les simulations prédisent un effet d'exaltation pour une bille de 25 nm de rayon avec un fluorophore espacé d'au moins 5 nm. Les traits gras séparent trois régions. Celle du bas correspond à une très petite distance entre le chromophore et la particule où l'influence de la bille est très forte, Γ^{NonRad} et Γ^{Rad} sont tous les deux diminués en augmentant la distance. En augmentant la distance on passe dans une zone où seule Γ^{NonRad} augmente. A plus grande distance la NPM n'a quasiment plus d'influence et on retrouve le comportement du fluorophore libre. Les figures sur la droite et la gauche montrent deux géométries qui conduisent à une exaltation de la fluorescence même avec une inadéquation spectrale du fluorophore et de la NPM. Celle de gauche correspond via la superposition de plusieurs billes au cas de nanobâtonnets. L'exaltation a alors lieu lorsque le fluorophore est éloigné de la surface. Au contraire, la géométrie de la figure de droite qui correspond à un fluorophore dans "l'entrefer" de deux nanobilles conduit à une exaltation de la fluorescence lorsque le chromophore se situe près de la surface. Cela est dû au fait qu'avec cette géométrie, le champ associé au plasmon est très localisé entre les deux particules.

Les résultats, plus quantitatifs concernant le cas qui nous intéresse, à savoir une seule nanoparticule sphérique en or, sont reportés dans le tableau 5.6. Avec une particule de 13 nm de

diamètre et un fluorophore espacé à environ 3 nm (voir section 5.3.2) nous obtenons (en supposant que le dipôle de la molécule est perpendiculaire à la surface de la bille) une annihilation de la fluorescence d'un facteur 63. Un ordre de grandeur sépare la prévision théorique de la mesure réalisée à l'échelle macroscopique sur les NPM fonctionnalisées avec de la FITC.

	0,3	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15
0,5	0,000	0,000	0,001	0,013	0,064	0,201	0,423	0,644	0,799	0,888	0,937	0,963	0,996
1	0,000	0,000	0,000	0,003	0,012	0,039	0,096	0,199	0,340	0,498	0,643	0,755	0,963
2	0,000	0,000	0,001	0,002	0,005	0,012	0,027	0,053	0,097	0,160	0,246	0,349	0,795
3	0,001	0,001	0,001	0,002	0,005	0,010	0,018	0,033	0,055	0,089	0,137	0,197	0,612
4	0,001	0,001	0,002	0,004	0,006	0,011	0,018	0,029	0,045	0,068	0,101	0,142	0,481
5	0,001	0,002	0,003	0,006	0,009	0,013	0,020	0,030	0,043	0,062	0,087	0,120	0,398
6	0,002	0,002	0,004	0,008	0,012	0,017	0,024	0,034	0,046	0,063	0,085	0,113	0,349
7	0,002	0,003	0,006	0,011	0,016	0,023	0,030	0,039	0,052	0,068	0,088	0,113	0,321
8	0,002	0,004	0,007	0,014	0,021	0,029	0,037	0,047	0,060	0,076	0,095	0,118	0,309
9	0,003	0,004	0,009	0,018	0,027	0,036	0,045	0,057	0,070	0,086	0,105	0,128	0,302
10	0,003	0,005	0,010	0,021	0,033	0,044	0,055	0,068	0,082	0,098	0,118	0,141	0,307
15	0,004	0,007	0,016	0,041	0,068	0,095	0,121	0,145	0,169	0,192	0,217	0,242	0,395
20	0,005	0,009	0,021	0,058	0,104	0,155	0,204	0,249	0,293	0,330	0,367	0,401	0,565
25	0,006	0,010	0,025	0,073	0,139	0,213	0,292	0,367	0,436	0,499	0,553	0,601	0,794

FIG. 5.6 – Tableau regroupant la brillance relative d'une molécule interagissant avec une nanosphère en or en fonction du *rayon* (ligne) de la NPM et de la distance entre le chromophore et la NPM en nm (colonne).

5.2.4 Objectifs des mesures à l'échelle de la particule unique

La première étape est de confirmer la fonctionnalisation de la NPM par la FITC-TEG. La FCS est une méthode particulièrement bien adaptée à ce but car une particule FITC-TEG-AuNP diffuse beaucoup plus lentement que la FITC-TEG.

Les expériences doivent aussi trancher entre le facteur d'annihilation estimé à un facteur 7 par la mesure macroscopique et celui prédit par la théorie qui vaut 63 dans le meilleur des cas. Une étude par burst donne a priori facilement le résultat. Le montage optique a la sensibilité de détection d'une molécule unique (voir figure 1.18). La brillance attendue pour une particule de type FITC-TEG-AuNP est équivalente à 47 ou 5 chromophores selon le facteur d'annihilation de la fluorescence avec un temps de diffusion plus long qu'une molécule libre, ce qui est plus favorable. Dans les deux cas, le signal est tout à fait détectable.

Enfin, nos mesures ont pour but de caractériser la stabilité de la liaison entre le ligand et la NPM. En d'autres termes, il s'agit d'étudier le vieillissement de la sonde.

5.3 Caractérisation à l'échelle de la particule unique des sondes

5.3.1 Choix de l'excitation

Le montage permet une excitation monophotonique ou biphotonique. Le système chimique quant à lui a deux composantes : la nanostructure d'or et les fluorophores. Selon l'excitation choisie, on peut s'adresser à la nanostructure d'or ou aux fluorophores. Le schéma 5.7 résume la situation. Avec une excitation monophotonique, on s'adresse principalement aux fluorophores⁸. Avec une excitation biphotonique, on induit en plus la luminescence des billes qui a été étudiée au chapitre 4. La fluorescence des fluorophores (FITC) n'est efficacement excitée que si la longueur d'onde est comprise entre 750 et 850 nm. Notons aussi que quelle que soit l'excitation on peut aussi exploiter comme signature de la bille son signal de diffusion Rayleigh si cette dernière est assez grosse (ce signal varie comme d^6 où d est le diamètre de la particule). En pratique, à 488 nm, on peut mesurer ce signal de diffusion pour des billes dont le diamètre est supérieur à 30 nm, en deçà le bruit de diffusion laser de l'échantillon et des optiques domine le signal Rayleigh de diffusion d'une bille unique.

L'étude de la sonde fluorescente est donc plus facile à un photon (avec $\lambda < 520$ nm) car on ne sélectionne que le signal provenant des fluorophores. A deux photons, ce signal se mêle à celui de photoluminescence des billes. On peut cependant ultérieurement discriminer la photoluminescence de la fluorescence temporellement. La désexcitation de la photoluminescence à lieu instantanément à l'échelle de notre résolution temporelle, elle est donc confondue avec la réponse impulsionnelle du détecteur. Au contraire la durée de vie d'un fluorophore est de quelque ns. Néanmoins la fluorescence est annihilée et le temps de vie de fluorescence est plus faible. En première approximation⁹ la diminution du temps de vie est inversement proportionnelle à l'annihilation de la fluorescence. La réponse impulsionnelle de nos détecteurs est de 250 ps. En considérant que le temps de vie de fluorescence de la FITC-TEG est de 3 ns, on peut discriminer la fluorescence de la réponse impulsionnelle jusqu'à une annihilation d'un facteur 24 de la fluorescence .

⁸La photoluminescence des billes excitée à un photon est très faible pour $\lambda > 450$ nm on n'en détecte plus du tout. Notons tout de même que la particule absorbe le rayonnement et peut donc s'échauffer.

⁹Selon l'orientation du chromophore sur la NPM Γ^{Rad} peut augmenter (dipôle perpendiculaire à la surface de la NPM) ce qui diminue le temps de vie tout en diminuant l'annihilation de fluorescence ou Γ^{Rad} peut diminuer (dipôle parallèle à la surface de la NPM) de qui *augmente* le temps de vie tout en augmentant l'annihilation partielle de la fluorescence.

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS.3

La bande d'émission de la FITC dans l'eau est comprise entre 510 nm et 560 nm soit proche de la bande plasmon. L'émission du dipôle est donc amortie par absorption de la bille. Ce choix initial résulte du succès d'une première synthèse de ligands fonctionnalisés FITC-TEG, délicate à transférer avec des molécules avec une bande d'émission plus éloignée du plasmon de la NPM au moment de ce travail.

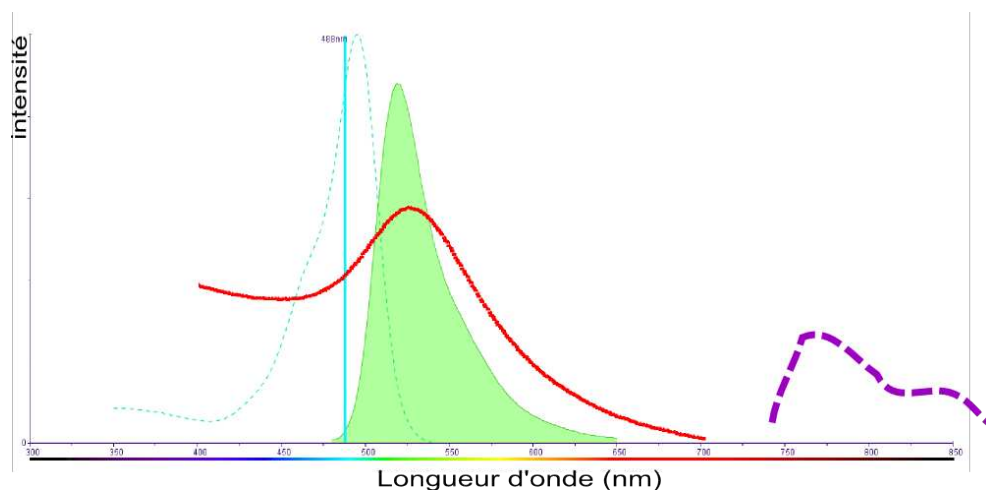


FIG. 5.7 – Schéma concernant le choix de l'excitation pour les sondes. Les spectres d'absorption sont représentés en pointillés (bleu pour un photon et violet pour deux photons (non expérimental)). Le spectre d'absorption de billes de 13nm est représenté en rouge, il est centré à 525 nm. Le spectre d'émission de la FITC est représenté en vert, on peut noter le recouvrement entre le spectre d'émission du fluorophore et le plasmon de la bille.

5.3.2 Caractérisation des billes d'or

Les chimistes ont synthétisé des billes de 13 ± 2 nm dont la taille a été caractérisée par microscopie électronique à transmission. Ces billes sont trop petites pour donner un signal de diffusion Rayleigh détectable. On peut néanmoins étudier leur luminescence. Les mesures de FCS donne un ordre de grandeur de la distance sur laquelle se déploient les ligands TEG. On trouve, en comparant la taille nominale des billes et le rayon hydrodynamique déduit des courbes de FCS, une taille de 2 – 3 nm (voir figure 5.8). Avec des billes commerciales de diamètre 20 nm, et une comparaison directe entre une bille entourée de citrates et une bille fonctionnalisée avec des ligands TEG, nous avons trouvé à la section 4.6.12 une taille de 3.6 ± 0.4 nm pour les ligands TEG. On peut donc estimer que les chromophores sont séparés d'une distance d'environ 3 nm de la surface des nanobilles d'or, en accord avec un calcul simple de la longueur de la chaîne carbonée.

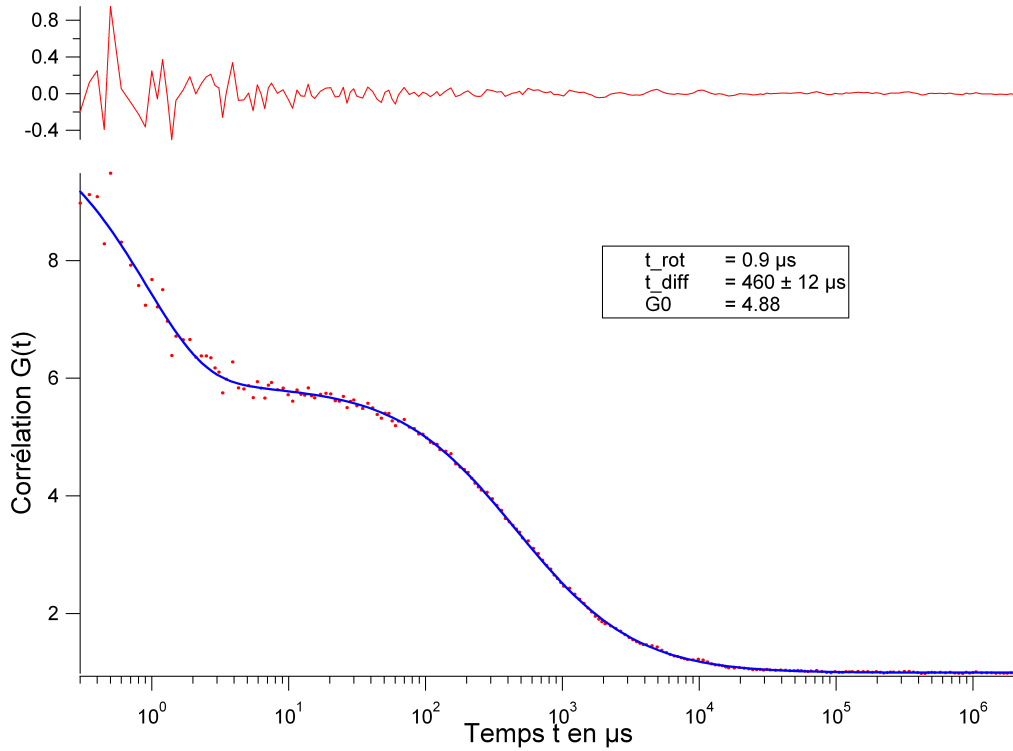


FIG. 5.8 – Courbe de FCS de billes en or de 13 nm taille nominale, fonctionnalisée par des ligands TEG. Le temps de diffusion obtenu correspond à un rayon hydrodynamique de 17 ± 0.5 nm, Le temps de rotation donne une taille de 19 nm. Les ligands TEG une fois déployés ont donc une longueur d'environ 2 – 3 nm

5.3.3 Caractérisation des ligands très dilués

Le second système à caractériser est le ligand FITC-TEG avant qu'on ne l'accroche aux billes. Son temps de diffusion servira de référence. Au préalable, on a déterminé la valeur de la puissance de saturation pour ce système. Elle est de l'ordre de $P_s = 15 \mu\text{W}$, on travaille systématiquement très en dessous (typiquement $P_s/5$).

Afin de se placer à l'échelle de la molécule unique, la FITC-TEG est ici étudiée à très faible concentration : $6 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. La courbe de corrélation (figure 5.9) fournit un temps de diffusion de 30 μs soit un rayon hydrodynamique de 0,62 nm. La fluorescéine mesurée dans les mêmes conditions conduit à un rayon hydrodynamique de 0,41 nm. La présence de la chaîne TEG augmente le rayon hydrodynamique de 50%. D'autre part, on note la présence dans le chronogramme de quelques bursts trop rares pour intervenir dans la corrélation.

On peut aussi estimer la brillance du chromophore. Ce dernier excité avec une puissance de 2.5 μW émet 270 photons par secondes (CPS) avec $\frac{1}{3.4}$ molécules en moyenne dans le volume focal soit 918 CPS par molécule. La fluoresceine avec une puissance de 4.3 μW émet 7 600 CPS (voir figure 5.3.3). Le rendement quantique de la FITC-TEG est donc 4,7 fois inférieur

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS.4

à celui de la fluorescéine. La FITC-TEG étudiée ne comporte qu'une seule FITC, les mesures effectuées par les chimistes qui donne une diminution d'un facteur 8 du rendement quantique (voir tableau 5.4) concerne une molécule possédant deux fluorophores FITC, un sur chacune des chaîne alkyl. La différence entre le facteur 4,7 et 8 rend compte des échanges d'énergie entre les deux fluorophores très proches dans le cas de la molécule étudiée par les chimistes.

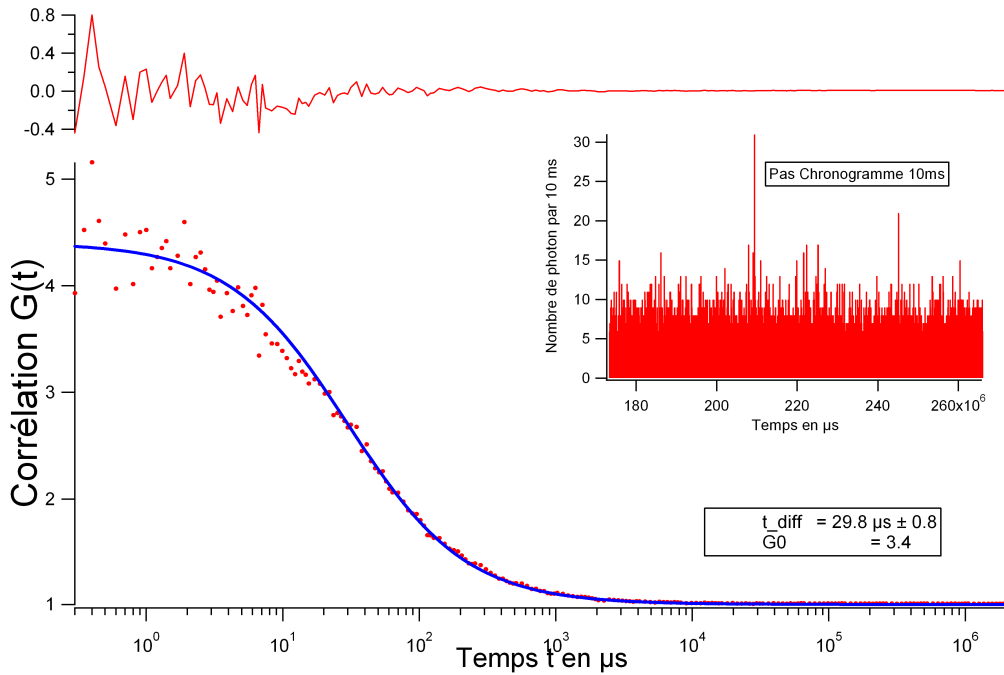


FIG. 5.9 – Courbe de FCS du ligand (FITC liée à un TEG) à très faible concentration (0,3 molécules en moyenne dans le volume focal) excité à 488 nm avec une puissance de $2.5 \mu\text{W}$. On obtient un temps de diffusion de $30 \mu\text{s}$. En encart, un chronogramme de l'expérience, on observe quelques bursts qui sont trop rares pour intervenir dans la courbe de corrélation. Le taux moyen de comptage est de 320 photons par secondes.

