



HAL
open science

Fluorescence et Diffusion Raman exaltée de surface (SERS) de molécules individuelles

Carine Julien

► **To cite this version:**

Carine Julien. Fluorescence et Diffusion Raman exaltée de surface (SERS) de molécules individuelles. Physique [physics]. Université Paris Sud - Paris XI, 2004. Français. NNT : . tel-00011564

HAL Id: tel-00011564

<https://theses.hal.science/tel-00011564>

Submitted on 8 Feb 2006

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 XI Centre d'Orsay

Thèse

présentée pour obtenir le grade de

**Docteur en Sciences
de l'Université Paris XI**

par
Carine Julien

Sujet :

**Fluorescence
et
Diffusion Raman exaltée de surface (SERS)
de molécules individuelles**

soutenue le 14 décembre 2004 devant la commission d'examen :

M. Patrice Gadenne	Rapporteur
M. Robert Pansu	Rapporteur
Mme Anne Débarre	Directrice de Thèse
M. Serge Huant	Examineur
M. Mehran Mostafavi	Examineur
M. Paul Tchénio	Examineur
M. Talal Mallah	Invité

Remerciements

Je remercie M. Pierre Pillet, directeur du laboratoire Aimé Cotton pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour y mener à bien mes travaux de thèse, mais aussi participer à la vie de celui-ci en tant que membre du conseil de laboratoire.

Je suis très reconnaissante à MM Patrice Gadenne et Robert Pansu qui ont 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, aux tournures "Proustiennes" un peu alambiquées.

Je remercie également les autres membres du jury,
M. Serge Huant avec qui je n'ai eu que trop peu de temps pour discuter,
M. Mehran Mostafavi avec qui j'ai eu aussi grand plaisir à collaborer et dont les agrégats d'argent indispensables m'ont permis de conduire l'étude SERS de molécules individuelles, et enfin M. Tallal Mallah, que j'ai entraîné dans mon aventure de chimiste au pays de la molécule unique.

Ma prose s'est à présent tarie et j'avoue ne pas réussir à trouver les mots qu'il me faudrait pour réellement traduire à quel point je voudrais remercier ma directrice de thèse, Anne Débarre, et Paul Tchénio. Merci de m'avoir accueillie, moi qui n'avais jamais touché à un microscope! Merci de m'avoir tant appris, de m'avoir soutenue, mais aussi fait confiance. Grâce à vous, ces trois années (et quelques...!) ont été tellement enrichissantes, scientifiquement mais aussi humainement.

Merci.

Merci évidemment aux autres membres de l'équipe nanospectroscopie:

l'ancien, Rodolphe mon co-thésard, à présent devenu un "grand-maître" de conférence avec qui j'ai profité de superbes années et à qui j'offre à nouveau mon hospitalité à la capitale;

Alain, merci pour tous nos déjeuners en tête à tête, et pardon pour mes violents essais de logiciel, et aussi pour ces derniers mois de rédaction pendant lesquels j'ai été si envahissante !!!

Merci enfin à Daniele et à Elodie à qui je souhaite de bien profiter de ses années de thèse dans le groupe.

Je tiens à remercier J.P. Boilot et F. Chaput du laboratoire de physique condensée de l'Ecole Polytechnique pour la préparation des échantillons solgel.

Merci également à Christian Colliex du Laboratoire de Physique des solides et à son équipe, Odile et Mathieu, avec qui j'ai passé de bons moments et de longues heures à la recherche de peapods et surtout d'agrégats aux plasmons attendus! J'espère que les prochains déroulements seront fructueux... Aussi, ciao Dario!

Je tiens à remercier l'équipe de mécanique du LAC, pour toutes ces petites pièces, pas très intéressantes pour eux mais indispensables pour moi, dessinées de mon mieux et

matérialisées avec tant de maestria et de gentillesse malgré mon vocabulaire déboullonné et malhabile. Merci aussi à Jocelyne, ses "tells" nets et son sourire face à mes "le réseau y marche pas". Merci enfin au personnel administratif.

Une thèse, c'est aussi trois ans de vie avec des hauts et des bas, des matins en forme d'autres beaucoup moins, et puis des moments de doute, face à une absence totale de signaux ou objets d'intérêt, "capitaine! capitaine! Regardez, il n'y a rien...", ou alors des signaux fous, où la sensibilité de la détection de molécules uniques fait payer cher le fait de profiter d'un rafraîchissement de la peinture du couloir...

Pour tous ces moments, il a été bon de pouvoir profiter de la présence de tous les autres thésards qui ont constitué bien plus qu'une simple communauté scientifique environnante. Merci à mes aînés, Salah mon supporter, ma Nathalia du LAC, Nico Loulou, Fabienne Ze active woman, Jérôme aux bons mots. Merci à mes contemporains, qui ont subi le "all inclusive, Carine 3 years tour", Vincent l'analyseur spectral et mon secrétaire (!!!), le Zouper Cool Etienne dit Ananassosov@polytech.org à qui j'ai fait profiter plus qu'il ne devait de soirées interminables au LAC mea maxima culpa mais bienheureux les simples d'esprit, Kai ma caille le surréalisme incarné be aware et concentre toi, et Pascal. Merci, et profitez bien de la suite les futurs docteurs: Aurélie ma coloc' d'un an déjà, Nassim le chef des cold guys, Frédéric, Vincent, Pierre, Guillaume,...

Ici, je veux aussi remercier de manière non exhaustive tous les grands du LAC, qui ont aussi contribué à l'insertion d'une petite chimiste dans ce dur monde de physiciens.

Merci à M. Bauche, parce que c'est aussi grâce à lui que j'ai pu venir au LAC, à Mme Bauche aussi pour sa gentillesse bienveillante, Ivan le fumeur intermittent, Fabien le qualificationneur qualificationné dont j'ai raté les pots, Cyril le serreur de main coloré à la rhodamine, Amanda toujours efficace et prête à nous aider, et tous les autres à qui je demande de me pardonner d'être ici absents.

J'espère bientôt vous revoir.

Merci aussi aux enseignants chimistes que j'ai rencontrés pendant mon monitorat, et un coucou particulier à Laure.

Merci à mes amis, qui ne m'ont pas vue ni entendue ces derniers mois, mais qui sont réapparus, ayant propagé indubitablement la nouvelle de mon "adoubement" de docteur !!!

Merci aussi et encore pardon à ma famille, mon caractère ne s'en étant pas amélioré, merci pour l'amour, la confiance et l'admiration (que je jure ne pas tant mériter!) que vous me portez. Bravo à tous de si bien prononcer à présent "Spectroscopie", et ce n'est pas une mince affaire...

Enfin, MERCI MON GUILLAUME. Pardon pour ces durs mois pendant lesquels je t'ai laissé seul tout gérer y compris ma douce humeur qui est allée crescendo...!

Sans toi et ton soutien sans faille, je n'y serais jamais arrivée. Merci.

Table des matières

Introduction	5
1 Principes de la détection de molécules uniques par spectroscopie optique	13
1.1 Généralités sur les méthodes spectroscopiques	13
1.1.1 Introduction	13
1.1.2 Spectroscopie de fluorescence	17
1.1.3 Spectroscopie Raman	23
1.2 Problématique de la spectroscopie de molécules individuelles en fluorescence	29
1.2.1 Intérêt et apport vis-à-vis des techniques macroscopiques	29
1.2.2 Signature spectroscopique spécifique de molécule individuelle	31
1.2.2.1 Traces temporelles	31
1.2.2.2 Enregistrement du déclin de fluorescence et mesure de la durée de vie de fluorescence	34
1.2.2.3 Spectres de molécules uniques	35
1.2.2.4 Polarisation	36
1.2.3 Signal et bruit de fond	37
1.3 Problématique de la spectroscopie Raman de molécules individuelles	40
1.3.1 Intérêt et apport vis-à-vis des techniques macroscopiques	40
1.3.2 Signal et bruit de fond	41
1.3.3 Caractéristiques du signal Raman de molécules uniques	43
2 Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes	47
2.1 Motivations, système d'intérêt et mise en oeuvre de l'étude	47
2.1.1 Motivations	47
2.1.2 Système étudié : films minces solgel dopés	48
2.1.2.1 Matériaux solgel	48
2.1.2.2 Echantillon étudié	52
2.1.3 Dispositif expérimental- microscope grand champ et détection confocale	53

TABLE DES MATIÈRES

2.2	Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment	59
2.2.1	Méthode	59
2.2.1.1	Observations expérimentales et problématique du traitement des données	59
2.2.1.2	Un outil indispensable pour l'analyse systématique : logiciel d'exploitation semi-automatique	62
2.2.2	Etude du photoblanchiment des molécules de pérylène orange dans la matrice solgel mince	66
2.2.2.1	Histogrammes	67
2.2.2.2	Analyse semi-quantitative des mécanismes de photoblanchiment	73
2.3	Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal	81
2.3.1	Diffusion spatiale	81
2.3.1.1	Description du phénomène	81
2.3.1.2	Etude et analyse	82
2.3.1.3	Expérience sous saturation de THF	85
2.3.1.4	Discussion	86
2.3.2	Nucléation-agrégation	90
2.3.2.1	Description du phénomène et caractérisation des "agrégats"	90
2.3.2.2	Etude et discussion des paramètres influant sur l'"agrégation"	94
2.4	Nanospectroscopie– Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques	102
2.4.1	Description et exploitation des spectres expérimentaux	104
2.4.2	Discussion	108
2.4.3	Suivi temporel des spectres	117
2.4.4	Réflexions sur les "agrégats"	123
2.5	Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.	125
2.5.1	Analyse et discussion- focus sur le phénomène de clignotement et de fluctuation du signal	127
2.5.2	Une grande richesse de comportements-description de "familles"	139
2.6	Conclusion	146
3	La molécule unique comme sonde de l'effet SERS	147
3.1	Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS	147

TABLE DES MATIÈRES

3.1.1	Historique	147
3.1.1.1	Découverte et SERS canonique	147
3.1.1.2	"NanoSERS"	149
3.1.1.3	Enjeu du nanoSERS	151
3.1.2	L'effet d'exaltation de surface	152
3.1.2.1	Les sources électromagnétiques de l'effet SERS	153
3.1.2.2	L'effet chimique	160
3.2	Système étudié et dispositif expérimental	164
3.2.1	Motivations de l'étude	164
3.2.2	Les agrégats constitutifs du substrat SERS	166
3.2.3	Préparation des échantillons-procédure expérimentale	169
3.2.4	Dispositif expérimental	170
3.3	Spectres SERS de molécules uniques	175
3.3.1	Résultats-observations expérimentales	175
3.3.1.1	Observations qualitatives - dynamique temporelle des spectres SERS	178
3.3.1.2	Analyse des spectres	183
3.3.2	Une mesure du facteur d'exaltation liés aux agrégats étudiés	191
3.3.2.1	Signal SERS de la rhodamine 6G	192
3.3.2.2	Signal de fluorescence de la rhodamine 6G	193
3.3.2.3	Calcul du facteur d'exaltation	197
3.3.3	Vers une compréhension de l'effet chimique : Mise en évidence de la présence d'argent non réduit	198
3.4	Caractérisation des agrégats actifs en microscopie électronique	204
3.4.1	Procédure	205
3.4.2	Résultats et discussion	209
	Conclusion	213
	Annexes	217
	Bibliographie	229

TABLE DES MATIÈRES

Introduction

" Ce qui est admirable, ce n'est pas que le champ des étoiles soit si vaste, c'est que l'homme l'ait mesuré. "

Anatole France, Le Jardin d'Epicure (1894)

Après la conquête de l'infiniment grand— l'espace— est venue celle de l'infiniment petit. La seconde partie du XX^e siècle a vu l'émergence de la technologie informatique et l'avènement de la microtechnologie, avec pour enjeux la conception, l'élaboration et le contrôle d'objets de plus en plus petits, de taille microscopique. Les progrès scientifiques et technologiques spectaculaires dans le domaine de la miniaturisation, ont permis de franchir la barrière du micromètre, pour atteindre l'ère du nanomètre. Depuis quelques années, les nanotechnologies, ou les nanosciences— entre lesquelles il est devenu difficile d'établir une frontière nette, tant est rapide l'intégration des découvertes de la recherche fondamentale/appliquée et tant la synergie entre ces deux types de recherches est devenue un moteur de progression puissant— sont omni-présentes. La raison en est en partie que ce terme recouvre des problématiques différentes, et des domaines à différents niveaux de maturité scientifique : de toutes les technologies "plus petites" que les microtechnologies, à la création de nanomachines, en passant par le contrôle au niveau moléculaire ou atomique pour créer des structures étendues avec des organisations moléculaires (autoorganisation incluse) fondamentalement nouvelles.

Outre le fait que les nanosciences sont intimement mêlées à notre mode de vie et ont des enjeux socio-économiques considérables, concrètement, quels sont les enjeux scientifiques réels et sous-jacents des nanosciences ?

Il s'agit non seulement de créer artificiellement un "monde du petit", mais aussi de pouvoir appréhender le monde réel à une échelle inhabituelle pour en comprendre les mécanismes élémentaires. L'élaboration d'objets de taille nanométrique, outre leur intérêt intrinsèque pour des applications données, a un enjeu majeur : maîtriser des systèmes modèles pour progresser dans la compréhension d'effets spécifiques aux objets de petite taille (effet quantique

par exemple).

En d'autres termes, on peut distinguer deux champs d'investigation majeurs : la synthèse ou la construction de nano-objets, et/ou de manière symbiotique leur contrôle, leur analyse ce qui suppose de développer des outils d'imagerie et surtout d'analyse à leur échelle. Il s'agit donc d'un effort scientifique global, largement inter-disciplinaire.

Si l'on pense naturellement en premier lieu aux composants électroniques— processeurs, transistors, dispositifs de stockage d'informations— cette tendance scientifique est générale et touche tous les domaines, de la physique, la chimie, à la biologie. Les nano-objets qui sont le centre de l'attention sont ainsi très divers. De manière non exhaustive, il s'agit par exemple des composants élémentaires de matériaux nanostructurés, de nanocristaux pour l'informatique quantique ou encore comme sources de photon unique, ou de nanoparticules de métalliques comme les agrégats. Les nano-objets d'intérêt peuvent aussi être les nanotubes, aux propriétés recherchées de conduction en vue d'utilisation comme jonction dans des circuits "nano-intégrés" ou encore comme réacteur chimique. Enfin, et "tout simplement", il peut s'agir de molécules individuelles de toute nature (in/organique, chromophores, biomolécules comme les protéines), encore plus élémentaires et petites que les premiers objets cités.

Outre la mise en oeuvre, on peut distinguer deux problématiques différentes pour la "nano-analyse".

Les nano-objets sont effectivement soit hétérogènes par synthèse— et on pense alors aux boîtes quantiques ou en particulier aux nanotubes dont le diamètre mais aussi la chiralité peuvent être très différents au sein d'un échantillon contenant des individus élaborés au cours du même processus, et déterminent les propriétés, notamment électroniques, des tubes— soit identiques par synthèse, de même nature chimique mais inclus dans une matrice qui est hétérogène et englobe un nombre important de nano-environnements différents.

Dans le cas des nano-objets différents par synthèse, l'objectif premier des études sera de corréler finement leur propriétés avec leur structure (morphologie, structure électronique,...) pour déterminer quels paramètres particuliers influencent ces propriétés. Une telle étude nécessite de s'affranchir de l'effet de moyenne lié à l'étude simultanée d'objets différents, et la voie optimale est d'analyser ces objets un par un.

La problématique de l'analyse d'objets identiques dans un environnement hétérogène est différente.

Prenons par exemple le cas de molécules individuelles identiques chimiquement comme nano-objet d'intérêt. Les propriétés des molécules sont très sensibles à leur environnement. Ainsi, même dans un environnement homogène, les interactions de la molécule avec son milieu agissent comme des perturbations et modifient légèrement sa dynamique interne. On peut néanmoins étudier les propriétés intrinsèques de la molécule (en considérant qu'en dehors de conditions extrêmes d'ultra-vide, c'est bien toujours le système global molécule-milieu et

non pas molécule isolée qui est en jeu). En milieu homogène, il est possible d'étudier la réponse globale de plusieurs individus pour étudier leurs propriétés. Par contre dans un milieu hétérogène, les propriétés des molécules varient individuellement en fonction des interactions avec leur environnement local, on aura donc à nouveau un effet de moyenne dans la réponse globale des molécules.

Pour progresser dans la compréhension des mécanismes fondamentaux de dynamiques interne et externe (réactions chimiques, photochimiques, physiologiques ; interactions physico-chimiques ; catalyse) des molécules, ou celles de mécanismes microscopiques dont sont connus l'existence et le résultat final mais pas par exemple les étapes élémentaires et les acteurs successifs (détection d'espèces intermédiaires de faible durée de vie, mécanisme de transport membrane-cellule, repliement des protéines), il sera donc également nécessaire d'étudier les molécules individuellement.

Réciproquement, si les propriétés des molécules sont connues, on pourra utiliser cette dernière comme une sonde locale nanométrique très efficace de l'hétérogénéité du milieu dans lequel elle est insérée, et déterminer par exemple des caractéristiques telles que le pH local ou la concentration en différentes espèces chimiques, la rigidité du milieu, etc... On utilisera donc la molécule pour caractériser son environnement.

Tout au long de ma thèse ce sont ces deux directions que je me suis attachée à suivre.

Le travail de thèse que je présente dans ce manuscrit s'inscrit donc dans ce domaine des nanosciences, non pas au niveau de la synthèse des objets mais au niveau de leur analyse, dans le cadre du développement de méthodes et de protocoles de caractérisation par microscopie et par spectroscopie optique, mais aussi à travers la compréhension des phénomènes en jeu dans les interactions lumière-matière conduisant au signal spectroscopique.

Avant de développer plus précisément le plan suivant lequel je présenterai les différentes étapes de mon travail, on peut essayer de définir la place des méthodes développées parmi les autres méthodes de microscopies privilégiées pour l'étude des nano-objets.

La première révolution dans le domaine de l'imagerie à très haute résolution a été celle des microscopies électroniques à balayage et en transmission (MEB et MET), qui permettent d'obtenir des images avec une résolution nanométrique voire atomique grâce à la dimension nanométrique du faisceau d'électrons pour le MEB. La nouvelle génération de microscopes électroniques pourrait même permettre d'atteindre des résolutions de un à quelques *Ångström*.

Le second type de microscopies, dont l'usage est devenu aujourd'hui courant, correspond aux microscopies de champ proche à effet tunnel et à force atomique, d'acronymes anglais STM et AFM respectivement ; le STM ayant ouvert la voie au début des années 80. La très haute résolution spatiale caractérisant les techniques de champ proche est liée à la dimension

très restreinte de la sonde— dans les deux cas considérés, l’apex nanométrique d’une pointe métallique conductrice ou semi-conductrice approchée quasiment au contact (une fraction de nanomètre) de la surface de l’échantillon. Ces microscopies exploitent les interactions très locales de la pointe avec l’échantillon et leur très rapide variation d’intensité avec la distance sonde-échantillon : le passage de courant tunnel pour le STM qui permet d’obtenir une cartographie des atomes de surface à travers leur densité électronique locale, et les forces exercées sur la pointe (interactions de Van der Waals par exemple pour l’AFM).

Ces microscopies de champ proche donnent également accès à d’autres informations, comme la spectroscopie électronique par STM et la cartographie de champs de force pour l’AFM et ses dérivés. La contrepartie de la résolution spatiale de ces microscopies est la limitation de l’analyse à la surface de l’échantillon et sur des zones de dimension limitées, le STM est aussi limité à l’étude d’échantillons conducteurs. Il peut de plus intervenir un effet invasif de la sonde.

La microscopie électronique est un outil très performant, qui peut de plus être couplée à des analyses chimiques spectroscopiques (EELS :spectroscopie de perte d’énergie des électrons) en MET et structurales (diffraction)— mais leur mise en oeuvre reste très restreinte, et la microscopie électronique est à l’heure actuelle elle aussi largement et majoritairement utilisée comme outil d’imagerie.

La microscopie optique offre plusieurs avantages. D’une part, elle peut être mise en oeuvre en champ lointain, et elle est donc moins invasive. D’autre part, elle offre, en plus de l’observation (imagerie, localisation, détection) de l’échantillon, de multiples voies d’analyse, à travers les nombreuses signatures spectroscopiques différentes qu’il est possible d’exploiter : la diffusion élastique ou Rayleigh, mais aussi des signaux spectroscopiques permettant de sonder les propriétés de la matière grâce aux différentes sous-structures de niveaux d’énergie qui la caractérisent, avec par exemple la fluorescence, la phosphorescence et la diffusion Raman. Cette analyse spectroscopique ne se limite pas à l’acquisition de spectres mais elle peut être étendue à l’acquisition de paramètres physico-chimiques comme la durée de vie d’états électroniques par exemple.

Cependant, la résolution latérale des microscopies optiques classiques est limitée à la longueur d’onde λ de la source utilisée, et atteint au mieux en microscopie confocale la limite de diffraction, soit $\lambda/2$ (critère de Rayleigh), ce qui correspond dans le domaine visible à quelques centaines de nanomètres.

Pour dépasser la limite de résolution de la microscopie optique, l’une des voies possibles est à nouveau d’utiliser des sondes locales nanométriques placées dans le champ proche de la surface de l’échantillon. On parle alors de microscopies de champ proche optiques ou SNOM, dont la mise en place et les techniques d’élaboration des sondes utilisées (fibre optique étirée et métallisée) restent délicates et sont encore en évolution.

Une alternative intéressante pour contourner la limite de la résolution spatiale de la microscopie optique et ne pas la limiter à une technique de surface est d'exploiter la petite taille des objets dont on détecte individuellement le signal spectroscopique. On exploite ainsi les propriétés de sonde très locale (nanométrique) de l'objet. En dispersant suffisamment les objets, on peut les étudier individuellement, même si la résolution spatiale du microscope est supérieure à la taille de l'objet. Dans ce cas, il ne s'agit plus vraiment d'une problématique d'imagerie— même si au sein même de notre groupe a été développé un outil d'imagerie hyperspectrale, qui permet à travers un traitement de sélection des signatures spectroscopiques spécifiques, de reconstruire une cartographie chimique de l'échantillon— mais de détection puis d'analyse du signal faible d'un unique objet.

C'est dans ce cadre que se placent mes travaux de thèse, avec comme objet d'étude dont on détecte le signal spectroscopique, des molécules individuelles.

Deux signaux spectroscopiques sont pertinents pour l'étude et l'analyse de molécules individuelles : l'émission de fluorescence et la diffusion Raman.

Ici, les objets étudiés sont identiques par synthèse mais éventuellement insérés dans un environnement hétérogène. Rappelons que l'avantage principal des études d'objets individuels est la suppression de l'effet de moyenne lié à la détection du signal provenant d'un nombre important de molécules situées dans des environnements différents. Cet effet de moyenne n'est pas seulement spatial, il concerne aussi les effets dynamiques.

En étudiant les molécules une à une, on pourra donc aussi s'intéresser à des processus dynamiques (réactions chimique, dynamique de la molécule au cours du cycle d'émission), et à l'évolution des paramètres d'émission d'une molécule au cours du temps, en s'affranchissant de la nécessité de synchronisation dans le cas où plusieurs molécules sont sondées à la fois, et pour lesquelles les processus peuvent avoir lieu de manière simultanée, mais avec un déphasage.

C'est en 1989 que furent enregistrés par *W.E Moerner* [1] à San Jose, et par *M. Orrit* [2] à Bordeaux, les premiers signaux spectroscopiques de molécule unique. Il s'agissait respectivement de spectres d'absorption et d'excitation de la fluorescence. Un réel engouement s'ensuivit et de nombreuses études furent effectuées, pour enregistrer aussi le spectre de fluorescence de molécules individuelles (ex : *Guttler* en 94 [3],...). Grâce aux progrès effectués dans le domaine des détecteurs de haute sensibilité, des conditions de très basses températures des premières expériences, la détection de la fluorescence de molécules uniques s'est élargie aux conditions ambiantes. Ainsi, cette technique s'est montrée performante dans de nombreux domaines, de la connaissance de la physico-chimie de milieux denses, inorganiques ou polymères, à celle de la dynamique de macromolécules biologiques étudiées dans des conditions comparables aux conditions *in vivo* [4, 5].

Si la fluorescence de molécule unique offre déjà un gain considérable de données et paramètres individuels par rapport au signal macroscopique beaucoup plus large, la possibilité d'obtention d'une signature chimique fine des espèces est très limitée. L'obtention de la structure vibrationnelle "cachée" dans la bande de fluorescence n'est en effet possible que dans des conditions expérimentales restreintes, très sévères et limitantes [6], différentes des conditions "naturelles". Une deuxième limitation concerne les objets étudiés, qui doivent être fluorescents. On contourne évidemment cette limitation, notamment dans l'étude de macromolécules biologiques, en greffant sur ces molécules des marqueurs fluorescents. Outre le fait que cette étape de marquage peut être très complexe à mettre en oeuvre, on ne peut tout à fait exclure la possibilité que la présence du marqueur dénature la molécule et perturbe les processus particuliers (repliement,...) dont on veut connaître les étapes et mécanismes. C'est pourquoi d'autres types de microscopies sont en cours de développement, pour exploiter les propriétés d'émission intrinsèques de certaines molécules biologiques par absorption multiphotonique.

Il est possible par contre de mettre en oeuvre les spectroscopies de diffusion Raman et d'absorption Infrarouge, spectroscopies vibrationnelles, qui présentent l'avantage certain de pouvoir sonder toutes les espèces. Ces signaux spectroscopiques sont de plus très riches et fournissent une véritable empreinte digitale de la molécule étudiée.

Malheureusement, dans le cas de la spectroscopie IR, les détecteurs ne possèdent pas la sensibilité suffisante, dans la gamme de longueurs d'onde d'intérêt, et cette spectroscopie est inexploitable en mode molécule unique.

Le signal Raman pose une problématique différente, le signal lui-même est intrinsèquement très faible en raison du processus conduisant au photon de diffusion, car l'excitation n'est pas résonante. A titre de comparaison, pour un colorant, la section efficace de diffusion Raman spontanée est typiquement 15 ordres de grandeur plus faible que celle de fluorescence.

Cependant, il existe des voies permettant d'obtenir un signal Raman plus intense. En particulier, il est possible de créer une exaltation dite "de surface" de ce signal, en utilisant des substrats métalliques nanostructurés. On enregistre alors le signal de diffusion Raman exalté de surface, d'acronyme anglais SERS. C'est en utilisant cette technique que les premiers spectres Raman de molécules uniques ont été enregistrés par *K. Kneipp* [7] et *S. Nie* [8]. Intrinsèquement la méthode SERS pose une problématique supplémentaire, car les mécanismes même de l'exaltation de surface ne sont pas totalement clarifiés : il intervient définitivement un fort effet électromagnétique, qui n'est cependant pas suffisant pour expliquer la sensibilité de l'exaltation à la nature chimique de la molécule étudiée.

Comme je l'ai déjà dit, dans ce travail de thèse, l'étude des molécules individuelles à travers leur signal spectroscopique a toujours eu un objectif double : d'une part l'utilisation des molécules comme sondes locales, et d'autre part l'exploration des propriétés de la molé-

cule elle-même, au cours du cycle de fluorescence, pour la première partie de mon travail, et l'exploration du processus d'exaltation SERS pour la seconde partie.

Dans ce but, deux méthodes de microscopies différentes ont été employées. La microscopie grand champ m'a donné accès à l'étude simultanée d'un grand nombre de molécules fluorescentes pour caractériser la matrice (solgel) dans laquelle les molécules sont insérées. Pour pouvoir comprendre l'origine des fluctuations du signal d'objets identiques, il s'agit aussi de chercher le plus d'"indices" possible et donc d'exploiter les différentes propriétés du signal de fluorescence. De manière complémentaire, plusieurs caractéristiques de l'émission des molécules ont donc été enregistrées sur les différents objets, ce qu'on peut considérer comme une analyse multiparamètre.

La microscopie confocale à balayage a été employée pour la spectroscopie SERS de molécules individuelles adsorbées sur des agrégats d'argent. Dans ces expériences, on peut remarquer que l'échantillon se compose en fait de deux nano-objets distincts, de nature mais aussi de taille différentes : les agrégats et les molécules organiques. Le plus petit objet – la molécule individuelle – étant utilisée pour sonder le second.

Ce travail est aussi un peu à l'image de la synergie qui peut caractériser les nanosciences. Peu de choses auraient été possibles sans les collaborations qui ont jalonné mes travaux. Les échantillons de films solgel dopés ont été synthétisés par *F. Chaput* à l'Ecole Polytechnique, et les différents échantillons d'agrégats d'argent employés pour l'exaltation du signal Raman ont été élaborés par *M. Mostafavi* à Orsay.

Plan de thèse

Mon travail de thèse est essentiellement expérimental. Il est constitué de deux études bien distinctes, tant au niveau des techniques optiques et spectroscopiques employées que des systèmes étudiés. Le plan de ce manuscrit reflète donc cette dualité.

Dans le premier chapitre sont exposés les principes des spectroscopies de fluorescence et de diffusion Raman, ainsi que les différentes problématiques liées à leur utilisation dans le cadre de la détection du signal de molécules individuelles. Je dégagerai également les signatures particulières que le mode molécule unique permet d'obtenir.

Le second chapitre est entièrement dévolu aux résultats obtenus au cours de l'étude de films minces solgel par fluorescence de molécules de colorant dopant la matrice.

Après la définition du système étudié et du montage expérimental mis en place, je présenterai l'outil de traitement spécialement mis au point pour cette étude, grâce auquel je m'intéresserai à explorer l'un des écueils typique de la fluorescence : le photoblanchiment des chromophores.

J'exploiterai ensuite les nombreuses informations sur la dynamique de la molécule au sein de la matrice et sur la matrice elle-même, obtenues grâce à l'observation au cours du temps

d'une large zone de l'échantillon et déduites du suivi de nombreuses molécules en parallèle. J'exploiterai également la richesse d'informations complémentaires contenue dans l'analyse spectrale, y compris dynamique, des molécules incluses dans la matrice. Enfin je discuterai d'une donnée supplémentaire très riche qui est une autre sonde très sensible de la molécule et de son site : la dynamique temporelle de l'émission au cours du temps, à une échelle de résolution temporelle de l'ordre de la seconde.

Le troisième et dernier chapitre est consacré à la spectroscopie Raman exaltée de surface de molécules organiques individuelles.

Je présenterai tout d'abord les aspects spécifiques de cette technique, en décrivant les conditions particulières qu'elle requiert. Je ferai également un point sur les connaissances actuelles de l'effet d'exaltation de surface de la diffusion Raman, en mettant en avant les contradictions et zones d'ombres qui empêchent aujourd'hui une utilisation généralisée de cette technique très puissante. En particulier tous les substrats ne présentent pas la même capacité d'exaltation, et toutes les espèces chimiques ne sont pas candidates à une exaltation de leur signal de diffusion Raman. Je présenterai ensuite le dispositif expérimental, ainsi que le système d'étude choisi, et les spectres de molécules individuelles adsorbées sur les agrégats de morphologie particulière, obtenus. Je montrerai ensuite comment l'analyse chimique très fine à laquelle la spectroscopie SERS donne accès, permet de mieux comprendre l'effet d'exaltation en jeu. Outre cette analyse chimique, je présenterai aussi les résultats obtenus dans la détermination du facteur d'exaltation lié aux agrégats employés.

Enfin, je montrerai qu'il est possible d'effectuer de manière corrélée sur le même objet une analyse spectroscopique par microscopie SERS confocale à balayage et son étude en imagerie par microscopie électronique haute résolution (MEB et MET).

Chapitre 1

Principes de la détection de molécules uniques par spectroscopie optique

1.1 Généralités sur les méthodes spectroscopiques

1.1.1 Introduction

La détermination qualitative de la composition de la matière a longtemps été limitée à l'emploi de réactifs permettant de reconnaître spécifiquement des espèces particulières [9]. Pour ce faire, nous avons aujourd'hui à notre disposition un grand nombre de techniques [10][11], mettant en jeu les propriétés physiques et chimiques de la matière, qui nous permettent non seulement d'obtenir une connaissance poussée de la composition mais aussi de l'organisation de la matière et de la dynamique des échantillons. En corollaire, il n'y a pas de méthode qui convienne à toutes les situations ou types d'échantillons, la méthode choisie doit pourvoir à la résolution du problème posé.

Les techniques dites spectroscopiques occupent, de par leur variété, une place importante. Elles consistent d'une manière générale à étudier et déduire des informations de la répartition en énergie – ou en masse, (...)– de la réponse de la matière à un stimulus donné. Ces techniques ont suivi la progression des préoccupations des chercheurs, tant en ce qui concerne les propriétés étudiées que la taille des objets d'intérêt. Ainsi, les progrès effectués dans de nombreux domaines (détecteurs, filtres,...) et l'emploi de configurations adaptées permettent désormais l'étude d'objets individuels de taille nanométrique. A côté des méthodes optiques qui ont atteint un degré certain de maturité, permettant ainsi l'étude de ces objets, citons la spectroscopie I-V par microscopie à effet tunnel (STM) qui est une des dernières spectroscopies en date appliquée à la molécule unique [12]. Un exemple d'application est celui de l'excitation sélective de vibrations moléculaires qui fournit un moyen d'influencer largement la vitesse mais aussi l'orientation d'une réaction chimique et donc de contrôler dans une

certaine mesure la distribution des produits obtenus. C'est ce que montrent *Pascual et. al.* dans une étude sur des molécules d'ammoniac chimisorbées sur une surface de cuivre [13]. Ils ont pu déterminer deux voies différentes de désorption : la première est reliée à l'excitation d'un mode d'élongation de la liaison N–H qui provoque une diffusion de la molécule qui se "réadsorbe" sur un site voisin, la deuxième implique l'activation d'un mode de déformation ou de son overtone, qui "retourne" la molécule, ce qui empêche sa réadsorption.

On se focalisera dans ce manuscrit sur les techniques de spectroscopies optiques moléculaires qui présentent de nombreux avantages.

Tout d'abord leur caractère non destructif, contrairement notamment aux différents modes de spectroscopie de masse, permet d'inclure ces techniques dans un processus d'analyse multi-étapes, consistant par exemple en des analyses croisées d'un même échantillon par différentes techniques, ou dans le suivi de l'évolution de l'échantillon sur de longues périodes. Je me propose d'ailleurs de présenter dans ce manuscrit des exemples de la richesse des informations obtenues par une telle démarche.

Toujours du point de vue de l'échantillon, ces méthodes ont l'intérêt de ne nécessiter qu'une faible quantité de matière qui pourra, de plus, se trouver sous différentes phases, aucun ordre à longue distance n'étant nécessaire. En outre, elles possèdent un large champ d'application puisqu'il n'existe aucune restriction sur la nature des atomes constitutifs contrairement aux exigences des techniques de spectroscopies de résonance nucléaire (RMN) ou électronique (RPE).

Enfin, la détection du signal ne nécessite pas de se trouver dans des conditions expérimentales sévères tel que le vide poussé indispensable aux spectroscopies d'électrons. De ce point de vue, on peut aussi mettre en avant le fait de pouvoir sonder les espèces dans leur environnement naturel, l'illumination optique bien contrôlée n'induisant que de faibles perturbations, ce qui est essentiel dans le cas d'études de structures biologiques fragiles par exemple.

Les méthodes de spectroscopies optiques reposent sur l'existence dans la structure énergétique des molécules de niveaux d'énergie discrets. Dans la plupart des expériences mettant en oeuvre ces techniques, on mesure, non pas directement l'énergie de ces niveaux (contrairement aux spectroscopies d'électrons type XPS), mais des différences d'énergie entre niveaux. La complexité de la détermination de la structure moléculaire par la mécanique quantique [14][15] augmente très rapidement avec le nombre d'atomes et d'électrons du système, mais aussi en fonction de l'environnement ou du milieu dans lequel se trouve la molécule (solide, liquide, gazeux).

Considérons le cas le plus simple, c'est-à-dire celui d'une molécule diatomique isolée. Il s'agit de déterminer les valeurs propres E de l'équation de Schrödinger $H\Psi = E\Psi$ où le Hamiltonien H du système décrit à la fois les électrons et les noyaux :

1.1. Généralités sur les méthodes spectroscopiques

$$H = T^N + T^e + V^{NN} + V^{Ne} + V^{ee} \quad (1.1)$$

T^N et T^e représentent respectivement les énergies cinétiques des noyaux et des électrons, V^{NN} le potentiel d'interaction noyau/noyau (répulsion Coulombienne). V^{Ne} décrit l'attraction qui s'exerce entre les noyaux et les électrons et V^{ee} la répulsion entre électrons.

En raison du rapport de masse qui existe entre les noyaux et les électrons, les électrons se déplacent à une vitesse très largement supérieure à celle des noyaux, avec des temps caractéristiques de l'ordre de $10^{-17}s$ pour les mouvements électroniques contre $10^{-15}s$ pour les mouvements les plus rapides des noyaux (vibrations).

En dissociant le mouvement des noyaux de celui des électrons, c'est-à-dire en se plaçant dans l'approximation de *Born-Oppenheimer*, on peut résoudre le système en deux étapes. Lorsque les noyaux se déplacent, les électrons se réarrangent quasi instantanément, et on peut donc traiter le problème en considérant dans un premier temps le seul mouvement des électrons en présence de noyaux statiques. On en déduit la fonction d'onde électronique ϕ_{el}^n correspondant à un arrangement donné des noyaux dans l'espace.

La fonction d'onde nucléaire χ_N^n est ensuite obtenue en considérant les noyaux qui se déplacent dans le potentiel moyen créé par les électrons en mouvement.

La fonction d'onde totale Ψ décrivant le système correspond au produit des fonctions d'ondes électroniques ϕ_{el}^n et nucléaires χ_N^n .

Pour chaque position R_k des noyaux, on résout donc d'abord l'équation aux valeurs propres électronique :

$$\left[\frac{-\hbar^2}{2m_e} \sum_i \vec{\nabla}_{\vec{r}_i}^2 + V^{Ne}(\vec{R}_k, \vec{r}_i) + \sum_{j>i} V^{ee}(r_i, r_j) \right] \phi_{el}^n(\vec{R}_k, \vec{r}_i) = E_{el}^n(\vec{R}_k) \phi_{el}^n(\vec{R}_k, \vec{r}_i) \quad (1.2)$$

L'ensemble des valeurs $E_{el}^n(\vec{R}_k)$ constitue les surfaces de potentiel des états électroniques considérés. On peut souvent modéliser la section de ces surfaces suivant une des coordonnées nucléaires par une courbe de Morse (en gras sur la figure 1.1), elle présente un minimum à la position d'équilibre X_{eq} .

On résout ensuite l'équation aux valeurs propres nucléaire en considérant le mouvement des noyaux dans un potentiel $E_e^n = E_{el}^n + V_N$. Une première approximation consiste à développer le potentiel électronique en ne conservant que les termes d'ordre inférieur ou égal à 2, c'est l'approximation harmonique. Elle reste valable tant qu'on se place suffisamment près de la position d'équilibre prise comme origine des énergies $E_{el}^n(eq)$ ($E_{el}^0(eq)$ pour le niveau électronique fondamental).

Pour aller plus loin, on peut aussi séparer les mouvements de vibration des noyaux des mouvements en bloc de la molécule, dits externes, tels que les mouvements de rotation et de translation. Dans le cas d'une molécule non linéaire à N atomes, il existe $3N$ degrés de

liberté dont 3 correspondent à des mouvements de rotation et 3 à des translations. Il reste ainsi $3N-6$ vibrations indépendantes appelées modes normaux de vibration que l'on peut traiter comme un ensemble d'oscillateurs harmoniques. Chacun de ces modes normaux met en jeu des modifications géométriques des différentes liaisons présentes dans la molécule, comme l'étirement, la torsion,... L'énergie de vibration s'écrit alors¹

$$E(\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \dots, \mathbf{v}_{3N-6}) = \sum_{i=1}^{3N-6} \left(\mathbf{v}_i + \frac{1}{2} \right) \hbar \omega_i \quad (1.3)$$

\mathbf{v}_i correspond au nombre de quanta de vibration du i ème mode propre et ω_i est la fréquence de cette vibration. Un niveau de vibration est associé à chaque multiplet $(\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \dots, \mathbf{v}_{3N-6})$. Ces niveaux sont représentés sur la figure 1.1 par des traits horizontaux en gras. Pour une molécule diatomique (qui ne possède que 2 degrés de liberté de rotation et donc un seul mode de vibration) on obtient un nombre infini d'états équidistants séparés de $\Delta E = \hbar \omega_1$, avec $E(\mathbf{v}_1 = \mathbf{0}) = \frac{1}{2} \hbar \omega_1$. En réalité, à cause de l'anharmonicité du potentiel, ces niveaux se rapprochent quand \mathbf{v}_1 augmente, jusqu'à former un continuum au niveau de l'asymptote du potentiel électronique, qui correspond à l'énergie de dissociation.

Enfin, l'existence de mouvements de rotation se traduit par l'apparition de sous-niveaux rotationnels d'énergie $E_{rot} = hBJ(J+1)$ dans le cas d'une molécule diatomique.

Une molécule peut donc absorber de l'énergie, fournie par exemple sous forme de rayonnement électromagnétique, pour être portée dans des niveaux d'énergie différents du fondamental.

Les différents types de transitions sont symbolisés par des flèches verticales sur la figure 1.1. Elles se caractérisent par des énergies d'ordres de grandeur différents; les transitions électroniques se font par absorption UV-Vis ($\lambda=200-400-800nm$), tandis que les transitions vibrationnelles nécessitent une absorption dans l'IR ($\lambda=10-100\mu m$) et qu'un rayonnement micro-onde ($\lambda=10^{-1}-1cm$) permet une transition purement rotationnelle.

Dans tous les cas, la taille des molécules est petite comparée aux longueurs d'onde utilisées, l'approximation dipolaire est valable, et on peut considérer les molécules comme des dipôles ponctuels. La section efficace d'absorption pour une transition entre deux niveaux i et f s'écrit alors :

$$\sigma_{if} \propto |\langle \Psi_f | \vec{\mu} \cdot \vec{n} | \Psi_i \rangle|^2 \quad (1.4)$$

¹Pour prendre en considération l'existence éventuelle de vibrations dégénérées on peut faire apparaître le degré de dégénérescence d_i .

$$E(\nu) = \sum_{i=1}^{3N-6} \left(\mathbf{v}_i + \frac{d_i}{2} \right) \hbar \omega_i$$

²où J est le nombre quantique de rotation et B est lié au moment d'inertie I de la molécule : $B = \frac{\hbar^2}{2I}$
[10]

1.1. Généralités sur les méthodes spectroscopiques

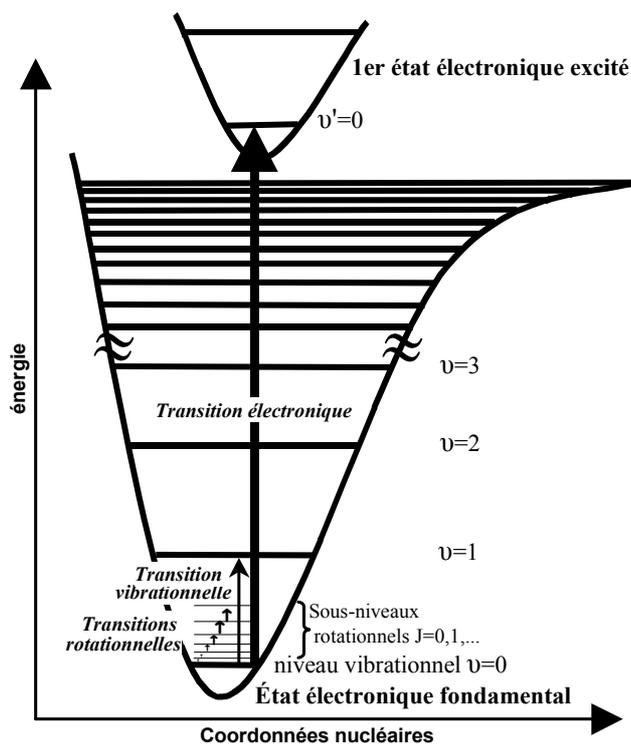


FIG. 1.1 – Diagramme de Morse

où

$$\vec{\mu} = \vec{D}_N + \vec{D}_e = e \sum_N Z_N \vec{R}_N - e \sum_e \vec{r}_e, \quad (1.5)$$

est le moment dipolaire de la molécule et \vec{n} est la direction du champ exciteur.

Ainsi, toutes les transitions n'ont pas la même probabilité d'avoir lieu, mais il existe des conditions sur la symétrie ou le spin des états initial et final, qui permettent de discriminer les transitions "permises" de celles dites "interdites"; l'ensemble de ces conditions constitue les "règles de sélection".

La transition est suivie de différents processus de désexcitation–relaxation, transitions vers des niveaux plus bas en énergie ou retour sur l'état fondamental– qui peuvent se faire avec, ou sans émission de rayonnement électromagnétique. Ces processus, mais aussi la position des niveaux d'énergie, sont très largement dépendants de l'environnement proche, ce qui fait de la molécule une sonde très locale.

1.1.2 Spectroscopie de fluorescence

Certaines molécules organiques, possédant des cycles aromatiques ou plus généralement des systèmes π plus ou moins délocalisés, ont la propriété d'absorber de manière très efficace

une partie du spectre visible puis de retourner à l'état électronique fondamental, par émission d'un rayonnement, appelé rayonnement de fluorescence. Ce phénomène est à la source des premiers lasers [16], dits à colorants en référence à ces molécules particulières.

Les structures du pérylène orange et de la rhodamine 6G, colorants que j'ai utilisés au cours de ma thèse sont présentées en exemple sur la figure 1.2.

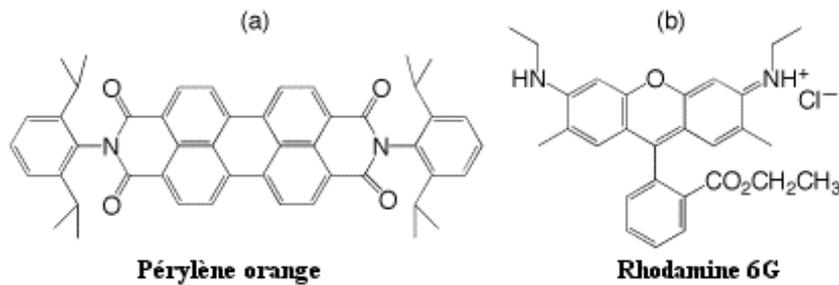


FIG. 1.2 – Structures développées du pérylène orange et de la rhodamine 6G

Sur la figure suivante (Fig. 1.3) sont portés les spectres d'absorption et de fluorescence de la Rhodamine 6G en solution dans l'éthanol³.

La largeur à mi-hauteur est relativement importante, de l'ordre de plusieurs dizaines voire de la centaine de nanomètres. Effectivement, lorsqu'on réalise des mesures macroscopiques, à la largeur homogène des raies (lorentzienne) vient s'ajouter une autre source d'élargissement : l'élargissement inhomogène (gaussienne).

La largeur homogène des bandes de fluorescence vient en partie du fait que, même pour des températures peu élevées, c'est-à-dire même à température ambiante, les états ro-vibrationnels de l'état électronique fondamental sont peuplés thermiquement suivant une statistique de Boltzman, et on mesure donc en même temps toutes les transitions qui se font à partir de ces niveaux. Mais l'élargissement homogène est aussi lié au fait qu'on ne sonde en réalité pas une molécule isolée mais une molécule dans un milieu donné, avec lequel il existe de nombreux couplages. En phase condensée, pendant que la molécule se trouve sur son état excité le milieu peut provoquer une modification des niveaux électroniques. C'est ainsi qu'en milieu solide les vibrations (phonons) de la matrice dans laquelle se trouve la molécule font constamment varier l'énergie du niveau excité à partir duquel se fait l'émission de fluorescence. En phase liquide, la dynamique rapide des couches de solvatation produit aussi un effet similaire.

L'élargissement inhomogène est lié au caractère macroscopique des mesures : si le milieu est hétérogène, les molécules sondées subissent des interactions avec leur environnement local,

³Données obtenues sur le site

<http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/>

1.1. Généralités sur les méthodes spectroscopiques

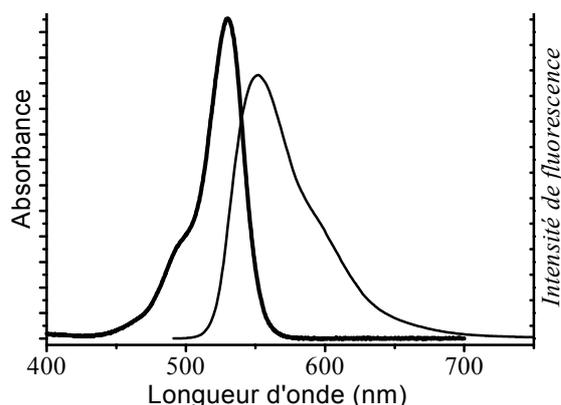


FIG. 1.3 – Spectres d’absorption (en gras) et d’émission de la rhodamine 6G dans l’éthanol.

qui peuvent être différentes. Cela conduit à un déplacement des raies très important dans le cas où le milieu impose un changement de conformation de la molécule (équilibre acido-basique, isomérisation) irréversible ou très lent comparé à la durée de vie de fluorescence. Par simple solvatation, le déplacement peut aussi être de l’ordre de plusieurs térahertz. Dans un milieu très hétérogène, par exemple dans un solide amorphe, qui comporte des sites de solvatation très différents (adsorption, défauts métalliques,...), chaque molécule subit un déplacement différent de sa fréquence d’émission, ce qui conduit à un élargissement global de la bande d’émission macroscopique atteignant quelques dizaines de térahertz. Dans le cas particulier de la phase gazeuse, l’environnement est globalement homogène mais les molécules peuvent se déplacer à des vitesses différentes, ce qui déplace leur fréquence apparente d’émission par effet Doppler.

Il faut noter cependant, que l’emploi courant de lasers comme sources d’excitation a permis de s’affranchir, en partie, du problème de l’élargissement inhomogène : l’excitation ne se faisant plus que sur une gamme spectrale très restreinte on sélectionne naturellement la fraction de molécules dont le spectre d’absorption est centré sur la fréquence du laser. Cette sélection spectrale, très efficace à basse température car dans ce cas la largeur homogène est faible, est d’ailleurs à l’origine des premières expériences de molécules uniques [1].

On remarque sur la figure 1.3 que les spectres d’absorption et d’émission présentent un décalage de leurs maxima.

Effectivement, suite à un processus très rapide (de l’ordre de la picoseconde) de relaxation vibrationnelle de la molécule et de sa couche de solvatation qui se fait avant le retour au niveau initial, les niveaux entre lesquels s’effectue la transition radiative de fluorescence sont plus proches en énergie que ceux intervenant au cours de l’absorption. Cela explique que le spectre d’émission d’un chromophore soit toujours décalé vers les plus grandes longueurs d’onde par rapport au spectre d’absorption. On appelle ce phénomène le déplacement de

Stokes.

Pour le colorant présenté, on remarque aussi que les spectres d'absorption et d'émission sont miroirs l'un de l'autre. Ceci n'est pas une caractéristique générale— quoiqu'assez fréquente— des colorants, mais traduit le fait que les niveaux électroniques fondamental et excité de ces molécules particulières présentent des structures vibrationnelles proches, et qu'en particulier la molécule ne subit pas de reconformation importante après l'excitation.

En ordonnée du spectre d'absorption on trouve l'absorbance, grandeur à partir de laquelle on peut remonter à la concentration en colorant par la relation de Beer-Lambert ou au coefficient d'extinction molaire ε^4 en se plaçant au niveau du maximum d'absorption.

Le processus d'absorption s'effectuant de manière quasi-instantanée (10^{-15} s), on considère que les transitions électroniques se font à position des noyaux constante : c'est l'approximation de Franck-Condon. Dans ce cas, et en considérant toujours l'approximation de Born-Oppenheimer, on peut réécrire l'expression 1.4 de la section efficace d'absorption électronique sous la forme

$$\sigma_{a,el} \approx \left| \left\langle \phi_{el}^f \mid \vec{\mu} \cdot \vec{n} \mid \phi_{el}^{i=0} \right\rangle \right|^2 \left| \langle \chi_N^j \mid \chi_N^i \rangle \right|^2 \quad (1.6)$$

Le premier terme est appelé moment dipolaire de transition. Il impose une condition sur le spin total S des états électroniques initial et final pour que la transition soit efficace : $\Delta S = 0$. Le deuxième terme dit facteur de Franck-Condon ne dépend que du recouvrement entre les fonctions d'ondes vibrationnelles des états initial et final.

La figure 1.4 présente les premiers niveaux électroniques caractéristiques des molécules de colorants ; il s'agit d'un système modèle à 3 niveaux électroniques.

L'état fondamental ainsi qu'un des niveaux excités sont de type singulet ($S = 0, 2S + 1 = 1$). A une énergie un peu plus basse que le premier état singulet excité S_1 , se trouve un niveau triplet T_1 ($S = 1, 2S + 1 = 3$) décomposable en trois états. La dégénérescence de ces états est levée en présence d'un champ magnétique : on obtient trois niveaux correspondant aux arrangements possibles des spins par rapport à la direction du champ magnétique extérieur : parallèle, anti-parallèle et orthogonal. En première approximation on considère que T_1 est triplement dégénéré.

Sur la figure 1.4 sont aussi représentées les transitions à prendre en compte dans la description d'un tel système.

La transition permise par absorption d'un photon $S_0 \rightarrow S_1$ excite la molécule vers des états vibrationnels élevés du niveau électronique S_1 . Après relaxation vibrationnelle, la molécule peut se désexciter de manière radiative, par émission de fluorescence, pour se retrouver dans des états vibrationnels de basse énergie du niveau électronique fondamental S_0 .

⁴expérimentalement, la mesure du coefficient d'extinction molaire ε par absorptiométrie (loi de Beer-Lambert $A = \varepsilon l C$) permet de déterminer la valeur de σ_a telle que $\sigma_a (cm^2) = 0.385 * 10^{-20} \varepsilon [16]$

1.1. Généralités sur les méthodes spectroscopiques

La durée de vie radiative associée à la fluorescence τ_r est de l'ordre de quelques nanosecondes et ne varie que peu pour les colorants, on lui associe un taux (ou probabilité) de transition k_r .

$$k_r = \frac{1}{\tau_r} \quad (1.7)$$

La molécule peut également se désexciter sans émission de photon, par différents processus qui entrent en compétition.

La première voie de désexcitation non-radiative, appelée conversion interne (CI), est directement responsable de la perte d'efficacité de fluorescence des colorants organiques. Il s'agit en fait d'une relaxation $S_0 \leftarrow S_1$. Cette relaxation est favorisée par la présence de groupements mobiles dans la structure moléculaire. Dans ce cas, une élévation de la température ou un solvant de faible viscosité peuvent rendre cette voie de désexcitation prédominante. La conversion interne peut aussi se faire en deux étapes par relaxation vers un état vibrationnel excité de S_0 suivie d'une relaxation vibrationnelle. Ce processus a lieu lorsque la surface de potentiel de l'état excité S_1 est suffisamment proche de l'état fondamental pour permettre le retour vers un état vibrationnel excité de S_0 par effet tunnel. Il a été démontré que la présence d'hydrogène sur les chromophores favorise ce processus [17]. Effectivement, l'hydrogène étant un atome très léger, les vibrations qui le mettent en jeu sont très énergétiques et conduisent à la présence de niveaux de très haute énergie dans la structure vibrationnelle de l'état S_0 .

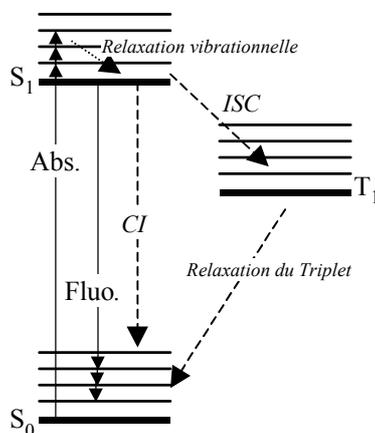


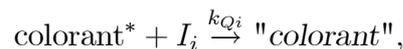
FIG. 1.4 – Schéma à 3 niveaux électroniques caractéristique des colorants avec les différentes transitions radiatives (traits continus) et non radiatives (pointillés) pouvant intervenir au cours d'un cycle absorption-émission

Le passage inter-système noté ISC (de l'anglais inter-system crossing) correspond à la transition $T_1 \leftarrow S_1$. Cette transition *a priori* interdite de spin peut avoir lieu lorsque la molécule possède un moment magnétique orbital important, rendant le couplage spin-orbite $\vec{L} \cdot \vec{S}$

non négligeable. C'est le cas des colorants dont les électrons appartenant à un système π peuvent être délocalisés sur l'ensemble de la structure, jusqu'aux groupements terminaux, mais aussi lorsque ces groupements contiennent des atomes assez lourds. La possibilité de collision avec des espèces paramagnétiques présentes dans le milieu (ex : O_2 , molécules de solvant) a aussi tendance à augmenter le taux de passage inter-système. Après être passée sur l'état T_1 qui a une durée de vie de l'ordre de la centaine de microsecondes à plusieurs dizaines de millisecondes, la molécule se désexcite vers S_0 . Le passage de T_1 à S_0 est associé à la phosphorescence qui correspond à une transition radiative. En réalité, comme c'est le cas pour toutes les transitions interdites de spin, le temps de vie radiatif de phosphorescence est extrêmement long (de quelques millisecondes jusqu'à plusieurs secondes pour les molécules à très faible couplage spin-orbite). Ainsi, même des processus non radiatifs peu efficaces peuvent inhiber l'émission de photons de phosphorescence (quenching). C'est en particulier le cas en solution et à température ambiante ; la phosphorescence commence à ne pas être totalement négligeable seulement en dessous de 77K, en solution solide.

Même si on utilise ici un système fermé à trois niveaux pour décrire la molécule, il faut noter qu'au dessus des premiers états excités S_1 et T_1 se trouvent des états $S_2, T_2, S_3, T_3...$ Par absorption mutiphotonique ou par un processus en deux étapes avec pour état intermédiaire S_1 , la molécule a une probabilité faible d'atteindre ces niveaux électroniques excités supérieurs. Cependant, si le niveau S_2 est atteint, la relaxation vers l'état fondamental mettra en jeu les même processus que ceux décrits précédemment sauf que dans ce cas la première étape de la relaxation sera dominée par le processus de conversion interne $S_1 \leftarrow S_2$. Ce processus est non radiatif et seule la deuxième étape $S_0 \leftarrow S_1$ pourra se faire avec émission de photons. Cela explique que pour la plupart des colorants la position du maximum du spectre de fluorescence est indépendante de la longueur d'onde d'excitation.

La désexcitation non-radiative peut aussi avoir des origines externes à la molécule, et être liée à différents types d'interactions avec des espèces étrangères au chromophore, on parle alors d'inhibition du rayonnement de fluorescence, couramment désignée par son équivalent anglais de "quenching". La nature des espèces dites inhibitrices de fluorescence ainsi que les mécanismes mis en jeu seront discutés dans la deuxième partie de ce chapitre. Si on associe à tous les processus de quenching des "réactions" du type



dans lesquelles $[I_i]$ est la concentration en inhibiteur(s) et k_{Q_i} le taux d'efficacité des processus impliquant l'espèce inhibitrice I_i , on peut définir le rendement de fluorescence comme étant le rapport du taux désexcitation radiative et de l'ensemble des processus de désexcitation. Soit :

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{ci} + k_{isc} + \sum k_{Q_i} \cdot [I_i]} \quad (1.8)$$

1.1. Généralités sur les méthodes spectroscopiques

La durée de vie de fluorescence effectivement obtenue par mesure du déclin de fluorescence est $\tau_f = \phi_f \cdot \tau_r$.

1.1.3 Spectroscopie Raman

Lorsqu'on irradie une molécule, une partie des photons est diffusée. Ce phénomène a lieu même avec un rayonnement exciteur non résonant, c'est-à-dire ne vérifiant pas la condition de Bohr $h\nu = E_1 - E_2$, où ν est la fréquence de l'excitation, et E_1 et E_2 correspondent à des énergies de niveaux réels de la molécule. La diffusion peut se faire de manière élastique, sans perte ou gain d'énergie et on parle de diffusion Rayleigh⁵.

La diffusion inélastique de la lumière, prédite par A. Smekal en 1923, fut observée pour la première fois, dans des liquides, par Sir C.V. Raman [18] et porte depuis son nom. Bien que l'excitation ne soit pas résonnante, la différence d'énergie entre les photons laser et ceux de diffusion Raman correspond quant à elle à l'écart entre deux niveaux vibrationnels réels. Dans le cas de la diffusion Raman spontanée ces niveaux vibrationnels appartiennent à un même état électronique.

On sonde donc ici, comme avec la spectroscopie infrarouge, la structure vibrationnelle de la molécule. Les spectroscopies dites vibrationnelles permettent ainsi d'obtenir une signature chimique très fine puisqu'on a vu au paragraphe 1.1.1 que les niveaux d'énergie vibrationnels dépendaient directement de la structure de la molécule (liaisons et type d'atomes). Du spectre on peut remonter à des informations qualitatives (mise en évidence de la présence d'une espèce chimique) et quantitatives (par comparaison des intensités relatives des raies de différentes espèces) sur l'échantillon.

Lorsqu'une molécule (ou un ion,...) interagit avec un champ électrique ou un faisceau laser, son nuage électronique est déformé et la séparation des charges provoque l'apparition d'un moment dipolaire induit tel que

$$\vec{\mu}_{induit} = \alpha \vec{E} \quad , \quad (1.9)$$

où α est la polarisabilité, et \vec{E} le champ électrique qui dans le cas d'un laser de fréquence ω_L peut se mettre sous la forme $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos \omega_L t$. Les mouvements des N noyaux peuvent être décrits en utilisant 3N coordonnées normales Q_i , décrivant des mouvements d'ensemble des noyaux et choisies de manière à pouvoir écrire les énergies potentielles et cinétiques nucléaires sans produits croisés⁶. Nous avons vu que dans le cas d'une molécule dont la géométrie à

⁵La diffusion élastique de la lumière porte le nom de John Strutt, troisième baron de Rayleigh (UK, 1842-1919) qui proposa une théorie de la diffusion de la lumière pour expliquer la couleur bleue du ciel.

⁶le mouvement des noyaux peut être décrit initialement à l'aide des coordonnées généralisées q_1, q_2, \dots, q_{3n} telles que : $q_1 = \sqrt{m_1} \Delta x_1, q_2 = \sqrt{m_1} \Delta y_1, \dots$

Les coordonnées normales Q_i s'en déduisent par les relations $q_1 = \sum_i B_{1i} Q_i, q_2 = \sum_i B_{2i} Q_i, \dots$

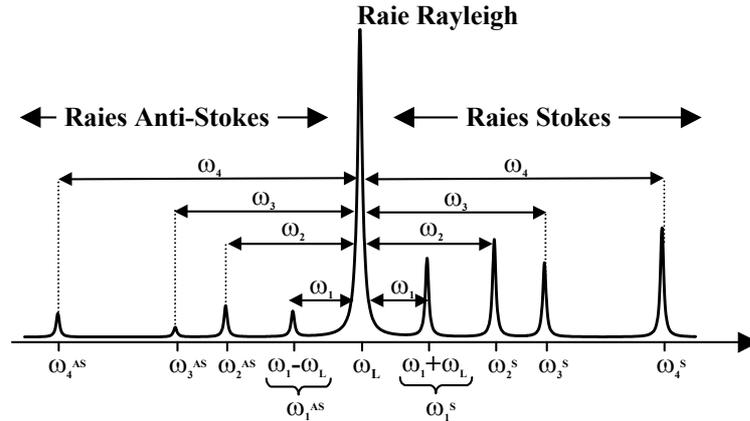


FIG. 1.5 – Spectre Raman schématisé en solution. avec mise en évidence des domaines Stokes et Anti-Stokes. L'espèce en solution présente quatre modes propres de vibration actifs de fréquence ω_1 , ω_2 , ω_3 et ω_4 .

l'équilibre est non linéaire, parmi ces $3N$ coordonnées $3N-6$ décrivent des mouvements de vibrations des noyaux tels que

$$Q_i = Q_{ieq} \cos \omega_i t \quad , \quad (1.10)$$

où ω_i est la fréquence de cette vibration. Les Q_i sont les modes normaux, ou modes propres de vibrations, de la molécule considérée. Pour les vibrations de faibles amplitudes, ce qui est le cas des modes normaux, la polarisabilité est une fonction linéaire du déplacement des atomes. On peut donc effectuer un développement au premier ordre de α en fonction des coordonnées Q_i , autour de la position d'équilibre des noyaux :

$$\alpha = \alpha_{eq} + \sum_i^{3N-6} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_{eq} Q_i \quad , \quad (1.11)$$

où α_{eq} est la valeur de la polarisabilité à la position d'équilibre. En combinant les équations 1.10 et 1.11 dans l'expression du moment dipolaire 1.9, on obtient l'expression suivante du moment dipolaire induit :

$$\vec{\mu}_{induit} = \alpha_{eq} \vec{E}_0 \cos \omega_L t + \sum_i^{3N-6} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_{eq} Q_{ieq} \vec{E}_0 [\cos(\omega_L - \omega_i)t + \cos(\omega_L + \omega_i)t] \quad (1.12)$$

Cette expression montre que le dipôle induit peut être considéré comme équivalent à la somme de trois dipôles qui rayonnent à des fréquences différentes.

Le premier terme correspond à la diffusion Rayleigh à la fréquence du laser.

L'énergie de vibration s'écrit alors $E = T + V = \frac{1}{2} \sum_{3N-6} \dot{Q}_i^2 + \frac{1}{2} \sum_{3N-6} \omega_i^2 Q_i^2$

1.1. Généralités sur les méthodes spectroscopiques

Si on considère un mode de vibration i , le deuxième terme correspond à un rayonnement de fréquence $(\omega_L - \omega_i)$, inférieure à celle du laser et on parle alors de diffusion Raman Stokes car, comme dans le cas de l'émission de fluorescence, la fréquence est décalée vers le rouge. Le troisième terme correspond à la diffusion Raman Anti-Stokes qui se fait à une fréquence $(\omega_L + \omega_i)$. Les décalages de fréquence observés par rapport à la fréquence d'excitation (repérée par le pic de diffusion élastique) sur les spectres Raman tels que celui symbolisé sur la figure 1.5 correspondent donc à des fréquences de vibrations de la molécule.

La figure 1.6 décrit les processus responsables des différentes diffusions observées pour un mode de vibration donné k .

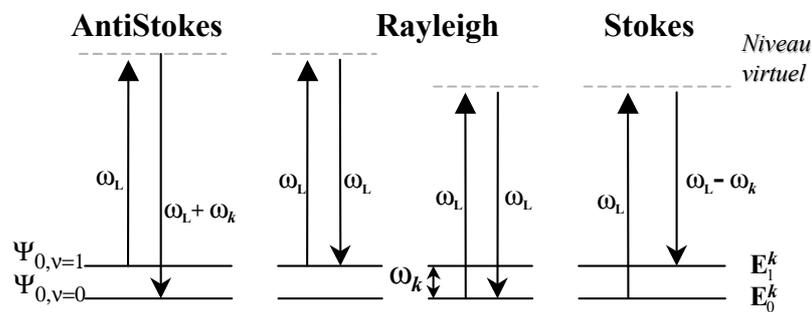


FIG. 1.6 – Niveaux d'énergie et processus responsables des diffusions Rayleigh et Raman pour un mode normal de vibration k .

La diffusion est accompagnée d'une variation Δv du quantum de vibration de la molécule qui est nulle dans le cas de la diffusion Rayleigh : après le processus de diffusion la molécule revient sur le même niveau vibrationnel que celui sur lequel elle se trouvait au départ.

Si on exclut les overtones ainsi que les bandes de combinaison, la diffusion inélastique Raman correspond à un Δv de 1. Dans le cas du processus Stokes, $\Delta v = +1$ et le processus de diffusion conduit la molécule, initialement sur un état vibrationnel v – en général $v = 0$ – sur un état vibrationnel supérieur $v + 1$. On dit qu'il y a création d'un mode de vibration. De manière symétrique, la diffusion Anti-Stokes correspond à l'annihilation d'un mode de vibration. L'interaction de la molécule avec un photon laser conduit donc dans ce cas à une perte d'énergie du système moléculaire.

D'une manière plus générale, on peut donc écrire la relation de conservation de l'énergie au cours des processus de diffusion : $\hbar\omega_L = \hbar\omega_{\text{diffusé}} \pm \hbar\omega_k$. A température ambiante, seuls les premiers niveaux vibrationnels de l'état fondamental sont peuplés, la diffusion élastique ou inélastique résultera donc majoritairement d'interaction avec des molécules qui se trouvent dans leur état $v = 0$ ou $v = 1$. De plus, le remplissage des niveaux vibrationnels suivant une statistique de Boltzmann conduit, contrairement à ce que prévoit la théorie classique, à l'existence de raies Stokes et antiStokes d'intensité différentes. Comme l'illustre la figure 1.5,

pour chaque mode de vibration les bandes antiStokes présentent une intensité plus faible que les bandes Stokes associées selon le rapport d'intensité :

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left(\frac{\omega_L + \omega_i}{\omega_L - \omega_i} \right)^4 \exp\left(-\frac{k_B T}{\hbar \omega_i}\right). \quad (1.13)$$

La figure 1.6 ne comporte pas les sous niveaux rotationnels de la molécule, car d'une manière générale et à température ambiante, on n'observe pas de structures rotationnelles dans les spectres vibrationnels de la plupart des molécules polyatomiques. En effet, leurs niveaux rotationnels sont très proches (moment d'inertie important). Cela reste vrai en solution, où les collisions s'effectuent plus rapidement qu'une rotation, et où les réorganisations sont plutôt liées à des interactions en solution [19].

Parmi les $3N-6$ modes normaux de vibration, tous ne peuvent pas à conduire une diffusion inélastique de photons.

Il existe des règles de sélection qui permettent de discriminer les modes dits actifs en Raman. Ces modes sont ceux qui décrivent des mouvements des noyaux tels que, au cours de ces déplacements, la polarisabilité de la molécule varie. Les molécules présentent une certaine anisotropie, la polarisation induite par le déplacement de charges en présence d'un champ électrique extérieur n'est pas forcément parallèle à celui-ci, mais est fortement liée aux directions des différentes liaisons chimiques. Ainsi, pour prendre en compte cette anisotropie, la polarisabilité s'écrit sous la forme d'un tenseur du troisième ordre et l'équation 1.9 devient :

$$\begin{bmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix}. \quad (1.14)$$

Rappelons ici que les valeurs des α_{ab} sont dépendantes des coordonnées Q_i , comme cela apparaît dans les équations 1.11 et 1.12. Dans le cas de la diffusion Raman spontanée et contrairement à la diffusion Raman résonnante [19], ce tenseur est symétrique : $\alpha_{xy} = \alpha_{yx}, \dots$ Un mode normal est actif en Raman si au moins une des six composantes de la polarisabilité de la molécule change au cours du mouvement des noyaux décrit par cette vibration. Dans ce cas, pour un mode k , au moins l'une des six intégrales du type

$$[\alpha_{ab}]_{\nu\nu'} = \int \chi_{\nu'}^*(Q_k) \alpha_{ab} \chi_{\nu}(Q_k) dQ_k \quad , \quad a, b \equiv x, y, z$$

est non nulle.

La symétrie de la molécule est un paramètre majeur dans l'étude des vibrations moléculaires. Il est donc pratique de se placer dans le cadre de la théorie des groupes pour aller plus loin. Je ne considérerai pas ici le cas des cristaux ou des phases solides dans lequel l'ordre à grande distance impose la prise en compte des translations pour définir le groupe d'espace. Par contre, localement, la symétrie de la molécule est décrite par son groupe ponctuel. De par

1.1. Généralités sur les méthodes spectroscopiques

leur définition, les coordonnées normales se rapportant à chaque fréquence propre donnée des vibrations de la molécule correspondent en fait à des représentations irréductibles du groupe ponctuel. Il est ainsi possible de déterminer le nombre de vibrations "appartenant" à une même représentation irréductible, la multiplicité ainsi que l'activité Infrarouge ou Raman, les modes actifs en Raman étant ceux qui appartiennent aux représentations irréductibles décrivant des combinaisons du second ordre des composantes de la polarisabilité.

A titre d'exemple, les modes normaux de vibration de l'anion carbonate et du dioxyde de carbone, ainsi que la représentation irréductible qu'ils réalisent, sont présentés sur la figure 1.7.

CO₂ est une molécule linéaire qui appartient au groupe ponctuel D_{∞h}. Parmi les 3N-5=4 vibrations normales, deux sont dégénérées et réalisent la représentation Π_u, et seule la vibration ν₁ d'élongation symétrique des liaisons C=O présente une activité Raman. Ceci peut être déterminé en se référant à la table caractère du groupe. Mais d'une manière plus générale, pour les molécules qui ne possèdent qu'un unique centre d'inversion, seules les vibrations de type *g*⁷ présentent une activité Raman. CO₃²⁻, de géométrie plane appartient au groupe ponctuel D_{3h}, les 3N-6=6 modes normaux de vibration consistent en trois vibrations pouvant conduire à des raies Stokes et AntiStokes. Il s'agit respectivement d'une vibration de type A'₁, de deux vibrations doublement dégénérées de type E' et d'une vibration de type A''₂ active uniquement en Infrarouge. La dégénérescence des vibrations ν₃ et ν₄ est liée à la géométrie à l'équilibre de la molécule. En conséquence, une modification de cette géométrie, liée par exemple à une adsorption sur une surface, peut conduire à une levée de dégénérescence de ces vibrations. Sur le spectre seront alors observées deux bandes au lieu d'une. Mais l'influence de l'environnement sur la molécule peut aussi induire des modifications plus subtiles dans le spectre Raman, telles que des variations des intensités relatives des différentes raies, de leur largeur ou de leur position spectrale.

Les vibrations peuvent faire intervenir différents types de mouvements des noyaux. Nommément, on peut distinguer les vibrations d'élongation ν, de déformation dans le plan et hors du plan δ⁸ et π, les vibrations de balancement dans/hors du plan ρ_r/ρ_w et les vibrations de torsion ρ_t. Les vibrations d'élongation comme ν₁ du carbonate présentent un intérêt particulier dans le sens où leur fréquence peut fournir des informations sur la force de la liaison déformée κ⁹ et l'énergie de liaison. Ainsi dans le cas des liaisons carbone-carbone, on trouve une constante de force dans les alcènes qui est le double de celle des alcanes. La constante

⁷ *g* de l'allemand *gerade* pour symétrique, en opposition avec les représentations de type *u* pour *ungerade*.

⁸ δ_s déformation totalement symétrique est aussi appelée cisaillement.

⁹ Loi de Hooke : Par analogie avec un ressort la fréquence de vibration d'une molécule diatomique peut en effet se mettre sous la forme $\omega = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}}$ avec κ la constante de force de la liaison et μ la masse réduite. Dans le cas de molécules plus complexes on distinguera des constantes de force d'élongation mais aussi de déformation suivant un angle.

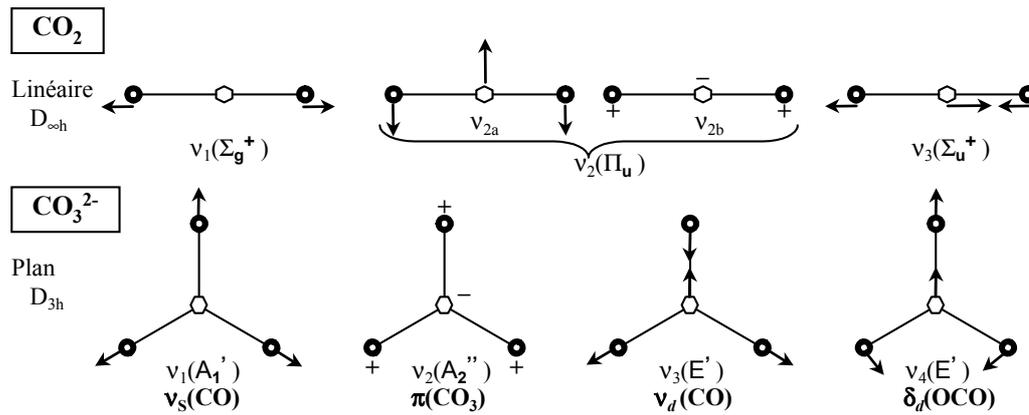


FIG. 1.7 – Modes normaux de vibration dans l'ion plan carbonate CO_3^{2-} et dans le dioxyde de carbone CO_2

de force et la fréquence de la vibration ne sont cependant pas toujours le reflet de la force de la liaison. Une liaison peut en effet être associée à une énergie de dissociation importante tandis que la vibration associée sera de faible fréquence. Cela est lié au fait que la constante de force κ contient une mesure de la courbure du potentiel près de la position d'équilibre tandis que l'énergie de dissociation est donnée par la profondeur du puits de potentiel.

Pour les deux exemples, les constantes de forces des liaisons CO calculées¹⁰ par Herzberg[20] sont relativement différentes, respectivement $\kappa_{\text{CO}} = 10.65 \text{N/cm}$ dans CO_3^{2-} et $\kappa_{\text{CO}} = 15.5 \text{N/cm}$ pour CO_2 . Ce qui peut se comprendre, puisque dans l'ion carbonate, seule une des liaisons est double. Par contre, dans la molécule SCO on trouve une valeur de 14.2N/cm , c'est-à-dire très proche de celle trouvée pour CO_2 . Effectivement, pour des molécules possédant des groupements fonctionnels semblables, les constantes de forces auxquelles on peut remonter sont très proches. Ainsi, il est possible de distinguer des fréquences caractéristiques de groupes, très utiles pour mettre en évidence la présence d'espèces chimiques appartenant à différentes "familles". Citons les vibrations de groupement carbonyle qui donnent lieu à des bandes autour de 1700cm^{-1} , ou encore les vibrations C-H, qui s'étendent de 2900 à 3300cm^{-1} suivant le degré d'insaturation du carbone. Enfin, et comme on peut le remarquer sur la figure 1.5 les raies correspondant aux différents modes de vibration n'ont pas toutes la même intensité. Si l'intensité croît avec $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_{eq}$ la variation de la polarisabilité au cours du déplacement des atomes, son calcul précis est complexe. On peut néanmoins noter quelques tendances générales : les vibrations d'élongations produisent

¹⁰calcul effectué à partir des valeurs des fréquences de vibrations observées expérimentalement : $\nu_{1\text{CO}_2} = 1337 \text{cm}^{-1}$ et pour l'ion carbonate la constante de force donnée est la valeur moyenne obtenue à partir de $\nu_{1\text{CO}_3^{2-}} = 1063 \text{cm}^{-1}$ et $\nu_{3\text{CO}_3^{2-}} = 2349 \text{cm}^{-1}$.

1.2. Problématique de la spectroscopie de molécules individuelles en fluorescence

des raies d'intensités supérieures à celles associées à des mouvements de déformation ; il en est de même pour les modes totalement symétriques comparés aux modes anti-symétriques, les modes de respiration totalement symétriques étant les plus intenses. Enfin, l'élongation d'une liaison ionique conduira à des raies moins fortes que celles d'une liaison covalente et plus les atomes mis en jeu dans ces liaisons sont lourds plus la raie sera intense.

1.2 Problématique de la spectroscopie de molécules individuelles en fluorescence

1.2.1 Intérêt et apport vis-à-vis des techniques macroscopiques

L'intérêt majeur des expériences de molécules uniques, qui est également le plus évident, est que des mesures en mode molécule unique permettent de supprimer totalement les effets de moyenne observés lorsqu'un très grand nombre de molécules sont sondées en même temps. Effectivement, même lorsque l'échantillon étudié n'est dopé qu'avec des individus sélectionnés pour leur activité optique et identiques par synthèse– identité chimique des molécules et identité de caractéristiques telles que le diamètre dans le cas de nano-objets plus complexes comme les nanotubes de carbone– toutes les molécules participant à la moyenne ne sont pas réellement équivalentes : elles sont incluses dans un environnement qui peut se révéler hétérogène et, comme nous l'avons vu plus haut, cet environnement peut largement modifier le comportement de leur émission de fluorescence. En enregistrant le signal des molécules une à une, on a donc accès de manière directe à une quantité beaucoup plus importante d'informations sur la molécule elle-même ainsi que sur ses interactions avec l'environnement.

Par définition, l'élargissement inhomogène des raies est supprimé. Cela nous permet d'étudier les fluctuations du signal d'une seule molécule, ou de distinguer des différences de comportement entre les molécules, liées à leur environnement. On peut ainsi observer différentes formes de spectres, avec des variations dans la position des maxima, la molécule pouvant, réversiblement ou non, présenter un type de spectre ou un autre. Comme nous le verrons plus loin et à cause de la largeur des bandes de fluorescence, l'ordre de grandeur du déplacement des maxima que l'on peut résoudre dépend de la température, et varie de quelques centièmes de nanomètre à basse température, à quelques nanomètres à température ambiante.

Dans les expériences macroscopiques, plus la matrice est hétérogène plus le spectre s'élargit, en conséquence des nombreux sites différents où sont localisées les molécules. A l'opposé, c'est bien dans le cas de l'étude de tels milieux qu'on voit l'avantage des études de molécules uniques. Effectivement, on ne considère plus alors une telle matrice dans son ensemble macroscopique, mais au niveau microscopique et donc comme une juxtaposition de micro-environnements différents au sein desquels se trouvent les molécules. On pourra ainsi étudier

les modifications des propriétés microscopiques de la molécule dans ces différents milieux. S'il est possible de caractériser, de la manière la plus précise possible, les réponses de la molécule à une gamme complète d'environnements –milieu polaire, présence d'ions particuliers...– on peut espérer pouvoir ensuite l'utiliser comme une sonde très locale au cours de l'étude de différents milieux plus ou moins denses ou complexes tels que les milieux biologiques.

On peut aussi espérer mettre en évidence des effets de dynamique moléculaire microscopique, ou même de "nouvelles" propriétés chimiques et physiques (interactions faibles, événement de basse probabilité)[21]. D'un point de vue temporel, le régime molécule unique nous permet d'avoir un accès direct à toutes les fluctuations du système molécule-milieu qu'il était impossible d'observer par des mesures macroscopiques. Non seulement parce que ces variations étaient moyennées mais aussi et surtout parce que leur observation réclame la synchronisation des processus de chaque individu, ce qui est une procédure lourde, si elle est possible, et dans tous les cas efficace uniquement dans le cas de processus sans étape comme par exemple l'enregistrement de la durée de vie de fluorescence. En mode molécule unique, on peut par contre s'intéresser à des processus présentant différentes cinétiques. Des processus comportant une ou plusieurs étapes, tels que des réactions chimiques, peuvent être mis en évidence par le biais de l'observation d'espèces intermédiaires. Les propriétés de la matrice elle-même peuvent fluctuer aléatoirement spatialement et/ou temporellement et de manière réversible, comme dans le cas d'un réarrangement des chaînes dans un polymère, ou non (réticulation de matériaux type sol-gel, transition vitreuse). L'évolution temporelle du signal des molécules subissant les variations locales de leur environnement traduit directement une telle dynamique.