5.3.4 Etude en FCS de la sonde

Le premier objectif des mesures en FCS sur ces sondes est de confirmer la fonctionnalisation c'est à dire vérifier que les ligands sont bien attachés aux billes. La FCS est ici une méthode particulièrement efficace car l'accrochage des fluorophores sur les billes se manifeste par un allongement important de leur temps de diffusion. L'échantillon constitué de billes de 13 nm avec des ligands FITC-TEG est excité à un photon à 488 nm. Comme expliqué à la section 5.3.1 seuls les fluorophores sont excités. L'observation d'un temps de corrélation compatible avec la diffusion de billes de $(13 + 6)$ nm, soit $456 \mu\text{s}$ dans notre situation expérimentale, est la preuve, a priori, de la fonctionnalisation des sondes.

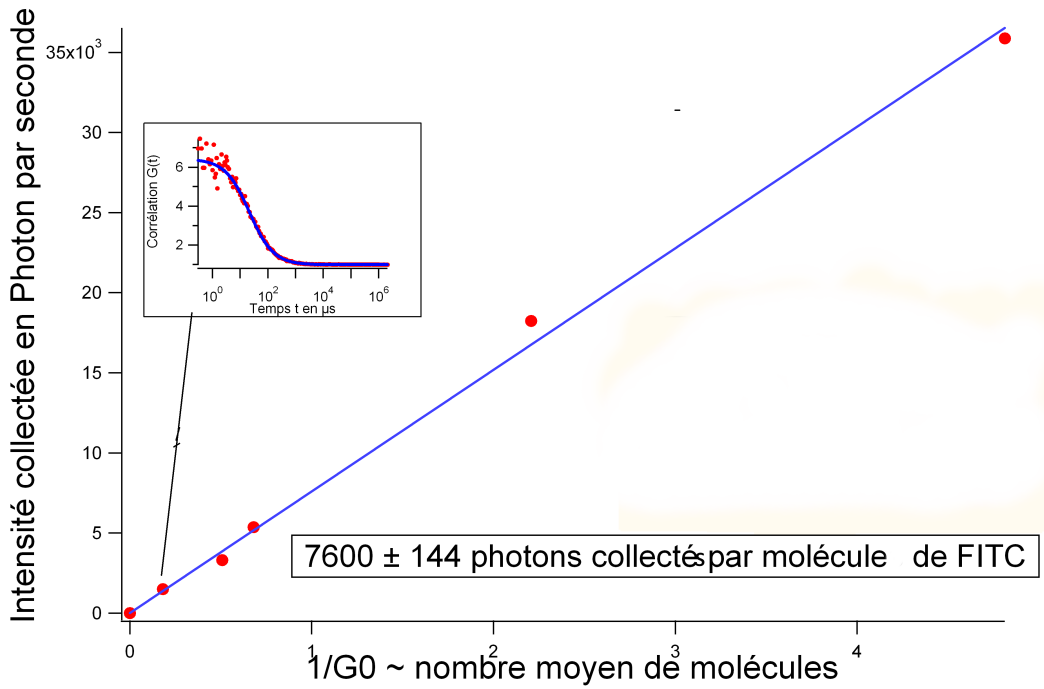


FIG. 5.10 – Etude de la brillance de la fluorescéine. Quantification du nombre de photons collectés pour une seule molécule excitée à 488 nm avec une puissance de 4.3 μ W

La corrélation du signal de l'échantillon excité à 488 nm avec une puissance sur l'échantillon de 4 μ W est présentée sur la figure 5.11. Un dépouillement rapide du résultat avec deux contributions diffusives donne un temps court correspondant aux fluorophores libres et un temps long qui indique la présence d'un objet brillant qui diffuse avec un temps de 550 μ s. Ce dernier est très voisin de la valeur attendue pour des billes de (13 + 6) nm fonctionnalisées bien que légèrement trop long. Une analyse plus fine montre que la corrélation est néanmoins plus compliquée que la simple somme des contributions de deux espèces. Son ajustement nécessite d'introduire la signature d'un clignotement sur l'une des deux espèces. Dans une première approche la fonction d'ajustement inclut un terme de type réaction chimique pour l'espèce avec un temps de diffusion long dans l'hypothèse que la fluorescence des molécules attachées à la bille fonctionnalisée a un comportement complexe.

La figure 5.12 montre aussi le vieillissement de la sonde. En l'espace de quelques semaines, l'échantillon évolue fortement. L'ajustement des différentes courbes permet de suivre quantitativement ce vieillissement. Nous reviendrons plus tard sur l'analyse de ces courbes.

5.3.5 Analyse du temps de vie de fluorescence de la sonde

La courbe de durée de vie d'un échantillon de billes commerciales de 20 nm fonctionnalisées avec des ligands FITC-TEG et excitées à 488 nm est présentée sur la figure 5.13. La décroissance est biexponentielle avec pour temps de déclin 1.3 ns (30%) et 3 ns (70%). Le temps court

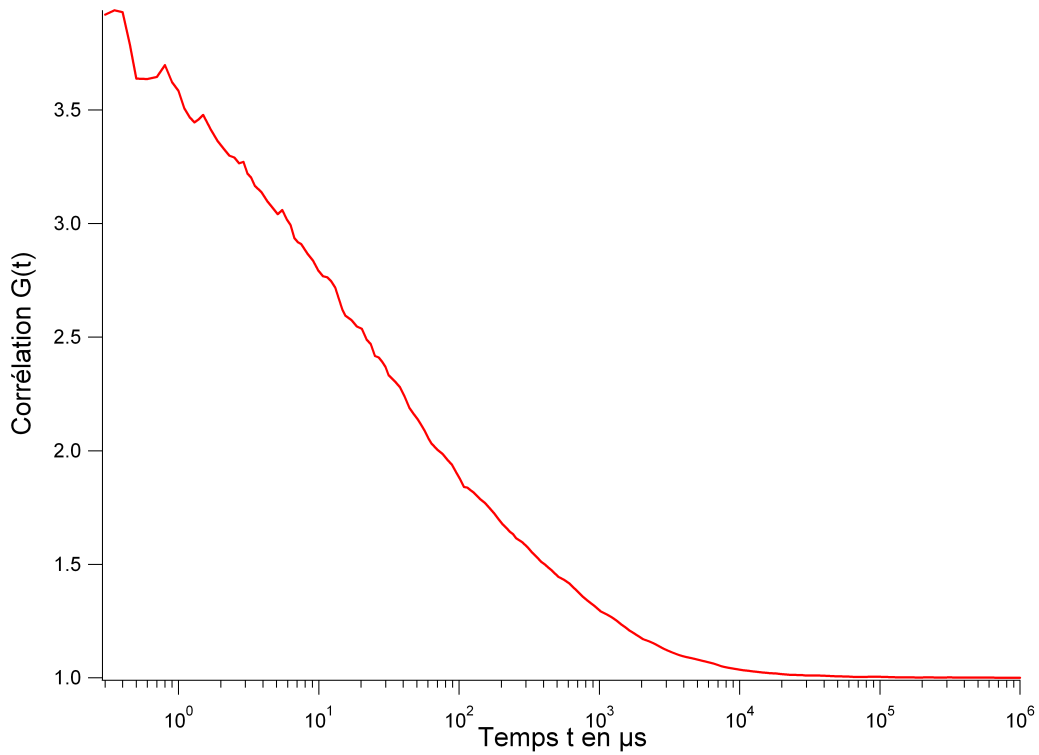


FIG. 5.11 – Courbe de corrélation du signal provenant de l'échantillon composé de FITC-TEG et de billes d'or excité à 488 nm avec 3.5 μ W.

pourrait correspondre à une annihilation partielle de la fluorescence et le temps long aux fluorophores libres. Ces données sont donc en accord avec les mesures réalisées par les chimistes. Elles sont aussi en accord avec la bonne fonctionnalisation des NPM et avec un facteur de d'annihilation de la fluorescence de quelques unités.

5.3.6 Etude par bouffées de photon

Plusieurs observations vont cependant à l'encontre de l'hypothèse simple d'une fonctionnalisation réussie des particules et d'un facteur d'annihilation de la fluorescence de quelques unités.

Tout d'abord, l'objet qui diffuse avec un temps long est peu brillant. La fluorescence observée est donc annihilée. Dans la mesure où l'objet diffuse lentement il est relativement facile de repérer les bursts correspondant à sa diffusion. En comparant la brillance d'une FITC-TEG mesuré à la section 5.3.3 et le nombre moyen de photons émis par l'objet de "temps long" (environ 30 photons en 1 ms ; il s'agit de la valeur moyenne car il y a une grande dispersion), on peut conclure que ce dernier brille autant que environ¹⁰ 20 chromophores. Cette brillance

¹⁰La FITC-TEG libre a pour brillance 365 photons par seconde par μ W contre 8570 photons par seconde par μ W pour l'espece diffusant avec un temps long.

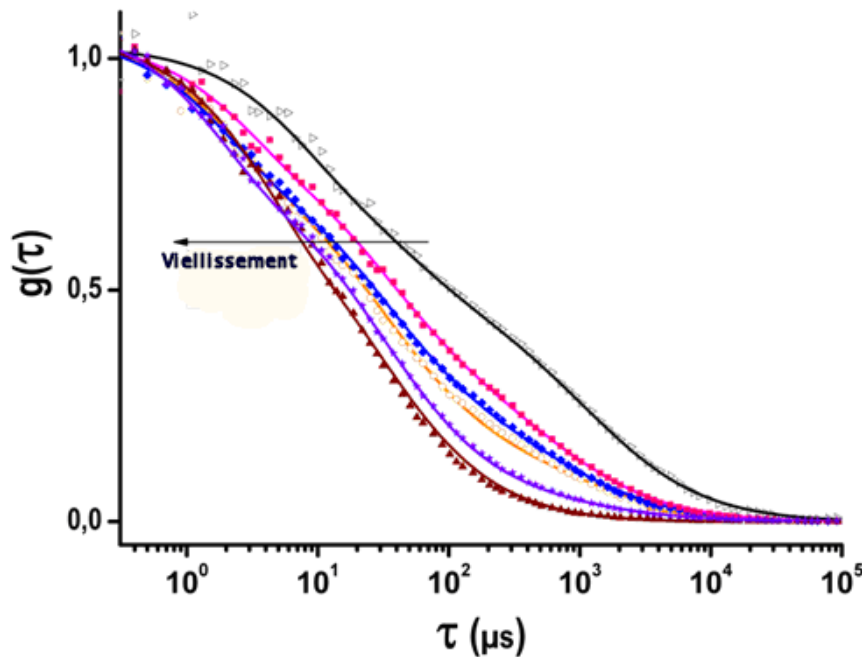


FIG. 5.12 – Courbes de corrélation du signal provenant de l'échantillon composé de FITC-TEG et de billes d'or excité à 488 nm avec 3.5 μ W. Le réseau de courbes permet de suivre le vieillissement de l'échantillon. L'ajustement des courbes est la somme d'une espèce avec un temps long, a priori les fluorophores attachés aux billes et un temps court avec un clignotement du signal des billes fonctionnalisées.

serait plutôt en accord avec la mesure macroscopique des chimistes.

Cependant, l'analyse du temps de déclin de fluorescence peut être réalisée en ne conservant que les bursts correspondant au passage de la sonde. Le déclin est alors encore biexponentiel ce qui étonnant puisque les fluorophores sur la sonde ne devraient avoir qu'un temps de vie court en raison de l'annihilation partielle de la fluorescence.

Une troisième expérience, plus subtile, consiste à exciter le même échantillon à 2 photons. Comme expliqué à la section 5.3.1, le signal émis par la sonde est alors plus complexe. La photoluminescence des nanobilles d'or se surimpose à la fluorescence des chromophores. En utilisant une puissance importante la majorité des billes d'or constituant les sondes luminescent (voir 4.6.4). Cette photoluminescence est bien plus intense que la fluorescence. On peut ainsi séparer les photons provenant des sondes possédant avec certitude un coeur métallique en ne sélectionnant que ces bursts. Pour chacun de ces bursts on peut tracer l'histogramme de durée de vie. Ce dernier doit a priori être composé de :

- la photoluminescence dont le temps caractéristique est bien inférieur à la réponse impulsionnelle du détecteur

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS.7

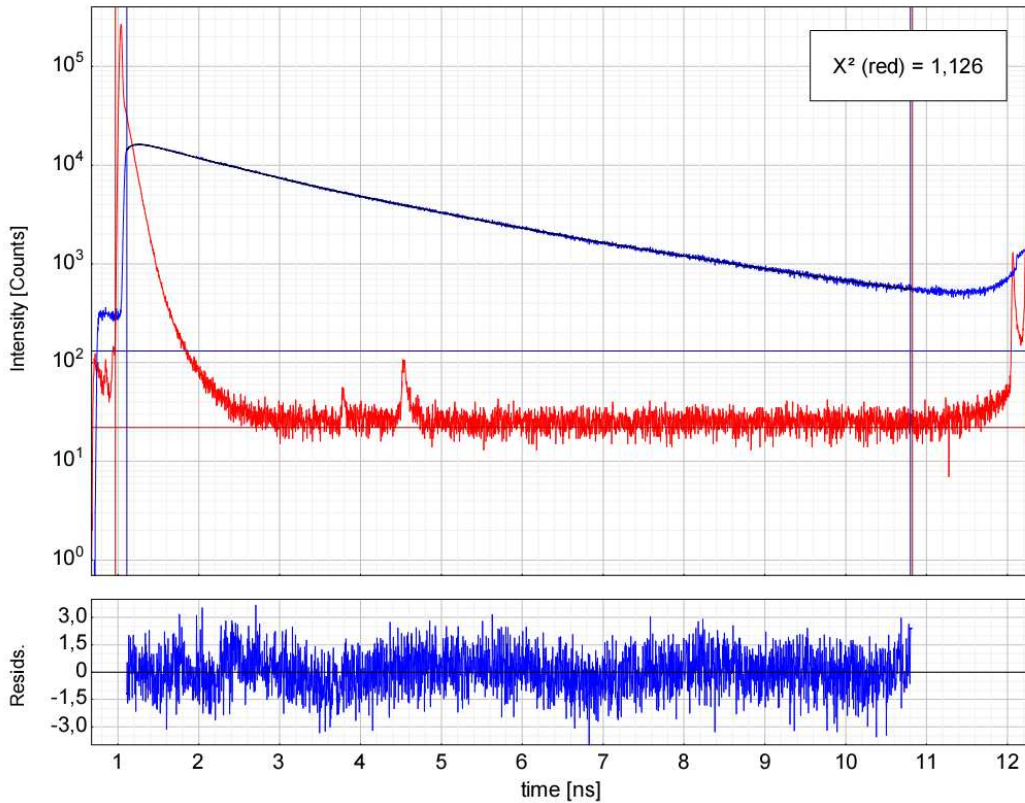


FIG. 5.13 – Courbe de durée de vie de l'échantillon composé de bille d'or de 20 nm fonctionnalisée avec de la FITC-TEG. La décroissance est biexponentielle avec pour temps de déclin 1.3 ns (30%) et 3 ns (70%).

- la décroissance multiexponentielle de la fluorescence partiellement annihilée des chromophores.

Cependant, tous les histogrammes de durée de vie de chaque burst ne comportent que du signal confondu avec la réponse impulsionnelle. La fluorescence émise par les sondes à coeur métallique est tellement annihilée que son temps de vie est comparable à la réponse impulsionnelle soit de l'ordre de 0.25 ns avec le détecteur utilisé. La diminution du temps de vie indique que l'annihilation des fluorophores sur la sonde est supérieure à un facteur 25.

En conclusion, les fluorophores effectivement présents à la surface de la NPM ont une fluorescence annihilée d'un facteur au moins 25 et un déclin de fluorescence dont le temps caractéristique est inférieur¹¹ à 125 ps.

La seule hypothèse raisonnable pour expliquer à la fois la valeur des temps de vie mesurés à la section 5.3.5 et le temps long observé en FCS est l'existence d'une autre espèce dans la solution. Mon travail s'est alors concentré sur la détermination de la nature de cette espèce, passée inaperçue dans les caractérisations macroscopiques et inattendue.

¹¹On considère que l'on peut discriminer un déclin de fluorescence jusqu'à un temps correspondant à la moitié de la réponse impulsionnelle.

5.3.7 Expérience de comparaison du signal Rayleigh et de la fluorescence

La présence d'objets fluorescents qui ne sont pas des FITC-TEG-AuNP dans l'échantillon de sonde ne fait plus de doute. Reste à savoir si parmi les signaux détectés dans les expériences précédentes, certains correspondraient à des particules fonctionnalisées.

5.3.7.1 Présentation de la méthode

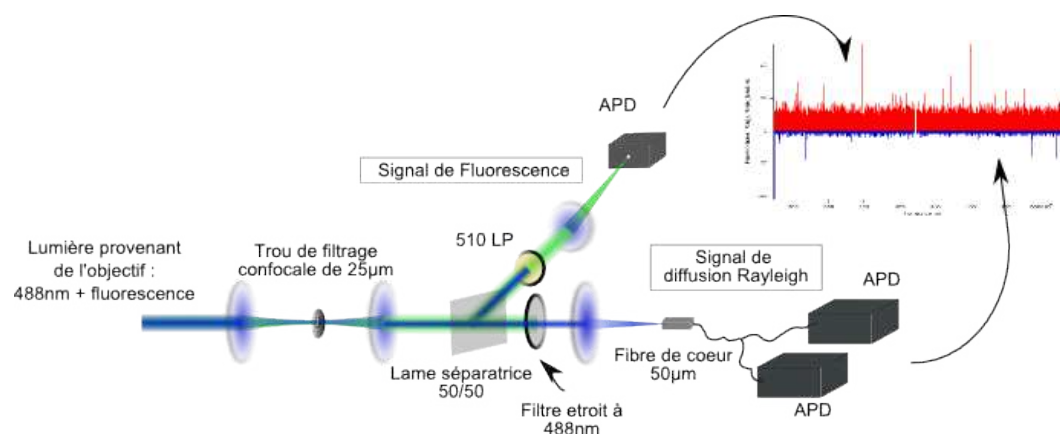


FIG. 5.14 – Schéma de la voie de détection pour comparer simultanément le signal de fluorescence des fluorophores et le signal de diffusion Rayleigh des billes d'or de 50nm

La discrimination peut être faite en comparant un signal provenant intrinsèquement de la bille, la diffusion Rayleigh, et un signal propre aux FITC-TEG, leur fluorescence.

Ces deux signaux peuvent être discriminés de deux manières :

spectralement la diffusion Rayleigh élastique est réémise à la longueur d'onde laser à savoir 488 nm. Le fluorophore quant-à lui émet majoritairement au-dessus de la longueur d'onde d'excitation (en fonction du décalage Stokes entre spectre d'absorption et d'émission). En l'occurrence, pour la FITC, le signal de fluorescence à 488 nm est négligeable.

temporellement A l'échelle de notre détection, la diffusion Rayleigh a lieu instantanément et sa trace temporelle est confondue avec la réponse impulsionnelle du détecteur. La fluorescence présente un déclin exponentiel.

Les objets étudiés sont assez lumineux pour pouvoir être étudiés qualitativement, burst après burst, la concordance temporelle de ces bursts (de diffusion Rayleigh et de fluorescence) étant ensuite étudiée précisément par corrélation croisés des deux signaux.

Trois cas sont possibles :

1. Si ces deux bursts sont émis en même temps les ligands sont accrochés aux billes d'or.

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS.7

2. Si on observe seulement un burst de signal Rayleigh, il s'agit d'une bille "noire", i.e. non fonctionnalisée ou alors avec des ligands dont la fluorescence est très fortement annihilée.
3. Si on observe seulement un burst de signal de fluorescence, il s'agit d'un objet "polluant".

5.3.7.2 Expériences préliminaires

Expérimentalement, l'expérience exige de séparer en deux voies le signal collecté par le système objectif-lentille de tube et de filtrer spectralement la première voie pour ne conserver que le signal à la longueur d'onde du laser et de filtrer spectralement l'autre voie pour ne conserver que la fluorescence (voir fig 5.3.7.1). On procède tout d'abord à trois expériences test. On utilise les systèmes suivants :

Des billes fluorescentes de 20 nm de diamètre On ne détecte alors un signal que sur la voie de fluorescence. La corrélation croisée ne donne aucun signal.

Des billes fluorescentes de 100 nm de diamètre On détecte alors un signal sur les 2 voies. La corrélation croisée conduit bien au temps de diffusion des billes¹².

Des billes en or de 50 nm de diamètre On détecte alors un signal sur la voie de diffusion Rayleigh et du bruit sur la voie de fluorescence. Pourtant, la corrélation croisée des deux voies conduit, bien que très bruitée, au temps de diffusion des billes d'or. En fait, l'élimination du signal de diffusion Rayleigh sur la voie de fluorescence reste délicate. Malgré trois filtres rejetant la longueur d'onde du laser, soit une densité de 15 au moins, quelques photons de signal Rayleigh atteignent le détecteur de la voie de fluorescence¹³. La corrélation croisée s'avère très robuste même si l'une des voies est très bruitée. Les photons Rayleigh sur la voie de fluorescence sont donc aussi filtrés de façon temporelle en éliminant les photons arrivés immédiatement après le pulse laser. Avec l'APD utilisée, cela correspond aux 250 premières picosecondes. La corrélation croisée ne donne alors plus aucun signal.

5.3.7.3 Résultats

L'expérience est ensuite réalisée avec des sondes obtenues par le même protocole que précédemment mais avec des billes en or de 50nm de diamètre pour pouvoir détecter efficacement le signal Rayleigh. Un chronogramme de l'expérience est présentée figure 5.15. On voit clairement des bursts de fluorescence sans leur contrepartie Rayleigh ce qui est la preuve formelle de la présence d'objets fluorescents autres que les particules fonctionnalisées dans la solution. Plus problématique, les bursts de fluorescence et de signal Rayleigh ne semblent pas coïncider. La

¹²Les billes de 100 nm en latex diffuse suffisamment pour pouvoir détecter leur signal Rayleigh

¹³Il se peut que le signal qui passe à travers les filtres soit la très faible photoluminescence des billes d'or excitée à 1 photon à 488 nm. On aurait alors une méthode de détection très sensible d'un tel signal.

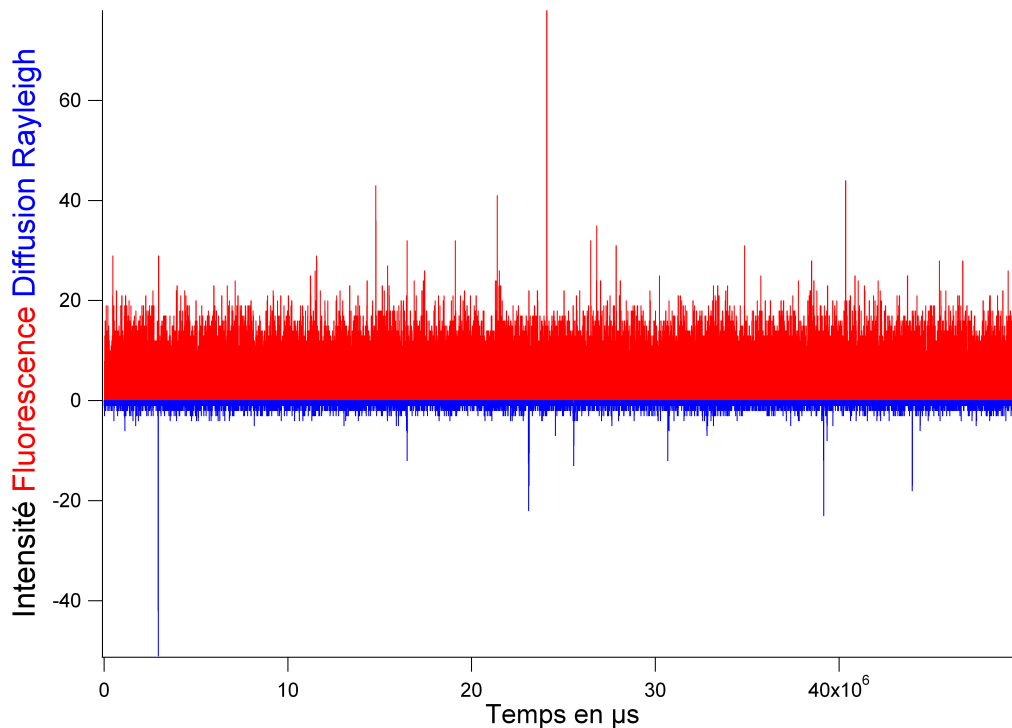


FIG. 5.15 – Extrait d'un chronogramme de l'expérience. En rouge le signal de fluorescence et en bleu avec une échelle inversée le signal de diffusion Rayleigh. On peut noter la présence de burst de fluorescence sans contrepartie sur le signal de diffusion Rayleigh. Inversement les pics de diffusion Rayleigh ne présentent pas de contrepartie en fluorescence. L'analyse quantitative est donnée par la corrélation croisée des deux signaux (voir figure 5.16)

corrélation croisée des deux voies (en rejetant les 250 premières ps pour la voie de fluorescence) montrée sur la figure 5.16 prouve que la fonctionnalisation n'a soit pas fonctionné ou, si elle a fonctionné, la fluorescence des sondes n'est pas détectable.

Selon la formule 5.1 le nombre de FITC attendu sur une nanoparticule de 50 nm avec un mélange de FITC-TEG et TEG dans les proportions 1/9 est de 4870 fluorophores. Les prévisions théoriques présentées dans le tableau 5.6 donnent un facteur d'annihilation de la fluorescence de 7,6 dans le cas d'une bille de 25 nm de rayon et d'un fluorophore dont l'axe du dipôle est perpendiculaire à la surface de la bille. Les objets devraient donc être aussi brillant que 640 chromophores. Un tel objet serait extrêmement brillant à l'échelle de notre montage optique. Nous n'observons aucun objet avec une telle brillance sur le signal (dont les 250 premières ps n'ont pas été filtrées). Nous pouvons avancer trois hypothèses :

1. L'objet "au temps long" a empêché la bonne fonctionnalisation des nanobilles. Les expériences macroscopiques de spectre d'absorption montrent que la fonctionnalisation par des ligands FITC-TEG est efficace pour des billes de 13 nm. La fonctionnalisation de bille de 50 nm par des ligands PolyEthyleneGlycol est par exemple utilisée avec succès

dans [Bergen et al., 2006].

2. Les échanges d'énergie entre les fluorophores sont très importants du fait de leur proximité. Par FRET (Forster Resonance Energy Transfert) l'énergie d'excitation d'un fluorophore se transmet de proche en proche jusqu'à atteindre un chromophore qui se désexcite essentiellement non radiativement (par exemple un chromophore qui est très près de la surface (moins de 1 nm), ou la présence de dimère de chromophore sur la NPM). Ces chromophores joueraient le rôle de site annihilateur de la fluorescence. En supposant que les 4 800 fluorophores se répartissent de façon uniforme sur la surface de la bille de 25 nm de rayon, ils sont séparés en moyenne de 0,64 nm. Le recouvrement spectral entre la bande d'émission et la bande d'absorption de la FITC n'est pas négligeable, par conséquent le FRET est extrêmement efficace entre les fluorophores présents sur la bille.
3. Les dipôles ne sont pas perpendiculaires mais parallèles à la surface. Cela a une grande importance lorsque le diamètre de la bille est important. En effet, le régime de couplage entre la molécule et la NPM devient très fort. Si l'axe du dipôle de la molécule est perpendiculaire à la surface de la NPM le taux radiatif de la molécule est augmenté d'un facteur 10. Dans le cas contraire le taux radiatif de la molécule est *diminué* d'un facteur 10. En d'autres termes si le dipôle de la FITC est parallèle à la surface de la NPM le facteur d'annihilation de la fluorescence n'est pas 7,6 mais 1400 [Vukovic et al., 2009]. La sonde brille alors autant que quelques molécules libres ce qui est en accord avec nos expériences. Notons que Dulkeith *et al.* [Dulkeith et al., 2002] [Dulkeith et al., 2005] ont montré, par exemple, que le dipôle de la lysamine avec un groupe thioester et du Cy5 sur de l'ADB se place parallèlement à la surface de la NPM.

Le filtrage des 250 première picosecondes empêche de conclure définitivement en ce qui concerne l'absence totale de signal de fluorescence. En effet bien qu'une particule qui brille autant que 0,8 chromophores soit détectable, un chromophore dont la fluorescence dont le taux non radiatif serait augmenté de $\simeq 80$ et le taux radiatif augmenté de 10 aurait un temps de vie proche de $\frac{3000}{80} \simeq 37$ ps et la fluorescence considérée serait donc filtrée.

En l'état, la sonde n'est pas directement utilisable car l'échantillon comporte de nombreux objets qui sont bien plus lumineux que la sonde voulue.

5.3.7.4 Extensions possibles de la méthode

Cette méthode de corrélation croisée diffusion Rayleigh/fluorescence est à rapprocher de celle employée à la section 4.6.10. Nous comparons par corrélation deux signaux de nature différentes : le premier dont on connaît la nature, ici la diffusion Rayleigh qui correspond avec certitude au passage d'une bille et le second dont l'origine est incertaine, la fluorescence qui peut provenir d'un agrégat de fluorophores, de fluorophores attachés à une bille ou alors des fluorophores libres. Il existe déjà des méthodes similaires appelées FCS à deux couleurs (Two-

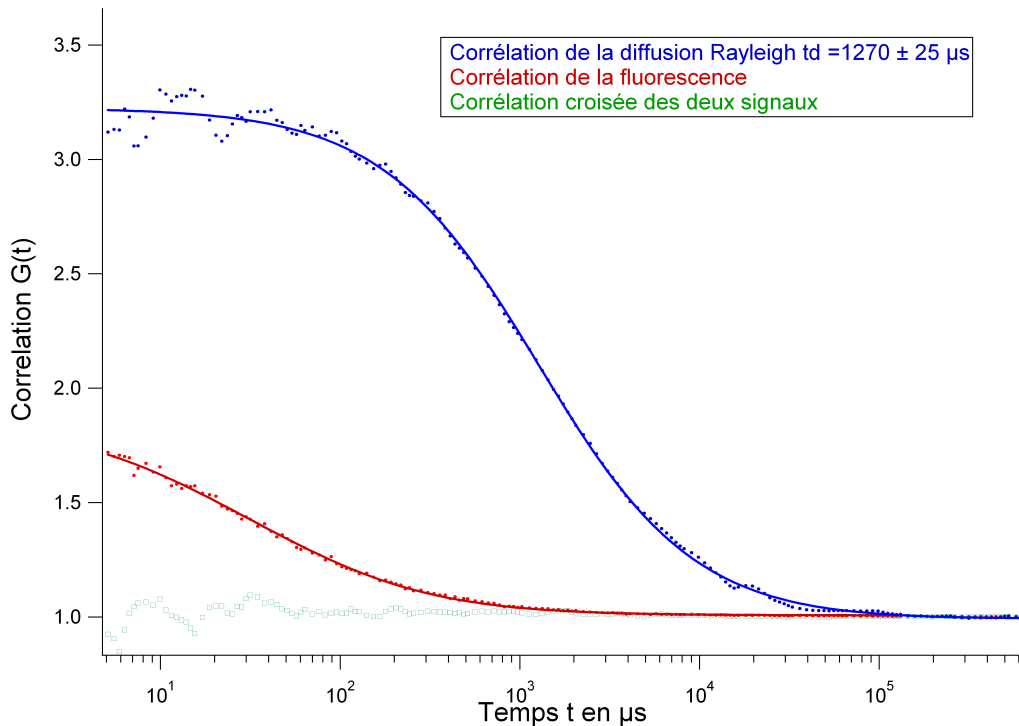


FIG. 5.16 – Courbes de corrélation issues de l’expérience présentée à la section 5.3.7 . Le système étudié est composé de billes d’or de 20 nm commerciales fonctionnalisées avec des ligands FITC-TEG excités à 488 nm avec une puissance de 3,75 μW . En bleu la courbe de corrélation de la diffusion Rayleigh qui donne un temps de diffusion de 1270 μs qui correspond à une taille de 53 nm, en rouge l’autocorrélation du signal de fluorescence qui peut s’ajuster comme la somme de deux espèces dont l’une clignote et en vert la corrélation croisée des signaux qui montre qu’il n’y a pas de coïncidence entre le signal Rayleigh (i.e. le coeur en or) et la fluorescence (i.e. la FITC).

color FCS) [Jung et al., 2001] qui permettent d’étudier l’accrochage effectif d’une molécule émettant dans une certaine gamme spectrale à une molécule émettant dans une autre gamme. La méthode originale développée dans cette thèse s’apparente à la FCS à deux couleurs mais en diffère par deux points :

- Nous utilisons directement la nature hybride de l’échantillon. La nature physique des deux signaux que l’on corrèle est totalement différente. Ces derniers diffèrent à la fois par leurs comportements spectraux et temporels, ce qui rend leur discrimination très efficace.
- Le montage optique à mettre en oeuvre est beaucoup plus simple. La FCS à 2 couleurs nécessite l’utilisation de 2 lasers de longueurs d’onde différentes dont les points de focalisation dans l’échantillon doivent être superposés¹⁴. Cela pose de nombreux problèmes

¹⁴Pour contourner ces sérieux obstacles, des expériences de FCS ont été réalisées avec une excitation à deux photons. Les spectres d’absorption à deux photons étant très larges spectralement l’excitation n’est pas

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS

d'alignement et peut rapidement conduire à des artefacts de mesure si les deux volumes d'étude correspondant aux deux couleurs ne sont pas parfaitement superposés. La méthode proposée dans ce travail n'utilise qu'un seul faisceau laser. Son implémentation est quasi directe sur n'importe quel microscope confocal.