Enfin, la mesure directe effectuée sur chaque molécule peut aussi avoir pour avantage de réduire les perturbations imposées au système. Un exemple est celui de l'étude de la diffusion spatiale de molécules dans un milieu. La technique la plus courante pour étudier une telle diffusion de manière macroscopique par le biais de l'observation du signal de fluorescence, consiste en effet à photoblanchir toute une zone de l'échantillon, c'est-à-dire à irradier cette zone jusqu'à disparition totale de la fluorescence, puis à observer la vitesse à laquelle on retrouve un signal moyen (FRAP pour fluorescence recovering after photobleaching). Outre le caractère destructif d'une telle méthode, la vitesse de diffusion obtenue ne permet pas de discriminer par exemple, les molécules diffusant à grande vitesse de celles qui, bien que plus proches initialement de la zone d'intérêt, se déplacent à une vitesse plus faible ou encore les molécules dont la diffusion nécessiterait le franchissement d'une barrière d'énergie avant d'être amorcée.

Le fait d'étudier un échantillon molécule par molécule conduit aussi à obtenir des distributions statistiques, ce qui permet de mettre en évidence des sous-populations, ou l'existence d'évènements singuliers. Si on exploite de plus les différentes données contenues dans la ré-

1.2. Problématique de la spectroscopie de molécules individuelles en fluorescence

ponse au stimulus, il sera possible d'effectuer des corrélations ce qui terminera de donner aux spectroscopies de molécule unique leur caractère d'outil puissant.

Enfin, si les études en molécules uniques permettent d'approfondir nos connaissances des espèces chimiques, elles permettent aussi l'étude des matériaux ou particules hôtes pour lesquels les molécules se comportent comme des sondes nanométriques.

1.2.2 Signature spectroscopique spécifique de molécule individuelle

Ce paragraphe a pour objet la mise en évidence de la richesse des données incluses dans le signal de fluorescence de molécules uniques et de décrire les différents moyens d'analyse du signal permettant d'obtenir le plus grand nombre d'informations possible sur le système molécule-matrice. Pour chacun des cas, j'ai voulu donner des exemples spécifiques de détermination de paramètres physico-chimiques du système, mais en réalité c'est bien souvent la combinaison de plusieurs— voire l'ensemble— de ces analyses qui permettent d'aboutir à de telles conclusions.

1.2.2.1 Traces temporelles

Les fluctuations de la fluorescence d'un chromophore apparaissent à différentes échelles temporelles. En suivant la dynamique d'émission sur différentes fenêtres d'observation on peut donc tirer des informations sur de nombreux processus dont les temps caractéristiques sont directement reliés à l'environnement de la molécule (ou de l'objet fluorescent).

Ainsi, l'une des données majeures que l'on peut extraire des études de molécules uniques est la trace temporelle de l'émission moléculaire (transient en anglais). Il s'agit d'observer l'évolution au cours du temps de l'intensité de la fluorescence pour chacun des objets, cette observation s'effectuant sur un intervalle de temps choisi et si possible jusqu'au photoblanchiment de la molécule, avec une résolution temporelle donnée, qui sélectionne le type de mécanisme observé. Plus précisément, dans ce contexte, l'intensité de fluorescence correspond à la sommation de tous les photons émis par la molécule pendant un intervalle de temps donné, quelles que soient leur polarisation et leur énergie. En employant une puissance d'excitation adéquate, cette observation peut se faire pendant des durées très importantes allant de quelques secondes à plusieurs heures. Cette trace donne accès à la dynamique temporelle de l'émission, dont les caractéristiques dépendent fortement de l'échelle de temps sur laquelle elle est étudiée. Les figures 1.8 et 1.9 mettent en évidence différentes échelles temporelles pertinentes, des temps courts aux temps longs.

Analysons tout d'abord cette dynamique aux échelles de temps courts.

Une molécule unique excitée à résonance a des propriétés tout à fait particulières. Une des

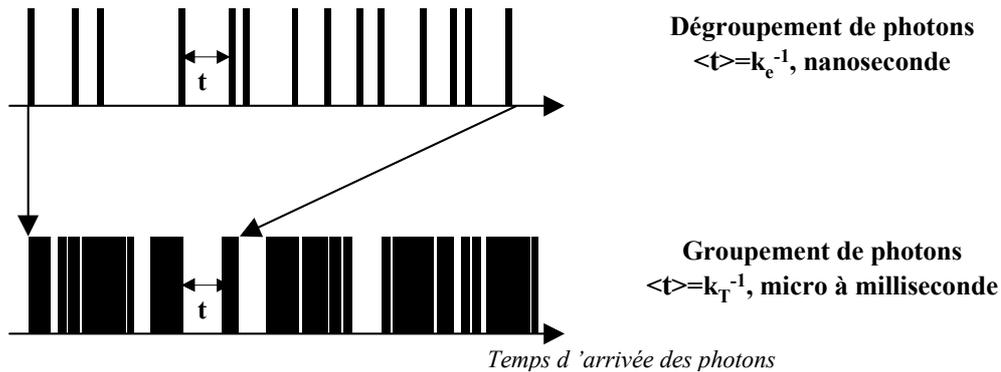


FIG. 1.8 – Les différentes échelles de temps de la dynamique d’émission d’une molécule unique

plus simples mais peut-être également la plus frappante est la suivante : même si la puissance du faisceau excitateur est très importante, la molécule n’émettra qu’un photon à la fois. A l’instant initial, la molécule absorbe un photon. Elle se désexcite alors vers le niveau fondamental S_0 en émettant un photon de fluorescence. Au bout d’une durée qui dépend de sa probabilité d’absorption, elle absorbe un second photon excitateur, puis émet un second photon de fluorescence. Les photons de fluorescence sont donc émis au cours de cycles absorption-émission successifs, et leur répartition temporelle reflète les propriétés d’absorption de la molécule. Ce phénomène de dégroupement des photons, ou *anti-bunching* [22] présenté sur la première ligne de la figure 1.8, qui est lié aux propriétés quantiques de la molécule, est une signature incontestable de l’unicité de l’objet étudié. L’analyse temporelle du rayonnement de fluorescence est de ce point de vue plus puissante que l’imagerie optique du flux total émis. L’échelle de temps pertinente pour l’observer est la nanoseconde.

Si on considère à présent le cas où la molécule se désexcite par passage intersystème, aucun photon ne sera émis pendant l’intervalle de temps de l’ordre de $1/k_{TS}$ ¹¹, typiquement de l’ordre d’une fraction à quelques millisecondes. La molécule a suivi la voie de désexcitation non radiative, et elle est piégée dans l’état triplet. A cette échelle de temps, l’émission est composée de bouffées de photons, interrompues par des intervalles sans émission, ou noirs, de longue durée par rapport à ceux du phénomène de dégroupement de photons¹², et qui surviennent de manière apparemment aléatoire. Les paramètres statistiques caractérisant ces temps morts dépendent cependant des paramètres photochimiques de la molécule étudiée[23]. Les bouffées de photons, qui ont donné son nom au processus dit de «groupement de photons», ou *bunching*, sont constituées par les photons dégroupés à l’échelle de la

¹¹ k_{TS} est le taux de transition associé à la transition non-radiative $S_0 \leftarrow T_1$ définie au paragraphe 1.1.2 .

¹²En fonction de la molécule étudiée ces intervalles noirs peuvent avoir des durées allant de l’ordre de quelques centaines à plusieurs milliers de microsecondes.

1.2. Problématique de la spectroscopie de molécules individuelles en fluorescence

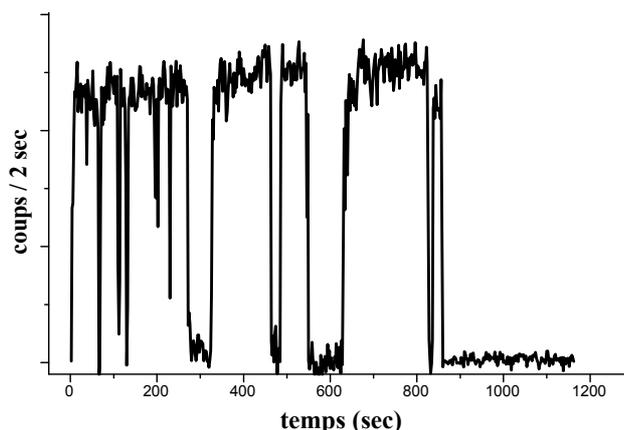


FIG. 1.9 – Trace temporelle de l'émission de fluorescence d'une molécule de perylène orange insérée dans une matrice solgel.

nanoseconde.

Il faut enfin envisager une troisième échelle de temps, grande par rapport à celle qui gouverne le groupement de photons, et qui s'étend de quelques secondes à plusieurs heures. A cette échelle de temps, d'autres processus, complexes et mal identifiés à ce jour, peuvent interrompre le processus d'émission. Une trace temporelle reflétant une forte dynamique à l'échelle de quelques secondes est représentée sur la figure 1.9.

On observe une alternance de périodes d'émission, ou "*on*" avec des périodes durant lesquelles la molécule s'éteint, on nomme ces périodes périodes noires ou "*off*". Une telle dynamique a été observée dès les premiers enregistrements de signaux de molécules uniques ; on parle depuis du clignotement ou "*blinking*" des molécules qui est une caractéristique de telles expériences. Sur cette trace, on observe de plus une autre caractéristique de l'émission de molécule unique : l'intensité bascule entre deux valeurs particulières, sans prendre de valeurs intermédiaires¹³. En effectuant des histogrammes des durées noires, des durées brillantes et de leur fréquences pour un grand nombre de molécules, et dans des conditions expérimentales différentes, on peut obtenir des informations sur les processus responsables des périodes "*off*".

Enfin, au bout d'un temps qui dépend de la molécule et de son environnement, l'émission cesse définitivement, et on dit que la molécule a photoblanchi. Le nombre total de photons émis avant photoblanchiment par chaque objet peut être déduit de telles traces. Il permet d'avoir des informations sur l'environnement des molécules dans la mesure où le photoblanchiment est un processus qui peut faire intervenir des espèces étrangères. Le diagnostic définitif du photoblanchiment n'est pas aisé. Ses causes ne sont pas tout à fait clarifiées et

¹³Les fluctuations lentes autour des deux valeurs ON et OFF seront discutées dans la suite.

restent en grande partie à quantifier. Une partie de mon travail (chap.2) a ainsi été consacrée à une telle étude, ainsi qu'à l'étude des traces temporelles décrites plus haut.

Il existe en revanche des objets qui peuvent potentiellement émettre un nombre infini de photons. Il s'agit par exemple de centres colorés inclus dans des nanocristaux de diamant, ou de nanocristaux semi-conducteurs que l'on nomme quantum-dots [24]. Dans de nombreux cas, comme par exemple pour la mise au point de sources de photons uniques, ils seront donc préférés aux molécules organiques.

1.2.2.2 Enregistrement du déclin de fluorescence et mesure de la durée de vie de fluorescence

Les traces temporelles de molécules uniques telles que celle présentée sur la figure 1.9 sont exploitées pour obtenir des informations sur les dynamiques "lentes" caractérisant la molécule dans son milieu. On peut aussi s'intéresser aux dynamiques moléculaires beaucoup plus rapides. Comme nous l'avons vu, il existe de nombreuses voies par lesquelles la molécule peut se désexciter et qui nous fournissent des informations sur l'environnement dans lequel la molécule se trouve. Tous ces chemins entrent en compétition les uns avec les autres, l'émission de fluorescence n'étant qu'une seule des voies de désexcitation possibles.

L'enregistrement du déclin de fluorescence est une autre voie d'analyse de la dynamique moléculaire aux échelles de temps courts. La réponse dépend alors des différentes voies possibles et concurrentes de désexcitation de la molécule (cf paragraphe 1.1.2). Ainsi si l'on effectue des mesures résolues en temps de la fluorescence, c'est-à-dire si on enregistre le déclin de fluorescence, on obtient une mesure de la durée de vie de fluorescence qui est un reflet direct du rendement quantique, préalablement défini dans l'équation 1.8, et porte des informations sur toutes les voies possibles de désexcitation. Aussi, en effectuant des mesures dans différentes conditions expérimentales appropriées, on pourra obtenir des informations supplémentaires sur chacun des différents mécanismes. Si l'analyse de telles mesures effectuées de manière macroscopique a déjà permis de remonter à des paramètres physico-chimiques du milieu tel que le pH [25], la première mesure de durée de vie de fluorescence de molécule unique date de 1994 [26]. A l'époque, une telle expérience n'avait pu être réalisée qu'à des températures cryogéniques (1.8K) et le temps d'accumulation nécessaire pour obtenir une statistique suffisante était de 20 min. De nombreuses expériences ont suivi, et les progrès réalisés sur les dispositifs expérimentaux permettent aujourd'hui d'effectuer les mesures à température ambiante voire au delà, avec des durées d'acquisition largement réduites. Ainsi par exemple l'équipe de van Hulst, a récemment pu remonter à des paramètres physiques du polymère dans lequel se trouvait le dopant [27] : les molécules dans un environnement hétérogène présentent des durées de vie de fluorescence qui, bien que différentes, restent constantes si l'environnement est stable, les mouvements de la molécule liés à l'agitation

1.2. Problématique de la spectroscopie de molécules individuelles en fluorescence

thermique n'entraînant qu'une variation au plus de 10%. Dans cette expérience, les molécules de DiD dopant des matrices de polymère organique sont soumises au réarrangement au cours du temps de ce milieu mou. Et pour ces polymères, les fluctuations thermiques de l'environnement sont la principale cause de cette réorganisation. Le suivi des fluctuations des durées de vie de fluorescence de certaines molécules a ainsi permis de mettre en évidence le nombre de motifs de répétition du polymère qui étaient impliqués dans ce réarrangement par comparaison avec la variation de densité du milieu hôte nécessaire pour obtenir une variation équivalente de la durée de vie des molécules dopantes. Depuis quelques années, ces mesures sont effectuées de manière systématique par plusieurs groupes qui ont mis en place un système d'imagerie de durée de vie de fluorescence (FLI pour fluorescence lifetime imaging [28]) largement appliquée à des problématiques biologiques. Enfin, outre la durée de vie de fluorescence, les données recueillies peuvent être traitées de manière à obtenir la durée de vie de l'état triplet dont les fluctuations apportent elles aussi des informations sur les interactions de la molécule avec son milieu [29].

1.2.2.3 Spectres de molécules uniques

Nous avons vu que la suppression de l'effet de moyenne permettait de s'affranchir par définition, de l'élargissement inhomogène des raies. Cependant et sauf aux très basses températures, inférieures ou égales à celle de l'hélium liquide [6], les raies restent larges, on obtient en conséquence des spectres larges qui ne permettent pas une étude détaillée de la structure vibrationnelle des molécules et des bandes vibroniques associées. En effet, en milieu désordonné et au-dessus de quelques Kelvin, la largeur homogène croît très rapidement avec la température. Cet élargissement augmente selon une loi en T^α où $\alpha \sim 1.3$ jusqu'à une vingtaine de Kelvin, et de manière exponentielle au-delà. Avec l'augmentation de la température la raie très fine, dite à zéro phonon, perd en intensité, puisqu'un nombre de plus en plus important de photons sont émis avec assistance de modes de phonons (bandes vibroniques). A température ambiante, l'élargissement est donc majoritairement lié aux couplages avec les vibrations de la matrice et les modes plus locaux. On peut par contre s'intéresser au déplacement induit par l'environnement sur les spectres d'émission. La diffusion spectrale des chromophores dopant une matrice a été étudiée initialement à basse température, dans le système modèle p-Terphenyl [30], puis à température ambiante [31][32]. Cette diffusion est directement liée à des processus de réarrangement des groupements constitutifs de la matrice, réarrangements qui peuvent être soit spontanés soit photoinduits. On comprend donc pourquoi les déplacements de fréquence observés à froid sont moins étendus : à basse température les mouvements se trouvent être largement réduits, et l'organisation de la matrice n'est modifiée que par des reconfigurations locales réversibles (rotation d'un ou deux groupements). Par contre, dans un environnement plus chaud cette reconfiguration peut s'étendre

sur des distances plus longues, ce qui induit localement une modification irréversible. Certaines molécules ont aussi été optimisées par voie de synthèse pour voir un déplacement important en présence d'espèces particulières. Ainsi l'utilisation d'un fluorophore sensible à l'hydrogène, c'est-à-dire présentant des propriétés acido-basiques, a permis d'effectuer des mesures de pH de manière très locale puisqu'à l'échelle de la molécule unique[33]. D'une manière plus générale le fluorophore choisi pourra être sensible à une molécule ou à un ion d'intérêt, comme c'est le cas pour l'ion Calcium Ca^{2+} , qui intervient au cours de nombreux processus biologiques ou physiologiques [34]. On utilise alors la molécule unique comme un capteur chimique local. On pourrait imaginer à terme quantifier et "voir" les dynamiques existantes à l'échelle nanométrique, et par exemple tester le modèle de la double couche en électrochimie par l'emploi de molécules fluorescentes pouvant participer à des équilibres redox et donc sensibles au potentiel du milieu. Si les conditions nécessaires pour obtenir une résolution vibrationnelle complète sont particulièrement extrêmes, il faut noter qu'en refroidissant l'échantillon par de l'azote liquide ($\sim 70\text{K}$) il sera tout de même possible de réduire la largeur des bandes et de distinguer différentes bandes (2 ou 3 pour la plupart des colorants) qui correspondent à l'enveloppe d'un ensemble de bandes vibrationnelles de la molécule. Cela nous permet d'extraire de nouvelles informations sur la molécule et son environnement car ces bandes sont suffisamment résolues pour pouvoir observer aussi leurs fluctuations, et ainsi les corrélérer aux autres observables.

L'enregistrement des spectres des objets brillants permet aussi de s'affranchir des limitations imposées par la résolution optique du système. Effectivement à travers leurs spectres il est possible de discriminer de manière très nette une molécule unique d'un ensemble de deux molécules (dimère) ou d'un agrégat moléculaire alors même que leur dimensions physiques réelles (de l'ordre de l'angström jusqu'à la dizaine de nanomètres) ne permettent pas de les distinguer en imagerie.

1.2.2.4 Polarisation

Lorsqu'on dope un milieu, en absence de mise en forme spécifique de l'échantillon, l'orientation des molécules n'est pas contrôlée. Statistiquement, les molécules se placent de manière désordonnée, ce qui conduit globalement à une isotropie d'ensemble. L'orientation du dipôle de la molécule est un exemple de paramètre auquel les expériences de molécules uniques donnent accès, alors que cette information est perdue dans les expériences multimolécules ; le signal de fluorescence d'une molécule unique est anisotrope et la polarisation est ainsi une signature de l'unicité de l'objet. De la même manière que l'étude des spectres, l'analyse de la polarisation d'un émetteur permet aussi de s'affranchir des limites de résolution optique, en distinguant une molécule unique d'un amas de molécules orientées aléatoirement et dont l'émission sera donc dépolarisée.

1.2. Problématique de la spectroscopie de molécules individuelles en fluorescence

En faisant varier la polarisation du faisceau exciteur dans le plan de l'échantillon, l'intensité du signal varie. L'intensité maximum étant obtenue pour une polarisation parallèle au dipôle de la molécule (cf eq.1.6). En supplément de la détermination des composantes du dipôle moléculaire dans les deux dimensions du plan de l'échantillon, il est possible, en travaillant la mise en forme du faisceau laser d'excitation, de caractériser l'orientation tri-dimensionnelle du dipôle de la molécule[35][36].

Il existe aussi de grandes potentialités dans le suivi de la polarisation de manière dynamique, l'observation de l'évolution du dipôle d'une molécule unique permettant en effet d'appréhender les dynamiques à l'échelle nanométrique. A titre d'exemple, les moteurs moléculaires, qui sont des protéines présentant la propriété particulière de pouvoir se déplacer "seules", et dont les mécanismes de mouvement sont à l'heure actuelle mal compris, sont typiquement des objets que de telles études permettent de mieux connaître [37][38]. D'autre part, en effectuant ces mesures sur un nombre important de molécules individuelles on pourra distinguer d'éventuels sous-groupes de population présentant des caractéristiques de réorientation différentes. Par exemple, l'évolution au cours du temps de l'orientation du dipôle d'une molécule sonde, attachée de manière rigide à une protéine d'ADN a permis de mettre en évidence des processus d'adsorption/désorption suivi de rotation des fluorophores, ce qui apporte des informations sur les degrés de liberté angulaire de la macromolécule elle-même [39], le couplage d'une modulation rapide ($90^\circ/10ms$) de la polarisation d'excitation avec le suivi temporel de l'émission permettant d'obtenir aussi des informations sur les causes des périodes *off* observées sur les traces temporelles (décrites au début de cette section). De la même manière on peut déterminer des transitions de type ordre/désordre dans l'organisation de molécule au cours de leur adsorption sur du verre, ou bien à des interfaces solide/liquide [40]. Il n'est cependant pas obligatoire de faire varier la polarisation du faisceau exciteur pour suivre l'évolution de l'orientation du dipôle moléculaire. On peut aussi suivre la direction du dipôle d'émission, ainsi, l'équipe de Schmidt a mis au point ce qu'ils nomment l'imagerie par anisotropie [41]. Les composantes du signal de fluorescence sont ainsi séparées dans la voie de détection par des composants optique adaptés, et imagées simultanément. L'évolution dans le temps du poids relatif de ces deux composantes a ainsi permis de déterminer les constantes de diffusion rotationnelle de lipides dans des membranes biologiques. De tels paramètres permettent de mieux connaître les caractéristiques du milieu lui-même, et la structure des membranes.

1.2.3 Signal et bruit de fond

La solution la plus simple pour n'étudier qu'une seule molécule est d'augmenter la dilution. Cela n'est cependant pas suffisant pour pouvoir détecter son signal, il faut pour cela obtenir un rapport signal sur bruit suffisant et rechercher les moyens de son optimisation.

On considèrera dans la suite que la molécule a été préalablement sélectionnée pour ses qualités d'émission et possède donc un bon rendement quantique de fluorescence, une section efficace importante ainsi qu'une bonne photostabilité.

Soit un système expérimental d'efficacité globale de détection η_D , dont l'ordre de grandeur varie entre 1 et 15% suivant le type de montage, son optimisation et le détecteur utilisé. Le signal de fluorescence accumulé pendant un temps T_{acq} au cours duquel la molécule est excitée avec un taux k_{ex} s'écrit :

$$S_f = \eta_D \phi_f k_{ex} T_{acq} \quad (1.15)$$

Le signal de fluorescence détecté dépend largement de paramètres intrinsèques au système molécule-milieu à travers le rendement quantique de fluorescence (cf eq.1.8), mais aussi à travers le taux d'excitation qui est lié à la section efficace du processus d'absorption $\sigma_{a.el}$:

$$k_{ex} = \sigma_{a.el} \frac{I_{ex}}{h\nu} \quad (1.16)$$

avec I_{ex} l'intensité d'excitation en W/cm². Afin d'obtenir un signal maximum sans toutefois dégrader la molécule, on aura intérêt à travailler avec une excitation proche de l'intensité de saturation¹⁴. On peut aussi optimiser la polarisation d'excitation pour augmenter la section efficace (voir eq.1.6). On obtient alors un signal variant typiquement de 10³ à 10⁶ photons par seconde suivant la molécule d'intérêt, ce qui correspond à un signal tout à fait détectable par les détecteurs actuels. Le problème ne provient donc pas de la faiblesse du signal émis mais réside bien plutôt dans l'existence de signaux parasites qui masquent le signal d'intérêt et dont je vais exposer les sources.

Tout d'abord, pour toutes les expériences de molécules uniques la "pureté" des échantillons est un facteur déterminant qui peut cependant être relativement bien contrôlé, tant au cours de la préparation, que durant l'enregistrement (atmosphère contrôlée, travail en circuit fermé dans le cas des solutions). Il faut effectivement minimiser le nombre d'impuretés, molécules ou particules, susceptibles elles aussi d'émettre un signal parasite de fluorescence ou de diffusion, et qui pourrait donc masquer le signal d'intérêt en augmentant le bruit de fond. Néanmoins, même lorsque cette condition est remplie, il n'est pas toujours possible d'éliminer une fluorescence résiduelle provenant de la matrice ou des optiques utilisées. Cette fluorescence est une des causes du bruit de fond, mais celui-ci provient essentiellement des diffusions Rayleigh et Raman provenant du volume V de la matrice de l'échantillon, volume qui est éclairé en même temps que la molécule. Le bruit de diffusion induit par un milieu de

¹⁴ Lorsque l'on augmente l'intensité d'excitation, le taux d'excitation n'augmente pas à l'infini mais atteint une valeur limite à l'intensité dite de saturation I_S qui correspond à l'intensité d'excitation à laquelle la section efficace d'absorption $\sigma_{a.el0}$ est divisée par 2. On peut donc écrire la section efficace pour une intensité I inférieure à I_S : $\sigma_{a.elI} = \sigma_{a.el0} \frac{1}{1 + I/I_S}$.

1.2. Problématique de la spectroscopie de molécules individuelles en fluorescence

densité moléculaire n s'écrit :

$$B_{dif} = \eta_D n V (\sigma_{Raman} + \mathbf{f} \sigma_{Rayleigh}) \frac{I_{ex}}{h\nu} T_{acq} \quad (1.17)$$

où σ_{Raman} est la section efficace de diffusion Raman du milieu ($\approx 10^{-30} \text{cm}^2/\text{molécule}$ pour une matrice peu diffusante à $10^{-28} \text{cm}^2/\text{molécule}$ pour un milieu qui diffuse de manière efficace) et $\sigma_{Rayleigh}$ la section de diffusion Rayleigh ($\approx 10^{-20} \text{cm}^2/\text{molécule}$). Comme dans toutes les expériences de spectroscopie optique, le bruit de diffusion Rayleigh, quoique le plus important, est largement réduit par l'utilisation d'un système de filtres efficaces qui éliminent la longueur d'onde d'excitation ; ce facteur d'atténuation est traduit dans l'équation 1.17 par le facteur \mathbf{f} . Les filtres *notch* par exemple, conduisent à une atténuation de l'ordre de 10^6 à 10^8 . La diffusion Raman est plus difficile à éliminer mais reste en général faible devant la diffusion Rayleigh du fait de la faible efficacité du processus.

Les détecteurs actuels ont été largement optimisés de manière à réduire le bruit de détection (de l'ordre de la dizaine de coups par seconde pour les photodiodes à avalanche ainsi que pour les caméras CCD refroidies à l'azote). Si on néglige le bruit de fond lié au détecteur N_D , on obtient l'expression du rapport signal sur bruit suivante[42]

$$\frac{S_f}{B} = \frac{S_f}{\sqrt{S_f + N_D + B_{dif}}} \approx \frac{\sqrt{\eta_D \sigma_{fluo} \frac{I_{ex}}{h\nu} T_{acq}}}{\sqrt{1 + nV \frac{(\sigma_{Raman} + \mathbf{f} \sigma_{Rayleigh})}{\sigma_{fluo}}}} \quad \text{avec } \sigma_{fluo} = \phi_f \sigma_{a.el} \quad (1.18)$$

Une fois que l'intensité d'excitation a été optimisée et que la matrice a été choisie de manière à être la moins diffusante possible, le seul facteur qui reste à optimiser est le volume d'excitation V . Plus ce volume est faible, meilleur sera le rapport signal sur bruit. Plusieurs solutions expérimentales sont envisageables selon la configuration de microscopie retenue. Dans le cas de la microscopie "grand champ", c'est-à-dire lorsqu'une large zone de l'échantillon est éclairée, et où le signal provenant d'une zone de plusieurs microns carrés est détecté dans son ensemble, la seule solution consiste à limiter la profondeur de l'échantillon, en travaillant sur des films minces dont l'épaisseur est de l'ordre de la centaine de nanomètres. Dans le cas des microscopies à balayage on utilise une excitation laser fortement focalisée pour limiter le volume latéralement. On pourra aussi restreindre le volume en profondeur en travaillant en microscopies multiphotoniques, avec des molécules appropriées, ou de champ proche (SNOM). Cette dernière solution est très puissante mais elle est, dans les faits, lourde à mettre en oeuvre, et peut parfois avoir l'inconvénient que l'approche de la sonde optique (pointe AFM, fibre optique métallisée ou non) induise des perturbations non négligeables sur le système que l'on veut étudier (phénomène de quenching vu au paragraphe 1.2.2.1,...). Elle est aussi limitée à des études de surface. C'est la raison pour laquelle, la solution choisie dans un grand nombre d'expériences de molécules uniques utilisant une excitation à un photon, est d'effectuer la sélection du volume au niveau de la détection. On utilisera pour

ce faire une configuration confocale, en utilisant par exemple le coeur d'une fibre optique comme filtre spatial. Le choix d'un montage par rapport à un autre dépend largement de l'application choisie et du type d'information recherché. Nous verrons dans ce manuscrit que la combinaison de différentes solutions peut s'avérer très avantageuse pour étudier un échantillon hétérogène.

1.3 Problématique de la spectroscopie Raman de molécules individuelles

1.3.1 Intérêt et apport vis-à-vis des techniques macroscopiques

Détecter des molécules uniques tout en identifiant simultanément leur structure chimique représente un aboutissement dans l'analyse chimique et présente un intérêt tant d'un point de vue tant pratique que fondamental. Il existe de plus un grand intérêt pour les méthodes de détection et de caractérisation de molécules uniques qui pourraient s'effectuer dans des conditions ambiantes.

Comme nous l'avons vu, la technique de fluorescence est d'une très grande sensibilité mais, en particulier à température ambiante, le nombre d'informations que l'on peut extraire des spectres est limité en raison de la largeur des bandes de fluorescence. L'avantage principal de la spectroscopie Raman est sa capacité à fournir des informations très riches sur la structure moléculaire, et ce même à température ambiante. Les domaines de la biophysique ou de la médecine sont les premiers intéressés dans la possibilité de suivre les molécules et les interactions moléculaires à l'échelle de la molécule unique dans des conditions assimilables aux conditions physiologiques, ouvrant la voie à des caractérisations *in vivo* dans des cellules ou des membranes biologiques.

De plus, si les colorants présentent un signal de fluorescence important, toutes les molécules, et en particulier certaines de grand intérêt biologique, ne sont pas fluorescentes. En utilisant le signal de diffusion Raman, pour lequel il n'existe aucune restriction sur la nature de l'espèce étudiée, des molécules non fluorescentes telles que les acides aminés pourront être détectées et identifiées individuellement, sans la nécessité de greffage par un marqueur fluorescent, étape préalable qui peut s'avérer être une manipulation sinon limitante, toujours délicate.

Donc, de même que pour la spectroscopie de fluorescence, l'observation de la diffusion Raman de molécules individuelles offre un aperçu des propriétés intrinsèques de la molécule et permet d'effectuer des observations affranchies des effets de moyenne macroscopique. Mais dans le cas de la spectroscopie Raman tous les diagnostics pourront être effectués avec une réelle précision sur la nature exacte des espèces chimiques, puisque le spectre Raman d'une espèce constitue une véritable empreinte. Il sera aussi possible de connaître plus précisé-

1.3. Problématique de la spectroscopie Raman de molécules individuelles

ment la partie de la molécule qui participe à (aux) interactions(s) avec l'environnement. Les différentes bandes du spectre Raman peuvent être considérées comme autant de signatures puisque, comme je l'ai évoqué, les vibrations ne mettent pas toutes en jeu les mêmes atomes ou liaisons, ni avec les mêmes poids. Cela permet aussi de mettre en évidence des espèces chimiques présentes par exemple sous forme de trace.

Aussi, s'il paraît évident que de telles techniques spectroscopiques sont bien souvent employées pour la détection d'espèces de spectre connu, un réel effort est porté sur la caractérisation d'espèces "nouvelles", en raison notamment de l'évolution technique qui conduit au contrôle d'objets de plus en plus petits. Ainsi par exemple les nanotubes de carbone, qui sont constitués de feuilles de graphite repliées sur elles-même, sont des objets de taille nanométrique dans une dimension. Depuis leur observation par microscopie électronique par le groupe d'*Iijima*[43] en 1991 ils ont fait l'objet de nombreuses études, en particulier en raison de leur fort potentiel à être utilisés pour leur propriétés électriques. Des études par spectroscopies vibrationnelles permettent de mettre en évidence des hétérogénéités subtiles (variations inférieures au nanomètre du rayon des tubes, chiralité), mais critiques dans le cadre d'une utilisation postérieure de ces objets, dans les échantillons. Plus précisément, le mode RBM, caractéristique des nanotubes, permet de remonter de manière très précise à leur diamètre. Une synergie intéressante a ainsi permis d'affiner les méthodes de synthèse, par validation de l'homogénéité en taille des nanotubes.

1.3.2 Signal et bruit de fond

La différence la plus importante concernant la problématique de la détection du signal Raman de molécules uniques par rapport à celle du signal de fluorescence repose sur l'énorme écart d'efficacité des deux processus.

Comme l'excitation ne correspond pas à la transition entre deux niveaux réels de la molécule, la section efficace du processus Raman est beaucoup plus faible que celle de fluorescence. Typiquement pour les colorants, cette différence peut aller jusqu'à 14 ordres de grandeurs, avec pour la rhodamine par exemple un rapport $\frac{\sigma_{Raman}}{\sigma_{Fluo}} = 10^{-12}$. Ainsi, l'acquisition de spectres macroscopiques avec une bonne résolution demande-elle déjà des durées très importantes (de plusieurs dizaines de minutes jusqu'à plusieurs heures). Si l'on tient compte du nombre de molécules participant au signal macroscopique, on peut très rapidement réaliser qu'obtenir un tel signal à l'échelle de la molécule unique conduirait à des durées d'acquisition tout à fait déraisonnables.

Une première étape a cependant été franchie avec les instruments dits "micro-raman", qui utilisent une détection confocale permettant d'obtenir des spectres de qualité en quelques minutes. Une augmentation drastique de la puissance d'excitation ne constitue pas non plus une solution puisque même si, contrairement à la fluorescence, la diffusion Raman ne conduit

pas à un phénomène rapide de photoblanchiment, l'emploi d'une puissance élevée peut tout de même activer des processus de photodégradation, voire même à très haute puissance et par échauffement local une dégradation thermique. Ainsi dans le cas de la diffusion Raman la faiblesse du signal rend la diminution du bruit nécessaire mais insuffisante pour parvenir à un rapport signal sur bruit satisfaisant. En supplément des voies d'optimisation décrites dans le cas de la spectroscopie de fluorescence parmi lesquelles on choisira dans la plupart des cas d'utiliser en excitation un laser focalisé couplé à une configuration confocale de la détection, il est ici nécessaire de trouver des moyens d'exaltation du signal lui-même.

Deux techniques mettant en oeuvre des processus d'exaltation différents ont été développées dans ce but.

Une voie possible consiste à se placer dans une configuration de spectroscopie Raman résonante, déjà utilisée dans le cadre d'études macroscopiques pour diminuer les durées d'acquisition, qui peuvent aller jusqu'à plusieurs heures suivant l'échantillon, ou le type d'information recherchée (cristallinité de l'échantillon, étude en polarisation, détermination de concentrations relatives,...). Le terme résonnant traduit le fait que l'exaltation est obtenue par l'utilisation d'une excitation dont la longueur d'onde se trouve dans la bande d'absorption électronique de l'espèce que l'on veut étudier. Si deux espèces présentes possèdent des bandes d'absorption éloignées il ne sera cependant pas possible de les détecter simultanément. Cette sélectivité peut néanmoins s'avérer très utile pour contourner les problèmes éventuels de "pollution" qui peuvent conduire à la présence de signaux parasites (spectres Raman des "polluants").

Une autre solution pour augmenter le signal Raman met en oeuvre une exaltation dite "de surface" qui tire son nom du fait que l'observation d'une telle exaltation du signal a été effectuée pour la première fois au milieu des années 70 par *M. Fleischmann* au cours d'une expérience portant sur des molécules de pyridine adsorbées sur une électrode d'argent[44]. Si l'exaltation fut au début attribuée à une augmentation du nombre de molécules participant au signal, les nombreuses expériences postérieures validèrent la thèse de processus plutôt physiques ou physico-chimiques de surface. Cette technique porte depuis le nom de SERS, acronyme anglais de Surface Enhanced Raman Scattering et met en jeu l'emploi de substrats de métaux nobles (Au ou Ag). L'exaltation conduit à une section efficace SERS du même ordre de grandeur que la section de fluorescence. Comme les temps de relaxation vibrationnels sont plus courts que ceux liés aux relaxations électroniques, comparativement, pendant la même durée, le nombre de cycles Raman que peut effectuer une molécule est plus grand que le nombre de cycles de fluorescence. En principe, plus de photons pourraient donc être détectés, pour conduire à des durées d'acquisition de l'ordre de la seconde (voire du dixième de seconde) en SERS, soit pour une même qualité de spectre, une réduction voisine d'un ordre de grandeur des temps d'acquisition nécessaires en spectroscopie de fluorescence. C'est

1.3. Problématique de la spectroscopie Raman de molécules individuelles

cette voie d'exaltation qui a été privilégiée au sein de notre groupe. Son caractère *a priori* non sélectif est en effet très séduisant, mais en réalité, et en raison des processus complexes mis en jeu dans l'exaltation de surface, le signal de toutes les espèces ne peut être augmenté par cet effet. Les phénomènes à l'origine de l'effet SERS et donc aussi la nature des substrats employés seront décrits plus en détail dans le troisième chapitre, au cours duquel je m'efforcerais aussi de présenter des résultats originaux contribuant à la compréhension de ce processus.

1.3.3 Caractéristiques du signal Raman de molécules uniques

Dans le cas de la spectroscopie Raman, les informations apportées par les photons diffusés sont analysées sous forme de spectres. On s'intéressera donc aux caractéristiques de chacune des raies Raman, c'est-à-dire non seulement à leur position en énergie mais aussi à leur amplitude et leur forme.

Tout d'abord, il nous faut noter qu'une des spécificités des spectres de molécules uniques est de présenter, à l'échelle de temps d'acquisition de l'ordre de la seconde, de légères variations de ses caractéristiques. De telles fluctuations ont été observées dès les premières expériences SERS de molécules uniques effectuées de manière indépendantes aux Etats-Unis par les groupes de *K. Kneipp* [7] et *S. Nie* [8].

Ces expériences furent menées sur des échantillons contenant, outre des agrégats d'argent type colloïdes nécessaires à l'exaltation, des molécules de même nature chimique, respectivement le crystal violet et la rhodamine 6G. Les spectres de molécules uniques de ces colorants ont pu être enregistrés toutes les secondes et de manière continue. S'ils correspondent bien à une seule et même espèce chimique, les spectres successifs présentent une forte dynamique à l'échelle de la seconde et même en deçà ; on voit l'intensité relative de certaines, et parfois de toutes les raies, changer de manière soudaine ; de plus les variations subies par les différentes raies ne sont pas corrélées, et semblent aléatoires. Plus que des fluctuations de l'intensité relatives des raies, il existe aussi une dynamique d'apparition/disparition du spectre dans sa globalité et, comme dans le cas de la fluorescence, on parle alors de clignotement. On peut effectuer le même type d'observation, c'est-à-dire constater l'existence d'une dynamique temporelle, concernant la position des maxima de certaines raies. Ces positions peuvent en effet "osciller", c'est-à-dire par exemple augmenter puis baisser en fréquence et recommencer ; le déplacement spectral qui en résulte peut cependant ne pas être négligeable et atteindre 10cm^{-1} . Tout comme les variations d'intensité relative, les déplacements en fréquence ne se font pas ni sur l'ensemble des raies, ni dans le même sens pour toutes les raies qui se déplacent. Même lorsqu'on n'observe pas de changement soudain, les spectres SERS obtenus sur différentes particules peuvent aussi présenter de légers décalages spectraux les uns par rapport aux autres. L'enjeu des études actuelles est ainsi d'identifier le, ou les processus, à

l'origine de cette dynamique.

Il n'existe pas, dans le cas du signal Raman, de signature spectroscopique spécifique permettant de s'assurer de l'unicité de la molécule étudiée.

C'est ainsi plutôt un ensemble d'indices, décrits ci-dessus, associé à des échantillons préparés de manière à ce que le nombre de molécules soit très faible, qui permettent aux membres de cette communauté de valider l'hypothèse d'un signal de molécule unique.

L'analyse chimique qu'il est possible d'effectuer à partir de l'étude du spectre Raman de molécules uniques se révèle aussi puissante et prometteuse. Pour l'étude de l'ADN par exemple, puisqu'effectivement la signature SERS en mode molécule unique de l'adénine, base de l'ADN, a été observée en 1997 [45], et ce sans marqueur particulier. Cela peut ouvrir la voie à une technique rapide de séquençage de brin d'ADN puisque les 4 bases constitutives présentent des signatures spectroscopiques spécifiques entre 650 et 800 cm^{-1} .

Cette analyse chimique peut de même être effectuée dans le temps, et un tel suivi peut se faire sur de longues périodes puisque la molécule ne risque pas d'être photoblanchie comme avec l'analyse par fluorescence. On pourra donc suivre une réaction (photo)chimique en détectant et en caractérisant de manière précise les produits de réactions. Nous verrons au cours du chapitre 3 un exemple d'une telle application de l'analyse spectrale mettant en jeu une photo-oxydation de molécules organiques.

On peut aussi comparer les caractéristiques de spectres obtenus dans différentes conditions expérimentales et en particulier étudier les variations induites par une modification de polarisation d'excitation ou au contraire analyser la polarisation de la diffusion. Effectuer une telle analyse sur des objets uniques présente une différence majeure avec les études macroscopiques de spectres Raman en polarisation, dans lesquelles on effectue une moyenne sur des objets orientés *a priori* aléatoirement. De plus, dans une mesure macroscopique, la seule information pertinente est l'intensité des raies relatives à deux configurations perpendiculaires des polarisations d'excitation et de détection. En spectroscopie de molécule unique, on se retrouve, sans préparation particulière, dans une situation analogue à la seule situation dans laquelle une telle analyse peut être effectuée de manière macroscopique sur tout objet et sans conditions de symétrie, c'est-à-dire dans le cas d'un échantillon ordonné (monophasique et/ou cristallin); les systèmes amorphes conduisant, du fait d'une répartition statistique globalement isotrope, à une dépolarisation du signal macroscopique¹⁵. Dans une mesure de molécule unique, on peut ainsi s'intéresser pour chaque mode aux caractéristiques du dipôle induit qui rayonne, en fonction de la polarisation d'excitation, c'est-à-dire obtenir l'ensemble des composantes du tenseur de polarisabilité.

¹⁵Pour les objets ou molécule de symétrie très élevée, proche de la symétrie sphérique, cette analyse peut en revanche être effectuée quelque soit l'ordre régnant au sein de l'échantillon, car dans ce cas, le signal conserve en partie un caractère polarisé, même dans un échantillon désordonné.

1.3. Problématique de la spectroscopie Raman de molécules individuelles

Le signal Raman de molécule unique va nous permettre, comme dans le cas de la fluorescence, de déterminer l'orientation spatiale de la molécule, mais aussi de sonder de manière plus fine l'interaction avec l'environnement qui peut se traduire par la modification du tenseur de polarisabilité de la molécule. A nouveau, les nanotubes de carbone et leur dérivés sont des objets que ce type d'analyse permet de mieux appréhender.

En effet, des études en polarisation sur des nanotubes monoparoi (SWNT) [46] ont montré leur potentiel pour l'analyse d'un objet unique au sein d'un échantillon inhomogène, ce qui est critique dans le cas des nanotubes. Ces derniers sont en effet difficiles à disperser et on note en général dans les échantillons, excepté dans le cas de préparation préalable complexe ou de processus de croissance spécifiques, la présence de cordes, de petits fagots ou bien encore de pelotes constitués de nanotubes hétérogènes en diamètre et orientation.

Un autre exemple du potentiel de l'analyse Raman de nano-objets individuels est celui des peapods, qui sont constitués de nanotubes remplis de métallobfullerènes, et dans lesquels un effet d'antenne a pu être mis en évidence : cet effet conduit à un signal anisotrope, avec une direction privilégiée—majoritaire quelle que soit la direction de polarisation de l'excitation—qui correspond vraisemblablement à l'axe du tube [47].

Chapitre 2

Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

2.1 Motivations, système d'intérêt et mise en oeuvre de l'étude

2.1.1 Motivations

Un des inconvénients et limitations majeurs des expériences de détection et d'étude de molécules uniques par fluorescence est lié au processus de photoblanchiment. Quand la molécule photoblanchit, elle devient en quelque sorte invisible, et l'expérience est terminée. De nombreux efforts sont fournis afin de développer de nouvelles molécules, ou de nouveaux objets dont la stabilité sous irradiation serait meilleure voire infinie. Mais il est aussi très important de s'intéresser à mieux connaître le(s) processus qui conduisent à ce blanchiment. S'il existe plusieurs hypothèses sur les causes du photoblanchiment— comme par exemple l'implication de l'oxygène, la photostabilité des molécules semblant être réduite en sa présence— celles-ci sont néanmoins largement méconnues et dépendent très fortement du milieu dans lequel se trouve l'objet fluorescent. La motivation de cette étude est donc double.

D'une part, nous nous sommes attachés à la compréhension des processus physico-chimiques qui gouvernent la photo"vie" d'une molécule particulière— le pérylène orange— dans un milieu donné, un film solgel en couche mince. Les échantillons utilisés pour conduire ces études ont été synthétisés au *Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (LPMC-Ecole Polytechnique)*, dans le cadre d'une collaboration avec *J.P. Boilot* et *F. Chaput*. Une telle étude nécessite d'exploiter au mieux le signal de fluorescence de la molécule, c'est-à-dire d'en retirer

le maximum d'informations possible, en s'intéressant non seulement au nombre de photons de fluorescence émis, mais aussi par exemple à leur dispersion en énergie, donc au spectre. Pour être valides, ces mesures doivent être effectuées de manière parallèle sur un même nano-objet, ce que nous traduisons par le terme de "caractérisation multiparamètres" utilisé dans ce manuscrit.

D'autre part, nous avons aussi utilisé la molécule fluorescente comme une sonde de son environnement. Dans notre cas particulier, nous avons cherché à explorer les propriétés du film solgel dans lequel se trouvent les molécules de pérylène orange. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, il est en effet très important, en vue des applications envisagées, de connaître les paramètres microscopiques de ces matériaux dont les choix de synthèse –précurseur, solvant, protocole expérimental– déterminent les propriétés. De plus, dans ce travail, pour des raisons liées au mode de microscopie choisi, le matériau solgel étudié ne se trouve pas sous forme massive mais sous la forme d'une pellicule de très faible épaisseur, de l'ordre d'une cinquantaine à une centaine de nanomètres. A nouveau, cette forme particulière du matériau en film mince peut induire des modifications des processus de sa formation au cours des différentes phases de synthèse, ce qui implique à terme une modification des propriétés du film solgel par rapport au même matériau massif. Plus précisément, nous nous sommes intéressés aux propriétés de réticulation de ces films et à leurs conséquences. Nous avons aussi cherché à connaître le degré d'hétérogénéité de la matrice.

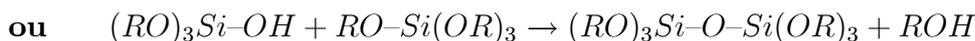
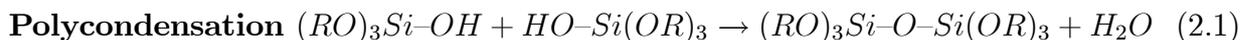
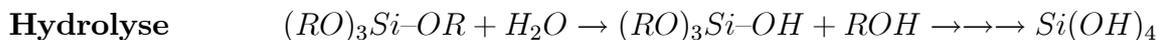
2.1.2 Système étudié : films minces solgel dopés

2.1.2.1 Matériaux solgel

De manière classique, les méthodes de synthèse de matériaux vitreux, le verre le premier, requièrent de se placer dans des conditions extrêmes de température : pour fondre le quartz et donc transformer le réseau ordonné d'oxyde de silicium qu'est le quartz en un réseau désordonné qui caractérise les matériaux vitreux, il est nécessaire d'élever la température jusqu'à plus de 1800°C . De plus, en raison de la forte viscosité de la silice, il est nécessaire d'effectuer plusieurs cycles de chauffage avant d'obtenir un verre aux propriétés optiques –transparence, pertes par diffusion limitées– de qualité. La communauté des chimistes du verre a donc contourné cette phase de chauffage violent, en construisant le réseau désordonné de silice à température ambiante. La matière première est alors non pas le quartz, mais des précurseurs sous forme liquide, connus sous le nom d'alkoxydes de silicium, de formule générique $\text{Si}(\text{OR})_4$ où R symbolise un groupement organique type alkyle $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$. Sont largement utilisés comme précurseurs des matériaux solgel le tétraéthoxysilane TEOS de formule $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, ou encore le tétraméthoxysilane TMOS ($\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$). La première étape consiste en une hydrolyse des groupements alkoxy par l'eau en milieu acide. Ils sont

2.1. Motivations, système d'intérêt et mise en oeuvre de l'étude

donc progressivement remplacés par des groupements OH . Les silanols $\equiv Si(OH)$ obtenus peuvent alors réagir entre eux, et/ou avec des groupements alkoxy non hydrolysés pour former des ponts siloxanes, $Si-O-Si$. C'est le début de la formation du réseau de silice.



Progressivement, on aboutit à un réseau tridimensionnel de silice, qui se forme donc par le biais de réactions conduites à température ambiante. La viscosité de la solution initiale augmente au fur et à mesure de la formation de ce réseau jusqu'au moment où toute la solution est gélifiée, ce qui se fait au point de gélification, transition qui contrairement à celles de cristallisation ou de fusion se fait sans échange de chaleur avec l'extérieur. Seule la capacité thermique du matériau est modifiée, il s'agit d'une transition du second ordre. On est donc passé d'une solution (sol) à un gel, d'où le nom de "solgel" donné à ce procédé ainsi qu'aux matériaux obtenus par ce biais. Le gel est constitué d'un réseau continu de silice amorphe imprégné d'une phase liquide qui contient à la fois les solvants de synthèse et les produits secondaires de réaction. Si la phase liquide est constituée majoritairement d'eau, ce gel sera nommé aquagel ou hydrogel; si on a plutôt utilisé des alcools on le nomme alcogel. La phase de condensation peut aussi mener à des gels de structures différentes, c'est par exemple le cas lorsque la phase d'hydrolyse est très rapide, comme l'ont observé *F. Devreux et al.*[48]. A partir du TEOS, ils obtiennent effectivement un gel constitué d'un agrégat de silice dit "agrégat de percolation" de grande taille, qui coexiste avec des unités plus petites contenues dans le sol; ce n'est qu'après la gélification que ces petites particules se lient progressivement à l'agrégat. D'une manière générale, la taille des particules de silice de quelques nanomètres à une dizaine de nanomètres, mais aussi l'homogénéité du gel c'est à dire la présence d'alkoxydes de silicium hydrolysés partiellement seulement, dépendent de la compétition entre la réaction d'hydrolyse et celle de condensation. Une modification du pH peut à ce stade favoriser l'une des réactions par rapport à l'autre¹. Au delà du point de gélification, le gel continue à évoluer. La réticulation progresse, la phase liquide devient minoritaire et restreinte dans des domaines de plus en plus petits, assimilables à un réseau de cages, de pores et de canaux étroits. Cet entrelacs constitue une matrice très poreuse, dont les pores et "cages solgel" vont être utilisés pour inclure dans le matériau des dopants de différentes natures (molécules, cristaux,...). La dernière phase de préparation du matériau est le séchage qui consiste à évaporer doucement la phase liquide résiduelle— ce qui peut se faire à des températures aussi basses que 40°C— mais on peut aussi utiliser des solgels humides

¹Par exemple, en augmentant le pH on ralentira la réaction d'hydrolyse, la réaction de condensation étant par là même favorisée.

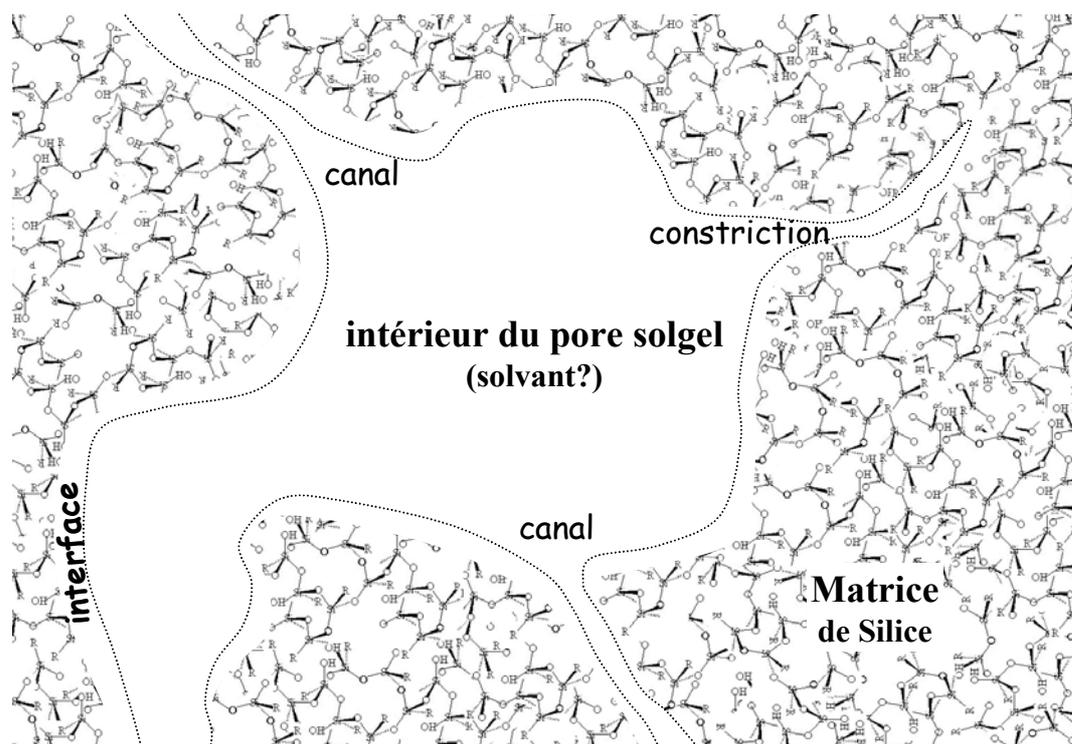


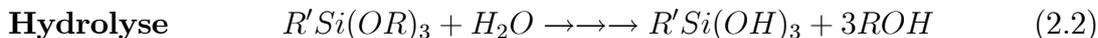
FIG. 2.1 – Représentation schématique de la structure d'un matériau sol-gel massif. La condensation du réseau de silice peut donner lieu à la formation à l'intérieur de la matrice de canaux, constriction et pores, éventuellement remplis de solvant résiduel et interconnectés. L'échelle du schéma représenté est typiquement d'une dizaine de nanomètres.

c'est-à-dire dans lesquels on a sciemment choisi de conserver la phase liquide. La figure 2.1 présente schématiquement la structure attendue pour un matériau sol-gel massif.

Si le procédé peut paraître simple, il existe en réalité un nombre important de paramètres de synthèse dont dépendent les propriétés physico-chimiques du matériau final. Ainsi, pour un même précurseur, le pH, la quantité d'eau, la concentration, la température ou encore les conditions de séchage du sol-gel peuvent largement influencer et modifier le schéma réactionnel et conduire à des xerogels de propriétés très différentes. L'avantage est qu'il est alors possible, en définissant un protocole expérimental complet adapté, de former des matériaux "sur mesure", avec des propriétés spécifiques telles que le volume des pores ou la surface spécifique, l'indice de réfraction, (...) adaptées à une application donnée. On peut aussi "jouer" sur les précurseurs utilisés, pour introduire par exemple des groupements organiques dans le réseau. On utilisera alors en particulier des alcoxydes de silicium modifiés – nommés dans la littérature ormosils pour "organically modified silanes" – $R_x'Si(OR)_{4-x}$ où R' est un groupement organique souvent aussi de type alkyle, et grâce auxquels, surtout, on aboutira à des sol-gels dans lesquels des groupements R' sont liés de manière covalente au silicium, la

2.1. Motivations, système d'intérêt et mise en oeuvre de l'étude

liaison Si-C(sp³) résistant à l'hydrolyse. Ces groupements peuvent ainsi— tout comme les groupements silanols éventuellement résiduels— tapisser la paroi des pores et cages solgel et induire des environnements plus ou moins polaires. La synthèse d'ormosils est ainsi l'une des voies privilégiée pour contrôler la polarité des matériaux solgel.



On obtient alors des matériaux dans lesquels les composants inorganiques et les fonctionnalités organiques sont mêlés à l'échelle micro- voire nanométrique. On peut aussi noter l'intérêt de préparer un réseau vitreux/transparent sans avoir besoin de trop élever la température : *a priori*, n'importe quelle molécule organique (et en particulier dans le cas d'applications optroniques, des molécules actives optiquement) peut effectivement être incorporée dans le sol dans lequel elle est soluble. Après réticulation, les molécules dopantes se trouveront piégées dans la structure solide obtenue— ou en tous cas les molécules seront dans la matrice— et ce, sans avoir subi de dégradation thermique au cours du processus, car même la phase de séchage se fait en ne chauffant que très faiblement. Le problème majeur est que les techniques d'investigation classiques macroscopiques, utilisées pour caractériser les matériaux obtenus, ne permettent d'obtenir que des informations moyennées sur l'ensemble de l'échantillon. Les paramètres locaux de réticulation, de concentration des objets dopants et de leurs interactions avec la matrice et donc leur stabilité, restent mal appréhendés.

Comme on peut le vérifier dans l'article de revue très complet de *Sanchez et al.* paru récemment [49], les applications des matériaux solgels et de leurs dérivés— dits matériaux hybrides organique/inorganique— sont très nombreuses et couvrent une très large gamme de domaines. Outre des applications de type chimie des matériaux (couche protectrice, emballage ou verre coloré proprement et facilement recyclable), il existe de nombreuses possibilités dans le champ de la nanophotonique, que ce soit pour les propriétés d'émission, d'absorption (filtre), pour les propriétés optiques non-linéaires ou encore de capteur chimique de ces matériaux hybrides. A titre d'exemple, on peut citer le cas particulier des lasers à colorants "tout-solide". L'inconvénient majeur des lasers à colorants classiques est qu'ils nécessitent un système de flux pour renouveler les molécules émettrices, la durée d'émission des colorants en solution étant très limitée. Ce système, lourd à mettre en place et volumineux empêche ces lasers— sans même considérer la toxicité des molécules— de sortir des laboratoires. Ce problème peut être contourné en insérant les colorants dans une matrice, de type solgel par exemple ; la durée de vie d'émission des molécules se trouve largement augmentée par rapport à celle observée en milieu liquide. Du facteur 7 des premiers essais [50], on a atteint des augmentations de 1 à 2 ordres de grandeur en optimisant la matrice [51]. La stabilité des molécules de colorant dans les matrices solgel est aussi supérieure à celle obtenue par l'emploi de matrices

polymère "classiques", type PMMA par exemple [52, 51]. Enfin, dans ces articles les auteurs notent aussi une amélioration des propriétés de ce matériau laser (effet de lentille thermique, inhibition par l'état triplet,..., minimisés). Le principe utilisé dans le cadre des applications des sol-gel comme senseurs chimiques est assez similaire : en insérant des molécules dont les propriétés optiques sont sensibles à la présence d'espèces particulières, la durée de vie de la sonde est augmentée. La très large gamme d'espèces potentiellement détectables mais aussi de phases— dans le sens thermodynamique du terme— font des capteurs l'un des champs d'intérêt les plus larges de la communauté de recherche sur les sol-gels dopés. Leur très grande sensibilité permet de détecter de très faibles concentrations, et donc de mettre en évidence des espèces présentes seulement sous la forme de traces. De nombreuses études ont porté sur la mise au point de capteurs d'acidité, de gaz (NH_3 , NO_2 ,...) mais aussi de capteurs de solvants comme l'eau, et dans ce cas particulier le capteur sera sensible à l'humidité de l'air. Ces capteurs sont ainsi préférentiellement utilisés dans le cadre du contrôle et de la protection de l'environnement, en permettant de connaître et de détecter la présence de polluants. Si dans de nombreux cas les matériaux sol-gel sont utilisés sous forme massique, les coatings ou l'utilisation de films minces sont aussi largement employés, par exemple pour modifier les propriétés optiques de verres mais aussi pour augmenter la sensibilité et le temps de réponse des capteurs chimiques. L'obtention de film minces, d'épaisseur de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, se fait en utilisant la technique du dépôt à la tournette ou *spin-coating*. Le sol hydrolysé est déposé sur un substrat— verre, silicium,...— en rotation rapide ; dans ce cas, les processus de condensation-réticulation et d'évaporation des solvants entrent en compétition. La mise en oeuvre des films donne donc lieu au contrôle de nouveaux paramètres pour obtenir les matériaux voulus. La vitesse de rotation, l'atmosphère de coating ou la propreté du substrat font alors partie des nombreux paramètres pouvant influencer sur l'état de surface des films (défauts, comme par exemple des stries), leur épaisseur, la taille des domaines, leur état de réticulation, exemples choisis parmi les nombreuses caractéristiques à contrôler.

2.1.2.2 Echantillon étudié

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude de films sol-gel minces dopés.

Le précurseur utilisé est du type ormosil, puisqu'il s'agit du méthyltriéthoxysilane (MTEOS) de formule $(\text{CH}_3)\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$.

La molécule dopante qui sert de sonde fluorescente est le pérylène orange, aussi connu sous les sigles *KF241* ou *BASF241*. Il s'agit d'un dérivé pérylèneimide di-substitué dont la structure est présentée dans le premier chapitre (Fig. 1.2 p 18). Ce colorant, mis au point à la fin des années 80, offre l'avantage de posséder une très bonne photostabilité, supérieure par exemple à une autre molécule couramment employée comme la rhodamine 6G, et d'avoir un

2.1. Motivations, système d'intérêt et mise en oeuvre de l'étude

très grand rendement quantique de fluorescence, proche de l'unité [53]. Cette stabilité est notamment la raison du choix de ce colorant dans le cadre de recherche pour des applications laser tout solide [54, 55]. De plus, son large domaine spectral d'émission de fluorescence—comme on peut le voir sur les spectres présentés sur la figure 1.2— offre la possibilité de changer assez facilement la fréquence laser sur une gamme de plusieurs dizaines de nanomètres [54]. Par contre, tout comme certains autres colorants d'intérêt, comme ceux de la famille des pyrrométhènes, les pérylènes ne sont pas solubles dans l'eau, ni d'une manière générale dans les solvants polaires. Le perylène orange est donc ajouté au sol sous forme d'une solution avec le tétrahydrofurane, ou THF, comme solvant. Cette "hydrophobicité" du colorant explique aussi le choix de travailler avec un précurseur modifié contenant une fonction organique : même après hydrolyse, le groupement méthyl conservé, beaucoup moins polaire que les groupements silanols, permet une meilleure interaction avec le colorant et on peut espérer ainsi limiter une éventuelle ségrégation.

Le protocole expérimental est le suivant : La première phase d'hydrolyse du MTEOS est conduite dans une solution équimolaire eau/éthanol à un pH de la phase aqueuse de 2,5. Les solvants d'hydrolyse sont alors retirés par pompage puis remplacés par du tétrahydrofurane (THF) et le perylène orange est ajouté, de manière à obtenir une concentration de $10^{-11} mol.l^{-1}$ dans le sol. Cette concentration, déterminée par tests successifs (voir aussi la figure 2.4), est celle qui correspond à une bonne dispersion des molécules dans le film, avec une distance moyenne entre molécules de l'ordre de quelques fois la résolution spatiale du microscope (600-700nm). A ce stade, l'ormosil précurseur a été totalement hydrolysé, et la condensation s'est amorcée en formant de petits amas [48]. Pour éviter toute présence de polluants qui pourraient nuire à l'homogénéité du film, le dépôt est ensuite effectué sous hotte, en légère surpression. Environ $100\mu l$ du sol dilué sont déposés à la tournette— moins de 30s à $8000t/min$ — sur une lamelle couvre-objet propre. L'épaisseur des films obtenus après quelques minutes en étuve ($\sim 120^{\circ}C$) est typiquement de 50 à 100nm.

2.1.3 Dispositif expérimental- microscope grand champ et détection confocale

Pour pouvoir effectuer l'étude des films solgel à travers celle de la fluorescence des molécules dopantes, en détectant et caractérisant les molécules de perylène orange de manière individuelle, nous avons choisi de combiner deux modes de microscopie : La microscopie grand champ d'une part, qui permet, en éclairant une large zone, de détecter un grand nombre de molécules simultanément, et d'autre part, la microscopie confocale pour la caractérisation spectroscopique du signal de fluorescence d'une molécule donnée.

L'intérêt de la microscopie grand champ est de permettre d'obtenir la réponse d'un grand nombre d'objets individuels simultanément. Elle possède de plus une bonne efficacité de

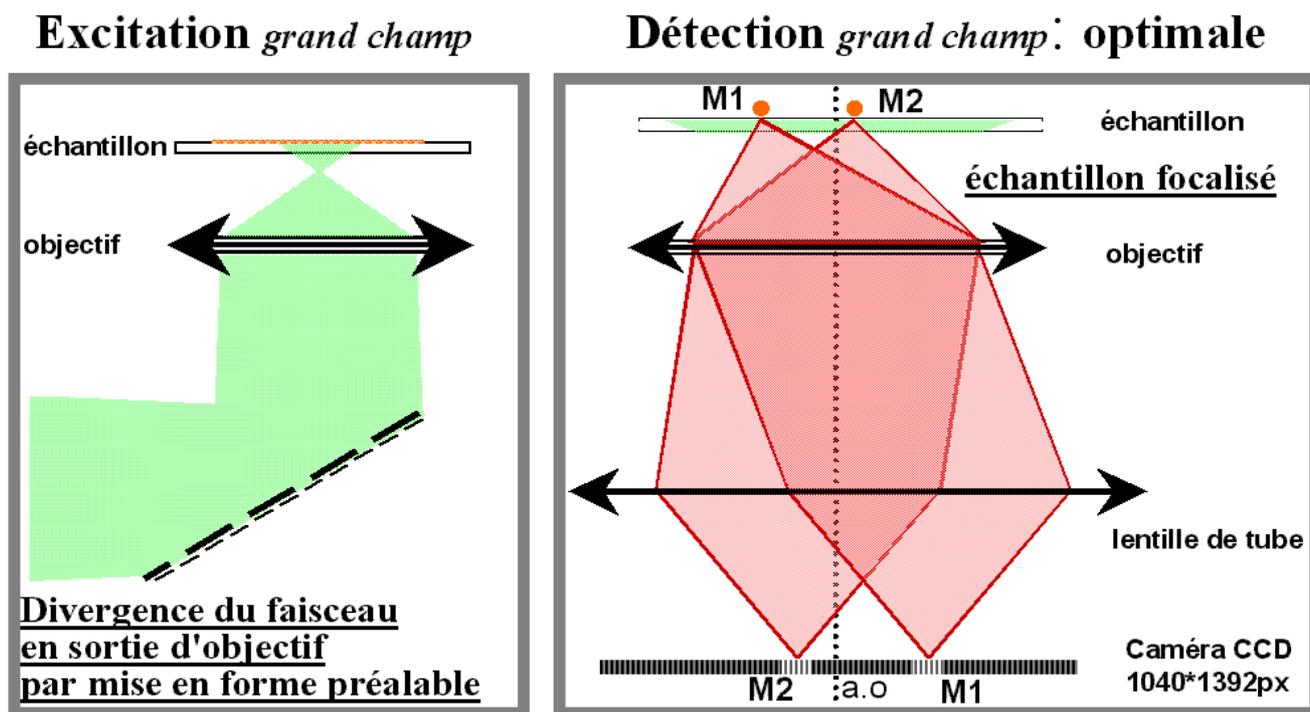


FIG. 2.2 – Représentation schématique du principe de la microscopie grand champ. Pour plus de clarté, les schémas représentant l'excitation et la détection sont séparés.

détection. Grâce à cette détection multicanal, on obtient la réponse des objets à l'excitation laser avec pour tous les mêmes conditions expérimentales, ce qui permet de limiter les artefacts qui pourraient biaiser les statistiques obtenues sur l'ensemble des différentes molécules. On peut également suivre l'évolution temporelle de leur réponse en acquérant des images successives (films). En contrepartie, travailler en "grand-champ" présente aussi certains inconvénients. Il n'y a effectivement aucun filtrage spatial du signal des molécules, en particulier axial, et la seule possibilité existante pour augmenter le rapport signal sur bruit, en réduisant les signaux parasites (diffusion ou fluorescence), est de limiter l'épaisseur de l'échantillon lui-même. Pour réaliser une analyse spectrale de molécules particulières, il est nécessaire d'adjoindre dans cette voie d'analyse un filtrage spatial. Sans ce filtrage spatial, la zone de l'échantillon analysée qui dépend de la conjugaison entre l'échantillon et la zone active du détecteur contiendra plusieurs molécules. Le signal analysé proviendra de plusieurs émetteurs et ne sera pas significatif. Il sera de plus entaché d'un bruit important correspondant à celui de toute la zone imagée sur le détecteur. Ainsi, pour obtenir le spectre des molécules, nous avons utilisé une détection type "confocale" : le signal est alors filtré de manière latérale dans le plan image. La mise en place effective du filtrage sera détaillée dans la suite de ce paragraphe.

2.1. Motivations, système d'intérêt et mise en oeuvre de l'étude

Le principe de la microscopie grand champ peut-être appréhendé à partir du schéma de la figure 2.2. Il s'agit d'obtenir une tache laser sur le plan de l'échantillon, non pas focalisée, mais étendue, de manière à couvrir une large zone– ou un grand champ– de l'échantillon. On va cependant utiliser l'objectif de manière optimale, c'est-à-dire que l'objectif est situé à la distance de travail spécifiée dans ses caractéristiques. La fluorescence des molécules est donc correctement collectée, leurs images sont focalisées. Pour obtenir une large tache d'excitation, le faisceau laser est donc mis en forme avant l'objectif, de manière à obtenir un faisceau légèrement convergent au niveau de la pupille d'entrée. En modifiant non seulement l'angle d'entrée dans l'objectif, mais aussi la taille du faisceau sur cette pupille d'entrée, on pourra obtenir des zones d'éclairement sur l'échantillon plus ou moins importantes.

Le dispositif expérimental effectivement utilisé au cours de cette étude est présenté sur la figure 2.3. La partie microscope à proprement parlé est constituée d'un microscope Nikon inversé qui possède différents mode de détection– voies directe ou latérale et combinaison 20/80 mais aussi voie binoculaire– et qui a été progressivement optimisé pour les besoins spécifiques de cette étude, et pour pouvoir effectuer les mesures voulues sur les molécules uniques de perylène orange.

La source d'excitation est un laser Argon utilisé en mode monoraie à $514,5nm$ dont le faisceau est injecté dans une fibre monomode pour être amené jusqu'au microscope. L'extrémité de la fibre est montée sur un support xyz, solidaire d'une platine de déplacement en z sur laquelle se situe une lentille convergente pour collimater le faisceau laser, très divergeant en sortie de fibre. En modifiant la distance entre la sortie de la fibre et cette première lentille, il est possible de modifier la taille de la tache d'excitation sur l'échantillon. Pour s'assurer du contrôle de la polarisation de l'excitation, au rotateur de polarisation situé avant la fibre, est ajouté en sortie de fibre un polariseur. Bien que la plupart des mesures se soient effectuées en microscopie grand champ, nous avons aussi parfois utilisé une tache d'excitation focalisée. Pour adapter la divergence du faisceau, j'ai mis en place un système télécentrique constitué de deux lentilles achromat ($f_2 = 50mm$; $f_3 = 100mm$) placées avant l'entrée du microscope. A l'entrée du microscope se trouve un diaphragme qui permet de sélectionner une partie homogène du faisceau. Le trajet laser traverse ensuite le filtre d'excitation (passe bande étroit centré à $514nm$), puis une lame séparatrice à 45° (dichroïque à $532nm$) qui réfléchit 95% du faisceau vers l'entrée de l'objectif. Deux objectifs *Nikon* ont été utilisés au cours des différentes études : un objectif à immersion $\times 40$ (Ouverture Numérique 1,3) et un objectif à sec $\times 100$ (ON 0,73). L'échantillon solgel sur lequel arrive le faisceau se situe dans une enceinte spécialement dessinée pour ces études et qui permet, grâce à deux embouts tubulaires sur lesquels s'adaptent des valves microfluidiques, de contrôler l'atmosphère de travail en choisissant de se relier soit à une pompe, soit à une bouteille de gaz, par exemple N_2 . On peut aussi se replacer à l'atmosphère ambiante, éventuellement très rapidement grâce

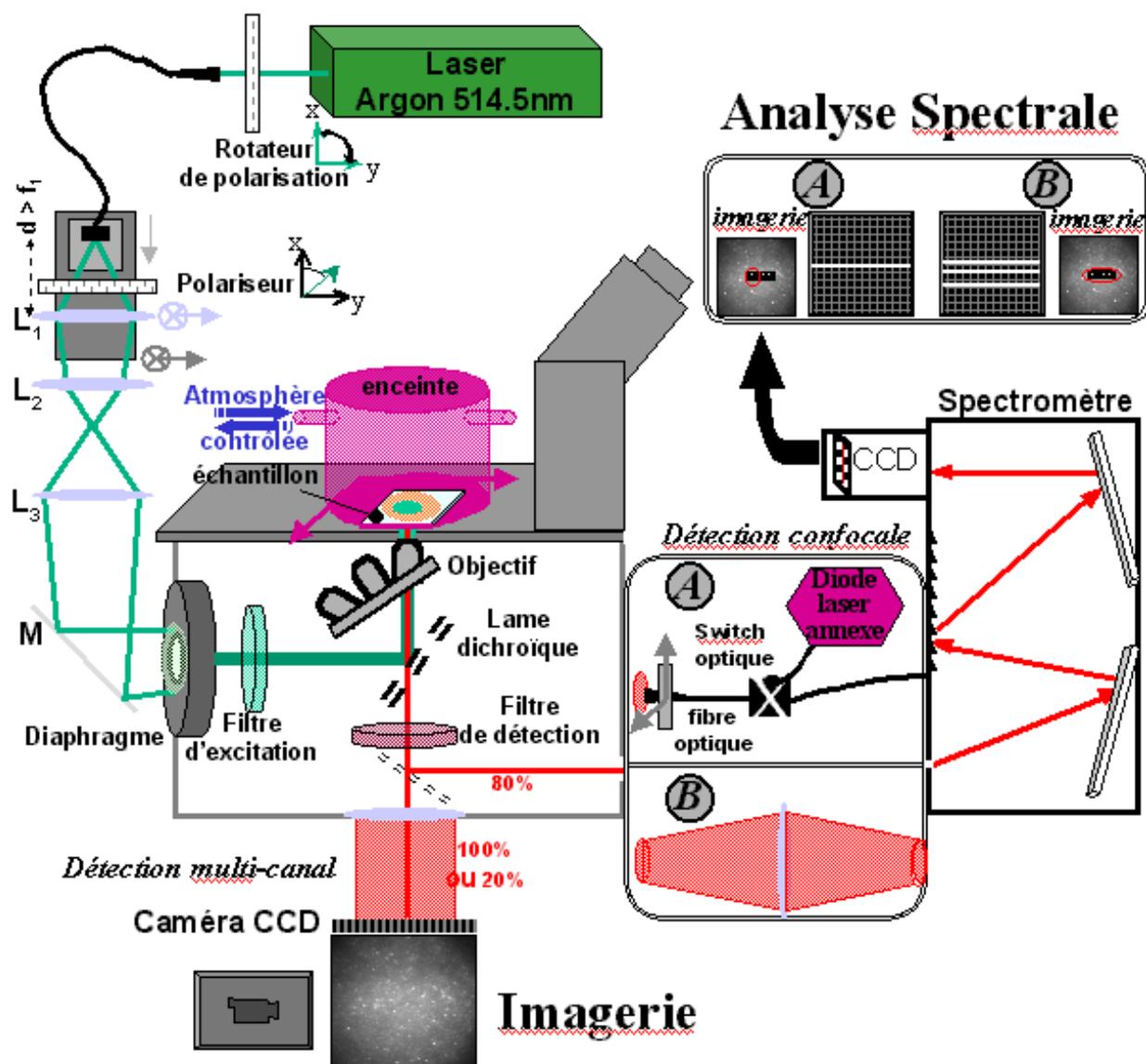


FIG. 2.3 – Schéma du dispositif expérimental associant microscopie grand champ et détection confocale utilisé pour les études de fluorescence de molécules individuelles.

2.1. Motivations, système d'intérêt et mise en oeuvre de l'étude

à la présence d'un bouchon à vis. Dans le cas particulier des expériences menées à froid, une enceinte commerciale à azote liquide (platine *Linkam*) remplace l'enceinte décrite ci-dessus. Le signal est ensuite collecté à travers le même objectif, transmis par la dichroïque puis traverse le filtre de détection (*AELP/Omega 520*) qui laisse passer uniquement les longueurs d'onde supérieures à $520nm$, et la lentille de tube du microscope ($f_T = 160mm$) avant d'atteindre le cube permettant de choisir parmi les différentes voies de détection.

La voie de détection majoritairement utilisée est celle de l'imagerie, qui comprend une caméra CCD (*Coolsnap*) refroidie par triple étage *Peltier* à $-35^\circ C$. Deux images, obtenues avec l'objectif de grossissement $\times 40$ sur des échantillons de concentrations différentes C_a et C_b , sont présentées sur la figure 2.4. La puissance utilisée est d'une dizaine de milliwatts à l'entrée de l'objectif, ce qui permet d'obtenir un rapport signal sur bruit satisfaisant pour détecter des molécules individuelles avec des temps d'acquisition de l'ordre de la seconde ou de la centaine de millisecondes. Sur l'image de droite apparaît aussi une grille, obtenue sur la lamelle de verre avant spin-coating du film solgel, par dépôt de chrome par micro-lithographie. Cette grille est indispensable pour pouvoir retrouver une zone particulière de l'échantillon, et suivre son évolution au cours du temps. A la concentration $C_a = 10^{-9}M$, le nombre de molécules dopantes est important. Beaucoup de molécules se trouvent à des distances relatives trop faibles pour qu'il soit possible de les distinguer sur les images. On voit donc des points brillants de quelques pixels de dimension, des molécules individuelles, dont l'image correspond à la réponse impulsionnelle du microscope : la tache d'*Airy* a un diamètre de $\sim 480nm$ pour l'objectif à immersion utilisé dont le grossissement $\times 40$, prévu pour des lentilles de tube de focale $f_T = 200mm$, correspond à un grossissement $\times 32$ dans notre configuration. Le diamètre de la tache brillante correspondant à une molécule individuelle sur la caméra CCD est donc d'environ $16\mu m$, soit 2 à 3 pixels. On observe aussi des points beaucoup plus étendus, correspondant au recouvrement des images de plusieurs molécules. Pour une concentration inférieure de plusieurs ordres de grandeurs, $C_b = 10^{-11}M$, on ne distingue plus que des objets individuels, qu'il est donc possible d'étudier un par un. Nous avons donc choisi de travailler sur des échantillons dopés à ce titre, qui correspond à un bon compromis entre la séparation spatiale minimum des molécules, imposée par la résolution de notre microscope, et le nombre de molécules qu'il est possible de suivre simultanément dans la zone irradiée. Sur ces images apparaît ainsi immédiatement l'intérêt de l'imagerie grand champ. La détection multicanal constituée par l'ensemble des pixels de la CCD nous permet d'étudier rapidement un grand nombre d'objets à la fois, et de couvrir une zone suffisamment étendue pour espérer englober un ensemble statistiquement représentatif d'individus et d'environnements, qui décrit l'échantillon étudié. La taille physique des pixels est de $6,7\mu m$. Pour l'objectif $\times 40$ majoritairement utilisé, un pixel représente donc environ $209nm$. L'aire de la tache d'excitation laser utilisée est de l'ordre de $2000\mu m^2$.

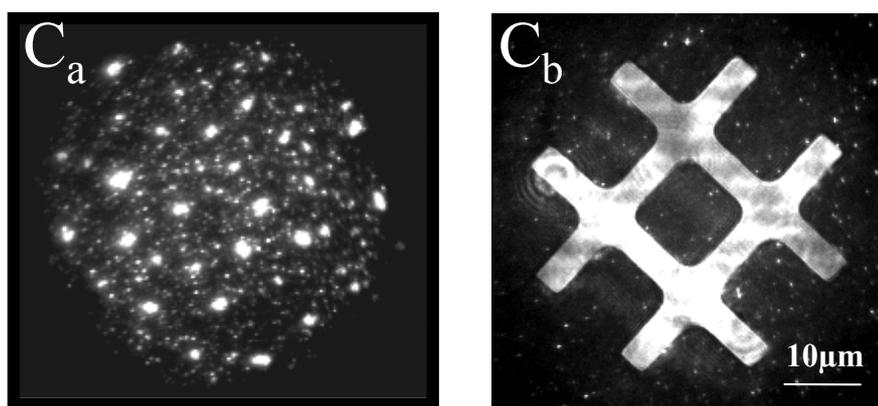


FIG. 2.4 – Imagerie grand champ de fluorescence. Images $P_{obj} = 10mW$, durée d'acquisition = 2 sec de molécules de pérylène orange dopant un film solgel mince, pour deux concentrations différentes $C_a(10^{-9}M)$ et $C_b(10^{-11}M)$. Sur l'image de droite apparaît aussi une grille de lithographie, utilisable comme repère.

La seconde voie utilisée est la voie dite latérale, elle nous a permis d'effectuer des analyses complémentaires de la fluorescence des molécules suivies par imagerie grand champ sur la CCD.

Le premier système mis en place sur cette voie est une détection type confocale – principe que je détaillerai plus précisément dans le chapitre 3 – obtenue par l'emploi d'une fibre de diamètre de coeur $50nm$ (mode **A** sur la figure 2.3). Pour pouvoir détecter dans cette voie latérale le signal de fluorescence d'une molécule particulière, j'ai mis au point une procédure d'alignement. La difficulté consiste en effet à sélectionner une molécule donnée parmi les centaines de molécules qui sont éclairées, et qui émettent donc simultanément en microscopie grand champ. La sélection du rayonnement d'une seule molécule est obtenue par le coeur de la fibre elle-même. On ne détecte en effet que le signal injecté dans la fibre optique qui est placée dans le plan image de la voie latérale. De plus, pour choisir une molécule particulière imagée sur la CCD, on utilise une diode laser annexe qui sert d'alignement. La fibre qui recueille le signal de fluorescence est connectée à un commutateur optique, dont l'une des voies est reliée à la diode et l'autre au détecteur choisi, c'est-à-dire soit à un spectromètre, dans lequel le signal est détecté sur une caméra CCD refroidie à l'azote liquide après dispersion par un réseau, soit à une photodiode à avalanche permettant d'analyser temporellement les photons émis (dans ce manuscrit ne seront cependant pas discutées les données résolues en temps obtenues par cette méthode). Le signal de la diode laser annexe est automatiquement focalisé sur l'échantillon par l'objectif du microscope, et on observe donc sa tache sur l'image CCD. Il suffit alors de déplacer finement l'extrémité de la fibre de collection pour faire coïncider cette tache laser annexe avec la molécule dont on veut étudier les caractéristiques d'émission et qui

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

est visualisée simultanément sur l'image donnée par la caméra du système grand champ. Par le principe du retour inverse de la lumière, lorsqu'on commute ensuite le switch sur l'autre voie, le rayonnement de la diode n'arrive plus sur l'échantillon, mais le signal de fluorescence de la molécule sélectionnée est envoyé vers le détecteur.

Le second système de détection utilisé pour recueillir le signal par la voie latérale est aussi de type confocal, mais il est obtenu en n'utilisant non plus une fibre, mais en projetant directement l'image de l'échantillon sur l'entrée du spectromètre. On utilise comme filtre spatial la fente d'entrée même du spectromètre (mode **B** sur la figure 2.3). Cela permet de pouvoir éventuellement analyser simultanément les spectres de plusieurs molécules se situant sur une "ligne" de quelques pixels d'épaisseur de l'image CCD grand champ.

2.2 Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

2.2.1 Méthode

2.2.1.1 Observations expérimentales et problématique du traitement des données

Comme on peut l'observer sur la figure 2.5 qui présente plusieurs images obtenues au cours du temps extraites d'un même film, l'imagerie grand champ nous permet de suivre l'émission de fluorescence de quelques centaines de molécules à la fois. Qualitativement, tout au long des films, qui peuvent durer jusqu'à plusieurs heures, les différents nano-objets présentent un comportement typique de molécules individuelles. On remarque entre autres que leur émission n'est pas constante, mais peut subir des pauses plus ou moins longues—on dit que les molécules clignotent— comme je le discuterai dans ce chapitre. On distingue aussi le phénomène de photoblanchiment des molécules, leur émission cessant "définitivement" à l'échelle de l'expérience. Globalement, plus la durée depuis le début de l'irradiation augmente— plus on "avance" dans le film— et plus le nombre d'objets fluorescents diminue. Cette remarque est clairement illustrée sur la figure 2.5. Un grand nombre d'émetteurs présents sur la première image—qui correspond aussi à la première image du film, acquise lorsque l'irradiation vient de commencer— disparaissent dès la seconde image et sont aussi absents sur la troisième, présentée sur la figure. Si l'on compare aussi la première image de la figure 2.5 à la cinquième, enregistrée après presque 5 minutes d'irradiation, le photoblanchiment est à nouveau confirmé par le nombre largement restreint d'émetteurs visibles sur cette dernière image.

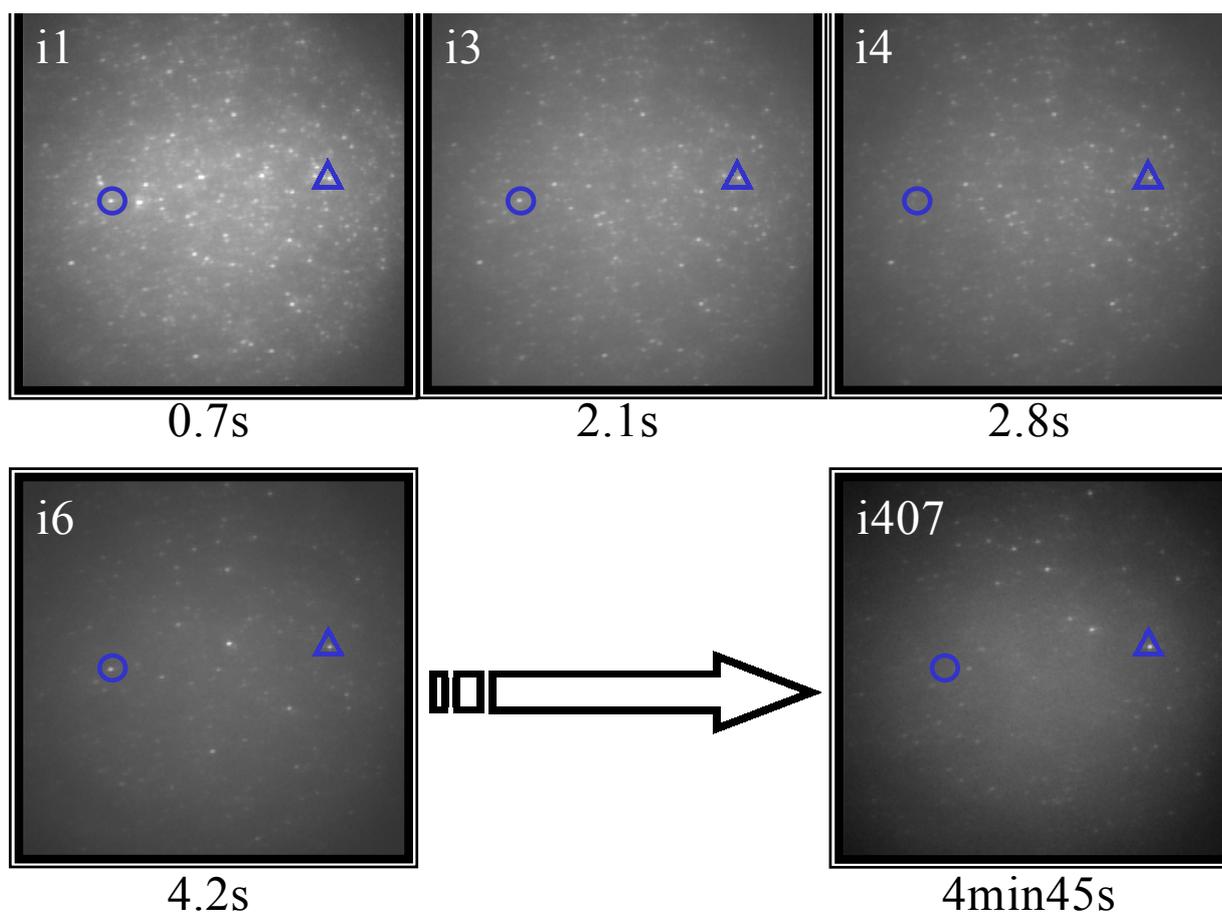


FIG. 2.5 – Film grand champ de fluorescence : séquence d’images reflétant une vue d’ensemble de la dynamique temporelle d’émission de fluorescence de molécules uniques en film solgel. Conditions : $T=T_{amb}$, sous vide primaire $10^{-3}mbar$, $P_{obj}=57mW$. Chaque image a été enregistrée en $700msec$. En bleu, deux molécules caractéristiques présentant une émission durable et continue (triangle), ou un clignotement suivi d’un photoblanchiment (cercle).

D’autre part, si à première vue les molécules semblent toutes avoir un comportement relativement similaire, c’est-à-dire que beaucoup clignotent et photoblanchissent, il n’en est en fait rien. Les durées temporelles pertinentes des périodes d’émission, de clignotement, de photoblanchiment peuvent être très différentes d’une molécule à l’autre. Certaines molécules clignotent, d’autres pas. Certaines photoblanchissent très rapidement, d’autres continuent d’émettre très longtemps. Il faut noter que les remarques sur la dynamique d’émission des molécules et les phénomènes reflétés par cette dynamique, sont conditionnés par les échelles temporelles de l’expérience décrite, c’est-à-dire d’une part par la résolution temporelle de l’expérience– liée à la vitesse d’acquisition des images– et d’autre part par la durée de l’expérience. Dans les expériences présentées, la résolution temporelle est typiquement de l’ordre

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

de plusieurs centaines de millisecondes à quelques secondes. Dans nos études, on ne sondera donc pas par exemple les phénomènes de groupement et de dégroupement de photons, décrits dans l'introduction, et qui correspondent à des processus, tels le piégeage dans l'état triplet, qui ont lieu à une échelle temporelle très courte (τ_T de quelques microsecondes à une fraction de milliseconde), mais des processus plus lents comme l'exploration locale de son site par la molécule.

Les différents comportements temporels d'émission des molécules seront discutés plus avant dans la dernière partie de ce chapitre, mais pour illustrer ici l'hétérogénéité des comportements individuels, on peut en particulier s'intéresser aux deux objets repérés en bleu sur la figure 2.5. La molécule encadrée par le triangle est ainsi un exemple d'émetteur très persistant et continu. Son photoblanchiment interviendra pourtant effectivement après plus de 40 minutes d'irradiation, et sans que l'émission ne se soit interrompue – du moins pas à l'échelle des 700 millisecondes de résolution temporelle du film – une seule fois. La molécule encadrée par le cercle possède quand à elle une dynamique beaucoup plus complexe. Elle n'émet pas de manière continue et clignote plusieurs fois avant de photoblanchir et de disparaître donc de l'image. Sur la figure 2.5, on distingue ainsi une interruption de l'émission de la molécule entre les images *i3* et *i6*, la molécule étant invisible sur les images *i4* et *i5* (non présentée), soit pendant une durée d'environ 1,4 sec.

Enfin, le dernier diagnostic nous permettant de nous assurer de l'unicité de l'objet étudié est celui de la polarisation. Globalement, et bien que ces résultats ne soient pas discutés dans ce manuscrit, nous avons pu vérifier, en modifiant la polarisation du laser mais aussi en séparant le signal émis suivant deux directions de polarisation perpendiculaires, que les objets considérés comme des molécules individuelles possédaient à la fois une direction d'excitation et une direction d'émission de fluorescence privilégiées : avec la variation de la polarisation d'excitation, l'intensité détectée pour chaque molécule varie, certaines disparaissent même, tandis que d'autres molécules, non visibles initialement, apparaissent. En détection, la séparation du signal de fluorescence² donne lieu à deux taches représentant chacune le signal de fluorescence émis par l'objet suivant une direction de polarisation donnée ; le signal des molécules individuelles est polarisé et le poids relatif des deux taches détermine l'orientation du dipôle de la molécule.

Pour espérer décrire au mieux le système et/ou comprendre les phénomènes physico-chimiques en jeu, il ne suffit donc pas de s'intéresser à quelques objets particuliers "exceptionnels" ou qui semblent caractéristiques. Si les études de molécules uniques permettent d'accéder ainsi à des paramètres ou hétérogénéités très locales, il s'agit aussi de pouvoir recréer une statistique suffisante, raisonnablement comparable aux études macroscopiques, et

²Pratiquement, une telle séparation est obtenue par la mise en place, avant la caméra CCD, d'une lame – wollaston – constituée de deux prismes d'un matériau biréfringent positionnés de manière à ce que les axes caractéristiques soient perpendiculaires.

donc d'analyser un très grand nombre de molécules. Ainsi obtient-on une image de l'ensemble des sites présents dans l'échantillon, et une idée de leur poids statistique. L'avantage principal de la microscopie grand champ est son parallélisme, c'est-à-dire la possibilité d'étudier quelques centaines de molécules simultanément. Cependant, ce gain n'est acquis que si l'on sait extraire rapidement l'information pertinente de la masse des données brutes obtenues sous forme de films "vidéo". Pour chaque molécule, il s'agit d'obtenir la trace temporelle de son émission et donc d'extraire des images successives des films le nombre de coups détectés sur la CCD. De cette trace, on pourra aussi déduire le nombre de photons total émis par la molécule avant photoblanchiment. Au début de ma thèse, l'extraction de ces données s'est effectuée "à la main", en sélectionnant pour chaque molécule et sur chaque image pour éviter un éventuel recouvrement avec une molécule trop proche par exemple, les pixels représentatifs. Obtenir une statistique d'une centaine de molécules – où de plus la subjectivité de l'observateur (détection "à l'oeil") intervient – s'avérait ainsi un travail d'au moins plusieurs semaines. L'avantage de la détection multicanal sur la CCD en était donc grandement diminué, et c'est pour cela que nous avons développé des outils informatiques permettant l'analyse simultanée de l'ensemble des molécules individuelles présentes au cours d'un film.

2.2.1.2 Un outil indispensable pour l'analyse systématique : logiciel d'exploitation semi-automatique

Je ne vais pas décrire l'ensemble des outils du logiciel de dépouillement, mais il me semble intéressant de discuter de l'un des éléments clés de ce logiciel : l'identification automatique des molécules présentes.

Il n'existe pas d'outils commerciaux pour un tel traitement car les molécules présentent de l'une à l'autre de larges variations d'intensité, non seulement parce qu'elles ont une orientation qui peut être plus au moins favorable à leur excitation par laser ou à la détection de leur fluorescence (polarisation), mais aussi parce que les différentes molécules peuvent avoir des environnements différents et donc ne pas avoir le même rendement quantique de fluorescence. Certaines molécules présentent ainsi une intensité qui n'est que légèrement supérieure au signal de fond de diffusion local. Il n'est donc pas possible d'utiliser un logiciel fondé sur une discrimination d'intensité et capable de détecter par exemple, uniquement les pixels d'une, ou au dessus, d'une intensité donnée. Un simple seuillage est inopérant. Une autre difficulté est que le niveau de "fond", lié en partie à la diffusion laser Rayleigh, varie car la diffusion de l'échantillon n'est pas uniforme. Le signal total détecté pour une molécule dans une zone de faible diffusion a typiquement une intensité plus faible que le fond de diffusion moyen. Pour surmonter ces difficultés, nous allons nous appuyer sur une des propriétés spécifiques de l'imagerie de molécules uniques, et liée à la taille de l'objet imagé : la dimension des molécules d'une fraction à quelques nanomètres étant largement inférieure à la résolution

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

du microscope, l'image attendue est donc la même pour chaque molécule et correspond à la fonction de transfert du microscope. Dans notre cas, l'image des molécules avec l'objectif $\times 40$ à immersion est un disque dont l'aire est typiquement de 4 pixels/(418*418)nm² (qui représentent plus de 60% de l'énergie de la molécule). Même si l'image des molécules peut être distordue par le bruit, nous allons pouvoir utiliser cette propriété dans les deux étapes de l'identification. La première étape est, dans le jargon du traitement d'image, un pré-traitement qui permet de supprimer la difficulté liée au fond inhomogène, la seconde est la phase d'identification des objets proprement dite.

Les molécules sont en général plus intenses que le fond local. Ce sont en premier lieu les variations lentes du fond de diffusion liées aux variations de l'éclairement qui rendent une détection classique par seuillage impossible. Pour supprimer ces variations, la petite taille des molécules est utilisée. La première étape consiste donc à éliminer le fond, ce qui se fait en ne conservant que les objets de petites tailles et en éliminant toute zone de dimension importante sur laquelle l'intensité est constante (faible pour le fond, ou très forte pour éliminer d'éventuels points diffusants). Si l'on construit une image où chaque pixel est remplacé par le pixel de valeur minimale dans un rayon légèrement supérieur à la taille des molécules (typiquement 3 à 4 pixels), on obtient une image sur laquelle les molécules sont "effacées", mais qui représente assez fidèlement le fond. En soustrayant cette image à l'image brute acquise, on retient essentiellement les molécules (et les petits défauts) sur fond noir. Ici, une version légèrement plus sophistiquée s'appuyant sur cette idée, dite filtrage par chapeau haut de forme [56], et qui corrige certains défauts de la méthode précédente— en particulier pour les fonds présentant une forte pente, et par exemple pour l'élimination de la grille utilisée parfois comme repère au cours de ces expériences— est effectivement utilisée. La figure 2.6 présente dans l'environnement logiciel le résultat obtenu après cette étape de soustraction du fond. A gauche (2.6a) se trouve le film brut, sur lequel on peut bien sûr repérer les molécules, mais qui présente aussi un fond non uniforme à l'intérieur de la zone éclairée. L'image 2.6b de droite correspond au film traité. Les molécules apparaissent à présent sur un fond d'intensité nulle.

La seconde phase est l'identification des molécules sur un fond fortement réduit uniforme. On utilise dans un premier temps une méthode par seuillage relativement classique. La sélection des molécules est effectuée en utilisant l'histogramme des intensités des pixels de l'image. Cet histogramme de luminosité des pixels permet de définir un seuil qui rejette la plupart des pixels de fond. Globalement, seules les zones de taille définies et comportant un pixel au moins d'intensité forte seront considérées dans la suite. On choisit une valeur de seuil la plus faible possible pour conserver le maximum de molécules et ne pas éliminer arbitrairement les molécules qui émettent faiblement, ce qui introduirait une distorsion dans les histogrammes d'analyse. On retient alors aussi par cette méthode de "fausses molécules"

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

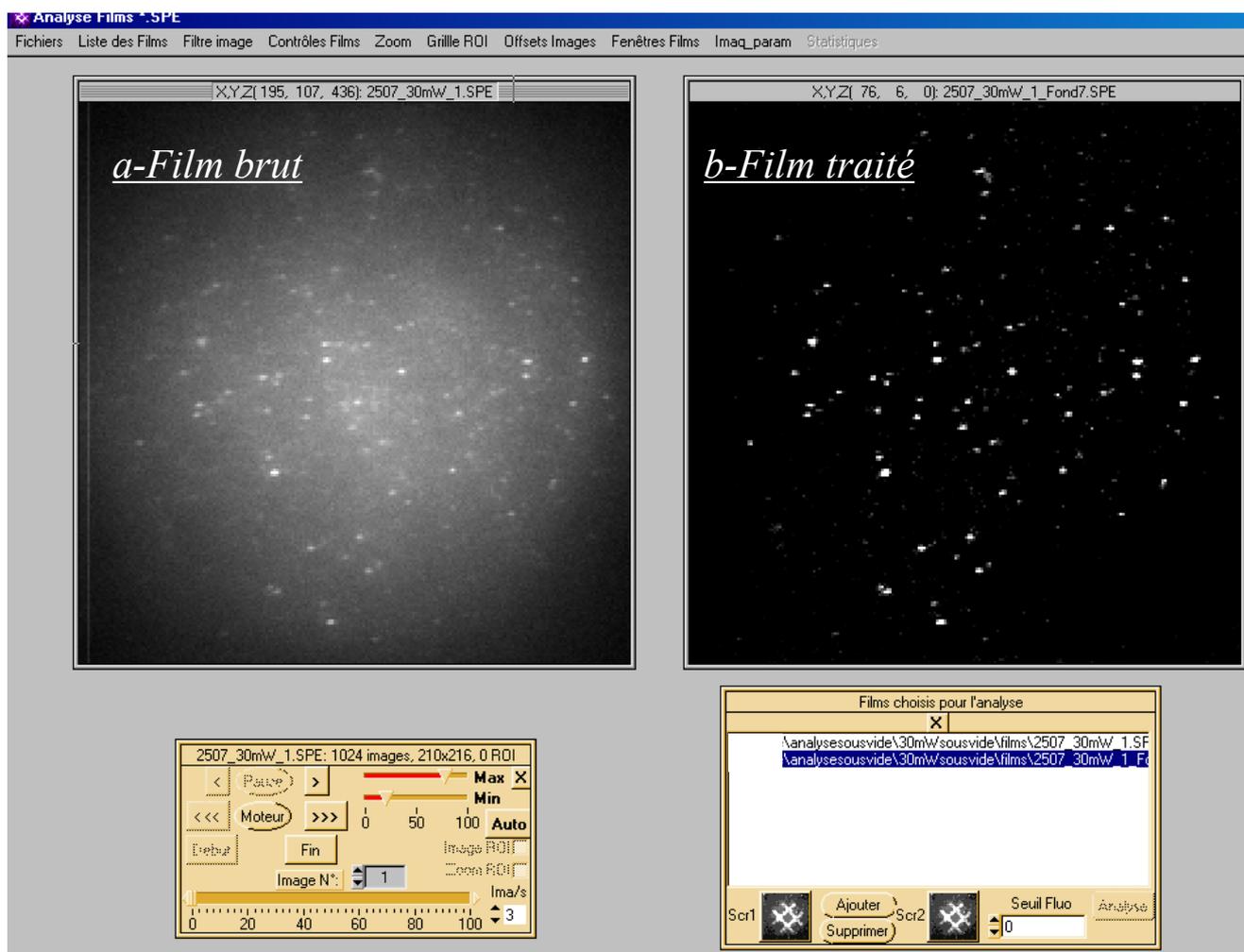


FIG. 2.6 – Extraction des données de fluorescence de molécules uniques des films grand champ- première étape : soustraction du fond.

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

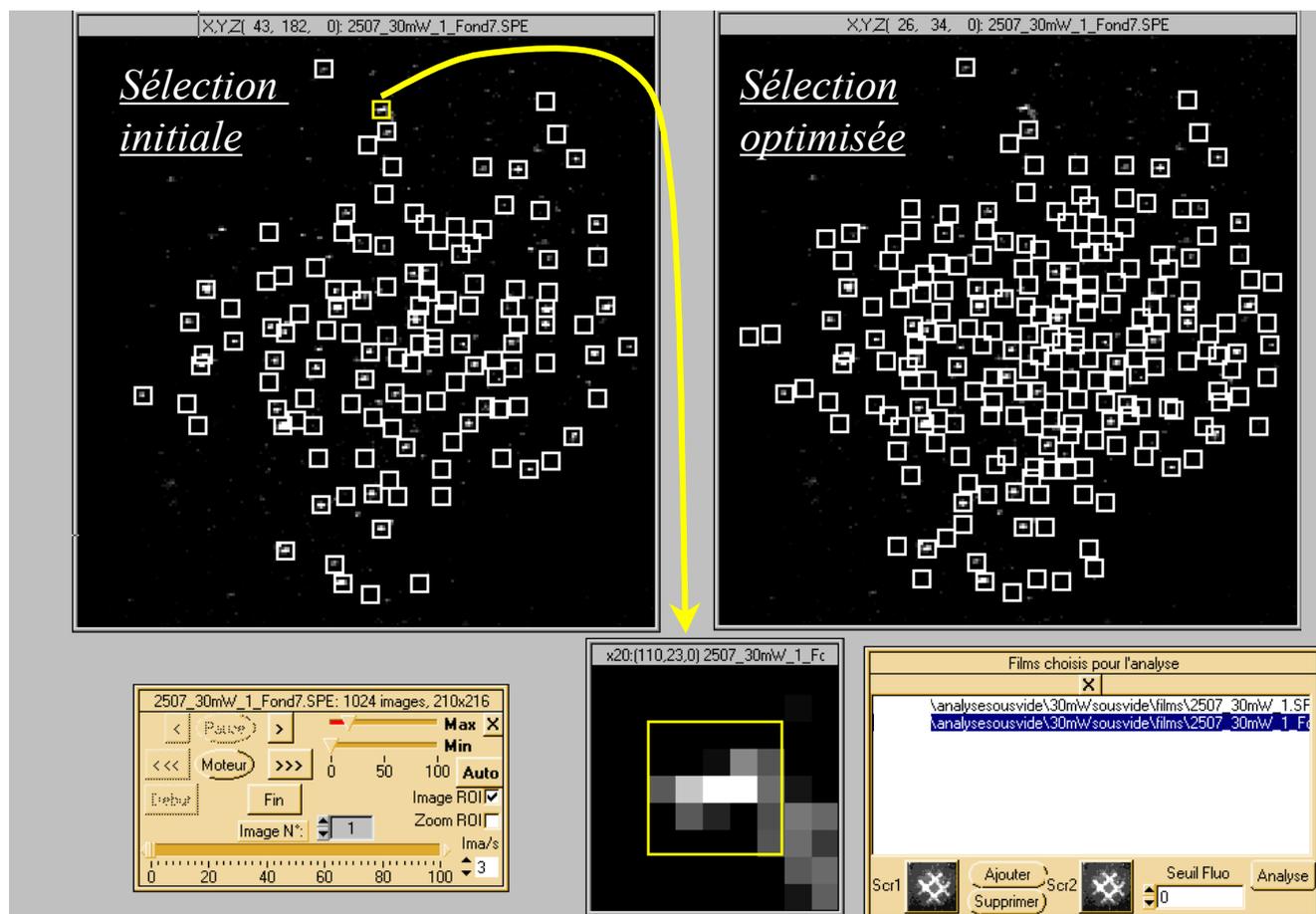


FIG. 2.7 – Extraction des données de fluorescence de molécules uniques des films grand champ- 2ème étape : Sélection des molécules. A gauche ensemble initial, à droite sélection finale par optimisation des paramètres morphologiques et ajout d'objets individuels. Le zoom sur les "objets" permet d'adapter la taille et le centre du ROI sélectionné.

qui sont des pixels de fond isolés ayant une intensité anormale. On utilise alors le fait que pour un seuil relativement bas, une molécule doit présenter un nombre de pixels au-dessus du seuil et connexes, statistiquement plus élevé que pour le fond. On peut aussi utiliser simultanément des critères morphologiques (élongation, périmètre) pour définir les molécules, car les pixels brillants correspondant aux molécules décrivent une figure de morphologie compacte (disques). La supervision des molécules sélectionnées est visuelle, et l'utilisateur définit et modifie les paramètres morphologiques à volonté. La combinaison des critères sur le nombre de pixels voisins et sur la forme qu'ils définissent permet de supprimer la presque totalité des fausses molécules, tout en permettant de détecter l'ensemble des molécules. Finalement, l'utilisateur peut supprimer manuellement les quelques cas qui lui semblent litigieux. A cet ensemble déterminé automatiquement l'utilisateur peut aussi ensuite ajouter des molécules, modifier la taille pour certaines... Pour ces deux dernières phases de sélection, l'utilisation d'un zoom sur la molécule est très utile comme on peut le voir sur la figure 2.7. Sur cette même figure, sont présentés deux ensembles de ROI^3 de molécules pour le même film que celui présenté sur la figure 2.6. De la sélection initiale, on aboutit en procédant à l'optimisation des paramètres, puis à un ajustement manuel individuel, à la sélection "optimisée" (à droite sur la figure 2.7) qui comporte la totalité des molécules exploitables. Une fois les molécules sélectionnées, leur centre de gravité est déterminé automatiquement et l'on intègre l'intensité reçue sur un diamètre typiquement 1,5 fois le diamètre de la tache d'Airy pour mesurer l'intensité émise par la molécule. On obtient alors pour chaque film ou série de films plusieurs fichiers qui contiennent pour chaque molécule la trace temporelle de son émission, le nombre total de coups détectés et son barycentre. Ainsi peut-on analyser relativement rapidement les films.

2.2.2 Etude du photoblanchiment des molécules de pérylène orange dans la matrice solgel mince

De nombreuses études expérimentales et théoriques ont été menées pour étudier le phénomène de photoblanchiment des espèces fluorescentes, mais la photophysique ou la photochimie de ce processus ne sont en général pas connues en détail. Plusieurs mécanismes menant à une perte de fluorescence irréversible sont donc proposés pour expliquer le phénomène de photoblanchiment.

La première hypothèse est que la molécule subit une photodégradation : l'absorption d'un photon est suivie d'une réaction modifiant la structure chimique intrinsèque de la molécule d'intérêt, la bande d'absorption est alors modifiée, et l'émission de fluorescence s'arrête. Il peut s'agir par exemple de réactions d'ionisation, de complexation ou de polymérisation au

³ ROI : Region Of Interest, ensemble des pixels considérés comme image de l'objet d'intérêt, ici la molécule.

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

sens large mais aussi d'oxydation. La présence d'oxygène à proximité des molécules est un facteur connu d'augmentation de l'efficacité du photoblanchiment. Effectivement, la molécule peut subir des collisions avec O_2 et, si elle se trouve dans son état triplet qui est métastable, une réaction de photo-oxydation peut s'ensuivre.

Si le taux d'occupation des niveaux excités S_1 ou T_1 est important (fort taux d'excitation), alors la probabilité d'absorption d'un second photon qui porte la molécule sur des niveaux excités supérieurs devient non négligeable. Ces niveaux ayant une énergie importante, la molécule peut alors s'ioniser par perte d'électron ($M \rightarrow M^+ + e^-$), processus qui sera favorisé dans les milieux polaires.

Tous les colorants ne sont pas égaux devant ces processus de photoblanchiment, et ils sont plus ou moins sensibles aux différentes voies. Afin de pouvoir choisir un bon colorant⁴ pour une application donnée, il est donc important de choisir des molécules présentant une bonne photostabilité dans les conditions dans lesquelles on envisage de l'utiliser. Il s'agit alors de connaître plus précisément les voies privilégiées, ou majoritaires, de photoblanchiment de chaque espèce dans un milieu donné. Nous nous sommes donc intéressés au cas du pérylène orange inséré dans des films sol-gel MTEOS. Pour étudier le photoblanchiment de cette molécule, et partant des différentes voies de photoblanchiment possibles, nous avons suivi la fluorescence de molécules uniques dans différentes conditions expérimentales, en faisant varier les conditions atmosphériques— études sous air et sous vide— et la puissance d'excitation du laser. Ce sont ainsi des données extraites des films de fluorescence grand champ en utilisant le programme décrit précédemment que je me propose de présenter et discuter ici.

2.2.2.1 Histogrammes

Le phénomène de photoblanchiment correspond à l'arrêt définitif, à l'échelle de l'expérience, de l'émission de la molécule. De l'exploitation des films grand champ, on peut donc extraire, pour chacune des molécules situées dans la zone d'irradiation, deux données pertinentes de leur photoblanchiment : le nombre total de photons N_T émis par la molécule et la durée globale sur laquelle la molécule a émis ces photons, c'est à dire ce qui est communément nommé dans la littérature le temps de survie t_{survie} .

La première possibilité pour exploiter les données obtenues est de s'intéresser à la répartition des caractéristiques des différentes molécules. Sur les figures 2.8 et 2.9 sont présentées sous forme d'histogrammes la répartition respective de ces deux données pour un échantillon de 110 à 170 molécules suivant les expériences, sous air et sous vide, pour différentes puissances d'excitation, croissantes de haut en bas. Sous air, les différentes puissances corres-

⁴Typiquement un "bon" colorant peut, à température ambiante émettre 10^6 photons avant photoblanchiment, ce nombre augmentant à basse température en raison du "gel" de la diffusion des espèces responsables de ce processus.

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

pendant aux lettrines sont de $75W/cm^2$ (**A**), $200W/cm^2$ (**B**), $750W/cm^2$ (**C**), $2015W/cm^2$ (**D**) et $6540W/cm^2$ (**E**). De même sous vide, $75W/cm^2$ (**A**), $375W/cm^2$ (**B**), $755W/cm^2$ (**C**) et $1410W/cm^2$ (**D**). Le nombre total de photons présenté a été obtenu à partir du nombre total de coups détectés sur la caméra, et en considérant une efficacité totale de détection du microscope de 10%, qui tient compte de l'efficacité de collection et de transmission de l'objectif, des différents éléments optiques situés sur le trajet du signal, de l'efficacité de la caméra et d'un facteur d'efficacité d'extraction des coups liée à l'utilisation du traitement logiciel (fond et *ROI* considéré).

Qualitativement, l'observation des histogrammes de photoblanchiment des molécules de pérylène orange nous apporte déjà des informations sur l'environnement dans lequel elles sont insérées, le film solgel mince.

Au cours des expériences, nous avons noté que les comportements sous air et sous vide semblaient être différents : à puissance d'excitation équivalente la durée totale de l'expérience, c'est à dire la durée totale d'irradiation nécessaire pour photoblanchir la quasi-totalité des émetteurs, était moins importante sous air. Cette observation expérimentale est confirmée par l'analyse des films. Il apparait très clairement sur les histogrammes présentés que la répartition des temps de survie, ainsi que la répartition des nombres totaux de photons émis, sont différents suivant que l'enceinte dans laquelle se situe l'échantillon est pompée ou non. Les molécules de pérylène orange dans la matrice solgel du film, sont donc sensibles aux modifications de l'environnement de l'enceinte. Cela signifie donc que le film est poreux, la matrice est perméable aux gaz et vapeurs contenus dans l'air.

La seconde information qualitative que l'on peut déduire des histogrammes est qu'il existe une certaine hétérogénéité dans la matrice. Effectivement, dans un milieu homogène, les distributions des paramètres de photoblanchiment t_{survie} et N_T , peuvent être ajustées par une courbe monoexponentielle décroissante : les molécules étant situées dans un environnement homogène, elles suivent une loi de survie classique [57]. Cela peut être traduit, en terme d'évolution du nombre de molécules non photoblanchies au cours du temps, par la relation :

$$N_{mol}(t) = N_0 \exp(-k_B t) \quad , \quad (2.3)$$

avec k_B le taux de photoblanchiment et N_0 le nombre de molécules fluorescentes présentes au départ. En considérant le cycle de fluorescence (par exemple dans le système à trois niveaux électroniques présenté sur la figure 1.4), le nombre de molécules qui ont émis un nombre total de photons N_T est obtenu en introduisant dans l'expression 2.3 le rendement de fluorescence (eq.1.8) et la probabilité de peuplement de l'état d'émission de fluorescence S_1 , comme je le détaillerai dans la seconde partie de cette étude du photoblanchiment.

Dans notre cas, on observe qualitativement que les molécules de long temps de survie, et celles qui émettent un nombre important de photons, sont en plus faible nombre. Cependant, il n'est pas possible de parvenir à un ajustement satisfaisant des histogrammes en

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

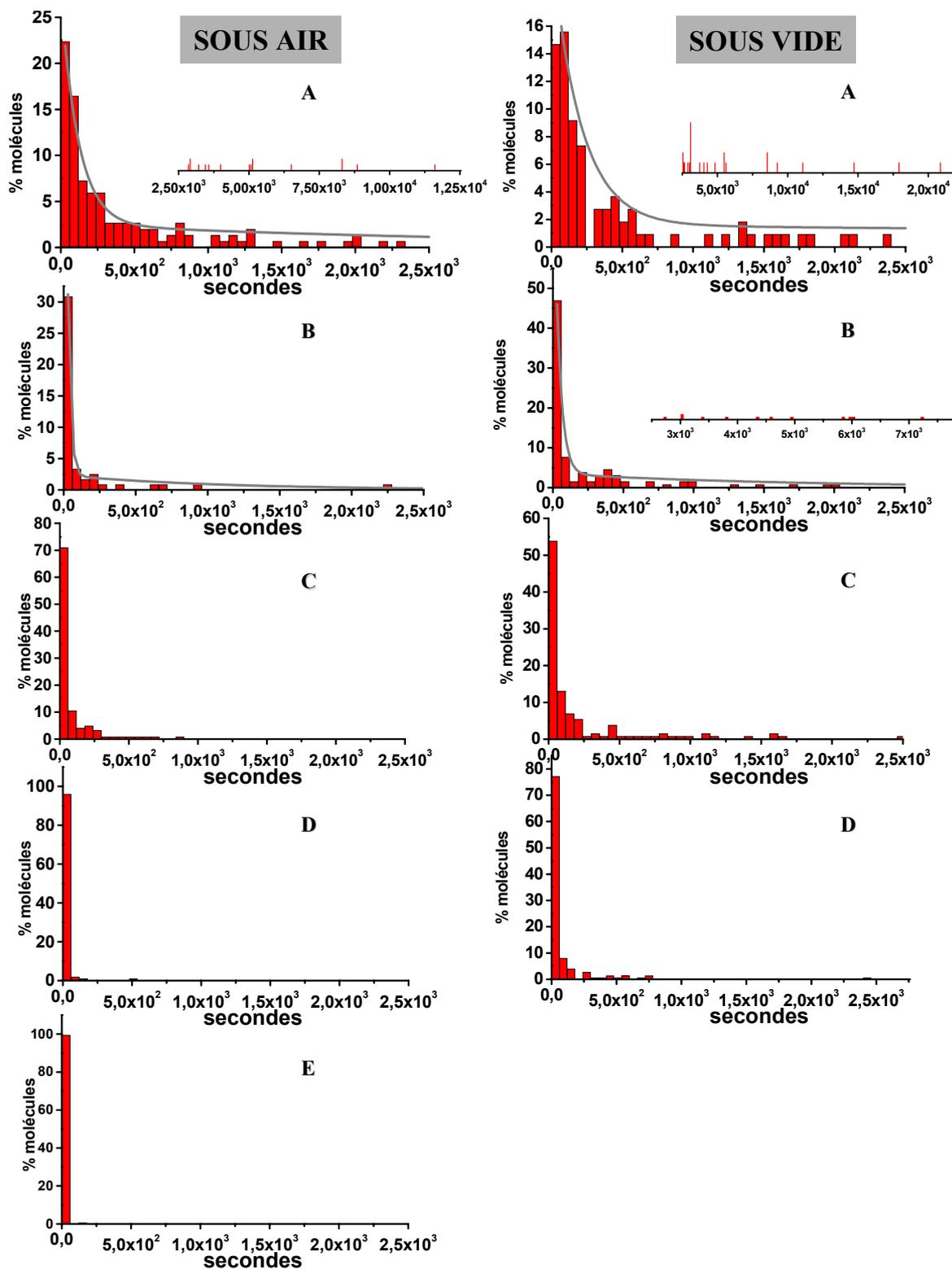


FIG. 2.8 – Histogrammes des temps de survie et ajustement double exponentielle (en gris) des molécules de pérylène orange insérées dans un film sol-gel mince en fonction de l'atmosphère de travail et de l'intensité d'excitation utilisée, respectivement : sous air, $75\text{W}/\text{cm}^2$ (A), $200\text{W}/\text{cm}^2$ (B), $750\text{W}/\text{cm}^2$ (C), $2015\text{W}/\text{cm}^2$ (D) et $6540\text{W}/\text{cm}^2$ (E), et sous vide $75\text{W}/\text{cm}^2$ (A), $375\text{W}/\text{cm}^2$ (B), $755\text{W}/\text{cm}^2$ (C) et $1410\text{W}/\text{cm}^2$ (D).

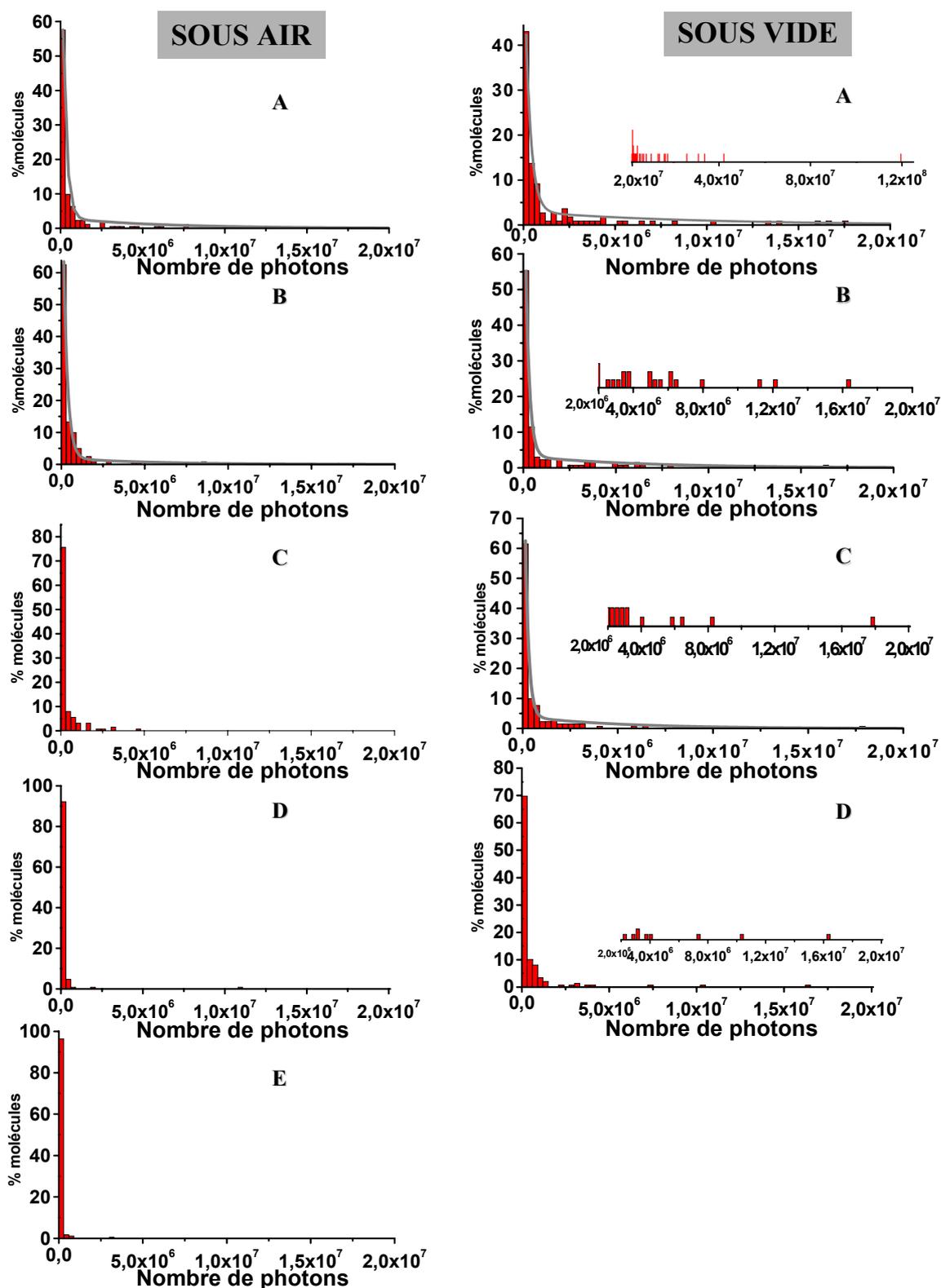


FIG. 2.9 – Histogrammes du nombre total de photons émis avant photoblanchiment des molécules de pérylène orange dans un film solgel mince. Les puissances correspondant aux différents histogrammes sont les même que celles de la figure 2.8. En gris, ajustement par une double exponentielle.

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

utilisant une courbe monoexponentielle. Dans la littérature, on peut trouver des exemples d'ajustements effectués, pour décrire les statistiques de molécules individuelles dans un environnement hétérogène, en ajoutant un second terme exponentiel [58]. En utilisant une telle simulation dans nos études, on peut obtenir— par exemple pour les histogrammes de temps de survie (fig.2.8) et du nombre de photons (fig.2.9) sous vide à intensité d'excitation de $75W/cm^2$ (**A**) et $375W/cm^2$ (**B**)— un ajustement correct de la distribution des paramètres. Un tel ajustement met donc en évidence l'existence d'au moins deux populations de molécules bien distinctes vis à vis du processus de photoblanchiment, et donc la présence d'au moins deux types d'environnements différents dans les films solgel.

L'hétérogénéité est aussi confirmée plus simplement par la présence sur les histogrammes de temps de vie d'émetteurs exceptionnellement stables, et sur les histogrammes du nombre de photons, par des molécules qui émettent jusqu'à plusieurs dizaines de millions de photons. Il faut cependant noter que les molécules qui émettent un nombre important de photons ne sont pas uniquement celles de grand temps de survie et *vice versa*. Certaines molécules émettent effectivement de manière très intense et photoblanchissent rapidement, tandis que d'autres, très stables, ont une émission faible mais qui peut être continue pendant plusieurs milliers de secondes. Il existe donc une forte dispersion du flux de photons émis pour les différentes molécules dans le film solgel à intensité d'excitation et conditions expérimentales données. Dans tous les cas, on peut remarquer que les individus exceptionnels mis en évidence sur les histogrammes— les molécules très stables et les forts émetteurs— constituent deux "populations" relativement "protégées" des mécanismes de photoblanchiment par rapport aux autres molécules.

A partir des histogrammes des figures 2.8 et 2.9, on peut s'intéresser plus précisément aux comportements des molécules et rechercher des informations sur les mécanismes de photoblanchiment du pérylène orange.

Discussion

Effet de l'environnement D'une part, si on ne considère que l'effet de l'atmosphère d'étude et que l'on compare les comportements sous air et sous vide à même puissance d'excitation, on remarque que le temps de survie des molécules est plus important sous vide que sous air. Il existe donc une voie de photoblanchiment qui fait intervenir une espèce présente sous air, sans doute O_2 , qui augmente la probabilité de photoblanchiment des molécules. De plus, les molécules émettent aussi globalement plus de photons sous vide.

Le mécanisme de quenching de l'état triplet par le dioxygène diminue la durée de vie de cet état et augmente le taux de *cyclage* de la molécule donc le taux d'émission de fluorescence, ainsi que l'a observé par exemple *Hübner* [59] pour des molécules de DiI_{18} insérées dans un film de PMMA. Si ce processus existe aussi pour le pérylène orange— cependant et sans doute en raison de la dispersion du flux de photons souligné plus haut, nous n'avons pas noté, à

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

intensité d'excitation équivalente, d'augmentation notable de l'intensité d'émission sous air par rapport au vide— son efficacité n'est pas suffisante pour compenser la forte diminution du temps de survie des molécules sous air.

Si on s'intéresse plus précisément aux histogrammes obtenus à $75W/cm^2$, on note que plus de 22% des molécules photoblanchissent après moins de 30 secondes sous air, soit une fois et demi la proportion observée sous vide.

On note aussi que la répartition en t_{survie} des molécules est très dispersée. Sur les figures 2.8 et 2.9 sont reportés en encart les individus extrêmes, exceptionnels par l'efficacité de leur émission et/ou leur longévité. Sous air et sous vide, on trouve ainsi respectivement des émetteurs exceptionnels qui émettent pendant plusieurs dizaines de milliers de secondes alors que la plus grande partie des molécules survit moins de quelques centaines de secondes.

Effet de la puissance Que ce soit sous air ou sous vide, l'effet de l'augmentation de puissance conduit à diminuer le temps de survie et le nombre total de photons émis par l'ensemble de l'échantillon de molécules irradiées qui photoblanchissent au cours de l'étude. La répartition se resserre vers les faibles valeurs, la proportion d'émetteurs plus "faibles", dont la durée de vie est courte augmente. Ainsi par exemple sous vide, la population des molécules de plus courte durée de vie passe de 15% à $75W/cm^2$ (A) à près de 47% à $375W/cm^2$ (B), avec dans le même temps une augmentation de 43% à 55% de la population des plus faibles émetteurs ($N_T \leq 150000$).

La remarque la plus importante concerne les évolutions respectives sous air et sous vide : on note en effet que l'augmentation de puissance induit un effet plus important sous air. La distribution en nombre de photons émis se resserre plus rapidement sous air. Sur les statistiques concernant le nombre total de photons émis (figure 2.9), on retrouve la quasi-totalité des molécules (plus de 99%) dans le premier "pic" de l'histogramme pour l'intensité maximale appliquée de $6540W/cm^2$ (E). Cette remarque est encore plus frappante sur les histogrammes de temps de survie ; sous air alors qu'à faible puissance la survie des molécules s'étendait sur une échelle de temps équivalente à celle sous vide, à plus forte puissance ces échelles ne sont plus comparables : dès $200W/cm^2$ la répartition sous air est plus resserrée que sous vide, les individus les plus stables se caractérisant respectivement par des temps de survie de 2200s (figure 2.8air B) et 7200s (fig. 2.8airB).

Le phénomène de photoblanchiment présente donc différentes efficacités sous vide et sous air. De plus, la différence de comportement observé en fonction de la puissance tend à prouver que l'efficacité particulière sous air n'est pas uniquement liée à l'augmentation d'un mécanisme intervenant depuis les premiers niveaux excités S_1 et T_1 de la molécule, car dans ce cas les évolutions en fonction de la puissance dans les deux environnements devraient être parallèles. Il existe vraisemblablement pour le pérylène orange dans nos échantillons, un processus multi-photonique de photoblanchiment, c'est à dire un mécanisme qui fait

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

intervenir des niveaux excités supérieurs et qui demande l'absorption d'un second photon.

2.2.2.2 Analyse semi-quantitative des mécanismes de photoblanchiment

Les voies de photoblanchiment ouvertes sous air et sous vide sont donc différemment efficaces. Nous nous sommes en particulier intéressés à distinguer si cette différence correspond à une voie de photoblanchiment particulière— depuis les premiers états excités ou depuis des niveaux supérieurs— et dans quelle mesure les variations de puissance modifient le rapport entre les différentes voies.

La notion de probabilité de photoblanchiment pour une molécule n'est pas pertinente : la molécule est effectivement soit photoactive soit photoblanchie. Un moyen d'accéder à la probabilité de photoblanchiment est de moyenniser les résultats obtenus pour un grand nombre de molécules, et si le milieu était homogène, cette statistique serait équivalente au résultat obtenu si l'on pouvait réaliser l'expérience de photoblanchiment un grand nombre de fois sur la même molécule.

Pour discuter du photoblanchiment, il n'est plus possible de considérer un système à trois niveaux électroniques tel que celui présenté dans le premier chapitre. La prise en compte des processus de photoblanchiment "à deux photons", c'est à dire ceux que la molécule peut subir à partir des états excités supérieurs, impose de prendre en compte au moins un système à 5 niveaux, présenté sur la figure 2.10. Les notations utilisées sont celles qui ont été introduites à la section 1.1.2 du premier chapitre, en même temps que les mécanismes qu'elles représentent. En supplément, on considère les états excités supérieurs \mathbf{S}_n et \mathbf{T}_n , avec respectivement k_{S1n} et k_{T1n} , les taux d'excitation à partir des niveaux \mathbf{S}_1 et \mathbf{T}_1 vers les niveaux \mathbf{S}_n et \mathbf{T}_n , et k_{Sn1} et k_{Tn1} les taux de retour associés. Enfin, les taux de photoblanchiment à partir de chaque état \mathbf{X} sont notés k_{bX} .

En négligeant le croisement intersystème à partir de l'état \mathbf{S}_n , on peut écrire les équations de populations en utilisant les notations de la figure 2.10. La probabilité $X(t)$, que je noterai X , des molécules de se trouver dans l'état \mathbf{X} s'écrit :

$$\begin{aligned}
 \frac{dS_0}{dt} &= -k_{ex}S_0 + (k_r + k_{ci})S_1 + k_T T_1 \\
 \frac{dS_1}{dt} &= k_{ex}S_0 + k_{S1n}S_n - (k_r + k_{ci} + k_{isc} + k_{S1n})S_1 - k_{bS}S_1 \\
 \frac{dT_1}{dt} &= k_{isc}S_1 + k_{T1n}T_n - (k_T + k_{T1n})T_1 - k_{bT}T_1 \\
 \frac{dS_n}{dt} &= k_{S1n}S_1 - k_{S1n}S_n - k_{bSn}S_n \\
 \frac{dT_n}{dt} &= k_{T1n}T_1 - k_{T1n}T_n - k_{bTn}T_n
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

Le pérylène orange présente une bonne photostabilité. En première approximation, on suppose que le photoblanchiment est peu efficace et ne participe que très faiblement à dépeupler

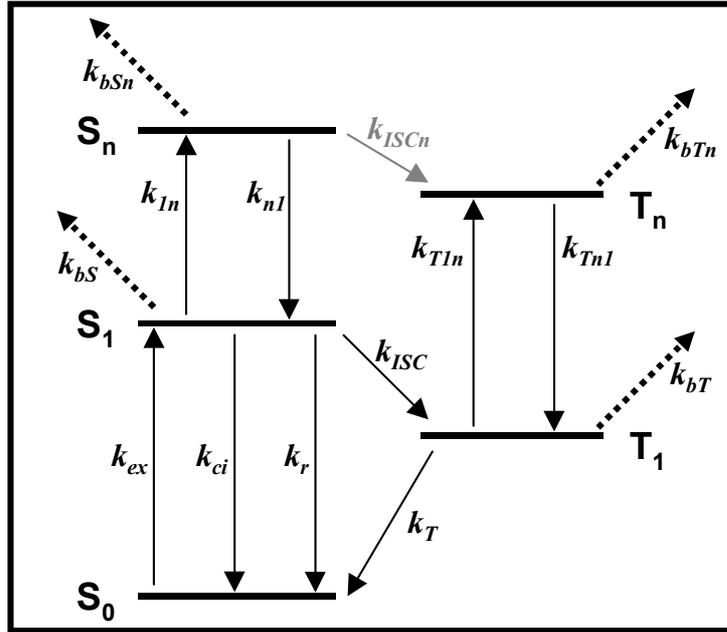


FIG. 2.10 – Schéma à 5 niveaux électroniques permettant de distinguer les différentes voies de photoblanchiment.

les différents états S_1 , T_1 , S_n et T_n . Dans le cas de ces derniers niveaux, l'ordre de grandeur de la durée de vie $\tau_{X_n} \simeq \frac{1}{k_{X_n}}$ est très courte, de l'ordre de quelques centaines de femtosecondes à quelques picosecondes. Les taux de photoblanchiment sont donc supposés négligeables devant les taux de passages inter-états. Les solutions stationnaires du système supposé fermé dans un premier temps et donc tel que

$$S_0 + S_1 + T_1 + S_n + T_n = 1 \quad (2.5)$$

sont de la forme :

$$S_0^{eq} = \frac{k_{Tn1}k_{Sn1}k_Tk_f}{k_{Tn1}\{k_T[k_{Sn1}(k_f + k_{ex}) + k_{ex}k_{S1n}]\} + (k_{Tn1} + k_{T1n})(k_{isc}k_{Sn1}k_{ex})} \quad (2.6)$$

$$S_1^{eq} = \frac{k_{ex}}{k_f} S_0^{eq}, \quad T_1^{eq} = \frac{k_{isc}}{k_T} S_1^{eq}, \quad S_n^{eq} = \frac{k_{S1n}}{k_{Sn1}} S_1^{eq}, \quad T_n^{eq} = \frac{k_{T1n}}{k_{Tn1}} T_1^{eq},$$

où

$$k_f = k_r + k_{ci} + k_{isc} \quad .$$

Aux faibles intensités d'excitation utilisées dans nos expériences, le pompage vers les états excités supérieurs S_n et T_n est peu important. On peut donc négliger les termes correspondant, $k_{Tn1}k_{isc}k_{Sn1}k_{ex}$ et $k_{Tn1}k_Tk_{ex}k_{S1n}$, devant les autres termes contenus dans le dénominateur de l'expression de S_0^{eq} . On retrouve alors pour S_1^{eq} l'expression qui serait obtenue

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

dans le cadre d'un système à trois niveaux

$$S_1^{eq} = \frac{k_{ex}k_T}{k_f k_T + k_{ex}(k_T + k_{isc})} \quad (2.7)$$

Contrairement aux expressions présentées dans les sections 1.1.2 et 1.2 du premier chapitre, dans l'expression 2.7, la saturation est prise en compte par les facteurs de desexcitation vers d'autres niveaux, et k_{ex} s'écrit simplement :

$$k_{ex} = \sigma_{a.el}^0 \frac{I_{ex}}{h\nu} \quad (2.8)$$

L'expression 2.7 de S_1^{eq} devient alors :

$$S_1^{eq} = \frac{\sigma_{a.el}^0 \frac{I_e}{h\nu} k_T}{k_f k_T + \sigma_{a.el}^0 \frac{I_e}{h\nu} (k_T + k_{isc})} \quad (2.9)$$

Soit, en introduisant l'intensité de saturation I_S (voir note p38) :

$$S_1^{eq} = \frac{I/I_S}{1 + I/I_S} \left(\frac{k_T}{k_T + k_{isc}} \right) \quad \text{où } I_S = \frac{k_f k_T}{\sigma_{a.el}^0 \frac{1}{h\nu} (k_T + k_{isc})} \quad (2.10)$$

Concernant le photoblanchiment, le taux effectif global k_B^{global} , qui prend en compte toutes les voies de photoblanchiment offertes dans le système à 5 niveaux de la figure 2.10 s'écrit :

$$k_B^{global} = k_{bS} S_1^{eq} + k_{bT} T_1^{eq} + k_{bS_n} S_n^{eq} + k_{bT_n} T_n^{eq} \quad (2.11)$$

Soit, en utilisant les expressions de T_1^{eq} , S_n^{eq} et T_n^{eq} données par les formules 2.6 :

$$k_B^{global} = k_{bS} S_1^{eq} + k_{bT} \frac{k_{isc}}{k_T} S_1^{eq} + k_{bS_n} \frac{k_{S1n}}{k_{S_n1}} S_1^{eq} + k_{bT_n} \frac{k_{T1n} k_{isc}}{k_{T_n1} k_T} S_1^{eq} \quad (2.12)$$

On peut alors séparer les processus "à un photon" – regroupés sous la constante $k_B^{1h\nu}$ – qui ont lieu depuis les états \mathbf{S}_1 et \mathbf{T}_1 , de ceux "à deux photons" – regroupés sous la constante $k_B^{2h\nu}$ – qui ont lieu depuis les états \mathbf{S}_n et \mathbf{T}_n et nécessitent donc l'absorption d'un second photon laser pour être déclenchés. Tout comme k_{ex} , les taux de passages k_{S1n} et k_{T1n} sont fonctions de la section efficace d'absorption de la transition et de l'intensité d'excitation I , suivant $k_{ij} = \sigma_{ij}^0 \frac{I}{h\nu}$. Le taux global de photoblanchiment devient donc :

$$k_B^{global} = k_B^{1h\nu} S_1^{eq} + k_B^{2h\nu} I S_1^{eq} \quad (2.13)$$

avec $k_B^{1h\nu} = k_{bS} + k_{bT} \frac{k_{isc}}{k_T}$ et $k_B^{2h\nu} = \frac{k_{bS_n} \sigma_{S1n}^0}{k_{S_n1} h\nu} + \frac{k_{bT_n} k_{isc} \sigma_{T1n}^0}{k_{T_n1} k_T h\nu}$

Le nombre total moyen de photons émis par molécule avant de photoblanchir s'écrit :

$$\overline{N}_T = \int_0^{t_{survie} \rightarrow \infty} k_r S_1^{eq} \exp(-k_B^{global} t) dt$$

soit $\overline{N}_T = k_r \frac{1}{k_B^{1h\nu} + k_B^{2h\nu} I} \quad (2.14)$

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

En traçant la courbe du nombre total moyen de photons émis par l'ensemble des molécules dans des conditions données (air ou vide), en fonction de l'intensité d'excitation, on peut accéder aux valeurs des taux de photoblanchiment à un et deux photons, $k_B^{1h\nu}$ et $k_B^{2h\nu}$.

D'autre part, il existe une relation simple entre le temps de survie moyen par molécule obtenu expérimentalement et le taux effectif global de photoblanchiment : $k_B^{global} = \frac{1}{\bar{t}_{survie}}$. En utilisant la formule de k_B^{global} donnée à l'équation 2.13, et en remplaçant S_1^{eq} par l'expression 2.10, on obtient une expression permettant d'appréhender l'évolution de \bar{t}_{survie} en fonction de l'intensité d'excitation :

$$(\bar{t}_{survie})^{-1} = \left(\frac{I/I_S}{1 + I/I_S} \right) \left(\frac{k_T k_B^{1h\nu}}{(k_T + k_{isc})} \right) \left(1 + \frac{k_B^{2h\nu}}{k_B^{1h\nu}} I \right) . \quad (2.15)$$

La figure 2.11 présente les courbes expérimentales obtenues pour le nombre total moyen de photons émis par molécule avant photoblanchiment \bar{N}_T , et l'inverse du temps de survie moyen $(\bar{t}_{survie})^{-1}$ en fonction de l'intensité d'excitation, sous air et sous vide. Sur cette figure apparaissent aussi les courbes d'ajustement obtenues en utilisant respectivement les équations 2.14 et 2.15. Pour ajuster la courbe $(\bar{t}_{survie})^{-1} = f(I)$, on fixe le rapport $\frac{k_B^{2h\nu}}{k_B^{1h\nu}}$ à sa valeur déduite de l'ajustement de $\bar{N}_T = f(I)$.

Le tableau 2.16 regroupe les valeurs obtenues en considérant une durée de vie radiative du niveau \mathbf{S}_1 , $\tau_r = \frac{1}{k_r}$ de $3ns$, qui est un ordre de grandeur typique pour les colorants usuels.

	sous vide	sous air
$k_B^{1h\nu} (s^{-1})$	558	3210
$k_B^{2h\nu} (s^{-1} \cdot W^{-1} \cdot cm^2)$	2,4	6,6
$I_S (W/cm^2)$	$3,8 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$
$\frac{k_T}{k_T + k_{isc}}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$0,9 \cdot 10^{-5}$

(2.16)

Plusieurs remarques peuvent être déduites de ces valeurs.

Tout d'abord, il apparaît que le photoblanchiment du pérylène orange inséré dans les films solgel est la conséquence non pas d'un unique processus mais bien de l'effet conjugué des deux processus à un photon et à deux photons, quelle que soit l'intensité d'excitation utilisée. Les mécanismes de photoblanchiment à partir des états supérieurs excités entrent donc en jeu même à faible puissance d'excitation, ce qui est plutôt inattendu. On ne peut donc pas *a priori* les négliger à faible puissance, contrairement à la proposition par exemple d'Eggeling *et al.* dans un article portant sur le photoblanchiment de la rhodamine 6G en solution aqueuse [60]. L'implication d'un processus de photoblanchiment à deux photons y compris à faible puissance d'excitation est par contre en accord avec les conclusions de Deschesnes *et al.* pour la Rhodamine 6G, cette fois en matrice polymère [61]. Le processus biphotonique n'explique cependant pas la pente 2 que trouvent ces auteurs pour la dépendance logarithmique à fort

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

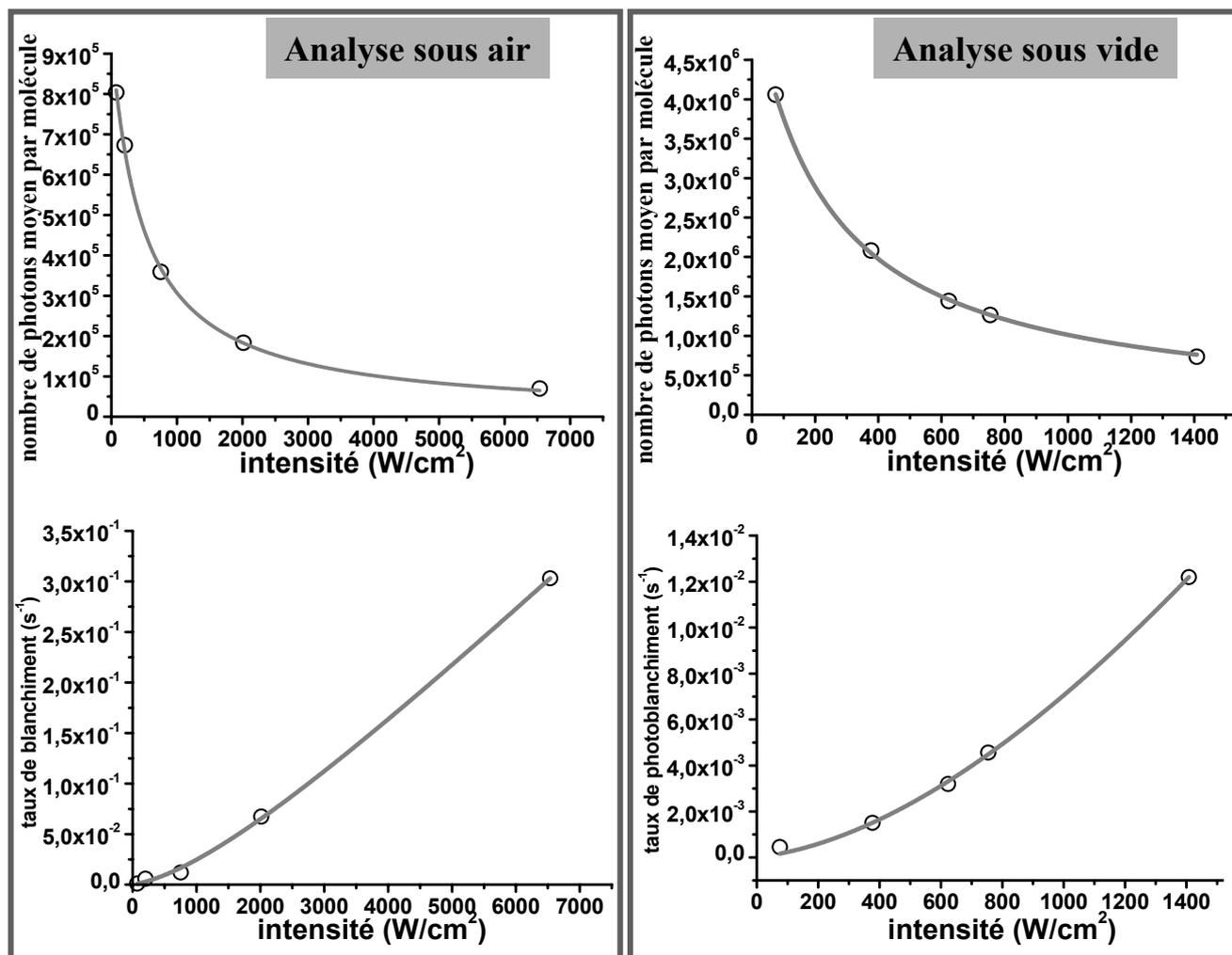


FIG. 2.11 – Etude du photoblanchiment du pérylène orange sous air et sous vide : courbes du nombre total moyen de photons émis par molécule \overline{N}_T et de l'inverse du temps moyen de survie \overline{t}_{survie} en fonction de l'intensité d'excitation. Les cercles sont les points expérimentaux ; en gris les ajustements correspondant aux fonctions $\overline{N}(I) = (a + bI)^{-1}$ et $(\overline{t}(I))^{-1} = c(\frac{I/I_S}{1+I/I_S})(1 + d \times I)$. Pour les correspondances avec les paramètres pertinents $k_B^{1h\nu}$ et $k_B^{2h\nu}$.

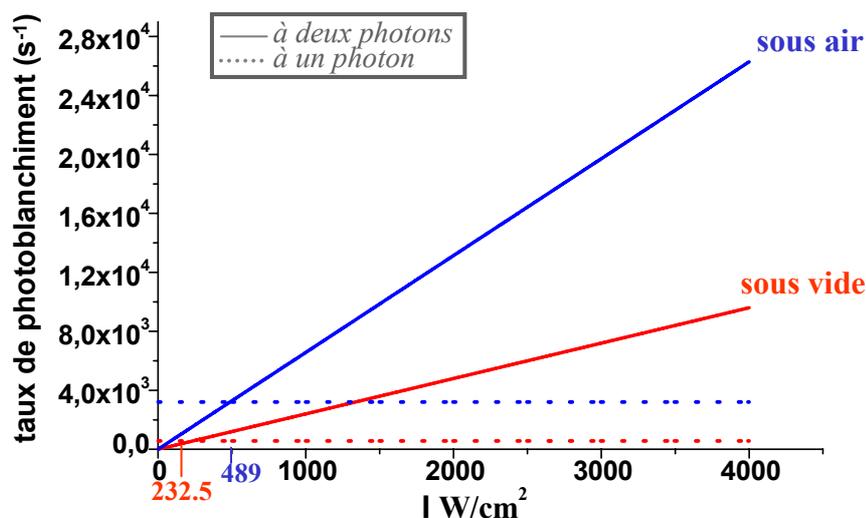


FIG. 2.12 – Taux de photoblanchiment à un et deux photons sous air et sous vide, évolution avec l'intensité d'excitation. En traits pleins les taux à deux photons, tels que $(k_B^{2h\nu})_{eff} = k_B^{2h\nu} I$. En pointillés les constantes à un photon $k_B^{1h\nu}$ obtenu par les ajustements discutés.

taux d'excitation de la courbe du nombre total moyen de photons émis $N_t = f(I)$; une telle valeur correspondant en effet plutôt à des processus faisant intervenir au total l'absorption de 3 photons pour atteindre les niveaux impliqués dans le photoblanchiment, ce qui semble peu probable aux intensités d'excitation utilisées.

Dans notre cas, on remarque de plus que les mécanismes à deux photons deviennent très rapidement majoritaires, à partir d'intensités d'excitation largement inférieures à l'intensité de saturation, et respectivement à partir de $230\text{W}/\text{cm}^2$ sous vide et $490\text{W}/\text{cm}^2$ sous air, comme cela apparaît sur la figure 2.12 sur laquelle sont tracées pour le photoblanchiment à l'air et sous vide, les évolutions calculées de la constante effective de photoblanchiment à deux photons renormalisée par l'intensité d'excitation $(k_B^{2h\nu})_{eff} = k_B^{2h\nu} I$ et la droite $k_B^{1h\nu} = cte$. Cela signifie donc que l'absorption biphotonique est particulièrement efficace dans le cas du pérylène orange. Cette conclusion n'est toutefois pas complètement surprenante. En effet, pour deux colorants de la famille des pérylénimides, le DBPI et le DXP, très similaires au pérylène orange puisque ne s'en distinguant que par les groupements situés sur les phenyls terminaux⁵, Bird et son équipe ont montré que l'énergie de la transition $\mathbf{T}_1 \rightarrow \mathbf{T}_n$ correspond presque exactement à celle de la transition $\mathbf{S}_0 \rightarrow \mathbf{S}_1$. L'absorption d'un photon depuis \mathbf{T}_1 peut donc être importante [62]. Pour le pérylène orange, on peut donc proposer que la deuxième étape de l'absorption biphotonique efficace corresponde à cette même transition

⁵DBPI : (2,5-di-*tert*-butylphenyl)imide, DXP : (2,6-dimethylphenyl)imide, alors que le pérylène orange correspond au dérivé (2,6-di-isopropylphenyl)imide.

2.2. Exploitation de l'imagerie grand champ de fluorescence : Méthode et étude du phénomène de photoblanchiment

$\mathbf{T}_1 \rightarrow \mathbf{T}_n$ et que l'efficacité du processus de photoblanchiment à deux photons corresponde à celle d'une photoionisation à partir de l'état excité \mathbf{T}_n .

Il est intéressant de souligner aussi que les deux processus de photoblanchiment sont proportionnellement plus efficaces à l'air. Si une telle remarque semble évidente pour le processus à un photon dont un des mécanismes proposés est celui d'une photooxydation par interaction avec l'oxygène singulet, cette conclusion est plus originale dans le cas du processus à deux photons. On peut en déduire que ce processus est également assisté par une espèce présente à l'air. On peut par exemple penser à l'eau, comme accepteur d'électrons au cours d'une photoionisation à partir de la molécule dans ses états \mathbf{S}_n et \mathbf{T}_n .

La valeur de I_S déterminée est en bon accord avec l'ordre de grandeur de quelques à une dizaine de kW/cm^2 classiquement trouvées pour l'intensité de saturation des bons colorants [63, 61].

Par contre, le rapport $\frac{k_T}{k_T+k_{isc}}$ obtenu à partir de l'ajustement des courbes de temps de vie moyen est très faible, et conduit à trouver $\frac{k_{isc}}{k_T} \sim 8.10^4$ sous vide et 10^5 sous air, ce qui semble peu raisonnable et correspondrait à un cycle de fluorescence au cours duquel la molécule serait majoritairement dans l'état \mathbf{T}_1 plutôt que sur l'état radiatif \mathbf{S}_1 .

En considérant une durée de vie typique de l'état \mathbf{T}_1 de l'ordre de quelques microsecondes à une fraction de milliseconde, on attend plutôt pour $\frac{k_T}{k_T+k_{isc}}$ une valeur comprise entre 10^{-1} et 10^{-2} .

Si on utilise l'expression de I_S donnée par l'équation 2.10, et en considérant une section efficace d'absorption $\sigma_{a,el}^0 = 10^{-16}cm^2$ typique pour ce type de colorant pour estimer le rapport $\frac{k_T}{k_T+k_{isc}}$, on trouve par contre une valeur beaucoup moins faible, qui permet retrouver un rapport $\frac{k_{isc}}{k_T}$ proche de celui attendu, respectivement de 200 et 330 sous vide et sous air.

Ce désaccord entre les rapports obtenus à partir des constantes de photoblanchiment et à partir de l'intensité de saturation indique que les valeurs inhabituelles de 8.10^4 et 10^5 ne s'expliquent pas uniquement par la dépopulation de l'état \mathbf{S}_1 par croisement intersystème vers l'état triplet \mathbf{T}_1 piège. Ces valeurs peuvent par contre indiquer que la molécule a une probabilité importante de se trouver dans un état non radiatif différent de \mathbf{S}_0 et de \mathbf{T}_1 . En effet, le désaccord observé implique que cette probabilité est plus importante que celle uniquement liée au triplet, dont un ordre de grandeur correct est déterminé par le rapport obtenu à partir de I_S . Cela signifie donc qu'en réalité il existe pour la molécule un état supplémentaire non fluorescent différent du triplet, et qui n'apparaît pas dans le modèle à cinq niveaux proposé. La molécule passe en proportion une durée importante dans cet état, dans lequel elle est protégée des mécanismes de photoblanchiment— car une large fraction des molécules sont très photostables et peuvent émettre pendant plusieurs milliers de secondes— mais qui abaisse le taux moyen de fluorescence. Cela permet aussi d'expliquer le relativement faible taux de photons émis par les molécules dans le film solgel : pour une durée de vie

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

radiative de 3 nanosecondes et un rendement de fluorescence proche de 1, comme il est attendu pour un bon colorant, à l'intensité de saturation le flux est déterminé par $\frac{k_r}{2}$, soit ici $\sim 1,7 \cdot 10^8 \text{ photons/s}$. La valeur d'intensité expérimentale la plus importante sous vide est 1410 W/cm^2 , ce qui correspond à peu près à $I_S / 2,5$. On attendrait donc un flux d'environ $6,7 \cdot 10^7$ photons par seconde. Or à cette puissance, même la molécule la plus intense ne présente un flux (corrigé de la détection expérimentale) que de $\sim 7 \cdot 10^4 \text{ photons/s}$, et la plupart des molécules n'émettent qu'environ 3000 photons/s . On est donc très loin du flux attendu. On retrouve cette même analyse sous air, le processus de quenching n'est donc pas lié à des espèces extérieures mais semble être inhérent à l'environnement dans lequel se trouve la molécule. On peut par exemple proposer que cet état résulte d'une interaction intermittente de la molécule avec la paroi de son site, la fluorescence étant quenchée par transfert d'énergie vers la paroi. Le processus d'adsorption-désorption de la molécule serait suffisamment rapide pour ne pas être observable à l'échelle typique de la seconde sur laquelle nous avons étudié la dynamique temporelle.

Lors de ces discussions sur le photoblanchiment nous n'avons pas pris en compte l'hétérogénéité du milieu et le fait que les molécules peuvent avoir individuellement différentes probabilités de photoblanchiment, à un et à deux photons. Nous avons obtenu des informations sur le photoblanchiment global au sein de l'échantillon, mais ce n'est qu'en mesurant pour chaque molécule les paramètres tels que le rapport $\frac{k_{isc}}{k_T}$ et I_S , qu'il serait possible de distinguer l'existence des sous-populations vis à vis du photoblanchiment. La prise en compte de l'hétérogénéité est donc très exigeante et nécessiterait un grand nombre de mesures complémentaires à l'étude présentée dans ce manuscrit.

2.3 Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

2.3.1 Diffusion spatiale

2.3.1.1 Description du phénomène

Les études sur le photoblanchiment des molécules présentées dans la partie précédente ont été effectuées en analysant la fluorescence de molécules qui, si on ne peut exclure une diffusion rotationnelle, conservaient au long de leur étude une position fixe. La tache de fluorescence observée sur la caméra CCD, image des molécules individuelles, conservait les mêmes coordonnées au cours des films. Cette observation montre donc que ces molécules sont relativement localisées dans un site donné, elles n'ont pas de mouvement de translation d'amplitude supérieure à la dimension de la tache d'Airy ($\sim 480nm$), et globalement le dopage reste homogène dans le film solgel.

En fait, et c'est le propos de cette section, nous avons aussi observé de manière incontestable qu'un certain nombre de molécules ont la possibilité de se mouvoir sur des distances importantes. Cette diffusion n'est pas observée dans toutes les zones du film, et en particulier, même lorsqu'il existe des molécules capables de diffuser, elles ne représentent qu'un faible pourcentage des molécules présentes dans la zone d'étude. La majorité des molécules conservent une tache de fluorescence fixe, à l'échelle de la résolution du microscope. La figure 2.13 présente une séquence d'images sur lesquelles il est possible de suivre le parcours d'une molécule particulière. Sa tache de fluorescence se déplace de manière désordonnée sur plusieurs pixels, ce qui signifie que la diffusion de la molécule a lieu sur des distances de l'ordre du micron. Tout au long de sa course, l'objet présente par contre toutes les caractéristiques de l'émission d'une molécule individuelle, et de celles des molécules "immobiles" : son intensité fluctue, et en particulier on distingue un clignotement très rapide, peu de temps après lequel la molécule photoblanchit. Sur le dernier cliché de la figure 2.13 sont reportées en rouge les différentes positions de la molécule au cours du temps, jusqu'à sa position finale, où l'émission de la molécule persiste pendant quelques images avant de disparaître. D'autres molécules continuent par contre d'émettre après la fin de leur course.

Cette diffusion des molécules a été observée de manière directe pour la première fois sur des films frais, mais aussi sur certaines zones des films vieilliss. Même au sein d'un échantillon donné, il existe donc différentes zones dont la structure va permettre, ou non, aux molécules de se déplacer sur des distances notables. Le type de structure permettant la diffusion reflète donc vraiment des variations locales de la réticulation du film solgel de MTEOS.

Globalement, la durée moyenne d'émission des molécules qui diffusent spontanément, et des

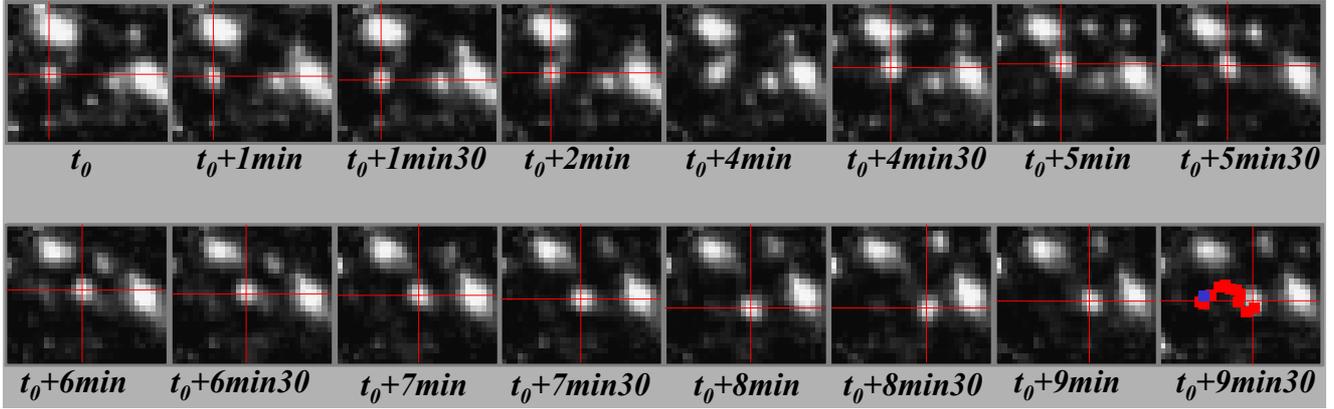


FIG. 2.13 – Diffusion spatiale des molécules, suivi par microscopie de fluorescence grand champ de la position d'une molécule au cours du temps. Les clichés présentés correspondent à des zones de $5.4 * 6.2 \mu m^2$, extraites d'images couvrant une surface environ 6 fois plus importante enregistrées en 30s.

molécules "immobiles" dans le solgel est comparable. On exclut donc que la diffusion ne corresponde qu'à des espèces qui se trouvent en dehors du film, sur la surface par exemple, et qui devraient être moins photostables. Un certain nombre de molécules sont donc capables de diffuser dans les films, à travers la matrice ou le réseau de pores et de canaux créé au cours de la polycondensation finale.

2.3.1.2 Etude et analyse

diffusion "spontanée" des molécules Pour étudier la diffusion des molécules, nous avons calculé, pour chacune d'entre elles, le déplacement quadratique moyen, ou MSD⁶, défini par [64] :

$$MSD(\Delta t = t_i - t_j) = \langle d_{\Delta t}^2 \rangle = \frac{1}{[t_{\max}/\Delta t]_{t_i-t_j=\Delta t}} \sum (\vec{r}(t_j) - \vec{r}(t_i))^2 \quad , \quad (2.17)$$

où $\vec{r}(t_i)$ représente la position de la molécule à t_i , Δt l'intervalle de temps élémentaire considéré, et $[t_{\max}/\Delta t]$ le nombre de pas de durée Δt dans la durée totale de diffusion.

Pour une diffusion spatiale à n dimensions, on peut introduire un coefficient de diffusion D , et réécrire l'expression du MSD, en fonction du temps :

$$MSD = 2nDt \quad . \quad (2.18)$$

Soit, en considérant dans le film solgel mince une diffusion à deux dimensions :

$$MSD = 4Dt \quad . \quad (2.19)$$

⁶MSD, de l'anglais Mean Squared Displacement.

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

La dépendance en temps de cette grandeur permet de caractériser la nature de la diffusion des molécules. Bien que je n'ai pas pu approfondir plus convenablement les études de la diffusion spatiale, qui constitue un domaine de recherche en soi, on peut ici proposer une analyse préliminaire des données. On distinguera ainsi, la diffusion "normale", ou brownienne, classique qui résulte uniquement de collisions intramoléculaires, des diffusions dites "anormales", parmi lesquelles on peut citer la diffusion avec transport de matière. Dans le cas d'une diffusion normale, on attendra une dépendance en temps linéaire du MSD tandis qu'elle sera quadratique dans le cas d'un transport de matière⁷[65].

La figure 2.14 présente les trajectoires et les courbes des MSD de différentes molécules individuelles mobiles.

Les échelles spatiales sur lesquelles s'effectue la diffusion des différentes molécules sont très variables, de quelques pixels, soit moins d'un micron (molécule **e**), jusqu'à plusieurs dizaines de microns (molécule **a**). L'analyse montre que les courbes des MSD de la plupart des molécules, telle la molécule **a** de la figure 2.14, sont ajustables par des droites; ces molécules ont donc une diffusion normale dans le solgel. La diffusion est cependant relativement peu rapide puisqu'on trouve des valeurs de D de l'ordre de 3.10^{-10} à $10^{-9}cm^2.s^{-1}$, inférieures par exemple à celle d'environ $10^{-8}cm^2.s^{-1}$ obtenue par *Schmidt et al.* pour la diffusion de lipides marqués dans une membrane [64]. Par rapport à une solution, la diffusion des molécules est ainsi largement ralentie dans le film solgel que nous avons étudié.

Pour certaines molécules, on obtient par contre un ajustement plus adapté en utilisant une courbe quadratique. La molécule **b** en est un exemple; pour ces molécules la diffusion normale est donc accompagnée d'un déplacement de matière, par exemple un flux de THF.

Il est intéressant de remarquer qu'on observe aussi souvent des ruptures brutales de la courbe de diffusion, parfois des paliers, et sur la trajectoire des positions autour desquelles la molécule réside plus longtemps (figure 2.14, molécules **c** à **e**). On peut rapprocher cette observation de la proposition de *Malek et Coppens*, qui se sont intéressés à la diffusion d'espèces moléculaires dans les matériaux nanoporeux, dans lesquels on peut englober les matériaux solgel [66].