La diffusion Rayleigh pose néanmoins un problème. Sa dépendance avec le diamètre de la particule étudié (en d^6) impose que l'on ne peut pas étudier des particules de moins de 20 nm même en utilisant une excitation laser dans le proche UV. Néanmoins le signal Rayleigh n'est pas le seul signal intrinsèque à une nanoparticule métallique¹⁵, on peut aussi utiliser :

- la SHG pour les nanoparticules métalliques n'ayant pas de centre de symétrie. Nous mettrons cette technique en oeuvre dans les phases suivantes du projet MOLIMEN. La séparation spectrale entre la SHG de la nanoparticule et la fluorescence des chromophores est alors très facile.
- La photoluminescence des métaux nobles qui a été abordée au chapitre 4. La séparation spectrale est alors plus délicate. Le spectre de photoluminescence est très large (voir figure 4.15) et englobe en général le spectre de fluorescence de la molécule étudiée. On peut néanmoins procéder de la façon suivante. Il existe souvent une fenêtre spectrale où seule la nanoparticule émet. Avec la fluorescéine par exemple cette fenêtre va de 450 nm à 490 nm soit environ 15% du signal de photoluminescence. Cette partie spectrale correspond avec certitude au coeur métallique des billes¹⁶. Le reste du signal est un mélange de photoluminescence et de fluorescence. On peut ensuite filtrer totalement temporellement la photoluminescence en sacrifiant les 50 premières ps du signal. Le signal dans cette fenêtre temporelle correspond à l'ensemble de la photoluminescence plus une fraction faible de la fluorescence¹⁷. Avec l'ensemble du protocole on peut donc corrélérer un

sélective. La séparation des canaux de détection repose alors uniquement sur la différence de spectres d'émission des chromophores. Une telle méthode, efficace pour quelques couples de chromophores, n'est pas applicable dès que l'un des objets a un spectre d'émission très large tel que celui des nanoparticules. Elle est également mal adaptée et génère facilement des artefacts par diaphonie spectrale quand l'un des objets est beaucoup plus brillant que l'autre.

¹⁵Symétriquement, la fluorescence n'est pas le seul signal intrinsèque au fluorophore. Si l'exaltation du champ est suffisant le signal de SERS de la centaine de molécules sur la bille pourrait devenir détectable. On pourrait alors séparer par un filtre holographique Notch le signal de diffusion laser qui est réfléchi et le signal Raman qui est transmis. A 2 photons le signal Raman IR pourrait facilement être séparé spectralement de la photoluminescence des billes. Ces méthodes seraient particulièrement efficaces si l'on vise à réaliser des particules fonctionnalisées mais dont la fluorescence est totalement annihilée.

¹⁶Rappelons tout de même que le nombre de bille luminescente dépend de la puissance utilisé (voir chapitre 4. A la différence du signal de diffusion Rayleigh, le signal de photoluminescence ne permet pas d'établir le ratio particule brillante sur particule noire. Le signal de photoluminescence permet tout de même de répondre à la question cruciale : Y-a-t il des particules fonctionnalisées ?

¹⁷Sauf si cette fluorescence est extrêmement annihilée i.e. plus d'un facteur 100, mais ce n'est pas, à terme ,le type de la sonde recherchée

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDES

signal correspondant avec certitude à la photoluminescence et un signal correspondant avec certitude à de la fluorescence. L'expérience utilisant la photoluminescence est un des objectifs prévu dans la suite du projet MOLIMEN, en utilisant des fluorophores plus adaptés spectralement que la fluorescéine.

5.3.8 Identification de l'espèce inconnue

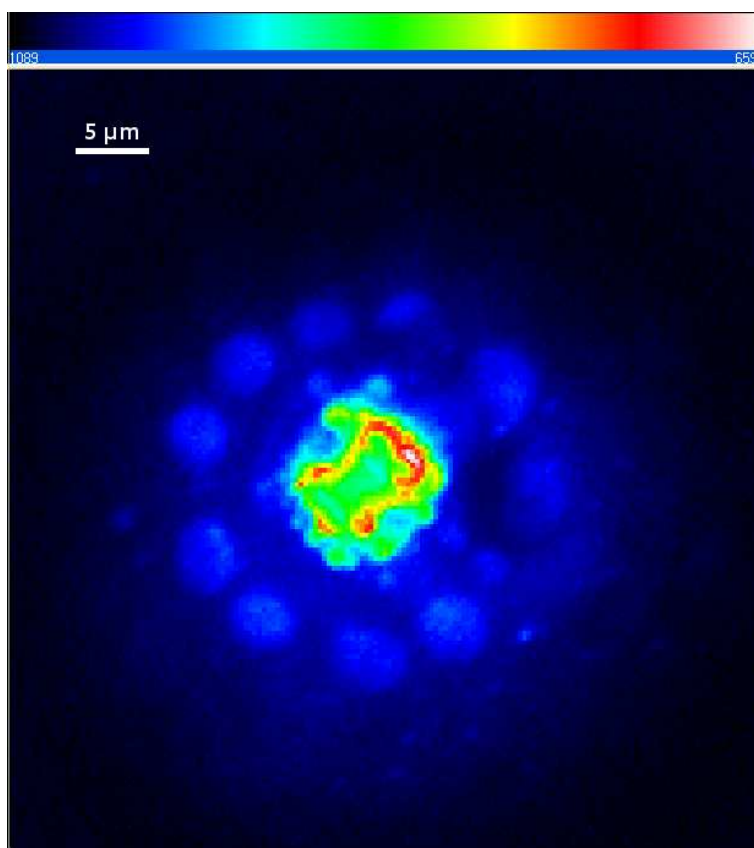


FIG. 5.17 – Image grand champ de ligand FITC-TEG (initialement dans l'éthanol à $10^{-4}M$) déposé sur une lamelle de verre

Pour identifier l'espèce parasite nous avons étudié le comportement d'une solution de ligands FITC-TEG plus concentrée. Comme cela est présenté sur la figure 5.18, le chronogramme d'une solution de ligand FITC-TEG à une concentration de l'ordre de $1 \times 10^{-8} \text{ molL}^{-1}$ comporte alors de nombreux bursts. Les conclusions des observations précédentes suggèrent que ces bursts soient produits par des agrégats de fluorophores de type micellaire. Leur formation résulte du caractère amphiphile du ligand. En effet, le précurseur de la FITC-TEG, à savoir un système composé d'une molécule FITC avec une chaîne butyl supplémentaire (FITC-butyl) n'est pas amphiphile. Le chronogramme d'une telle solution ne présente alors plus de burst et la corrélation du signal ne présente qu'un seul temps de diffusion correspondant à des chromophores libres.

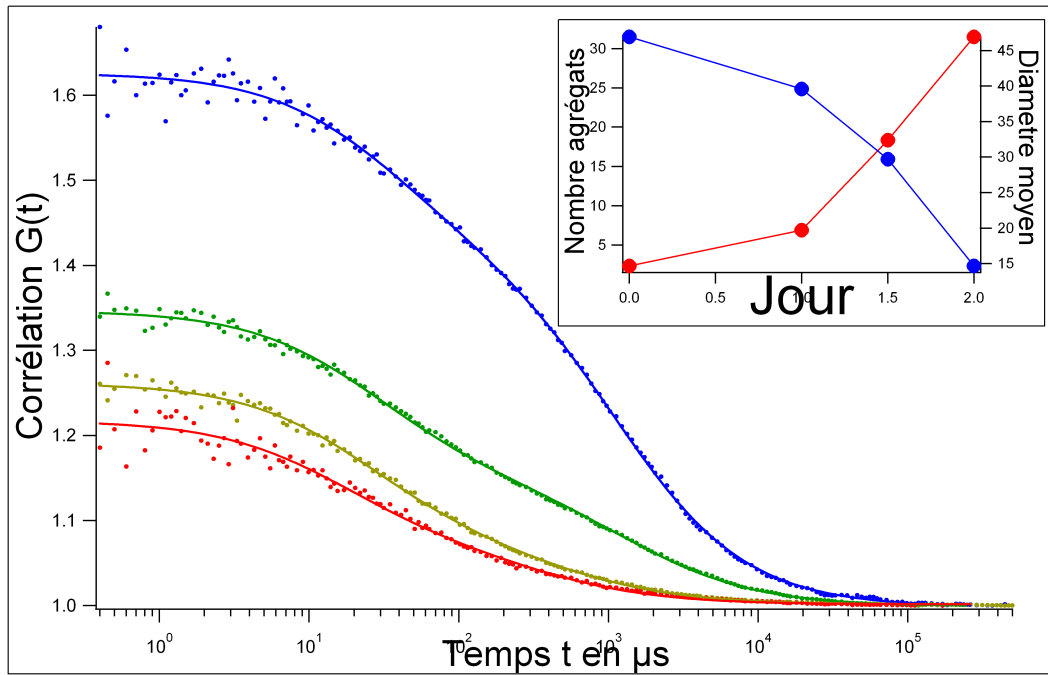


FIG. 5.18 – Courbes de corrélations des agrégats de FITC-TEG excités à 488 nm avec une puissance de $2,5 \mu\text{W}$. Ces courbes sont ajustées par un modèle faisant intervenir la somme de deux courbes de diffusion sans interaction entre les deux espèces. La première espèce est la FITC-TEG avec un temps de diffusion de $30 \mu\text{s}$, le second correspond au temps *moyen* des agrégats. L'expérience a dû être filtrée des nombreux burst correspondant au passage de très gros agrégats de fluorophores. En encart, le rayon hydrodynamique moyen des agrégats ainsi que leur nombre au fil de leur vieillissement

Le caractère amphiphile de la FITC-TEG est intrinsèque car la molécule possède à la fois une partie hydrophobe (la liaison disulfure avec la chaîne alkyl) et une partie hydrophile (la FITC déprotonée à pH 9). De telles molécules, à des concentrations suffisantes, sont susceptibles de former des micelles ou des agrégats. Le plus simple d'entre eux est le regroupement de plusieurs molécules se positionnant de manière sphérique de telle sorte à rapprocher leur partie hydrophobe au centre de la structure et d'étirer radialement la chaîne alkyl pour mettre la partie hydrophile en périphérie du micelle. Ces structures sont caractérisées, en particulier par leur concentration micellaire critique (CMC) i.e. la concentration à partir de laquelle se forme massivement les micelles. La CMC d'une chaîne alkanethiol est de l'ordre¹⁸ de $10 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$. Nous travaillons à des concentrations notablement plus basses. Cependant, à l'échelle de la molécule unique, il est encore possible d'observer des micelles parmi une large majorité de molécules libres bien en dessous de la CMC. Notons que des ligands FITC-TEG ayant au préalable été attachés aux particules d'or se désorbent sous la forme de ligands monosulfures

¹⁸la CMC pour le ligand FITC-TEG qui présente un caractère amphiphile plus marqué n'est pas connue.

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS

avec un ion thiolate hydrophile et que la formation de micelles est un peu plus défavorable¹⁹.

Afin de caractériser ces structures micellaires, nous avons étudié plus en détail la dynamique de la solution de FITC-TEG. La solution de ligand FITC-TEG est initialement dans l'éthanol ce qui doit limiter la formation de micelles à cause de l'aproticité du solvant²⁰. La sonde est diluée dans de l'eau, à partir de cette étape la solution comporte probablement des micelles. Afin de ne conserver que les agrégats, la solution est ensuite filtrée sur une colonne de chromatographie. On ne conserve que les particules dont le rayon est plus grand que $\simeq 5$ nm. On peut aussi ne garder que les plus petites molécules i.e. la FITC-TEG non agrégée. Dans le premier cas on observe alors un signal provenant d'objets de taille bien supérieure à un fluorophore, il s'agit sûrement d'agrégats. Dans le second cas, bien qu'il y ait une majorité de fluorophores libres, on observe aussi quelques micelles, ces derniers se sont donc reformés après que la solution ait été filtrée sur la colonne de chromatographie.

Une autre preuve de la propension des ligands à former des micelles peut être obtenue en étudiant la solution de ligand FITC-TEG déposée sur une lamelle. La figure 5.17 montre une image obtenue par microscopie grand champ d'un autoassemblage microscopique des ligands FITC-TEG.

Les micelles présentent un comportement complexe, ce qui est normal au vu de leur structure très évolutive. On peut tout de même tirer de nos expériences quelques tendances. La taille moyenne des micelles, mesurée par FCS, dépend de la concentration. A forte concentration les micelles sont plus grosses. D'autre part, une fois la concentration de FITC-TEG fixée, la taille des micelles diminue au cours du temps. Notons que la FCS ne permet pas d'obtenir, par polarisation, d'information sur la forme exacte de l'agrégat de FITC-TEG. En effet, cet édifice, qui est composé de beaucoup de fluorophores, est excité par le laser quelle que soit son orientation par rapport à la polarisation excitatrice. D'autre part son émission est isotrope du fait du nombre important de chromophores présents et des échanges d'énergie de type FRET entre les différents fluorophores. La taille obtenue par FCS n'est donc que le rayon hydrodynamique moyen des agrégats.

Le hasard a voulu que la concentration en ligands FITC-TEG lors des premières expériences était telle que les micelles avaient une taille dont le temps de diffusion était compatible avec celui d'une bille de $(13 + 6)$ nm. Le comportement de vieillissement des micelles est similaire à celui que nous avons attribué au vieillissement des sondes métalliques (voir section 5.3.4) à une exception importante : l'ajustement des courbes de FCS de micelles ne nécessite pas de tenir compte d'un effet de clignotement. La simple somme de deux courbes de diffusion spatiale dont l'une correspond au fluorophore libre et l'autre à la taille moyenne des micelles ajuste très bien la courbe de FCS.

L'existence d'un clignotement signe donc la présence d'une interaction entre les fluorophores

¹⁹Cette structure est favorable à la formation de micelles de type bicouche

²⁰la FITC reste donc sous sa forme protonée hydrophobe

et les atomes d'or. A titre spéculatif nous pouvons avancer deux hypothèses :

- Les ligands FITC-TEG peuvent se désorber de la surface de la nanoparticule en emportant un atome d'or comme cela a déjà été observé dans [Schaaff and Whetten, 1999] [Bachman et al., 2000]. Les ligands monosulfides désorbés formeraient alors des micelles incluant des atomes d'or ce qui conduirait à une modulation de la fluorescence moyenne de la micelle au gré de ses reconformations.
- Les micelles juste après leur formation ont en moyenne une taille supérieure aux billes de 13 nm. Les micelles pourraient alors englober une bille. Cette dernière se déplaçant à l'intérieur du micelle créerait par effet d'annihilation de la fluorescence une modulation de la luminescence des micelles. Cet effet pourrait expliquer le clignotement observé ainsi que la faible brillance des agrégats micellaires.

5.3.9 Conclusion

De l'intérêt des études à l'échelle de la molécule unique

Malgré le résultat final qui invalide cette génération de sonde, cette étude est un bel exemple de ce que les observations à l'échelle de la particule unique peuvent apporter dans la compréhension de systèmes qui a priori paraissent simples et bien contrôlés.

Du point de vue de la caractérisation expérimentale, les agrégats de fluorophore ont finalement beaucoup de points en commun avec des billes d'or fonctionnalisées avec des fluorophores. Il montre un changement de spectre d'absorption, une annihilation forte de la fluorescence, une diminution du temps de vie, un changement de spectre d'émission et des temps de diffusion qui peuvent être comparables à ceux des nanosondes à coeur métallique. Des mesures purement macroscopiques peuvent rapidement conduire à des conclusions inexactes quant à la fonctionnalisation effective et la brillance des sondes synthétisées. Les premières mesures sur les sondes à l'échelle de la molécule unique étaient ambiguës car ces dernières (FCS et mesure de temps de vie) réalisent une moyenne sur l'échantillon. Seules des études plus approfondies qui mettent en avant l'hétérogénéité de l'échantillon comme celles par bouffées de photon ont permis de changer radicalement nos conclusions quant à la caractérisation de ces sondes.

A la lumière de nos résultats les chimistes ont effectué des expériences complémentaires qui ont confirmé qu'ils avaient bien étudié principalement les propriétés des micelles et non celles des sondes composées de nanobilles d'or avec des chromophores.

D'autre part de telles sondes sont actuellement au centre de nombreux travaux et cette étude souligne l'intérêt d'une analyse fine de leur propriétés avant de les utiliser comme des marqueurs. De nombreux travaux publiés dans la littérature ont utilisé des ligands très similaires à la FITC-TEG dans les mêmes conditions de fonctionnalisation. Sans remettre en cause la fiabilité de tous les résultats car les détails des protocoles de purification ne sont en général pas donnés, nos études montrent qu'il faut rester très vigilant sur la formation pos-

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS.9

sible d'agrégats de fluorophores lorsque l'on fonctionnalise des nanoparticules métalliques avec des fluorophores, notamment lorsque les études ne comportent que des analyses à l'échelle macroscopique.