⁷La vitesse d'écoulement du flux de matière (solvant), $\nu_{solvant}$, intervenant, on peut utiliser une nouvelle expression du MSD,

$$MSD=4Dt + \nu_{solvant}^2 t^2,$$

et on peut introduire un coefficient de diffusion global, qui varie ici avec le temps :

$$D(t)=D_0(1 + \frac{\nu_{solvant}^2 t}{4D}).$$

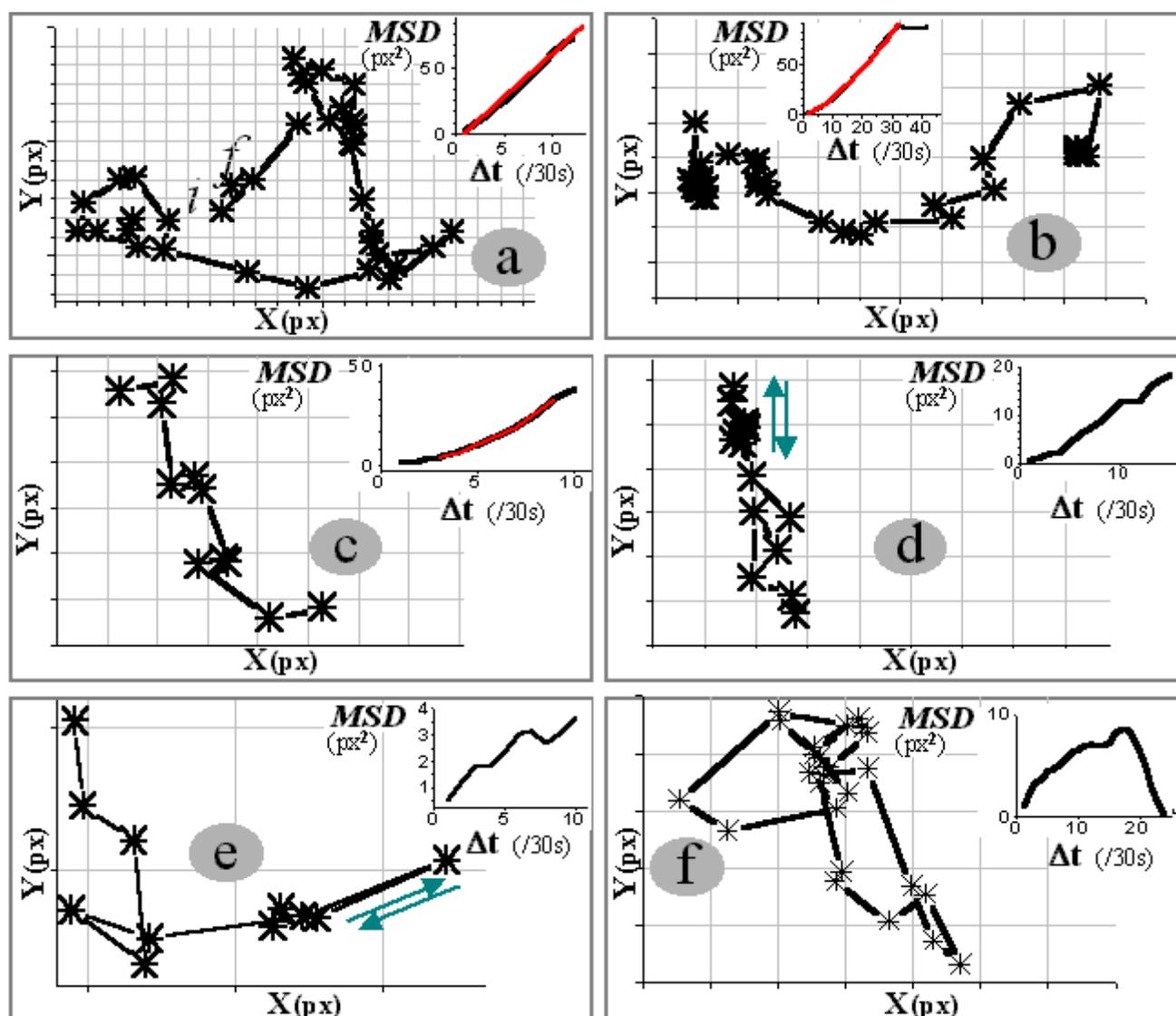


FIG. 2.14 – Diffusion spatiale des molécules dans le film sol-gel : observation en microscopie grand champ. Pour 6 molécules distinctes, **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, et **f** : Coordonnées successives (en px de la CCD) du centre gravité de la tache image de la molécule suivie, permettant de reconstruire sa trajectoire, et courbe du MSD (px^2). En rouge, l'ajustement proposé de la fonction $\text{MSD}=f(\Delta t)$.

Ces auteurs ont ainsi montré qu'en présence de pores de dimension nanométrique ($\leq 50\text{nm}$), la rugosité des parois intervient de manière non négligeable sur le mode de déplacement des molécules : la probabilité d'entrée dans le pore est d'autant plus réduite que le pore est rugueux. Cela a pour effet de freiner la diffusion des molécules qui vont avoir tendance à s'accumuler autour de la zone d'entrée. De plus, une molécule qui aura pénétré dans le pore, pourra de nouveau diffuser. Evidemment, le concept de rugosité est ici à considérer avec précaution : il peut s'agir d'une rugosité au sens propre—c'est-à-dire une rugosité

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

morphologique spatiale— ou d'une "rugosité" chimique, c'est-à-dire la présence de sites d'interaction, voire d'adsorption, privilégiés de la molécule sur la paroi du pore. Dans notre cas, les ralentissements de la diffusion des molécules de pérylène orange pourraient résulter de ce type d'interactions paroi ou entrée du pore/molécule. De manière équivalente, l'obstacle pourrait aussi correspondre à un autre type de site dont la géométrie est caractérisée par un rétrécissement local de l'espace libre (constriction, canal avec goulot d'étranglement). Dans le cas particulier des molécules sélectionnées pour la figure 2.14, on peut donc proposer que la molécule **c**, qui ralentit puis retrouve une diffusion équivalente est parvenue à franchir l'entrée d'un pore, tandis que les molécules **d** et **e** qui présentent une trajectoire qui revient sur elle même après le ralentissement n'aurait pas pu pénétrer dans le pore. Il existe aussi des molécules dont la courbe de diffusion est "en cloche", comme la molécule **f**. Aux temps longs, une telle molécule a donc subi un ralentissement progressif avant de se fixer "définitivement". Pour la molécule **b** par contre ce ralentissement est brutal, la molécule a rencontré un site qui stoppe sa diffusion.

D'autres molécules dont la diffusion est stable, et la courbe linéaire, se trouvent probablement dans des domaines plus vastes, des pores de dimension plus importante ou des canaux plus larges par exemple. Elles traduiraient l'existence de zone moins réticulées dans le film.

2.3.1.3 Expérience sous saturation de THF

Une première hypothèse, qui semble raisonnable et qui a déjà été proposée pour un système similaire par l'équipe de *Viteri* lors d'une étude de films solgel par fluorescence de molécules individuelles de DiI [58], est de postuler que les molécules qui diffusent spontanément sont localisées dans le film solgel, en solution dans du solvant résiduel qui aurait été piégé au moment de la condensation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une expérience— en saturant l'enceinte de THF— dans le but d'observer l'évolution de l'échantillon dans le cas d'un ajout artificiel de solvant.

Dans de telles conditions est-on capable de déclencher le déplacement des molécules? La réponse est positive : alors que sur les films de la zone d'étude, préalablement enregistrés sous air, les molécules étaient immobiles, elles deviennent mobiles dès l'introduction de THF dans l'atmosphère. La diffusion est telle qu'il n'est d'ailleurs plus vraiment possible de suivre spécifiquement l'émission d'une molécule particulière. Il faut pour cela attendre quelques secondes après l'ouverture de l'enceinte et la remise à l'air. La diffusion ralentit ensuite, puis les molécules s'immobilisent à nouveau.

De la même manière que pour les molécules diffusant spontanément, nous nous sommes intéressés au mode de diffusion sous THF, en calculant le déplacement quadratique moyen introduit à l'équation 2.17.

Cette fois, il apparaît que les molécules ne diffusent pas de manière brownienne. Comme on

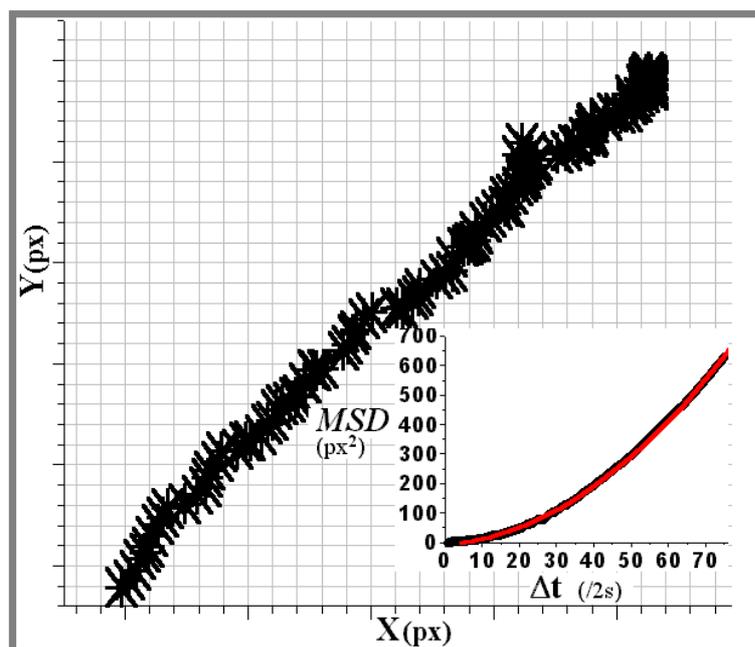


FIG. 2.15 – Diffusion spatiale de molécules, déclenchée sous saturation de THF. Trajectoire (en px) et courbe du MSD (px^2) d'une molécule individuelle représentative. L'ajustement en rouge correspond à une dépendance quadratique du MSD, soit à une diffusion avec transport de matière.

peut l'observer sur la figure 2.15 qui présente l'exemple d'une des molécules diffusant sous THF, l'ajustement de la courbe du MSD correspond ici à un polynôme d'ordre 2 en t . On note aussi que les molécules diffusent sur des distances importantes, de l'ordre de $7\mu\text{m}$ dans le cas de la molécule particulière présentée sur la figure 2.15. La diffusion des molécules se fait donc avec transport de matière : les molécules sont entraînées par le solvant qui s'évapore.

2.3.1.4 Discussion

On peut retirer une information intéressante de cette étude sous THF, couplée avec l'observation d'une diffusion spontanée dans certaines zones des films.

Intéressons nous tout d'abord au cas de la diffusion spontanée des molécules.

Aucune mobilité translationnelle n'est détectée quelques semaines après la synthèse des films étuvés ou non, dans lesquels les molécules se déplaçaient spontanément. En s'appuyant sur l'hypothèse que la molécule se déplace dans un pore rempli de solvant, si la diffusion s'arrête cela signifie que le solvant s'est partiellement évaporé. Il semble peu probable pour les films âgés de quelques jours, quelques semaines et encore moins plusieurs mois, que la condensation ne soit pas achevée.

Le solvant initialement emprisonné persiste à pouvoir trouver des voies vers l'extérieur du

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

film, malgré la réticulation du solgel. Cette expérience montre qu'il existe dans les films solgel minces des connections ouvertes depuis la matrice vers le milieu ambiant. Suivant la taille de ces connections, les sites dans lesquels se trouve du THF résiduel, vont se "vider" plus ou moins rapidement du solvant qu'ils contiennent. Cela permet alors aussi d'expliquer les molécules qui diffusent spontanément et dont la diffusion s'accompagne d'un transport de matière : elles se situent dans des pores ouverts où l'évaporation est suffisamment rapide et elles sont entraînées avec le THF.

On considère à présent l'observation d'une diffusion induite en présence de THF. Les molécules dont on a déclenché la diffusion par ajout de THF étaient pour la plupart des molécules initialement visibles sur l'image CCD, et qui présentaient une émission de fluorescence stable, caractéristique de molécules situées dans le film. S'il est possible de déclencher la diffusion des molécules incluses dans le film solgel en saturant l'atmosphère de THF, cela signifie que le solvant est capable d'atteindre ces molécules. D'autre part, l'émission des molécules qui deviennent mobiles après ajout de THF persiste après leur immobilisation pendant une durée compatible avec les observations des molécules situées dans le film. Si ces molécules étaient situées uniquement à la surface du matériau, elles photoblanchiraient en moyenne beaucoup plus rapidement. Ce sont donc – au moins pour une fraction – des molécules localisées dans le film. Certaines molécules dont la diffusion est induite peuvent parcourir des distances beaucoup plus longues que l'épaisseur du film qui est de quelques dizaines de nanomètres (voir par exemple la molécule de la figure 2.15). Cette observation suggère qu'il existe dans certaines zones des films un réseau de canaux relativement larges dans l'épaisseur du film, dont certains débouchent à la surface. Grâce à ces larges ouvertures, le solvant peut rapidement atteindre des molécules situées dans le film, et se retirer tout aussi rapidement.

On peut donc proposer que la structure des films minces soit telle que celle présentée à droite sur la figure 2.16. Plutôt qu'une surface bien condensée, et relativement "impermeable" telle que celle proposée pour définir les solgel massiques (à gauche sur la figure 2.16), on aurait dans le cas des films minces des canaux ou des pores non circonscrits assurant la communication entre la surface et des pores, des canaux, et d'autres sites plus profonds.

Seules les molécules dopantes se trouvant dans des canaux ou des pores reliés à la surface diffuseront dans le cas de l'introduction de solvant. La réversibilité du phénomène de diffusion valide aussi cette hypothèse de domaines ouverts à la surface du film, puisqu'il est possible de déclencher plusieurs fois la diffusion des molécules en contrôlant la saturation de l'atmosphère du film en THF. En condition de saturation en THF, le solvant diffuse par les connections dans le film, déclenchant le déplacement des molécules qu'il rencontre. Si on supprime la source de THF, le THF introduit s'évapore très rapidement à température

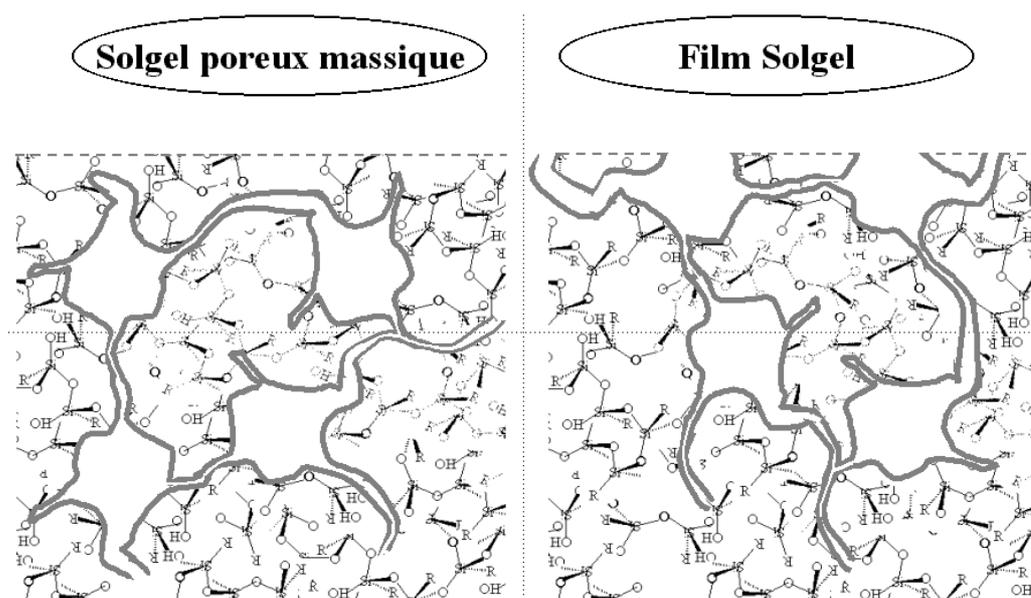


FIG. 2.16 – Structure des matériaux solgel. A gauche structure d'un matériau massif poreux. A droite structure proposée dans cette étude des films minces solgel. On notera en particulier la présence de canaux et de pores ouverts en surface et d'un réseau communiquant vers l'intérieur du film.

ambiante. Le solvant qui avait trouvé des voies d'entrée, suit donc le même chemin en sens inverse, entraînant avec lui les molécules en solution. Sous THF, les molécules pourraient ainsi pendant leur course atteindre la surface du film, diffuser dans la couche d'eau présente sur la surface à température ambiante, et pénétrer à nouveau dans le film par un autre canal, puisque nous avons remarqué qu'après immobilisation, les molécules présentent une photostabilité en moyenne comparable aux molécules situées dans le solgel.

Par contre, les molécules insérées dans des sites tels que les cages inorganiques de la matrice condensée, ou des pores presque fermés, seraient quant à elles vraiment immobilisées. On peut ainsi expliquer le fait que même dans les conditions de "diffusion possible", toutes les molécules ne se déplacent pas. Il y a donc pour les molécules des environnements bien différents. On peut aussi déduire que si ces deux "types" de molécules ne sont pas accessibles au solvant additionnel avec la même probabilité, il en sera de même pour d'autres espèces pouvant diffuser dans le film. On pense alors en particulier à l'oxygène; une telle différence d'accessibilité induirait alors aussi une différence de comportement face au processus de photoblanchiment discuté dans la section précédente.

Il peut aussi rester des pores ou des poches remplis de solvant, non connectés à l'extérieur dans lesquels la molécule diffuse. Si l'espace libre a des dimensions inférieures à la résolution spatiale du microscope, accéder à la diffusion suppose d'utiliser une procédure

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

de déconvolution. Cette déconvolution sera d'autant plus précise que le rapport signal sur bruit est grand. Si l'espace libre est grand, il est probable que nous ne puissions pas observer le phénomène de diffusion des molécules piégées en raison du temps d'acquisition long des images, indispensable à obtenir un rapport signal sur bruit suffisant pour détecter les molécules individuelles. Pendant cet intervalle de temps, la molécule diffuse librement et son signal de fluorescence, dispersé sur les pixels de sa trajectoire contribue au bruit de fond de l'image. Cette remarque est à rapprocher de l'observation suivante : pour pouvoir mesurer les déplacements induits tel que celui présenté sur la figure 2.15, il a fallu attendre que l'évaporation du THF soit amorcée. Auparavant, la diffusion était trop rapide, et les images CCD ne montraient au mieux que de très rapides et fulgurantes traces des molécules mobiles. On ne peut donc exclure qu'il existe dans les films sol-gel des sites fermés– ou très difficilement accessibles– dans lesquels à la fois une ou des molécules et du solvant se sont trouvés piégés au cours de la condensation. Ces molécules seraient alors aussi en solution, en étant toutefois "protégées" des fluctuations de composition chimique– mais non thermiques– extérieures. De telles molécules constitueraient alors une nouvelle population vis à vis du photoblanchiment et de la dynamique d'émission.

La possibilité de diffusion des molécules dans les films sol-gel minces signifie donc la présence d'un réseau de canaux et de pores libres formés dans la matrice silice au cours de la condensation.

Le type de sol-gel étudié a deux particularités. Il est élaboré sous forme de film mince (50-100nm) par une technique de spin coating d'une part, et il est formé à partir d'un précurseur particulier, le MTEOS, d'autre part. On peut se demander quelle est l'influence relative de ces deux facteurs sur la structure particulière de l'échantillon.

Premièrement, par rapport au cas de l'emploi de précurseurs sol-gel silanes plus classiques comme le TEOS, l'ormosil offre après hydrolyse une possibilité de lien en moins, c'est-à-dire qu'il peut former seulement trois ponts siloxanes contre quatre pour le TEOS. Les sol-gels ormosils auront donc *a priori* et quelle que soit la forme finale du matériau– film ou massif– un degré de polymérisation moindre, ce qui est décrit par le groupe d'*Higgins* comme une moindre rigidité de la matrice. Cette différence de propriété a ainsi été notée par le même groupe [67], au cours d'étude de la fluorescence de molécules uniques du colorant Nile Rouge dans des films sol-gel synthétisés non seulement à partir du TEOS mais aussi à partir de l'ormosil isobutyltriméthoxysilane (BTMOS), ou à partir de ces deux précurseurs à la fois avec des proportions relatives, dans la solution avant hydrolyse, variables. Ils ont remarqué en particulier, que plus la quantité de précurseur "organique" était importante, plus le taux de fluctuation du signal de fluorescence des molécules uniques augmente, et moins la tache obtenue pour une molécule individuelle par microscopie confocale est compatible avec la réponse impulsionnelle du microscope utilisé (une tache circulaire d'environ 500nm), contrairement

à ce qui est observé pour les films purement TEOS. Dès une proportion de 33% en BTMOS, ils n'observent en effet majoritairement les molécules que sous la forme de stries. La diffusion spatiale de translation, suggérée dans l'interprétation, n'est pas observée directement puisque contrairement au système d'imagerie grand champ que nous avons utilisé, la microscopie confocale ne permet pas de suivre l'éventuelle diffusion des molécules uniques. Mais il est aussi intéressant de noter que les auteurs ont été confrontés au phénomène de diffusion des molécules dans leurs films, ce qui a compliqué l'interprétation des spectres enregistrés : "*Only spectra from single molecules that clearly remained in fixed locations during imaging were employed*".

Deuxièmement, quel que soit le précurseur employé, ce sont le mode de synthèse et la qualité du réseau de silice formé qui conditionnent intrinsèquement la limitation de la mobilité des molécules. Ainsi, un exemple quoique indirect, de l'importance de la préparation du solgel sur la stabilité spatiale des molécules dopantes est celui de *Salin et al.* [52]. Ces derniers expliquent effectivement que leur échantillon solgel massif, dopé par des molécules de sulforhodamine, destiné à être employé comme milieu actif d'un laser tout solide, blanchit après une certaine durée d'irradiation. Ils remarquent surtout, qu'en stoppant l'irradiation et en la reprenant quelques minutes plus tard, il est à nouveau possible de détecter une émission de fluorescence de l'échantillon. Vraisemblablement, de "nouvelles" molécules ont remplacé celles qui avaient photoblanchi. Les molécules sont donc capables de diffusion dans les solgels massifs, en fonction du parachèvement de la synthèse. Dans notre cas, la très faible épaisseur de nos échantillons peut aussi induire intrinsèquement une réticulation particulière, moindre. Une des raisons possibles est que la rapidité de l'évaporation d'une majeure partie du solvant au cours du spin coating, limite les possibilités de contacts et réarrangements postérieurs des îlots ou germes solgel, initiés dans la solution avant dépôt.

De plus, comme les films sont minces, la distance à parcourir par des espèces extérieures-solvant,...- pour atteindre les molécules situées dans le film est plus faible que dans les matériaux massifs, et *vice versa* : la distance sur laquelle les molécules doivent diffuser pour atteindre la surface, et éventuellement la pellicule d'eau qui la recouvre, dans laquelle la diffusion sera très rapide, est moins grande.

D'une manière générale, la diffusion dans les films minces sera donc plus importante que dans les matériaux massifs.

2.3.2 Nucléation-agrégation

2.3.2.1 Description du phénomène et caractérisation des "agrégats"

Pour pouvoir obtenir les données sur le photoblanchiment, nous avons effectué des expériences sous air et sous vide. Afin d'obtenir les données d'intérêt pour l'étude de ce processus sur un très grand nombre de molécules, j'ai poursuivi l'irradiation de différentes zones d'un film jusqu'à qu'il n'y ait plus aucune molécule fluorescente détectable sur les images. Si il

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

a été possible d'arriver à ce terme sous atmosphère gazeuse ambiante, cela n'a pas toujours été le cas sous vide.

La figure 2.18 présente des images extraites d'une série de films couvrant une durée totale de plus de 2h, pour un temps d'acquisition par image de 1,5s avec une puissance d'excitation de 23mW, permettant de visualiser les étapes "marquantes" de l'évolution observée lorsque l'échantillon est placé dans une enceinte, sous pompage.

Au début de l'irradiation, l'évolution est relativement similaire— bien que plus lente— à celle observée sous air : le nombre d'objets fluorescents diminue rapidement. Ainsi, sur la seconde image de la figure 2.18, enregistrée après 8 minutes d'éclairement laser, plus des deux tiers des molécules initiales ont photoblanchi.

Sous air, cette diminution persiste jusqu'à disparition de la quasi-totalité des émetteurs, l'expérience est alors arrêtée. Sous vide par contre, après une première phase de diminution du nombre des molécules de départ, on note un ralentissement. Ce ralentissement est tel que, après un moment, on arrive à un palier, c'est-à-dire que le nombre de molécules ne baisse plus mais reste globalement constant. Ainsi, entre les images correspondant à des durées d'irradiation de 8 et 30 minutes, on note que l'évolution de la population n'est que peu importante par rapport au laps de temps qui les sépare.

Si on continue l'irradiation, il semble que l'évolution du nombre d'objets s'inverse : sur les images successives on observe de plus en plus de molécules, ou en tous cas des fluctuations importantes du nombre d'émetteurs et de leur position. Cette remarque est visible sur la figure 2.18, si on compare les images obtenues après 30 et 45 minutes d'irradiation.

Sur ce film, il n'a pas été possible d'observer directement le déplacement des molécules, mais l'augmentation du nombre de molécules présentes dans une zone longuement irradiée, après photoblanchiment des molécules présentes initialement, est une nouvelle preuve— mais indirecte— de la diffusion spatiale du perylène orange dans le solgel. Dans les expériences dites de *FRAP* (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), c'est d'ailleurs l'analyse du temps nécessaire au retour des molécules dans la zone d'étude qui est utilisée pour déterminer les paramètres de diffusion macroscopique.

Mais au cours de nos expérience sous vide, en plus d'une preuve indirecte de la diffusion des molécules, nous avons aussi observé un second phénomène, inattendu.

Après le "palier", on note en effet que l'intensité de certains nouveaux objets— qui présentent bien au départ un comportement d'émission caractéristique de molécules individuelles— semble croître : l'intensité émise augmente de manière quasi-exponentielle. Sur la figure 2.18, j'ai mis en évidence plusieurs de ces sites en les cerclant de rouge, et sur la figure 2.17 sont présentées les traces temporelles de l'émission de trois "agrégats" en cours de formation. Le départ de la nucléation ne se fait qu'après un temps d'irradiation long, presque une heure et demie dans le cas présenté. A partir de ce moment, l'intensité augmente très rapidement

alors qu'aucune molécule ne se trouvait auparavant dans le site, comme le montre la trace temporelle plate. Au vu de leur comportement de croissance, qui fait penser à une accumulation, ou nucléation, de molécules, nous avons qualifié ces objets d'"agrégat". Bien que cela n'implique aucune conclusion sur la nature des objets, nous utiliserons donc ce terme pour les désigner dans la suite du manuscrit.

Parmi les "agrégats", certains disparaissent (voir par exemple les cercles rouges reportés de l'image à $t=80\text{min}$ sur l'image suivante (fig.2.18) : un des trois sites a cessé d'émettre et sa croissance ne reprendra pas.), mais l'intensité de nombreux agrégats continue à augmenter. L'intensité émise peut devenir si importante qu'on atteint le régime de saturation de la caméra, qui rend nécessaire d'augmenter la fréquence d'acquisition pour pouvoir continuer à suivre leur évolution. Après plus d'une heure et demi d'irradiation, il n'est toujours pas possible de distinguer une stabilisation des "agrégats", leur croissance continue. Sur la figure 2.18, on distingue alors les nombreux sites de nucléation de la zone cerclée en rose.

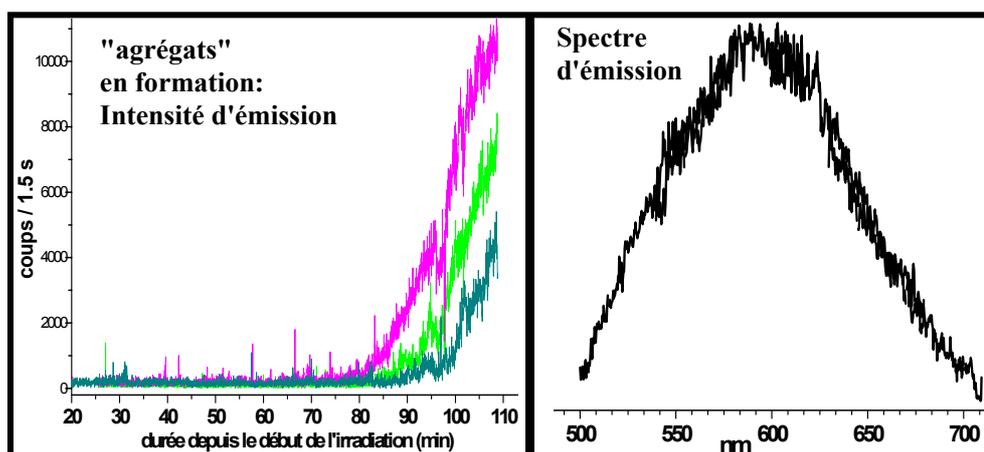


FIG. 2.17 – Caractérisations des "agrégats" : A gauche trace temporelle de l'émission détectée en 3 différents sites de nucléation. Avant la croissance de chacun des agrégats, aucune molécule n'est visible dans le site– A droite, spectre d'émission d'un agrégat, reconstruit à partir de 3 spectres enregistrés pour différentes longueurs d'onde centrales du spectromètre.

Etant donné la stabilité dans le temps des "agrégats", il nous a été possible d'effectuer plusieurs caractérisations de leur émission de fluorescence :

– Contrairement à la fluorescence de molécule individuelles, le signal détecté sur les "agrégats" de pérylène orange est dépolarisé. Le signal détecté pour deux directions de polarisation croisées de l'excitation est absolument équivalent. L'absorption de l'"agrégat" est aussi efficace dans les deux cas.

– Nous avons aussi enregistré le spectre d'agrégats, dont un exemple est présenté sur la figure 2.17.

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

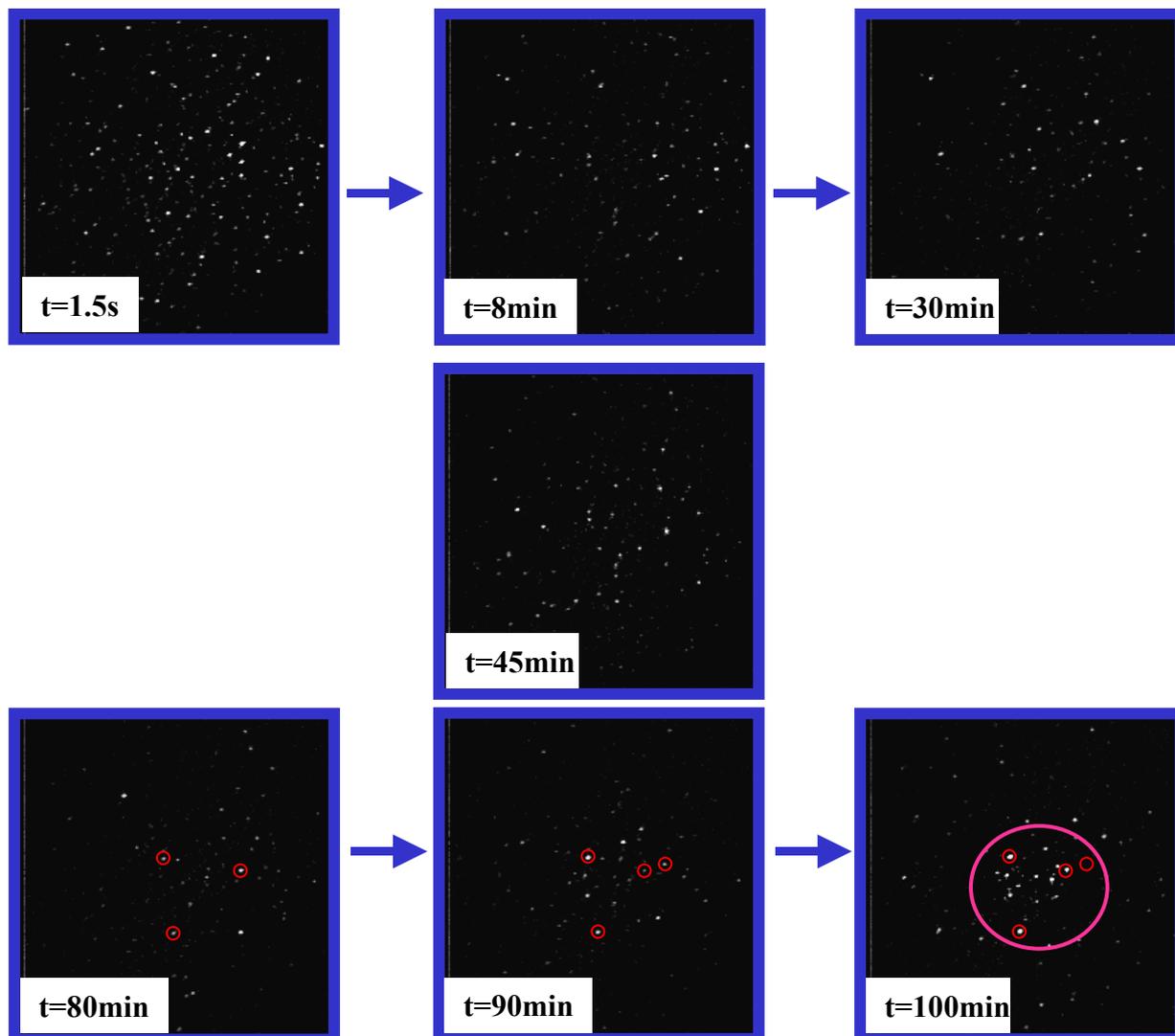


FIG. 2.18 – Irradiation continue sous vide du pérylène orange dans un film sol-gel : séquence d'images grand champ de fluorescence permettant de visualiser différentes les étapes observées : photoblanchiment, stabilisation du nombre d'émetteurs, puis apparition de sites dont l'intensité croît rapidement. Différents sites de "nucléation", parmi lesquels un germe – à droite sur l'image correspondant à une durée d'irradiation de 80min – qui disparaît, sont repérés par des cercles rouges.

On ne distingue pas de bande de fluorescence résolue, et l'émission s'étend sur un très large domaine de longueurs d'onde. Pour obtenir un tel spectre, plusieurs acquisitions successives à des longueurs d'onde du spectromètre différentes ont été nécessaires : le réseau utilisé était celui à $300\text{tr}/\text{mm}$, chacun des spectres s'étend sur 85nm .

Comme la croissance des "agrégats" sous vide ne semblait pas atteindre son terme, nous avons voulu tester leur éventuelle sensibilité à l'oxygène et donc éprouver leur photostabilité sous air.

Les conséquences ont été, comme le montre la figure 2.19, très rapidement visibles : la quasi-totalité des agrégats présents, irradiés pendant plus de 2 heures sous vide, ont disparu en seulement quelques minutes d'irradiation sous air. Les rares noyaux émetteurs qui restent présents sur l'image de droite de la figure 2.19 ont une intensité qui a fortement décru, et le nombre de coups détectés n'est plus exceptionnel mais assez proche de celui des molécules individuelles.

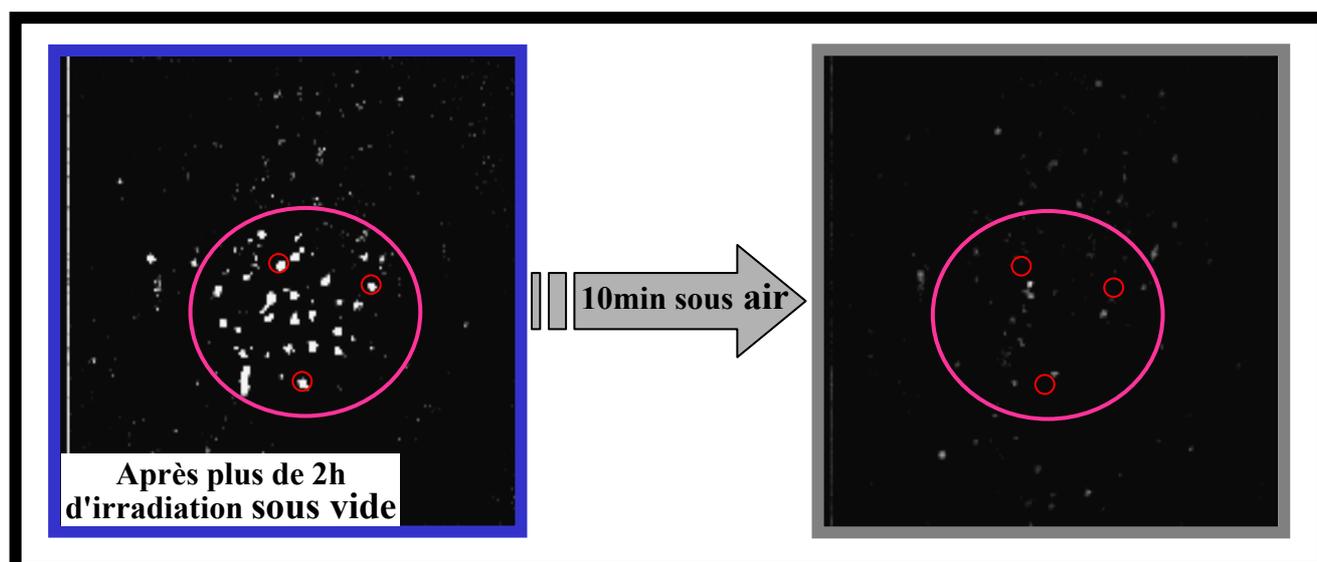


FIG. 2.19 – Effet de la remise à l'air du film dans lequel des "agrégats" se sont formés : A gauche, sous vide, après 2h d'irradiation : l'intensité des "agrégats" et leur nombre continue de croître– A droite, la même zone, 10min après la remise sous air et en conservant la même intensité d'excitation : les "agrégats" ont disparu sous irradiation, les émetteurs restant ont une intensité comparable à celle de molécules individuelles.

2.3.2.2 Etude et discussion des paramètres influant sur l'"agrégation"

Etude en température et analyse– phénomène limité par diffusion ? La première observation du processus de nucléation s'est effectuée à température ambiante. Afin d'étudier ce phénomène, et pour tenter de comprendre quels sont les paramètres expérimentaux

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

influant sur l'"agrégation", nous avons effectué des expériences similaires à celles dans lesquelles les premiers "agrégats" ont été détectés, mais en abaissant la température.

La première remarque que l'on peut faire est que le nombre d'"agrégats" observé diminue avec la température. Plus la température baisse plus le nombre d'amorces avortées est important.

La seconde observation concerne la dynamique temporelle de l'"agrégation". Des traces temporelles— dont on a extrait l'intervalle pertinent pour la croissance des objets— de l'émission des "agrégats", caractéristiques de celles observées à différentes températures sont présentées sur la figure 2.20.

Les observations montrent que plus l'environnement se refroidit plus la formation de l'agrégat devient difficile. Dès 0°C , les traces deviennent chaotiques, on distingue des périodes noires de plus en plus rapprochées : les fluctuations du signal autour de la courbe de croissance sont de plus en plus importantes. A -40°C , certains "agrégats" semblent se construire par paliers ; souvent aussi on note un décrochage, l'intensité chute à zéro puis l'"agrégation" reprend. A partir de -80°C et jusqu'à -110°C , on remarque dans un nombre croissant de cas, qu'après une amorce d'agrégation, l'intensité baisse, et le "germe d'agrégat" se dissocie, puis disparaît. A -110°C on commence aussi à observer des amorces dont l'intensité est si faible, qu'il n'y a plus de rupture brutale d'intensité mais une décroissance lente, précédée d'une montée lente elle aussi. En deçà de -110°C , on n'observe plus que ce type de trace et il devient même difficile de considérer qu'il y a effectivement nucléation : le photoblanchiment semble prédominer sur la nucléation. Par contre, si on étudie ensuite la même zone à température ambiante, on observe de nouveau la formation d'"agrégats". L'effet observé est donc bien lié à la température et non à une zone particulière de l'échantillon. On peut conclure de ces observations que les agrégats sont des objets dont la croissance est fortement ralentie quand la température baisse, et qui photoblanchissent dans des conditions similaires à celles des molécules uniques. Même pour les molécules constituées en "agrégat", les voies de photoblanchiment offertes sous vide semblent continuer à être efficaces, en particulier lorsque l'"agrégat" n'est qu'à un stade peu avancé de sa croissance.

Nous n'avons que peu d'éléments pour expliquer la nature exacte du processus d'agrégation que nous avons observé.

Toutefois, il est probable que la dépendance en température de l'"agrégation", soit liée à la diffusion des molécules. Plus la température est faible, plus la diffusion est limitée, quel que soit le milieu dans lequel les molécules se déplacent ; l'abaissement de température va induire un ralentissement de la diffusion. Le ralentissement de la croissance des agrégats sous froid serait donc lié à une baisse de l'apport en molécules dans le site de nucléation. Les molécules mettent plus de temps à rejoindre l'amorce d'agrégat, et la plupart photoblanchissent avant de pouvoir s'"agréger". A très basse température, soit à partir de -110°C , la diffusion

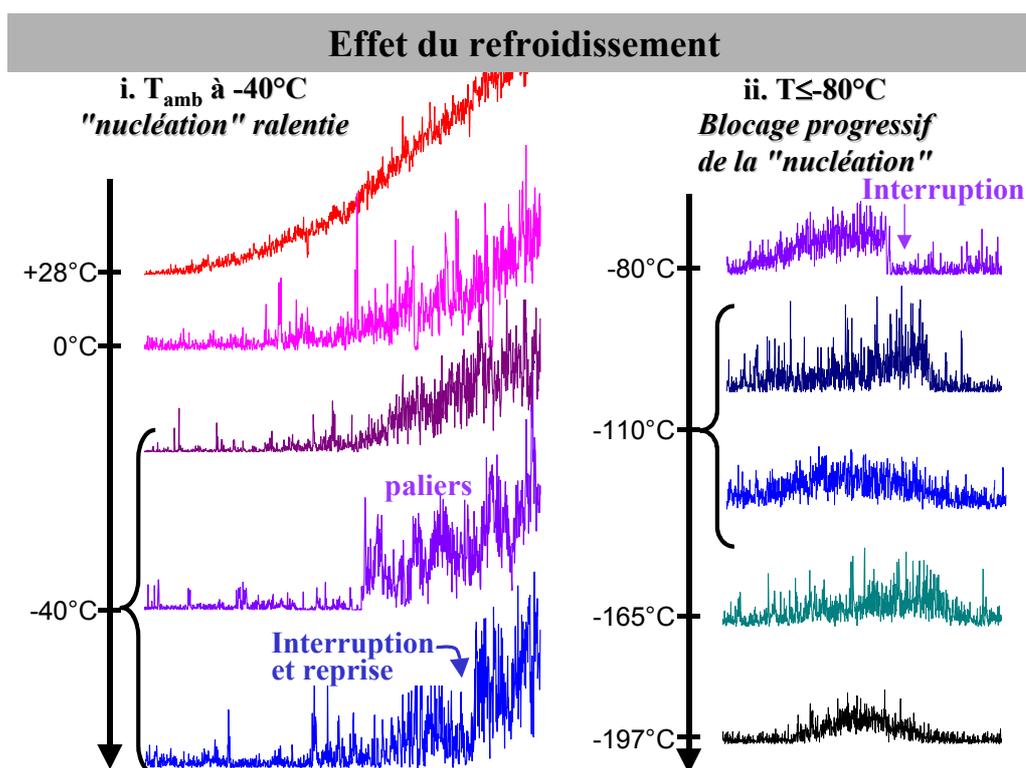


FIG. 2.20 – Effets d'un abaissement de température sur la "nucléation" du pérylène orange en film solgel. Plus la température baisse, plus celle-ci est ralentie. On observe des paliers et des interruptions de l'augmentation d'intensité témoin de la nucléation, puis un blocage progressif : de $-80^{\circ}C$ à $-197^{\circ}C$ l'intensité maximale atteinte chute, les germes avortent de plus en plus tôt.

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

peut être pratiquement bloquée, les "agrégats" ne sont visibles que sous la forme d'amorce. On peut noter ici que les températures indiquées correspondent aux valeurs expérimentales fournies par la jauge de la platine Linkam, située sur le bloc d'argent refroidi. Il est cependant difficile de s'assurer que ces valeurs correspondent en réalité à la température de l'échantillon. Pour les faibles refroidissements, par exemple à 0°C , cette mesure semble correcte, puisqu'il a été possible d'observer dans certains cas la formation de cristaux de glace. Les températures plus basses sont certainement sous-estimées car le contact thermique entre le bloc d'argent assurant le refroidissement et l'échantillon est imparfait. Ainsi il apparaît plus probable que le blocage de l'"agrégation" dans tous les sites à une température de -165°C , corresponde plutôt à la cristallisation du THF, soit à pression atmosphérique à une température de $-108,5^{\circ}\text{C}$.

interdépendance avec le milieu— sites privilégiés d'agrégation Plusieurs observations expérimentales nous permettent de conclure qu'il existe une très grande influence du site d'agrégation dans lequel se trouvent les molécules et de son environnement immédiat pour que la nucléation, non seulement s'amorce, mais aussi persiste.

Ainsi, même au sein de la population d'"agrégats" observée sur une zone donnée à une température fixée, il existe des différences dans l'évolution de la formation des objets. Sur la figure 2.17 introduite plus haut, on note par exemple à partir des trois traces temporelles d'émission présentées, que si l'"amorce" a lieu globalement après la même période d'irradiation, les trois "agrégats" ne croissent pas à la même vitesse. Nous avons aussi observé, en utilisant comme sonde l'évolution de l'intensité, que dans des sites distincts la formation des "agrégats" pouvait résulter d'un mécanisme de croissance exponentielle (majorité des cas) ou linéaire.

La nucléation résulte de la compétition entre les mécanismes de photoblanchiment— car on n'observe pas d'agrégation sous air— et de diffusion moléculaire. L'observation de modes de croissances différents suggère que selon les sites, l'un ou l'autre des mécanismes en compétition est limitant. Si seule la taille de l'agrégat— c'est à dire le nombre de molécules non photoblanchies qui y participe— joue sur la capture de nouvelles molécules, ce qui implique que le mécanisme limitant est le photoblanchiment, alors la croissance sera exponentielle.

Le site de nucléation doit aussi jouer le rôle d'un piège pour les molécules qui diffusent. L'agrégat ne se formera pas en l'absence d'une barrière de diffusion— sinon les molécules ne feront que "transiter" rapidement dans le site— mais selon la hauteur de cette barrière, sa croissance sera plus ou moins rapide. Dans certains sites moins accessibles— par exemple parce que les canaux d'entrée sont étroits— le "débit" des molécules, plus faible, ralentit la croissance qui devient linéaire.

La seconde observation qui démontre l'importance du site de nucléation et la nécessité d'une barrière de diffusion, est l'existence parmi des sites proches spatialement de sites net-

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

tement "privilegiés" : parmi trois à quatre sites rapprochés qui semblent être interconnectés, et donc entre lesquels les molécules peuvent aller et venir, un ou deux sont des sites où la nucléation est efficace, tandis que les autres ne semblent être que des "réservoirs", dans lesquels les molécules sont temporairement stabilisées (ralentissement) mais ne forment pas d'"agrégats", sinon parfois avec un retard très net par rapport au début de la nucléation dans les sites privilégiés.

Cette observation est illustrée sur la figure 2.21, qui présente une zone de $6.6\mu m * 5.6\mu m$ d'images obtenues en $700\ ms$ sous vide pour une puissance sur l'échantillon de $28mW$, après des durées totales d'irradiation t_1 et t'_1 , respectivement de 35 ($\sim 3000images$) et 47 minutes ($\sim 4000images$). Sur cette zone on s'intéresse plus particulièrement à la dynamique des trois sites dénotés **a**, **b** et **c** encadrés en rouge, et dont la trace temporelle d'émission depuis le début de l'irradiation est aussi présentée. Avant d'observer l'"agrégation" et les images présentées, on a déjà pu observer le photoblanchiment de la quasi-totalité des molécules individuelles initiales : sur la trace temporelle des sites **a** et **c** on repère ainsi la disparition des molécules qui s'y trouvaient localisées au départ ; dans le site **b** ce blanchiment est beaucoup plus rapide. Les pics d'intensité observés après blanchiment sont les signatures de l'émission des molécules qui passent dans les trois sites sans s'y fixer. Le laps de temps de résidence est à ce moment très court, inférieur à la durée d'acquisition de deux images successives.

Les phénomènes d'interconnexions entre les sites et l'existence de sites préférentiels, sont illustrés par les séries d'images *i* et *ii*.

Les étapes illustrées par ces images successives interviennent après une durée importante d'irradiation. A gauche, la nucléation vient à peine de commencer. On note que le premier site dans lequel on distingue une augmentation anormale d'intensité est le site **a**. Des molécules alimentent ce site et y résident suffisamment longtemps. Mais parmi les molécules qui arrivent dans le site **a**, certaines continuent leur chemin vers le site **b**, puis vers le site **c**, comme on peut le remarquer sur les images prises de t_1 à t_4 . Ces trois sites semblent donc communiquer les uns avec les autres, et on peut proposer qu'ils soient par exemple reliés par une série de canaux. L'arrivée des molécules se fait par le site **a**, qui doit être plus facilement accessible, soit parce qu'il est interconnecté avec un nombre plus important de sites alentour, soit parce que les canaux sont plus larges, et le site plus ouvert. En même temps, il apparaît très rapidement que ces trois sites ne possèdent pas les mêmes propriétés vis à vis de la formation d'"agrégats" : les sites **a** et **c** ont des courbes de croissance relativement parallèles, l'efficacité de la nucléation est similaire. Par contre, dans le site **b**, si on note bien une augmentation d'intensité qui débute avec celle des traces **a** et **c**, l'intensité chute brutalement quelques minutes après. Dans le même temps on note une importante hausse d'intensité dans le site **c** : l'anti-corrélation des intensités des deux traces est clairement repé-

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

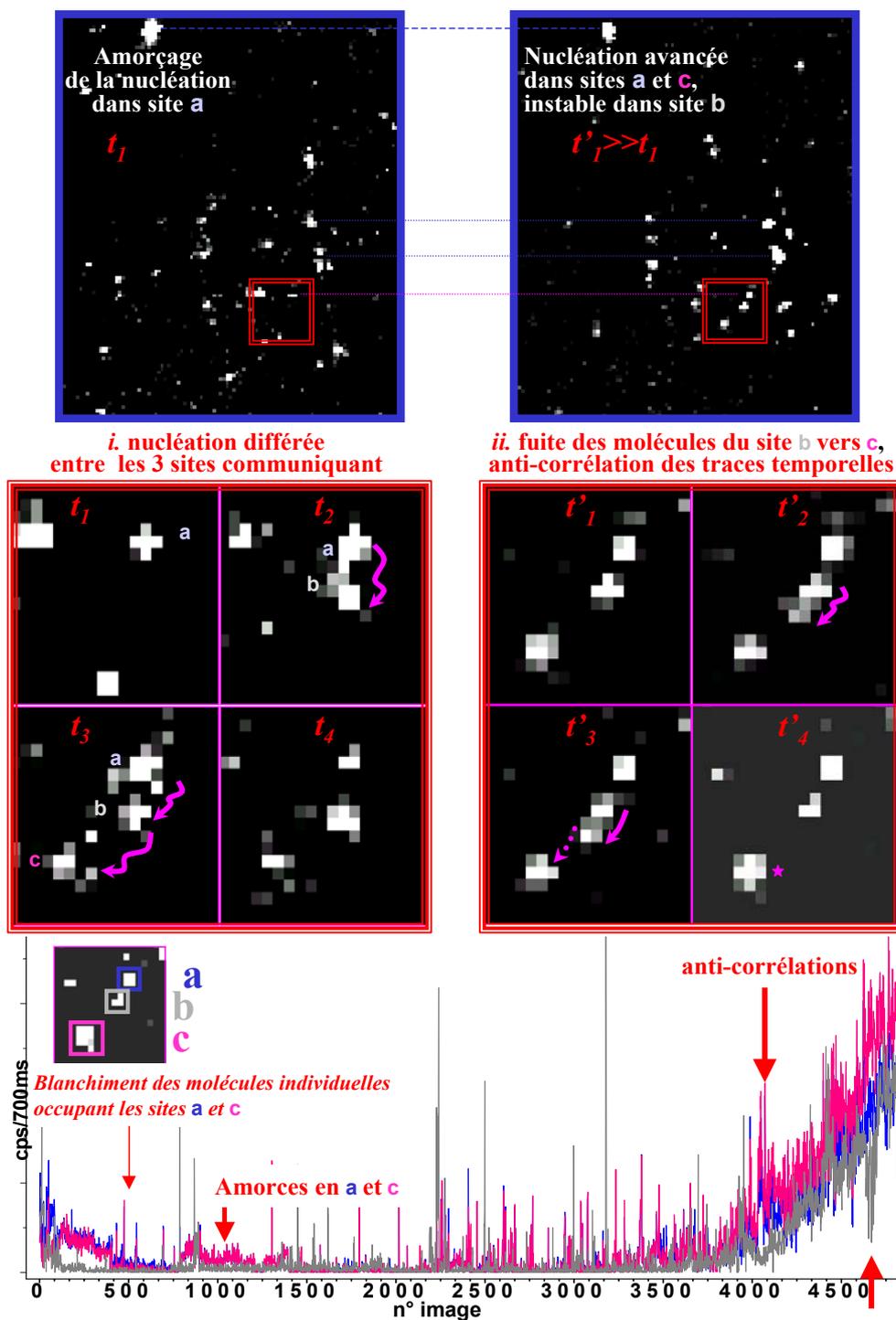


FIG. 2.21 – Sites privilégiés de nucléation. De haut en bas et de gauche à droite : Vues d'ensemble de la zone au début de la nucléation (t_1) et à une étape plus avancée (t'_1). Zooms sur les trois sites a, b et c qui communiquent (*i* : t_1 à t_4), et *ii* de t'_1 à t'_4 fuite de b vers c où la nucléation est plus efficace. En bas, trace temporelle des coups détectés dans les trois sites et interprétations.

nable et ce phénomène intervient par deux fois. Les molécules qui s'étaient accumulées dans le site **b**, sans former d'"agrégat", ont migré vers le site **c** où la cohésion est plus efficace et la formation plus avancée. Sur la figure 2.21, on peut ainsi suivre le passage des molécules de **b** vers **c** en suivant les images obtenues entre t'_1 et t'_4 sélectionnées pour illustrer ce phénomène. L'intensité des quelques pixels correspondant au site **b** sur l'image obtenue en t'_1 se répartit sur une zone plus importante, vers le site **c** (images en t'_2 et t'_3). En t'_4 , le site **c** a gagné en intensité ce que le site **b** a perdu. Un "agrégat" finira pourtant par se former dans le site **b**, mais avec un retard.

Il est intéressant de remarquer que dans les sites **a** et **c**, dans lesquels la nucléation est efficace, les molécules initiales ont émis pendant une durée plus importante que dans le site **b**. Les sites privilégiés semblent donc aussi stabiliser les molécules, et abaisser leur probabilité de photoblanchiment.

phénomène induit sous excitation Il est important de remarquer, que ces objets ne sont observés— dans des conditions telles que leur définition, c'est-à-dire leur distinction d'avec les molécules uniques soit non-ambiguë— que sous irradiation, et plus précisément après une durée relativement importante sous irradiation. Au début des films— ce qui revient à observer une zone non-irradiée— on ne trouve jamais de tels objets. Les "agrégats" sont absents des zones non explorées, et les rares objets dont l'assimilation à une molécule unique peut être ambiguë et qu'on ne peut exclure comme étant, sinon un cristal, au moins un amas de quelques molécules, ne montrent définitivement pas le même comportement que les "agrégats". En particulier, on ne note pas d'augmentation de l'intensité émise au cours de l'étude, celle-ci reste stable sous irradiation, les amas ne croissent ni ne s'étendent.

L'irradiation est donc nécessaire à la formation des "agrégats" étudiés dans cette section. Deux hypothèses peuvent être formulées en considérant les effets induits par l'illumination laser grand champ.

La première hypothèse concerne l'effet d'échauffement local induit par l'irradiation. Cet effet contribuerait à augmenter la mobilité des molécules, qu'elles soient ou non en solution. Cependant, aux faibles intensités d'excitation utilisées, l'échauffement créé ne correspond qu'à une augmentation très limitée de la température du solgel dont une des applications est celle de milieu actif de laser tout solide, ce qui suppose l'utilisation de puissances bien supérieures sans modification ou altération rapide du matériau, la capacité thermique du matériau solgel est faible. L'irradiation participe toutefois certainement à un vieillissement induit des films, par exemple par évaporation progressive du solvant résiduel et stimulation de la réticulation. Ce mécanisme est susceptible alors d'entraîner les molécules vers des sites en cours de clôture dans lesquels elles se retrouveraient piégées.

Si l'effet d'activation de l'irradiation était lié à l'accélération de la diffusion moléculaire induit par l'échauffement laser, l'agrégation devrait se déclencher rapidement après le début

2.3. Diffusion spatiale et phénomène de nucléation moléculaire : deux phénomènes observés grâce à la détection multicanal

de l'irradiation, ce qui n'est pas le cas. On observe au contraire que l'activation ne se fait qu'après photoblanchiment de la majeure partie des molécules présentes initialement, ce qui demande— même à température ambiante— plusieurs dizaines de minutes. De plus, le phénomène d'agrégation— ou tout du moins la présence d'"agrégats"— aurait aussi du être observé sans nécessité d'irradiation dans les échantillons étuvés, car l'étuvage correspond à un échauffement certainement comparable si ce n'est supérieur à celui induit par le laser. Enfin, le point le plus important qui suggère que le rôle d'augmentation de la température sur la diffusion moléculaire induit par le laser n'est pas l'effet qui rend l'irradiation nécessaire à la formation des agrégats, est que si il existe bien un effet de l'irradiation sur la température de l'environnement (comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent), ses conséquences sur l'agrégation sont subtiles : pour être significatives, un écart de plusieurs dizaines de degrés, est nécessaire et on observe encore une agrégation efficace à 0°C . Le laser ne peut au plus faire varier la température d'une zone suffisamment étendue que de quelques degrés, alors que nous avons vu que l'agrégation n'est totalement bloquée qu'à -195°C . L'effet d'échauffement laser interviendrait donc surtout par sa composante de réticulation et la formation de sites-pièges favorisant la nucléation.

Le seul mécanisme de modifications de la structure du film sous irradiation ne peut expliquer le processus de nucléation observé. L'irradiation joue un autre rôle dans la "photoinduction" de l'agrégation.

La formation de ces objets ne s'amorce qu'après une longue durée d'irradiation, après donc le photoblanchiment de la quasi-totalité des molécules de départ. Seules persistent des molécules assez singulières comparées à l'ensemble des molécules du fait de leur très longue durée d'émission et du nombre total important de photons émis. Le phénomène d'agrégation suppose une source efficace de molécules mobiles, soit l'existence de molécules qui diffusent jusqu'au site privilégié. Ces molécules peuvent être présentes dans la zone d'étude dès le début du film mais elles peuvent aussi venir des zones périphériques. Plus on progresse dans l'acquisition des films grand champ, plus le nombre de molécules qui parvient dans la zone d'intérêt est important et plus la proportion de ces molécules excitées augmente. De façon visuelle, cet effet se traduit par l'observation d'une constellation de points brillants dont la localisation varie d'une image à l'autre, et qui ressemble à une "pluie" d'objets brillants.

Le fait que l'agrégation ne démarre pas dès le début de l'irradiation, est en faveur de l'hypothèse que la nucléation a lieu à partir des molécules dans un état excité. Ces molécules peuvent alors photoblanchir ou participer à la formation d'un germe d'"agrégat", lui même sensible aux mécanismes de photoblanchiment, en particulier lorsqu'il n'est constitué que de deux ou trois molécules. De plus, il faut pour constituer le germe d'agrégat qu'au moins deux molécules excitées soient proches spatialement, ce qui est un événement peu probable. On a donc un effet retard, qui correspond aux faibles probabilités de ces deux événements : la survie

des petits germes et la proximité spatiale de molécules excitées. Cela explique l'apparition relativement tardive des objets que nous nommons "agrégats", dont la croissance ne débute de manière efficace qu'après que celui-ci ait atteint une taille critique. Cette hypothèse peut de plus être rapprochée de l'observation de sites privilégiés de nucléation : en plus d'être alimenté de manière efficace en molécules et en plus de la nécessité d'une barrière de diffusion, le site doit présenter un espace libre suffisant pour accueillir un objet dont la taille est plusieurs fois celle des molécules.

On peut conclure raisonnablement également que les composants élémentaires des agrégats formés ont la même nature chimique que les molécules de pérylène orange. En effet, l'absorption de ces objets se fait de manière efficace à la longueur d'onde employée pour exciter les molécules individuelles, et la voie de photoblanchiment offerte sous air reste très efficace.

A ce stade, il est très difficile de comprendre quels sont les effets, induits par exemple par les variations de puissance et de température, prédominant pour le processus d'agrégation. Nous avons vu qu'il semble en effet exister des sites privilégiés de nucléation ; comment découpler alors la dépendance de site des autres paramètres expérimentaux ? Les propositions émises dans ce manuscrit ne peuvent être considérées au plus que comme des pistes, et la compréhension du phénomène demanderait donc de poursuivre plus avant les études.

2.4 Nanospectroscopie— Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

C'est l'analyse de la dynamique- temporelle et spectrale- d'émission des photons de fluorescence, effectuée individuellement pour chaque objet, qui permet d'exploiter l'avantage fourni par la nanospectroscopie : distinguer les individus et certains comportements spécifiques traduisant la nature des interactions locales et donc les propriétés nanométriques du milieu. Dans ce but, et parallèlement au suivi de l'émission des molécules par l'imagerie grand champ de fluorescence, une partie du signal détecté a été envoyé vers un spectromètre. Cela m'a donc permis, sinon d'analyser spectralement toutes les molécules présentes dans la zone d'éclairement— car il n'est possible d'étudier à la fois qu'une ou deux molécules dont l'émission est suffisamment intense pour fournir un bon rapport signal sur bruit après dispersion sur le réseau— d'enregistrer le spectre de fluorescence d'un certain nombre d'objets individuels.

Bien que le pérylène orange soit un colorant qui, depuis sa synthèse, a été largement utilisé pour ses propriétés d'émission— et par exemple comme colorant laser— très peu d'études se sont attachées à la fluorescence même de cette molécule. Ainsi est-il très difficile de trouver dans la littérature ses spectres d'absorption ou d'émission, que ce soit en solution ou dans

2.4. Nanospectroscopie– Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

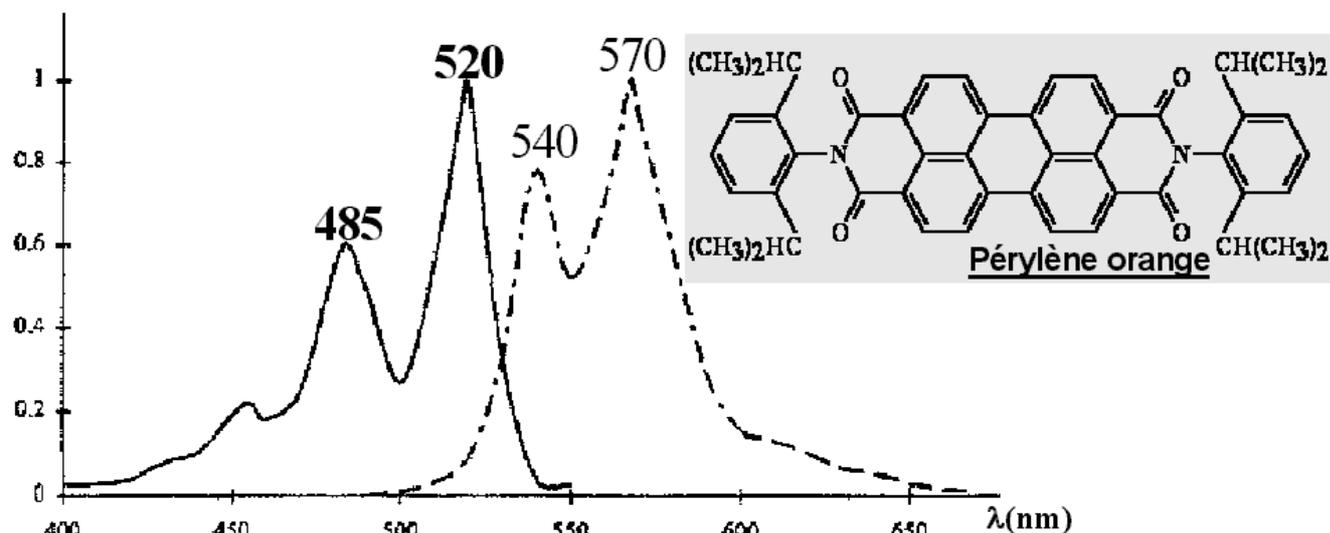


FIG. 2.22 – Caractéristiques de la molécule étudiée : Structure, spectres d'absorption et d'émission de fluorescence (tirets) [68] du pérylène orange.

les différentes matrices (polymère et solgel) dans lesquelles le pérylène orange a été inséré. Il apparaît pourtant– et comme on peut le remarquer sur la figure 2.22 sur laquelle sont présentés les spectres d'absorption et d'émission du pérylène orange [68]– que ses propriétés semblent être remarquables et se distinguent de celles des autres colorants. En effet, et comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, de nombreux colorants, telle la rhodamine 6G mais aussi les autres colorants de la famille des xanthènes, des oxazines par exemple (cresyl violet, Nile rouge,...) ainsi que ceux de la famille des pérylènes, présentent des spectres d'absorption et d'émission symétriques, traduisant une symétrie des structures vibrationnelles des états fondamentaux et excités intervenant dans le cycle absorption-émission, et donc le fait que la molécule conserve une conformation similaire dans les états S_0 et S_1 . La structure typique du spectre d'émission de fluorescence de ces colorants est ainsi assez "simple", avec une bande dite "à zero-phonon"⁸ intense et, à une longueur d'onde plus importante, une bande plus large et moins intense dite bande vibronique. Les spectres de référence du pérylène orange se distinguent par contre de cette description. Premièrement, son absorption ainsi que son émission ne présentent pas un mais deux maxima bien séparés. On observe donc une structure à double bande avec, en outre, pour chacune et plus ou moins proche de la bande de plus basse énergie– parfois dans le pied de cette dernière– une bande plus large et d'intensité plus modeste. Sur la figure 2.22, on remarque aussi une seconde différence importante par rapport aux spectres des autres colorants : Les spectres d'émission et d'absorption ne sont

⁸langage usuel utilisé dans la littérature pour désigner la bande de fluorescence relative aux phonons de plus basse énergie, dont la participation au cours du cycle de fluorescence de la molécule est la plus probable.

pas symétriques. Sur cette figure 2.22, sur laquelle je présente des spectres tels qu'ils sont donnés dans l'article de *M.D. Rahn* [68], outre l'écart en énergie des deux bandes, le rapport d'intensité lui-même est inversé. Sur le spectre de fluorescence, l'intensité relative de la bande de plus faible longueur d'onde centrale est ainsi inférieure à celle située plus haut. Un article récent de *G. Qian et al.* [69], dans lequel les auteurs s'intéressent aux spectres de fluorescence macroscopiques du pérylène orange inclus dans des matrices solgel, présente des spectres de structure similaire. Les matrices utilisées ayant été obtenues à partir de différents précurseurs, les auteurs ont conduit cette étude afin d'essayer de distinguer et de connaître les variations des propriétés de cette matrice en fonction de la composition initiale du sol. Les différents spectres obtenus par *G. Qian et al.* présentent tous une structure double bande, par contre les intensités relatives des deux bandes n'obéissent pas dans tous les cas à la même relation de proportionnalité que celles des spectres de *Rahn*. Plus précisément, on observe que la bande d'énergie la plus faible présente l'amplitude la plus importante dans les cas des solgels de précurseurs ormosils VTES (vinyltriéthoxysilane) et MTES, alors que le rapport d'intensité est inversé sur le spectre du pérylène orange inclus dans un solgel ne possédant *a priori* pas de groupements organiques intacts puisqu'obtenu en partant du TEOS. A nouveau, et outre le fait que les spectres présentés dans ces deux articles sont macroscopiques, l'origine des deux bandes n'est pas discutée. Etant donné le caractère macroscopique des spectres de référence, il n'était pas possible de savoir si par exemple ces deux bandes ne traduisaient pas la présence de molécules subissant deux types d'interactions différentes avec leur environnement, et donc séparables en deux familles masquées par un effet de moyenne. L'observation des spectres de molécules uniques offre une occasion de répondre à cette question.

2.4.1 Description et exploitation des spectres expérimentaux

La figure 2.23 présente un échantillon représentatif de la soixantaine de spectres de fluorescence de molécules uniques de pérylène orange en film solgel mince, enregistrés au cours de nos études. Les 18 spectres présentés correspondent à autant de molécules individuelles. Sur cette figure sont aussi présentées les courbes d'ajustement total (en rouge), les différentes composantes (lorentziennes violettes), ainsi que le résidu de l'ajustement (en gris), un tel ajustement par utilisation de plusieurs lorentziennes étant un modèle classiquement utilisé pour modéliser la fluorescence de molécules uniques. Tous les spectres présentés ont été enregistrés à basse température— porte-échantillon refroidi à l'azote liquide, température mesurée à -100°C — pour des durées d'acquisition variables— de 5 à 30 secondes— en raison des différences d'intensités d'émission des différentes molécules et pour obtenir un rapport signal sur bruit satisfaisant dans chacun des cas.

La première observation que l'on peut faire à partir de la figure 2.23 est qu'il existe une

2.4. Nanospectroscopie – Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

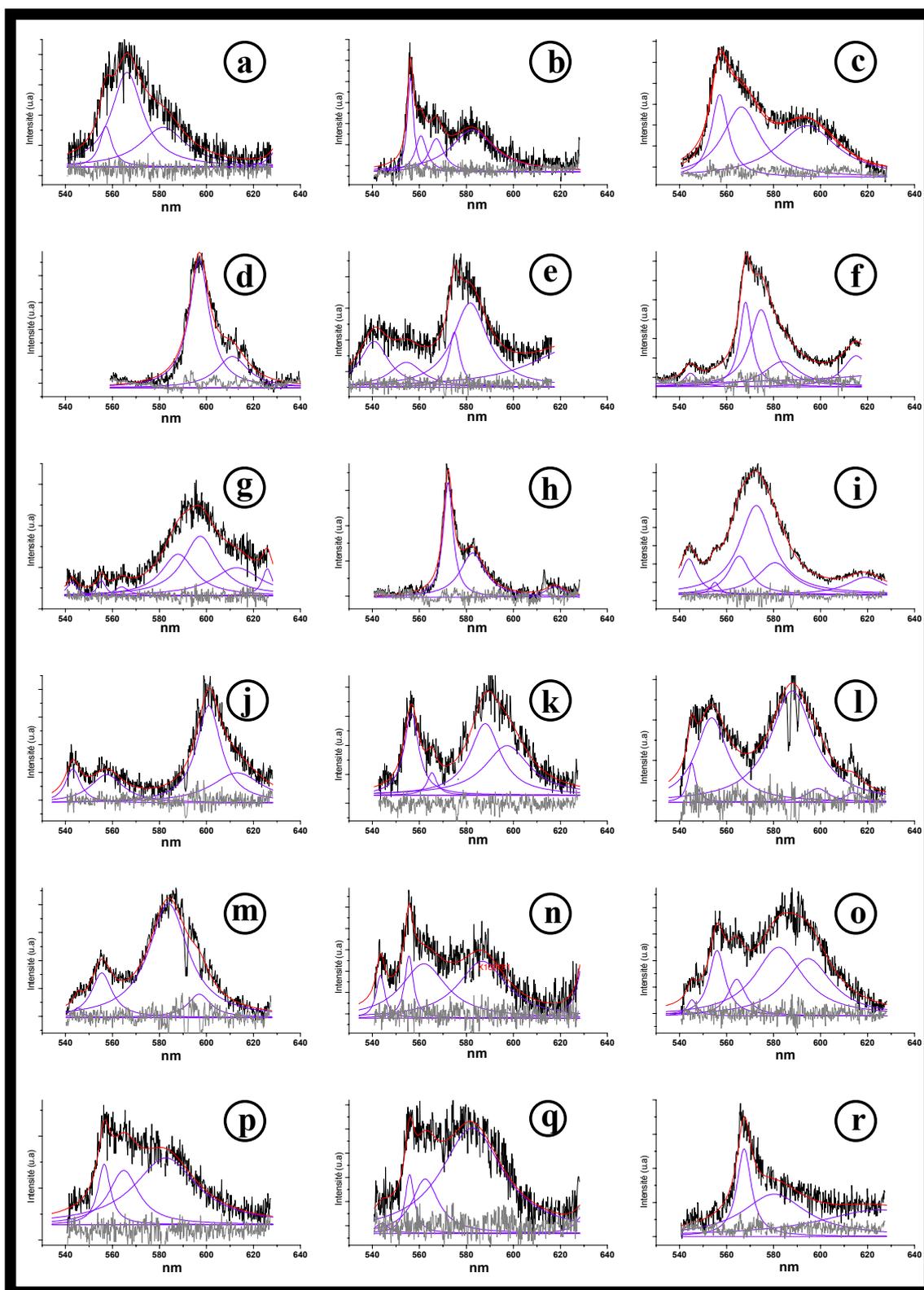


FIG. 2.23 – Spectres de fluorescence de molécules individuelles de pérylene orange incluses dans un film sol-gel mince. Les spectres présentés ont été choisis pour permettre une vue globale de la distribution des caractéristiques spectrales observée sous froid (-100°C).

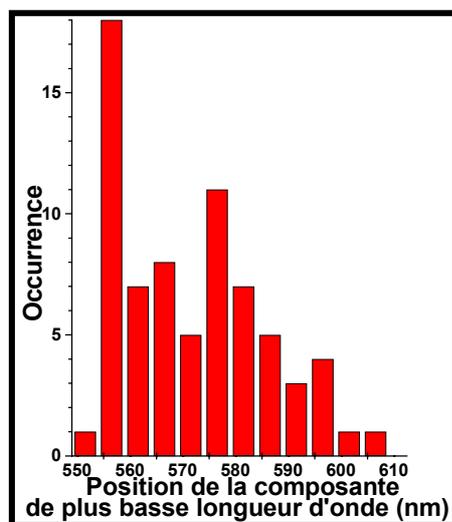


FIG. 2.24 – Statistiques des spectres de molécules individuelles : histogramme des positions des maxima de fluorescence (en nm) sur l'ensemble des spectres sous froid enregistrés.

large distribution de spectres différents. On note effectivement des variations aussi bien de structure– nombre de composantes, largeur à mi-hauteur– que de position dans la dispersion en énergie de l'émission de fluorescence de ces molécules de nature chimique identique. En traçant l'histogramme (figure 2.24) de la longueur d'onde de la transition de fluorescence de plus grande énergie sur l'ensemble des 65 spectres enregistrés, la dispersion en longueurs d'onde est aussi très nette. Même s'il existe indubitablement des événements plus fréquents (autour de 557 et 578nm), l'ensemble est effectivement réparti sur une gamme allant de 548 à plus de 600nm. Cependant, les différences observées entre les différents spectres concernent non seulement la longueur d'onde d'émission mais aussi et de façon majeure leur structure même. L'analyse efficace des spectres requiert donc un "classement" préalable ; on peut alors tenter de définir des familles à l'intérieur desquelles plusieurs paramètres décrivent correctement les individus. Une approche consiste à considérer la structure des spectres et donc les composantes qui ont été nécessaires à un bon ajustement du spectre expérimental. Nous considérerons ici deux familles distinctes dans le cadre desquelles on peut effectuer la description suivante des 18 spectres présentés.

Certaines molécules présentent des spectres d'allure "classique" pour des colorants, avec une décomposition possible en un pic principal et, peu éloignée à plus haute longueur d'onde, une bande plus large d'intensité-pic plus modeste. Sur la figure 2.23, les spectres **a**, **d**, **f**, **g**, **h**, **i**, **j**, et **r** peuvent être regroupés sous cette description, et l'écart entre les deux composantes de la structure est alors un paramètre constant du groupe, typiquement compris entre 10 et 15nm. Mais malgré cet écart caractéristique, on peut extraire des différences notables à l'intérieur même de ce groupe. Ainsi, la comparaison entre les spectres **d** et **h** par exemple

2.4. Nanospectroscopie– Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

fait apparaître à la fois une différence dans la largeur des "sous-bandes"– le spectre **h** est plus fin, les deux lorentziennes de l'ajustement sont moins larges que celles utilisées pour le spectre **d**– et un décalage notable de la position des maxima d'émission, la molécule de spectre **d** présentant une fluorescence de longueur d'onde "très rouge", avec un maximum à $597nm$ contre $572nm$ pour le spectre **h**.

La seconde famille qu'il semble raisonnable de définir est celle à laquelle nous ferons référence dans la suite comme celle des spectres double bande, nommément les spectres **b**, **c**, **e**, **k**, **l**, **m**, **n**, **o**, **p**, et **q** de la figure 2.23. Ces spectres ont pour caractéristique commune de présenter deux bandes bien séparées en longueur d'onde, avec un écart beaucoup plus important que celui définissant les deux sous-bandes de la famille précédente, mais très bien défini et relativement constant de l'ordre de $29nm$. Quelle que soit la bande considérée, on remarque aussi que sur l'ensemble des spectres de ce type, et contrairement aux spectres mono bande, leur position est très stable, la dispersion en longueur d'onde est très faible puisqu'on trouve une répartition très piquée de la première bande autour de $557nm$, et une répartition légèrement plus large autour de $586,5nm$ pour la seconde. L'ajustement de chacune des deux bandes conduit en outre à retrouver pour chacune la sous-structure de la bande unique de la première famille. Pour tous les spectres de cette famille on remarque enfin que la première bande est toujours environ moitié moins large– largeur à mi-hauteur de 4 à $15nm$ – que la bande de plus haute longueur d'onde. La caractéristique qui fluctue par contre beaucoup au sein de cette famille est le rapport d'intensité entre les deux bandes. Pour la plupart, c'est la bande de plus basse longueur d'onde qui présente l'intensité-pic et l'amplitude globale les plus importantes. C'est ainsi le cas des spectres **b**, **c**, **n**, **p**, et **q** de la figure 2.23. Mais on observe aussi des spectres sur lesquels le rapport d'intensité des deux bandes est pratiquement inversé, et la seconde bande est sinon plus (ex : spectre **m**), au moins aussi intense que la première (ex : spectre **q**).

En considérant donc l'existence de deux familles distinctes, on peut à présent reconstruire l'histogramme 2.24, en séparant les spectres mono bande des spectres double bande. On obtient alors les histogrammes de la figure 2.25.

On observe donc pour les molécules de pérylène orange dopant nos échantillons de films solgel minces un grand nombre de spectres qui diffèrent, non seulement par la longueur d'onde d'intensité maximum des bandes mais aussi par leur structure. Tous ces spectres correspondant à une seule et même espèce chimique, le pérylène orange, une telle distribution traduit une hétérogénéité du milieu, et le fait qu'il existe donc un nombre important de nanoenvironnements différents échantillonnés par la molécule unique qui nous transmet cette information à travers son émission de fluorescence. Pour analyser plus précisément l'ensemble des spectres et comprendre l'hétérogénéité de l'échantillon qu'ils reflètent, nous discuterons de deux points particuliers. D'une part, nous nous intéresserons aux effets induits par l'en-

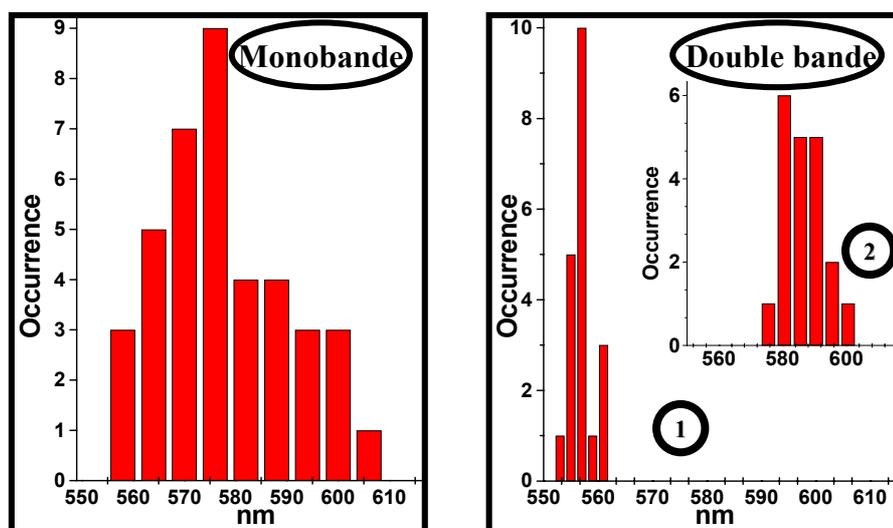


FIG. 2.25 – Statistiques des spectres de molécules individuelles, avec distinction de deux familles distinctes : à gauche, histogramme des positions des maxima de fluorescence (en nm) des spectres monobandes, à droite histogramme de la première et de la seconde (encart) bande des spectres double-bande.

vironnement sur les caractéristiques— par exemple la position du maximum d'émission— de spectres d'une structure donnée. D'autre part, nous traiterons plus précisément du cas des spectres double bande, et de la(des) raison(s) de l'existence d'une seconde bande d'émission de fluorescence pour le pérylène orange.

2.4.2 Discussion

Effets de l'environnement local Afin de pouvoir distinguer des hétérogénéités locales dans un échantillon, et de distinguer les effets d'une différence de nano-environnement des molécules sur leur comportement spectral d'émission de fluorescence, *Higgins* utilise un modèle⁹ permettant de découpler les phénomènes intramoléculaires des phénomènes externes [71]. Dans le cadre de ce modèle, on peut ainsi écrire les fréquences d'absorption et d'émission de fluorescence, $\bar{\nu}_{abs}$ et $\bar{\nu}_{fluo}(cm^{-1})$, sous la forme :

$$\bar{\nu}_{abs} = \Delta G^\circ + \lambda_{0i} + \lambda_i \text{ et } \bar{\nu}_{fl} = \Delta G^\circ - \lambda_{0i} - \lambda_i. \quad (2.20)$$

λ_{0i} est l'énergie de réorganisation externe de l'environnement imposée par la modification du moment dipolaire de la molécule de colorant après absorption d'un photon, λ_i l'énergie de réorganisation intramoléculaire des colorants associée à une absorption particulière, et ΔG°

⁹modèle dérivé de la théorie de Marcus [70].

2.4. Nanospectroscopie— Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

l'énergie de transition après totale relaxation des dipôles de l'environnement. Par rapport au cas des solutions, lorsque la molécule se trouve dans une matrice type polymère, on a en même temps un déplacement de l'émission vers les basses longueurs d'onde, et un déplacement vers le rouge de l'absorption. Cet effet est à rapprocher de celui de rigidochromisme qui a lieu lors d'un refroidissement lent d'une solution jusqu'à solidification. Les mouvements de réorientation de l'environnement autour de la molécule sont alors largement restreints par rapport au cas d'un solvant liquide. Par contre, comme dans le cas d'un solvant, les paramètres ΔG° et λ_{0i} peuvent être utilisés pour caractériser les propriétés des environnements locaux que l'on trouve dans les films solides. ΔG° peut être interprété comme décrivant la polarité "statique" de l'environnement local. λ_{0i} est l'énergie associée à la relaxation du système molécule dopante-cage (dans le sens solvation) durant le temps de vie de l'état excité. Ainsi, on peut la considérer comme reflétant la rigidité locale du milieu dans lequel se trouve la molécule qui fluoresce. λ_{0i} dépend aussi de la polarité de ce milieu. Si on considère ce dernier comme un continuum— c'est-à-dire qu'on peut le définir par une constante diélectrique réelle, en excluant les effets sur cette constante d'interactions spécifiques entre la molécule et le milieu— on s'attend à ce que λ_{0i} prenne des valeurs plus faibles dans des environnements peu polaires. Par rapport à un milieu relativement polaire, on s'attend donc dans un milieu de polarité moindre à observer une émission de fluorescence de plus haute fréquence $\bar{\nu}_{fl}$, soit de plus faible longueur d'onde et donc à observer un déplacement vers le bleu de l'émission. A titre d'exemple, pour un colorant de la famille des pérylènes, le DBPI¹⁰, *Burgorff et al.* ont observé un déplacement de 541 à 535nm de la fluorescence entre une solution d'éthanol et de THF [72].

Comme dans les solvants, c'est à travers la formation de liaisons hydrogènes que l'on peut s'attendre à une interaction forte entre la molécule et le milieu environnant. Dans le cas de matériau solgel, le site de formation privilégié de telles liaisons peut être offert par la présence de groupements silanols résiduels. Cette hypothèse a été largement utilisée par la communauté pour décrire la polarité des sites des molécules dopant le matériau solgel, et expliquer les déplacements spectraux de la fluorescence des colorants observés dans le cadre d'études macroscopiques et "nanoscopiques"[50, 69, 73, 71, 74]. Ainsi, on peut trouver dans la littérature des études nous permettant de mieux appréhender et quantifier l'ordre de grandeur des déplacements de l'émission de fluorescence qu'il est raisonnable d'attendre avec des variations de la polarité de l'environnement des molécules. Nous avons déjà discuté des résultats macroscopiques de *Qian et al.* sur des échantillons solgel dopés pérylène orange ; ceux-ci trouvent plus précisément un déplacement vers le bleu de 20nm (de 560 à 540nm) de la première bande de fluorescence entre l'échantillon solgel TEOS et le solgel pur ormosil MTES [69]. *Lam et al.*, en comparant la fluorescence de l'erythrosinB dans l'eau et dans un

¹⁰N-N'-bis(2,5-di-tert-butylphenyl)-3,4 :9,10-perylenebis(dicarboximide)

échantillon solgel de TMOS, constatent une augmentation de plus de 30nm de la longueur d'onde d'émission [75]. Dans une étude effectuée sur des échantillons préparés à partir de nombreux précurseurs différents, *Matsui et al.* observent que les maxima de fluorescence du Nile rouge dans des solgels frais TEOS et TMOS sont identiques (634nm), mais que dans un solgel MTES le maximum est décalé à 630nm, et plus bas encore dans un solgel HTES¹¹. L'écart est d'autant plus important pour les films plus âgés, et les positions observées, respectivement pour les précurseurs TEOS et MTES, sont de 665 et 604nm après deux mois, 652 et 599nm après un an [76]. Enfin, *Higgins* observe un déplacement du centre de la distribution des longueurs d'onde des maxima des spectres d'émission de molécules uniques de Nile Rouge pour des solgels de composition mixte TEOS/ormosil (BTMOS) avec le pourcentage de chacun des précurseurs [67] : cette distribution, centrée à 609nm pour 10% de BTMOS, se déplace ainsi à 599nm dans l'échantillon à 65% de BTMOS. On peut aussi noter que pour le pourcentage en BTMOS le plus important dont les données sont présentées, soit 75%, on peut calculer que la distribution elle-même s'étale sur 30nm pour les molécules de cet échantillon.

Dans toutes ces études, il apparaît, comme on pouvait l'attendre, que l'introduction en mélange ou seul, d'un précurseur ormosil tend à diminuer la polarité moyenne du solgel : l'utilisation des précurseurs tétrafonctionnels d'alkoxide de silicium, qui possèdent quatre groupements silanols après hydrolyse va effectivement induire une probabilité de présence de fonctions OH résiduelles plus importante que les ormosils qui n'offrent que trois de ces groupements après l'hydrolyse.

La dispersion en énergie des spectres observés dans notre étude, et en particulier, les spectres dits mono bande dont la large distribution est bien visible sur l'histogramme de gauche de la figure 2.25, traduirait donc le fait qu'il existe dans les films solgel que j'ai étudiés, des nanoenvironnements de différentes polarités. Très peu de molécules ont des spectres centrés à très haute longueur d'onde (590nm), et on trouve majoritairement des molécules de spectre mono bande qui émettent autour de 575nm. Une différence importante existe par contre dans nos études par rapport à celles d'*Higgins* par exemple : dans notre cas aucun mélange de précurseurs n'a été utilisé pour synthétiser les films minces, mais uniquement l'ormosil MTES. On ne peut donc pas associer l'hétérogénéité de l'échantillon à l'existence dans le même échantillon de siloxanes tétra ou trifonctionnels qui induisent des probabilités de présence de silanols résiduels et des zones de condensation (ou réticulation-cross-link) différentes. Il s'agit donc uniquement d'hétérogénéités liées à la condensation du MTES après hydrolyse.

¹¹HTES pour HSi(OEt)₃

2.4. Nanospectroscopie— Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

origine des spectres Il n'existe pratiquement pas dans la littérature de données sur les spectres d'émission du pérylène orange, malgré les nombreuses études sur cette espèce moléculaire. Pourtant, le comportement singulier de cette molécule apparaît immédiatement par la dissymétrie de ses spectres d'absorption et d'émission, enregistrés par exemple en solution dans l'acétate d'éthyl. Une telle observation suggère que les états fondamental et excité puissent avoir des structures différentes. Une reconformation est un processus qui rend la molécule particulièrement sensible à son environnement. L'étude spectrale que j'ai menée sur des molécules uniques a permis d'obtenir une variété de spectres qui traduisent l'hétérogénéité du film sol-gel et qui représentent une richesse d'information qui n'aurait pas pu être obtenue par une analyse macroscopique de l'échantillon. L'analyse de ces situations offre une occasion intéressante de progresser dans la compréhension des processus à l'origine des caractéristiques inhabituelles de son émission et de la nature des sites occupés par la molécule.

Pour aborder cette analyse, j'ai entamé une recherche ciblée dans la littérature d'exemples pour lesquels un spectre de fluorescence présentant deux bandes résolues avait été observé, et je me suis intéressée aux conditions particulières dans lesquelles une émission de ce type pouvait être obtenue. De tels exemples sont assez rares. Ils concernent le Nile rouge [71, 74], un dérivé bi-substitué du diphényl [77] et enfin la molécule de DiIC₁₂ dont l'étude a été réalisée en mode molécule unique [78]. Ces colorants présentent tous un spectre de fluorescence « classique » avec une bande unique large (de l'ordre de 1000cm^{-1}) accompagnée d'une bande plus large et peu intense vers les plus grandes longueurs d'onde dans des solvants usuels, comme le méthanol ou l'éthanol. Par contre, dispersés dans des environnements très peu polaires, le spectre de leur fluorescence présente une double bande, d'un type analogue à celui observé dans certains environnements du film sol-gel pour le pérylène orange. Dans le cas du Nile rouge et du dérivé biphényl, le solvant utilisé était du n-hexane, très apolaire. *Rettig* a montré qu'il existait une corrélation entre la polarité de l'environnement de l'émetteur et l'apparition d'un spectre avec deux bandes résolues. Seul un milieu très apolaire autorise cette observation [77]. *Rettig* a en effet réalisé une étude systématique de l'allure du spectre de fluorescence du dérivé du biphényl en solution, dans une large gamme de solvants choisis, selon une échelle de polarité croissante du n-hexane au diméthylformamide. Seuls les spectres enregistrés en présence du n-hexane présentent cette structure. Une étude antérieure, réalisée par *Laguitton-Pasquier et al.* [79], relevait déjà une telle apparition de raies résolues sur les spectres de fluorescence du bianthryl et d'un de ses dérivés disubstitués¹² en milieu apolaire comme le cyclohexane, tandis que dans les solvants plus polaires comme le DMSO (et même dans le chloroforme) le spectre présente une enveloppe plus large. Effectivement, pour ces deux espèces, dans un solvant polaire, la fluorescence a lieu majoritairement depuis un état

¹²le dérivé étudié est le bis 9,9'-(2-ethyl-10-hexyl)anthryl [79].

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

de transfert charge, favorisé par un tel milieu, et dont les caractéristiques d'émission (position et largeur des bandes) dépendent fortement de la nature du milieu dans lequel se trouve la molécule. Les auteurs mettent aussi en évidence, en plus d'un déplacement vers le rouge de l'émission avec l'augmentation de la polarité du solvant, un élargissement de type inhomogène des bandes, lié à une augmentation des interactions soluté-solvant.

Comme le proposent aussi *Laguitton-Pasquier et al.*, l'interprétation de *Rettig* pour la présence de bandes résolues sur les spectres du dérivé biphenyl en milieu apolaire [77], est que la structure vibrationnelle, masquée par l'élargissement dans un milieu polaire, peut être résolue dans un milieu apolaire, et donc que les deux bandes observées correspondent à la structure vibronique de la fluorescence. Dans un milieu apolaire en effet, les molécules de colorant sont en très faible interaction avec leur sphère de solvatation. L'énergie externe de réorganisation, que j'ai introduite précédemment, est peu importante et la largeur des bandes réduite. Cette interprétation prévoit l'observation d'un unique type de spectre double bande présentant une première bande qui correspond à une transition 0-0 plus intense que la seconde, dont l'origine est une transition *a priori* moins probable du type 0-1. C'est effectivement ce type de spectre qui a été observé dans les expériences évoquées précédemment. Elle ne prévoit cependant pas l'observation de spectres pour lesquels l'intensité des deux bandes serait du même ordre de grandeur.

En fait, *Rettig* a lui aussi observé au cours de son étude de la molécule de 4-N,N-diméthylamino-4'-cyanobiphenyl, des spectres double bande s'écartant de ce spectre type et présentant des rapports d'intensité entre les deux bandes modifiés ou franchement inversés [77]. Pour obtenir cet effet, *Rettig* a réalisé une étude par spectroscopie de fluorescence de trois conformères distincts de cette molécule, obtenus sélectivement par voie de synthèse. La différence entre les trois structures est que l'angle entre les plans moléculaires des deux phényles est soit nul (les deux phényles sont dans le même plan), soit "twisté" d'un angle $\theta = 39^\circ$ ou 78° . Les spectres obtenus dans le n-hexane pour ces trois composés présentent comme nous l'avons remarqué, une structure similaire, avec deux bandes de fluorescence. Il existe néanmoins des différences entre ces trois spectres, et les auteurs observent en particulier une diminution du rapport d'intensité avec l'angle de rotation des deux groupements : L'intensité relative de la bande de plus faible énergie (bande rouge) augmente avec l'accroissement de la valeur de l'angle entre les plans des groupements phényle, pour finir par dominer la première bande pour le conformère d'angle le plus important (78°).

Pour expliquer une telle modification, l'hypothèse proposée s'appuie en premier lieu sur la proposition d'une identité de la symétrie de l'état excité depuis lequel la molécule émet pour les trois conformations. *Rettig* propose ainsi que dans tous les cas la molécule émette depuis un état excité dans lequel elle possède une structure plane. Cela implique donc, pour les deux espèces twistées, une reconformation de l'état excité après absorption d'un pho-

2.4. Nanospectroscopie – Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

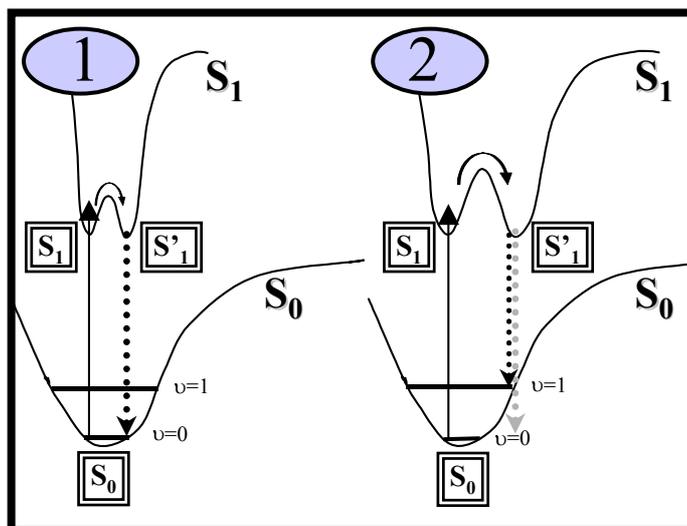


FIG. 2.26 – Représentation schématique du cycle de fluorescence dans le cadre du modèle de reconfiguration de l'état excité proposé par Rettig [77]. **1** : reconfiguration peu importante, le retour vers $S_0(v=0)$ reste majoritaire. **2** : cas extrême d'une reconfiguration très importante, le retour vers $S_0(v=0)$ n'est plus possible.

ton. Dans ce cas, plus l'angle initial est important, plus l'énergie de reconfiguration pour atteindre une conformation plane est élevée et on attend alors (equ. 2.20) une augmentation du déplacement Stokes entre le maxima d'absorption et d'émission. En conséquence, l'émission de fluorescence est plus rouge en échelle de longueur d'onde, ce qui est en accord avec l'expérience. Cette interprétation leur permet d'expliquer le renversement du rapport d'intensité des deux bandes avec θ , comme l'illustre le schéma 2.26. Plus la différence de conformation entre l'état excité atteint après absorption d'un photon et l'état excité émissif $S'1$ (et aussi entre l'état fondamental S_0 et l'état excité reconformé $S'1$) est importante, plus la séparation des coordonnées nucléaires des minima de ces états est élevée. Selon ce degré de modification, sera favorisée la désexcitation vers le niveau vibrationnel $v=0$ de l'état fondamental (première bande) ou vers le niveau $v=1$ (deuxième bande), dans l'approximation de Franck-Condon. Plus la reconfiguration de l'état excité est importante, plus l'intensité relative de la seconde bande deviendra importante. Le schéma de droite (Fig.2.26) illustre le cas extrême, pour lequel seule la deuxième bande d'émission serait observable.

Il existe des arguments forts pour inscrire l'interprétation des données spectroscopiques acquises dans mes expériences sur la molécule de pérylène orange dispersée dans le matériau sol-gel dans le cadre précédent. Le premier concerne la structure de cette espèce. Les chimistes qui ont pour la première fois synthétisé le pérylène orange, ont créé, pour des raisons de solubilité, une molécule dont la structure, contrairement à celle de beaucoup d'autres

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

dérivés du pérylène ou à celle des composés pérylénimides, n'est pas plane [53]. Les deux groupements "périphériques" aromatiques ortho-substitués forment en effet –dans leur structure à l'équilibre– un angle de 90° avec le plan de la structure pérylène ; comme dans le cas du dérivé biphényl étudié par Rettig, il peut sembler réaliste que ces deux groupements puissent se reconformer au cours du cycle de fluorescence.

Le second s'appuie sur les résultats obtenus dans les expériences en mode molécule unique qui ont été conduites dans des matrices sol-gel. Ceux-ci s'accordent sur l'hétérogénéité d'un tel matériau, ce qui implique en particulier l'existence de sites plus rigides ou plus mous, et sur l'existence, avec des proportions qui varient notablement d'un type de sol-gel à l'autre, de sites de polarité variable.

Dans ce contexte, on peut raisonnablement expliquer la diversité des spectres observés, double-bande avec des intensités relatives variables ou mono bande de longueur d'onde centrale étalée sur un domaine spectral étendu.

L'observation de spectres double bande correspondrait à l'existence d'une reconformation de la molécule à l'état excité, pour laquelle l'angle extrême des groupements périphériques serait réduit. Un spectre double bande pour lequel la bande la plus rouge (en longueur d'onde) est dominante, correspondrait à la structure la plus plane de la molécule de pérylène. Au contraire, quand la bande bleue domine le spectre, la reconformation serait moindre. Les spectres pour lesquels les intensités des deux bandes sont équilibrées correspondraient à une situation intermédiaire. Par ailleurs, dans tous les cas, en se fondant sur les conclusions de *Rettig* et de *Higgins*, l'environnement de la molécule serait de type apolaire, milieu qui favorise une reconformation en minimisant les interactions de la molécule avec son environnement. Le temps nécessaire pour enregistrer les spectres de molécules individuelles, compte tenu des contraintes liées au photoblanchiment par exemple, puis pour en faire une analyse fine, ne m'a pas permis d'augmenter le nombre de spectres étudiés. Malgré la statistique limitée du nombre de spectres analysés, il est instructif de voir quelle est la proportion relative des spectres double-bande et des spectres mono bande. Dans l'échantillon réalisé « en aveugle », le pourcentage de spectres double bande s'élève à $1/3$ environ. On peut conclure de cette valeur que le nombre de sites apolaires dans le film sol-gel est relativement important ou encore que les molécules occupent préférentiellement ce type de site. Deux types de sites ont cette propriété, les pores remplis de THF résiduel, et ceux pour lesquels les processus d'hydrolyse et de réticulation ont conduit à l'élimination complète des groupements OH. L'absence de groupements OH dans les sites du film sol-gel est une situation très probable en raison de l'utilisation d'un précurseur ormosil pour lequel on s'attend à ce que les trois groupements silanols participent à la formation de la matrice en intervenant dans des ponts siloxanes.

L'interprétation que je propose pour expliquer ces observations s'appuie sur une analo-

2.4. Nanospectroscopie— Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

gie avec la situation étudiée par *Rettig* pour des molécules qui possèdent des groupements phényl qui peuvent se reconformer. Elle repose sur l'hypothèse que la molécule de pérylène orange "libre" subit une reconformation à l'état excité vers un état S'1 qui correspond à une structure pour laquelle l'angle entre la structure centrale pérylène et les groupements phényl terminaux est réduit.

Sous cette hypothèse, les spectres double bande pour lesquels la bande bleue est prépondérante, majoritaires (50% des spectres double bande analysés), reflètent l'existence de sites apolaires dans lesquels la molécule est contrainte et qui limitent sa reconformation en raison de leur géométrie. Il peut s'agir de sites étroits par exemple, pores de petit diamètre ou constrictions. Cette interprétation est confortée par l'allure de la distribution de la longueur d'onde du maximum de la bande bleue qui est étroite et relativement piquée. L'interaction de la molécule avec son environnement est faible, en accord avec la localisation de la molécule dans un site peu polaire. A l'opposé, les sites pour lesquels le spectre double bande est dominé par la bande rouge sont des sites apolaires plus "larges", dans laquelle la reconformation de la molécule est plus importante, ou même maximale. Les spectres pour lesquels il y a équilibre entre les deux bandes correspondent à des sites de géométrie intermédiaire. La proportion des spectres pour lesquels l'intensité des deux bandes est équilibrée est de l'ordre de 33% du nombre total des spectres double bande. Les spectres dont la bande rouge est dominante, sont minoritaires. Selon cette interprétation, les sites « larges » remplis de THF ou sans groupements OH résiduels seraient moins nombreux que les sites étroits. Une alternative plausible est que les molécules localisées dans de tels sites sont peu fixées et qu'elles diffusent facilement dans la matrice qui, nous l'avons vu, possède des connexions vers la surface. Il n'est pas possible dans ce cas d'enregistrer leur spectre. Les spectres double bande "rouges" seraient la signature de molécules situées dans un type particulier de sites apolaires "larges" : ceux qui sont suffisamment fermés pour empêcher ou freiner leur diffusion.

L'interprétation de *Rettig* n'exclut cependant pas la possibilité que les spectres à deux bandes résolues résultent de l'émission de deux conformères distincts de la molécule. Dans ce cas, chacune des bandes proviendrait de l'émission d'un des deux conformères, dont les états fondamentaux et excités sont différents. Une telle hypothèse suppose que la structure de la molécule oscille dans le temps entre celle des deux conformères, condition nécessaire pour que les deux bandes spectrales soient observées au cours des acquisitions dont la durée est d'une à quelques dizaines de secondes. Cet effet est donc moins probable que celui d'une seule reconformation dans l'état excité.

Essayons d'analyser quelle peut être l'origine des spectres mono bande, à la lumière de l'interprétation des spectres double bande.

On peut remarquer que c'est la situation la plus fréquente (2/3 des spectres), ce qui une nouvelle fois démontre l'hétérogénéité d'un tel milieu. La situation la plus simple à inter-

préter est celle pour laquelle la longueur d'onde de cette bande est dans l'aile bleue de la distribution en longueurs d'onde. Les caractéristiques d'un tel spectre sont compatibles avec une localisation de la molécule dans un site apolaire très étroit ou très déformé, qui bloque complètement la reformation à l'état excité. La molécule n'émet donc que de l'état S_1 et préférentiellement sur la transition 0-0. Quand la bande est rouge, la molécule serait située au contraire dans un site plus polaire, un pore dont les parois sont tapissées de groupements OH résiduels par exemple. L'absence de seconde bande indique en effet que dans ce site, la reformation est bloquée. Le déplacement vers le rouge du spectre serait alors la signature d'un déplacement Stokes dans un milieu polaire. Les interactions entre le pérylène orange et les groupements OH du site sol-gel peuvent mettre en jeu les atomes d'oxygène des groupements carbonyles des cycles imides greffés sur le cœur pérylène, et relativement proches des groupements phényl périphériques. Il est possible que le blocage de la reformation à l'état excité résulte d'un encombrement stérique après formation des liaisons des atomes d'oxygène avec les groupements OH de la paroi du site. Une autre possibilité est que l'encagement de la molécule au moment de la réticulation du matériau bloque la rotation des groupements phényl.

Le très faible nombre de spectres mono bande très déplacés vers le rouge observés accrédite l'hypothèse que la différence de polarité des différents sites des films est liée à l'existence de groupements silanols résiduels dont la probabilité de présence est limitée en raison du précurseur utilisé. Les environnements polaires, bien que présents, seraient peu nombreux. Cette conclusion est également en accord avec les observations d'*Higgins*. Dans l'ensemble de ses études, spectrales ou non, de molécules uniques insérées dans des matrices sol-gel, Higgins a toujours mis en avant que l'utilisation d'un précurseur ormosil induisait un abaissement de la polarité moyenne du milieu [67, 74, 80], la probabilité de présence de silanols résiduels est plus faible qu'avec un précurseur inorganique qui en possède initialement quatre : dans le cas de l'utilisation d'un précurseur ormosil, on s'attend effectivement à ce que les trois groupements silanols participent tous à la formation de la matrice en intervenant dans des ponts siloxanes.

Pour confirmer ces résultats, on peut proposer plusieurs expériences complémentaires. Il faudrait tout d'abord vérifier de façon systématique l'évolution des spectres d'absorption et de fluorescence du pérylène orange en fonction de la polarité de différents solvants en phase liquide. Puis, il serait intéressant de poursuivre l'étude de molécules individuelles de pérylène orange dans un matériau moins hétérogène, comme un polymère par exemple, et d'étudier l'évolution du spectre dans des polymères de différentes rigidités.

2.4. Nanospectroscopie– Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

2.4.3 Suivi temporel des spectres

Dans nos films sol-gel, si on observe qu'un grand nombre de molécules photoblanchissent rapidement, nous avons vu que de nombreuses molécules peuvent aussi émettre pendant des durées très importantes. Ainsi, pour les objets étudiés spectralement, l'enregistrement des spectres successifs, tant que la molécule était active optiquement, nous a permis de suivre– bien qu'évidemment avec une résolution temporelle moindre par rapport à celles des traces temporelles de l'émission totale– l'évolution du spectre de la molécule au cours du temps.

Certaines molécules sont très stables spectralement, qu'elles émettent de manière continue, qu'elles clignotent, ou qu'elles émettent avec un niveau d'intensité variable du signal. Le suivi temporel de quatre molécules de spectre stable est présenté sur la figure 2.27.

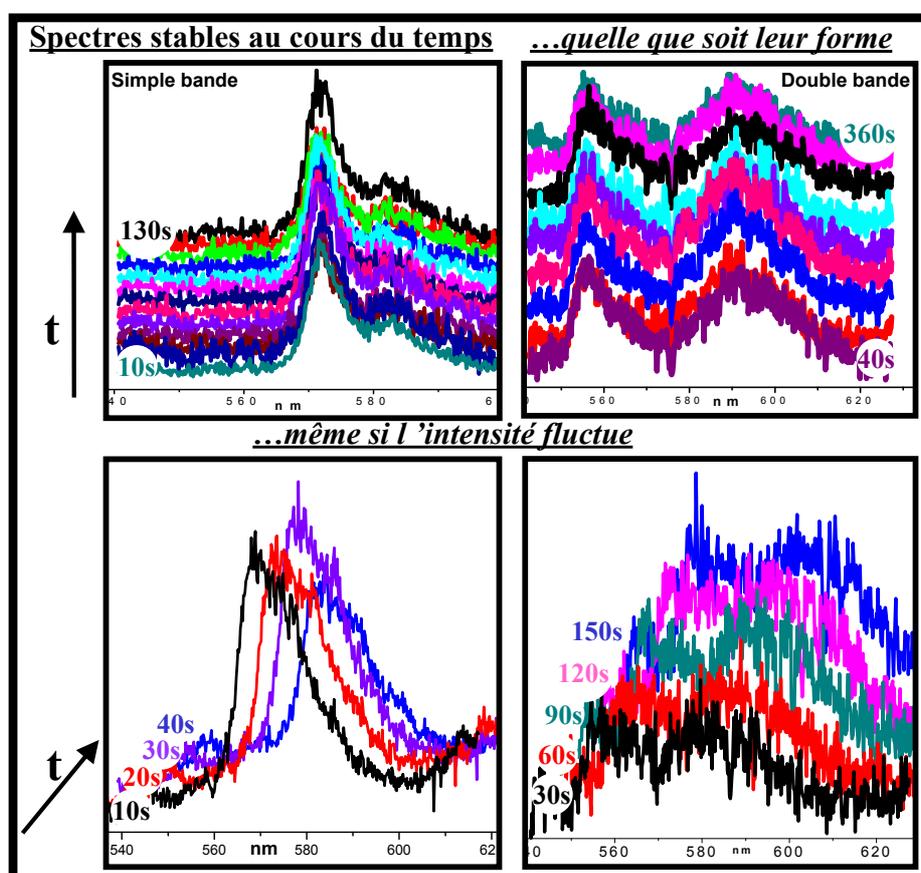


FIG. 2.27 – Evolution au cours du temps (de bas en haut) du spectre de fluorescence de molécules individuelles : cas de 4 molécules dont la structure (mono/double bande, bande majoritaire) et les caractéristiques spectrales (position et intensité relative des bandes) restent stables. Les spectres constituant les deux séries du bas ont été décalés par souci de clarté.

Pour chaque molécule, les spectres préservent leurs caractéristiques de structure– nombre de bandes, intensités relatives des composantes et position– au cours du temps, du premier

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

enregistrement (en bas) au dernier (en haut).

A travers l'exemple des deux premières molécules présentées, on voit qu'il existe des molécules dont l'émission, à l'échelle de la dizaine de secondes, peut être très stable pendant plusieurs minutes : ni la structure, ni l'intensité globale ne fluctuent. Ces molécules peuvent donc être considérées comme "fixées" dans un site donné.

Les deux autres molécules présentées sur la figure 2.27 (ligne inférieure) présentent elles aussi une structure spectrale d'émission constante au cours du temps. On remarque par contre des fluctuations de l'intensité globale : sur l'encart de gauche, on note effectivement une diminution de cette intensité au niveau du second spectre. Sur le spectre suivant, l'intensité a retrouvé son niveau initial, mais l'émission s'atténue à nouveau sur le dernier spectre. La molécule a ensuite disparu, elle a photoblanchi (non présenté). Sur l'encart de droite de la seconde ligne, on remarque une augmentation de l'intensité globale au cours du temps, la molécule est d'ailleurs "apparue" juste au début de l'enregistrement du premier spectre présenté.

Nous avons vu que l'ensemble des spectres présentés par les molécules de pérylène orange incluses dans le film sol-gel constitue une très large distribution de structures différentes. Ces différents types de structures ne sont pas liés intrinsèquement à la molécule, mais au milieu dans lequel la molécule est insérée et aux interactions que celle-ci entretient avec son environnement local. Ainsi, si des molécules – telles que celles dont les spectres successifs sont présentés sur la figure 2.27 – présentent une émission de fluorescence qui préserve une structure spectrale constante, cela signifie que les interactions avec l'environnement, moyennées durant la durée d'acquisition du spectre soit quelques secondes, sont elles aussi en moyenne constantes ou équivalentes. Une telle stabilité spectrale signifie donc que, quelle que soit la nature du site de localisation de la molécule (polaire, mou,...), l'environnement local autour de la molécule est homogène : même si la molécule est capable de diffusion rotationnelle, et peut être aussi translationnelle, les interactions entre la molécule et le sol-gel restent en moyenne les mêmes, il n'existe pas d'hétérogénéités qui modifieraient ces interactions.

Pour expliquer des variations de l'intensité globale sans modifications de structure, comme dans le cas des spectres de la deuxième ligne de la figure 2.27, on peut proposer qu'elles soient liées à un changement d'orientation de la molécule au cours du temps : ce changement entraînerait une baisse ou une augmentation de l'efficacité d'excitation de la molécule. La figure de gauche, illustre le cas d'une baisse d'efficacité : la molécule se réoriente, revient à sa position initiale, se réoriente à nouveau, pour ensuite soit photoblanchir soit peut être n'être plus du tout excitée efficacement. Le cas de droite est le cas inverse : la modification de l'orientation de la molécule la conduit à être excitée de plus en plus efficacement, l'intensité de l'émission augmente en conséquence.

Enfin, il n'apparaît pas que la stabilité spectrale soit liée à un type de spectre particulier.

2.4. Nanospectroscopie – Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

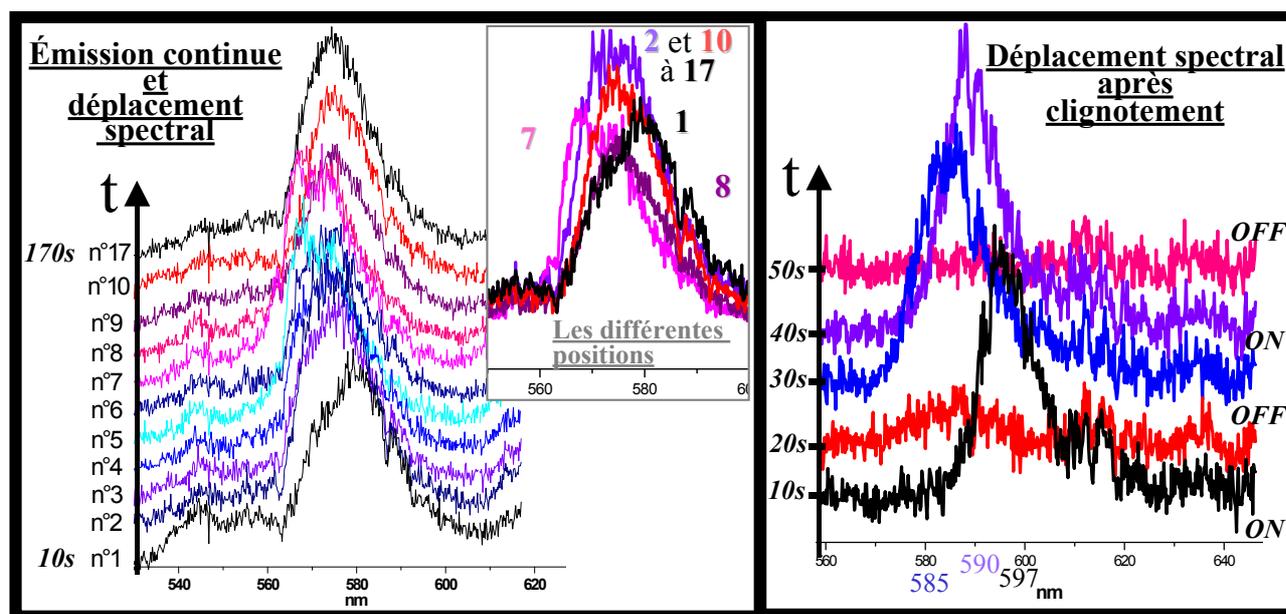


FIG. 2.28 – Evolution au cours du temps du spectre de fluorescence de molécules individuelles : cas de 2 molécules dont la bande de fluorescence se décale en longueur d'onde au cours du temps.

Comme le montre la figure 2.27, on trouve aussi bien des molécules dont les caractéristiques spectrales restent constantes au cours d'au temps parmi les molécules de spectre simple bande que parmi la famille double bande.

Si certaines molécules ont une fluorescence stable au cours du temps, nous avons également observé des molécules qui présentent des modifications spectrales corrélées au comportement dynamique de l'émission, que l'on peut rapprocher à nouveau des fluctuations des interactions molécule-matrice. Les fluctuations des spectres peuvent être séparées en deux catégories : changement dans l'intensité relative d'une ou plusieurs bandes et déplacement spectral.

La figure 2.28 présente deux séries de spectres illustrant une fluctuation de la position en longueur d'onde de la fluorescence.

Sur la série de gauche on note que les spectres successifs présentent de très légers déplacements de la bande de fluorescence de la molécule qui émet de manière continue. L'énergie varie mais l'intensité émise reste constante. Dans l'encart sont reportés quatre des spectres, choisis de manière à mieux discerner les différentes positions. On peut aussi noter que l'évolution vers la position extrême n'est pas continue : les déplacements spectraux, vers les grandes et petites longueurs d'onde, semblent plutôt correspondre à des sauts discrets, et la molécule va et vient entre ces différentes émissions. Sur le premier spectre, la fluorescence est centrée à 580nm et la position la plus extrême est trouvée pour le spectre 7 (ainsi que le cinquième) à 570nm , soit un écart de 10nm . Après la période de fluctuations – du premier au huitième

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

spectre— l'émission devient très stable. L'ensemble des caractéristiques du spectre restent inchangées pendant 80 secondes, avec une bande de fluorescence centrée à $574nm$, puis la molécule s'éteint.

La série de droite présente elle aussi une molécule dont l'émission s'est déplacée dans le temps. Ici le premier saut spectral peut être associé à la dynamique temporelle de l'émission : la molécule s'est effectivement éteinte pendant l'enregistrement du second spectre. Quand elle émet à nouveau (troisième spectre), l'intensité de l'émission est équivalente à celle d'avant le clignotement, mais sa bande de fluorescence est décalée vers le bleu de $12nm$.

Nous avons déjà noté que dans nos expériences, lorsqu'une molécule dopante est considérée comme stable dans le matériau, cela signifie que la diffusion moléculaire de translation est limitée à l'échelle de la résolution du microscope. La diffusion rotationnelle et une translation très locales restent *a priori* possibles. Rappelons en effet que la résolution du microscope ne nous permet pas de distinguer un déplacement nanométrique, alors que les échelles spatiales pertinentes de propriétés spécifiques des domaines (cages, pores ou canaux) semblent justement être d'un tel ordre de grandeur. Dans le cas d'une diffusion rotationnelle ou translationnelle, la molécule explore son environnement local, et on peut s'attendre non seulement à voir les effets de ces mouvements sur l'intensité du signal de fluorescence (excitation laser plus ou moins efficace), et c'est le cas des séries de la deuxième ligne de la figure 2.27, mais une telle diffusion peut aussi amener la molécule à sonder une hétérogénéité très locale de son environnement : les interactions avec le milieu seront modifiées pendant que la molécule explore le site.

Si au cours de la rotation de la molécule ou de sa translation, la possibilité de reconformation reste identique, la structure— mono ou double bande et bande majoritaire— sera préservée mais on attend alors de très légers déplacements spectraux, tels que ceux présentés sur la figure 2.28, qui reflètent l'hétérogénéité locale. Plusieurs études de molécules uniques insérées dans des films polymères montrent de plus que l'ordre de grandeur des vitesses de rotation est de l'ordre de la minute [81][82], ce qui est l'échelle de temps pertinente pour les évolutions spectrales que nous avons observées ; *Bartko et al.* ont aussi observé que plutôt qu'une réorientation continue, la molécule insérée dans une matrice polymère vitreuse a plutôt tendance à procéder par bonds discrets entre orientations préférentielles [82]. L'échelle de temps et la dynamique par sauts de la rotation sont de plus en accord avec la description temporelle des déplacements spectraux observés. On ne peut cependant exclure le fait que ces déplacements pourraient aussi être liés à une diffusion de translation.

Outre des déplacements en longueur d'onde des maxima de l'émission, on note aussi sur les spectres, double bande en particulier, des fluctuations relatives de l'intensité ou de l'amplitude des deux bandes, sans déplacement spectral. On note ainsi l'existence de molécules pour lesquelles ces fluctuations sont très légères tandis que pour d'autres elles conduisent à

2.4. Nanospectroscopie— Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

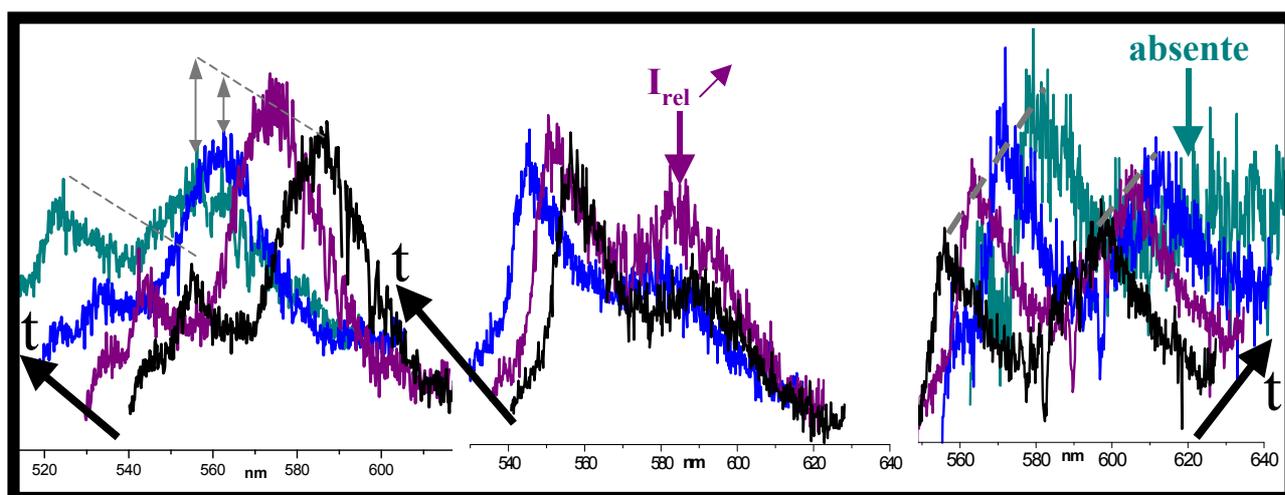


FIG. 2.29 – Evolution au cours du temps du spectre de fluorescence de molécules individuelles : variations des intensités relatives des spectres de 3 molécules "double bande".

une inversion du poids relatif des deux bandes. Parfois aussi on constate la disparition ou l'apparition brutale de l'une ou l'autre des bandes. De tels cas sont présentés sur la figure 2.29.

Sur la première série de cette figure, on constate que la bande de plus haute longueur d'onde voit son intensité chuter sur les troisième et quatrième spectres, après une augmentation sur le second spectre. Dans le même temps, l'autre bande, bien que d'intensité plus modeste ne diminue que très légèrement. Cela conduit à l'observation du quatrième spectre, sur lequel les intensités relatives des deux bandes sont similaires. Enfin la molécule s'éteint.

Sur la série du milieu de la figure 2.29, l'évolution des intensités relatives est différente. Il s'agit à nouveau d'une molécule qui présente un spectre double bande, mais cette fois avec la bande de plus basse longueur d'onde comme composante majoritaire. L'intensité de cette dernière reste stable pendant les trois enregistrements. La bande plus rouge voit quant à elle son intensité croître puis retrouver son niveau initial.

La dernière série présente enfin un cas de disparition totale de l'une des deux bandes.

En accord avec l'interprétation des spectres double bande qui suppose l'existence de plusieurs états d'émission de fluorescence différant par l'angle formé par les groupements phényl terminaux et le coeur pérylène— plus l'angle diffère de la position initial, *i.e.* 90° , plus l'intensité de la seconde bande sera grande (fig. 2.26)—on peut raisonnablement suggérer l'hypothèse qu'au cours du temps la molécule puisse avoir à l'état excité différentes conformations préférentielles. Cette interprétation implique que l'émission dépend du site où se trouve la molécule, qui favorise une conformation vis à vis d'une autre. A nouveau donc, comme pour les déplacements spectraux des molécules de spectre simple bande présentées sur la figure précédente,

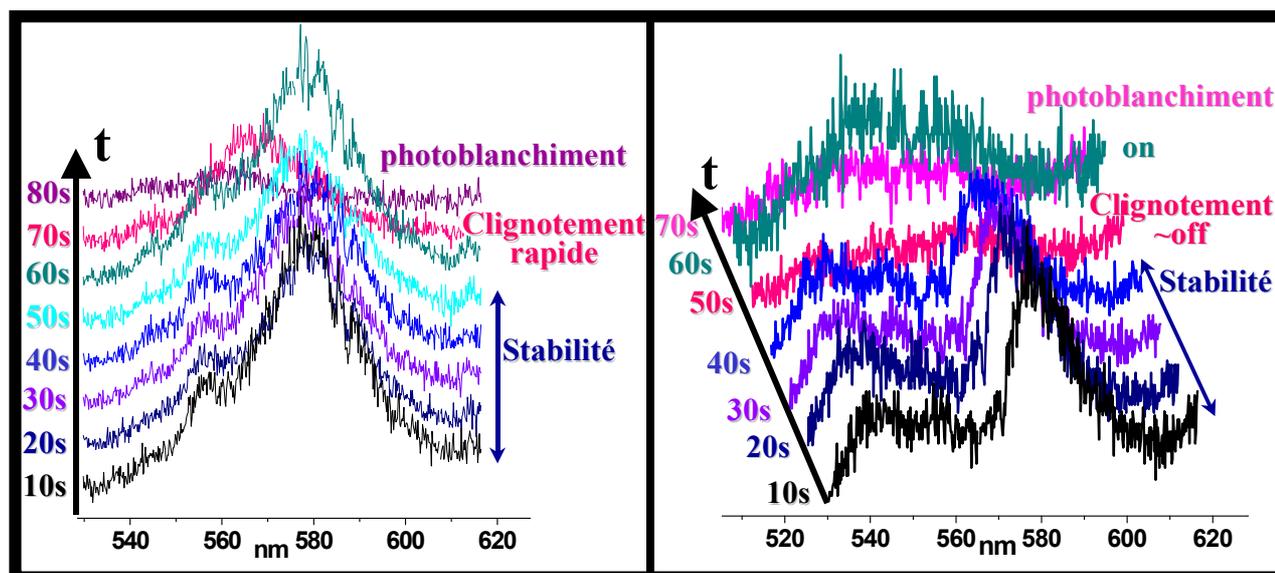


FIG. 2.30 – Evolution au cours du temps du spectre de fluorescence de molécules individuelles : phénomènes couplés d'élargissement et de déplacement spectral liés à une dynamique de clignotement précédant le photoblanchiment de la molécule.

les modifications telles que celles présentées sur la figure 2.29 pourraient correspondre à une molécule capable de diffusion qui explore un environnement local hétérogène. Les hétérogénéités imposant les reconformations adoptées préférentiellement par la molécule au cours du temps pouvant être soit une irrégularité géométrique du site– existence de contraintes, effets d'encombrements stériques– soit une hétérogénéité chimique, avec la présence de groupements silanols par exemple, qui conduisent à des interactions physico-chimiques de la molécule avec la paroi.

A titre de dernier exemple d'évolution des spectres double bande, je présente les séries de spectres de la figure 2.30. Ces deux séries traduisent deux comportements particuliers et très intéressants de l'évolution du spectre de molécules individuelles, associés à une dynamique qu'il nous a été possible de suivre en observant pendant l'acquisition des spectres, les images CCD recueillies avec une fréquence supérieure.

Même s'il est délicat de conclure définitivement, j'ai remarqué que pour certaines molécules qui clignotent très peu de temps avant leur photoblanchiment, l'émission de fluorescence qui suit ou englobe cette période de clignotement est décalée en longueur d'onde, et la bande est plus large. Sur la figure 2.30 sont présentés deux cas qui illustrent cette observation. La molécule dont l'évolution est présentée à gauche montre un spectre double bande stable pendant 60 secondes, puis elle clignote au niveau du septième spectre, qui est bien plus large et positionné globalement entre les deux bandes précédentes. La molécule subit donc une

2.4. Nanospectroscopie— Analyse spectrale de l'émission de fluorescence de molécules uniques

perturbation qui modifie la nature de ses interactions avec le milieu et donc son spectre. Cette étape est directement suivie par le photoblanchiment de la molécule. Le deuxième exemple présenté est légèrement différent : après une stabilité de 40 secondes, la molécule s'éteint pendant un temps suffisamment long pour que cette extinction apparaisse sur le spectre qui est donc plat. Ce n'est qu'après cette période d'annihilation de plusieurs secondes que la molécule émet à nouveau. Comme dans le premier exemple de cette figure, le spectre de l'émission juste après le clignotement est décalé, et surtout plus large que le spectre de départ.

Une telle dynamique couplée, clignotement-déplacement spectral puis photoblanchiment, pourrait traduire une suite d'évènements conduisant au photoblanchiment de la molécule. On peut ainsi proposer par exemple le déroulement suivant : au départ la molécule est localisée de façon stable dans un site dans lequel elle est peu contrainte puisqu'on observe un spectre double bande, son émission est constante. Un processus de diffusion— rotationnelle ou translationnelle— la conduit ensuite à augmenter sa probabilité de désexcitation non radiative, on peut par exemple penser à un processus de quenching par la paroi, la molécule étant entrée dans un site moins large comme un canal. Elle clignote, c'est-à-dire que la molécule suit des cycles au cours desquels elle se plaque sur la paroi, et s'en libère. Son spectre, qui reflète l'intermittence de l'émission, est donc moins intense et mono bande décalé vers le bleu, car dans ce site la molécule est contrainte. Eventuellement, la molécule peut aussi aller et venir du site contraignant vers le site plus large de départ, son spectre sera donc large comme superposition du spectre double bande (molécule "libre") avec un spectre mono bande plus bleu (molécule contrainte). Finalement elle photoblanchit car l'état "inhibé" favorise une des voies de photoblanchiment.

2.4.4 Réflexions sur les "agrégats"

Pour progresser dans la compréhension de la nature des "agrégats" décrits précédemment (§2.3.2), on peut mettre en parallèle les caractéristiques de formation de ces objets et les informations apportées par l'étude spectroscopique sur la dynamique conformationnelle au cours du cycle de fluorescence du pérylène orange.

En particulier, nous avons vu que l'"agrégation" ne se fait que sous irradiation. En mettant de côté les effets thermiques induits par le laser et intervenant éventuellement dans le processus de nucléation, on peut se focaliser sur l'effet majeur de l'irradiation : porter les molécules dans un état excité.

Au cours de l'analyse spectroscopique, nous avons proposé que la molécule puisse se reconformer dans son état excité, atteint depuis l'état fondamental par absorption d'un photon ; l'indice pertinent est la présence de spectres double bande d'intensités relatives variables. Cette reconformation correspondrait, en accord avec certains auteurs, à une rotation des

groupements phényles terminaux [77]. D'une position à l'équilibre de l'état fondamental "orthogonale" à une conformation "totalement plane" – les deux phényles dans le plan du coeur pérylène – il existe de nombreux états intermédiaires possibles. Toutes ces conformations n'étant par ailleurs pas obligatoirement équivalentes du point de vue de l'efficacité d'émission.

Dans tous les cas, l'existence sous irradiation de molécules possédant des conformations plus planes que celle de l'état fondamental est un point d'intérêt.

En effet, si le pérylène orange est un colorant particulièrement utilisé et apprécié, c'est en raison non seulement de ses très bonnes propriétés d'émission, mais aussi parcequ'il possède une bonne solubilité par rapport aux autres colorants de la famille des pérylènes et pérylènimide. Cette propriété, recherchée par les chimistes qui l'ont mis au point, est directement liée à l'orientation des groupements par rapport au plan pérylènimides [53] :

La plupart des dérivés du pérylène possèdent effectivement une très faible solubilité en raison de leur structure plane qui favorise la formation de cristaux très stables en raison d'une importante énergie réticulaire. Dans le cas du pérylène orange, la présence de groupements phényles tournés de 90° en dehors du plan de la molécule abaisse la densité d'empilement du cristal, et augmente la solubilité de la molécule.

Si les molécules excitées sont plus proches de la planarité, on peut supposer que la densité d'empilement et l'énergie réticulaire vont au contraire augmenter et donc que la "solubilité" sera plus faible. Si plusieurs molécules excitées se retrouvent en forte proximité dans le sol-gel, entourées par la matrice elles auront donc plus facilement tendance à "cristalliser". Les "agrégats" que nous avons observés correspondraient à des sortes de cristaux dans lesquels les molécules sont empilées et forment un réseau plus ou moins ordonné, puisque différentes conformations relaxées peuvent caractériser les molécules. D'autres caractéristiques de formation de ces agrégats, dégagées de manière indirecte des observations expérimentales, et par exemple le fait que certains environnements semblent être plus propices à l'apparition de ces objets, entrent aussi dans le cadre de cette hypothèse. Suivant les sites, la rotation des groupements pouvant être plus ou moins restreinte, la planarité des molécules et donc la formation des cristaux est plus ou moins favorisée.

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

2.5 Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

Dans cette dernière partie je me propose de discuter plus précisément des comportements individuels de dynamique temporelle d'émission de fluorescence de molécules uniques que nous avons détectés aux cours des différentes études conduites sur les films sol-gel minces dopés pérylène orange. On exploite donc ici à nouveau l'avantage de la détection multicanal grand champ qui, associée au programme de dépouillement des films, nous permet d'obtenir les traces temporelles de plusieurs centaines de molécules étudiées simultanément. L'analyse de celles-ci reste par contre "manuelle". A nouveau, et comme nous l'avons vu dans la partie précédente avec l'analyse des spectres de molécules uniques, en effectuant individuellement pour chaque objet l'analyse de la dynamique- ici temporelle- d'émission des photons de fluorescence, on utilise chaque molécule comme un "reporter" indépendant qui informe sur les propriétés de son environnement local. On exploite alors pleinement les atouts de la nanospectroscopie.

Dans la première section de ce chapitre, nous avons discuté, en recréant de manière statistique l'ensemble de l'échantillon grâce à l'analyse d'un grand nombre de molécules individuelles, des phénomènes de photoblanchiment. Des informations fournies par l'imagerie grand champ de fluorescence sur l'émission des molécules, n'ont été ainsi exploitées "que" les paramètres- temporels, nombre de photons- pertinents pour décrire ces phénomènes. Mais les traces temporelles des molécules offrent une richesse en informations bien plus importante, non limitée à ces seuls paramètres.

Très peu d'objets présentent en réalité des traces temporelles simples- telles que celle présentée sur la figure 1.9 de l'introduction- qui correspondaient aussi jusqu'à récemment aux seuls types de comportements à l'échelle de la seconde présentés et discutés dans la littérature [83, 57]. Néanmoins, les travaux plus récents de plusieurs équipes, et notamment ceux d'*Higgins* [73, 84, 67], de *Viteri* [58] ou de *Weston* [78, 85], présentent eux aussi des exemples de dynamiques plus complexes. Les comportements de l'émission des molécules de pérylène orange dopant le film sol-gel étudié présentent une grande diversité, en accord avec la forte hétérogénéité du milieu, et il faut noter que ces traces sont de premier abord très complexes et difficilement interprétables. La classification même, et le regroupement en familles est ainsi malaisé.

Il faut noter ici en préambule que les comportements dynamiques que je présenterai dans

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

ce paragraphe, s'ils peuvent paraître singuliers, ne correspondent pas à des artefacts expérimentaux évidents dont l'éventualité a été prise en compte. Ceux qui perturbent l'ensemble des molécules situées dans la zone d'irradiation, telles que des fluctuations d'intensité, une défocalisation ou encore une dérive lente de la position de l'échantillon se manifestent sur l'ensemble des traces. Ces artefacts ont été effectivement corrigés au cours des différentes étapes du traitement, avant extraction des données sur lesquelles nous nous appuyons, ou les films correspondant ont été exclus de l'étude.

Les traces que je présenterai correspondent à des comportements remarquables de quelques molécules. Dans la zone d'irradiation où les molécules sont localisées, et même en des sites très proches, au cours d'un même film, les traces sont très variées. Ce n'est donc pas un seul type de trace, ou une seule évolution d'intensité de l'émission, mais un ensemble de comportements très différents que composent la centaine de molécules suivies. Pour illustrer l'hétérogénéité des comportements observés au cours d'une même période, les traces de molécules relativement voisines sont présentées dans l'annexe A.

D'autre part, comme je l'ai déjà remarqué, les comportements que nous avons mis en évidence sont complexes, et à ce jour on ne peut émettre que des hypothèses concernant l'origine physico-chimique de ces comportements. L'objectif de leur présentation dans ce manuscrit est de pointer leur existence, tout en proposant des pistes d'analyse pour des études ultérieures.

Ici, nous avons envisagé l'étude de quelques comportements remarquables, dont les interprétations dans le cadre de nos expériences peuvent être considérées comme cependant "facilitées" par la possibilité de corrélérer les différentes informations déduites de l'analyse grand champ de l'échantillon. Cette méthode a effectivement mis en lumière non seulement des phénomènes locaux, mais également des processus à une échelle spatiale pertinente de plusieurs dizaines ou centaines de microns, comme la diffusion et sa conséquence : l'agrégation. Aucun des phénomènes observés ne peut-être a priori découplé des autres ; l'analyse et l'interprétation de la dynamique d'émission de fluorescence des molécules uniques suppose donc la prise en compte de tous les phénomènes et caractéristiques du milieu connus. Ainsi, forts de la connaissance de l'existence des phénomènes de diffusion spatiale et d'agrégation, et en considérant l'hétérogénéité conséquente de l'échantillon– existence de pores et canaux interconnectés, sites de stabilité des molécules– peut-on tenter une telle analyse.

La trace temporelle est une signature de la dynamique de l'émission, pertinente à des échelles de temps typiquement de la seconde, dans le cadre de mes études. On ne voit donc pas les effets quantiques de type dégroupement ou de groupement des photons, ce qui exclut en particulier un suivi de la dynamique de peuplement et de dépeuplement de l'état triplet par exemple. La molécule unique est une sonde qui a été utilisée à de nombreuses reprises pour accéder aux effets de l'environnement sur la durée de cet état "noir" ou à la variation

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

du taux de croisement singulet-triplet. Les signatures qu'on obtient par le biais des traces temporelles dans le cadre de nos expériences sont d'une part les signatures de l'unicité de la molécule sondée, et d'autre part la signature d'effets de processus lents de reconformation de la molécule ou de son environnement, ou encore de processus très locaux d'exploration des sites proches de la molécule par des processus de diffusion rotationnelle ou translationnelle, à l'échelle de la résolution spatiale du microscope.

2.5.1 Analyse et discussion- focus sur le phénomène de clignotement et de fluctuation du signal

Une des signatures classiques de l'unicité de l'objet se manifeste par une chute brutale et définitive à zéro de son émission, d'une image à l'autre d'un film. C'est le phénomène de photoblanchiment, que j'ai discuté au paragraphe 2.2.2. Une autre signature est fournie par une chute analogue de l'émission pendant un temps plus ou moins long, de quelques secondes, ou parfois pendant des durées de l'ordre de plusieurs dizaines de secondes. Si la molécule émet de nouveau, on parle de clignotement de la molécule. Ce phénomène peut se reproduire plusieurs fois avant le photoblanchiment. Deux exemples d'un tel clignotement ont été donnés sur la figure 1.9, et sur la figure 2.28 qui correspond au suivi spectral de l'émission moléculaire. A nouveau, il est important de rappeler que les échelles temporelles pertinentes dans nos études sont de l'ordre de la seconde. Le clignotement discuté ici est donc a priori différent des phénomènes de groupements de photons décrits dans l'introduction, et qui correspondent à des processus, tels le piégeage dans l'état triplet, qui ont lieu à une échelle temporelle beaucoup plus faible (τ_T de quelques microsecondes à une fraction de milliseconde).

Dans la littérature, on peut trouver plusieurs propositions formulées pour expliquer l'annihilation de la fluorescence [16]. Des processus d'annihilation potentiellement réversibles peuvent donc être considérés pour interpréter le clignotement des molécules uniques à l'échelle de la seconde.

Pour expliquer les périodes noires, on se place tout d'abord dans une situation où la molécule ne diffuse pas spatialement. Elle ne sort donc ni du volume d'excitation, ni du volume de détection, et reste éclairée pendant tout le temps d'observation. Différents processus "externes" peuvent inhiber temporairement l'émission.

Le premier cas est celui d'un processus de transfert de charge, qui peut se produire lorsque des anions sont présents au voisinage de la molécule. Ce transfert est d'autant plus efficace que les atomes constitutifs des ions ont une faible électronégativité. Par exemple, si on considère les ions halogénures, on observe que l'efficacité de ce processus augmente le long de la série. Par contre, comme ce mécanisme entre en compétition avec tous les autres processus de désexcitation, il faut que les collisions avec l'anion soient favorisées pour qu'il soit efficace.

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

Le transfert de charge sera donc très peu probable dans les solvants polaires qui stabilisent les charges par solvatation, formant ainsi un écran entre les ions.

La fluorescence peut également être inhibée par un transfert d'énergie entre le dipôle de la molécule et un autre dipôle moléculaire. On appelle ce processus le transfert de Förster. La portée de l'interaction est faible, de l'ordre de 10nm. L'accepteur peut être une molécule ou bien plus généralement une structure polarisable (ex : structure métallique [86]) puisque la seule condition requise pour qu'un tel transfert ait lieu est l'existence d'un recouvrement entre le spectre d'émission du colorant et le spectre d'absorption de l'espèce acceptrice. Le transfert d'énergie sera d'autant plus efficace que les dipôles mis en jeu présenteront une orientation proche. Un tel transfert pourra être utilisé à des fins d'exaltation du signal— en choisissant de manière astucieuse la nature des objets mis en jeu— ou tout au contraire dans le but d'inhiber la fluorescence, comme nous le verrons pour les expériences de diffusion Raman. Il est intéressant de citer l'importance pratique de ce transfert qui est utilisé dans la technique de transfert résonant de fluorescence (ou transfert de Förster résonnant-acronyme anglais FRET). Dans ces expériences, on utilise des systèmes de couples moléculaires Donneur-Accepteur greffés sur des macromolécules. Il y a basculement entre deux situations, soit on détecte la fluorescence de l'espèce "donneuse", soit il se produit un transfert qui inhibe l'émission du Donneur et déclenche la fluorescence de l'Accepteur. C'est le suivi de la signature spectroscopique des deux espèces qui permet ainsi d'analyser la dynamique moléculaire du "porteur", le transfert ne se faisant que lorsque les molécules, ou les groupements des chromophores, sont proches. Cette technique est très largement utilisée en biologie, et, à l'échelle de la molécule unique, permet de sonder en particulier les dynamiques d'orientation, de reconformation ou de repliement de protéines ou autres biomolécules de dimensions importantes sur lesquelles ont été greffées des colorants D/A [87, 4, 88].

Troisièmement, dans un solvant ou un milieu présentant des groupements polaires il peut aussi y avoir des échanges d'énergie sous forme vibrationnelle.

Enfin, la perte temporaire de signal peut aussi être liée à une modification de l'excitation de la molécule. Citons deux causes possibles : soit une réorientation de la molécule la conduit à se trouver dans une configuration dans laquelle son dipôle moléculaire est perpendiculaire à la polarisation du champ exciteur, le moment de transition est alors nul, soit, sous l'effet d'un déplacement spectral important de l'absorption, la longueur d'onde du laser ne correspond plus à un domaine dans lequel la section efficace d'absorption est importante, la molécule n'est alors plus excitée efficacement [31]. On peut d'ailleurs extraire des informations très intéressantes sur la dynamique moléculaire d'études contrôlées "en polarisation". Par exemple, l'évolution au cours du temps de l'orientation du dipôle d'une molécule sonde, attachée de manière rigide à une protéine d'ADN a permis de mettre en évidence des processus d'adsorption/désorption suivi de rotation des fluorophores, ce qui

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

apporte des informations sur les degrés de liberté angulaire de la macromolécule elle-même [39]. Le couplage d'une modulation rapide ($90^\circ/10ms$) de la polarisation d'excitation avec le suivi temporel de l'émission permet aussi de discriminer une pause (de durée supérieure à la modulation) liée à une réorientation d'une pause liée aux autres processus de clignotement.

Dans nos études, la variété et l'impossibilité de donner une interprétation définitive aux processus qui conduisent au clignotement dans les films minces hétérogènes que j'ai étudiés m'ont conduit à ne pas entreprendre un travail d'analyse statistique des durées et de la fréquence des périodes noires sur toutes les molécules d'un film donné, contrairement au traitement qui est habituellement mené sur le clignotement à l'échelle de la microseconde. Dans ce dernier cas en effet, un seul processus est exploré, celui du passage de la molécule dans son premier état triplet, et l'analyse statistique permet de quantifier les taux de croisement intersystème et la durée de vie de l'état triplet, en fonction des différents environnements des molécules.

Il reste cependant intéressant de faire une classification simple des différents de types de clignotement observés et éventuellement de leur fréquence d'observation dans un film donné, ce qui permet de donner une idée de l'hétérogénéité des situations rencontrées et donc de l'hétérogénéité du film sol-gel mince étudié.

Le premier type de clignotement qui est observé correspond à une interruption "accidentelle" de l'émission de la molécule. Ce type de comportement se traduit par l'observation d'une trace continue dont le niveau d'intensité reste stable pendant des durées qui peuvent être très longues, de l'ordre parfois de l'heure, ou plus dans les films enregistrés à faible intensité, et qui n'est interrompue que par de très rares périodes noires, parfois une seule, de courtes durées de quelques secondes à quelques dizaines de secondes. Ce type de comportement s'observe aussi bien pour les films enregistrés sous air que sous vide. La durée de l'émission varie en moyenne avec l'intensité d'irradiation du film, et les molécules dont l'émission est stable sur de très longues durées sont pratiquement inexistantes dans les films enregistrés à des intensités supérieures à $1,4kW/cm^2$ sous vide et à $0,2kW/cm^2$ sous air, comme le montrent les histogrammes du temps de survie total des molécules du paragraphe sur le photoblanchiment (figure 2.8 p 69). Trois exemples de telles traces sont donnés sur la figure 2.31, extraits de données de films enregistrés à $75W/cm^2$ et $380W/cm^2$ respectivement sous air et sous vide.

Ces traces correspondent à des molécules qui sont dans des environnements très stables. Une interprétation possible de ce type de trace est que la molécule soit à l'intérieur, non pas de pores connectés les uns aux autres par des canaux, mais dans un espace libre entre des groupements siloxanes pontés. Une telle zone à l'intérieur de la matrice constitue une sorte de défaut dans le réseau de réticulation. C'est une cage au sens de la référence [50], suffisamment grande cependant pour inclure la molécule. Dans ce site, les groupements méthyl, tournés vers

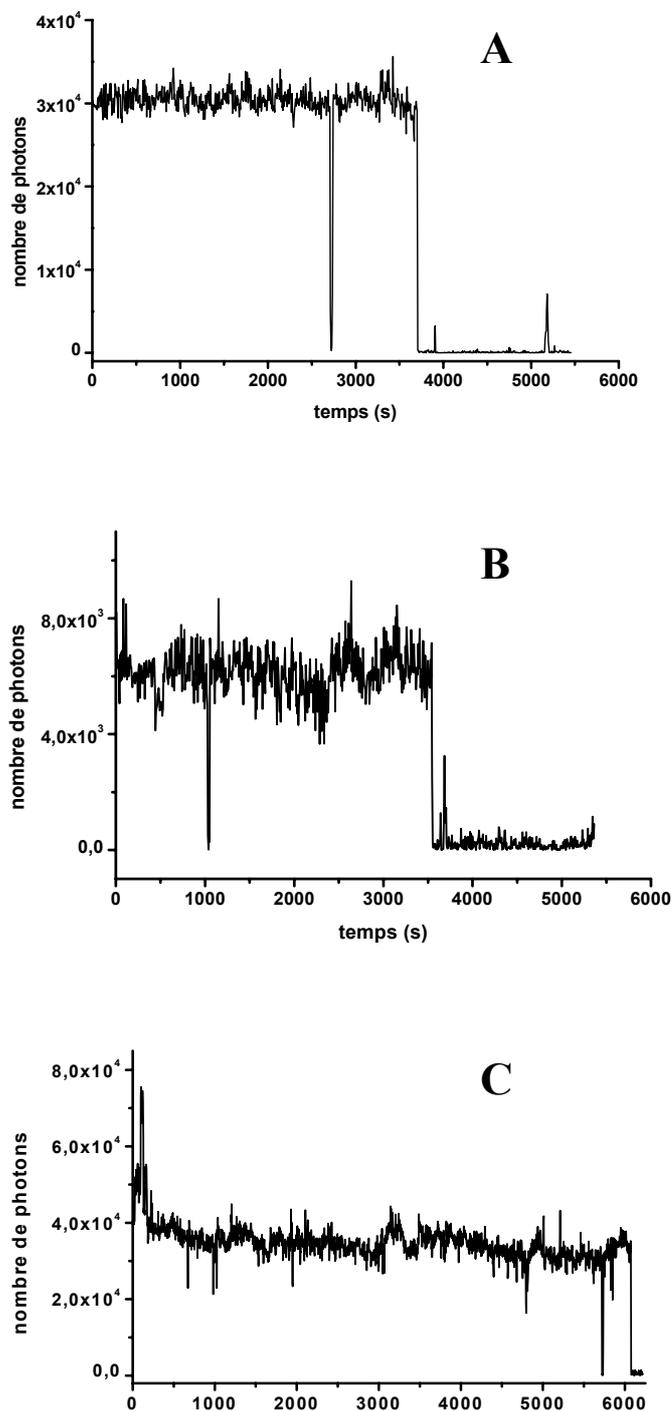


FIG. 2.31 – Traces de durée longue et stables, avec un clignotement épisodique; A et B traces temporelles de molécules d'un film enregistré sous vide, intensité $75W/cm^2$; C idem, intensité $380W/cm^2$.

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

l'intérieur de la vacance, contribuent à fixer la molécule, qui est pratiquement immobilisée. L'environnement lui-même est rigide, ce qui exclut une reconformation du site au cours du temps. On peut estimer la proportion de ce type de traces sur les films enregistrés sous vide et sous air. A une intensité de $75W/cm^2$, ce type de comportement est observé pour 19 % des molécules sous vide, alors que sous air le pourcentage correspondant s'élève à 8% . Il chute à 10% sous vide à $380W/cm^2$, alors qu'il n'y a plus qu'un émetteur (ou zéro) de ce type à $200W/cm^2$ sous air. Il est à noter que les molécules correspondantes émettent un nombre total important de photons avant de photoblanchir. La différence entre les pourcentages de telles traces sous vide et sous air suggère qu'il existe deux types d'environnements possibles. Le premier est un site presque fermé du type cage, dans lequel la diffusion des espèces extérieures est inefficace. Ce type de site expliquerait les observations des émissions de très longue durée sous air. La ou les interruptions brèves observées pourraient correspondre à un mouvement de diffusion réversible et faible de la molécule vers une zone dont le caractère chimique est très localement différent, plus polaire par exemple, moins favorable à l'émission, ou à une faible perméabilité du site aux espèces extérieures dont le passage provoquerait un clignotement. Le deuxième type correspondrait à des sites de même nature, à l'intérieur de la matrice, qui pourraient ne pas être complètement isolés du réseau de pores et de canaux du film mince. Ils seraient alors accessibles à l'oxygène, et les molécules y résidant photoblanchiraient rapidement sous air alors qu'elles restent protégées sur de longues durées sous vide.

Il existe un deuxième type de trace pour lesquelles le clignotement est épisodique. Il partage avec le précédent la propriété de ne présenter que de brèves et rares périodes noires. Il s'en différencie dans l'évolution lente du niveau d'émission, qui n'est pas constant au cours du temps. Ce niveau présente des variations, soit monotones et en général décroissantes comme l'illustre la figure 2.32, soit des variations plus cycliques mais sur des échelles de temps longues, de l'ordre de une à quelques minutes (figure 2.33). Dans certains cas, ces fluctuations se reproduisent à une échelle de plusieurs dizaines de minutes.

Les fluctuations sont aussi plus ou moins importantes. Les artefacts liés au dispositif expérimental ne sont cependant pas suffisants pour expliquer de telles variations. Il s'agit bien plutôt d'une signature des même processus que ceux conduisant à des arrêts de l'émission, mais avec des dynamiques beaucoup plus rapides.

La continuité presque parfaite de l'émission de la molécule assure comme dans le cas précédent, que cette molécule est fixée dans un environnement pratiquement homogène et stable. La variation du niveau d'émission traduit cependant, soit une variation lente de l'environnement, soit un déplacement lent de la molécule elle-même qui explore localement son environnement.

Deux processus simples peuvent rendre compte de ces observations.

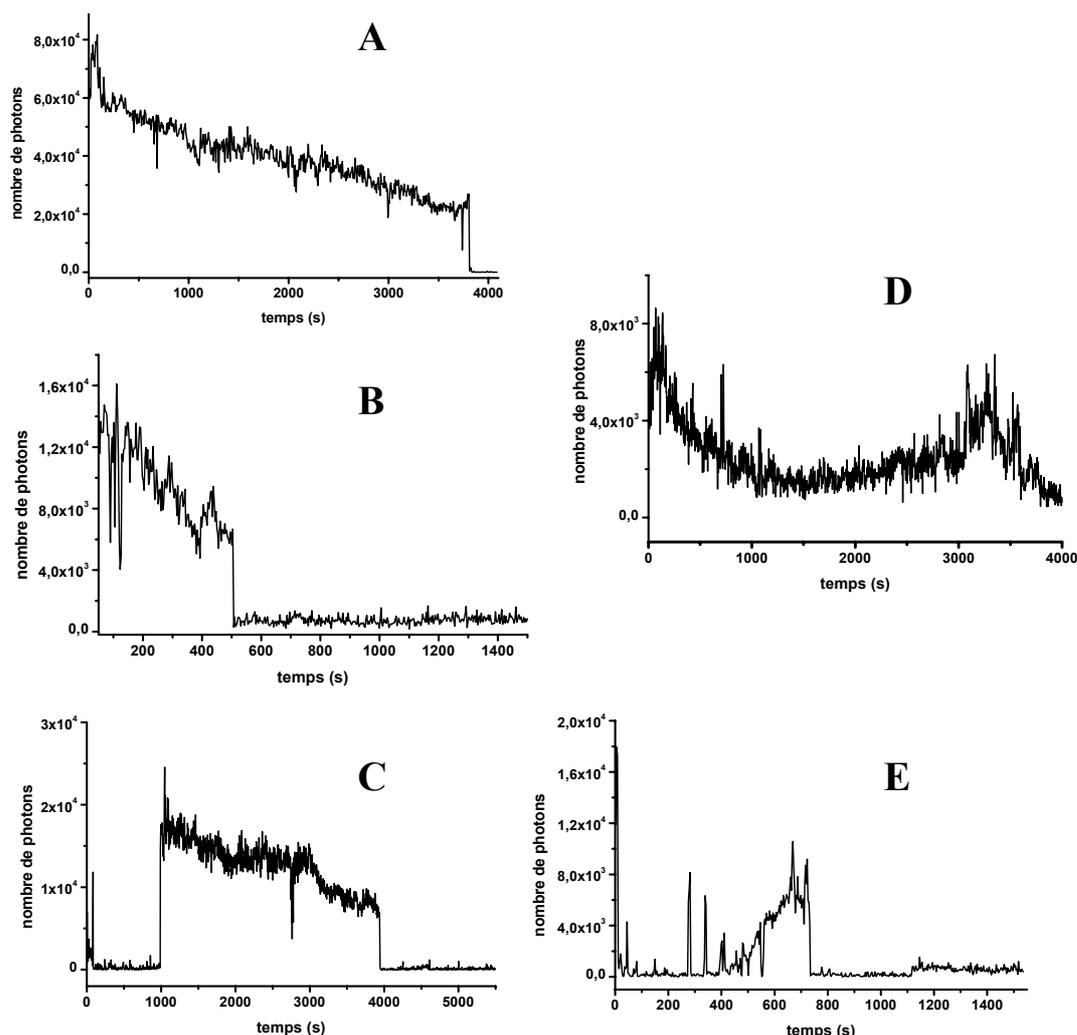


FIG. 2.32 – Traces temporelles longues, lentement variables, avec un clignotement épisodique. A sous vide, $380W/cm^2$; B sous air, $200W/cm^2$; C sous vide $75W/cm^2$; D idem C ; E idem B

Le premier correspond à une modification lente du pore dans lequel se trouve la molécule, sans changement notable de ses propriétés de polarité. Une telle situation peut être provoquée sous l'effet de l'irradiation continue du film pendant des durées longues. C'est ainsi qu'à l'intensité de $75mW/cm^2$, neuf films successifs de 1024 images ont été enregistrés jusqu'à disparition de tous les émetteurs (à l'exception de trois), avec une durée d'acquisition de 3s par image, ce qui représente un temps total d'irradiation de pratiquement huit heures. Une telle irradiation, même faible, peut provoquer une modification globale du film étudié. Elle peut conduire à une accélération des phénomènes d'évaporation du solvant résiduel emprisonné dans les pores, et donc à une restructuration lente de certains pores qui vont se contracter [84]. Elle peut accélérer également l'achèvement du processus de réticulation qui n'est en général pas fini immédiatement après la synthèse du film, mais parfois plusieurs jours

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

après. Dans ce processus, des groupements silanols initialement libres vont se ponter pour former un matériau plus rigide. Dans ce dernier cas toutefois, le changement de la nature de l'environnement de la molécule consécutif à la création de nouvelles liaisons chimiques devrait *a priori* changer de façon rapide et irréversible l'émission de la molécule si le groupement siloxane est très proche, et la trace correspondante s'écarterait du type de celle discutée ici. Ces processus de reformation de l'environnement de la molécule s'apparentent à un effet de vieillissement induit. Les traces lentement variables peuvent correspondre au cas d'une constriction lente mais irréversible du pore qui contient la molécule [84]. En même temps, tous les mécanismes d'évolution du solgel décrits ici et supposés induits par le laser, peuvent aussi être liés à la seule dynamique intrinsèque du solgel. Celle-ci est en effet assez importante puisqu'éventuellement supérieur à celle d'un polymère, comme l'a montré Higgins à partir d'une comparaison de la dynamique d'émission de molécules individuelles de RhodamineB dans un film solgel et dans un film de PBMA [73].

Mais ce type de variations peut également résulter de la dynamique de la molécule elle-même. C'est en particulier le cas des traces à évolution "cyclique" (figure 2.33) sur des échelles de temps de l'ordre de quelques minutes à quelques dizaines de minutes. Remarquons ici que les molécules voisines de celles présentées sur la figure 2.33 présentent des traces très variées, sans de telles variations cycliques (voir annexe B), ce qui exclut de nombreux artefacts comme origine de ce comportement. Il se produit dans ce cas un phénomène réversible sans annihilation d'émission. Cet effet peut être expliqué par exemple par une diffusion rotationnelle de la molécule dans un environnement homogène. Il peut s'agir d'une molécule située dans le solvant remplissant un pore dont la configuration ou la taille ne permet qu'une rotation limitée de la molécule.

C'est ce type d'émission pour laquelle le clignotement est pratiquement inexistant, et qui perdure pendant des temps très longs, qui nécessite d'acquérir des films de très longues durées. Ces traces sont peu nombreuses, et il s'agit de sites plutôt rares dans lesquels la molécule est "isolée" et ne subit pas ou peu d'interactions avec d'autres molécules, d'oxygène par exemple, ou d'autres espèces. Il n'y a a priori pas, ou très peu, de communications entre de tels sites et le reste du matériau soit qu'il s'agisse d'une cage, ou encore d'un pore presque fermé.

Un autre type de traces "clignotantes" remarquables est celui pour lequel le niveau "haut" de l'émission est de même pratiquement constant mais où la dynamique d'émission est souvent interrompue, de façon répétée, par des périodes noires. Dans cette famille de traces également, on peut distinguer deux situations. Dans la première, les périodes noires assez brèves (toujours à l'échelle de notre résolution de quelques secondes) alternent avec des périodes noires plus longues et plus rares. Elles s'observent d'un bout à l'autre de la trace temporelle, comme l'illustre l'exemple de la figure 2.34.

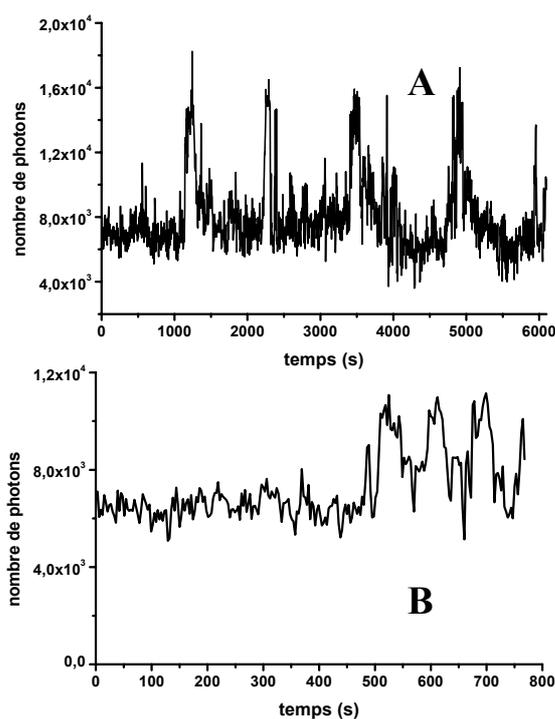


FIG. 2.33 – Traces "cycliques" pour des émetteurs de longue durée. A sous vide, $75W/cm^2$; B sous air, $200W/cm^2$.

Elles existent sous vide et à l'air, avec toutefois une prédominance pour les films enregistrés sous vide. Le niveau d'émission ne chute pas toujours à zéro mais à une valeur très faible, soit parce que la période noire est plus courte que le temps d'acquisition d'une image, soit parce que ce niveau bas a une réalité. On englobera cependant cette observation dans le phénomène de clignotement. Etant donné que le niveau de l'émission est constant (ou lentement variable) entre les interruptions, cet effet pourrait être attribué à l'existence d'un environnement local hétérogène que la molécule explorerait au cours de petits mouvements de diffusion. Une molécule, en diffusant localement dans un site tapissé majoritairement de groupements méthyl par exemple, peut explorer une zone qui possède des groupements OH. Son émission sera partiellement ou même complètement annihilée dans certaines zones où un transfert d'énergie vers la paroi est possible, et où la molécule peut effectuer des cycles rapides d'adsorption/désorption [73]. Ce type de traces reflèterait une hétérogénéité locale de l'environnement moléculaire. Le site est suffisamment large pour que la molécule ne soit pas contrainte, mais il est également suffisamment fermé pour que l'émission dure plusieurs dizaines de minutes. Un tel effet peut également correspondre à la diffusion rotationnelle d'une molécule emprisonnée dans un pore rempli de solvant, ou dans un environnement mou. L'ordre de grandeur de la diffusion rotationnelle d'une molécule de DiI dans un po-

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

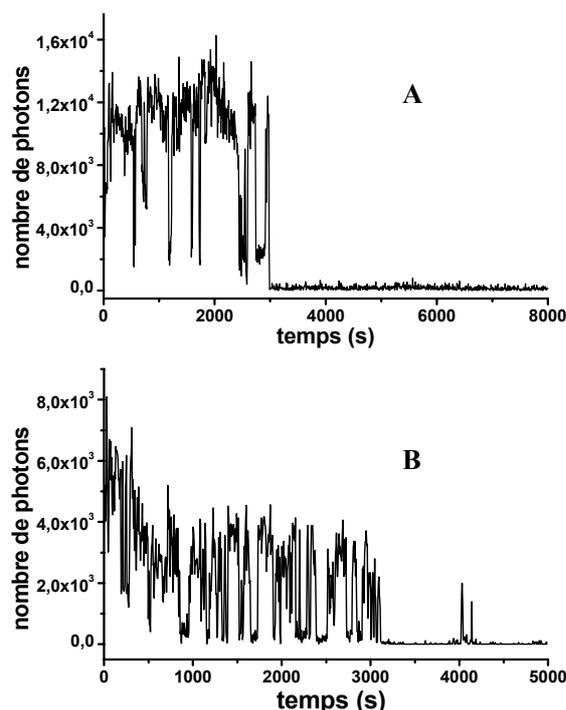


FIG. 2.34 – Traces temporelles avec une forte dynamique de clignotement. A sous air, $75W/cm^2$; B sous vide, $75W/cm^2$.

lymère comme le PMMA est de une à quelques minutes [81]. Cet ordre de grandeur est compatible avec les écarts successifs entre les périodes noires brèves de la trace B de la figure 2.34, sur plusieurs domaines de la trace.

Une autre situation correspond à l'observation d'une émission stable sans interruption pendant une période de temps assez longue, suivie d'une période de temps pendant laquelle la molécule oscille entre des périodes noires et des périodes d'émission assez régulières, et qui s'achève par le photoblanchiment de la molécule (Figure 2.35). La situation inverse, où une période d'émission instable est suivie d'une période plus stable, est également observée, bien que plus rare (cas C figure 2.35, et dans cet exemple la molécule oscille beaucoup). Le premier cas (traces A et B de la figure 2.35) assez fréquent, est difficile à analyser car de nombreuses explications peuvent être proposées. Il est cependant remarquable que ce clignotement important n'apparaisse qu'après une durée d'émission stable plutôt longue. Il apparaît donc brutalement une source d'instabilités, inexistante au début de l'émission. Une des possibilités est la modification de la nature chimique de l'environnement de la molécule. Une telle modification peut être provoquée par l'évaporation progressive du solvant dans lequel se trouverait piégée la molécule au départ, dans un pore plutôt fermé. Quand le niveau du solvant qui s'évapore atteint un seuil tel que la molécule se situe à l'interface liquide-solide, la probabilité d'interaction de la molécule avec la paroi du pore augmente, et

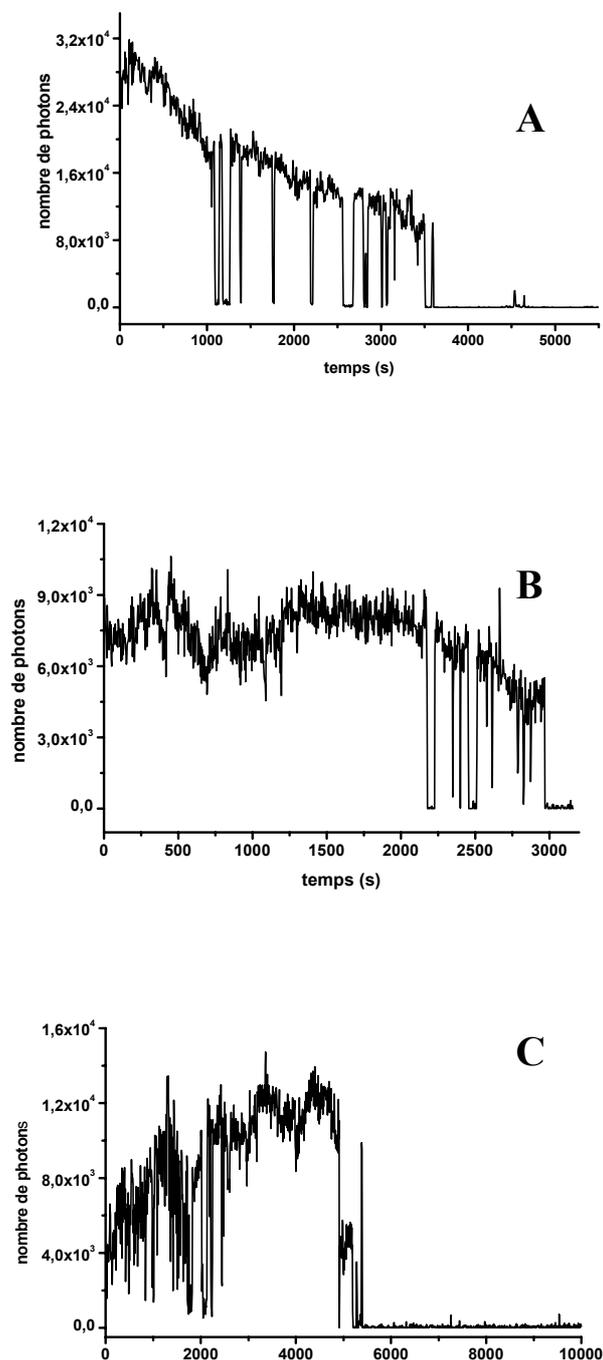


FIG. 2.35 – Basculement entre une émission stable et un comportement de forte dynamique. A et C sous vide, B sous air, $75W/cm^2$.