Vers un nouveau système

Le protocole de fonctionnalisation est donc à revoir. En particulier, les ligands ne doivent à aucun moment être sous une forme amphiphile. Cela peut paraître difficile dans la mesure où le ligand doit forcément comporter une chaîne alkyl pour séparer le chromophore de la surface de la NPM et une partie hydrophile pour être soluble dans l'eau. Ce problème peut néanmoins être contourné en procédant en deux étapes.

1. Attacher un ligand hydrophile contenant un groupe thiol ou amine aux particules.
2. Faire réagir un fluorophore avec le ligand hydrophile déjà attaché à la bille.

Une méthode assez répandue consiste à utiliser de l'ADN. Il est relativement facile de fonctionnaliser un brin d'ADN en 5' par un thiol. Une fois les ligands accrochés aux nanoobjets métalliques, on introduit des brins d'ADN complémentaires fonctionnalisés avec un fluorophore. Une deuxième possibilité est d'utiliser des fluorophores avec un groupe NHS-ester. Ces derniers réagissent avec les groupes amine et sont utilisés notamment pour marquer les protéines. Les chimistes ont déjà synthétisé des ligands possédant un thiol qui peut se fixer à la particule, une chaîne TEG et un groupe amine en bout de chaîne.

En parallèle des études sont actuellement menées sur des ligands PDMI-TEG le PDMI étant un dérivé du pyrene. Ces derniers sont solubles dans le DMF où ils ne forment pas d'agrégats.

A terme des mesures de diffusion Raman seront mises en place dès que la bonne fonctionnalisation des particules aura été vérifiée.

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS.9

Conclusion et perspectives

Une grande partie de mon travail de thèse a été consacrée à la mise au point d'un microscope de spectroscopie de corrélation de fluctuations performant. Toutes les expériences réalisées utilisent un microscope confocal optimisé pour la détection de faibles signaux. Celui-ci, complètement modulable, permet aujourd'hui de détecter de façon courante des chromophores uniques diffusant en solution. Le système permet notamment de distinguer dans le signal global les contributions de chaque espèce. Les méthodes de filtrage développées durant mon travail de thèse se sont avérées cruciales lors de l'étude de systèmes hétérogènes. Le microscope fonctionne avec une double excitation mono et biphotonique. L'adjonction prochaine d'un continuum créé par une fibre microstructurée permettra de couvrir l'ensemble du visible.

Les chapitres 1 et 2 ont décrit les outils nécessaires à la mise en oeuvre et à l'analyse des expériences de FCS. Plusieurs procédés de filtrage du signal et plusieurs algorithmes de calcul de la corrélation y sont présentés. La dernière partie du chapitre 2 est consacrée à l'étude théorique des courbes de corrélations obtenues. Je montre en particulier qu'il faut tenir compte de la réponse impulsionnelle du microscope lorsque les particules étudiées ont un diagramme d'émission ou d'absorption qui apparaît comme anisotrope à l'échelle de la résolution temporelle du système. Nos calculs prédisent que le contraste de rotation, le temps de diffusion dans le volume d'étude ainsi que l'amplitude des fluctuations d'une telle particule dépendent de la polarisation excitatrice mais aussi d'une éventuelle sélection de polarisation à la détection.

Le chapitre 3 a montré que l'on peut caractériser efficacement des sondes calciques par spectroscopie de corrélation de fluctuations. Néanmoins, la FCS n'est peut-être pas la méthode la plus appropriée pour caractériser les sondes exprimées génétiquement qui sont peu brillantes et dont la dynamique est de l'ordre de la microseconde. En effet, la FCS devient intéressante par rapport à d'autres techniques lorsque la dynamique de la sonde est de l'ordre ou plus rapide que la milliseconde. De plus, la FCS nécessite de se placer dans des conditions telles que l'on puisse observer les fluctuations autour de l'équilibre, et par conséquent utiliser des concentrations en sonde relativement faibles tout en étant suffisantes pour se démarquer du bruit de fond. La brillance de la sonde est donc un paramètre crucial pour permettre une mesure fiable de sa dynamique par FCS. Néanmoins, le domaine des sondes exprimées génétiquement est en plein

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

essor et la brillance, le contraste et la dynamique de ces sondes sont en constante amélioration.

Le chapitre 4 présente une des premières études de la photoluminescence de nanoparticules en solution à l'échelle de la particule unique. Le comportement de la photoluminescence excitée à 2 photons peut paraître, à première vue, assez énigmatique. La photoluminescence présente une anisotropie alors que les billes sont sphériques. L'anisotropie et le nombre de billes émettant de la photoluminescence dépendent fortement de la puissance. Enfin, les billes, prises une par une, ne semblent pas émettre plus de photoluminescence lorsque l'on augmente la puissance laser excitatrice alors que la photoluminescence de billes déposées a une évolution quadratique avec l'intensité laser. Après le recoupement des résultats de l'ensemble des expériences, le rôle de l'état de surface et des ligands et de leur mouvement sur la photoluminescence de la bille a été mis en évidence. Il s'agit d'une large avancée. En effet, toutes les billes en solution possèdent un recouvrement moléculaire pour éviter leur agrégation, ne serait-ce que le recouvrement minimal par des citrates. Dans les études antérieures, la photoluminescence était considérée comme une propriété intrinsèque à la structure métallique et le rôle des ligands n'était pas pris en compte.

L'anisotropie d'émission et d'absorption d'un objet dont la taille est assez grande pour avoir un temps de rotation de l'ordre de la microseconde a permis de confirmer de nouveaux aspects de la FCS qui avaient été calculés au chapitre 2. L'analyse du contraste de la rotation ainsi que celle de la modification du volume d'étude permettent de caractériser le diagramme d'émission et d'absorption d'une particule. Cependant, la photoluminescence n'est pas le phénomène physique le plus approprié pour une telle étude car ses propriétés d'absorption et d'émission dépendent de beaucoup de paramètres, en particulier de la puissance laser. La technique pourra être utilisée pour étudier l'anisotropie de particules d'or fonctionnalisées avec des colorants ou de façon générale pour tout édifice de taille supérieure à $\simeq 20$ nm qui présente une anisotropie à l'absorption et/ou à l'émission. Citons par exemple des billes diélectriques fonctionnalisées avec des chromophores [Gerard et al., 2009].

Nos travaux montrent que la photoluminescence n'est a priori pas un moyen sûr pour localiser une sonde composée d'un coeur métallique. En effet, le nombre de particules détectées dépend de la puissance laser utilisée. Des études ultérieures seront effectuées avec des nanobâtonnets d'or et aussi en utilisant de nouveaux ligands moins mobiles sur la surface de la nanoparticule. D'autre part, des expériences seront réalisées sur la photoluminescence en utilisant la résolution sub-nanoseconde de la carte de comptage pour expliquer plus en détail le rôle joué par les ligands ; et des expériences en spectroscopie Raman exploreront le lien possible entre les sites émetteurs de photoluminescence et les "points chauds" observés en SERS.

Le chapitre 5 a démontré l'intérêt des expériences à l'échelle de la molécule unique lors de la caractérisation d'échantillons composites. Nos études ont mis à jour la présence d'agrégats de fluorophores en lieu et place de sondes fonctionnalisées.

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS

Les expériences s'appuient en particulier sur la nature hybride de la sonde ; différents moyens de filtrage tant optiques que numériques ont permis de séparer le signal en une première partie ne correspondant qu'aux billes métalliques et une deuxième partie correspondant à la fluorescence. La corrélation croisée a prouvé que la fluorescence des fluorophores attachés sur les billes était très fortement annihilée. Par conséquent, les signaux enregistrés sur la fluorescence correspondent aux agrégats de chromophores. Les prochaines expériences continueront à exploiter la nature hybride de la sonde, notamment en utilisant la photoluminescence du coeur métallique. D'autre part, la synthèse des nanosondes prend désormais en compte la présence possible d'agrégats de fluorophores, et se placent dans les conditions qui limitent leur formation. Des efforts sont portés sur la synthèse de sondes constituées de deux nanobilles d'or. De telles structures devraient conduire à l'exaltation de la fluorescence.

5.3. CARACTÉRISATION À L'ÉCHELLE DE LA PARTICULE UNIQUE DES SONDÉS

Bibliographie

- [Anger et al., 2006] Anger, P., Bharadwaj, P., and Novotny, L. (2006). Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Physical Review Letters*, 96(11) :113002–+.
- [Aspnes et al., 1980] Aspnes, D. E., Kinsbron, E., and Bacon, D. D. (1980). Optical properties of au : Sample effects. *Phys. Rev. B*, 21(8) :3290–3299.
- [Azoulay, 2001] Azoulay, J. (2001). *Méthodes spectroscopiques originales pour exploiter les propriétés sonde locale d'un nanoobjet individuel*. PhD thesis, Université Paris XI.
- [Bachman et al., 2000] Bachman, R. E., Bodolosky-Bettis, S. A., Glennon, S. C., and Sirchio, S. A. (2000). Formation of a novel luminescent form of gold(i) phenylthiolate via self-assembly and decomposition of isonitrilegold(i) phenylthiolate complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 122(29) :7146–7147.
- [Barbillon et al., 2009] Barbillon, G., Bijeon, J.-L., Plain, J., and Royer, P. (2009). Sensitive detection of biological species through localized surface-plasmon resonance on gold nano-disks. *Thin Solid Films*, 517(9) :2997–3000.
- [Bergen et al., 2006] Bergen, J. M., von Recum, H. A., Goodman, T. T., Massey, A. P., and Pun, S. H. (2006). Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromolecular Bioscience*, 6(7) :506–516.
- [Beverluis et al., 2003] Beverluis, M. R., Bouhelier, A., and Novotny, L. (2003). Continuum generation from single gold nanostructures through near-field mediated intraband transitions. *Phys. Rev. B*, 68(11) :115433.
- [Blum et al., 2006] Blum, J., Bruns, S., Rademacher, D., Voss, A., Willenberg, B., and Krause, M. (2006). Measurement of the Translational and Rotational Brownian Motion of Individual Particles in a Rarefied Gas. *Physical Review Letters*, 97(23) :230601–+.
- [Bouhelier et al., 2005] Bouhelier, A., Bachelot, R., Lerondel, G., Kostcheev, S., Royer, P., and Wiederrecht, G. P. (2005). Surface plasmon characteristics of tunable photoluminescence in single gold nanorods. *Physical Review Letters*, 95(26).
- [Bouhelier et al., 2003] Bouhelier, A., Beverluis, M. R., and Novotny, L. (2003). Characterization of nanoplasmonic structures by locally excited photoluminescence. *Applied Physics Letters*, 83 :5041–+.

BIBLIOGRAPHIE

- [Boutin et al., 2008] Boutin, C., Jaffiol, R., Plain, J., and Royer, P. (2008). Surface modified single molecules free-diffusion evidenced by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 18(6) :1115–1122.
- [Boyd et al., 1986] Boyd, G. T., Yu, Z. H., and Shen, Y. R. (1986). Photoinduced luminescence from the noble metals and its enhancement on roughened surfaces. *Phys. Rev. B*, 33(12) :7923–7936.
- [Brust et al., 1994] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D., and Whyman, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, pages 801 – 802,.
- [Buining et al., 1997] Buining, P., Humbel, B., Philipse, A., and Verkeij, A. (1997). Preparation of functional silane-stabilized gold colloids in the (sub)nanometer size range. *Langmuir*, 13 :3921–3926.
- [Cang et al., 2006] Cang, H., Wong, C. M., Xu, C. S., Rizvi, A. H., and Yang, H. (2006). Confocal three dimensional tracking of a single nanoparticle with concurrent spectroscopic readouts. *Applied Physics Letters*, 88(22) :223901.
- [Caruso et al., 2006] Caruso, A., Wang, L., Jaswal, S., Tsybal, E., and Dowben, P. (2006). The interface electronic structure of thiol terminated molecules on cobalt and gold surfaces. *Journal of Materials Science*, 41(19) :6198–6206.
- [Chen et al., 2006] Chen, J., McLellan, J. M., Siekkinen, A., Xiong, Y., Li, Z.-Y., and Xia, Y. (2006). Facile synthesis of gold silver nanocages with controllable pores on the surface. *Journal of the American Chemical Society*, 128(46) :14776–14777.
- [Chen et al., 1999] Chen, Y., Muller, J. D., So, P. T., and Gratton, E. (1999). The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.*, 77(1) :553–567.
- [Chen et al., 2007] Chen, Y., Munechika, K., and Ginger, D. S. (2007). Dependence of fluorescence intensity on the spectral overlap between fluorophores and plasmon resonant single silver nanoparticles. *Nano Letters*, 7(3) :690–.
- [Christensen and Seraphin, 1971] Christensen, N. E. and Seraphin, B. O. (1971). Relativistic band calculation and the optical properties of gold. *Phys. Rev. B*, 4(10) :3321–3344.
- [Darbha et al., 2007] Darbha, G. K., Ray, A., and Ray, P. C. (2007). Gold nanoparticle-based miniaturized nanomaterial surface energy transfer probe for rapid and ultrasensitive detection of mercury in soil, water, and fish. *ACS Nano*, 1(3) :208–214.
- [Débarre et al., 2004] Débarre, A., Jaffiol, R., Julien, C., Nutarelli, D., Richard, A., Tchénio, P., Chaput, F., and Boilot, J.-P. (2004). Quantitative determination of the 3d dipole orientation of single molecules. *The European Physical Journal D - Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics*, 28(1) :67–77.

BIBLIOGRAPHIE

- [Donnert et al., 2007] Donnert, G., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2007). Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation. *Nat Meth*, 4(1) :81–86.
- [Drexhage, 1968] Drexhage, K.H. and Kuhn, H. S. F. (1968). Variation of the fluorescence decay time of a molecule in front of a mirror. *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, 72 :329.
- [Drude, 1900] Drude, P. (1900). Zur elektronentheorie der metalle. *Annalen der Physik*, 306 :566.
- [Dulkeith et al., 2002] Dulkeith, E., Morteani, A. C., Niedereichholz, T., Klar, T. A., Feldmann, J., Levi, S. A., van Veggel, F. C. J. M., Reinhoudt, D. N., Möller, M., and Gittins, D. I. (2002). Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles : Radiative and nonradiative effects. *Phys. Rev. Lett.*, 89(20) :203002.
- [Dulkeith et al., 2004] Dulkeith, E., Niedereichholz, T., Klar, T. A., Feldmann, J., von Plessen, G., Gittins, D. I., Mayya, K. S., and Caruso, F. (2004). Plasmon emission in photoexcited gold nanoparticles. *Phys. Rev. B*, 70(20) :205424.
- [Dulkeith et al., 2005] Dulkeith, E., Ringler, M., Klar, T. A., Feldmann, J., Munoz Javier, A., and Parak, W. J. (2005). Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression. *Nano Letters*, 5(4) :585–589.
- [Durr et al., 2007] Durr, N. J., Larson, T., Smith, D. K., Korgel, B. A., Sokolov, K., and Ben-Yakar, A. (2007). Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Letters*, 7(4) :941–.
- [Eggeling et al., 2005] Eggeling, C., Volkmer, A., and Seidel, C. A. M. (2005). Molecular photobleaching kinetics of rhodamine 6g by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy. *ChemPhysChem*, 6(5) :791–804.
- [Eggeling et al., 1998] Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R., and Seidel, C. A. M. (1998). Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection : Evidence of two-step photolysis. *Analytical Chemistry*, 70(13) :2651–2659.
- [Einstein, 1905] Einstein, A. (1905). *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*. Dover Publications.
- [Elson and Magde, 1974] Elson, E. L. and Magde, D. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. i. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13(1) :1–27.
- [Enderlein, 2000] Enderlein, J. (2000). Theoretical study of detection of a dipole emitter through an objective with high numerical aperture. *Opt. Lett.*, 25(9) :634–636.
- [Enderlein and Gregor, 2005] Enderlein, J. and Gregor, I. (2005). Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, 76(3) :033102–+.