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

la molécule peut osciller entre deux états, "dans le liquide" et "collée sur la paroi", auquel cas son émission peut être annihilée par transfert d'énergie. Tant que du liquide subsiste dans la cage, la molécule peut se détacher de la paroi sous l'effet par exemple de son énergie vibrationnelle et des forces de capillarité, puis se recoller de nouveau. Quand le niveau du liquide devient trop faible, la molécule reste accrochée à la paroi, et son émission est définitivement annihilée à l'échelle de nos observations, ou bien elle photoblanchit par un autre processus. La baisse lente du niveau global d'émission, sensible surtout pour la trace A, est en accord avec une lente reconformation du site de la molécule. Dans le cas C de la figure 2.35, la molécule parvient dans un environnement stable dans lequel elle-même ne subit pas de fortes reconformations. Cette situation est à rapprocher des traces en forme de "V" qui seront discutées ci-dessous. Il est possible que ce comportement reflète le franchissement de l'entrée d'un pore homogène.

Il est également possible, dans certains cas au moins, que certaines traces de forte dynamique correspondent à une situation où la molécule elle-même change de conformation dans son environnement. Le niveau d'émission de la molécule ne retombe pas à zéro dans les périodes "noires" plus longues que la durée d'acquisition des images, mais à un niveau plus faible stable. C'est ce qu'on observe par exemple sur la trace de la figure 2.36 où le niveau d'émission atteint lors de l'interruption de 45 secondes (qui pour ce film correspond à l'acquisition de 45 images) située après environ 900s d'éclairement, n'est pas nul.

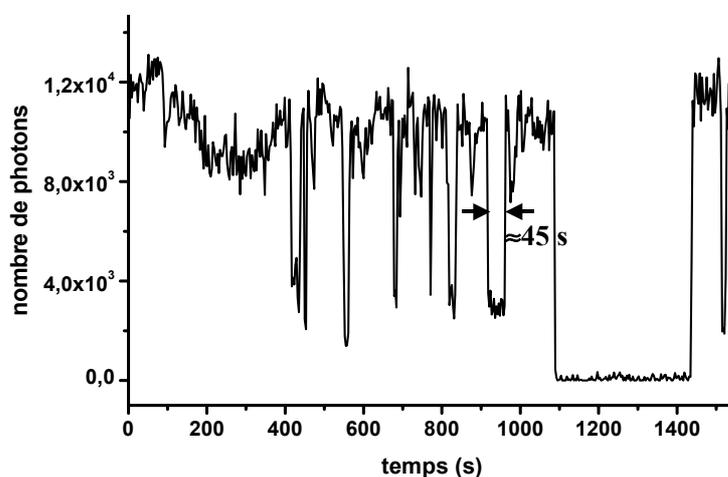


FIG. 2.36 – Molécule dont l'émission, de forte dynamique temporelle, oscille entre un niveau élevé et un niveau "bas". Sous air, $750W/cm^2$.

Si cette observation est imputable à l'existence de deux conformères de la molécule, alors l'un des conformères est beaucoup plus stable que l'autre, et cette réorganisation de la molécule est rare. Cette hypothèse est en accord avec l'attribution des spectres double

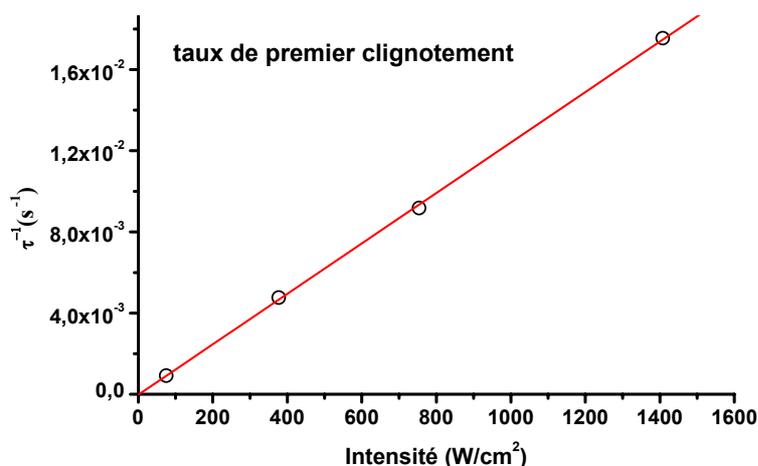


FIG. 2.37 – Évolution du taux de premier clignotement en fonction de l'intensité d'excitation, pour des films enregistrés sous vide.

bande à un changement de conformation de la molécule dans l'état excité plutôt qu'à l'effet de deux conformères. Ce type de trace est exceptionnel dans l'ensemble des films.

J'ai réalisé une étude semi-quantitative du phénomène de clignotement, pour essayer de dégager des paramètres qui interviennent dans le déclenchement de ce processus, malgré la variété des observations réalisées sur les traces. Dans ce but, j'ai construit la statistique du délai au bout duquel se produit le premier clignotement pour toutes les traces des molécules observées dans des films étudiés sous vide à une intensité donnée. Cette statistique m'a permis de déterminer le temps moyen de survenue du premier clignotement, que j'appellerai par la suite temps de premier clignotement τ . J'ai ensuite comparé les temps obtenus pour différentes intensités d'excitation .

Dans cette étude, une étape préalable a consisté à regrouper les images des différents films acquis à différentes intensités, avec des temps d'acquisition par image variables, en sorte que le phénomène de clignotement soit observé avec la même dynamique pour tous les cas. La variable que l'on analyse est alors τ^{-1} , qui est le taux de premier clignotement. La courbe obtenue est très bien ajustée avec une droite de pente unité (Figure 2.37) qui passe par l'origine. Le phénomène de déclenchement du clignotement est donc un processus assisté par un photon. Cette analyse démontre de manière incontestable que le mécanisme de clignotement du pérylène orange dans le film solgel ne peut être associé à un phénomène de photo-ionisation réversible, mécanisme parfois suggéré. Deux mécanismes peuvent y contribuer. Le plus évident est que le clignotement se produit à partir de l'état excité de la molécule. L'énergie ainsi acquise par la molécule favorise en effet son collage dans un site particulier par le biais d'un transfert d'énergie. Cette excitation est aussi favorable à une reconformation de la molécule dans l'état excité. Par ailleurs, l'irradiation du film peut

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

provoquer un échauffement modeste de l'échantillon, linéaire au premier ordre en fonction de l'intensité, qui pourrait également être à l'origine des fluctuations d'environnement nécessaires dans certaines situations à déclencher le processus de clignotement. Cet échauffement, comme nous l'avons noté précédemment a une incidence sur l'évolution de la réticulation du film qui s'accompagne d'une modification locale de la forme de certains pores.

2.5.2 Une grande richesse de comportements-description de "familles"

Il existe dans l'ensemble des films une très grande variété de traces qui n'ont pas les caractéristiques précédentes, et dont l'évolution traduit d'autres phénomènes que le clignotement. L'émission de fluorescence ne fluctue pas entre deux niveaux, un niveau haut et un niveau bas. L'observation de traces de caractéristiques différentes des traces à deux niveaux est rarement décrite dans la littérature. Elle mérite cependant qu'on s'y arrête car elle traduit la multiplicité des processus qui existe dans ce milieu complexe.

Parmi les traces que je voudrais décrire, deux types sont remarquables. Le premier correspond à des traces dont le niveau évolue "continûment", soit en décroissant soit en croissant, dont nous avons déjà vu des exemples dans le cadre du phénomène de clignotement (figure 2.32). Ce type de trace a été observé dans tous les films, avec des durées de montée, ou de descente du signal, variables. Elles sont parfois interrompues pour des films enregistrés à forte intensité par de longues périodes noires, ce qui confère dans ce cas à la trace une allure "en bâtons" de hauteur croissante (figure 2.38).

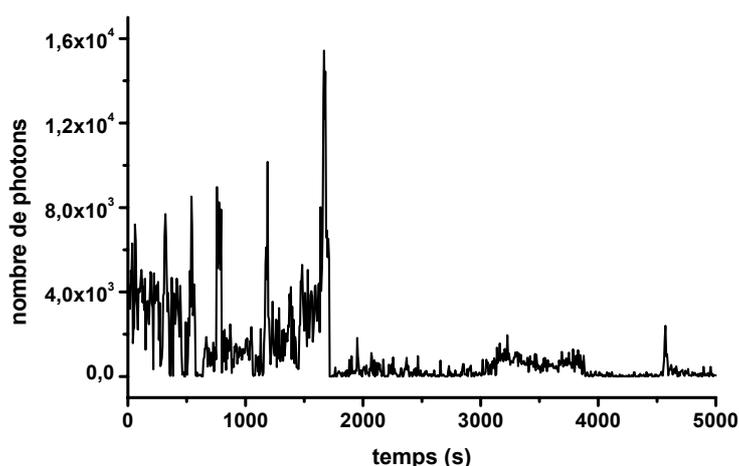


FIG. 2.38 – Emission sous forme de brèves périodes brillantes de plus en plus intenses, sur un fond. Acquisition sous vide à une intensité de $1,4 \text{ kW/cm}^2$.

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

Prises dans leur ensemble, ces traces représentent un pourcentage non négligeable de l'ensemble. Elles sont plus fréquentes sous air, où elles représentent par exemple 20% des traces observées dans les films enregistrés à $200W/cm^2$, alors qu'elles ne représentent que 7% des traces dans le film sous vide enregistré à $380W/cm^2$. De façon générale, de telles traces traduisent une lente évolution des interactions entre la molécule et son environnement. La molécule est donc moins contrainte que dans les cages ou que dans certains pores fermés. Dans certaines situations, une descente lente est suivie d'une montée de pente approximativement équivalente, puis d'une annihilation de l'émission (figure 2.39). Je me suis interrogée sur l'influence que peuvent avoir les zones étroites que présentent les matériaux sol-gel, comme les canaux qui peuvent faire communiquer les pores ou les constriction. Ce type de traces en V peut répondre à cette question. En effet, lorsqu'une molécule située au voisinage d'un canal, pénètre par diffusion translationnelle lente à l'entrée de ce canal, la probabilité de transfert de son énergie vers le milieu augmente car les parois du canal se resserrent et la molécule, entraînée ou non par du solvant, va subir un nombre croissant de collisions avec les parois. Son taux d'émission, moyenné sur le temps d'acquisition, d'une image va diminuer de façon progressive lors de la pénétration de la molécule dans le canal (il peut s'agir également d'une constriction). La diffusion d'une particule dans une structure de type canal dont les dimensions sont du même ordre de grandeur que la particule elle-même, et dont les parois présentent des irrégularités ou une hétérogénéité de composition chimique (modélisés comme des pièges), obéit à des lois particulières, comme le décrit l'article théorique de *Malek et Coppens* [66]. Une des conclusions importantes de cette analyse est qu'une particule se dirigeant vers le pore ou le canal subit "un effet d'entrée", et qu'elle a une probabilité non nulle de faire demi-tour après une certaine distance parcourue dans le canal. Le type de trace décrit ci-dessus pourrait donc correspondre à la traversée d'un canal, ou à un aller et retour jusqu'à la barrière de pénétration du canal. Si la taille du canal dans sa partie la plus étroite est de l'ordre de grandeur des dimensions de la molécule, l'émission de fluorescence peut chuter à une valeur voisine de zéro pendant la traversée. S'il s'agit au contraire d'une connexion assez large entre deux pores, la chute du niveau de signal ne sera que partielle. Ce type de trace en V a été observé dans de nombreux films, sous air et sous vide mais elles apparaissent plus fréquemment pour des intensités d'excitation intermédiaires de l'ordre de quelques centaines de W/cm^2 . La trace démarre la plupart du temps brutalement à la valeur haute de l'émission, et cesse également brutalement quand l'émission a retrouvé cette valeur. Ce type de trace n'est donc pas partie constituante d'une trace continue dont le niveau évoluerait d'une valeur constante à une structure en V. L'émission de la molécule apparaît donc en cours de film, contrairement aux traces que j'ai décrites précédemment. Soit l'émission de cette molécule était inhibée jusqu'à sa progression à l'entrée du canal ou plus généralement de la constriction, soit l'émission est celle d'une molécule qui a diffusé

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

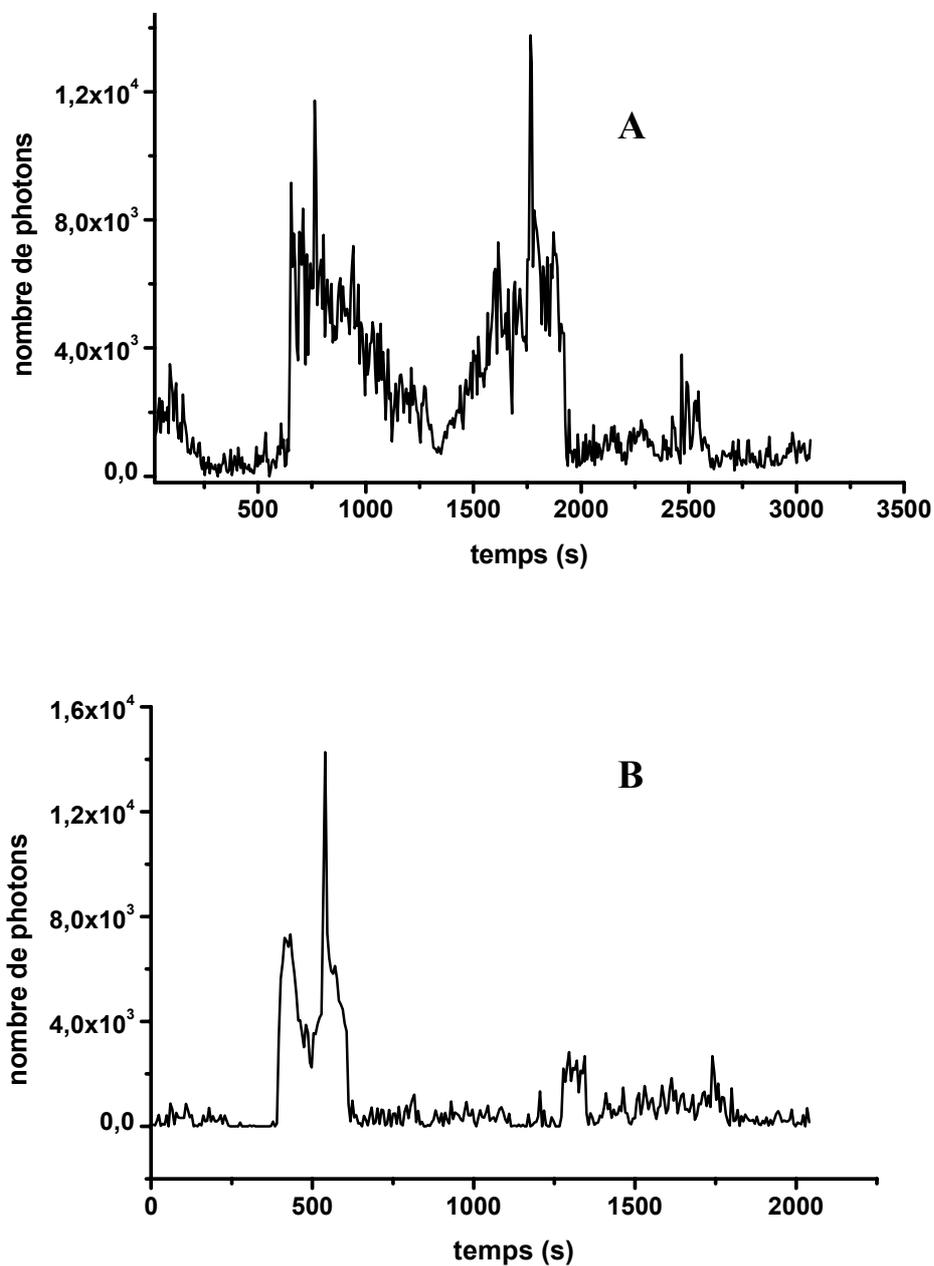


FIG. 2.39 – Exemples de traces en V. A sous vide, $75W/cm^2$; B sous vide, $375W/cm^2$.

Chapitre 2. Caractérisation multiparamètre de la fluorescence de molécules uniques pour l'étude de matériaux hétérogènes

jusqu'à cette structure particulière, suffisamment rapidement pour que sa trace ne puisse pas être suivie par notre technique d'analyse, puis sa diffusion a été ralentie par cet obstacle. La première possibilité correspondrait à une annihilation de l'émission de fluorescence par collage de la molécule à la paroi jusqu'à ce qu'un faible excès d'énergie apporté par effet thermique par exemple, ou par un processus de diffusion du solvant, lui permette de diffuser vers l'entrée du canal et d'émettre. Les traces de montées et de descentes lentes peuvent s'expliquer également par l'exploration par la molécule d'une zone de son environnement avec laquelle elle interagit de plus en plus fortement.

Le dernier type de trace typique de nos échantillons consiste en une trace de niveau stable qui montre un accroissement brutal du nombre de photons émis sous la forme d'un pic qui dure une ou quelques images au plus (Figure 2.40). La période noire consécutive est soit définitive et la molécule a photoblanchi, soit suivie d'une nouvelle phase d'émission et il s'agit alors d'un simple clignotement. La nouvelle période d'émission est précédée elle aussi la plupart du temps d'un pic important d'émission. Ce pic important d'émission peut aussi précéder une période d'émission stable moins intense. Ce type de traces a été observé indifféremment sur les films enregistrés sous air ou sous vide, mais l'intensité relative du pic est plus impressionnante quand l'intensité d'excitation augmente, et le pic peut correspondre à une bouffée de photons très importante.

Il serait fastidieux et certainement stérile de poursuivre la description de tous les types de traces observées qui sont très nombreux. La description qualitative des quelques traces typiques que je viens de faire avait pour objet de mettre en évidence d'une part l'hétérogénéité du film sol-gel, et d'autre part le nombre limité de sites dans lesquelles la molécule a une émission très stable. Les traces mettent en évidence qu'il peut y avoir une hétérogénéité très locale à l'échelle de déplacements nanométriques de la molécule, qu'il y a certainement des connexions entre les pores, et que certains pores restent en partie remplis de liquide qui favorisent la diffusion des molécules. J'ai déjà noté que le réseau de réticulation de ces films minces présentait des zones plus molles où la réticulation n'est que partielle, ce qui permet une large circulation des molécules à l'intérieur du film et vers la surface. Cet effet est à l'origine d'un phénomène d'agrégation qui a été clairement observé dans l'étude des films sous vide. Si les molécules diffusent vite, elles n'émettent que peu de photons pendant leur parcours jusqu'à leur stabilisation dans un pore plus fermé, ou jusqu'à ce qu'elles ressortent de la zone excitée. Il n'est donc pas possible d'observer leur trace spatiale de diffusion sur les images. Par contre, leur existence se traduit dans certaines zones des films sol-gel moins ou partiellement réticulées, par un phénomène de "pluie" de molécules, c'est à dire de points très brillants qui apparaissent soudainement et qui disparaissent très vite. Ces points correspondent probablement à l'émission de molécules qui ont diffusé rapidement vers un site de la matrice, où elles sont piégées très temporairement. Des traces temporelles acquises dans

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

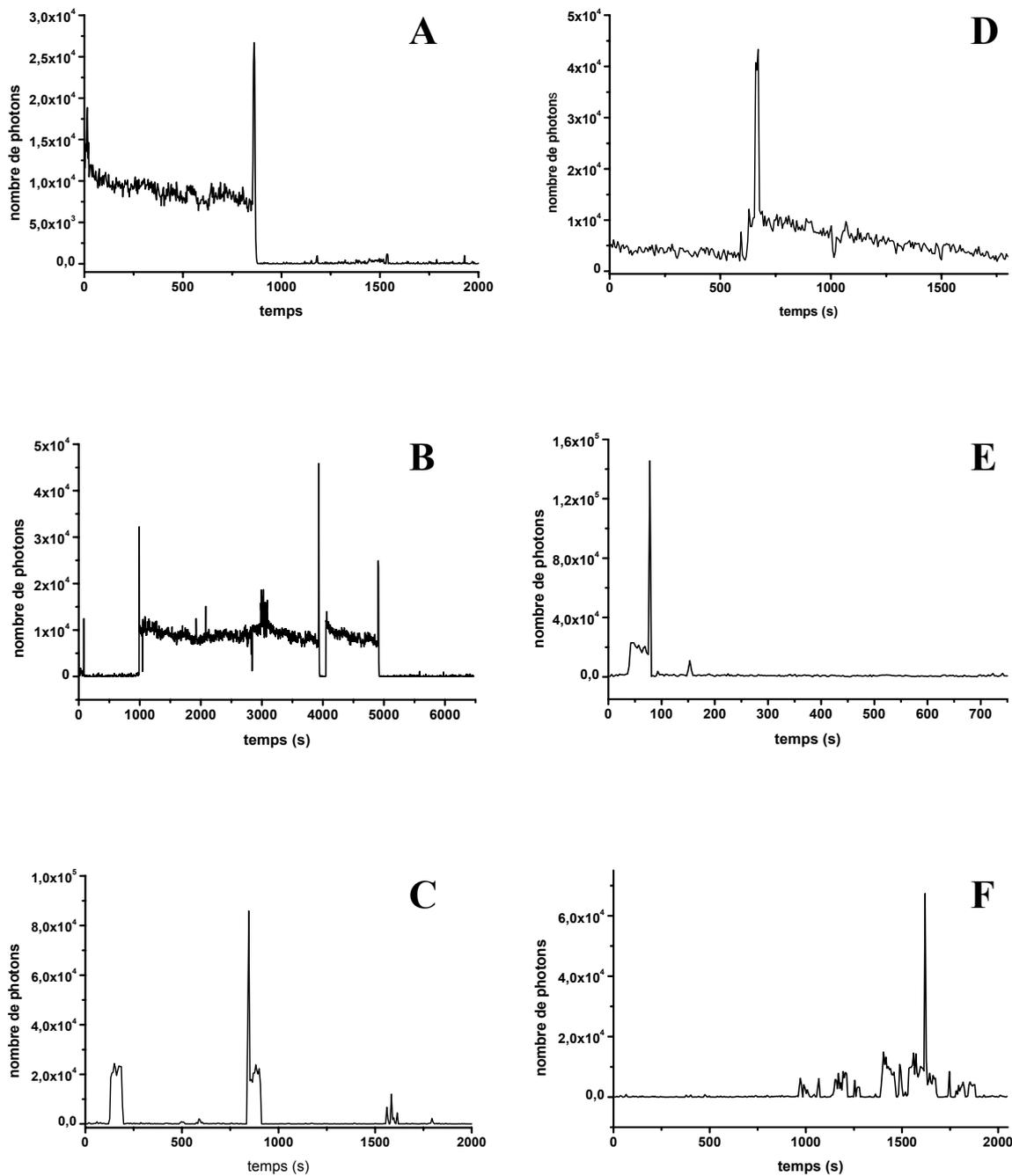


FIG. 2.40 – Exemples d'émission de bouffées de photons intenses. A et B sous vide, $75W/cm^2$; C sous vide, $755W/cm^2$; D sous air $200W/cm^2$; E et F sous air, $750W/cm^2$.

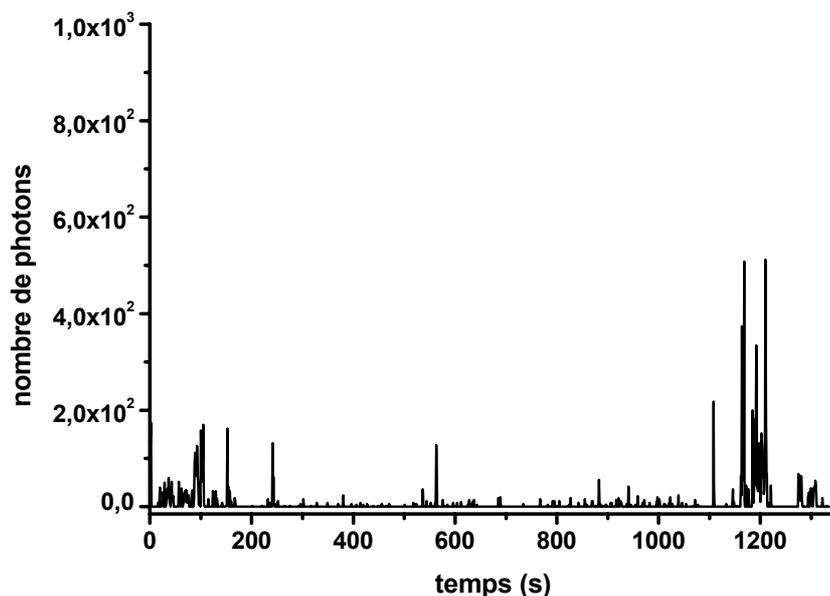


FIG. 2.41 – Signature du passage successif de molécules dans un site particulier.

ce type de zone montrent, dans des zones d'intérêt particulières (ROI), des pics d'émission séparés par des intervalles de temps irréguliers, comme l'illustre la figure 2.41. Il est souvent impossible de déterminer si les pics successifs d'émission sont dus à une unique molécule ou à des molécules différentes, et de telles zones ont été écartées des analyses quantitatives des films. Les traces temporelles permettent également de déterminer quelques caractéristiques du phénomène de diffusion rapide des molécules. La première observation qui a conduit à postuler l'existence de ce phénomène de diffusion est la suivante. En irradiant un film avec une intensité et un temps suffisant pour atteindre le photoblanchiment de toutes les molécules initialement présentes, et en recommençant une exploration de la même zone du film plusieurs heures plus tard, j'ai observé de nouveau la présence de molécules stables d'émission "normale". Les molécules qui diffusent ont donc une probabilité faible mais non nulle (puisque'il faut attendre plusieurs heures pour que de nombreux sites soient réalimentés) d'être capturées par un site suffisamment fermé pour bloquer leur diffusion rapide. Si on poursuit l'analyse de la trace temporelle d'une molécule fixe au delà du moment où elle a photoblanchi, on peut déterminer après traitement du film (c'est à dire en ayant soustrait le fond de diffusion laser) le niveau du signal observé dans la zone d'analyse (ROI) de la molécule étudiée, une fois celle-ci éteinte. Ce fond peut être attribué principalement au signal émis par les molécules qui diffusent rapidement à travers cette zone. On observe alors deux types de comportement différents. Dans un cas, ce fond est quasiment nul et le nombre de photons cumulé sur des minutes est très faible. De tels sites sont donc protégés de la

2.5. Microscopie grand champ, focus sur le comportement individuel d'émission de fluorescence : traces temporelles de molécules uniques, étude du phénomène de clignotement et discussion de singularités d'intérêt.

diffusion. C'est le cas en particulier pour le fond qui correspond à la grande majorité des traces très stables évoquées au début de ce paragraphe. L'autre cas correspond à l'opposé à une situation où le nombre de photons accumulés après disparition de la molécule pertinente n'est pas négligeable. Ces photons sont émis non pas continument mais pendant des périodes limitées de temps qui peuvent correspondre à un piégeage très temporaire d'une molécule qui a diffusé (figure 2.41). De tels sites, qui sont nécessairement suffisamment connectés à de potentiels réservoirs de molécules (poches non réticulées ou canaux larges), sont cependant suffisamment fermés ou rétrécis pour ralentir la diffusion moléculaire. Ils constituent des sortes de goulots d'étranglement, ce qui explique qu'ils sont occupés de façon répétitive par des molécules qui arrivent successivement. Il existe ainsi dans certains films des "canaux" larges qui permettent la circulation des molécules ce qui est la première étape à l'observation du phénomène d'agrégation que je décris au paragraphe 2.3.2. Heureusement, le niveau d'émission de ces molécules en transit reste bas, et l'erreur commise sur la détermination du nombre de photons émis par les molécules stables jusqu'à leur photoblanchiment est très faible. De plus, il est facile d'éliminer des analyses les sites où on voit passer au cours du temps de nombreuses molécules différentes qui donne une impression visuelle de "pluie". En moyenne, le nombre de photons émis par des molécules qui diffusent est de l'ordre d'une dizaine de photons par ROI et par seconde dans les sites ouverts des films étudiés sous air, quelle que soit la puissance d'excitation. Il atteint une valeur de quelques dizaines de photons par ROI et par seconde dans le cas des films sous vide. Cette valeur plus élevée est également pratiquement indépendante de la puissance. La différence entre air et vide peut s'expliquer en partie par le fait que les molécules en transit dans des zones moins réticulées sont en interaction avec l'oxygène qui diffuse plus facilement que dans des zones plus fermées, et qu'elles photoblanchissent rapidement sous air. Une autre hypothèse raisonnable est que la diffusion est moins rapide en vide qu'à l'air. En effet, le phénomène de diffusion rapide des molécules implique des passages des molécules par des canaux qui débouchent à la surface pour atteindre les différentes zones de l'échantillon. A l'air, l'échantillon est recouvert d'une couche d'eau mince qui favorise la diffusion des molécules qui atteignent la surface et la diffusion est certainement plus rapide que sous vide.

2.6 Conclusion

Les études que j'ai menées au cours de ma thèse sur les films solgel minces dopés par des molécules de pérylène orange se sont avérées très riches, tant en ce qui concerne l'avancement dans la compréhension des mécanismes photochimiques propres à la molécule étudiée, que dans l'analyse de la matrice dans laquelle la molécule est insérée.

En particulier, grâce à la conformation de microscopie grand champ dans laquelle ces études ont été réalisées, il nous a été possible de restituer une vue globale de l'échantillon, avec un échantillonnage de molécules suffisant pour obtenir des statistiques représentatives. Ainsi, nous avons mis en évidence l'existence dans la matrice solgel préparée sous forme de films minces d'une hétérogénéité importante, avec des domaines de géométrie, de réticulation mais aussi de polarité, c'est à dire de nature chimique, différentes.

La réponse de la molécule à l'excitation laser dans ces environnements différents conduit à une émission de fluorescence dont la dynamique au cours du temps varie suivant la nature des sites. C'est ce qu'attestent les différents types de clignotement observés et la large distribution des temps de survie des molécules. Un autre type d'hétérogénéité spectaculaire apparaît dans les spectres de fluorescence. Cette analyse spectrale m'a ainsi permis de mettre en évidence que le pérylène orange est un colorant dont le spectre de fluorescence, avec en particulier deux structures, mono et double bande, différentes, est une sonde particulièrement sensible de l'environnement local de la molécule individuelle analysée.

Parmi les nombreux phénomènes que nous a permis de suivre, pour un grand nombre de molécules, l'observation directe et simultanée d'une large zone de l'échantillon, nous avons aussi observé un certain nombre de processus inattendus comme la diffusion spatiale des molécules dans la matrice, ou encore le processus de nucléation.

J'ai proposé dans ce manuscrit un certain nombre d'explications et d'hypothèses en accord avec les différents phénomènes observés. Ce travail ouvre la voie à des études ultérieures qui permettraient de progresser dans leurs compréhension.

En particulier, et à présent que sont clairement définis les phénomènes d'intérêt et les signatures des individus qui présentent des comportements d'émission dont on aimerait comprendre l'origine, il serait intéressant d'adjoindre une analyse temporelle rapide à l'analyse multiparamètre déjà en place, ce qui permettrait d'avancer dans la compréhension des processus photophysique/chimique du pérylène orange irradié, en confirmant ou infirmant un certain nombre des hypothèses proposées.

Chapitre 3

La molécule unique comme sonde de l'effet SERS

3.1 Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

3.1.1 Historique

3.1.1.1 Découverte et SERS canonique

Pour pouvoir caractériser de manière précise les processus d'adsorption de réactifs électrochimiques sur des électrodes, la communauté des électrochimistes choisit de manière naturelle d'utiliser la spectroscopie optique vibrationnelle. Tout d'abord en raison de la signature chimique très fine qui permet de distinguer des espèces chimiques de formules proches, mais aussi parce que la spectroscopie de vibration, de par la nature même de la source du signal et comme nous l'avons montré au cours du 1er chapitre, permet aussi de distinguer et identifier des variations des propriétés des groupes fonctionnels (forces des liaisons,...) au sein d'une molécule, même complexe. A travers leur propriétés vibrationnelles, il est ainsi possible de déduire et de suivre le rôle de ces groupements dans les processus physico-chimiques tels que l'adsorption qui ont lieu aux électrodes. C'est préférentiellement la spectroscopie Raman qui sera choisie plutôt que la spectroscopie d'absorption IR dans laquelle les solvants utilisés (eau et autres solvants polaires très absorbants) contribuent fortement au signal ce qui présente un inconvénient non négligeable au cours du processus d'analyse des spectres. Lorsqu'en 1974, *Fleishmann* observa pour la première fois un signal Raman d'une intensité exceptionnelle, cette dernière ne fut pas directement associée à un effet "nouveau", mais on l'attribua plutôt à une augmentation de la rugosité des électrodes d'argent après plusieurs cycles d'oxydation et de réduction avec pour corollaire une augmentation de la surface spécifique. Dans le cadre

de cette hypothèse, la densité en molécules de pyridine adsorbées étant significativement plus élevée, on pouvait effectivement expliquer l'amplification du signal par une augmentation du nombre de molécules de pyridine participant à ce signal de diffusion [44]. Ce n'est que 3 ans plus tard, en 1977, avec les articles de *Jeanmaire* [89] et indépendamment d'*Albrecht* [90], que la communauté s'accorda sur l'implication d'un effet "nouveau", effet d'exaltation rendant le processus Raman plus efficace, dépendant du substrat métallique et donc nommé effet de surface. Dans ces articles, les auteurs s'attachaient effectivement à effectuer la comparaison de l'intensité relative des spectres Raman d'une même molécule, la pyridine à nouveau, obtenus d'une part de manière "classique", en solution saturée, et d'autre part sur des molécules de pyridine adsorbées sur une électrode d'argent. Ils observèrent ainsi une différence d'intensité telle, avec une exaltation du signal Raman sur l'électrode d'environ 10^5 par rapport au signal "classique", qu'elle ne pouvait définitivement pas être expliquée par un seul accroissement de la rugosité de surface de l'électrode.

Pour obtenir une exaltation du signal de diffusion Raman avec une excitation laser située dans le visible, on emploiera donc à partir de cette époque des substrats métalliques d'or, ou d'argent, qui présentent des hétérogénéités spatiales de surface, car l'exaltation Raman des premières expériences n'est pas observée sur des électrodes polies finement mais uniquement après que celles-ci ont subi plusieurs cycles redox. La taille des hétérogénéités présentes sur la surface après ce traitement et nécessaires pour rendre la surface exaltante reste par contre mal connue. Mais en 1980, toujours sur une électrode soumise à des cycles redox qui en modifient l'état de surface, *Billmann et Otto* [91] mettent en évidence la présence de structures à l'échelle nanométrique (rugosité de surface) sur l'électrode utilisée. Cette rugosité est associée à une exaltation SERS macroscopique de 10^6 . Ainsi, et dans toutes les autres expériences de SERS macroscopique, qui sont nombreuses du fait que cette technique de caractérisation est utilisée de manière quasi-routinière en chimie, on observe un facteur d'exaltation déjà important. Depuis la première observation en 1974 et parallèlement à l'extension de cette technique, de nombreuses études expérimentales et théoriques se sont donc attelées à essayer de comprendre les phénomènes à l'origine de l'exaltation observée. En particulier, les variations de ce facteur en fonction de la nature de l'espèce chimique, mais aussi avec la longueur d'onde d'excitation, amènent déjà les auteurs à postuler et à mettre en évidence l'existence de deux effets coopératifs participant au processus d'exaltation. Néanmoins l'interprétation des expériences macroscopiques par la théorie reste complexe et majoritairement non généralisable. Les cas de convergence entre la théorie et la mesure réelle sont effectivement des cas particuliers dans lesquels les paramètres expérimentaux des systèmes modèles choisis sont certes totalement définis – utilisation de nanocristaux aux propriétés de surface et réseaux de cristallisation connus – mais ne peuvent pas être considérés comme représentatifs des substrats réels, en général beaucoup plus complexes et hétérogènes. Des électrodes d'ar-

3.1. Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

gent utilisées initialement, on est en effet arrivé à l'emploi d'une gamme beaucoup plus large de substrats. Sont utilisés des agrégats métalliques– de formes, tailles, et degré d'agrégation différents– en solution ou déposés, des nanocristaux, mais aussi des films minces obtenus par des procédés électrochimiques classiques ou par CVD (Chemical Vapor Deposition). En fait, les différents membres de cette communauté réalisaient déjà que le handicap le plus important qui empêchait la progression de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet SERS, était fortement lié au caractère macroscopique des expériences menées. L'effet de moyenne spatiale inhérent à l'étude d'un grand nombre de molécules réparties sur l'ensemble de la surface de l'échantillon, empêche en effet toute exploration locale du phénomène d'exaltation sur le substrat pourtant hétérogène. Cette "intuition" s'appuyait aussi sur le fait qu'on connaissait déjà, et ce dès le XIX^{ème} siècle grâce aux expériences menées par *Faraday*, l'existence de propriétés optiques/électromagnétiques particulières présentées par différents métaux (or et argent mais aussi platine, cuivre, fer,...), lorsque ceux-ci se trouvent sous la forme de particules agrégées de dimensions inférieures aux longueurs d'onde du domaine visible. En particulier, la couleur d'une préparation contenant de telles particules, qui lorsqu'elles se trouvent en solution constituent des systèmes qualifiés de colloïdaux, présente des variations importantes avec la taille des particules élémentaires et leur degré d'agrégation qui détermine la taille globale des structures formées. On peut effectuer le même type de remarque lors de l'ajout d'ions (en particulier les ions chlorures), qui peuvent faire "virer" une préparation de colloïdes d'or du rouge rubis au bleu, par une augmentation de la taille des structures, comme cela a pu être démontré depuis les premières observations de *Faraday*.

3.1.1.2 "NanoSERS"

Au début des années 90, avec l'avènement des études de molécules uniques relevant de la tradition de la microscopie de haute résolution, une occasion de résoudre la question de l'effet SERS s'ouvre. Ce furent les équipes de *K. Kneipp* [7] et *S. Nie* [8] qui enregistrèrent en 1997, les premiers spectres Raman de molécules uniques. Ces deux expériences furent menées à partir de solutions colloïdales, auxquelles furent ajoutées les molécules d'intérêt, respectivement le crystal violet et la rhodamine 6G. Pour obtenir le signal d'une seule molécule, les démarches de ces deux équipes, bien qu'indépendantes, les conduisirent à définir des paramètres expérimentaux semblables et qui sont depuis utilisés comme norme dans toutes les équipes qui s'intéressent à la mise en oeuvre d'études "nanoSERS". Il s'agit majoritairement de paramètres de dilution s'appliquant sur les concentrations relatives des structures exaltantes et des molécules. Qualitativement, les concentrations en molécules cibles sont définies de manière à n'avoir au plus qu'une seule molécule adsorbée– majoritairement aucune– par structure métallique, et qu'en même temps il n'y ait d'autre part statistiquement dans le volume sondé pas plus d'une molécule à la fois, le plus souvent zéro. Afin de satisfaire à ces

conditions et pour éviter que le signal ne provienne de plusieurs molécules, les deux équipes pionnières se placèrent dans des conditions de dilution extrême, *a priori* plus exigeantes même que celles requises pour garantir avec une bonne probabilité l'unicité de la molécule. Pour Nie cette dernière condition est réalisée en adaptant directement la concentration en structures métalliques, et en limitant la densité d'agrégats sur la surface, en sorte d'avoir au maximum une seule structure dans le volume sondé. Plus quantitativement, les concentrations utilisées sont de 2.10^{-11} et 2.10^{-10} mol/l (M) en Rh6G pour 10^{14} particules par litre dans un cas et $\sim 3.10^{-14} \text{ M}$ en crystal violet pour 3.10^{12} particules dans l'autre ; dans les deux cas, et même en considérant que la totalité des molécules s'adsorbent (ce qui n'est certainement pas le cas), on obtient une proportion molécule/agrégat inférieure à 1– avec dans le cas de *Kneipp*, un maximum de 0,6 molécule et 100 agrégats dans le volume sondé– ce qui rend très improbable la possibilité d'avoir plusieurs molécules sur le même agrégat.

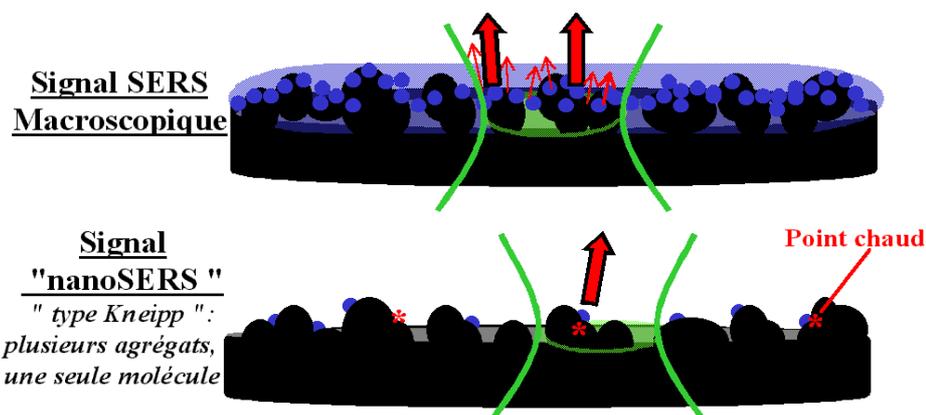


FIG. 3.1 – Illustration des caractéristiques spécifiques aux expériences macro- et nanoSERS. Dans la surface sondée en nanoSERS est détecté le signal d'une unique molécule adsorbée sur un point chaud d'un agrégat individuel.

Il apparaît alors que le phénomène d'exaltation de surface étudié présente des caractéristiques remarquables. La première observation est que toutes les particules ne sont pas actives, et on n'obtient des spectres Raman exaltés que sur un nombre très restreint d'agrégats. Plus précisément, ce nombre est inférieur au nombre d'agrégats sur lesquels sont statistiquement adsorbées les molécules.

Il existe donc dans l'ensemble de la population d'agrégats des individus actifs et d'autres intrinséquement inertes vis à vis des phénomènes d'amplification du signal Raman. Cette observation est illustrée sur la figure 3.1. D'autre part, les signaux Raman de molécules individuelles, observés sur les agrégats actifs, présentent un facteur d'exaltation gigantesque– largement supérieur aux facteurs observés en SERS macroscopique– qui permet d'obtenir

3.1. Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

des spectres relativement résolus pour des durées d'acquisition très courtes, de l'ordre de la seconde seulement. Comme je l'ai déjà souligné au cours du premier chapitre, la deuxième caractéristique remarquable du signal Raman de molécules uniques est qu'on observe une forte dynamique temporelle : dans les spectres successifs, les différentes bandes caractéristiques voient leurs intensités relatives, ainsi que leurs fréquences, fluctuer au cours du temps. Sur ces points particuliers, le facteur d'exaltation de la diffusion Raman, géant, atteint 14 ordres de grandeur. De tels points, en raison de leur activité exceptionnelle sont appelés points chauds. Sur ces sites, l'intensité du signal de diffusion Raman devient comparable au signal de fluorescence d'un colorant efficace. Dans la communauté SERS, pour comparer ces deux processus d'interaction lumière-matière, on parle ainsi d'une "section efficace SERS" – égale au produit du facteur d'exaltation avec la section efficace de diffusion Raman normale – qui atteint, grâce à l'exaltation géante des points chauds, le même ordre de grandeur que les sections efficaces de fluorescence de bons chromophores. Une des conséquences remarquables de l'existence de points chauds est la sélectivité spatiale intrinsèque de l'analyse par spectroscopie Raman exaltée de surface. Le caractère déjà très local de l'analyse du signal de molécules uniques est ici augmenté, puisque l'échelle pertinente est celle sur laquelle une exaltation intense est observée, c'est-à-dire typiquement la dimension du point chaud où l'exaltation est très localement confinée.

En utilisant le signal SERS de molécule unique comme sonde de l'effet d'exaltation, certaines caractéristiques des points chauds ont pu être mis en évidence. Tout d'abord ces points ne sont présents que sur un nombre très limité de nanostructures. D'autre part, à l'échelle d'une nanostructure unique, l'augmentation de la concentration en molécules sondes conduit à l'observation d'un accroissement non linéaire, accompagné d'un phénomène de saturation du signal de diffusion exaltée [92][93]. Une telle évolution du signal quand on augmente le nombre de molécules par nanostructure démontre que le nombre de points chauds par agrégat est lui-même limité. Ce résultat implique également que sur des nanostructures dont l'extension spatiale est de l'ordre de la centaine de nanomètres, l'extension du point chaud est très en deçà de cette échelle et confirme que l'exaltation est très localisée.

L'ensemble de ces caractéristiques confère dans tous les cas aux études des échantillons par observation du signal SERS de molécule unique – que ce soit pour une analyse chimique classique, ou dans le but d'explorer l'effet d'exaltation – une résolution spatiale intrinsèque exceptionnelle.

3.1.1.3 Enjeu du nanoSERS

Ce n'est donc en réalité qu'avec les expériences SERS de molécules uniques[7][8], qu'on a pu réellement appréhender le facteur d'exaltation "vrai", ou propre, du processus SERS, et non plus un facteur macroscopique, par définition moyenné sur un ensemble de molécules,

qui ne présentent pas toutes des spectres Raman exaltés. Sur ces nouvelles bases, on va donc pouvoir effectuer de nouvelles études quantitatives, en mode molécule unique, sans les artefacts des études macroscopiques, pour pouvoir comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet d'exaltation de surface du signal Raman. De plus, l'existence des points chauds confère au microscope SERS une résolution largement accrue par rapport à la résolution intrinsèque du montage optique ; en utilisant les molécules comme des sondes très locales, on peut donc espérer discriminer plus précisément les objets qui conduisent à obtenir des spectres Raman exaltés. Enfin, outre un intérêt fondamental, la motivation vient aussi de la possibilité d'utilisation de l'analyse SERS de manière plus systématique et quantitative, sur le nombre le plus important possible de systèmes moléculaires ce qui ne peut se faire que par l'emploi de substrats adaptés. La définition de leurs caractéristiques suppose une progression dans la compréhension et l'interprétation des phénomènes SERS dont les spectres sont les signatures. C'est dans ce processus global que s'inscrivent mes travaux de thèse, un tel objectif—qui nécessite le contrôle de la préparation d'objets de dimensions nanométriques et la possibilité d'analyse très locale—s'insère aussi directement dans le cadre des très actuelles nanotechnologies. Comme je le montrerai, l'idée de ce travail de thèse est aussi de mettre si possible en oeuvre plusieurs outils à notre disposition aujourd'hui, dans la panoplie des microscopies à haute résolution (ex : AFM, MEB), dans le but de comprendre les mécanismes fondamentaux mis en jeu dans l'effet SERS.

3.1.2 L'effet d'exaltation de surface

S'il reste de nombreuses zones d'ombre, il est admis que les différentes contributions mises en jeu dans le phénomène d'exaltation du signal Raman peuvent être séparées en deux catégories. On traduit ainsi que des effets de natures différentes sont mis en jeu. Tout d'abord, on regroupe sous le terme d'"effet électromagnétique" les mécanismes qui conduisent à l'exaltation des champs électromagnétiques. Cet effet affecte non seulement le champ exciteur mais aussi le champ émis dans la diffusion Raman elle-même. En complément de l'effet électromagnétique, il faut aussi considérer des mécanismes qui expliqueraient la sélectivité chimique de l'effet SERS—qui n'est pas observé sur certaines espèces et en particulier sur les molécules de solvant des échantillons comme l'eau ou les alcools— et qui permettent d'atteindre les facteurs d'exaltation effectivement observés expérimentalement. Ainsi a-t-on regroupé sous le qualificatif d'"effet chimique" d'autres effets coopératifs, nécessaires pour expliquer cette sélectivité, et indispensables à l'obtention des facteurs d'exaltation géants bien qu'ils ne contribuent à l'exaltation totale que pour une part moindre comparé au facteur d'ordre électromagnétique.

Si les bases de l'effet électromagnétique semblent relativement bien comprises, l'effet chimique l'est beaucoup moins, et c'est l'ensemble des différentes hypothèses formulées à ce

3.1. Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

jour que je développerai.

3.1.2.1 Les sources électromagnétiques de l'effet SERS

On peut distinguer deux contributions qui participent à l'augmentation des champs électromagnétiques, à proximité d'une surface métallique.

Effet géométrique La première contribution est liée à la géométrie de la surface, et peut être rapprochée de l'effet d'antenne ou "lightening rod effect" utilisé en microscopie de champ proche[42]. Elle nécessite la présence sur le substrat de points singuliers—protubérances, arêtes ou interstices—matérialisés dans les expériences de champ proche par l'extrémité d'une pointe métallique (figure 3.2a) [94]. Le champ électromagnétique exciteur provoque un déplacement des charges positives et négatives à la surface du métal (comme dans le cas de la déformation du nuage électronique d'une molécule) ce qui conduit à l'apparition d'un moment dipolaire induit. Ces charges se localisent en particulier sur les régions de fortes courbures présentes sur la surface et donc sur les excroissances et les interstices. Il en résulte un champ électromagnétique à la fois très intense mais aussi très localisé dans ces régions. L'exaltation du champ décroît rapidement dans l'espace, et sa portée est de l'ordre d'une dizaine de nanomètres. Le facteur d'exaltation ainsi que sa portée varient avec la nature du métal, la forme du "défaut" de surface et son orientation par rapport à la direction du champ électromagnétique exciteur.

Plasmons La seconde contribution à l'exaltation électromagnétique fait intervenir l'excitation de plasmons de surface sur le substrat. Les plasmons de surface sont des modes propres de vibrations des électrons du métal ; ils sont localisés à la surface du métal. Tout comme les vibrations des molécules en spectroscopie IR, ces modes peuvent être excités par absorption d'un rayonnement de longueur d'onde adéquate. Leur excitation induit un champ électromagnétique, dont l'amplitude décroît perpendiculairement à la surface, sur une distance d'une centaine de nanomètres dans l'air et, à l'intérieur du métal sur quelques dizaines de nanomètres : c'est l'effet de peau des métaux. Le plasmon de surface créé sur le substrat a plusieurs voies de désexcitation possibles, parmi-lesquelles celle d'un transfert d'énergie, par le biais d'un champ électromagnétique, vers les molécules adsorbées. L'intensité du champ électromagnétique et sa portée, dépendent ici aussi largement de la géométrie et des dimensions de la surface ou de la particule.

Un certain nombre de modèles et d'études théoriques ont été développés pour décrire l'effet électromagnétique impliqué dans l'exaltation SERS dans le cas de différentes morphologies du substrat (figure 3.2), de la forme la plus simple—particule sphérique—à la plus complexe (colloïdes fractals) [95][96][97][98]. La rugosité du substrat a aussi été modélisée dans certains

cas par des réseaux métalliques.

La sphère Considérons le cas d'une sphère métallique de dimensions petites devant la longueur d'onde utilisée, l'approximation dipolaire est valable et on peut donc considérer qu'en présence du laser d'excitation, la particule se trouve dans un champ électromagnétique constant \vec{E}_0 . Le plasmon de surface créé est de nature dipolaire et le champ maximal¹ induit à la surface de la sphère, aux pôles situés dans l'axe du champ exciteur, s'écrit :

$$\vec{E}_S = \varepsilon(\omega) \left(\frac{3}{2 + \varepsilon(\omega)} \right) \vec{E}_0 \quad (3.2)$$

où ε est la constante diélectrique du métal dans un champ sinusoïdal de fréquence ω :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_R(\omega) + i\varepsilon_I(\omega) \quad . \quad (3.3)$$

Lorsque la partie réelle $\varepsilon_R(\omega)$ de la constante diélectrique tend vers -2 , le champ induit \vec{E}_S est maximal. La fréquence correspondante est la fréquence de résonance ω_{ps} du plasmon de surface, mise en évidence par *Ritchie* en 1957 [99]. Pour un métal donné, la fréquence de résonance des plasmons de surface se déplace avec la taille (surtout pour les petites particules, de dimensions inférieures à 10nm) et la forme des particules ainsi qu'avec le milieu environnant. Le tableau 3.4 regroupe les valeurs des fréquences plasmons de métaux couramment utilisés comme substrat SERS [100].

	Ag	Au	Cu	
$\omega_{ps}(nm)$	355	498	355	(3.4)

Supposons qu'une molécule soit adsorbée sur la surface, tout d'abord par physisorption c'est-à-dire par la mise en jeu d'interactions dipolaires, forces de Van der Waals et/ou de liaisons hydrogènes. Les effets du champ intense créé à la surface de la particule par le rayonnement laser interviennent en premier lieu au niveau de l'excitation de la molécule, mais aussi lors de la diffusion du signal Raman.

Comme le décrit *Pettinger* dans un modèle, qui fut le premier à prendre en compte le rôle des plasmons de surface en addition de l'augmentation du champ électromagnétique par effet géométrique [101], une partie de la diffusion élastique des plasmons est effectivement convertie en diffusion inélastique par création ou annihilation de modes de vibration de la molécule adsorbée. Au niveau de la molécule, tous les processus s'effectuent par le biais de

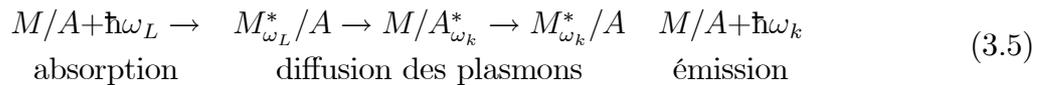
¹On peut d'une manière équivalente écrire la polarisabilité d'une particule sphérique :

$$\alpha = 4\pi a^3 \left(\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} \right) \quad , \quad (3.1)$$

où a est le rayon de la particule, qui est ici mis en évidence.

3.1. Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

transferts d'énergie, et en particulier dans le cas de la relaxation finale au cours de laquelle la molécule transfère de l'énergie au métal, plutôt que d'émettre des photons de diffusion. C'est enfin le photon diffusé par le métal par la désexcitation des plasmons, qui constitue le signal détecté. Les différentes étapes menant au photon de diffusion SERS pour un mode de vibration donné k de la molécule, sont symbolisées plus simplement sur le schéma 3.5, où A et M représentent respectivement la molécule adsorbée (ou adsorbat) et la particule métallique, et où l'exposant * traduit le caractère excité de l'objet.



Dans ce processus, plusieurs phénomènes assurent une large exaltation. Premièrement, l'absorption du photon laser et l'émission du photon de diffusion Raman sont effectuées par la particule d'argent qui a une polarisabilité, donc une section efficace d'absorption, beaucoup plus grande que la molécule isolée, et symétriquement une émission plus efficace. La particule sert donc d'antenne réceptrice et émettrice pour la diffusion Raman. Le second élément est que la molécule est dans le champ proche plasmon de la particule. Il existe donc un couplage dipolaire fort entre ces deux objets, et la molécule bénéficie pleinement de l'effet d'antenne de la particule : la molécule interagit avec un champ plasmon maximal et elle est également suffisamment proche de la particule pour que le dipôle Raman polarise de façon optimale la particule, qui rayonnera. Un point de vue différent mais équivalent, est de dire que la molécule est suffisamment proche pour diffuser inélastiquement avec le maximum d'efficacité le plasmon de la particule.

Cette interprétation a de plus l'avantage d'expliquer l'origine de plusieurs phénomènes secondaires accompagnant l'émission SERS. Tout d'abord, la fluorescence est annihilée : sur les spectres SERS, on remarque en effet l'absence de tout signal de fluorescence, même pour des molécules de colorants très efficaces telle que la Rh6G. En fait, la fluorescence a un temps caractéristique qui, comparé à ceux des processus de transfert d'énergie, est long (ns) en raison d'une efficacité relative d'émission des molécules faible par rapport à l'efficacité d'émission des particules métalliques, pour lesquelles les temps caractéristiques sont plutôt de l'ordre de la ps voire de la fs. Ici le couplage dipolaire fort entre la molécule et la particule sur laquelle elle est adsorbée, ouvre une nouvelle voie de relaxation beaucoup plus efficace et la fluorescence est supprimée. Un autre point intéressant, est que ce modèle permet de rendre compte du fond continu souvent observé dans les spectres SERS de molécules uniques.

Ce modèle propose aussi plusieurs effets susceptibles de conduire à une perte d'efficacité de l'exaltation SERS. Parmi ceux-ci, on peut citer les couplages d'ordre supérieur entre la molécule adsorbée et la particule, conduisant à des processus non radiatifs de désexcitation (couplage dipôle-multipôle et dipôle-paire électron-trou). Dans ce modèle, il est aussi prévu que l'existence d'une rugosité à l'échelle nanométrique, en favorisant la localisation

des plasmons, crée des champs électromagnétiques très importants et très localisés sur des sites particuliers du substrat. Cela pourrait donc participer à expliquer la présence, sur les substrats, des points chauds sur lesquels on observe expérimentalement des exaltations exceptionnelles du signal Raman.

Cas plus complexes modélisés : effet de couplage, jonction. Si le facteur d'exaltation attendu dans le cas d'une sphère métallique isolée est de l'ordre de 10^6 , ce facteur augmente déjà largement si on ne considère non plus une, mais deux particules à une distance de quelques nanomètres l'une de l'autre [95] (figure 3.2b). L'exaltation du champ électromagnétique entre ces deux particules très proches est ainsi toujours largement supérieure— de 4 à 6 ordres de grandeurs— à celle obtenue dans le cas d'une unique sphère, quel que soit le diamètre des objets, ou la distance de la surface à laquelle on se place pour calculer le champ (en se plaçant néanmoins dans l'interstice présent entre les particules). Comme l'ont montré récemment Xu et ses coauteurs [95], plus les particules sont proches, meilleur est le couplage entre les modes plasmons de chaque sphère ; on se place alors dans le cadre de jonctions entre particules et la présence des deux interfaces métal-air circonscrit le champ dans un espace très confiné. Le facteur d'exaltation du champ électromagnétique calculé dans cette même référence peut alors atteindre 10^{10} à 10^{12} dans le cas de sphères quasi-jointives, pour les points chauds d'exaltation particulièrement importante localisés dans les interstices ou les jonctions entre particules. Cet effet de la présence de jonctions au sein de la structure exaltante est remarquable et pourrait permettre d'expliquer une observation effectuée en SERS macroscopique : au cours de ces expériences il est en effet courant de recourir à un processus d'agrégation des particules pour activer les colloïdes, cette pratique ayant pour origine l'observation que seules les particules de taille relativement importante semblent présenter une activité SERS. A la lumière des calculs de dipôles couplés effectués par Xu *et al.* [95], on peut effectivement postuler que l'activité particulière de ces grosses structures pourrait être liée à la présence de nombreuses jonctions et interstices entre particules élémentaires agrégées. L'influence de la morphologie des particules sur l'exaltation du champ est aussi discutée dans cet article. Par exemple, la présence d'une protubérance en pointe sur une sphère (figure 3.2c) augmente de 5 à 6 ordres de grandeur (pour le cas d'une pointe formant un angle de 60°) l'exaltation calculée par rapport au cas d'une bille parfaite, en atteignant 10^{11} . Le facteur lié à la géométrie "en pointe" est aussi plus important que celui obtenu pour une protubérance semi-sphérique, au maximum de 10^7 (figure 3.2d).

Une certaine attention a aussi été accordée à la description des structures plus complexes de type fractales (figure 3.2e) que forment les agrégats lorsqu'ils coalescent en solution, et qui sont largement utilisées expérimentalement comme substrat exaltant. L'intérêt particulier de la modélisation de ces agrégats type colloïdes étant que de nombreuses études SERS de molécules uniques sont justement conduites sur de tels systèmes et que l'interprétation

3.1. Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

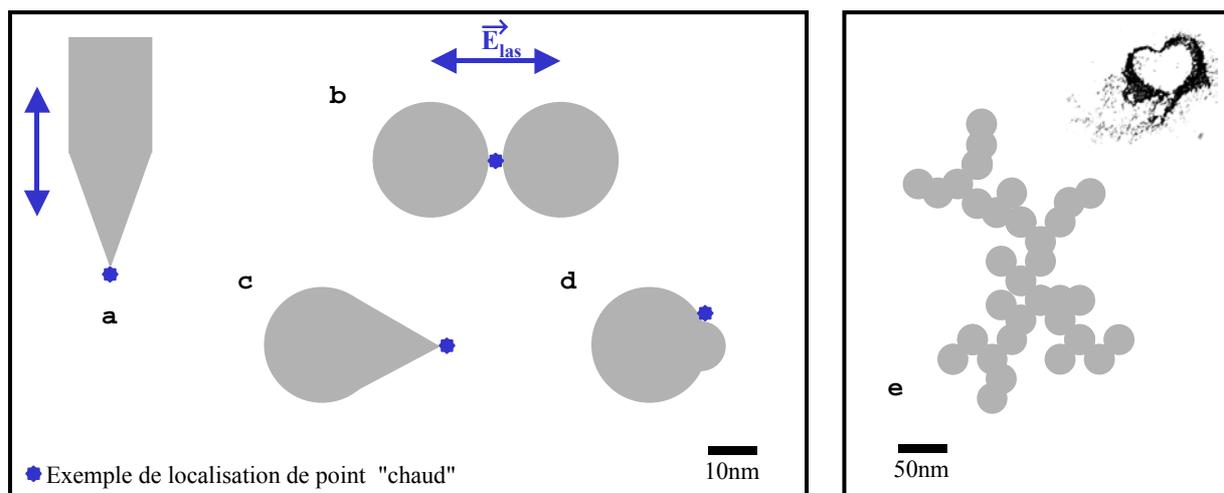


FIG. 3.2 – Quelques exemples de structures métalliques exaltantes, avec pour les plus simples (a à d) la localisation possible d'un point singulier de l'exaltation électromagnétique dit point "chaud"

de ces expériences est complexe. *Corni et Tomasi*, en particulier, ont développé un modèle [96], dans lequel la molécule physisorbée est traitée *ab initio*, tandis que la particule métallique est décrite dans son ensemble à travers ses propriétés diélectriques². La possibilité pour le couple molécule(pyridine)/métal de se trouver dans un solvant est aussi prise en compte dans ce modèle, le solvant étant dans ce cas modélisé comme un milieu diélectrique homogène. Les auteurs mettent ainsi en évidence l'importance du nombre de particules composant la structure métallique, mais aussi celle du site d'adsorption de la molécule dont on étudie la diffusion Raman. L'exaltation électromagnétique calculée pour une chaîne de sphères d'argent augmente avec le nombre de sphères. "Topologiquement", l'exaltation la plus importante est obtenue pour une adsorption de la molécule le long de l'axe de la chaîne et plus particulièrement dans l'interstice entre deux sphères ; de plus, dans le cas de chaîne d'au moins 5 particules élémentaires, la jonction pour laquelle l'exaltation est maximale se situe *a priori* au centre de la chaîne, plutôt qu'au niveau des extrémités [97]. Dans le cas de la structure fractale, constituée d'un nombre beaucoup plus important de particules, une troisième échelle spatiale est considérée : la structure globale, décrite comme un ensemble de dipôles couplés (les sphères métalliques de diamètre de l'ordre de la dizaine de nanomètres, en tant que composants élémentaires) [98]. Dans ce cas, les calculs de l'exaltation électromagnétique attendue, font à nouveau apparaître que la probabilité de présence de points chauds sur la structure, ainsi que l'amplitude de l'exaltation, augmentent avec le nombre de

²Dans ce modèle sont néanmoins pris en compte les effets de taille finie, liés à la forte similarité de l'ordre de grandeur de la taille de la particule avec celui du libre parcours moyen des électrons. Ces effets modifient le libre parcours des électrons dans le métal, et par conséquent sa structure de bande.

sphères considérées (de 50 à 1000), pour atteindre des facteurs d'exaltation allant de 10^{10} à 10^{13} en fonction du rayon des particules élémentaires ($r=5-20\text{nm}$). Dans ces facteurs d'exaltation électromagnétiques, les auteurs montrent que la contribution la plus importante est liée à la structure locale du point chaud, qui participe pour presque 9 ordres de grandeur à l'exaltation totale. Il faut aussi noter qu'aux longueurs d'onde d'excitation utilisées pour les calculs (607-799nm), la présence de solvant ne modifie que très peu le comportement exaltant des agrégats d'argent, contrairement aux structures d'or dont le facteur d'exaltation en présence de méthanol est 10 fois supérieur à celui obtenu dans le vide³. Si les spectres SERS calculés présentent bien des différences par rapport aux spectres macroscopiques (déplacement spectral, intensités relatives modifiées [97]), les auteurs ne prennent cependant pas en compte les modifications induites par l'adsorption (groupement mis en jeu ou chimisorption, c'est-à-dire formation de nouvelle liaison covalente– ou de coordination– entre la molécule et l'agrégat) sur les différents modes de vibration de la molécule.

L'effet "électromagnétique" permet donc d'expliquer un certain nombre de phénomènes observés dans les expériences SERS, comme l'existence d'au moins deux échelles de taille d'importance dans les substrats les plus actifs : une taille caractéristique relativement grande ($\simeq 10$ à 80 nm) pour les particules, et une échelle beaucoup plus petite, liée à la localisation des plasmons et à l'existence des points "chauds" (taille des interstices, ou des protubérances,...). L'effet électromagnétique explique aussi en grande partie les comportements obtenus sur des systèmes plus étendus, comme les structures fractales, et la localisation des sites actifs. Cependant, l'ensemble des valeurs présentées est constitué de valeurs théoriques, calculées dans le cadre de modèles avec l'hypothèse de couplages de type dipolaire, et pour des morphologies particulières, voire idéales. Les morphologies considérées dans ces calculs ne décrivent donc qu'un ensemble très restreint de substrats expérimentaux réels. Il existe à l'heure actuelle très peu d'études expérimentales permettant de quantifier l'exaltation à l'échelle microscopique et de localiser les points chauds au sein des systèmes d'agrégats métalliques réels– de type colloïdaux ou non– et dont la morphologie peut s'avérer très complexe et hétérogène parce que ces structures peuvent être constituées d'un nombre relativement important de particules élémentaires. Les études menées jusqu'à présent en utilisant les techniques de microscopie optique de champ proche à balayage (SNOM) semblent néanmoins être en accord avec certains points prévus par la théorie. On a pu notamment mettre en évidence l'existence, sur des films discontinus métal/diélectrique (verre/Au ou Ag), de points chauds très localisés, sur des zones de dimensions nanométriques ($\simeq 10\text{nm}$), et sur lesquels l'exaltation de l'intensité du champ électromagnétique atteint un facteur de 10^{10}

³Cette observation est liée au fait que la longueur d'onde d'excitation optimale varie avec l'environnement dans lequel se trouve la particule, à cause des différences de constantes diélectriques, et donc d'indices, à l'interface métal/vide ou métal/solvant. Pour l'or, le déplacement en fréquence est favorable en présence de méthanol, pour l'argent, les longueurs d'ondes utilisées correspondaient déjà à un optimum dans le vide.

3.1. Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

[102]. D'autres caractéristiques des plasmons de surface d'agrégats individuels, telles que la position en énergie de la résonance plasmon et le temps caractéristique, de l'ordre de la dizaine de femtosecondes, des processus de désexcitation des plasmons, ont pu aussi être mesurées en SNOM [103]. Dans cette étude conduite sur des agrégats d'or, *Klar et al.* ont de plus observé des structures à double résonance plasmon, pour lesquelles un modèle relativement simple de deux sphères proches permet d'obtenir un très bon accord avec les points expérimentaux. A nouveau dans ce cas, l'effet d'une jonction semble donc conduire à des phénomènes très particuliers. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que dans ces deux expériences les échantillons étudiés ne peuvent toujours pas être considérés comme reflétant fidèlement les substrats SERS réels dans leur diversité, du nanocristal aux faces cristallographiques bien définies jusqu'aux colloïdes. Il est donc à ce jour essentiel de mettre en oeuvre de nouvelles études de ces substrats, pour permettre de comprendre plus précisément les corrélations entre activité SERS et caractéristiques spatiales des agrégats. Je présenterai ainsi dans ce manuscrit, une étude effectuée dans ce but.

Nous avons aussi vu que les valeurs du facteur d'exaltation lié à des phénomènes électromagnétiques, et prévues par les modèles, peuvent être très importantes, et parfois très proches de celles observées expérimentalement. On pourrait donc admettre que dans certains cas, l'effet électromagnétique suffise à lui seul à expliquer l'augmentation du signal de diffusion Raman. Mais plusieurs points contredisent cette hypothèse et conduisent à conclure que cela n'est généralement pas le cas. Tout d'abord, un certain nombre d'observations expérimentales montrent l'existence d'une sélectivité chimique de l'exaltation. Cette sélectivité ne peut être expliquée dans le cadre des modèles électromagnétiques présentés. Premièrement toutes les molécules, c'est-à-dire toutes les espèces chimiques, ne présentent pas de spectres Raman exaltés. En particulier, il est une constante au cours des nombreuses expériences SERS, aussi bien en mode macroscopique, que dans le cas d'études de molécules uniques : si on observe bien un fort signal des molécules cibles, le signal du solvant est toujours absent alors que les molécules constitutives sont *a priori* elles-aussi soumises au fort champ électromagnétique. Deuxièmement, une adjonction d'ions peut aussi modifier l'exaltation effective. Nous verrons notamment les exemples d'une activation, c'est-à-dire une augmentation de l'exaltation, observée en présence d'ions chlorures, tandis que les ions thiosulfates la diminuent voire l'annihilent totalement [93].

D'autre part, et même en considérant les valeurs les plus importantes prévues par les théories de l'effet électromagnétique, il apparaît que les seuls processus électromagnétiques s'avèrent insuffisants pour expliquer l'ordre de grandeur des facteurs SERS en régime de molécule unique, qui atteignent 10^{14} - 10^{15} . Un effet supplémentaire intervient donc, capable de combler le fossé entre les facteurs d'exaltation observés au cours des expériences et l'exaltation liée au facteur électromagnétique.

Enfin, la dynamique des spectres SERS de molécule unique ne peut pas non plus être expliquée par ces modèles électromagnétiques. Pour toutes ces raisons, on considère donc un effet "chimique" permettant d'expliquer les observations.

3.1.2.2 L'effet chimique

Le qualificatif "chimique", que l'on a attribué à cet effet, ne présume pas en réalité de la nature des processus impliqués puisque ceux-ci sont encore très mal connus. En fait, dans la littérature, l'effet chimique est aussi nommé "first layer effect", en rapport avec la première couche d'adsorption au sein de laquelle se trouvent les molécules qui présentent des spectres exaltés. Cet effet, qui dépend des interactions spécifiques entre la molécule adsorbée et le substrat, apporte une contribution *a priori* beaucoup moins importante que celle de l'effet électromagnétique à l'exaltation globale du signal Raman. Il semble ainsi que l'effet chimique interviendrait au plus pour un facteur de l'ordre de 10^2 - 10^3 .

Une explication couramment proposée, quoiqu'encore largement discutée, est que cet effet pourrait être associé à l'existence d'un état de transfert de charge, résultant des interactions entre la molécule adsorbée et le substrat, qui rendrait l'excitation résonnante (figure 3.3a).

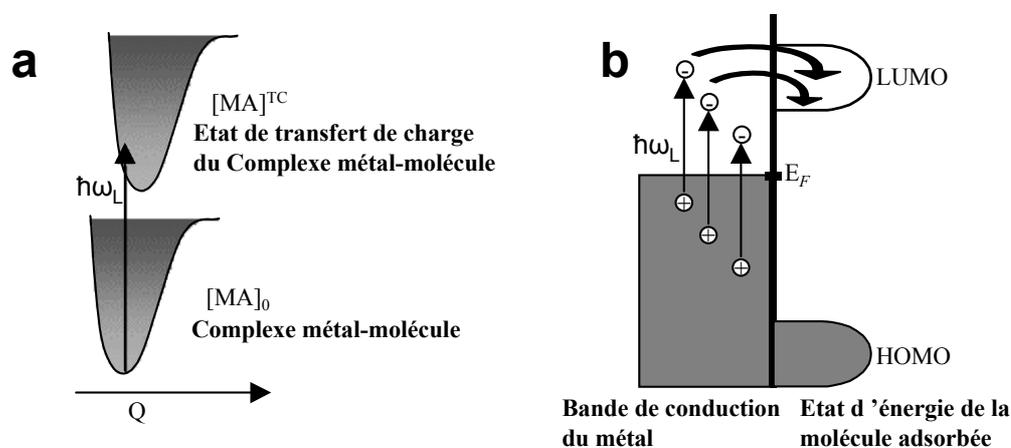


FIG. 3.3 – Description des niveaux d'énergie intervenant dans deux mécanismes de transfert de charge proposés. **a** Courbes de potentiels des états fondamental et de transfert de charge du complexe métal/molécule en fonction des coordonnées normales d'une vibration de la molécule A. L'excitation laser porte le système dans l'état excité $[MA]^{TC}$. **b** Peuplement de l'orbitale la plus basse inoccupée de la molécule par le biais de l'excitation de paires électrons-trous dans le métal. La séparation en énergie électron-trou correspond à la fréquence laser.

L'existence d'un tel état dépend de la nature et de la qualité des interactions existant entre la molécule et le substrat ; il faut en effet que le couplage soit important, et donc que les

3.1. Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

molécules soient au moins directement adsorbées sur la surface, sans espèce ou couche intermédiaire. En SERS macroscopique, l'importance de l'adsorption des molécules dans la première couche a d'ailleurs été démontrée de manière directe par *Otto* et *Mroczek* via l'utilisation de deux espèces isotopiques de pyridine (C_5H_5N/C_5D_5N) et en se plaçant à très basse température ($\approx 28K$)[104]. Le signal Raman obtenu sur des films d'argent préparés sous ultra-vide et recouverts d'une monocouche d'un des isotopes, sur laquelle plusieurs couches de la deuxième espèce sont condensées, ne comporte que la seule signature de l'isotope situé dans la première couche moléculaire. Par contre, après chauffage— et donc réarrangement des deux espèces dans les différentes couches— on obtient la signature Raman des deux isotopes. Ces auteurs ont effectué le même type d'observation, conduisant à postuler l'importance de cette première couche d'adsorption, sur l'effet de la passivation par l'oxygène des films d'argent actifs en SERS[105]. Après adsorption de dioxygène en surface, l'exaltation résiduelle du signal des molécules est moins importante (d'un facteur $\lesssim 10^{1,5}$) et elle perd surtout sa spécificité chimique, observée sur ces mêmes films avant passivation : avant adsorption de l'oxygène, les différentes molécules organiques détectées en SERS présentent des facteurs d'exaltation différents. Après passivation les auteurs observent un facteur d'exaltation à peu près identique (10^2 - $10^{2,5}$) pour toutes les espèces qui présentent encore un signal Raman exalté, comme si l'exaltation observée n'était plus liée qu'à des processus purement électromagnétiques.

Outre le fait que les molécules soient adsorbées directement sur le métal, on peut s'interroger sur l'influence des interactions plus fortes d'une molécule avec la surface, ce qui se produit par exemple dans le cas d'une chimisorption. Ainsi, l'existence de complexe Ag/adsorbat a-t-elle été très rapidement discutée [106][107]. Certaines études SERS multi-molécules sur des électrodes d'argent ont même conclu à la formation de complexes pour certaines espèces, les modifications de certaines caractéristiques des spectres (intensité, règle de sélection) théoriquement prévues dans ce cas et celles observées expérimentalement étant en bon accord. Parmi les espèces étudiées, se trouvent des molécules considérées comme étant de bons ligands, comme la pyridine [108], et plus récemment, mais toujours à travers l'analyse de spectres macroscopiques, la pyrazine [109].

En réalité, il est la plupart du temps difficile de savoir, premièrement si un complexe se forme, et deuxièmement s'il existe bien un transfert de charge dans ce complexe particulier. Dans cette dernière éventualité, on attend la présence d'une bande supplémentaire "de transfert de charge" sur le spectre d'absorption. A titre d'exemple, la molécule d'éthylène ne possède pas de bande d'absorption dans le visible. Par contre à très basse température (10-12K), sur un échantillon constitué d'une matrice d'éthylène dopée par de l'argent dispersé, *Otto et al.* ont observé la présence d'une bande d'absorption supplémentaire [105]. Cette bande, située vers 520nm, a été attribuée par les auteurs de manière non ambiguë à un tel

transfert de charge. Le transfert intervient depuis l'orbitale de valence 5s de l'argent, vers une des deux orbitales moléculaires π anti-liantes qui correspond à l'orbitale la plus basse inoccupée (LUMO) de C_2H_6 dans un complexe $Ag(C_2H_6)$. Dans ce cas, l'utilisation d'une excitation à 514.5nm porte la molécule vers un état excité, ce qui conduit à l'obtention de spectres Raman auxquels la configuration résonante confère intrinsèquement une exaltation supplémentaire de deux ordres de grandeurs par rapport aux spectres Raman "normaux". Par contre, si la matrice contient aussi du dioxygène, cette longueur d'onde perd son caractère résonnant. L'explication proposée par les auteurs est que l'introduction d' O_2 induit une oxydation des atomes métalliques et donc la présence d'argent oxydé (Ag^+); le transfert de charge ne peut alors plus avoir lieu à partir des mêmes niveaux qu'en présence d'Ag, et s'effectue plutôt depuis l'orbitale 4d de l'argent. Cela aurait pour effet de déplacer la bande d'absorption de transfert de charge du visible vers l'ultra-violet[105], excluant la possibilité d'excitation résonante à 514.5nm. La mise en évidence de manière aussi directe d'un état de transfert de charge reste cependant un cas très particulier. Il faut aussi considérer que l'expérience décrite ici s'est déroulée dans des conditions expérimentales sévères, et non pas dans des conditions ambiantes qui peuvent totalement modifier l'organisation microscopique du substrat et des molécules, la nature chimique du substrat– et par conséquent les interactions molécules/surface– ou encore les poids des différentes interactions mises en jeu (effet de l'agitation thermique, voies de relaxation,...). Enfin, il s'agit d'une étude multi-molécules, qui ne permet donc pas de déterminer les paramètres locaux de l'environnement dans lequel les complexes se sont formés (concentrations locales, défauts dans la matrice).

D'autre part, on peut mettre en évidence que certaines observations sont loin d'être généralisables. C'est notamment le cas de l'hypothèse proposée par *Otto* concernant le caractère inhibiteur de l'effet chimique des ions Ag^+ supposés présents, et qui est ici très spécifique à l'éthylène. En effet, dans de nombreuses expériences sur des molécules de natures chimiques différentes, il est au contraire proposé que la présence d'argent oxydé sur les points "chauds" est nécessaire pour observer des exaltations géantes [106]. Ces observations contradictoires pourraient être la signature de l'influence des différents niveaux d'énergie mis en jeu. En effet, pour que le transfert de charge ait lieu, il faut que le niveau d'énergie de la LUMO de la molécule et le niveau de Fermi du métal (ou le niveau HOMO de la molécule et les niveaux libres du métal) soient les plus proches possible. D'autre part, si pour l'éthylène le transfert de charge se fait à partir du métal, celui-ci peut aussi se faire vers le métal, à partir de l'orbitale la plus haute occupée de la molécule (HOMO).

En réalité, au delà de l'implication même d'un transfert de charge, le mécanisme de celui-ci est aussi à l'heure actuelle encore en débat. Nous avons envisagé le mécanisme appelé "Raman résonnant" (figure 3.3a) par certains auteurs, mais d'autres mécanismes, faisant par exemple intervenir des transitions non-radiatives, ou l'excitation et la diffusion de paires

3.1. Spectroscopie Raman Exaltée de Surface : principe et origine de l'effet SERS

électron-trou du métal, résonnantes à la fréquence du laser excitateur (figure 3.3b), sont proposés [109][110]. Ce dernier processus, couplé à l'existence de plasmons de surface décrits dans le paragraphe précédent, peut aussi, dans une certaine mesure permettre de rendre compte du fond continu souvent observé sur les spectres SERS de molécules uniques. Nous avons jusqu'à présent considéré uniquement la diffusion inélastique du plasmon, comme équivalent de la diffusion Raman pour une molécule isolée. Mais le plasmon peut aussi être "absorbé" par la molécule, pour créer un ion négatif. L'électron libéré est alors capturé par le métal et la recombinaison électron-trou conduit à la relaxation radiative inélastique du plasmon. Les temps caractéristiques de ces processus étant beaucoup plus longs que la diffusion inélastique non résonante, le système a le temps de relaxer et l'émission s'effectue, comme dans le cas de la fluorescence, sur une très large bande spectrale sauf que la fréquence centrale d'émission suit ici l'excitation laser. De plus, la création– associée à ce processus– d'un anion, en favorisant la désorption moléculaire, pourrait faire être à l'origine des phénomènes de clignotement observés dans les expériences de diffusion Raman de molécules uniques. Dans tous les cas, l'existence d'un tel transfert de charge modifie les règles de sélection, ou toutefois l'activité Raman des différents modes de vibrations de la molécule, de manière très différente par rapport aux modifications induites par un changement de géométrie liée à la simple physisorption de la molécule.

La compréhension très lacunaire de l'effet "chimique" est surtout liée à la difficulté d'effectuer des expériences probantes dans cette direction. Les études SERS de molécules individuelles ont par contre un fort potentiel dans ce cas. En conclusion d'une étude "nanoSERS" sur des molécules de tyrosine *Bjorneld et al.* proposent ainsi que les changements dynamiques particulièrement importants observés sur les spectres de molécules individuelles de cette espèce, soient liés à l'existence de différents modes de chimisorption adoptés par la molécule [92], la tyrosine pouvant passer d'un mode à l'autre de manière réversible au cours du temps. Dans une étude plus récente *Nie et Emaury*, qui furent aussi parmi les pionniers des expériences SERS de molécules uniques, ont aussi mis en évidence de manière directe l'importance des interactions physicochimiques molécules-métal dans l'effet chimique d'exaltation [93]. Le système étudié dans cette expérience se compose d'agrégats d'argent, préalablement incubés dans une solution diluée à 2.10^{-9} M de rhodamine 6G, et immobilisés sur une surface de verre. Cet échantillon est ensuite introduit dans le dispositif expérimental qui comporte notamment un dispositif micro-fluidique. Cette installation permet de faire passer sur le substrat un flux constant d'une solution dont la composition peut être modifiée à loisir. Les auteurs ont donc observé l'influence sur l'exaltation du signal Raman de la Rh6G de l'introduction de différentes espèces, notamment des ions halogénures et soufrés. Les comportements constatés sont très différents : une activation, c'est-à-dire une augmentation du nombre de particules actives et du facteur d'exaltation, particulièrement importante est ob-

servée en présence des halogénures Br^- , Cl^- et I^- , une faible incidence des ions citrates, sulfates et fluorures ainsi que la désactivation lorsque le milieu contient des ions thiosulfates. Ces conséquences ont été ainsi attribuées à une modification de l'adsorption de la molécule sur les sites actifs, l'adsorption sur ces sites étant ainsi favorisée lorsque des ions, par exemple chlorures, se trouvent à proximité. Cette augmentation particulière de l'exaltation du signal Raman en présence d'ions Cl^- est observée depuis les premières expériences macroscopiques [111] mais reste incomprise, même s'il existe différentes propositions pour l'expliquer— avec, par exemple, la formation de complexes métal-molécule-chlorure stables et existence d'un état de transfert de charge— comme l'a discuté récemment *Otto* dans un article critique spécialement consacré à ce sujet [112] et en s'appuyant notamment sur les résultats obtenus en mode molécule unique par les différentes équipes de la communauté. Au cours de leur étude d'addition d'ions, une observation fine des agrégats par microscopie à force atomique avant et après les traitements chimiques, permet à *Nie* et *Emaury* de rejeter la possibilité d'une modification de la morphologie des agrégats, liée par exemple à l'effet connu d'agrégation induit par un ajout d'ions Cl^- en grande quantité. Dans les expériences de *Nie* ceux-ci se trouvent en très faible quantité et ne peuvent *a priori* pas influencer la taille, la forme globale des agrégats et le nombre de particules constituant la structure. Cette conclusion s'appuie aussi sur les observations qu'avaient effectuées *Michaels et al.* par imagerie AFM[110] dans les mêmes conditions de concentration (Cl^- /particules). Mais en réalité, il est impossible aux auteurs d'effectuer des mesures suffisamment précises pour observer si une modification locale à l'échelle nanométrique ou atomique n'a pas lieu au cours de l'ajout des différents ions. Enfin, les différences de comportements peuvent aussi avoir des origines différentes. En particulier, la désactivation observée en présence d'ions $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ pourrait être très spécifique à cet ion, connu pour former avec l'argent des sels/complexes de très forte solubilité dans l'eau. Dans ce cas, les atomes métalliques supposés supplémentaires, c'est-à-dire non inclus dans le réseau massique, appelés aussi "*adatoms*" et situés sur les points "chauds", seraient emportés dans le flux de solution, désactivant ainsi les particules.

3.2 Système étudié et dispositif expérimental

3.2.1 Motivations de l'étude

Même si l'analyse SERS est actuellement largement utilisée de manière macroscopique, sa mise en place reste néanmoins loin d'être triviale. C'est en particulier le cas pour les expériences de molécules uniques, et donc en conséquence, dans toutes les expériences qui utilisent une configuration SERS en raison du gain important en résolution spatiale apporté par le caractère très localisé de l'exaltation. De plus, comme nous l'avons noté au paragraphe précédent, s'il y a bien plusieurs hypothèses concernant les causes de l'exaltation du signal

3.2. Système étudié et dispositif expérimental

Raman qui semblent pouvoir être validées aux vues des expériences, les mécanismes proposés sont parfois radicalement différents. L'état actuel des connaissances est donc encore très loin de permettre une définition précise des propriétés des substrats –forme, taille ou nature chimique des nanostructures exaltantes– ou paramètres expérimentaux–solvant ou matrice gazeuse préférentiels, présence d'ions spécifiques en plus des espèces étudiées– qui sont adaptés et indispensables ou nécessaires à l'étude d'une molécule donnée ou encore d'une certaine molécule dans un système particulier. De plus, les lacunes existantes conduisent à une prudence sur les conclusions déduites des observations expérimentales. Ces dernières années ont vu un intérêt croissant pour l'emploi du SERS comme technique d'analyse. Outre les molécules "classiques" des premières études SERS, comme la rhodamine6G, la pyridine et d'autres molécules organiques relativement simples, l'analyse Raman SERS est maintenant appliquée à l'étude de nombreux autres systèmes éventuellement d'intérêt biologique, *comme des bases de l'ADN* [45], des acides aminés [92] ou encore l'hémoglobine [113]. Si une grande partie de ces mesures s'avèrent cohérentes et reproductibles, il est parfois délicat de conclure. L'interprétation est souvent délicate et sujette à caution : ainsi *Otto* a-t-il récemment remis en question un certain nombre d'hypothèses [114] concernant les interprétations des spectres SERS de molécules uniques. Les motivations de notre étude reposent donc sur deux points distincts.

L'activité préférentielle des particules de taille suffisante(50nm)[115], la nécessité de la présence de plusieurs particules dans la structure exaltante ainsi qu'une exaltation particulière au niveau de la jonction entre particules, caractéristiques prévues dans le cadre des théories de l'effet électromagnétique, semblent plus que probables au regard d'études expérimentales récentes effectuées en mode molécules uniques [110]. Pour pouvoir, à terme, faire du nanoSERS un outil routinier, il est capital d'étendre ce type d'études à une large gamme de substrats, et donc d'étudier d'autres structures sur lesquelles est aussi théoriquement attendu un effet d'exaltation. Nous avons pour cela choisi de conduire l'étude du signal Raman de molécules individuelles adsorbées sur des agrégats de morphologie particulière que je décrirai dans le paragraphe suivant.

D'autre part, très peu d'expériences se sont attachées à explorer les mécanismes intervenant dans l'effet chimique qui reste encore très mal connu, la raison principale étant que les deux effets, électromagnétique et chimique, sont très difficiles à découpler expérimentalement. Et même si la plupart des théories s'accordent à considérer que l'effet chimique intervient pour un facteur bien moindre que l'effet électromagnétique, il est clair aussi que ses mécanismes sont indispensables à l'"avènement" du signal SERS, et à l'exaltation spectaculaire des points chauds. Nous nous sommes donc intéressés au cours de cette étude à explorer l'effet chimique en analysant la nature chimique des points chauds, et en particulier leur caractère ionique et accepteur d'électrons. Si l'hypothèse de l'importance de la présence

de cations métalliques, aux conséquences capitales concernant le contrôle et le choix de substrats adaptés, avait été formulée par différents auteurs pour expliquer certaines observations expérimentales— l'existence de complexes en macroSERS (*Pettinger* [106], *Furtak* [107], *Otto* [105]) et récemment l'influence de certains anions en nanoSERS (*Nie* [93])— la présence d'argent cationique n'avait encore jamais été mise en évidence de manière directe avant notre étude.

3.2.2 Les agrégats constitutifs du substrat SERS

On peut distinguer différents types de substrats qui sont utilisés au cours des expériences : films d'argent structurés lors du dépôt [116] ou déposés sur des structures dont la morphologie est elle-même préalablement contrôlée par usinage [105], recuit,..., ou bien dépôt d'agrégats d'argent qui possèdent intrinsèquement des caractéristiques de formes, comme je l'ai décrit dans la section précédente. Les agrégats utilisés au cours de cette étude possèdent une morphologie particulière contrôlée par voie de synthèse, qui diffère en particulier de la morphologie obtenue plus classiquement par réduction de l'argent par les ions citrate ou par BH₄ qui conduit à des structures fractales telles que celles décrites dans la section précédente. Nos agrégats ne sont pas sphériques mais présentent, en fonction de l'état d'avancement de la synthèse, une importante rugosité de surface— avec la présence de protubérances et d'interstices— ou une morphologie plus structurée avec la présence de facettes. Les particularités morphologiques de ces agrégats sont directement liées au processus original de synthèse développé au sein du laboratoire de Chimie Physique d'Orsay par le Professeur *M. Mostafavi* et son groupe [117]. La non-sphéricité des structures est ainsi obtenue en effectuant la réduction de la totalité des ions Ag^I par une procédure comportant deux étapes : radiolyse partielle conduisant à la formation de petites particules sphériques de distribution relativement étroite en taille, qui sont ensuite développées au cours de la deuxième phase de réduction par l'acide éthylènediaminetétraacétique (Eedta=400mV [118])— noté EDTA ou YH₄— dont la structure est présentée sur la figure 3.4. Une telle synthèse, c'est-à-dire le fait de procéder en deux étapes, s'avère très efficace pour structurer les agrégats d'argent et elle est ainsi par exemple utilisée pour produire des nanoprismes à partir de particules initialement sphériques [119]. La solution initiale comportant les ions argent est une solution aqueuse 0.1 molaire en isopropanol. Ag⁺ y est introduit sous la forme de perchlorate de manière à obtenir une concentration en cations de 10⁻⁴mol.l⁻¹. A cette solution est ajoutée l'EDTA à une concentration de 5.10⁻⁴mol.l⁻¹, voisine de celle des ions Ag⁺. L'ajout de soude ou d'acide sulfurique concentrés permet d'ajuster le pH de la solution entre 5 et 6. Cette préparation est alors irradiée au moyen de rayons γ produisant des électrons solvatés ainsi que des radicaux secondaires qui réduisent les ions Ag⁺ de manière homogène. Au cours de l'irradiation sont aussi produits des radicaux OH[•], très réactifs. C'est la raison de la présence

3.2. Système étudié et dispositif expérimental

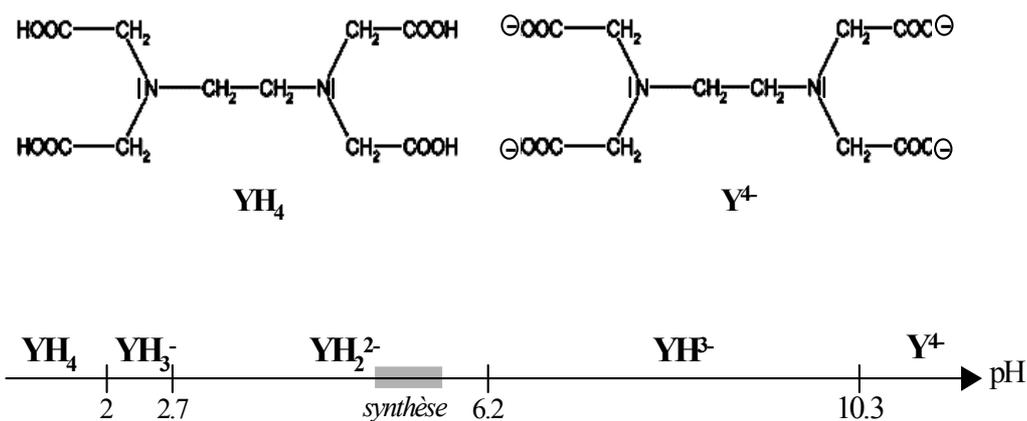


FIG. 3.4 – Structure de l’acide éthylènediamine tétraacétique (YH_4) et de sa forme stable en solution très basique Y^{4-} . Mise en évidence des formes majoritaires en fonction du pH de la solution.

dans la solution d’isopropanol qui intervient alors en tant qu’inhibiteur de ces radicaux en formant de l’acétone. L’irradiation est stoppée lorsqu’approximativement 50% des cations sont réduits, ce qui conduit à la formation de particules relativement sphériques, dont le diamètre est compris entre 10 et 20 nm. A la surface de ces particules viennent s’adsorber les ions Ag^+ résiduels. C’est à cette étape qu’interviennent les molécules d’EDTA présentes en solution. Elles servent dans un premier temps à stabiliser les petits agrégats, en les empêchant de coalescer et donc de conduire aux structures fractales classiques. L’EDTA est effectivement un tétraacide, que l’on peut noter YH_4 , qui présente des propriétés connues de ligand polydentate vis à vis des métaux de transition avec lesquels il peut se coordonner. Etant données les constantes acido-basiques de l’EDTA, au pH légèrement acide de la solution la forme majoritaire présente à l’équilibre est YH_2^{2-} (fig.3.4). Sous cette forme, la molécule possède donc deux groupements acétates à partir desquels s’effectue *a priori* la coordination avec les cations métalliques, par partage des électrons libres délocalisés sur le groupement. Cependant, la délocalisation peut être plus étendue et les groupements amines peuvent aussi s’avérer être les points de coordination, celle-ci se faisant alors entre le métal et le(s) atome(s) d’azote. Outre l’effet de stabilisation des particules, l’EDTA, qui présente aussi des propriétés de photoréducteur, intervient également à cette étape de la synthèse pour réduire lentement les ions Ag^+ résiduels, par le biais d’un transfert d’électrons.

Le processus de développement des agrégats par l’EDTA peut être suivi en enregistrant le spectre de diffusion quasi-élastique (QELS) sur lequel on observe la présence d’une bande d’absorption à 400 nm dont l’intensité est inversement proportionnelle à la taille moyenne des particules, ainsi que l’apparition, avec l’évolution des particules au cours du temps, d’une aile plus rouge, voire IR. Cette aile s’amplifie avec l’augmentation de la non-sphéricité des

Chapitre 3. La molécule unique comme sonde de l'effet SERS

particules, jusqu'à l'apparition des facettes, et devient très importante au bout d'un délai variant de plusieurs jours à une semaine, validant ainsi la structuration des agrégats au cours de la seconde phase de réduction par l'EDTA. Afin de mieux connaître le système étudié au cours de notre étude SERS, j'ai caractérisé la structure de ces agrégats à différents stades de croissance : sur la figure 3.5 sont présentées les images obtenues en microscopie électronique à balayage et grâce auxquelles j'ai pu clairement mettre en évidence l'évolution effective de la morphologie des agrégats. On observe ainsi une nette évolution entre la morphologie de l'agrégat présenté sur l'image **1**, qui présente de nombreuses protubérances, et la structure **3**. Sur cette dernière structure sont visibles des polygones, en voie de formation sur l'image **2**. Le passage des agrégats sphériques aux agrégats facettés a donc pour étape intermédiaire la formation de structures irrégulières dont la structure de l'image **1** est représentative.

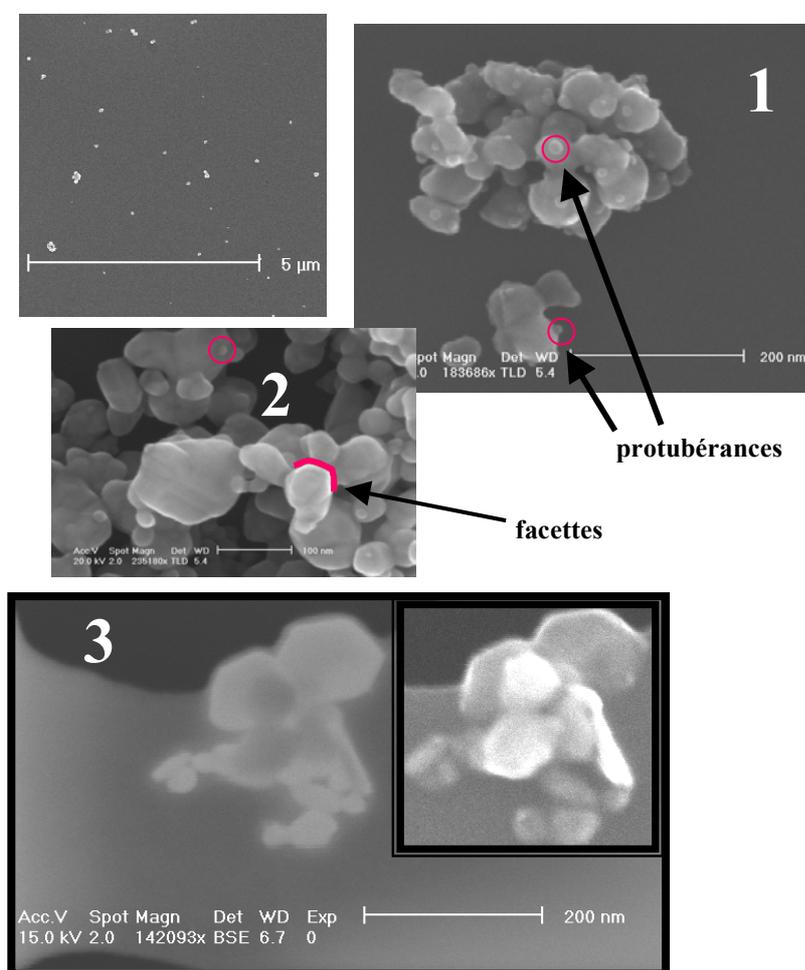


FIG. 3.5 – Caractérisation par microscopie électronique des agrégats d'argent. En haut à gauche, vue globale de la dispersion sur le substrat. Les figures 1 à 3 présentent l'évolution de la morphologie des agrégats au cours du processus de synthèse.

3.2. Système étudié et dispositif expérimental

3.2.3 Préparation des échantillons-procédure expérimentale

Contrairement au signal de fluorescence, qui permet par de nombreuses mesures de caractériser de manière incontestable l'unicité de l'objet étudié (polarisation de l'émission, clignotement, finesse du spectre), les indices fournis par le signal SERS permettant d'être *a posteriori* certain de se trouver en mode molécule unique sont, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, peu nombreux et peuvent sembler subjectifs. Lorsque l'on veut effectuer des expériences SERS de molécule unique, nous avons vu que la préparation des échantillons doit être effectuée dans le but de répondre à plusieurs critères dont on comprend bien l'intérêt, et qui ont été en quelque sorte définis au cours de l'évolution de ces études par les différents groupes de cette communauté, *Kneipp* et *Nie* les premiers. Rappelons ainsi que l'attention doit être portée tout d'abord sur la préparation du substrat SERS : les agrégats sont dispersés sur un substrat adéquat— lame de verre,...— ou dilués dans le cas de solutions colloïdales, de manière à obtenir une répartition à la fois relativement homogène des nanostructures mais aussi et surtout de manière à ce que la densité en particules soit telle qu'au plus un unique agrégat puisse se trouver dans le volume confocal sondé. Ainsi, comme les agrégats ne comportent pour la plupart aucun et parfois un point chaud, les signaux SERS obtenus ne proviendront que d'un seul point chaud. L'attention est aussi portée sur la concentration de l'espèce à caractériser, qui doit être suffisamment faible— si dans les conditions extrêmes des premières expériences la concentration en molécules était de l'ordre de $10^{-12} \text{ mol.l}^{-1}$ en solution, on utilise à présent fréquemment des concentrations nanomolaires qui permettent d'augmenter la probabilité de détection des molécules tout en restant dans un mode "molécule unique"— pour permettre d'avoir au moins une, éventuellement plusieurs molécules sur chacun des agrégats. Comme chaque nanostructure ne contient qu'un nombre très limité de points chauds (voire zéro), on obtient un échantillon tel que, sur chaque point chaud se trouve au plus une molécule et sur la plupart aucune. La concentration en molécules doit en fait être déterminée au cas par cas, en fonction du système molécule/agrégat étudié— à travers l'équilibre entre les molécules adsorbées et celles en solution— et en fait, étant donnée la sélectivité très accrue due aux points chauds, des concentrations allant jusqu'à 10^{-8} mol/l permettent d'obtenir des signaux de molécules uniques.

Au cours de cette étude, nous avons préparé les échantillons en déposant quelques μl de la solution d'agrégats fournie par le Professeur Mostafavi soit sur des lames de verre pour les expériences classiques, soit sur des grilles de microscopie électronique recouvertes de peau de carbone afin de pouvoir étudier les agrégats à la fois en microscopie confocale SERS et en microscopie électronique à transmission. La densité en agrégats obtenue est alors inférieure à $1/\mu\text{m}^2$. Deux solutions différentes ont été utilisées. La première est la solution finale de synthèse, telle que je l'ai décrite dans le paragraphe précédent, les agrégats y sont présents à une concentration estimée à 10^{-11} mol/l et la concentration en EDTA est de l'ordre de

10^{-4} mol/l. Les échantillons que je noterai \mathfrak{A} et \mathfrak{B} sont préparés à partir de cette solution, mais dans le cas de l'échantillon \mathfrak{B} on a procédé à un "rinçage" des particules : environ entre 18 et 24h après le dépôt sur le substrat, c'est-à-dire après séchage lent et donc adsorption des particules sur le substrat, un léger flux d'eau distillée est appliqué sur l'échantillon à l'aide d'une micropipette pour un volume total de quelques *ml*. L'échantillon est ensuite laissé à sécher, soit à l'atmosphère ambiante, soit en chauffant légèrement (50°C). Pour les échantillons de type \mathfrak{C} , la solution utilisée contient des agrégats dont la synthèse et le processus de croissance sont terminés, tous les ions Ag^+ initialement présents ont été réduits. Enfin, dans certains cas, nous avons ajouté une dernière étape à la préparation des échantillons (à partir des substrats de type \mathfrak{B} ou \mathfrak{C}) en incubant ceux-ci avec une solution d'EDTA (10^{-8} mol/l dans de l'isopropanol) ou de Rh6G (10^{-9} mol/l dans l'éthanol).

3.2.4 Dispositif expérimental

Dans ce paragraphe je m'attacherai à décrire les différents éléments qui composent le montage expérimental que j'ai utilisé pour étudier le comportement des agrégats en spectroscopie Raman exaltée de surface et qui est présenté sur la figure 3.6.

L'excitation est obtenue à partir d'un laser à Argon, capable de délivrer plusieurs longueurs d'onde (476.5, 488, 496.5, 501.7 et 514.5nm) et utilisé au cours de cette étude en mode monoraie dans le vert à 514.5nm. Avant d'atteindre la partie microscope, le faisceau laser passe à travers un filtre d'excitation— de type interférentiel qui permet un très bon filtrage, avec une fenêtre de transmission de l'ordre de 2nm— puis il est polarisé rectilignement.

Le trajet du laser passe ensuite par une lame séparatrice épaisse 40/60, orientée à 45° par rapport à l'angle d'incidence du laser, qui transmet 60% de l'intensité et réfléchit les 40% restants vers les miroirs galvanométriques du scanner XY. Cet élément est le premier du microscope à proprement parler. Il s'agit d'un microscope à balayage dit confocal. Dans cette configuration de microscopie de champ lointain, on obtient un rapport signal sur bruit satisfaisant en rejetant le signal ne provenant pas du volume de focalisation du laser dans l'échantillon. Comme on utilise un faisceau focalisé, le montage doit comporter aussi un système de balayage qui permettra d'effectuer une image point par point. Deux choix sont possibles, soit monter l'échantillon sur des platines de translation, la tache laser restant alors fixe dans le repère du laboratoire, soit comme c'est le cas ici, effectuer un balayage laser dans le plan focal à position fixe de l'échantillon. Cette configuration peut être avantageuse, en particulier lorsqu'on veut pouvoir balayer des zones relativement importantes (plusieurs dizaines de microns carrés), car sur de telles distances les piézoélectriques utilisés dans le cas d'un déplacement de l'échantillon possèdent une forte hystérésis et ne permettent donc pas un repositionnement précis. Il faut alors cartographier des zones successives de dimensions réduites compatibles avec un balayage reproductible des céramiques piézoélectriques, en s'as-

3.2. Système étudié et dispositif expérimental

surant que le recouvrement entre ces images soit suffisant. Le scanner utilisé pour pouvoir balayer le laser sur la surface de l'échantillon est composé de deux miroirs métalliques montés respectivement sur deux axes orientés à 90° l'un par rapport à l'autre et dont la rotation est contrôlée par un système galvanométrique refroidi par effet Peltier. Ce scanner permet tout à la fois un déplacement précis, puisque la précision du remplacement des miroirs est de l'ordre du millième de degré pour un déplacement minimum très fin de l'ordre de $0,06$ degré⁴, et un balayage important, avec un angle maximum de déviation de $\pm 20^\circ$ par rapport à la direction du faisceau non dévié. Pour que le faisceau laser éclaire toujours la totalité de la pupille d'entrée de l'objectif, un système télécentrique permettant de conjuguer le point pivot des miroirs avec la pupille d'entrée de l'objectif, est placé après le scanner. Il est constitué de deux lentilles de distance focale $f_1=160\text{nm}$ et $f_2=400\text{nm}$ ⁵. Comme l'a décrit *R. Jaffiol* qui a développé ce microscope au cours de sa thèse [36], un tel système permet d'effectuer des images de bonne qualité, c'est-à-dire sans trop d'aberrations– liées à l'éloignement de l'axe optique et donc du centre des lentilles du système télécentrique et surtout de celui de la pupille arrière de l'objectif– jusqu'à un déplacement maximum des miroirs de $\pm 1.8^\circ$. Avec un objectif de grandissement $\times 100$ cela correspond à la possibilité d'effectuer un balayage d'une zone d'une quarantaine de microns de côté, avec un repositionnement d'une précision de l'ordre de 20nm . Pour un grandissement $\times 63$, la zone d'exploration équivalente s'étendra latéralement sur environ $65\mu\text{m}$.

Pour pouvoir ajuster la focalisation avec précision, l'objectif est monté sur trois membranes piézoélectriques dont le support est posé sur un système de positionnement plus grossier à crémaillère. A partir de l'objectif, le système se situe dans une enceinte étanche pour pouvoir éventuellement travailler en atmosphère contrôlée. Les objectifs que j'ai utilisés sont des objectifs de grande ouverture numérique, indispensables à l'étude de molécules uniques. Il s'agit de deux objectifs à immersion–Zeiss $\times 100$ "achromat" (ON 1.3) et $\times 63$ (ON 1.4)– et dans le cas des échantillons sur peau de carbone d'un objectif à sec de grande distance de travail ($\simeq 6\text{mm}$) Nikon $\times 100$ (ON 0.85). On peut considérer que le volume de focalisation est de forme elliptique, défini dans le plan focal par la tache d'Airy et allongé le long de l'axe optique ; pour des objectifs tels que ceux que j'ai utilisés, *J. Azoulay* a montré dans sa thèse [63] que l'on peut considérer que le profil d'intensité laser s'étend axialement sur une distance de 1 à $2\mu\text{m}$ pour l'objectif à sec. Pour pouvoir étudier la totalité de l'échantillon et contourner la limitation liée à l'angle maximum de balayage laser, l'échantillon est également monté sur un système composé de deux moteurs piézoélectriques type stick&slip

⁴Valeurs obtenues pour une gamme de tension de commande de $\pm 10\text{V}$ pour 40° , codés sur 16bits, compte tenu d'une non-linéarité à pleine échelle de 0.006%.

⁵La lentille L_2 faisant ici office aussi de lentille de tube de l'objectif, on prend en compte la correction sur le grandissement des objectifs, indiqués pour des lentilles de tube de 160mm de focale. Ex : $\times 100 \leftrightarrow \times 250 / \times 63 \leftrightarrow \times 157$

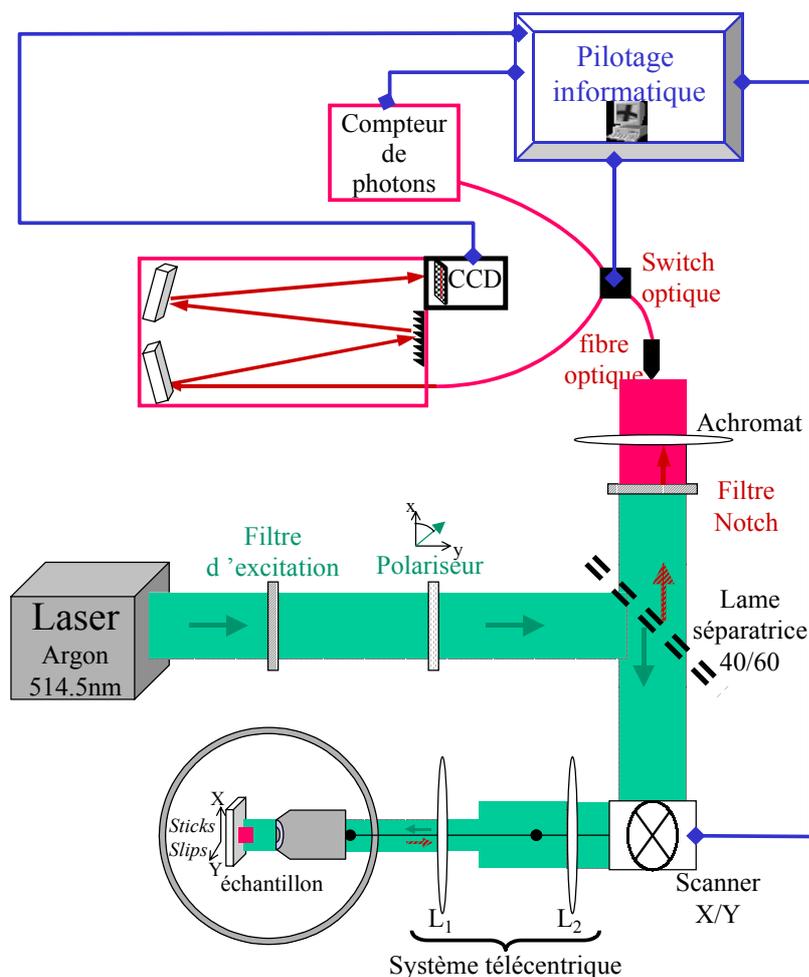


FIG. 3.6 – Schéma du microscope confocal utilisé pour les études SERS de molécules individuelles

positionnés à 90° et qui permettent de déplacer l'échantillon dans le plan xOy de focalisation sur des distances plus importantes que celles liées au seul balayage du laser.

Le signal issu de l'échantillon est collecté en configuration de rétrodiffusion, c'est-à-dire qu'on collecte le signal diffusé par l'échantillon à travers le même objectif que celui utilisé pour l'excitation. Le signal suit ensuite le même parcours qu'à l'aller, traverse la lame séparatrice avant d'arriver au filtre de détection qui est utilisé pour couper le signal de diffusion élastique. Il s'agit ici d'un filtre *notch plus* (filtre holographique) qui réfléchit uniquement les longueurs d'onde situées dans une fenêtre étroite ($\simeq 350\text{cm}^{-1}$) autour d'une longueur d'onde donnée. Sur cette fenêtre l'efficacité d'atténuation de la lumière laser est de l'ordre de 10^6 à 10^8 .

Le signal est enfin conduit pour être filtré vers un diaphragme ponctuel qui caractérise la configuration confocale. Le filtrage spatial en détection permet effectivement d'augmenter le rapport signal sur bruit en rejetant efficacement le signal provenant de points situés en

3.2. Système étudié et dispositif expérimental

dehors du volume d'excitation sur l'échantillon. Le volume effectivement sondé est déterminé quant à lui par le choix du volume d'excitation—qui dépend de l'objectif utilisé— et par le diamètre du trou de filtrage qui sera choisi de section circulaire et centré sur l'axe optique. La dimension du diaphragme doit être choisie de manière à atteindre le meilleur compromis possible entre l'efficacité de détection (portion de signal conservée) et l'efficacité de réjection du bruit de fond. Sur ce montage, après le filtre *notch* le signal est collimaté par un objectif achromat pour pouvoir être injecté dans une fibre multimode. C'est le coeur de cette fibre optique de diamètre $50\mu m$ qui assure la sélection spatiale. Un filtrage tel qu'une véritable confocalité soit atteinte correspondrait à l'emploi d'une fibre monomode de coeur de $14\mu m$, mais le choix de la fibre multimode de coeur $50\mu m$ reste un bon compromis. Grâce à ce filtrage, on peut considérer que le volume effectivement sondé est à peu près équivalent au volume d'excitation. Un ordre de grandeur de celui-ci peut-être obtenu en considérant la largeur de la tache d'Airy dans le plan de focalisation de l'échantillon, $r \approx \frac{1,22\lambda_{Laser}}{2.ON}$. Le tableau 3.6 regroupe les caractéristiques de l'excitation laser obtenue pour $\lambda_{Laser} = 514,5nm$ avec un objectif à sec d'ouverture numérique (ON) 0,85.

ON	Largeur de la tache d'Airy (μm)	Profondeur de champ (μm)	Volume d'excitation (μm^3)
0,85	0,74	2,2	$\sim 0,9$

(3.6)

On voit que dans le cas de cet objectif à sec, le volume d'excitation est de l'ordre du μm^3 . Par contre, dans le cas de l'utilisation d'objectif à immersion ($n=1,5$) de grande ouverture numérique, la profondeur de champ est réduite à $1\mu m$ et on améliore aussi largement la résolution latérale (dans la limite imposée par la condition de Rayleigh, $\frac{\lambda_{Laser}}{2}$). A titre d'exemple, pour l'objectif d'ON=1,3, la résolution dans le plan de focalisation atteint 300 à 350nm, toujours en utilisant la raie à 514,5nm d'un laser Argon, et dans ce cas le volume sondé est réduit à une fraction de μm^3 . Dans la suite, j'utiliserai ces caractéristiques de l'excitation laser pour estimer la densité de puissance (en W/cm^2) au point de focalisation sur l'échantillon, utilisée dans les études conduites. Pour une puissance d'entrée dans l'objectif (ON 1,3) de $1\mu W$ dont $\approx 80\%$ sont transmis effectivement par l'objectif, l'intensité d'excitation sur l'échantillon est de $1kW/cm^2$ (aire de la tache d'excitation $\lesssim 0,1\mu m^2$).

Le fait d'injecter le signal dans une fibre est aussi très pratique pour pouvoir le guider ; en particulier, la fibre est ici reliée à un commutateur optique (switch) permettant d'aiguiller le signal vers différents détecteurs : soit vers un compteur de photons EGG, composé d'une photodiode à avalanche, soit vers un spectromètre *Jobin Yvon HR 460* (focale 46cm) dans lequel le signal est envoyé, après dispersion sur un réseau, vers une caméra CCD 512*512 refroidie à l'azote liquide. Sur ce spectromètre sont montés deux réseaux de résolutions

différentes : un réseau à 1200tr/mm, permettant d'obtenir une résolution spectrale de 3 à 4 cm^{-1} ⁶, et un réseau à 300tr/mm conduisant à une résolution plus faible, de 10 cm^{-1} , mais qui permet d'obtenir des spectres étendus sur une gamme spectrale beaucoup plus large, d'environ 2700 cm^{-1} . Au cours de cette étude SERS c'est majoritairement ce dernier réseau que j'ai utilisé.

L'ensemble des différents éléments optiques situés sur le trajet du signal– objectif, lentilles, lame 40/60, filtre, fibre optique de transport et détecteur– conduit ce microscope à une efficacité de détection d'environ 3 à 4%.

La dernière particularité de ce montage réside dans l'interface informatique et électronique, spécialement développée au sein de notre groupe par *A. Richard*. A travers différents systèmes d'asservissement, elle permet de piloter à la fois le déplacement des miroirs du scanner en même temps que les deux détecteurs ainsi que le commutateur. La synchronisation du scanner avec le détecteur choisi permet ainsi d'effectuer des images "en temps réel" de l'échantillon. Ces images peuvent être visualisées à l'aide de ce même programme d'imagerie. Il est alors aussi possible de déplacer les miroirs de manière à placer la tache d'excitation en un point particulier de l'échantillon et d'en effectuer l'étude. Enfin, si avec le compteur de photons, les images obtenues ne contiennent en chaque pixel que l'information relative au nombre total de coups, sans information sur l'énergie des différents photons participant au signal, en choisissant comme détecteur le spectromètre on enregistre par contre un spectre complet en chaque pixel de l'image. On effectue alors une image *hyperspectrale* qui contient une grande richesse d'informations et permet d'effectuer une véritable cartographie chimique de l'échantillon. En guise d'exemple, je présente sur la figure 3.7, les deux différents types d'images– sur la gauche au compteur de photons et en regard l'image hyperspectrale– obtenues sur une même zone. L'image de gauche a été obtenue avec le compteur de photons tandis que l'image hyperspectrale présentée à droite est reconstruite à partir des spectres acquis sur la caméra CCD, en sommant l'intensité du signal sur l'ensemble de la gamme spectrale détectée. Sur cette image hyperspectrale on observe bien différentes réponses correspondant à l'hétérogénéité de l'échantillon et seuls certains pixels de l'image 3.7a présentent des spectres Raman résolus. On peut ensuite s'intéresser à l'étude de ces points particuliers en positionnant la tache d'excitation grâce aux coordonnées déterminées. On peut aussi réaliser des traitements sur cette image, en extrayant par exemple uniquement l'intensité relative à une gamme restreinte de fréquences, correspondant à la bande de vibration caractéristique d'une espèce chimique donnée. L'image fille obtenue fait alors ressortir la localisation de cette espèce sur l'échantillon. Ce type d'analyse se révèle très utile, en particulier dans le cas de l'étude d'échantillons hétérogènes. Ce programme unique est en constante évolution et au

⁶résolution obtenue expérimentalement sur la largeur à mi-hauteur de la raie à 514.5nm du laser, avec une ouverture de fente de 60-100 μm (px CCD \approx 25 μm).

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

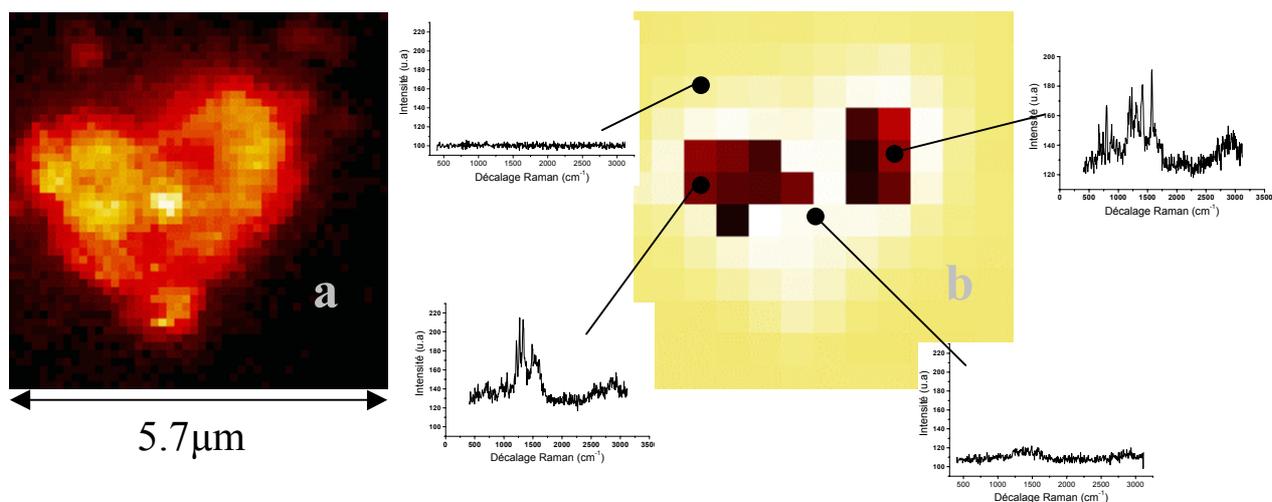


FIG. 3.7 – Images réalisées successivement sur une même zone de l'échantillon, en envoyant le signal vers le compteur de photons (a) ou vers le spectromètre (b). L'échantillon se compose ici d'agrégats d'argent peu dispersés, relatifs à une expérience préliminaire.

cours de ma thèse nous avons effectué de nombreuses modifications dans son utilisation. Sur-tout, afin de traiter les nombreux spectres enregistrés, nous avons aussi amélioré l'extraction systématique des données spectrales contenues dans les images.

3.3 Spectres SERS de molécules uniques

3.3.1 Résultats-observations expérimentales

Pour étudier l'échantillon, dans lequel les agrégats sont très dispersés, on enregistre dans un premier temps et afin de pouvoir localiser les objets, des images de diffusion totale (élastique+inélastique) à l'aide du compteur de photons en atténuant le faisceau laser par des densités optiques. Sur ces images on peut distinguer le substrat de verre, transparent et peu diffusant qui donne un fond constant, des agrégats métalliques qui donnent un signal beaucoup plus intense. Les différentes étapes sont présentées sur la figure 3.8. Comme la densité en agrégats est faible on explore au départ une zone assez large pour espérer localiser plusieurs structures. Les images enregistrées au compteur de photons peuvent être de deux types : soit on enlève le filtre de détection, et dans ce cas apparaissent comme intenses non seulement les objets qui émettent à une longueur d'onde différente de celle du laser (fluorescence, diffusion inélastique) mais aussi ceux qui diffusent de manière élastique.

En remettant en place le filtre *notch*, seuls seront intenses les points où ont lieu des processus inélastiques.

La différence entre ces deux types d'images est bien visible sur les images a et b de la figure

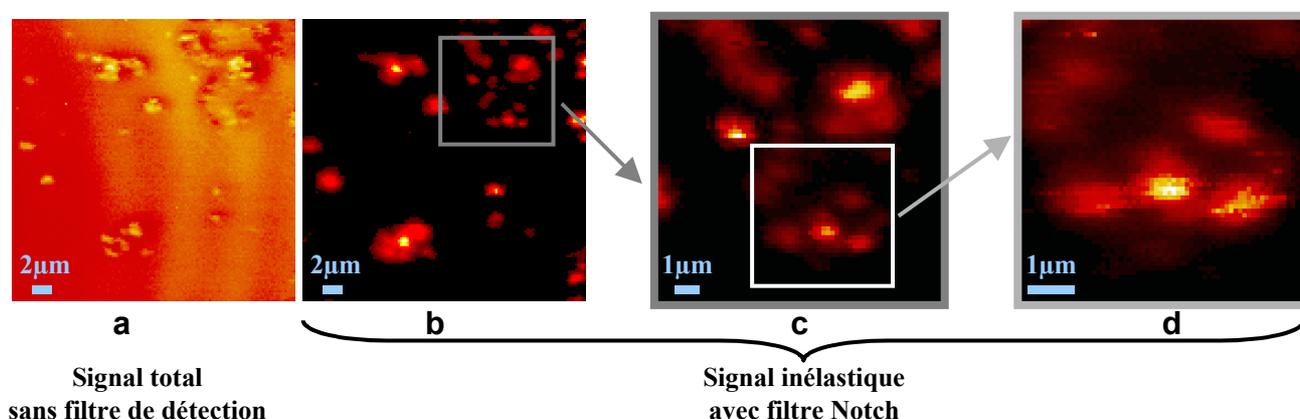


FIG. 3.8 – Processus de localisation des agrégats sur la surface de l'échantillon. Les différentes images sont obtenues par enregistrement du signal du compteur de photons au cours du balayage xy de l'échantillon. Le temps d'acquisition par pixel est de 20ms, avec une puissance d'entrée de l'excitation laser (514,5nm) dans l'objectif de $4.5\mu W$.

3.8, en particulier sur la structure du bas pour laquelle le contraste est inversé avec et sans filtre *notch* : cette structure présente un point très intense avec filtre alors que ce même point est très peu intense lorsque le filtre est ôté. La comparaison des deux images permet ainsi de postuler une faible, voire l'absence de diffusion Rayleigh en ce point et par contre l'existence d'un processus inélastique efficace. Néanmoins, tous les points intenses sur les images enregistrées en coupant la diffusion Rayleigh ne présentent pas non plus de spectres Raman résolus. Il peut en effet s'agir de fluorescence ou bien d'un signal résultant de la relaxation radiative de plasmons sur les agrégats. Après plusieurs zooms successifs – présentés sur les images b à d de la figure 3.8 – permettant de localiser et de choisir les structures de l'étude – agrégats de faible taille, bien dissociables – on envoie le signal sur l'autre voie de détection, c'est-à-dire vers le spectromètre, en basculant le commutateur à fibre optique. On enregistre alors des spectres en différents points de la structure⁷ ; tous ne présentent pas d'activité SERS, en particulier de nombreuses zones intenses en diffusion totale ne présentant effectivement un fort signal qu'en raison d'une diffusion élastique très importante et donc d'un pic Rayleigh que le filtre *notch* ne permet pas totalement de supprimer ; mais sur quelques/1 pixel(s) on peut aussi observer un spectre Raman bien structuré.

Lorsqu'un tel point – point chaud – est repéré, l'étude de son activité SERS peut débuter. On suit alors le signal SERS de manière continue en enregistrant des spectres successifs sur ce

⁷On peut aussi, pour localiser le point chaud enregistrer une image spectrale, image sur laquelle on enregistre en chaque pixel un spectre, couvrant l'agrégat dans son ensemble.

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

point et la résolution temporelle de cette étude de la dynamique du signal SERS est déterminée par le temps d'acquisition des spectres Raman. Des séries de spectres extraites de tels enregistrements sont présentées sur les figures 3.9 à 3.11.

Ces séries ont été choisies pour leur représentativité significative des spectres de molécules uniques enregistrés sur les agrégats, parmi les milliers de spectres analysés au cours de cette étude. Les densités de puissance au point de focalisation utilisées varient typiquement de quelques unités à une dizaine de kilowatts par centimètre carré. Toutes les calibrations ont été faites avec les raies d'une lampe à néon.

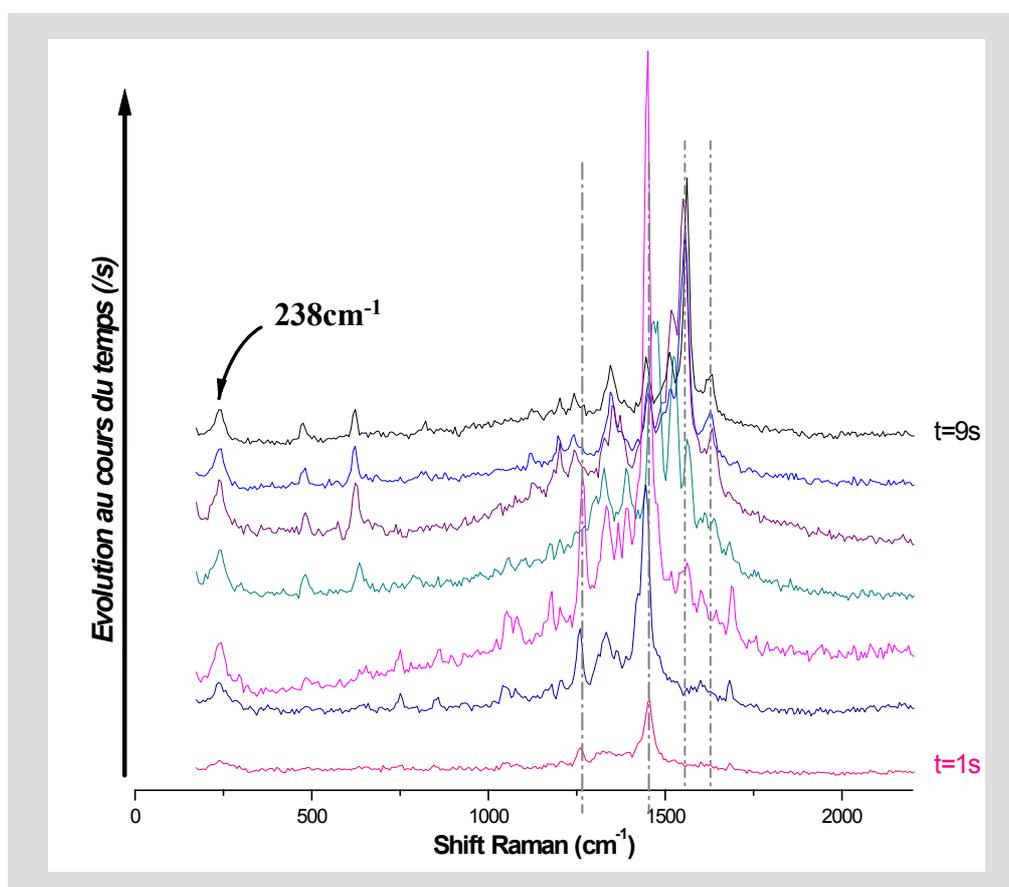


FIG. 3.9 – Série de spectres successifs enregistrés sur un même point chaud avec un temps d'acquisition de 1s pour une densité de puissance d'excitation sur l'échantillon de $4kW/cm^2$. Pour plus de lisibilité, les spectres ont été décalés verticalement mais sont présentés en conservant l'échelle d'intensité du premier spectre observé (en bas). Au cours du temps, la position des bandes principales change et l'évolution conduit à obtenir un spectre final totalement différent du premier.

3.3.1.1 Observations qualitatives - dynamique temporelle des spectres SERS

Ces spectres enregistrés en une seconde seulement sont très intenses ; plusieurs milliers de coups sont détectés pendant la durée d'acquisition, bien que la puissance d'excitation soit faible ($4.5\mu W$ à l'entrée de l'objectif). Cela traduit donc une très forte exaltation du signal des molécules sur le point chaud. On observe aussi des raies bien résolues et fines, avec une largeur à mi-hauteur de l'ordre de 15cm^{-1} . Cette caractéristique, tout comme les fluctuations spectrales importantes qui sont observées d'un spectre à l'autre, suggèrent que peu de molécules participent au signal détecté. En particulier, l'intensité relative de certaines raies fines varie ; des bandes de vibrations montrent ainsi un comportement de "clignotement" typique du signal SERS de molécules uniques, observé depuis les toutes premières expériences de *Kneipp* ou *Nie*, et confirmé par les études suivantes [110, 120, 121, 122].

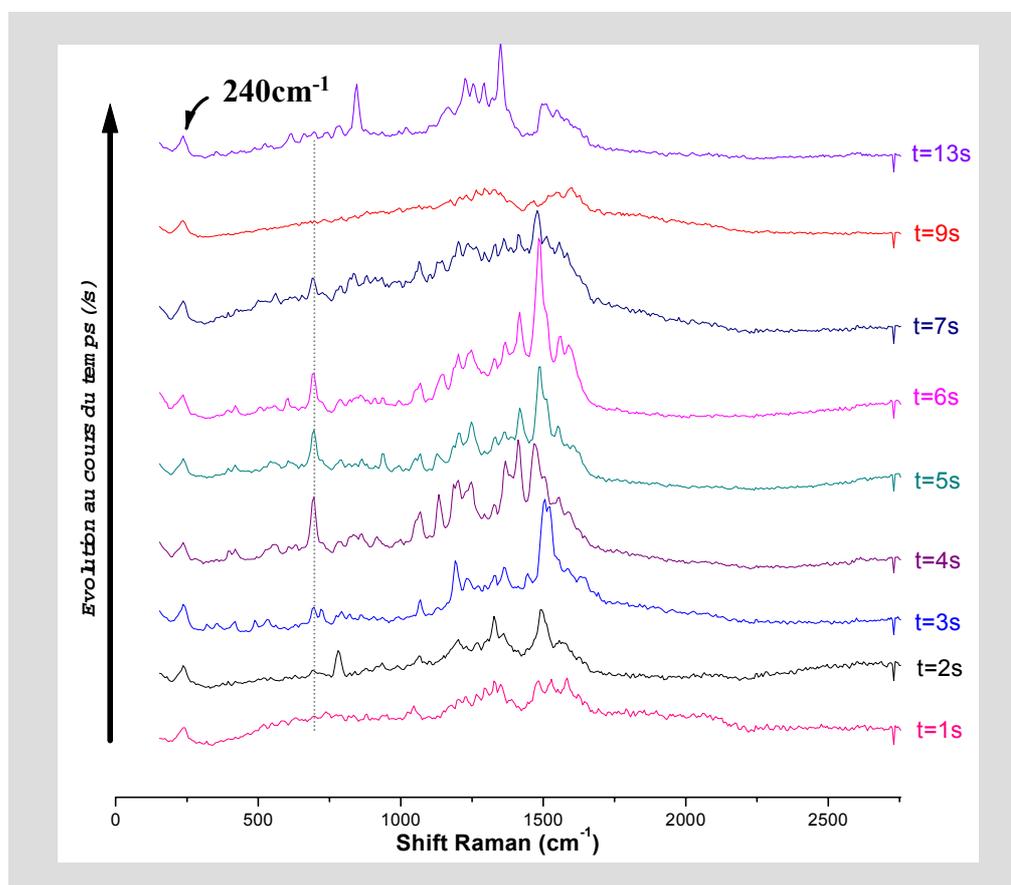


FIG. 3.10 – Série de spectres successifs enregistrés sur un même point chaud (1s/spectre, $4\text{kW}/\text{cm}^2$). Cette série est représentative des modifications globales de l'allure des spectres observées sur certains points chauds au cours du temps. Après une "interruption" au niveau du 8^{ème} spectre (en rouge), on retrouve après quelques secondes un nouveau spectre aux bandes intenses et résolues.

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

Sur les séries de spectres présentées ici certaines bandes peuvent ainsi apparaître et disparaître très rapidement. C'est le cas par exemple, de la raie indiquée par les pointillés sur la figure 3.10. Cette bande est absente sur les premiers spectres, et apparaît au 4ème spectre avec une intensité relativement importante. Elle persiste ensuite pendant quelques secondes, avec des fluctuations d'intensité, puis disparaît définitivement.

De telles fluctuations d'intensité relative, qui sont aussi observées au cours des études dans lesquelles les agrégats sont en solution (cas par exemple de *Kneipp*) ne peuvent pas être uniquement expliquées par des phénomènes de diffusion spatiale des agrégats, qui conduiraient les particules et donc les molécules adsorbées sur celles-ci, à sortir et revenir dans la zone sondée. Dans nos études, les agrégats sont déposés sur une surface et ne se déplacent pas. Par contre, dans le cas d'études en solution, on peut effectivement considérer le cas de la diffusion des structures métalliques. Ce déplacement devrait certes conduire à une modification de l'intensité du spectre, mais celle-ci serait homogène sur l'ensemble des raies, avec une baisse d'intensité en cas de sortie du volume d'excitation et *vice et versa*. La diffusion spatiale des agrégats ne peut donc expliquer les variations d'intensités inhomogènes observées sur les spectres SERS de molécules uniques— même si, pour les études SERS en solution, il est important de prendre en compte ce paramètre au cours de l'analyse des spectres et de leur interprétation— de telles variations d'intensité sont ainsi caractéristiques du signal de molécules individuelles.

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, le phénomène d'exaltation est très certainement associé en partie à des processus d'interactions de la molécule avec le substrat, et déjà dans les études macroscopiques cette hypothèse est proposée pour expliquer les différences existant entre les spectres Raman "normaux" et les spectres SERS [123].

Dans les expériences de molécules uniques, l'ensemble des observations effectuées sur les variations d'intensité ainsi que sur la position spectrale des raies, en particulier concernant les différences détectées pour les spectres correspondant à une même espèce chimique mais enregistrés sur différentes particules, conduit donc à nouveau à suggérer un rôle majeur de la dynamique du processus d'adsorption des molécules sur le substrat exaltant : modification de l'adsorption, ou différences de sites pour différentes molécules. En sondant les fluctuations de l'adsorption des objets individuellement, on s'attend ainsi à une sensibilité accrue à ces modifications. Deux points différents sont mis en avant concernant l'incidence de la modification de l'adsorption de la molécule au cours du temps sur la dynamique de l'intensité des bandes. D'une part, une modification de l'effet chimique— état de transfert de charge favorisé/défavorisé suivant l'adsorption— et d'autre part un changement dans l'efficacité d'excitation.

Effectivement, il faut aussi prendre en compte le fait que l'effet d'exaltation électromagnétique varie avec la polarisation du faisceau exciteur. Pour une nanostructure de forme

donnée sur laquelle une molécule est adsorbée, la polarisation optimale dépend de deux facteurs.

L'exaltation électromagnétique sera maximale si la polarisation du champ incident est parallèle au grand axe de la particule si la particule est oblongue, selon l'axe de la protubérance s'il s'agit d'une telle structure, et dans l'axe des deux particules si le site considéré est une jonction. Le signal de diffusion émis par la molécule sera quant à lui maximum pour une polarisation d'excitation orientée dans la direction préférentielle d'excitation du tenseur de polarisabilité de la molécule, qui dépend à la fois de l'interaction de la molécule avec le substrat et de l'orientation de la molécule dans le site d'adsorption. Cette particularité a d'ailleurs été démontrée par *Nie* et *Emaury* dans leur première étude SERS de molécule unique [8], la polarisation d'excitation la plus efficace étant trouvée pour une direction parallèle à l'axe longitudinal des particules et des molécules étudiées.

Les orientations préférentielles liées à la nanostructure et à la molécule n'étant pas nécessairement compatibles *a priori*, cela pourrait contribuer à expliquer le faible nombre de sites "chauds" observés dans les études SERS. Par ailleurs, un changement d'adsorption de la molécule— diffusion rotationnelle (nanoseconde) ou cas extrême de désorption— peut, en modifiant le tenseur de polarisabilité de celle-ci (déplacement de charge, polarisabilité des liaisons), rendre l'excitation laser moins efficace, ce qui peut être une des sources des fluctuations d'intensité des bandes spectrales observées. De plus, à des modifications du tenseur de polarisabilité liées à des changements d'adsorption des molécules, et comme l'ont proposé *A. Weiss* et *G Haran* [121], peut aussi s'associer une diffusion spatiale des molécules sur la surface. Dans cette étude SERS de molécule unique conduite sur la Rh6G, *Weiss et al.* attribuent ainsi l'absence de corrélation observée entre les variations du nombre global de coups détectés (intégration sur l'ensemble des raies) et les fluctuations d'intensité relatives des différentes bandes à deux phénomènes : la diffusion spatiale hors du point chaud pour la baisse d'intensité globale— ce qui peut être rapproché de la diffusion hors focus des agrégats en solution discutée plus haut— et la modification de l'adsorption pour les fluctuations d'intensité relative indépendantes des différentes raies. Pour ces dernières fluctuations, dont ils observent que la dynamique temporelle varie linéairement avec la puissance d'excitation, les auteurs proposent un mécanisme de "saut" de la molécule entre deux configurations d'adsorption séparées par une barrière énergétique. Une telle désorption, ou photodésorption, peut ainsi être assistée par le laser par le biais d'une transition électronique, et on parle de DIET⁸.

Sur les séries de spectres présentées ici, outre des modifications d'intensité des bandes, on observe aussi une dynamique dans la position en énergie de certaines raies. Ces déplacements spectraux peuvent être soit irréversibles et mener à une modification globale de l'allure des

⁸DIET, acronyme anglais de *Desorption Induced by Electronic Transition*.

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

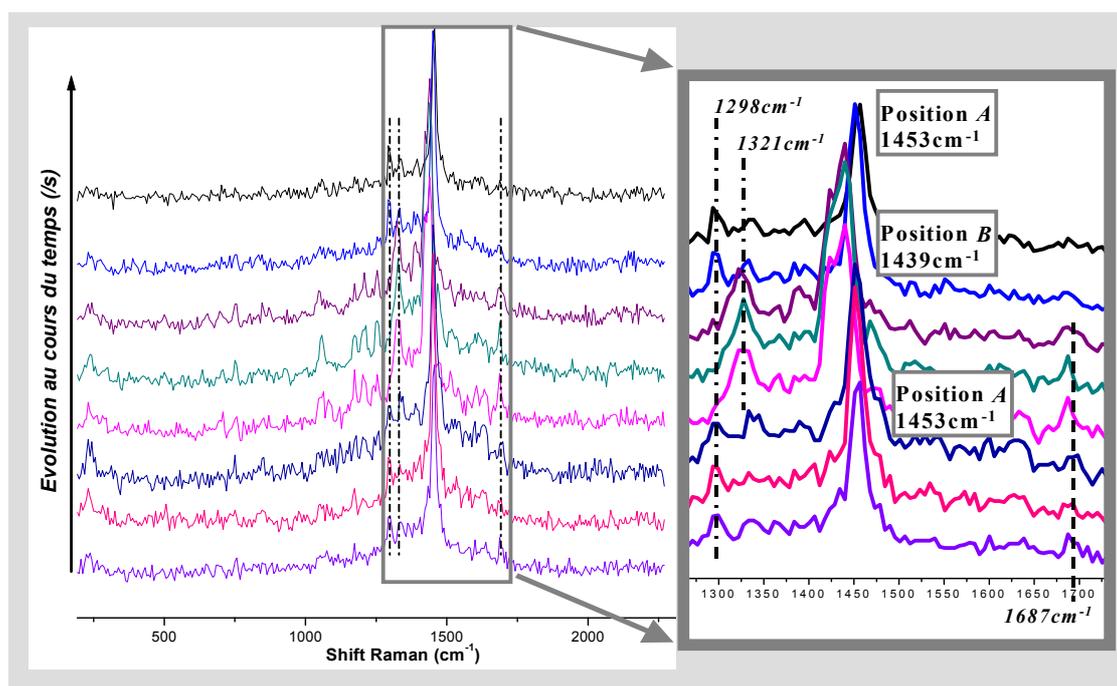


FIG. 3.11 – Déplacement spectral réversible des bandes de vibration des spectres de molécules uniques : série de spectres successifs enregistrés sur un même point chaud (1s/spectre, $4kW/cm^2$). Pour mieux distinguer les différentes positions des bandes un zoom de la gamme spectrale d'intérêt est présenté dans l'encart de droite.

spectres enregistrés sur un point chaud, soit réversibles, et dans ce cas on observe des aller-retours en fréquence de certaines bandes.

Sur la figure 3.11 est présentée une telle série de spectres, sur laquelle on distingue un réel saut spectral de la bande principale. Le long de cette série, la bande la plus intense, initialement pointée à $1453cm^{-1}$, se décale à $1439cm^{-1}$ sur le 4^{ème} spectre et revient à sa position initiale après 3 secondes. Parallèlement au saut spectral de la bande principale, on remarque aussi la présence d'une bande autour de $1300cm^{-1}$ d'intensité plus faible, et qui peut être corrélée au déplacement de la bande à $1453cm^{-1}$.

Lorsqu'on atteint la seconde configuration– bande à $1439cm^{-1}$ – la bande à $1298cm^{-1}$ disparaît et on observe une autre bande plus large à $1321cm^{-1}$. Cette bande disparaît avec le retour de la bande principale à sa configuration initiale qui se retrouve accompagnée à nouveau de la bande à $1298cm^{-1}$; le dernier spectre de la série est donc très similaire au premier. La seconde configuration conduit aussi à un spectre sur lequel on distingue une bande d'intensité moyenne vers $1687cm^{-1}$ et qui est quasiment inexistante dans les premiers spectres.

Nous avons déjà noté la difficulté de s'assurer de l'unicité de l'objet étudié au cours

des études SERS, de par le manque de signature spécifique et parce que les rares indices–fluctuations d'intensité,...– permettant de s'en assurer ne sont qu'indirects. En revanche, une réversibilité du déplacement spectral, telle que nous l'avons observée sur la figure 3.11 est ici une preuve directe et incontestable que le signal détecté est celui d'une molécule individuelle.

Ces allers-retours en fréquence sont néanmoins très subtils et donc difficiles à détecter sur les nombreux spectres enregistrés ; on observe par contre plus facilement, et le plus souvent des sauts de fréquence irréversibles des bandes principales, qui conduisent à obtenir des spectres d'allure globale différente.

Cela est par exemple le cas sur la série de la figure 3.9. Les deux bandes majoritaires au départ à 1265cm^{-1} et 1450cm^{-1} laissent place sur le 4^{ème} spectre à un nouveau type de signal, avec deux bandes intenses à 1523cm^{-1} et 1550cm^{-1} dont on peut ensuite suivre les fluctuations en intensité. Dans certains cas, comme sur la deuxième série présentée (Fig.3.10), la modification globale conduit non seulement à des spectres de types distincts, sur lesquels les bandes principales, intenses et résolues, ont des fréquences différentes, mais on enregistre aussi après un certain temps d'irradiation et ici sur le 8^{ème} spectre de la série, en rouge sur la figure 3.10, un signal peu intense qui ne comporte plus de bandes fines mais uniquement deux bandes larges centrées respectivement à 1320 et 1590cm^{-1} .

Pour les échantillons de type \mathfrak{B} , c'est-à-dire lorsqu'on rince les agrégats déposés avec de l'eau distillée, on n'enregistre plus aucun spectre SERS. Aucun signal spectroscopique n'est détecté sur les agrégats, même en augmentant la durée d'acquisition. Par contre, lorsqu'on enregistre le signal sur les échantillons rincés, puis incubés avec une solution diluée d'EDTA (10^{-8}mol/l dans de l'isopropanol), on retrouve le même type de spectres et de séries. On remarque alors sur ces séries la même dynamique rapide ainsi que la présence de raies résolues. De plus, de nombreux spectres de ces séries peuvent être rapprochés de ceux observés sur les échantillons non rincés de type \mathfrak{A} . Cette identité des comportements spectraux entre les enregistrements effectués sur des échantillons peu dilués, et ceux conduits à très basse concentration ($\leq \text{nM}$) a déjà été observée dans une étude précédente, sur les signaux SERS de tyrosine [92]. Il s'agit d'une preuve incontestable que le nombre de points chauds présents sur les agrégats est très faible, le plus souvent 0 et parfois 1. Ce nombre est alors le facteur limitant pour l'exaltation : seules les molécules situées à proximité de ces points chauds voient leur signal être exalté ; le nombre de sites étant limité, on atteint très rapidement (à faible concentration moléculaire) la saturation des points chauds en molécules. Dans ce cas, même en augmentant la proportion en molécules, le signal observé reste le même. Sur les échantillons de type \mathfrak{B} incubés, l'ensemble des observations, concernant la dynamique rapide des spectres et la résolution des raies, est à nouveau une preuve que le nombre de molécules participant au signal est faible, et que le régime molécule unique est atteint pour la plupart des points chauds étudiés.

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

3.3.1.2 Analyse des spectres

Comme nous l'avons noté, l'intérêt de la spectroscopie Raman réside dans la finesse de l'analyse chimique qu'elle permet d'effectuer grâce à la signature spécifique fournie par les nombreuses bandes caractéristiques des vibrations d'une molécule telle que l'EDTA. Nous avons donc effectué une telle analyse sur l'ensemble des spectres SERS enregistrés.

La position en énergie ainsi que l'attribution des bandes caractéristiques des spectres Raman "normaux" et exaltés de l'EDTA sont regroupées dans le tableau de la figure 3.12 [118, 124, 125, 126].

YH ₄			YH ₂ ²⁻				
Garfallo Esteban <i>et al.</i>			Bunding Lee <i>et al.</i>	Pettinger <i>et al.</i>		Guzonas <i>et al.</i>	
				normal	SERS		
v CH ₂	3024 <i>s</i> 2990 <i>s</i>	3018 <i>s</i> 2978 <i>s</i>	v CH ₂	≈2900 br 2-3bandes		2974	
vC=O	1690 <i>s</i>	1615 <i>m</i>	v _a COO ⁻	1633 <i>m</i>	1636	1636w,vbr	1625
vC-O	1415 <i>vs</i>	1400 <i>s</i>	v _s COO ⁻	1390 <i>s</i>	1408	1392vs	1400
δ(C-H)CH ₂	1445 <i>vs</i>	1480 <i>vs</i>	δ(C-H)CH ₂				1435
		1360 <i>m</i>	δ N-H ⁺	1344ms	1330	Absente	1325s
vC-N	1094 <i>m</i>	1090 <i>s</i>	vC-N	≈1040m			1090w
vC-C CH ₂ -COO ⁻	912 <i>s</i>	926,928s	vC-C CH ₂ -COO ⁻	920 <i>vs</i>	912, 935br	922s,br	912,930 s,br

FIG. 3.12 – Données spectroscopiques de l'EDTA, (formes YH₄ et YH₂²⁻)

Modes vibrationnels actifs en spectroscopie Raman, attributions aux vibrations moléculaires et positions en énergie obtenues dans les articles de Pettinger [118], Guzonas [124], Garfallo [125] et Bunding [126]. En annotation les caractéristiques, selon la nomenclature anglo-saxonne, observées expérimentalement par les différents auteurs. *vs* : très intense, *s* : intense, *m* : intensité moyenne, *w* : faible, *br* : bande large.

Au pH de nos solutions, la forme majoritaire attendue est YH₂²⁻. Pour cette forme, les bandes caractéristiques attendues sont celles des groupements carboxyliques COO⁻, avec la vibration anti-symétrique vers 1630cm⁻¹ et la vibration symétrique, de plus forte intensité et plus fine entre 1390 et 1410cm⁻¹ suivant les différents auteurs. Le mode d'élongation de la liaison C-N est attendu autour de 1090cm⁻¹, mais les intensités de la bande Stokes associée à cette vibration et trouvées dans la bibliographie ne permettent pas de conclure quant à l'intensité relative attendue. Enfin, deux vibrations particulières permettent d'obtenir des informations très intéressantes sur l'EDTA, sa forme acido-basique mais aussi son mode d'adsorption avec

la surface. Il s'agit du mode de déformation δ_{N-H^+} et de la vibration d'élongation C-C du groupement acétate. En effet, toutes les formes acido-basiques de l'EDTA, et en particulier YH_2 , existent sous forme zwitterionique à travers un équilibre d'échange des protons acides liés à l'oxygène vers les atomes d'azote du squelette. Suite à cet échange, on obtient l'ion zwitterionique dans lequel l'azote porte une charge formelle positive et l'oxygène une charge négative. On observe alors sur le spectre Raman la déformation δ_{N-H^+} dont la signature se situe autour de 1330cm^{-1} . Si cette bande est absente, on peut en conclure que l'équilibre avec la forme zwitterionique est modifié ou supprimé. Ainsi Pettinger a-t-il conclu de son spectre SERS que l'EDTA s'adsorbait préférentiellement par interaction avec le doublet libre de l'azote sur l'électrode d'argent utilisée [118], empêchant la capture du proton par l'azote et donc la bande δ_{N-H^+} d'apparaître sur le spectre. L'élongation $CH_2-COO(H)$ porte quant à elle une signature des propriétés des groupements carbonyles terminaux : Dans YH_4 , l'excitation de cette vibration se traduit sur le spectre Raman par une bande large ($\geq 20\text{cm}^{-1}$) et relativement intense, centrée vers 920cm^{-1} . Par contre, sur les spectres de la forme YH_2^{2-} , on voit apparaître un doublet à 912 et $\simeq 930\text{cm}^{-1}$ qui traduit bien les deux environnements différents des liaisons C-C des groupements acétates.

La première conclusion de l'analyse des spectres est qu'on n'observe en fait jamais le spectre de l'EDTA, seule espèce attendue et présente à une concentration pourtant relativement importante dans les échantillons \mathfrak{A} (10^{-4}mol.l^{-1}). Sa signature vibrationnelle Raman n'est jamais complète, et il manque en particulier le mode intense à 920cm^{-1} , ou encore la signature de la vibration ν_{C-N} . La présence de bandes dans la région $1200 - 1600\text{cm}^{-1}$ s'avère en particulier insuffisante pour attribuer les spectres à l'EDTA, puisque de nombreuses autres espèces organiques présentent elles aussi des vibrations actives en diffusion Raman dans cette zone ; sur nos spectres, l'absence des modes mettant en jeu les atomes d'azote exclut définitivement l'EDTA de l'analyse.

La grande diversité des spectres obtenus ainsi que le nombre considérable de données enregistrées sur les différents points chauds étudiés ont rendu cette analyse longue et complexe. De manière qualitative, il était aussi évident que la diversité des spectres obtenus traduisait la présence de différentes espèces chimiques. L'attribution des raies observées au cours d'une analyse Raman classique peut déjà s'avérer très compliquée, car les spectres de molécules organiques sont souvent riches et complexes, et de nombreuses espèces différentes présentent des bandes dans les mêmes gammes spectrales. Dans notre cas, plusieurs points augmentent la difficulté de l'exploitation des spectres. D'une part, et en raison de l'importance des processus d'adsorption dans le phénomène d'exaltation du signal Raman, les spectres SERS peuvent être "très" différents des spectres Raman classiques, avec des modifications d'intensité relative, voire l'absence de certaines bandes, l'éclatement de modes dégénérés sous l'effet d'une modification de la symétrie de la molécule adsorbée [120], ou

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

encore des déplacements spectraux de plusieurs cm^{-1} . On trouve aussi dans la littérature de nombreux exemples de spectres SERS pour lesquels l'interprétation est complexe et dont l'attribution à une espèce chimique particulière est rendue difficile, le spectre SERS de la molécule pouvant se distinguer totalement du spectre Raman classique de cette même espèce. *K. Kneipp* a ainsi par exemple observé deux formes différentes de spectres SERS du dioxyde de Carbone [127], un spectre assimilable au spectre Raman classique de cette molécule avec une bande très intense à $1382cm^{-1}$ et une structure multibande large centrée autour de $1270-1280cm^{-1}$ et un spectre présentant la bande à $1382cm^{-1}$ ainsi qu'une nouvelle bande très intense à $1180cm^{-1}$. Dans ce cas, les auteurs ont interprété ces deux types de spectres comme la signature de deux états d'adsorption différents de la molécule, le second type de spectre correspondant à une chimisorption de CO_2 . S'il existe de bonnes bases de données de spectres Raman, ce n'est pas le cas des spectres SERS, même si cela peut paraître difficilement réalisable, au regard des très nombreux systèmes différents utilisés comme substrats. Le second point compliquant notre analyse est directement lié au mode molécule unique dans lequel nous nous sommes placés, et qui conduit de manière intrinsèque à une dynamique temporelle très importante des spectres.

La démarche suivie afin d'attribuer les bandes observées sur les spectres SERS combine deux voies d'analyse, utilisées de manière complémentaire. D'une part, la recherche de bandes de vibration situées à des fréquences caractéristiques de groupes ou de fonctions organiques (groupement carboxylique, vibration C-C, amine,...), et d'autre part la recherche de la signature spectroscopique complète d'espèces particulières dont les spectres sont recensés. Cette dernière voie nécessite la détermination préalable d'un ensemble d'espèces, dont la présence peut être expliquée et probable. Nous avons vu que l'EDTA est introduite au cours de la synthèse comme agent de réduction de l'argent. Comme l'analyse des spectres SERS enregistrés montre que la signature SERS de l'EDTA est absente, on peut par contre raisonnablement s'attendre à détecter la présence de ses produits d'oxydation, déterminés au cours d'études électrochimiques [124].

Plusieurs bandes de nos spectres peuvent raisonnablement être attribuées à des vibrations de groupes caractéristiques.

Tout d'abord, la bande fréquemment observée sur les spectres et située autour de $240cm^{-1}$ peut très vraisemblablement être associée à un mode de vibration Ag-O. Ce mode est en effet très souvent présent sur les spectres SERS d'espèces organiques [128][129] ou sur les spectres Raman classiques de complexes que forme l'argent-Ag⁰ et Ag^I-coordiné avec des ligands organiques possédant des groupements carbonyles [19]. Pour un complexe Ag(EDTA)_n, Garfallo et al. ont d'ailleurs observé une bande à $230cm^{-1}$ dont l'intensité et la largeur sont tout à fait comparables à celles de la bande à $240cm^{-1}$ de nos spectres [125]. Dans leur cas cependant, ils ont attribué cette bande à une vibration AgN, plutôt qu'AgO, traduisant

ainsi une coordination de l'EDTA par l'azote plutôt que par un des atomes d'oxygène des groupements carbonyles. Mais une attribution à une vibration faisant intervenir l'oxygène semble en réalité plus probable si on considère les données de la littérature, et que l'on prend en compte le fait que sur le même spectre la vibration δ_{N-H^+} a été aussi observée par ces auteurs [111]. La présence de cette bande sur nos spectres traduit donc l'existence d'une espèce adsorbée sur les agrégats d'argent par mise en commun d'un doublet libre d'un atome d'oxygène présent dans sa structure moléculaire.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'origine vibrationnelle de la bande à 1453cm^{-1} des spectres de la figure 3.11 pour laquelle un saut de fréquence a été observé. Un déplacement si fin et réversible est très certainement lié à une modification peu importante des propriétés vibrationnelles de la molécule. Une implication de deux états d'adsorption différents est ainsi beaucoup plus plausible que celle de l'existence de deux espèces différentes, réactif et produit d'une réaction chimique très rapide et réversible.

De plus, cette bande se situe dans une gamme de fréquence dans laquelle est attendue la vibration ν_S des groupements carbonyles. Or, les molécules qui contiennent de tels groupements ont une très forte probabilité de s'adsorber par l'intermédiaire des oxygènes terminaux. Les vibrations des groupements carboxyles, ν_S et ν_{AS} , sont donc des capteurs très sensibles de l'état d'adsorption de la molécule.

Plusieurs articles décrivent ainsi les modifications des caractéristiques des bandes vibrationnelles liées à ces modes. Le mode anti-symétrique est par exemple très caractéristique du degré de coordination de la molécule, sa fréquence varie ainsi entre 1690 et 1560cm^{-1} , suivant que la molécule est mono-coordinée, libre ou pontante [130][19][131]. On attend aussi une augmentation de l'intensité de cette bande lors d'une coordination avec le métal par rapport à l'intensité observée pour le groupement "libre"[129]. La bande correspondant à ν_S est, elle, observée de 1390 à 1450cm^{-1} .

Sur les spectres de la figure 3.11, on pourrait donc attribuer la bande à 1453cm^{-1} à une vibration $\nu_S(\text{COO}^-)$. Le premier type de spectre observé correspondrait à une espèce possédant un groupement carboxyle relativement libre, puisqu'on n'observe pas la vibration ν_{AS} associée. La deuxième configuration– avec la bande à 1439cm^{-1} et celle à 1687cm^{-1} – correspondrait alors à la molécule coordinée, ou en tout cas avec des interactions mettant en jeu le groupement carboxyle plus importantes avec la surface. De plus dans cette deuxième configuration, le spectre présente une bande à 1321cm^{-1} . Cette fréquence correspond à celle des vibrations δ_{NH^+} de l'EDTA, et peut être attendue dans le cas d'espèce similaire, avec un échange possible de protons entre un groupement acide et amine. On détecte donc la vibration δ_{NH^+} lorsque la molécule interagit avec la surface avec le groupement acide (configuration B) mais pas lorsque l'interaction se fait avec le doublet libre de l'azote, laissant le groupe carboxyle terminal "libre"(configuration A). Néanmoins, il nous a été impossible

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

d'identifier l'espèce chimique donnant ce spectre, les considérations évoquées ci-dessus restent donc des hypothèses, mais sont un bon exemple de la voie d'analyse suivie au cours de l'interprétation de nos spectres.

De même, de nombreux spectres n'ont pu être interprétés et attribués de façon définitive à des espèces particulières, souvent à cause de l'absence d'une ou deux raies caractéristiques. Dans les échantillons de type \mathfrak{A} , pour lesquels la concentration en EDTA est relativement importante, il est aussi fort probable qu'au cours de la durée d'acquisition— et bien que celle-ci soit seulement de l'ordre de la seconde— des espèces chimiques de nature différentes contribuent au signal collecté. Cette proposition s'appuie surtout sur le fait que dans certains cas, la dynamique d'un certain nombre de bandes de vibration réparties sur l'ensemble de la gamme spectrale analysée semblent être corrélées : apparition et disparition des bandes, anti-corrélation des fluctuations d'intensité relative en regard des autres bandes présentes. L'extraction de "spectres élémentaires" à partir des spectres expérimentaux globaux a donc été effectuée. Malheureusement, les tentatives d'attributions de ces spectres plus simples se sont avérées vaines.

Il est en fait intéressant de noter que parmi les quelques expériences menées jusqu'ici pour enregistrer le signal SERS de l'acide éthylènediaminetétraacétique, seul *Pettinger* a pu corrélérer de manière satisfaisante les bandes observées sur les spectres SERS avec la signature de l'EDTA[118]. *Guzonas* [124] et *Bunding lee* [126] ont été confrontés aux mêmes difficultés d'interprétation des spectres obtenus. Dans le cas de *Guzonas* en particulier, il n'a pas été possible d'attribuer toutes les raies observées sur les spectres SERS de l'EDTA à des vibrations de cette espèce ou de produits dont la présence serait probable.

Dans notre cas cependant, certains spectres ont pu être identifiés comme correspondant à des produits possibles d'oxydation de l'EDTA. Sur les figures 3.13 à 3.15 sont présentés des spectres expérimentaux ainsi que les courbes d'ajustement des différentes bandes, avec en vert les bandes d'intérêt particulier. Sur ces spectres, j'ai ainsi recherché, et détecté, la signature spectroscopique complète de différents produits carbonés dont la présence est probable dans le cas d'une oxydation de l'EDTA. Je présente donc aussi sur ces figures les données spectrales obtenues dans la littérature. La comparaison— positions en énergie, intensités relatives— avec les spectres expérimentaux permet d'attribuer ceux-ci à différents produits de référence.

Le spectre de la figure 3.13 possède la signature de l'ion HCOO^- , base conjuguée de l'acide formique observée en SERS macroscopique [132]. Il présente en particulier les modes de vibrations ν_S et ν_A du groupement acide à 1367 et 1627cm^{-1} . La position en énergie de ces deux bandes vibrationnelles intenses est de plus une signature de la forme acido-basique présente. *Castro et al.* ont en effet observé un déplacement de ces bandes vers le rouge— de 10 à 15cm^{-1} — lorsque le pH augmente et que l'équilibre est déplacé vers la forme basique

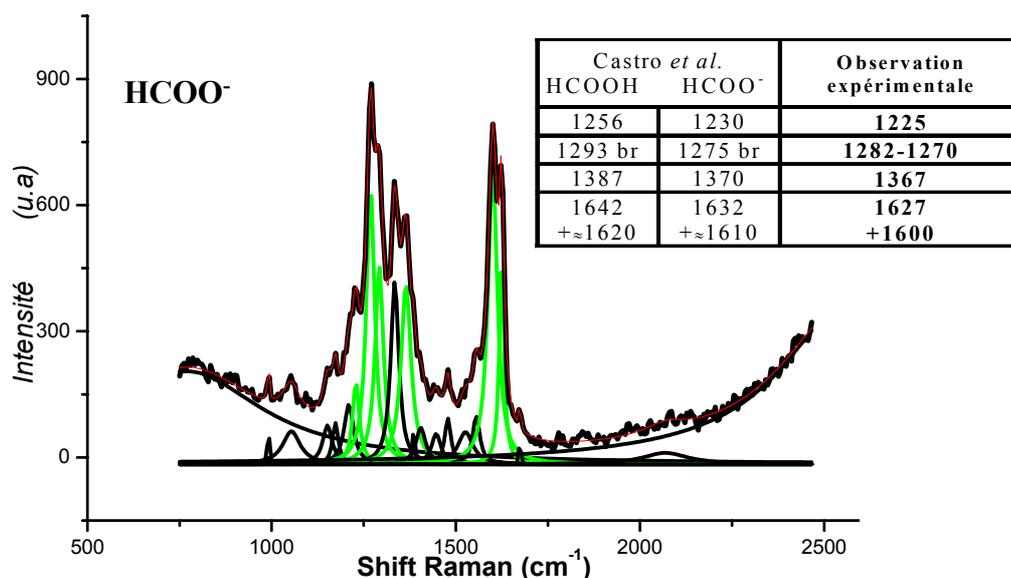


FIG. 3.13 – Spectre SERS (1s, $4kW/cm^2$) sur lequel la signature de l'ion formate a été détectée. L'ajustement de ce spectre a été effectué en le décomposant en une somme de Lorentziennes. En rouge, la courbe d'ajustement global. En vert, les composantes de l'ajustement associables, d'après les données trouvées dans la littérature [132] et présentées dans le tableau attenant, aux bandes de vibration de cet ion. Les positions des bandes expérimentales déterminées à partir de l'ajustement sont reportées dans ce même tableau.

[132].

La seconde espèce caractérisée lors de cette étude SERS est l'ion carbonate CO_3^{2-} . La position des différentes bandes ainsi que les motifs (épaulement, intensité relative) sont bien corrélées aux observations macroscopiques effectuées par *Sun Kai* [129] ainsi que par *Castro* [132].