BIBLIOGRAPHIE

- [Farrer et al., 2005] Farrer, R. A., Butterfield, F. L., Chen, V. W., and Fourkas, J. T. (2005). Highly efficient multiphoton-absorption-induced luminescence from gold nanoparticles. *Nano Letters*, 5(6) :1139–.
- [Gerard et al., 2009] Gerard, D., Devilez, A., Aouani, H., Stout, B., Bonod, N., Wenger, J., Popov, E., and Rigneault, H. (2009). Efficient excitation and collection of single-molecule fluorescence close to a dielectric microsphere. *J. Opt. Soc. Am. B*, 26(7) :1473–1478.
- [Gersten and Nitzan, 1981] Gersten, J. and Nitzan, A. (1981). Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. *The Journal of Chemical Physics*, 75(3) :1139–1152.
- [Ghorai and Glotzer, 2007] Ghorai, P. K. and Glotzer, S. C. (2007). Molecular dynamics simulation study of self-assembled monolayers of alkanethiol surfactants on spherical gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(43) :15857–15862.
- [Gregor and Enderlein, 2005] Gregor, I. and Enderlein, J. (2005). Focusing astigmatic gaussian beams through optical systems with a high numerical aperture. *Opt. Lett.*, 30(19) :2527–2529.
- [Gregor et al., 2005] Gregor, I., Patra, D., and Enderlein, J. (2005). Optical saturation in fluorescence correlation spectroscopy under continuous-wave and pulsed excitation. *ChemPhysChem*, 6(1) :164–170.
- [Haiss et al., 2007] Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., and Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from uv to vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11) :4215–4221.
- [Hardy and Richardson, 2008] Hardy, N. and Richardson, T. (2008). Temperature effects on the optical properties of thiol encapsulated gold nanoparticle thin films. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 321(1-3) :285 – 291. Organized Molecular Films Selected papers from LB12 - the 12th International Conference on Organized Molecular Films, July 1-5, 2007, Krakow, Poland.
- [Haugland and Miller, 2002] Haugland, R. P., J. G. M. T. Z. S. I. J. and Miller, E. (2002). *Handbook of fluorescent probes and research products [Texte imprimé]*. Molecular Probes.
- [Hess and Webb, 2002] Hess, S. T. and Webb, W. W. (2002). Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 83(4) :2300 – 2317.
- [Higby, 1982] Higby, G. (1982). Gold in medicine : a review of its use in the west before 1900. *Gold Bulletin*, 15 (4) :130–140.
- [Hossain et al., 2008] Hossain, M. K., Shimada, T., Kitajima, M., Imura, K., and Okamoto, H. (2008). Raman and near-field spectroscopic study on localized surface plasmon excitation from the 2d nanostructure of gold nanoparticles. *Journal of Microscopy*, 229(2) :327–330.

BIBLIOGRAPHIE

- [Hu and Hartland, 2002] Hu, M. and Hartland, G. V. (2002). Heat dissipation for au particles in aqueous solution : Relaxation time versus size. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(28) :7029–7033.
- [Huang et al., 2006] Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., and El-Sayed, M. A. (2006). Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society*, 128(6) :2115–2120.
- [Ionita et al., 2005] Ionita, P., Gilbert, B. C., and Chechik, V. (2005). Radical mechanism of a place-exchange reaction of au nanoparticles13. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(24) :3720–3722.
- [Ionita et al., 2008] Ionita, P., Volkov, A., Jeschke, G., and Chechik, V. (2008). Lateral diffusion of thiol ligands on the surface of au nanoparticles : An electron paramagnetic resonance study. *Analytical Chemistry*, 80(1) :95–106.
- [Johnson and Christy, 1972] Johnson, P. B. and Christy, R. W. (1972). Optical constants of the noble metals. *Phys. Rev. B*, 6(12) :4370–4379.
- [Jung et al., 2001] Jung, G., Brauchle, C., and Zumbusch, A. (2001). Two-color fluorescence correlation spectroscopy of one chromophore : Application to the e222q mutant of the green fluorescent protein. *The Journal of Chemical Physics*, 114(7) :3149–3156.
- [Jung et al., 2009] Jung, Y., Chen, H., Tong, L., and Cheng, J.-X. (2009). Imaging gold nanorods by plasmon-resonance-enhanced four wave mixing. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(7) :2657–2663.
- [Khlebtsov, 2008] Khlebtsov, N. G. (2008). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Analytical Chemistry*, 80(17) :6620–6625.
- [Kohei et al., 2005] Kohei, I., Tetsuhiko, N., and Hiromi, O. (2005). Near-field two-photon-induced photoluminescence from single gold nanorods and imaging of plasmon modes. *J. Phys. Chem. B*, 68(11) :13214 – 13220.
- [Kuhn et al., 2006] Kuhn, S., Hakanson, U., Rogobete, L., and Sandoghdar, V. (2006). Enhancement of single-molecule fluorescence using a gold nanoparticle as an optical nanoantenna. *Physical Review Letters*, 97(1) :017402.
- [Laurence et al., 2006] Laurence, T. A., Fore, S., and Huser, T. (2006). Fast, flexible algorithm for calculating photon correlations. *Opt. Lett.*, 31(6) :829–831.
- [Laurence et al., 2004] Laurence, T. A., Kapanidis, A. N., Kong, X., Chemla, D. S., and Weiss, S. (2004). Photon arrival-time interval distribution (paid) : a novel tool for analyzing molecular interactions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(9) :3051–3067.
- [Lee et al., 2004] Lee, D., Donkers, R. L., Wang, G., Harper, A. S., and Murray, R. W. (2004). Electrochemistry and optical absorbance and luminescence of molecule-like au₃₈ nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(19) :6193–6199.

BIBLIOGRAPHIE

- [Levi et al., 2005] Levi, V., Ruan, Q., and Gratton, E. (2005). 3-d particle tracking in a two-photon microscope : Application to the study of molecular dynamics in cells. *Biophysical Journal*, 88(4) :2919 – 2928.
- [Li et al., 2009] Li, S.-F., Zhang, X.-M., Yao, Z.-J., Yu, R., Huang, F., and Wei, X.-W. (2009). Enhanced chemiluminescence of the rhodamine 6g cerium(iv) system by auag alloy nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(35) :15586–15592.
- [Liang et al., 2005] Liang, H.-P., Wan, L.-J., Bai, C.-L., and Jiang, L. (2005). Gold hollow nanospheres : Tunable surface plasmon resonance controlled by interior-cavity sizes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(16) :7795–7800.
- [Link et al., 2002] Link, S., Beeby, A., FitzGerald, S., El-Sayed, M. A., Schaaff, T. G., and Whetten, R. L. (2002). Visible to infrared luminescence from a 28-atom gold cluster. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(13) :3410–.
- [Lippitz et al., 2005] Lippitz, M., van Dijk, M. A., and Orrit, M. (2005). Third-harmonic generation from single gold nanoparticles. *Nano Letters*, 5(4) :799–.
- [Magde et al., 1972] Magde, D., Elson, E., and Webb, W. W. (1972). Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29(11) :705–708.
- [Mandel, 1958] Mandel, L. (1958). Fluctuations of photon beams and their correlations. *Proceedings of the Physical Society*, 72(6) :1037–1048.
- [McFarland and Van Duyne, 2003] McFarland, A. D. and Van Duyne, R. P. (2003). Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nano Letters*, 3(8) :1057–1062.
- [Mie, 1908] Mie, G. (1908). Beitrage zur optik truber medien, speziell kolloidaler metallosungen. *Annalen der Physik*, 330 :377–445.
- [Mooradian, 1969] Mooradian, A. (1969). Photoluminescence of metals. *Phys. Rev. Lett.*, 22(5) :185–187.
- [Nappa et al., 2004] Nappa, J., Revillod, G., Abid, J.-P., Russier-Antoine, I., Jonin, C., Benichou, E., Girault, H. H., and Brevet, P.-F. (2004). Hyper-Rayleigh scattering of gold nanorods and their relationship with linear assemblies of gold nanospheres. *Faraday Discuss*, 125 :145.
- [Nehl et al., 2006] Nehl, C. L., Liao, H., and Hafner, J. H. (2006). Optical properties of star-shaped gold nanoparticles. *Nano Letters*, 6(4) :683–688.
- [Nerambourg et al., 2008] Nerambourg, N., Praho, R., Werts, M., Thomas, D., and Blanchard-Desce, M. (2008). Hydrophilic monolayer-protected gold nanoparticles and their functionalisation with fluorescent chromophores. *International Journal of Nanotechnology*, 5 :722–740.

BIBLIOGRAPHIE

- [Nägerl et al., 2000] Nägerl, U. V., Novo, D., Mody, I., and Vergara, J. L. (2000). Binding kinetics of calbindin-d28k determined by flash photolysis of caged ca^{2+} . *79(6)* :3009–3018.
- [Octeau et al., 2009] Octeau, V., Cognet, L., Duchesne, L., Lasne, D., Schaeffer, N., Fernig, D. G., and Lounis, B. (2009). Photothermal absorption correlation spectroscopy. *ACS Nano*, *3(2)* :345–350.
- [Palo et al., 2000] Palo, K., Ülo Mets, Jäger, S., Kask, P., and Gall, K. (2000). Fluorescence intensity multiple distributions analysis : Concurrent determination of diffusion times and molecular brightness. *Biophysical Journal*, *79(6)* :2858 – 2866.
- [Palpant et al., 2008] Palpant, B., Guillet, Yannick, R.-H. M., and Prot, D. (2008). Gold nanoparticle assemblies : Thermal behaviour under optical excitation. *Gold Bulletin*, *41/2* :105–115.
- [Persson et al., 2009] Persson, G., Thyberg, P., Sandein, T., and Widengren, J. (2009). Modulation filtering enables removal of spikes in fluorescence correlation spectroscopy measurements without affecting the temporal information. *The Journal of Physical Chemistry B*, *113(25)* :8752–8757.
- [Petkov et al., 2005] Petkov, V., Peng, Y., Williams, G., Huang, B., Tomalia, D., and Ren, Y. (2005). Structure of gold nanoparticles suspended in water studied by x-ray diffraction and computer simulations. *prb*, *72(19)* :195402–+.
- [Qian and Elson, 1991] Qian, H. and Elson, E. L. (1991). Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-d fluorescence correlation spectroscopy. *Appl. Opt.*, *30(10)* :1185–1195.
- [Richards and Wolf, 1959] Richards, B. and Wolf, E. (1959). Electromagnetic diffraction in optical systems structure of the image field in aplanatic system. *Proc. Roy. Soc.*, *A253* :358.
- [Rigler et al., 1993] Rigler, R., Mets, A., Widengren, J., and Kask, P. (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background : analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal*, *22(3)* :169–175.
- [Roper et al., 2007] Roper, D. K., Ahn, W., and Hoepfner, M. (2007). Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, *111(9)* :3636–3641.
- [Rosei, 1974] Rosei, R. (1974). Temperature modulation of the optical transitions involving the fermi surface in ag : Theory. *Phys. Rev. B*, *10(2)* :474–483.
- [Schaaff and Whetten, 1999] Schaaff, T. G. and Whetten, R. L. (1999). Controlled etching of au :sr cluster compounds. *The Journal of Physical Chemistry B*, *103(44)* :9394–9396.
- [Schuck et al., 2005] Schuck, P. J., Fromm, D. P., Sundaramurthy, A., Kino, G. S., and Moerner, W. E. (2005). Improving the mismatch between light and nanoscale objects with gold bowtie nanoantennas. *Phys. Rev. Lett.*, *94(1)* :017402.

BIBLIOGRAPHIE

- [Schwille et al., 1999] Schwille, P., Korch, J., and Webb, W. W. (1999). Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometry*, 36(3) :176–182.
- [Seelig et al., 2007] Seelig, J., Leslie, K., Renn, A., Kuhn, S., Jacobsen, V., van de Corput, M., Wyman, C., and Sandoghdar, V. (2007). Nanoparticle-induced fluorescence lifetime modification as nanoscopic ruler : Demonstration at the single molecule level. *Nano Letters*, 7(3) :685–.
- [Sherry et al., 2005] Sherry, L. J., Chang, S.-H., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P., Wiley, B. J., and Xia, Y. (2005). Localized surface plasmon resonance spectroscopy of single silver nanocubes. *Nano Letters*, 5(10) :2034–2038.
- [Siedentopf and Zsigmondy, 1903] Siedentopf and Zsigmondy, R. (1903). Ueber sichtbarmachung ultramikroskopischer teilchen, mit besonderer anwendung auf goldrubingläser (méthode permettant de voir les particules ultramicroscopiques et d’en évaluer les dimensions ; application spéciale aux verres rubis à l’or). *Drude’s Annalen der Physik*, 10 :1–39.
- [Sonnichsen and Alivisatos, 2005] Sonnichsen, C. and Alivisatos, A. P. (2005). Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy. *Nano Letters*, 5(2) :301–304.
- [Sonnichsen et al., 2002] Sonnichsen, C., Franzl, T., Wilk, T., von Plessen, G., Feldmann, J., Wilson, O., and Mulvaney, P. (2002). Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods. *Phys. Rev. Lett.*, 88(7) :077402.
- [Szabo, 1984] Szabo, A. (1984). Theory of fluorescence depolarization in macromolecules and membranes. *The Journal of Chemical Physics*, 81(1) :150–167.
- [Takahashi and Akiyama, 1986] Takahashi, Y. and Akiyama, H. (1986). Heat capacity of gold from 80 to 1000 k. *Thermochimica Acta*, 109(1) :105 – 109.
- [Tessier et al., 1999] Tessier, A., Méallet-Renault, R., Denjean, P., Miller, D., and Pansu, R. B. (1999). Conformational dynamics of calcium green 1 by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 1 :5767 – 5769.
- [Thomas et al., 2000] Thomas, D., Tovey, S. C., Collins, T. J., Bootman, M. D., Berridge, M. J., and Lipp, P. (2000). A comparison of fluorescent ca²⁺-indicator properties and their use in measuring elementary and global ca²⁺-signals. *Cell Calcium*, 28(4) :213 – 223.
- [Thomas et al., 2004] Thomas, M., Greffet, J.-J., Carminati, R., and Arias-Gonzalez, J. R. (2004). Single-molecule spontaneous emission close to absorbing nanostructures. *Applied Physics Letters*, 85(17) :3863–3865.
- [Turkevich et al., 1951] Turkevich, J., Stevenson, P., and Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.*, 11 :55–75.

BIBLIOGRAPHIE

- [Valeur, 2002] Valeur, B. (2002). *Molecular Fluorescence Principles and Applications*.
- [Varnavski et al., 2005] Varnavski, O. P., Goodson, T., Mohamed, M. B., and El-Sayed, M. A. (2005). Femtosecond excitation dynamics in gold nanospheres and nanorods. *Phys. Rev. B*, 72(23) :235405.
- [Vericat et al., 2005] Vericat, C., Vela, M. E., and Salvarezza, R. C. (2005). Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111) : surface structures, defects and dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7 :3258–+.
- [Vukovic et al., 2009] Vukovic, S., Corni, S., and Mennucci, B. (2009). Fluorescence enhancement of chromophores close to metal nanoparticles. optimal setup revealed by the polarizable continuum model. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(1) :121–133.
- [Wahl et al., 2003] Wahl, M., Gregor, I., Patting, M., and Enderlein, J. (2003). Fast calculation of fluorescence correlation data with asynchronous time-correlated single-photon counting. *Opt. Express*, 11(26) :3583–3591.
- [Wang et al., 2005] Wang, H., Huff, T. B., Zweifel, D. A., He, W., Low, P. S., Wei, A., and Cheng, J.-X. (2005). In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102 :15752–15756.
- [Werts et al., 2004] Werts, M. H. V., Zaim, H., and Blanchard-Desce, M. (2004). Excimer probe of the binding of alkyl disulfides to gold nanoparticles and subsequent monolayer dynamics. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3 :29 – 32.
- [White and McGeown, 2002] White, C. and McGeown, G. (2002). Imaging of changes in sarcoplasmic reticulum [ca²⁺] using oregon green bapta 5n and confocal laser scanning microscopy. *Cell Calcium*, 31(4) :151 – 159.
- [Widengren et al., 1999] Widengren, J., Terry, B., and Rigler, R. (1999). Protonation kinetics of gfp and fitc investigated by fcs – aspects of the use of fluorescent indicators for measuring ph. *Chemical Physics*, 249(2-3) :259 – 271.
- [Wilcoxon et al., 1998] Wilcoxon, J. P., Martin, J. E., Parsapour, F., Wiedenman, B., and Kelley, D. F. (1998). Photoluminescence from nanosize gold clusters. *J. Chem. Phys.*, 108(9137) :9137–9143.
- [Wohland et al., 2001] Wohland, T., Rigler, R., and Vogel, H. (2001). The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 80(6) :2987–2999.
- [Yang and Morin, 1997] Yang, F. d. and Morin, M. (1997). Réorganisation de la double couche électrique suivant la desorption reductive d’une monocouche auto-assemblée d’alkanethiol sur l’or <111>. *Canadian journal of chemistry*, 75 (11) :1680–1686.
- [Zhang et al., 2007] Zhang, J., Fu, Y., Chowdhury, M. H., and Lakowicz, J. R. (2007). Metal-enhanced single-molecule fluorescence on silver particle monomer and dimer : Coupling effect between metal particles. *Nano Letters*, 7(7) :2101–.

BIBLIOGRAPHIE

- [Zhang and Yang, 2005] Zhang, K. and Yang, H. (2005). Photon-by-photon determination of emission bursts from diffusing single chromophores. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(46) :21930–21937.
- [Zhao et al., 2003] Zhao, M., Jin, L., Chen, B., Ding, Y., Ma, H., and Chen, D. (2003). After-pulsing and its correction in fluorescence correlation spectroscopy experiments. *Appl. Opt.*, 42(19) :4031–4036.

Annexe A

Quelques rappels sur le phénomène de fluorescence

Niveaux d'énergie d'une molécule

Une molécule possède, par définition, plusieurs atomes donc plusieurs noyaux avec plusieurs électrons. Sa description doit donc faire intervenir les interactions électrostatiques entre les noyaux, entre les noyaux et les électrons et entre les électrons. Les molécules dont les propriétés spectroscopiques nous intéressent comportent plusieurs dizaines d'atomes. La résolution exacte de l'équation de Schrodinger n'est donc pas possible. L'approximation de Born-Oppenheimer qui consiste à considérer les noyaux fixes lors de l'étude des électrons permet de décomposer la fonction d'onde en une partie électronique et une partie nucléaire. La résolution de l'équation de Schrodinger sur la fonction d'onde relative aux électrons fait apparaître des niveaux électroniques. Ces derniers sont caractérisés par leurs nombres quantiques. La résolution de l'équation de Schrodinger sur la fonction d'onde relative aux noyaux surimpose aux niveaux électronique des sous niveaux de vibration qui possèdent eux mêmes des sous niveaux de rotation pour une molécule libre¹.

Diagramme de Jablonsky

Ces niveaux sont souvent représentés sous la forme d'un diagramme de Jablonsky [A.1](#).

Les transitions électroniques ont le plus souvent lieu entre un niveau d'énergie fondamental singulet ($J S = 0$) et un niveau excité lui aussi singulet. La transition du niveau excité vers le niveau triplet ($S=1$) n'est rendu possible que par le couplage spin-orbite et reste donc très

¹En milieu liquide, les interactions avec le milieu élargissent fortement les niveaux électronique excités et dans une moindre mesure les niveaux de vibration. La molécule n'étant plus un rotateur libre et l'écart entre les niveaux de rotation étant faible par rapport à l'agitation thermique, les niveaux rotationelles n'interviennent pas dans les conditions de nos expériences

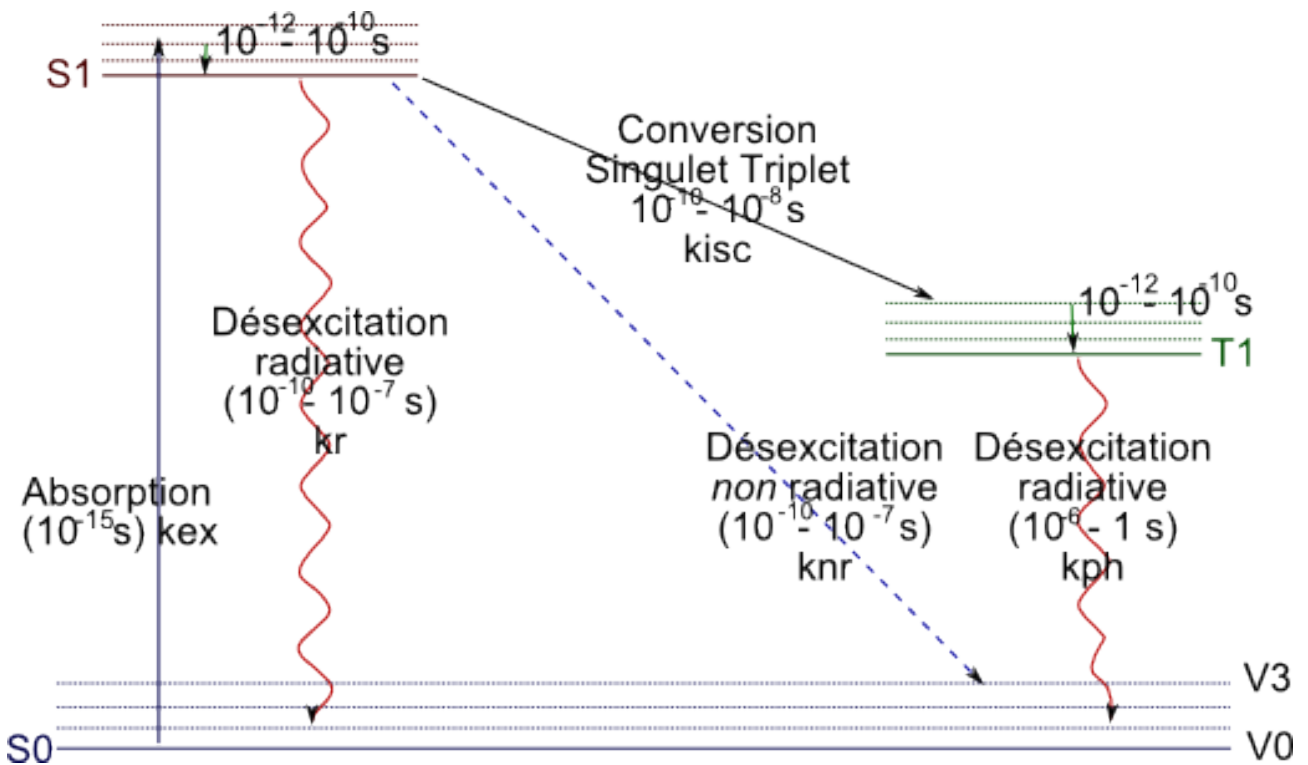


FIG. A.1 – Diagramme de Jablonsky simplifié.

faible comparé à la désexcitation vers le niveau fondamental. Ces règles de sélection rendent le triplet métastable, sa durée de vie est de l'ordre de la ms. Le solvant joue là encore un grand rôle en milieu liquide pour la durée de vie de l'état triplet qui n'est en général plus donnée par sa durée de vie radiative. Les collisions avec l'oxygène sont en général l'une des premières causes de relaxation, ce qui conduit à des durées de vie de quelques microsecondes à la dizaine de microsecondes.

La fluorescence

Au sens large, on appelle fluorescence les transitions radiatives dipolaires électriques entre des niveaux électroniques de la particule. Cette interaction impose par ailleurs des règles de sélection sur les nombres quantiques des transitions.

Section efficace d'absorption

La section efficace σ d'absorption est, par définition, la surface sur laquelle la molécule interagit avec le champ électrique excitateur. Elle relie le nombre de photons absorbés par la molécule par unité de temps au flux incident de photons. Elle dépend :

- des deux niveaux considérés via le moment dipolaire (ou quadropolaire) de la transition et de la différence d'énergie des niveaux considérés. Les deux niveaux mis en jeu sont sélectionnés par la longueur d'onde du photon incident.
- l'orientation du dipôle de la molécule par rapport à la polarisation du champ électrique incident.

Durée de vie radiative

L'énergie lumineuse absorbé provoque un transition d'un électron du niveau vibrationnel de l'état fondamental vers un niveau vibrationnel de l'état excité. L'absorption est immédiatement suivie d'un processus de relaxation vibrationnel très rapide (quelques picosecondes) qui précède le processus d'émission. Ainsi, la fluorescence émise à une énergie plus faible que celle qui a excité la molécule. Expérimentalement, ce décalage vers le rouge permet de séparer le photon de fluorescence du signal exciteur.

En général, la durée de vie du niveau excité est diminué par les interactions entre la molécule et son environnement. Pour une molécule en solution², le niveau excité est élargit par les interactions avec le solvant. Typiquement, dans ces conditions, la durée de vie radiativ de fluorescence est de l'ordre de quelques nanosecondes.

Rendement quantique

Le rendement quantique Q est la probabilité que la molécule se désexcite radiativement après avoir absorbé l'énergie lumineuse incidente.

Dans le cadre d'un système à 3 niveaux le rendement quantique s'écrit :

$$Q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_{isc}} \quad (\text{A.1})$$

où k_r est le taux de désexcitation radiatif i.e. l'inverse du temps moyen au bout duquel la molécule excitée se désexcite radiativement ; k_{nr} est le taux de désexcitation non radiatif, il englobe des effets comme par exemple la conversion interne de l'énergie d'excitation en changement de conformation, l'absorption à partir de l'état excité, des transferts de charge ou d'énergie vers le milieu extérieur ; k_{isc} est le taux de passage vers l'état triplet.

²Pour un solide, les interactions entre les atomes du réseau abaisse la durée radiative à une dizaine de femtosecondes.

Absorption à 2 photons et intensité du signal de fluorescence

Par excitation biphotonique on entend absorption quasi simultanée (en 10^{-18} s) de 2 photons pour créer une transition électronique dont l'énergie est la somme de celle des deux photons. (Graphe)

De façon générale, on peut exprimer le signal de luminescence observé en séparant le processus d'absorption de la lumière et le processus de réémission :

$$L = \eta_D k_e Q \tau_{acq}$$

où :

- η_D est l'efficacité de détection qui comprend entre autre l'efficacité de de détection optique et l'efficacité des détecteurs.
- k_e est le taux d'excitation en s^{-1} , on peut le reexprimer comme le flux de photons incidents multiplié par la section efficace d'absorption. Pour une excitation à 1 photon :

$$k_e = \sigma_a^{1\gamma} \frac{I}{h\nu}$$

et pour une excitation à 2 photon :

$$k_e = \frac{1}{2} \sigma_a^{2\gamma} \left[\frac{I}{h\nu} \right]^2$$

où :

- I est l'intensité du laser en $W.cm^{-2}$.
- ν est la fréquence du photon exciteur, $h\nu$ son énergie. $\frac{I}{h\nu}$ est donc le nombre de photon incident par cm^2 et par seconde.
- $\sigma_a^{1\gamma}$ (resp. $\sigma_a^{2\gamma}$) est la section efficace d'absorption à 1 photon (resp. 2 photons) en cm^2 (resp. $cm^4.s$).
- le facteur $\frac{1}{2}$ pour l'absorption à 2 photons car il faut deux photons pour créer la transition électronique et N photons ne peuvent créer au mieux que $\frac{N}{2}$ transitions.
- Q est l'efficacité quantique
- τ_{acq} le temps d'acquisition.

La section efficace d'absorption à 2 photons est extrêmement faible comparée à celle à 1 photon (typiquement, pour une molécule³ $\sigma_a^{2\gamma} \simeq 10^{-50} cm^4 s$ vs $\sigma_a^{1\gamma} \simeq 10^{-16} cm^2$. D'autre part l'absorption varie comme le carré de la puissance laser. Pour fixer les idées, une molécule de rhodamine soumise au flux solaire ($0.14 W cm^{-2}$ m émet en moyenne un photon par absorption à 2 photons tous les 3×10^{14} secondes soit 9 millions d'année ! Cependant, en utilisant un laser

³On pose souvent 1Gopper Mayer (1GM) = $10^{-50} cm^4$ du nom de la physicienne qui à prédit l'absorption à deux photons en 1931

puissant (quelques mW en intensité moyenne) et en impulsion (pour réunir l'énergie sur une durée très courte) et très focalisé (sur $1 \mu^2\text{m}$), on peut réussir à faire absorber quelques milliers de photon à une seule molécule en une dizaine de microseconde.

La particule est une sonde locale de son environnement

L'interaction de la molécule avec son environnement (solvant, autre molécules via des réaction chimiques, ...) a pour conséquences de déplacer et d'élargir les niveaux d'énergie, en particulier les niveaux électroniques. Ce changement des niveaux d'énergie se traduit par une modification des caractéristiques spectroscopiques de la molécule parfois facilement identifiable sur son signal de fluorescence. Cette dernière devient une sonde locale de son environnement. On peut ainsi étudier par exemple le pH (protonation de la sonde), des réactions redox (oxydation voire réduction de la sonde) ou les ions de la solutions (cf chapitre sur l'étude d'une sonde calcique).

Annexe B

Simulation

Le programme de simulation de diffusion de molécules a initialement été mis au point pour étayer les calculs relatifs à la corrélation des signaux de particule en rotation.

Il reprend les différentes facettes de l'expériences :

- Création d'un profil d'excitation laser
- Définition des caractéristiques des particules
- Diffusion brownienne translationnelle et rotationnelle des particules
- Interaction lumière matière
- Détection

Profil d'excitation

Le logiciel de simulation utilise pour l'instant le profil d'excitation présenté à la section [1.2.2.2](#) à savoir gaussien-gaussien. La polarisation du laser est donc considérée uniforme dans l'ensemble du volume d'étude. Par la suite, j'implémenterai le volume d'étude obtenues par interférences d'ondes planes. La zone d'étude simulée est un cube de $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ (avec des conditions aux limites périodiques). Le volume focal est échantillonné avec un pas de 1 nm. Le profil gaussien-gaussien possède la symétrie de révolution. Il suffit donc d'échantillonner un seul plan et la totalité du profil peut être calculée initialement et conserver en mémoire vive.

Profil de collection

Le simulateur utilise le profil décrit à la section [1.2.3.2](#). Ce dernier correspond à des particules emettant comme des dipôles et dont le temps de rotation est très inférieur au pas de temps δt de la simulation. Il tient aussi compte de la presence d'un trou de filtrage confocal. A deux photons cette CEF est tout de même utilisée mais avec un trou de filtrage de diametre infini.

Une bonne prise en compte de la rotation de la particule n'est pas encore implémentée. Elle consisterait, à tirer au hasard la direction de chaque photon émis dans une distribution traduisant le profil d'émission de la particule. On regarde ensuite si le photon se dirige vers le cône de collection de l'objectif.

Caractéristique des particules

Les particules sont définies par leur :

- rayon hydrodynamique, de cette grandeur découle le coefficient de diffusion translationnelle D et rotationnelle Θ .
- section efficace
- efficacité quantique qui peut varier au cours de la simulation
- position (x, y, z)
- nombre de dipole et l'orientation (2 angles) pour chaque dipole
- leur état interne pour modéliser l'état triplet ou une réaction chimique. On fixe pour cela le temps moyen τ_c du cycle brillant-sombre-brillant¹ et l'amplitude P de la réaction chimique en fixant le ratio temps de l'état brillant vs temps de l'état sombre. On fixe aussi la brillance dans l'état brillant et celle dans l'état sombre. A chaque début de cycle , on tire au hasard sur une distribution exponentielle $p(x)dx = \frac{1}{\mu} \exp(-\frac{x}{\mu})dx$ de moyenne $\mu = \tau_c$, le temps du cycle et sur une gaussienne centrée sur P de largeur $0.05 * P$ le ratio brillant vs sombre du cycle.

on ne tient pour l'instant pas compte de la saturation du fluorophore.

Diffusion

A chaque pas de temps δt , typiquement 50 ns, les particules se déplacent et tournent de manière brownienne. La diffusion est simulée en tirant au hasard trois fois sur une gaussienne centrée en 0 et de largeur $\delta l_i = \sqrt{2D\delta t^2}$. On augmente alors x de δl_x , y de δl_y , z de δl_z .

¹Pour l'état triplet ce temps de cycle est très long, notamment le retour de sombre vers brillant qui est de l'ordre de la milliseconde. La particule diffuse plus vite que ce temps de clignotement.

²De façon équivalente on peut tirer au hasard sur une sur une gaussienne centrée en 0 et de largeur $\delta L = \sqrt{6D\delta t}$ le rayon de la sphère où la sphère se retrouve après la diffusion. La direction de diffusion est choisie aléatoirement. On peut pour cela tirer au hasard sur une gaussienne centrée en 0 et de largeur 1 trois coordonnées d'un vecteur \mathbf{u} : $u_{\delta x}$, puis $u_{\delta y}$, puis $u_{\delta z}$. On a alors :

$$\begin{aligned} x &= x + \delta L \frac{u_{\delta x}}{\|\mathbf{u}\|} \\ y &= y + \delta L \frac{u_{\delta y}}{\|\mathbf{u}\|} \\ z &= z + \delta L \frac{u_{\delta z}}{\|\mathbf{u}\|} \end{aligned}$$

Interraction lumière matiere

Pour chaque pas de temps δt , on prend la valeur du profil d'excitation normalisé au point (x, y, z) où se trouve la particule $I(\sqrt{x^2 + y^2}, z)$, ainsi que le profil de collection $CEF(\sqrt{x^2 + y^2}, z)$. Le nombre moyen de photon emis par la particule \bar{N} vaut :

$$\bar{N} = \frac{1}{\gamma} \left(I_0 I(\sqrt{x^2 + y^2}, z) \right)^\gamma CEF(\sqrt{x^2 + y^2}, z) \delta t \sum_i^{n_d} A_\Omega^i E_\Omega^i$$

où :

- γ vaut 1 pour une excitation à 1 photon et 2 pour une excitation à 2 photons
- I_0 est l'intensité au centre du profil en Wm^{-2}
- A_Ω^i (resp. E_Ω^i) est la probabilité d'absorption (resp de collection) d'un photon alors que la direction du dipole i vaut Ω . Pour l'instant $E_\Omega^i = 1$, l'émission et la detection sont isotrope et typiquement $A_\Omega^i = |\mathbf{E} \cdot \boldsymbol{\mu}|^{2\gamma}$
- n_d est le nombre de dipôle
- η est l'efficacité globale de collection du montage. En pratique ce paramètre permet de controller la brillance des particules detectées.

\bar{N} est le nombre moyen de photon émis par la particule. Le nombre de photon effectivement emis puis collecté suit une distribution poissonniene de moyenne \bar{N} . On tire donc au hasard dans un distribution poissonniene le nombre N de photon reellement emis et collecté. Le programme de calcul de la corrélation utilisée en aval ne permet pas de prendre en compte plus d'un photon par pas de temps δt . Si $N > 1$, on tronque à $N = 1$, cela reproduit par ailleurs le temps mort du detecteur.

Detection

On conserve le temps d'arrivée du photon simulé, ainsi qu'un microtime choisit au hasard pour l'instant. Le fichier simulé est ensuite envoyer dans le même logiciel que celui utilisé pour analyser les expériences.

Annexe C

Code en C de l'algorithme de corrélation

```
double *TabListeLagTime;
double *HistogrammeCorrelation;

// Nombre de photons à prendre en compte
int NbrePhotonCptStart, NbrePhotonCptStop;

Photon *ListeTpsArrivePhotonStart, *ListeTpsArrivePhotonStop;

// Tps d'arrivé en tick horloge du dernier photon
__int64 TpsFinCptStart, TpsFinCptStop;

__int64 EcartStartStopCourant = 0;

int i_start, i_stop, i_lagtime;

int NumeroPhotonStopPlusProche = 0;
////////////////////////////////////

// Allocation et initialisation des variables
//[...]

// Boucle sur les photons du compteur start
```

ALGORITHME

```
for(i_start = 0; i_start < NbrePhotonCptStart; i_start++)
{
  i_lagtime = 0;
  // 1er étape :
  // Trouver le photon "NumeroPhotonStopPlusProche" du compteur stop dont
  // le temps est le plus proche du photon "i_start" du compteur start.
  while(EcartStartStopCourant > 0)
  {
    NumeroPhotonStopPlusProche++;
    EcartStartStopCourant =
    ListeTpsArrivePhotonStop [NumeroPhotonStopPlusProche]
    - ListeTpsArrivePhotonStart [i_start];
  }
  // Ce le photon "i_start" et le photon "NumeroPhotonStopPlusProche" sont
  // corrélé avec temps tau = EcartStartStopCourant. Reste à savoir à quel
  // case de l'histogramme HistogrammeCorrelation dont les abscisses sont
  // contenues dans TabListeLagTime correspond EcartStartStopCourant.
  while(i_lagtime < NbreLagTime && TabListeLagTime [i_lagtime]
        <= EcartStartStopCourant)
    i_lagtime;

  if(! Autocorrelation) //
  HistogrammeCorrelation [i_lagtime]++;

  i_stop = 1;
  if(i_start + i_stop >= NbrePhotonCptStop)
    break;
  // Deuxieme étape : Calculer "EcartStartStopCourant" avec les photons
  // stop suivant et repartir les "EcartStartStopCourant" dans
  // l'histogramme "HistogrammeCorrelation" jusqu'à ce que
  // l'écart de temps entre le photon stop et le photon
  // start soit plus grand que le temps de retard maximal
  // où l'utilisateur veut calculer la corrélation.
  // On passe alors au photon start suivant.

  while(i_lagtime < NbreLagTime && i_start + i_stop >= NbrePhotonCptStop)
  {
    EcartStartStopCourant =
    ListeTpsArrivePhotonStop [NumeroPhotonStopPlusProche + cpt_stop] -
    ListeTpsArrivePhotonStart [i_start]
```

ALGORITHME

```
    while(i_lagtime < NbreLagTime && TabListeLagTime[cpt_delai]
           <= EcartStartStopCourant)
        i_lagtime++;

    if(cpt_delai < NbreLagTime)
        HistogrammeCorrelation[i_lagtime]++;

i_stop++; // on passe à l'ecart de temps suivant

} // fin while, "EcartStartStopCourant" est plus grand que le plus grand
// des retard pour lequel on calcul la correlation
} // fin for, on a parcouru tous les photons start

// Normalisation
for(i_lagtime = 0; i_lagtime < NbreLagTime; i_lagtime)
{
HistogrammeCorrelation[i_lagtime] *= TpsFinCptStop / (NbrePhotonCptStart *
                                                    NbrePhotonCptStop);

    if(i_lagtime > 0)
        HistogrammeCorrelation[i_lagtime] /= TabListeLagTime[i_lagtime] -
                                                    TabListeLagTime[i_lagtime - 1];
}

// Libération des variables
//[...]
```


Annexe D

Changement de repère

Passage des composantes $\mu_i^e \mu_j^e$ des composantes du dipôle $\boldsymbol{\mu}^e$ d'émission dans le repere particulaire vers les composantes sphériques d'un tenseur cartésien d'ordre 2 :

$$T_0^{0,M} = \frac{1}{\sqrt{3}} \sum_{i=x,y,z} \mu_i^e \mu_i^e \quad (\text{D.1})$$

$$T_0^{2,M} = \frac{1}{\sqrt{6}} \left(3\mu_z^e \mu_z^e - \sum_{i=x,y,z} \mu_i^e \mu_i^e \right) \quad (\text{D.2})$$

$$T_{\pm 1}^{2,M} = \frac{-i}{2} \left((\mu_y^e \mu_z^e + \mu_z^e \mu_y^e) \pm i (\mu_z^e \mu_x^e + \mu_x^e \mu_z^e) \right) \quad (\text{D.3})$$

$$T_{\pm 2}^{2,M} = \frac{1}{2} \left((\mu_y^e \mu_y^e + \mu_x^e \mu_x^e) \pm i (\mu_x^e \mu_y^e + \mu_y^e \mu_x^e) \right) \quad (\text{D.4})$$

On notera que le tenseur est symétrique, seules les composantes d'indice pair interviennent. En conséquence le premier terme dépendant du temps de contribution de la rotation brownienne à la fonction de corrélation est du type $\exp - \left([6\Theta_{\perp} + m^2(\Theta_{\parallel} - \Theta_{\perp})] \tau \right)$ avec $-2 \leq m \leq 2$. Le terme suivant est du type $\exp - \left([20\Theta_{\perp} + m^2(\Theta_{\parallel} - \Theta_{\perp})] \tau \right)$ avec $4 \leq m \leq 4$

Transformation des composantes sphériques dans le repere particulaire vers le repere du laboratoire.

$$T_{l,m}^{\text{Labo}}(\Omega) = \sum_{m'} T_{l,m'}^{\text{Mol}} D_{m',m}^l(\Omega)$$

L'expression des composantes du tenseur cartésien $\mu_i^e \mu_j^e$ dans le repère du laboratoire est donnée ci-dessous en fonction des composantes sphériques $T_{l,m}^{\text{Labo}}(\Omega)$ du tenseur irréductible :

$$\mu_x \mu_x = \frac{1}{\sqrt{3}} T_0^{0,L}(\Omega) + \frac{1}{2} T_{-2}^{2,L}(\Omega) - \frac{1}{\sqrt{6}} T_0^{2,L}(\Omega) + \frac{1}{2} T_2^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.5})$$

$$\mu_x \mu_y = T_0^{1,L}(\Omega) + \frac{i}{2} T_{-2}^{2,L}(\Omega) - \frac{i}{2} T_2^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.6})$$

$$\mu_x \mu_z = -\frac{1}{\sqrt{2}} T_{-1}^{1,L}(\Omega) - \frac{1}{\sqrt{2}} T_1^{1,L}(\Omega) - \frac{1}{2} T_{-1}^{2,L}(\Omega) + \frac{1}{2} T_1^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.7})$$

$$\mu_y \mu_x = -T_0^{1,L}(\Omega) + \frac{i}{2} T_{-2}^{2,L}(\Omega) - \frac{i}{2} T_2^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.8})$$

$$\mu_y \mu_y = \frac{1}{\sqrt{3}} T_0^{0,L}(\Omega) - \frac{1}{2} T_{-2}^{2,L}(\Omega) - \frac{1}{\sqrt{6}} T_0^{2,L}(\Omega) - \frac{1}{2} T_2^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.9})$$

$$\mu_y \mu_z = \frac{1}{\sqrt{2}} T_{-1}^{1,L}(\Omega) + \frac{1}{\sqrt{2}} T_1^{1,L}(\Omega) + \frac{i}{2} T_{-1}^{2,L}(\Omega) + \frac{i}{2} T_1^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.10})$$

$$\mu_z \mu_x = \frac{1}{\sqrt{2}} T_{-1}^{1,L}(\Omega) + \frac{1}{\sqrt{2}} T_1^{1,L}(\Omega) - \frac{1}{2} T_{-1}^{2,L}(\Omega) + \frac{1}{2} T_1^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.11})$$

$$\mu_z \mu_y = -\frac{1}{\sqrt{2}} T_{-1}^{1,L}(\Omega) - \frac{1}{\sqrt{2}} T_1^{1,L}(\Omega) + \frac{i}{2} T_{-1}^{2,L}(\Omega) + \frac{i}{2} T_1^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.12})$$

$$\mu_z \mu_z = \frac{1}{\sqrt{3}} T_0^{0,L}(\Omega) + \sqrt{\frac{2}{3}} T_0^{2,L}(\Omega) \quad (\text{D.13})$$

Annexe E

Calcul des coefficients de rotation

Le tableau résume les principaux résultats :

Les C_{ij} ont été défini au chapitre 2 par :

$$C_{kk} = \sum_{m,m'} \left| \sum_{i,j} a_{ij} \int d\Omega \mu_i^a \mu_j^a \mu_k^e \mu_k^e D_{m,m'}^{l*}(\Omega) \frac{\sqrt{2l+1}}{8\pi^2} \right|^2 \quad (\text{E.1})$$

$$C_{kl} = \sum_{m,m'} \left[\sum_{i,j} a_{ij} \int d\Omega \mu_i^a \mu_j^a \mu_k^e \mu_k^e D_{m,m'}^{l*}(\Omega) \frac{\sqrt{2l+1}}{8\pi^2} \times \sum_{i,j} a_{ij}^* \int d\Omega \mu_i^a \mu_j^a \mu_l^e \mu_l^e D_{m,m'}^l(\Omega) \frac{\sqrt{2l+1}}{8\pi^2} \right. \\ \left. + \sum_{i,j} a_{ij} \int d\Omega \mu_i^a \mu_j^a \mu_l^e \mu_l^e D_{m,m'}^{l*}(\Omega) \frac{\sqrt{2l+1}}{8\pi^2} \times \sum_{i,j} a_{ij}^* \int d\Omega \mu_i^a \mu_j^a \mu_k^e \mu_k^e D_{m,m'}^l(\Omega) \frac{\sqrt{2l+1}}{8\pi^2} \right] \quad (\text{E.2})$$

où les composantes de $\boldsymbol{\mu}_a$ et $\boldsymbol{\mu}_e$ sont exprimées dans le repere du laboratoire.

Le calcul des coefficients de couplage fait intervenir des intégrales du type :

$$\int_0^{2\pi} d\alpha \left(\int_0^{2\pi} d\gamma \left(\int_0^\pi \sin \beta D_{m,m'}^{l*}(\Omega) D_{m_1,m_1'}^{l_1}(\Omega) D_{m_2,m_2'}^{l_2}(\Omega) d\beta \right) \right) = \langle l_1, m_1, l_2, m_2 | l, m \rangle \langle l_1, m_1', l_2, m_2' \rangle$$

où $\langle l_1, m_1, l_2, m_2 | l, m \rangle$ est le coefficient de Clebsch-Gordan. Dans le cas plus simple pour lequel on ne considère que les dipôles d'absorption et d'émission sont alignés les expressions se simplifient et les termes de couplage font intervenir les harmoniques sphériques.

Les coefficients sont calculés pour plusieurs situations expérimentales.

Les coefficients C_{ij} sont pondérés par les termes de collection du microscope $S_{\text{conf}}^{jj}(\mathbf{0})$ (voir chapitre 2). Les valeurs sont regroupées dans le tableau E.7 :

COEFFICIENTS DE ROTATION

$1phLinx$	C_{xx}	C_{yy}	C_{zz}	C_{xy}	C_{xz}	C_{yz}
$l = 2$	16/245	4/2205	4/2205	8/735	8/735	-4/2205
$l = 0$	1/25	1/225	1/225	2/75	2/75	2/225

FIG. E.1 – Coefficient C_{ij} dans le cas d'une absorption à un photon de polarisation linéaire selon x et des dipôles d'absorption et d'émission parallèles.

$1phLinx\theta$	C_{xx}	C_{yy}	C_{zz}
$l = 2$	$\frac{2(36 + 35 \cos 2\theta + \cos 4\theta)}{2205}$	$\frac{37 - 35 \cos 2\theta + 2 \cos 4\theta}{2205}$	$\frac{37 - 35 \cos 2\theta + \cos 4\theta}{2205}$
$l = 0$	$\frac{1}{225} (3 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta)^2$	$\frac{1}{900} (-3 + \cos 2\theta)^2$	$\frac{1}{225} (\cos^2 \theta + 2 \sin^2 \theta)^2$
	C_{xy}	C_{xz}	C_{yz}
$l = 2$	$\frac{19 + 7 \cos 2\theta - 2 \cos 4\theta}{2205}$	$\frac{19 + 7 \cos 2\theta - 2 \cos 4\theta}{2205}$	$\frac{2(6 - 7 \cos 2\theta - \cos 4\theta)}{2205}$
$l = 0$	$\frac{1}{450} (11 + 2 \cos 2\theta - \cos 4\theta)$	$\frac{2}{225} (3 + 2 \cos 2\theta \sin^2 \theta)$	$\frac{1}{450} (-3 + 2 \cos 2\theta)^2$

FIG. E.2 – Coefficient C_{ij} dans le cas d'une absorption à un photon de polarisation linéaire selon x et des dipôles d'absorption et d'émission ayant un angle θ .

$2phLinx$	C_{xx}	C_{yy}	C_{zz}	C_{xy}	C_{xz}	C_{yz}
$l = 2$	20/441	4/6615	4/6615	4/441	4/441	4/6615
$l = 0$	1/49	1/1225	1/1225	2/245	2/245	2/1225

FIG. E.3 – Coefficient C_{ij} dans le cas d'une absorption à deux photons de polarisation linéaire selon x et des dipôles d'absorption et d'émission parallèles.

COEFFICIENTS DE ROTATION

$2phLinx\theta$	C_{xx}	C_{yy}	C_{zz}
$l = 2$	$\frac{2(67 + 74 \cos 2\theta + 9 \cos 4\theta)}{6615}$	$\frac{737 - 788 \cos 2\theta + 99 \cos 4\theta}{79380}$	$\frac{737 - 788 \cos 2\theta + 99 \cos 4\theta}{79380}$
$l = 0$	$\frac{1}{1225} (3 + 2 \cos^2 2\theta)^2$	$\frac{1}{1225} (-2 + \cos 2\theta)^2$	$\frac{1}{1225} (-2 + \cos 2\theta)^2$
	C_{xy}	C_{xz}	C_{yz}
$l = 2$	$\frac{2(32 + 7 \cos 2\theta - 9 \cos 4\theta)}{6615}$	$\frac{2(32 + 7 \cos 2\theta - 9 \cos 4\theta)}{6615}$	$\frac{2(283 - 268 \cos 2\theta + 9 \cos 4\theta)}{39690}$
$l = 0$	$\frac{1}{1225} 2(5 + \cos 2\theta - \cos 4\theta)$	$\frac{1}{1225} 2(5 + \cos 2\theta - \cos 4\theta)$	$\frac{1}{1225} (-2 + \cos 2\theta)^2$

FIG. E.4 – Coefficient C_{ij} dans le cas d’une absorption à deux photons de polarisation linéaire selon x et des dipôles d’absorption et d’émission ayant un angle θ .

$2phCirc$	C_{xx}	C_{yy}	C_{zz}	C_{xy}	C_{xz}	C_{yz}
$l = 2$	4/945	4/945	0	-8/6615	0	0
$l = 0$	4/1225	4/1225	4/11025	8/1225	8/3675	8/3675

FIG. E.5 – Coefficient C_{ij} dans le cas d’une absorption à deux photons de polarisation circulaire et des dipôles d’absorption et d’émission parallèles.

$2phCirc\theta$	C_{xx}	C_{yy}	C_{zz}
$l = 2$	$\frac{1879 + 716 \cos 2\theta + 93 \cos 4\theta}{635040}$	$\frac{1879 + 716 \cos 2\theta + 93 \cos 4\theta}{635040}$	$\frac{4(7 \sin^4 \theta + \sin^2 2\theta)}{6615}$
$l = 0$	$\frac{1}{11025} (5 + \cos 2\theta)^2$	$\frac{1}{11025} (5 + \cos^2 2\theta)^2$	$\frac{1}{11025} 4(-2 + \cos 2\theta)^2$
	C_{xy}	C_{xz}	C_{yz}
$l = 2$	$-\frac{127 + 236 \cos 2\theta + 21 \cos 4\theta}{317520}$	$\frac{2(1 + 3 \cos 2\theta) \sin^2 \theta}{6615}$	$\frac{2(1 + 3 \cos 2\theta) \sin^2 \theta}{6615}$
$l = 0$	$\frac{1}{11025} 2(5 + \cos 2\theta)^2$	$\frac{1}{11025} 2(19 - 6 \cos 2\theta - \cos 4\theta)$	$\frac{1}{11025} 2(19 - 6 \cos 2\theta - \cos 4\theta)$

FIG. E.6 – Coefficient C_{ij} dans le cas d’une absorption à deux photons de polarisation linéaire selon x et des dipôles d’absorption et d’émission ayant un angle θ .

	C_{xx}	C_{yy}	C_{zz}	C_{xy}	C_{xz}	C_{yz}
Pas de polariseur	135×135	135×135	38×38	135×135	135×38	135×38
Polarisation en x	135×135	$0,45 \times 0,45$	$18,7 \times 18,7$	$135 \times 0,45$	$135 \times 18,7$	$0,45 \times 18,7$
Polarisation en y	$0,45 \times 0,45$	135×135	$18,7 \times 18,7$	$0,45 \times 135$	$0,45 \times 18,7$	$135 \times 18,7$

FIG. E.7 – Coefficient C_{ij} dans le cas d'une absorption à deux photons de polarisation linéaire selon x et des dipôles d'absorption et d'émission ayant un angle θ .