Une observation intéressante peut aussi être faite sur les spectres SERS de cette espèce. On obtient effectivement dans ce cas un très bel exemple des modifications possibles lorsque l'on passe d'un spectre Raman classique à un spectre exalté de surface : à cause d'une modification de la symétrie de la molécule lors de l'adsorption sur la surface, les deux modes E' , dégénérés initialement, se séparent pour donner deux bandes très proches en énergie. Cette explication, proposée par *Sun Kai* peut aussi être dans notre cas à l'origine des deux doublets observés à $1506, 1523cm^{-1}$ et à $696, 726cm^{-1}$. La bande de très basse énergie observée sur notre spectre (en tirets verts sur la figure 3.14) à $237cm^{-1}$ n'a pas pu être observée par les auteurs précédemment cités car elle était masquée dans le pied du pic de diffusion Rayleigh sur leurs spectres expérimentaux. Cette bande peut néanmoins raisonnablement être interprétée comme une signature supplémentaire de l'ion carbonate adsorbé sur l'argent. Le

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

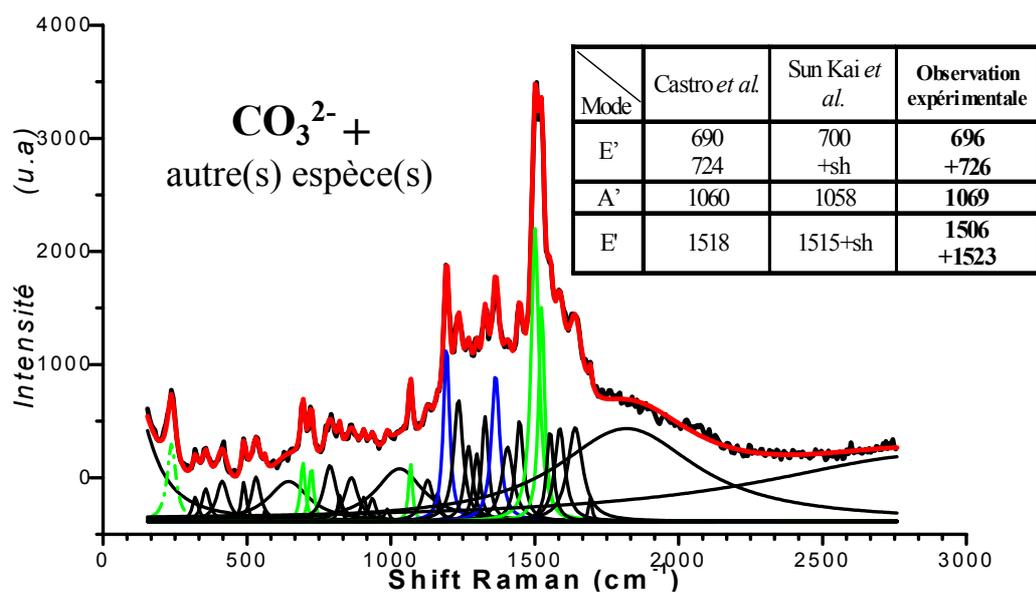


FIG. 3.14 – Spectre SERS (1s, 4kW/cm²) sur lequel la signature de l’ion carbonate a été détectée. En vert, les composantes attribuables aux bandes de vibration de cet ion [132][129]. En bleu, composantes probablement associable à une seconde espèce(voir texte).

mode de vibration Ag⁻-OOC est effectivement attendu autour de 240cm⁻¹ et Moskovits a également observé cette vibration (235cm⁻¹) dans le cas d’acides carboxyliques adsorbés sur une surface d’argent [128]. Le spectre de la figure 3.14 est aussi un exemple d’un cas pour lequel il est fort probable que plusieurs espèces aient contribué au signal durant la durée d’acquisition. Sur ce même spectre, sont ainsi indiquées en bleu deux bandes supplémentaires, ne pouvant être attribuées à des vibrations de l’ion carbonate, et situées respectivement à 1190 et 1367cm⁻¹. Bien que moins caractéristiques, car peu nombreuses, ces bandes pourraient être néanmoins attribuées au dioxyde de carbone CO₂ dont la signature SERS, observée par *Kneipp et al.*[127], se compose d’une bande intense et large à 1382-1370cm⁻¹ et d’une seconde bande plus fine et très intense à 1180cm⁻¹(chimisorption).

Si l’ion carbonate et l’ion formate sont des produits qui peuvent sembler peu caractéristiques de notre système– même si l’ion formate est un produit de dégradation quasi-final, attendu lors de l’oxydation de l’EDTA– nous avons aussi observé un produit plus précoce de dégradation de l’EDTA : le tétraméthyl-éthylène-diamine ou TMEDA, produit dans lequel les quatre groupements acides ont été dégradés en groupements CH₃. Le spectre expérimental observé est présenté sur la figure 3.15. Il est intéressant de noter que ce spectre a été enregistré sur un échantillon de type \mathfrak{B} - agrégats rincés – seulement quelques minutes après l’incubation par la solution d’EDTA 10⁻⁸M, alors qu’avant l’ajout de cette solution nous avons vérifié l’absence de spectre SERS et donc l’efficacité du rinçage sur ce même agrég-

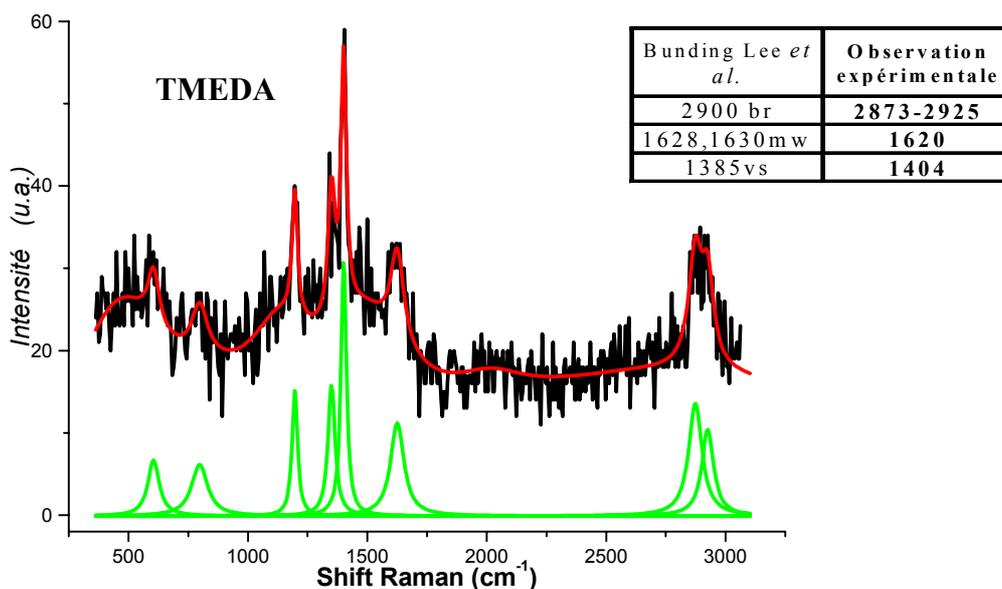


FIG. 3.15 – Spectre SERS ($1s, 4kW/cm^2$) sur lequel la signature du tétraméthyléthylène diamine TMEDA a été détectée. En vert, les composantes de l'ajustement associables, d'après les données trouvées dans la littérature [126], aux bandes de vibration de cette espèce.

gat. Les bandes présentes sur ce spectre, quoiqu'un peu déplacées en fréquence par rapport aux valeurs trouvées par *Bunding Lee* [126], correspondent bien à l'empreinte spectrale du TMEDA, en particulier quand on considère les intensités relatives des différentes bandes. Enfin, le spectre indiqué en rouge sur la figure 3.10 est très similaire à celui observé par *Kudelski et al.*, et attribué au carbone amorphe ou graphitique [133]. Ce spectre est en effet caractéristique des produits carbonés dégradés, avec deux bandes larges autour de $1350cm^{-1}$ et $1590cm^{-1}$. L'allure des bandes— très larges— et leur position en énergie ainsi que l'absence de signature des vibrations ν_{CH} autour de $3000cm^{-1}$ correspondent aussi aux observations de *Kudelski*. Ces bandes sont par contre absentes sur les premiers spectres de la série, mais on peut deviner leur apparition progressive au cours du temps. On peut donc supposer qu'au cours de cet enregistrement les produits initialement présents ont subi un processus de graphitisation, c'est-à-dire une décomposition en atomes élémentaires accompagnée d'un dégagement gazeux (CO_2, N_2, O_2, \dots), suivie d'une réorganisation des atomes de carbone. Malgré cela, on voit que même s'il existe autour du point chaud un amas de carbone amorphe, les molécules continuent à interagir avec les agrégats d'argent qui exaltent leur signal de diffusion Raman : sur le dernier spectre de la série on voit effectivement à nouveau, au dessus du fond de carbone amorphe, un spectre différent et qui présente les caractéristiques du signal de molécules uniques, avec des bandes très fines et intenses.

Enfin et dans le but de n'exclure *a priori* aucune espèce et de rendre l'analyse la plus ex-

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

haustive possible, nous avons aussi recherché des spectres pouvant correspondre aux solvants utilisés au cours de la synthèse ainsi que pendant la préparation finale des échantillons. Mais comme dans toutes les études SERS menées jusqu'ici, ces signaux sont absents, aucun spectre ne peut être attribué ni à l'eau, ni à l'isopropanol, le propanol ou encore l'acétone. Dans le cas par exemple de l'isopropanol, on n'observe en effet jamais sa signature chimique complète, qui se traduit sur les spectres Raman par plusieurs bandes caractéristiques : un triplet de faible intensité ($372\text{-}429\text{-}488\text{cm}^{-1}$), une bande très intense et fine à 819cm^{-1} , ainsi que des bandes plus larges à 953 , 1130 , $1340\text{cm}^{-1}(\text{vw})$ et 1451cm^{-1} [134]. Il n'existe pas non plus sur nos spectres de signatures spectroscopiques des ions perchlorate, introduits initialement comme contre-ions des ions Ag^+ .

3.3.2 Une mesure du facteur d'exaltation liés aux agrégats étudiés

La qualité (intensité, finesse des bandes) des spectres obtenus ainsi que la très courte durée d'acquisition nécessaire pour les enregistrer mettent clairement en évidence que les agrégats d'argent utilisés ici comme substrats induisent un facteur d'exaltation très important du signal de diffusion Raman. Cependant, et malgré l'attribution claire de bandes à certaines espèces mises ainsi en évidence, les expériences menées sur les agrégats incubés dans leur solution initiale ne permettent pas de quantifier l'exaltation. Effectivement, alors que l'EDTA est une espèce largement majoritaire dans notre échantillon (type \mathfrak{A}), sa signature spectroscopique n'est pas observée. Nous avons aussi enregistré des spectres SERS sur les échantillons de type \mathfrak{B} , c'est-à-dire rincés afin de ne plus avoir sur les agrégats de molécules d'EDTA ni de ses produits d'oxydation. Après un tel rinçage, on n'observe plus aucun spectre SERS sur les agrégats. Les points chauds sont pourtant toujours potentiellement actifs puisqu'en ajoutant quelques microlitres d'une solution diluée d'EDTA on retrouve bien une activité comparable. L'exaltation est toujours importante et on retrouve les spectres SERS de différentes espèces, dont certaines peuvent être identifiées comme des produits de dégradation de l'EDTA, dans des conditions standard d'analyse de molécules uniques.

D'autre part, nous ne connaissons pas *a priori*, la raison de la dégradation de l'EDTA en présence des agrégats. L'exaltation importante observée sur les agrégats utilisés conduit la molécule adsorbée sur un point chaud à être soumise à un très fort champ électromagnétique, qui pourrait à lui seul être la cause d'une dégradation de l'EDTA. Cependant, dans les expériences menées sur des substrats SERS plus classiques de type colloïdal, ou sur d'autres types d'agrégats individuels, des champs intenses sont également présents au niveau des points chauds, ce qui n'exclut pas l'observation de signaux Raman caractéristiques des espèces étudiées comme la rhodamine6G ou la tyrosine par exemple. Malgré les champs forts, ces molécules ne sont pas dégradées, du moins pas aux échelles de temps de plusieurs secondes nécessaires pour suivre le signal SERS pendant plusieurs enregistrements successifs.

Il est donc nécessaire de s'assurer que sur nos agrégats il est également possible de détecter le signal de l'une de ces molécules, en incubant les agrégats rincés avec une solution de l'espèce choisie.

Pour trancher si le phénomène de dégradation observé est général sur notre type de substrat ou propre à certaines espèces comme l'EDTA, j'ai poursuivi les études en utilisant les molécules de Rhodamine 6G comme sondes de l'effet SERS. Cette espèce chimique présente un double avantage. Tout d'abord, elle a fait l'objet de nombreuses études en spectroscopie Raman SERS de molécules uniques (ex : [8, 93, 115, 121]...), le spectre attendu est donc bien connu. Ce sont également des molécules modèles dans les études spectroscopiques – aussi bien en fluorescence qu'en diffusion Raman – en raison de leur grande efficacité quantique. A ce titre, plusieurs de leurs grandeurs photophysiques caractéristiques, telles les sections efficaces de fluorescence et Raman sont connues. Si on observe leur signature sur un substrat donné, il devient possible de quantifier l'exaltation et de déterminer le facteur d'exaltation lié au substrat utilisé.

3.3.2.1 Signal SERS de la rhodamine 6G

Nous avons enregistré le signal Raman SERS sur un échantillon de type \mathfrak{B} incubé avec quelques microlitres d'une solution nanomolaire de Rh6G dans l'éthanol. Sur la figure 3.16. est présenté un spectre expérimental enregistré sur cet échantillon. Le signal est intense pour une durée d'acquisition de 1s.

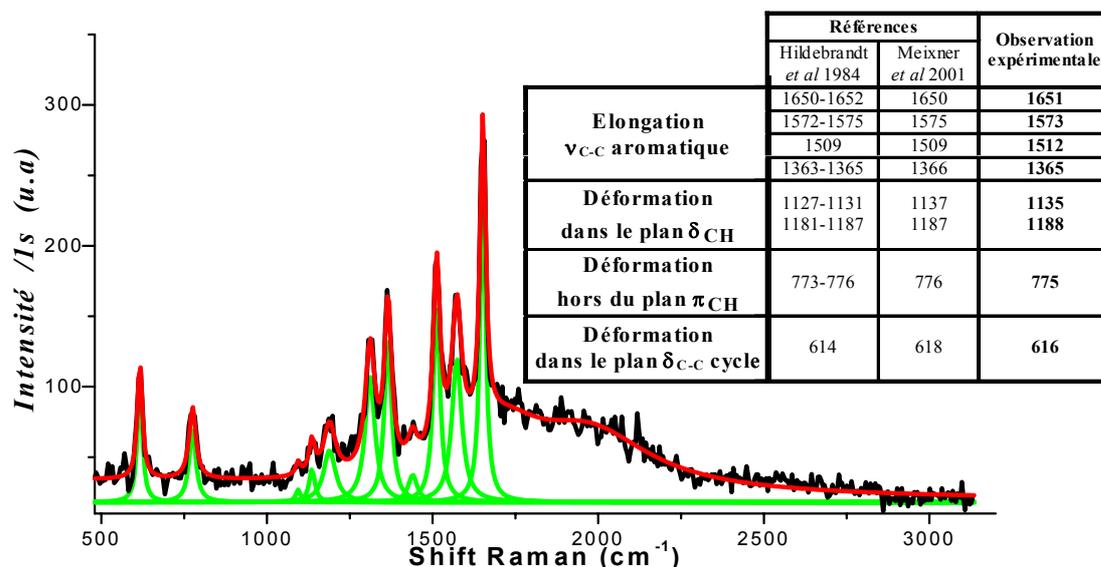


FIG. 3.16 – Spectre SERS de la rhodamine 6G enregistré en 1s sur les agrégats rincés et incubés par une solution $10^{-9}M$ de cette espèce (Puissance à l'entrée de l'objectif de $10\mu W$).

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

On observe surtout des bandes intenses et de faible largeur et non pas de bande de fluorescence qui s'étendrait sur un domaine spectral très étendu. Comme nous l'avons évoqué, un tel spectre démontre bien le processus de quenching de la fluorescence qui est associé au processus d'exaltation de surface du signal Raman des molécules. Le fond continu sur lequel émergent les bandes résolues est aussi une caractéristique du spectre SERS de la rhodamine6G, et a été observé par de nombreux auteurs (par exemple par *Weiss et al.* [121]). Un tel signal est aussi d'une manière plus générale, un trait typique des spectres Raman exaltés de surface. Les bandes vibrationnelles observées correspondent à la signature spectroscopique de la Rh6G. La position des bandes expérimentales principales, ainsi que les valeurs trouvées dans la littérature et leur assignation aux différents modes de vibration de cette molécule sont notées dans le tableau attenant [111][120].

Les colorants tels que la rhodamine6G ont une section efficace de fluorescence de l'ordre de 10^{-16}cm^2 . D'après les données obtenues dans la littérature [135], à résonance (532nm) la rhodamine a une section efficace d'absorption σ_{abs} égale à $2,2 \cdot 10^{-16} \text{cm}^2$ avec un rendement quantique ϕ de 0,98, ce qui conduit à obtenir une section efficace de fluorescence σ_{fluo} de $\simeq 2,16 \cdot 10^{-16} \text{cm}^2$. La section efficace du processus de diffusion Raman est beaucoup plus faible, de l'ordre de 10^{-30}cm^2 [8][115]. Pour calculer le facteur d'exaltation associé aux agrégats, nous avons comparé les signaux SERS de molécule unique de la rhodamine 6G adsorbée sur les agrégats avec le signal de fluorescence de cette même molécule, obtenue sur une solution diluée. L'intégration sur l'ensemble des signaux de fluorescence et Raman, obtenus dans des conditions d'excitation identiques (longueur d'onde et puissance d'excitation) permet d'obtenir des nombres de coups N_{fluo} et $N_{SERSRaman}$ reliés par un coefficient de proportionnalité correspondant au rapport des sections efficaces des deux processus :

$$\frac{N_{fluo}}{N_{SERS}} = \frac{\sigma_{fluo}}{\sigma_{SERS}} . \quad (3.7)$$

Le facteur d'exaltation SERS peut être défini comme un facteur d'augmentation de la section efficace de diffusion Raman classique, tel que $\sigma_{SERS} = F_{SERS} * \sigma_{Raman}$. On obtient donc le facteur d'exaltation suivant

$$F_{SERS} = \frac{\sigma_{fluo}}{\sigma_{Raman}} * \frac{N_{SERS}}{N_{fluo}} . \quad (3.8)$$

3.3.2.2 Signal de fluorescence de la rhodamine 6G

Les expériences effectuées afin d'enregistrer le signal de fluorescence de cette même espèce ont été menées en solution plutôt que sur des molécules déposées sur une lamelle de verre, afin que le processus de photoblanchiment ne soit pas trop rapide.

Afin de pouvoir comparer le signal de fluorescence avec le signal SERS de molécules uniques, nous avons choisi une méthode qui, quoiqu'imparfaite, présente plusieurs avantages.

Premièrement j'ai conservé des conditions expérimentales identiques à celles de l'enregistrement des spectres SERS de molécules uniques, c'est-à-dire que pour enregistrer le spectre de fluorescence de la Rh6G j'ai conservé le même objectif, les mêmes puissance et intensité d'excitation, la même résolution spectrale. Cela nous permet de nous affranchir de facteurs de calibration qui sont toujours difficiles à déterminer avec précision.

Cette méthode nous évite aussi d'avoir à connaître très précisément le volume confocal de notre système, ce qui aurait été indispensable si nous avions choisi d'utiliser une concentration plus importante et d'enregistrer la fluorescence de cette solution. Dans ce cas, la détermination exacte du nombre de molécules participant au signal, uniquement en utilisant la concentration de la solution peut être également une source d'erreur importante.

La méthode choisie pour obtenir des informations sur la fluorescence telles que ce signal puisse être ensuite utilisé pour comparaison avec le signal SERS de molécules uniques, est la suivante. Quelques μl d'une solution très diluée de Rh6G ($10^{-9}M$ dans l'éthanol) afin d'éviter la présence d'agrégats de molécules, placés entre deux lamelles couvre-objet scellées constituent l'échantillon étudié. A cette concentration on attend donc dans le volume d'excitation de l'ordre de $1\mu\text{m}^3$ environ 0,6 molécule.

Les molécules se trouvant en solution, elles ont la possibilité de diffuser spatialement. Contrairement aux expériences menées sur des molécules adsorbées sur les agrégats d'argent, les molécules ont donc ici la possibilité d'entrer et sortir du volume confocal un nombre non négligeable de fois pendant les durées d'acquisition des spectres qui sont de l'ordre de la seconde : d'après les données recueillies dans la littérature, les valeurs du temps de diffusion τ_D et du coefficient de diffusion D de la Rh6G en solution aqueuse obtenues par corrélation du signal de fluorescence (FCS, avec des rayons focaux d'environ $0,25\mu\text{m}$) sont respectivement de $60\mu\text{s}$ et $2,8 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [136].

Afin de normaliser les signaux spectraux SERS et de fluorescence, il est nécessaire de connaître la probabilité de présence des molécules dans le volume sondé. Pour ce faire, il n'est pas possible d'utiliser le signal spectral qui fournit une faible résolution temporelle au regard de la dynamique de diffusion en solution. En diminuant la durée d'acquisition de plusieurs ordres de grandeur, il n'est en effet pas possible de détecter les molécules par leur spectre, essentiellement en raison de la dispersion du signal par le réseau du spectrographe, qui fait chuter le rapport signal sur bruit. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé la seconde voie du switch optique, et envoyé le signal vers le compteur de photons.

En conservant la position du laser fixe sur l'échantillon, on observe alors les molécules qui, en passant dans le volume confocal, émettent des bouffées de photons qui se traduisent par des pics dans le suivi dynamique du nombre de coups détectés. On enregistre donc une image, non pas spatiale, mais de la trace temporelle de l'intensité de la fluorescence émise par les molécules qui traversent le volume focal. La figure 3.17 présente une "image" obtenue de

3.3. Spectres SERS de molécules uniques



FIG. 3.17 – Détection au compteur de photons du passage des molécules de Rh6G en solution dans l'éthanol dans le volume sondé. La position du laser est fixée. L'"image" totale présentée comporte 128*128 pixels dont l'intensité correspond au nombre de coups détectés en 1ms. L'analyse de cette "image" permet d'évaluer le taux présence des molécules dans le volume sondé.

cette manière.

Chaque pixel correspond au signal collecté en 1ms et on enregistre des images de grande dimension, typiquement de 128*128 pixels, ce qui permet d'obtenir des statistiques bien résolues temporellement et représentatives d'une période relativement longue ($\simeq 16s$) correspondant à la durée d'acquisition des spectres (10s). En extrayant ligne après ligne les valeurs, on obtient des traces temporelles sur lesquelles sont visibles les passages des molécules.

C'est le seuillage du fond qui permet d'obtenir les statistiques nécessaires à la suite du calcul. Au dessus du seuil, on considère qu'une molécule est présente. La valeur de seuil a été délibérément prise relativement haute. De cette manière, le signal de fluorescence sera éventuellement surestimé (en sous-estimant le nombre de passages des molécules dans le volume focal) ce qui permettra dans la suite de déterminer *a priori* une valeur minimale du facteur d'exaltation des agrégats, plutôt que de le surestimer. D'autre part, il est très important au cours d'une telle expérience de conserver la même homogénéité de la solution pendant les différents enregistrements. Un éventuel séchage et donc une augmentation corollaire de la concentration, fausseraient les statistiques obtenues. Un spectre de fluorescence a donc été enregistré immédiatement après chaque image au compteur de photons.

Le premier spectre enregistré est présenté sur la figure 3.18, la durée d'acquisition est de 10s. Sur cette figure sont aussi portées les courbes d'ajustement ainsi qu'un spectre de référence obtenu dans la base PhotochemCAD.

Plusieurs sessions successives d'enregistrement *image au compteur de photons/enregistrement du spectre* ont été effectuées. Cela nous a permis de vérifier la stabilité de l'homogénéité de

la solution, et d'obtenir des données de fluorescence avec les mêmes délais que ceux des données SERS, qui nécessitent une localisation préalable des points chauds et ne sont donc pas obtenues instantanément après préparation de l'échantillon.

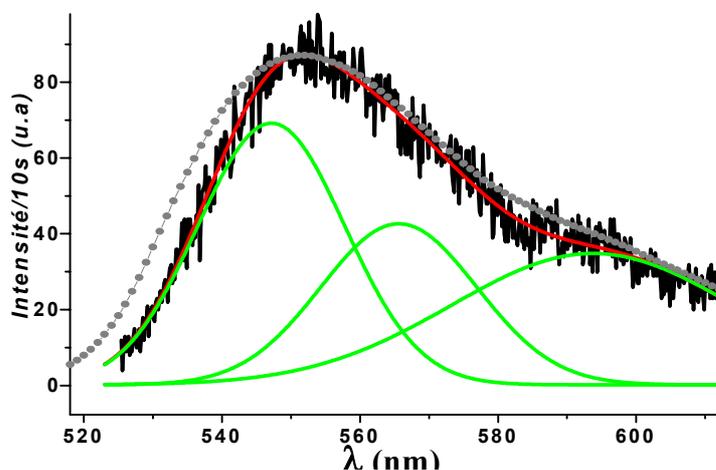


FIG. 3.18 – Spectre de fluorescence de la rhodamine 6G en solution $10^{-9}M$ dans l'éthanol. En noir : spectre expérimental, durée d'acquisition de 10s pour une puissance à l'entrée de l'objectif de $10\mu W$. Cercles gris : spectre de référence obtenus sur le site <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/>

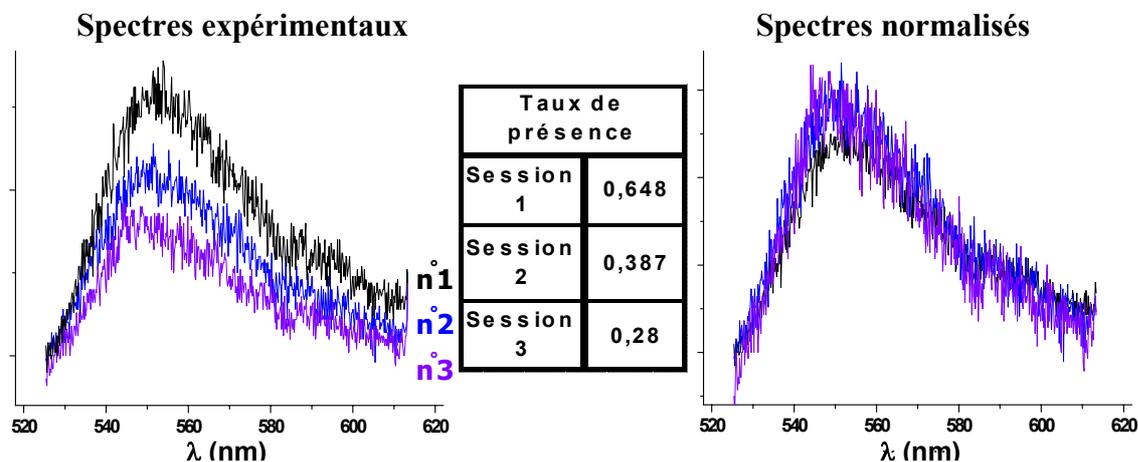


FIG. 3.19 – Spectre de Fluorescence de la rhodamine 6G en solution $10^{-9}M$ dans l'éthanol (durée d'acquisition de 10s pour une puissance à l'entrée de l'objectif de $10\mu W$)-validation de la représentativité du signal pour le calcul du facteur d'exaltation.

A gauche, évolution de l'intensité du signal au cours du temps : 3 spectres enregistrés avec un délai de quelques minutes pendant lesquelles sont collectées les données de taux de présence. A droite, les mêmes spectres dont l'intensité a été renormalisée pour tenir compte du photoblanchiment.

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

La répétition des sessions "de fluorescence" permet aussi de prendre en compte les éventuelles modifications d'intensité de fluorescence au cours du temps. Sur la figure 3.19, je présente les résultats associés à ce suivi.

A gauche se trouvent les spectres bruts obtenus au cours des sessions successives. Le signal de fluorescence semble donc s'affaiblir au cours du temps. Mais en réalité, en normalisant chacun des spectres par le taux de présence déduit des images au compteur de photon associées, on obtient une nouvelle série de spectres, présentée dans la partie droite de la figure 3.19. Il apparaît alors que ces spectres possèdent la même intensité, traduisant le fait que le niveau d'émission des molécules est resté stable. Les différences d'intensité observées entre les spectres de gauche traduisent simplement un photoblanchiment homogène des molécules au sein de la solution, et donc une baisse du taux de présence de molécules dans le volume sondé. Le nombre total de coups pour chacun des spectres normalisés est présenté dans le tableau 3.20.

3.3.2.3 Calcul du facteur d'exaltation

Les résultats obtenus en utilisant la formule 3.8 sont résumés dans le tableau 3.20.

Les calculs ont été effectués à partir des différents signaux de fluorescence des spectres successifs décrits au paragraphe précédent, par intégration du nombre total de coups détectés sur l'ensemble de la gamme spectrale détectée sur la CCD du spectromètre. On peut estimer que l'erreur liée au nombre de photons de fluorescence "perdus" en raison du domaine spectral exploré est d'environ 5%. Cette valeur est obtenue en estimant la partie tronquée de la troisième composante de l'ajustement présenté sur la figure 3.18.

Concernant l'intensité du signal SERS utilisée pour les calculs, deux différents modes d'intégration ont été utilisés, en normalisant par contre dans tous les cas sur la durée d'acquisition des spectres de fluorescence. Dans la première colonne se trouvent les valeurs du facteur d'exaltation calculées en ne considérant que l'intensité des bandes résolues sur le spectre 3.16, par intégration des 11 lorentziennes modélisées pour l'ajustement (en vert sur la figure 3.16). Malgré le caractère très restrictif de ce mode de calcul, dans lequel le signal SERS est sous-estimé, on obtient une valeur très importante du facteur d'exaltation, en moyenne de $1,87 \cdot 10^{14}$.

Cette estimation, d'un facteur d'exaltation géant supérieur à 10^{14} est en accord avec les exaltations trouvées dans la littérature. Néanmoins, les méthodes utilisées pour parvenir à ces valeurs sont rarement décrites dans les articles, et il semble que les calculs soient parfois effectués par comparaison de signaux de fluorescence et SERS de deux espèces chimiques différentes [115]. Dans la colonne de gauche, se trouve donc aussi pour note, le facteur d'exaltation calculé pour une intégration totale des coups du spectre SERS de la figure 3.16. Les valeurs obtenues sont évidemment plus importantes que celles de la première colonne, et on

	$N_{\text{coups}}(\text{Fluo})$		11 lorentziennes	spectre expérimental
Session1	33297	lfluo/lfers	0,51	0,19
		F_{SERS}	4,21E+14	1,16E+15
Session2	37159	lfluo/lfers	0,57	0,21
		F_{SERS}	3,78E+14	1,04E+15
Session3	33908	lfluo/lfers	0,52	0,19
		F_{SERS}	4,13E+14	1,14E+15

FIG. 3.20 – Facteur d'exaltation SERS calculé à partir des spectres de fluorescence et des spectres SERS de molécules uniques de Rh6G adsorbées sur les agrégats : nombre de coups de fluorescence et rapports des intensités et valeurs de F_{SERS} obtenus à partir de 3 spectres de fluorescence distincts, avec deux différentes méthodes d'obtention du nombre de coups du signal SERS (voir texte).

peut donc estimer que le facteur d'exaltation réel associé aux agrégats étudiés se situe entre les valeurs extrêmes obtenues.

3.3.3 Vers une compréhension de l'effet chimique : Mise en évidence de la présence d'argent non réduit

L'observation majeure de cette étude correspond à l'impossibilité d'enregistrer le spectre de l'EDTA sur les agrégats d'argent utilisés comme substrats.

Même en effectuant un rinçage et en ajoutant de manière contrôlée des molécules d'EDTA par incubation, on n'obtient toujours que le même type de spectres, qui forment des séries complexes au cours du temps.

Par contre, sur ce même système et en procédant suivant la même technique de préparation des échantillons, le signal SERS de molécules uniques de rhodamine 6G a pu être enregistré.

L'absence de spectre SERS de l'EDTA est ici totalement spécifique à cette espèce. On pourrait donc émettre l'hypothèse d'une sélectivité chimique de l'exaltation sur ces agrégats, sur lesquels l'EDTA verrait son signal ne pas être exalté. Mais les spectres observés et attribués à l'ion formate, l'ion carbonate et le TMEDA conduisent à rejeter cette hypothèse d'une sélectivité chimique.

En effet, ces trois espèces font partie des produits d'oxydation de l'EDTA comme on peut le vérifier dans la littérature [137].

Le TMEDA en particulier, est un produit relativement précoce de cette réaction chimique,

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

et il est intéressant de noter que son empreinte spectrale a été enregistrée très peu de temps après l'ajout de la solution d'EDTA sur les agrégats. Il est donc indubitable qu'après adsorption sur les agrégats, l'EDTA a subi une oxydation. Cela démontre de façon claire que les points chauds possèdent un caractère oxydant. Une des hypothèses les plus probables est que ce caractère est lié à la présence d'argent non réduit— par exemple sous la forme d'"adatoms" Ag^+ — au niveau de ces sites. Le processus de synthèse même rend cette hypothèse plausible, puisqu'il est très probable que des cations Ag^+ soient présents en surface au cours de la seconde phase de la synthèse, c'est-à-dire pendant la structuration des agrégats par réduction chimique.

Pour confirmer cette hypothèse, nous nous sommes aussi intéressés au signal SERS pouvant être obtenu sur des agrégats de type \mathcal{C} , c'est-à-dire des agrégats dont la croissance a été achevée. Dans ce cas, il ne reste "plus" d'ions Ag^+ , tous les cations ont été réduits. Il était donc intéressant d'observer les éventuelles différences de comportement entre l'activité d'exaltation de ces agrégats " totalement réduits", et celle des agrégats facettés en cours de structuration étudiés précédemment.

D'une manière générale, les agrégats "terminés" semblent moins actifs. On n'enregistre que très rarement des signaux Raman exaltés avec des raies fines, et au prix de temps d'acquisition plus longs. Le nombre de sites actifs est aussi plus faible. La différence la plus importante est observée en ajoutant la solution diluée d'EDTA : il est en effet alors possible d'enregistrer le spectre de cette espèce. Celui-ci est présenté sur la figure 3.21, avec en gras les positions en fréquence des différentes bandes expérimentales caractéristiques correspondant aux valeurs attendues regroupées dans le tableau 3.12. La durée d'acquisition de ce spectre est de 10 minutes ; en dessous de cette durée il est très difficile de distinguer des bandes résolues. Comparativement aux signaux SERS de molécules uniques obtenus sur les premiers agrégats avec des temps de pose de l'ordre de la seconde et en deçà, le signal de la figure 3.21 est très faible, et ce malgré le temps d'acquisition, plus de 100 fois supérieur. Néanmoins, la comparaison des positions des bandes expérimentales avec les valeurs trouvées dans la littérature permet d'identifier les différentes bandes vibrationnelles de l'EDTA et donc d'attribuer le spectre 3.21 à cette espèce.

Détecter la signature spectroscopique de l'EDTA sur les agrégats totalement réduits, même si ce signal est faible, alors qu'il était impossible d'obtenir ce signal sur les premiers agrégats utilisés comme substrat, est un argument supplémentaire en faveur de la présence des ions Ag^+ et du caractère oxydant des sites d'adsorption de l'EDTA sur les agrégats de l'étude précédente, sur lesquels des points chauds d'exaltation géante ont été repérés. Lorsque la synthèse et donc la réduction des ions Ag^+ est parachevée, les agrégats obtenus perdent ce caractère oxydant. L'EDTA ne subit plus de réaction redox et l'analyse spectrale SERS permet de la détecter ; par contre le facteur d'exaltation semble être moins important,

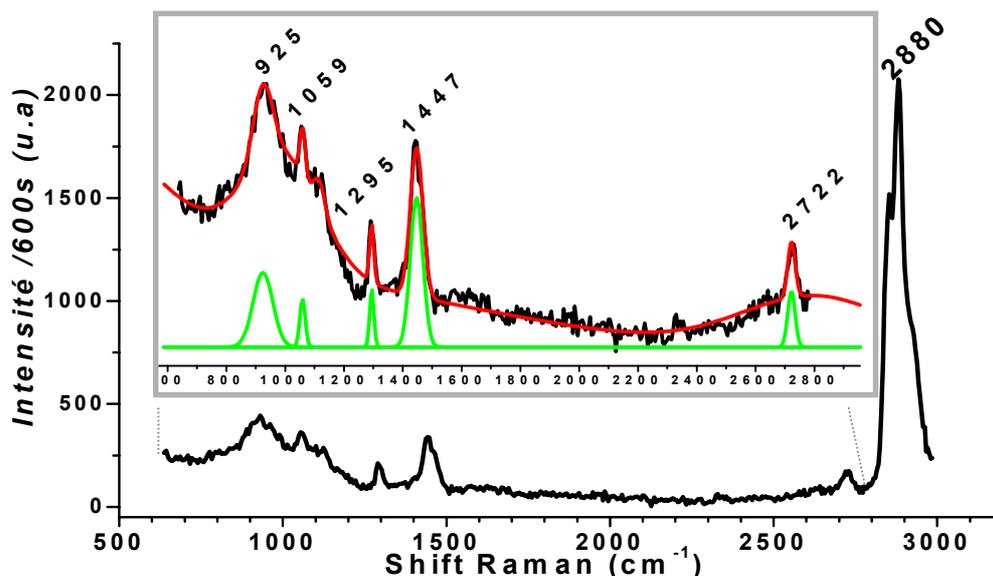


FIG. 3.21 – Spectre Raman/SERS enregistré en 600s ($P=100\mu\text{W}$) sur les agrégats dont la croissance a été prolongée et après incubation par une solution $10^{-8}M$ en EDTA. La signature vibrationnelle de cette espèce est détectée. Le signal étant peu intense, un zoom est présenté dans l'encart. La position des bandes caractéristiques déterminées par l'ajustement est compatible avec les valeurs de référence du tableau 3.12.

puisque les signaux SERS détectés sont beaucoup moins intenses.

Pour quantifier l'exaltation sur ces agrégats nous avons donc à nouveau utilisé la rhodamine 6G comme sonde. Après incubation des agrégats réduits par une solution de Rh6G de même concentration que celle précédemment utilisée, on enregistre des spectres dont l'allure typique est présentée sur la figure 3.22c. Sur ce spectre, enregistré en 10s, on détecte bien les bandes vibrationnelles de la rhodamine6G. Mais malgré un temps d'acquisition 10 fois plus grand que celui nécessaire à l'enregistrement du spectre 3.16 observé sur les agrégats en cours de structuration, on obtient un signal plus faible, et les bandes sont moins résolues. Pour atteindre un rapport signal sur bruit analogue, avec des intensités des raies vibrationnelles caractéristiques comparables, il est nécessaire d'accumuler plusieurs spectres. Cependant, le mode molécule unique est bien conservé comme le montre l'encart **c** de la figure 3.22 sur lequel sont présentés des spectres successifs enregistrés en 10s sur un même point chaud. Le signal n'est pas constant, et en particulier il existe une forte dynamique qui se traduit par des variations notables de l'intensité relative des bandes qui fluctuent de manière dégroupée.

En comparant le signal de fluorescence avec le signal Raman exalté, on obtient une estimation du facteur d'exaltation de ces agrégats. Le spectre expérimental utilisé pour ce calcul est présenté sur la figure 3.23.

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

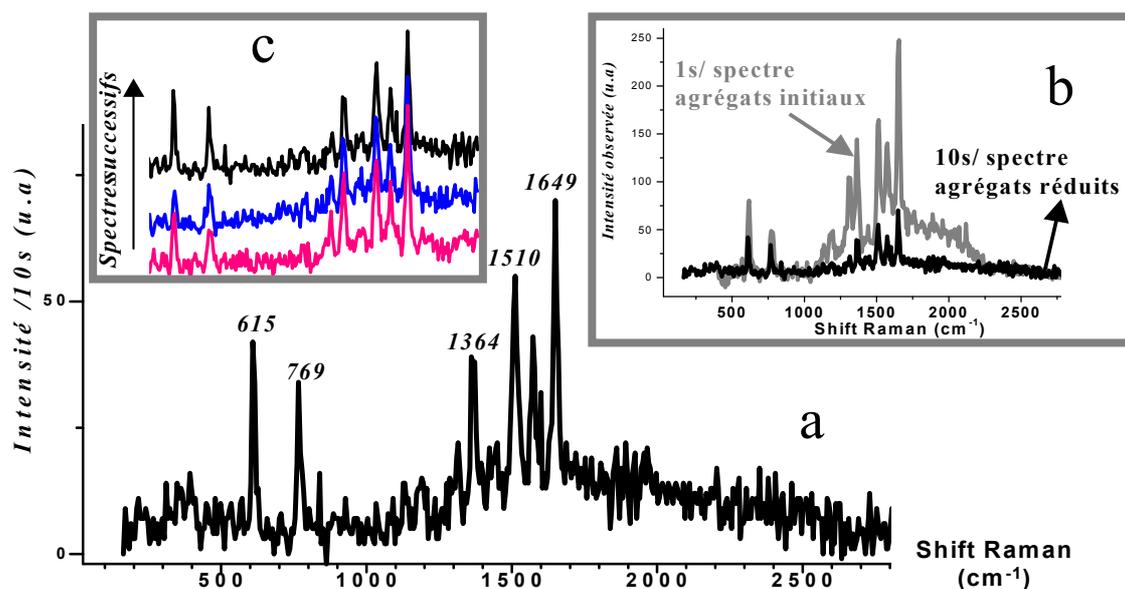


FIG. 3.22 – Spectres SERS de la rhodamine 6G –a.et c. spectres enregistrés en 10s (puissance à l’entrée de l’objectif de $100\mu W$) sur les agrégats dont la croissance a été prolongée et après incubation par une solution $10^{-9}M$ de cette espèce.– c. dynamique des spectres successifs.– b. Comparaison avec le spectre de la Rh6G obtenu dans les mêmes conditions mais en 1s sur les agrégats initiaux.

Sur ce spectre enregistré en 5s immédiatement après dépôt de la solution de colorant, il apparaît aussi un signal de fluorescence qui peut être attribué à des molécules de Rh6G présentes dans le volume sondé mais en solution. Ce spectre, qui contient à la fois un signal SERS de molécule unique et un signal de fluorescence, est très similaire à ceux observé par *Meixner et al.* pour la même molécule et également en mode molécule unique [120]. Très rapidement, avec l’évaporation du solvant, le photoblanchiment et l’annihilation liée aux mécanismes en jeu dans l’effet SERS, la fluorescence disparaît et on obtient des spectres tel que celui de la figure 3.22. En normalisant le signal de fluorescence du spectre 3.23 par le taux de présence maximum déterminé au sein de la solution Rh6G/EtOH, et en utilisant la formule 3.8 on obtient une estimation du facteur d’exaltation F'_{SERS} associé aux agrégats totalement réduits de l’ordre de 2.10^{12} .

Ces observations montrent de manière directe pour la première fois qu’une diminution importante du nombre d’ions Ag^+ de surface, liée à une réduction plus poussée des ions au cours de la synthèse des agrégats, conduit à une diminution très nette, non seulement du nombre d’agrégats permettant d’enregistrer le signal spectroscopique de molécules individuelles, mais aussi du facteur d’exaltation lié à ces agrégats. La perte d’efficacité observée par rapport aux agrégats sur lesquels sont présents des ions Ag^+ est estimée ainsi être de 2

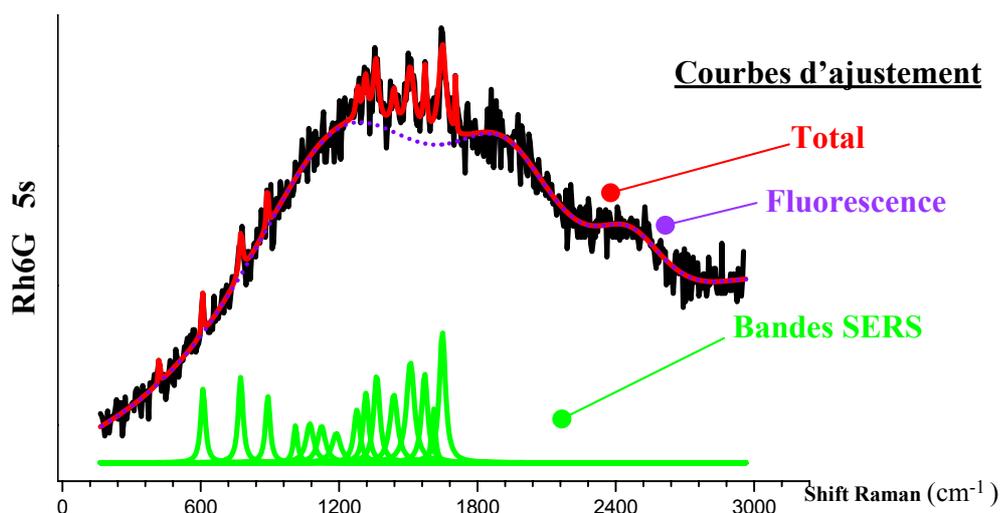


FIG. 3.23 – Spectre de la rhodamine 6G enregistré en 5s sur les agrégats dont la croissance a été prolongée et après incubation par une solution $10^{-9}M$ de cette espèce. Sur le spectre expérimental et la courbe d'ajustement globale on distingue le signal SERS (ajustement en vert) de molécule(s) adsorbée(s), du signal de fluorescence (pointillés violet) de molécules de Rh6G dissoutes.

ordres de grandeur. La diminution du facteur d'exaltation est donc proche des valeurs 10^2 à 10^3 classiquement attendues pour l'effet chimique. Cet effet chimique très efficace sur les premiers agrégats étudiés perdrait donc en efficacité en l'absence d'ions Ag^+ et les points chauds deviendraient "tièdes".

Ainsi, la présence de cations métalliques de surface et le caractère oxydant des sites d'adsorption des molécules, démontrés au cours de ces études, pourraient bien être des caractéristiques incontournables de l'effet d'exaltation de surface du signal de diffusion Raman, dont la portée est en conséquence à prendre en compte au cours de l'interprétation des spectres SERS. A la lumière de nos résultats, certains faits expérimentaux décrits dans la littérature pourraient ainsi être reconsidérés. On peut par exemple prendre le cas de l'ion citrate, réducteur connu de l'argent. Le signal macroscopique SERS de cet ion a pu être enregistré sur l'électrode d'argent utilisée par *Siiman* [138]. Par contre, plus récemment *Michaels et al.* ont noté l'absence de la signature spectroscopique SERS de cet ion sur les spectres Raman de molécules uniques enregistrés au sein d'une solution très riche en ions citrate [115]. Ils mettent donc en avant l'hypothèse d'une sélectivité chimique de l'exaltation, défavorable aux ions citrate. Mais pour expliquer les résultats contradictoires des deux études, on peut aussi proposer l'alternative suivante : les colloïdes utilisés comme substrat dans l'étude de *Michaels* contenaient des ions Ag^+ oxydants, contrairement à la surface de l'électrode de *Siiman*, dans la gamme de potentiels utilisés. En présence d'ions Ag^+ le citrate est oxydé, et il n'est plus possible d'observer son empreinte spectrale.

3.3. Spectres SERS de molécules uniques

La raison de la modification du facteur d'exaltation en liaison avec la présence d'ions Ag^+ n'est pas élucidée. On peut cependant formuler certaines hypothèses.

Premièrement, la présence d' Ag^+ peut favoriser l'adsorption des molécules sur le substrat, que ce soit par augmentation des forces mises en jeu dans une physisorption ou en favorisant un équilibre de complexation. D'une manière générale, plus une molécule a d'affinité pour le substrat c'est-à-dire pour s'adsorber sur les agrégats, plus l'effet d'exaltation électromagnétique sera efficace puisque nous avons vu que les deux phénomènes responsables de cette exaltation conduisent à une exaltation des champs dans un espace très restreint, l'effet diminuant très rapidement quand on s'éloigne de la surface, avec une portée maximale d'une centaine de nanomètres pour l'effet lié aux plasmons. De plus, si la molécule est bien adsorbée sur la surface, le temps de présence sur le site d'accrochage et donc éventuellement sur le point chaud sera allongé, augmentant en conséquence à la fois la probabilité de détecter la molécule et l'intensité du signal SERS.

Deuxièmement, la présence d'ions Ag^+ peut favoriser l'effet proposé d'une résonance de l'excitation. Cela peut être le cas si, par exemple la formation d'un complexe entre le métal et l'entité moléculaire au sein duquel il existe un état de transfert de charge, ou bien l'existence même du transfert de charge, sont rendues plus probables.

Mais peut-on trouver des arguments abondant dans le sens de l'une ou de ces deux hypothèses ?

On peut par exemple considérer en particulier le caractère oxydant des points chauds. Sur les agrégats examinés dans cette étude, le caractère oxydant est intrinsèque au système. Il se distingue donc des systèmes de piles électrochimiques induites qui interviennent dans les expériences dans lesquelles est utilisée comme substrat une électrode sur laquelle est appliqué un potentiel contrôlé. Néanmoins, on peut considérer dans les deux cas la présence d' Ag^+ et d' Ag^0 qui forment un couple de potentiel normal $E_{\text{Ag}/\text{Ag}^+} = 800\text{mV}$. On peut supposer que la valeur du potentiel, et donc l'équilibre entre les deux formes redox, joue un rôle dans les effets mis en jeu dans le processus d'exaltation de surface, par exemple en favorisant les interactions électroniques entre les molécules adsorbées et la surface (Ag^+ /ion ou doublet libre présent sur la molécule). Cette proposition peut alors être exploitée pour comprendre les modifications de l'exaltation, observées en présence de différents ions (ex : Nie [93]). Les équilibres de complexation ou de formation de sels entre Ag^+ et les anions halogénures par exemple, modifient le potentiel du couple Ag^+/Ag^0 , et on doit prendre en compte non plus le potentiel normal du couple mais un potentiel normal apparent, fonction de la concentration en ions au sein de la solution. La présence d'ions ainsi que leur nature va donc modifier la composition chimique de surface et donc les interactions avec les molécules d'intérêt dont on veut détecter le signal SERS.

3.4 Caractérisation des agrégats actifs en microscopie électronique

Comme nous l'avons vu, deux effets distincts sont proposés pour expliquer l'exaltation de surface du signal de diffusion Raman : l'effet électromagnétique et l'effet chimique. Il est couramment admis que la morphologie du substrat exaltant est de première importance pour l'effet électromagnétique. Cette remarque est valable aussi bien pour l'effet géométrique ou effet de pointe, que pour l'effet des plasmons de surface.

Dans la section précédente nous avons pu caractériser les agrégats d'intérêt grâce à l'enregistrement des spectres SERS de molécules adsorbées. Nous avons ainsi détecté une bonne activité des agrégats et la présence de points chauds sur lesquels le signal de diffusion inélastique profite d'un facteur d'exaltation géant, estimé à plus de 14 ordres de grandeur. Nous avons aussi démontré la présence d'ions Ag^+ sur les sites d'adsorption de surface. Nous avons remarqué d'autre part que le nombre de points chauds est faible, et que tous les agrégats ne présentent pas d'activité SERS, en tout cas pas avec le facteur d'exaltation géant calculé.

La caractérisation des agrégats de manière indirecte à travers l'enregistrement et l'analyse des spectres s'est donc avérée très fructueuse. Mais la raison du choix initial de ces agrégats comme substrats exaltants était leur morphologie particulière, dite "à facettes".

La présence d'arêtes est en effet *a priori* une situation favorable à l'obtention d'un effet électromagnétique d'exaltation important, tant pour le processus géométrique, que pour l'effet plasmons, dont on espère une localisation marquée.

La question qui s'est posée est de savoir s'il était possible de trier les agrégats en fonction de leur morphologie. Les agrégats actifs à très fort facteur d'exaltation seraient facettés, alors que les agrégats de morphologie différente (absence d'arêtes, agrégats en phase de structuration précoce ou aussi morphologie induite par une première phase de synthèse plus longue) auraient un facteur d'exaltation moindre, tel qu'aucune activité SERS ne peut être détectée en mode molécule unique.

Dans le but de répondre à cette question, nous avons donc effectué une étude de la morphologie des agrégats qui, en particulier, exaltent le signal Raman avec un facteur géant et permettent la détection de molécules uniques.

Dans la population d'agrégats dispersés sur l'échantillon, beaucoup sont inactifs selon les critères retenus dans cette étude : ils ne présentent pas un facteur d'exaltation suffisant pour observer avec un rapport signal sur bruit important le signal de diffusion Raman de molécule unique quand l'excitation laser est réduite à quelques microWatts. Outre qu'aux faibles concentrations moléculaires utilisées, certains agrégats peuvent ne pas avoir de molécules adsorbées sur leur surface, d'autres peuvent avoir été déjà complètement réduits au

3.4. Caractérisation des agrégats actifs en microscopie électronique

stade auquel est arrêté le façonnage. On ne pourra donc pas déduire une relation directe entre la morphologie d'un agrégat "inactif" et son facteur d'exaltation "réduit". La seule étude pertinente est celle qui consiste à croiser l'information d'activité géante, obtenue par spectroscopie Raman de molécule unique et la morphologie de l'agrégat correspondant.

L'étude proposée dans la suite de ce chapitre est donc une analyse multiparamètre d'un même nanoobjet. L'idée d'une "double caractérisation" des substrats SERS est de plus un enjeu définitif pour la communauté intéressée, comme le montre cette citation de Mikael Käll en conclusion d'un article de 2000 [95] : *"High resolution imaging of "hot" single particles could resolve this issue (lien entre l'existence des points chauds et celle d'une forte rugosité de surface ou de crevasses,...), and serve as critical test of electromagnetic SERS theory."*

Le microscope confocal optique ne fournit pas la résolution suffisante pour détecter les détails morphologiques des particules d'argent. Dans ce but nous avons utilisé un microscope électronique à balayage (MEB et MET).

3.4.1 Procédure

Cette étude croisée des agrégats se décompose en deux étapes. Nous avons tout d'abord localisé les particules actives en SERS, de la même manière qu'au cours des études présentées dans la section précédente. Le même échantillon est ensuite déplacé vers le microscope électronique.

Pour contourner la difficulté du repérage du même objet sur deux bâtis différents nous avons élaboré des échantillons légèrement différents de ceux utilisés précédemment.

Plutôt que sur une lamelle couvre-objet, nous avons déposé les agrégats à partir de la solution initiale sur une grille de microscopie électronique recouverte de peau de carbone. Cette peau de carbone est très fine et présente de nombreux trous qui sont autant de repères de la position des agrégats sur l'échantillon. Leur irrégularité de taille et de disposition lève toute ambiguïté de repérage si on sait les détecter optiquement, la microscopie confocale étant la méthode de cette double caractérisation la moins résolvente spatialement. Elle présente l'avantage d'être "transparente" au faisceau d'électrons, et il est donc également possible d'effectuer des images en transmission.

Cette grille possède de plus des marques qui permettent de repérer les différentes zones étudiées et donc de les retrouver au cours des différentes étapes.

La seconde différence avec les études précédentes est l'objectif utilisé. Les agrégats se trouvant sur une peau de carbone, il n'est plus possible d'utiliser un objectif à immersion dont l'huile viendrait polluer les agrégats. Nous avons donc utilisé un objectif à sec de grandissement $\times 100$ et d'ouverture numérique 0,85.

L'échantillon étudié est donc très similaire aux échantillons de type \mathfrak{A} . A nouveau, on observe que tous les agrégats ne sont pas actifs. Par contre, il existe des points

chauds sur lesquels on retrouve en une seconde d'acquisition et pour des puissances à l'entrée de l'objectif similaires ($30-45\mu W$) des spectres intenses, avec des bandes bien résolues. En enregistrant des spectres successifs sur ces points on obtient de même des séries très proches de celles présentées sur les figures 3.9 à 3.11.

Cette observation expérimentale est illustrée sur la figure 3.24 qui présente une série enregistrée sur un point chaud indiqué sur l'image au compteur de photons attenante.

Après avoir repéré les agrégats actifs et avoir enregistré de telles séries de spectres sur chacun d'eux, vient la seconde étape d'imagerie électronique.

L'ensemble des étapes est présenté sur les figures 3.24 et 3.25, qui correspondent à deux zones différentes de la grille.

Sur la seconde figure, un certain nombre de structures actives ont pu être caractérisées. Les différents points chauds sur lesquels les spectres de molécules uniques ont été enregistrés sont indiquées par des formes géométriques de couleurs différentes sur les images confocales ainsi que sur l'image MEB d'ensemble.

On voit que la forme et la répartition des trous dans la peau de carbone sont effectivement très utiles pour identifier les agrégats étudiés préalablement en spectroscopie Raman. En rapprochant les images de diffusion totale et inélastique enregistrées au compteur de photons des images de microscopie électronique, on remarque que le microscope confocal fournit déjà avec une bonne résolution une cartographie détaillée de l'échantillon, puisqu'il nous permet de distinguer les trous de la peau de carbone de dimensions de l'ordre de quelques centaines de nanomètres (voir la zone du carré bleu).

Les agrégats actifs observés présentent des morphologies relativement distinctes.

On peut remarquer en particulier la différence entre les structures de l'agrégat "rose" et du "jaune". Le premier est constitué d'un nombre important de particules et ressemble fort à celui présenté sur la figure 3.24, mais sa taille globale ne dépasse pas $300nm$, tandis que le deuxième atteint cette même taille en n'étant constitué que de quelques particules, dont une de diamètre important, $\sim 100nm$.

Ces structures semblent être constituées de plusieurs objets qui seraient restés associés même après la sonication de la solution initiale d'agrégats, qui sépare pourtant de nombreux objets dissociables : en absence de sonication, on obtient en effet des amas beaucoup plus gros et visiblement constitués d'un nombre important de structures, que l'on devine entourées de solvant (images non présentées ici). Les images en transmission de l'agrégat "rose" montrent qu'il existe différentes épaisseurs d'argent au sein de la structure, ce qui doit induire des zones de très forte courbure sur la surface.

3.4. Caractérisation des agrégats actifs en microscopie électronique

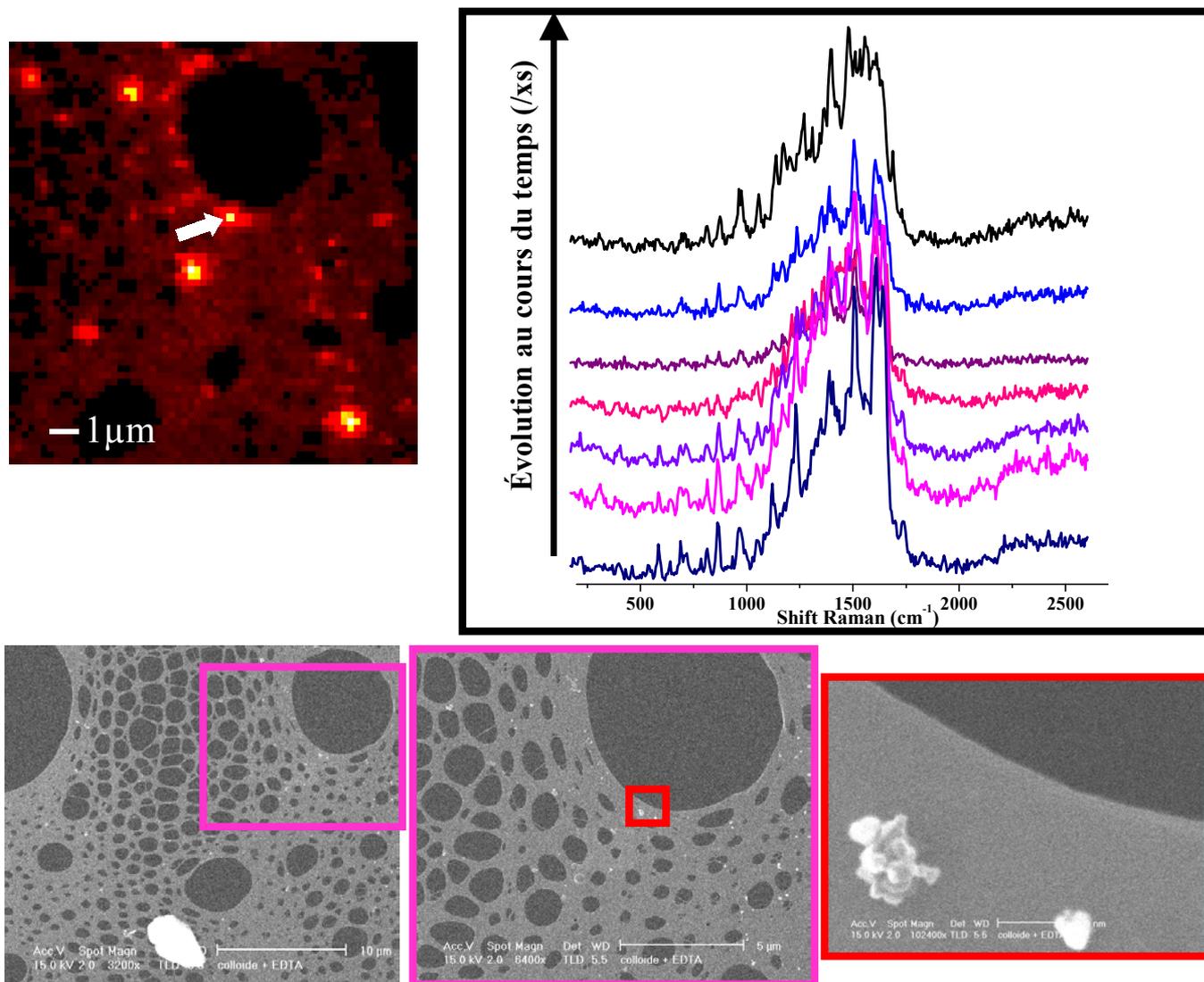


FIG. 3.24 – Etapes de la localisation des agrégats actifs en SERS. De haut en bas et de gauche à droite : Image de diffusion inélastique enregistrée au compteur de photons ($1\text{ms}/\text{px}$)–Série de spectres ($t_{acq}=3\text{s}$) obtenus successivement sur le point chaud indiqué par la flèche blanche sur l'image de gauche– images MEB des zooms successifs, indiqués par un code couleur.

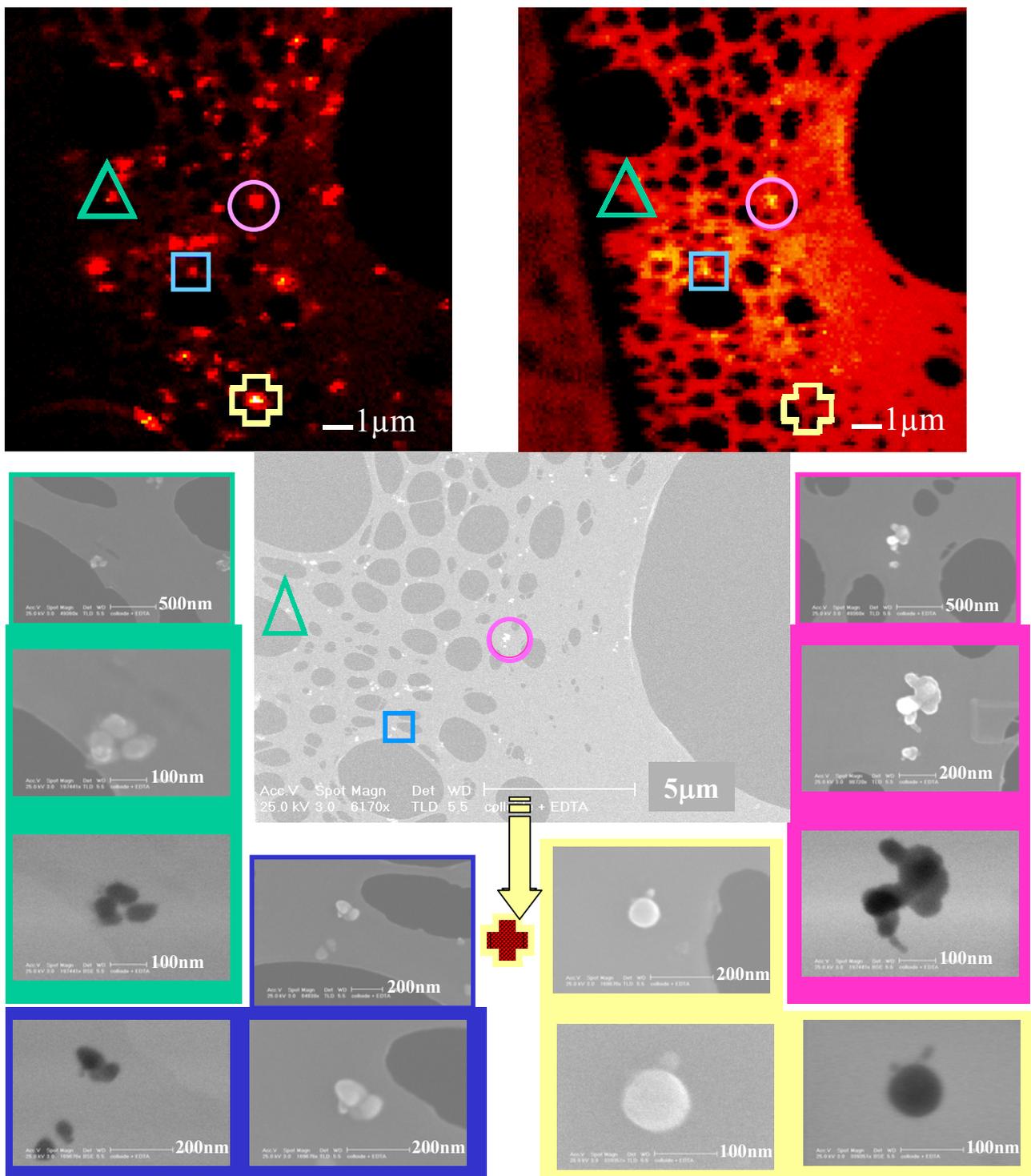


FIG. 3.25 – Etapes de la localisation des agrégats actifs en SERS. En haut : images au compteur de photons (1ms/px) diffusion inélastique (gauche) et diffusion totale (droite). Les différents points chauds sont repérés par des formes géométriques de différentes couleurs. Ce code couleur est conservé pour l'imagerie MEB/MET. Les images MEB et MET se distinguent par le contraste : en MET les structures apparaissent foncées (réflexion du faisceau) sur fond blanc.

3.4. Caractérisation des agrégats actifs en microscopie électronique

L'agrégat "vert" présente un autre type d'association des particules, "en ronde", qui laisse libre une zone centrale d'environ $30nm$ de diamètre.

Enfin, il existe des agrégats actifs avec des structures plus simples et contenant un nombre moins important de particules (agrégats "jaune" et "bleu"). On ne distingue pour l'agrégat "bleu" que trois de ces particules (image MET), dont deux de taille très faible, de diamètre $\simeq 30nm$. On peut ici penser que l'obtention d'une telle structure est liée à la coalescence de particules constituées d'un très faible nombre d'atomes d'argent – des germes d'agrégat – avec une particule plus avancée à un stade très précoce de la croissance des agrégats.

Le développement s'est ensuite poursuivi pour donner la morphologie effectivement observée. Sur l'agrégat "jaune" la plus petite particule est de taille similaire à celle des "protubérances" de l'agrégat "bleu", avec un diamètre $\simeq 40nm$.

3.4.2 Résultats et discussion

Contrairement à ce qui était attendu initialement, c'est-à-dire qu'une morphologie facet-tée soit nécessaire pour avoir une exaltation géante et que les agrégats soient "actifs" en SERS de molécule unique, la structure des agrégats doublement caractérisés ici ne présente en fait aucune facette.

Par contre, malgré une impression d'hétérogénéité des structures, tous les agrégats actifs présentent des morphologies de caractéristiques semblables.

On observe une structure principale, composée de particule(s) "sphéroïde(s)" d'un diamètre de l'ordre de la centaine de nanomètres. Sur cette structure sont greffées des protubérances, ou excroissances, relativement sphériques mais plus petites, avec des diamètres de quelques dizaines de nanomètres. La structure globale est donc constituée de plusieurs particules, ce qui donne une taille globale de 100 à 200 nanomètres. Les agrégats plus petits, et qui ne sont composés que d'une ou deux particules sphériques ne semblent pas présenter de points chauds avec une exaltation géante. Ce résultat peut être rapproché à nouveau des observations de *Michaels et al.* [115], qui ont remarqué au sein de leur échantillon l'activité préférentielle des agrégats de taille importante.

Dans notre cas, on peut proposer deux raisons possibles de la singularité de l'exaltation sur de tels agrégats, constitués de plusieurs particules.

Premièrement, l'activité préférentielle de tels agrégats pourrait être liée à la présence de cations métalliques. Les interstices ou interfaces entre les particules principales et les protubérances plus petites peuvent être supposés comme correspondant aux surfaces de croissance des agrégats. C'est donc dans de tels sites que peut être attendue la présence des ions Ag^+ en cours de réduction pour former de l'argent métallique.

La deuxième proposition concerne plus particulièrement l'effet électromagnétique. Comme nous l'avons vu, de nombreux articles proposent une augmentation du facteur d'exaltation

liée non seulement à un effet géométrique, pour lequel la protubérance peut être considéré comme un défaut de surface, mais surtout à un couplage des résonances plasmons, qui induit une exaltation des champs électromagnétiques très intense et localisée sur les sites de "mouillage" des excroissances sur la particule principale. La localisation proposée des points chauds dans les interstices des structures fractal utilisées plus classiquement [110] semble donc se confirmer dans notre cas.

Concernant la taille particulièrement importante qui semble favoriser l'activité SERS des agrégats, deux hypothèses restent probables : une simple augmentation statistique de la probabilité de présence de points chauds avec le nombre de particules ou un effet d'exaltation lié à une résonance plasmons (effet de taille et géométrie). Cependant, aucun facteur singulier n'a été observé sur les agrégats ; tous les agrégats actifs observés présentent des spectres SERS de molécules uniques avec des intensités similaires et la même forte dynamique.

Il est intéressant de noter que les agrégats de type \mathcal{C} dont la croissance a été conduite plus avant, et dont on a pu noter la "faible" exaltation en regard de celle observée sur les premiers agrégats, présentent en fait statistiquement la même distribution de morphologie que ces derniers. Cependant, on observe aussi des agrégats facettés – peu nombreux – mais, comme nous n'avons pas effectué de caractérisation croisée SERS/MEB sur ces échantillons, il est impossible de conclure quant à la morphologie des agrégats de type \mathcal{C} qui ont conduits à l'observation des spectres SERS de la Rh6G (figure 3.22).

On peut évidemment remarquer que, malgré la haute résolution de l'imagerie par microscopie électronique, on ne peut écarter ici totalement une modification de la géométrie des sites, à une échelle encore plus petite, qui modifierait l'exaltation liée à l'effet électromagnétique.

Cependant, il apparaît plus probable que la différence d'exaltation observée entre les différents types d'agrégats soit liée à la présence ou l'absence d'argent non réduit. La validité de cette hypothèse apparaît notamment en comparant les valeurs théoriques de l'exaltation électromagnétique calculées dans la littérature pour des sphères quasi-jointives.

Dans l'article de *Xu et al.* on trouve ainsi, pour une longueur d'onde d'excitation de ~ 500 à $550nm$, une valeur de $10^{11} - 10^{11,5}$ pour deux sphères d'argent de $50nm$ de rayon, séparées d'une distance de un nanomètre [95].

L'accord avec les valeurs du facteur d'exaltation trouvées pour les agrégats dont l'irradiation a été prolongée est bon, et la description de la morphologie utilisée peut être rapprochée de celle de nos agrégats réels. C'est en particulier le cas pour l'agrégat "jaune" présenté sur la figure 3.25. Si on n'analyse que les images MEB, on peut considérer que sa masse majoritaire est constituée de deux particules quasi-jointives, la plus importante d'un diamètre de $\simeq 100nm$, et la seconde, plus petite, d'un diamètre de $\simeq 40nm$ ⁹. On peut donc

⁹Dans ce même article, il est proposé qu'une telle différence de diamètre entre les deux particules amène

3.4. Caractérisation des agrégats actifs en microscopie électronique

proposer que pour ces agrégats, leur seule morphologie conduise à obtenir un effet d'exaltation électromagnétique dont le facteur est égal à celui observé sur les agrégats "réduits", c'est-à-dire une valeur de l'ordre de 10^{12} . La présence d' Ag^+ , déterminée sur les agrégats à l'exaltation géante, ajoutant un facteur supérieur à deux ordres de grandeurs, conduit alors en complément de l'effet de la morphologie des agrégats, au facteur d'exaltation supérieur à 10^{14} observé.

Des modifications des interactions entre les molécules adsorbées et la surface des particules sont obligatoirement induites par la présence de ces cations métalliques. Des expériences sont actuellement en cours pour tenter d'élucider cette question.

En particulier, on attend une modification des résonances de plasmons de surface. Il est donc intéressant de rechercher sur ces agrégats l'existence éventuelle de plasmons de surface dont la fréquence d'excitation est en résonance avec l'excitation laser utilisée au cours de nos études.

Une cartographie des plasmons sur les agrégats par spectroscopie électronique de perte d'énergie— electron energy loss spectroscopy EELS— est actuellement en cours en collaboration avec l'équipe de *C. Colliex* du Laboratoire de Physique des Solides d'Orsay.

La dimension très restreinte du faisceau d'électrons en fait une sonde nanométrique grâce à laquelle il est possible de caractériser très localement l'efficacité du couplage entre les électrons et les plasmons de surface des agrégats.

L'objectif d'une telle étude est donc d'obtenir les caractéristiques des plasmons, en mesurant l'énergie— ou les énergies— qui caractérise l'interaction maximum des plasmons de surface avec les électrons et en s'intéressant aussi à l'intensité du plasmon excité. On peut ainsi espérer pouvoir localiser précisément les points chauds, et savoir si ces sites exceptionnels se situent par exemple au niveau de jonctions ou d'interstices ou plutôt à l'aplomb des protubérances. Existe-t-il des plasmons en résonance avec le laser utilisé pour les études SERS? C'est-à-dire, existe-t-il des agrégats qui présentent des pics de perte d'énergie près de $2,41\text{eV}$ ($514,5\text{nm}$)? Les quelques résultats préliminaires semblent ne pas attribuer de rôle prépondérant aux interstices, mais cette interprétation peut facilement être remise en cause puisque l'absence de résonances plasmons au niveau des interstices peut aussi être liée à l'orientation des particules par rapport au faisceau d'électrons.

La complexité de la morphologie des agrégats, ainsi que sa très large distribution rendent l'interprétation des résultats très sensible. La très faible énergie à laquelle est attendue la signature de plasmons spécifiques pour expliquer l'activité SERS des agrégats, proche du pic élastique des spectres EELS, participe aussi à rendre cette étude difficile.

une légère augmentation du facteur d'exaltation électromagnétique.

Conclusion

L'objet de ce travail de thèse était d'exploiter au mieux le signal spectroscopique de nano-objets individuels que sont les molécules, pour en extraire des informations fondamentales sur leur dynamique interne parfois difficilement accessibles par d'autres approches, mais aussi en exploitant leur caractère de sondes locales nanométriques de leur environnement ou de phénomènes locaux comme l'exaltation de surface. Ce travail m'a également conduit à étudier un second type de nano-objets, des agrégats d'argent de morphologie complexe.

Fluorescence de molécules individuelles- Analyse multiparamètre et étude de matériau hétérogène

La mise en place de la microscopie grand champ avec une détection multicanal qui fournit une quantité très importante de données, a demandé la mise au point d'un protocole informatique d'extraction semi-automatique à présent opérationnel.

On peut classer les résultats obtenus dans l'analyse des films grand champ traités par ce biais, ainsi que par l'analyse des spectres de fluorescence des molécules, suivant que les informations obtenues concernent les propriétés d'émission du pérylène orange, ou la matrice solgel.

L'analyse d'un grand nombre de molécules, conduite par illumination continue jusqu'à arrêt de leur émission, dans différentes conditions, a mis en évidence l'existence de deux mécanismes de photoblanchiment, à un et à deux photons qui ont lieu respectivement à partir des premiers niveaux excités et de niveaux excités supérieurs. Un point remarquable est que les deux mécanismes interviennent ensemble, même à faible puissance pour le mécanisme à deux photons, et sont aussi tous deux assistés par des espèces présentes dans l'air.

Il existe une très grande diversité dans les spectres présentés par le pérylène orange dans le film solgel. En particulier, on a noté une large dispersion en énergie des maxima, que nous expliquons par la présence d'environnements chimiquement différents, avec des groupements -ol ou méthyl en surface du site. Les spectres présentent aussi des structures différentes, dites mono ou double bande. En particulier en raison de la géométrie du pérylène orange, nous avons proposé comme explication l'existence d'une reconformation de l'état excité, qui serait l'évolution "naturelle" de cette molécule après excitation électronique. La structure des spectres double bande intermédiaires ou mono bande traduit alors la géométrie du site dans

CONCLUSION

lequel se trouve la molécule, et le fait que sa reconformation y est plus ou moins favorisée. Le dernier phénomène très particulier que nous avons observé en irradiant le pérylène orange sous vide est celui d'une nucléation, ou agrégation. Elle conduit à l'apparition d'objets dont l'émission est spectralement beaucoup plus large que les molécules individuelles et dont l'intensité croît de manière continue, excepté dans le cas d'une remise à l'air sous laquelle ils disparaissent rapidement. Une proposition raisonnable est que ces objets correspondent à un empilement des molécules dans leur état excité, dont la reconformation abaisse la solubilité en augmentant leur densité d'empilement.

La molécule sonde des propriétés du matériau.

Les études spectroscopiques de fluorescence de molécule unique de films minces solgel, utilisant le pérylène orange comme sonde, nous ont fourni de nombreuses informations sur les propriétés des environnements locaux, de dimension nanométrique, que l'on retrouve dans ces films. Ainsi, il apparaît que la matrice solgel est très hétérogène, comme l'ont clairement montré plusieurs observations.

Nous avons ainsi mis en évidence de manière directe et indirecte que certaines molécules avaient la possibilité de diffuser spatialement et sur de longues distances dans la matrice solgel, ce qui traduit une hétérogénéité notable dans la réticulation des films.

Les films présentent aussi une porosité importante qui apparaît dans les comportements différents vis à vis de la photostabilité des molécules sous air et sous vide, mais aussi dans la possibilité de contrôler et déclencher la diffusion moléculaire par introduction de solvant. Cette porosité rend les films perméables, non seulement à l'oxygène mais aussi à des molécules de taille plus importante comme le THF. Ainsi, l'introduction de différentes espèces est possible— comme nous avons pu le voir avec le THF qui est capable de déclencher la diffusion des molécules ou avec l'oxygène qui accélère le photoblanchiment— et réversible puisque le THF a possibilité peut s'évaporer a posteriori. En conséquence, nous avons proposé l'existence en surface des films de pores de taille relativement importante qui communiquent avec l'intérieur du film.

La forte dispersion des caractéristiques de l'émission du pérylène orange, temporellement et spectralement valide aussi cette hétérogénéité de la matrice, et l'existence de sites de géométrie, de taille et encore de compositions de surface différentes.

Les films minces d'ormosils présentent donc une structure complexe et poreuse. Nous avons ainsi pu distinguer que dans un tel milieu il existe une très grande variété de nanoenvironnements ressentis par la molécule.

Néanmoins, les molécules de pérylène orange insérées dans le matériau voient leur stabilité être augmentée par rapport aux molécules en solution, comme en témoignent la large fraction de molécules qui émettent durant plusieurs dizaines de minutes. Si cette porosité peut-être gênante dans le cas d'une application type laser solide qui demande une stabilité encore

largement supérieure, ou pour tout autre emploi nécessitant non seulement des durées de vie très longues mais aussi une stabilité de l'homogénéité du dopage (pellicule de propriété optique définie, par exemple dans le domaine des verres), l'emploi de tels films dopés s'avère en revanche idéal dans le cadre des capteurs chimiques.

Les études en molécules uniques présentent incontestablement une grande richesse, mais en contrepartie, il faut être capable de déterminer des protocoles d'analyse efficaces, et extraire de la grande quantité de données obtenues les points représentatifs, les corrélations représentatives, et reconnaître les conclusions qu'ils impliquent. Malgré le nombre important de données traitées dans ce travail, une seconde phase d'expériences s'avérerait nécessaire. A présent que les comportements d'intérêt sont repérés, on pourra soit s'attacher à caractériser plus finement quelques individus représentatifs quand différentes sous-populations sont identifiées (cas des spectres), pour vérifier les hypothèses émises à leur sujet, soit chercher à définir des sous-populations quand l'hétérogénéité de l'échantillon est manifeste mais que nous n'avons pas établi de critère de classement. Pour ce dernier cas, on pense en particulier aux études de photoblanchiment qui ont été analysées sans tenir compte de l'hétérogénéité dans un premier temps, mais pour lesquelles les histogrammes contenant les paramètres individuels montrent clairement un comportement hétérogène (distribution des temps de survie non-exponentielle). Des études avec une résolution temporelle appropriée de l'émission permettraient de distinguer différentes sous-populations, sur la base de paramètres qui se sont révélés importants pour ces études, tels que la durée de vie du triplet ou d'état(s) noir(s) non-fluorescents.

La molécule sonde de l'effet SERS

Les agrégats d'argent utilisés comme substrats se sont avérés de très bon candidats à l'exaltation de la diffusion Raman de nombreuses espèces chimiques.

Nous avons obtenu des spectres SERS dont, en particulier la dynamique, valide le très faible nombre d'objets participant au signal. A nouveau, une très grande quantité de données ont été enregistrées, et l'analyse et la reconnaissance des espèces s'est effectuée de manière individuelle, pour plusieurs milliers de spectres. Cela nous a permis de distinguer des comportements originaux de la dynamique des interactions de la molécule avec la surface métallique, qui se traduisent par exemple par des modifications réversibles du spectre au cours du temps. L'utilisation d'un colorant pour quantifier l'exaltation nous a permis d'établir que celle ci correspondait au minimum à une augmentation de 10^{14} de l'"efficacité" du processus de diffusion.

Néanmoins, il ne nous a pas été possible d'enregistrer sur ces agrégats le signal SERS de l'EDTA, alors que sur des agrégats dont la présence d'argent non réduit a été fortement limitée par synthèse, l'observation du signal Raman de cette espèce est possible. Ces derniers agrégats présentent par contre une exaltation moins efficace.

CONCLUSION

La conclusion majeure à laquelle nous ont conduit ces observations est celle de la présence d'argent cationique sur les points chauds d'exaltation géante des agrégats. L'EDTA n'est alors pas détectée, car elle y subirait une réaction d'oxydation. Cela permet aussi d'expliquer la raison de la reconnaissance, au cours de l'analyse des spectres, de la signature vibrationnelle d'un certain nombre de produits d'oxydation— plus ou moins précoces— de l'EDTA.

En plus de l'analyse spectroscopique, nous avons couplé le repérage des agrégats actifs à une caractérisation par microscopie électronique. Cette expérience s'est aussi avérée très intéressante, avec la mise en évidence de caractéristiques géométriques communes aux agrégats actifs. Ceux-ci présentent non pas des facettes, mais des protubérances de dimensions de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres sur un coeur d'une centaine de nanomètres de diamètre. Une des propositions possibles est que les jonctions entre les différentes parties de ces agrégats soient les sites privilégiés de la présence d'Ag⁺. La raison de la plus faible activité des seconds agrégats, sur lesquels il est possible de détecter l'EDTA, serait l'absence de caractère cationique de la surface. Cependant, on ne peut tout à fait exclure l'implication d'un effet géométrique pour expliquer la baisse d'activité, les seconds agrégats n'ayant pas été étudiés de manière corrélée en microscopie électronique.

Pour aller plus loin dans la compréhension de l'exaltation de surface géante des agrégats, une étude est actuellement lancée pour essayer de mettre en évidence la présence de plasmons de surface d'énergie favorable à l'excitation et à la propagation du signal de diffusion Raman des molécules, comme il est suggéré par de nombreux auteurs.

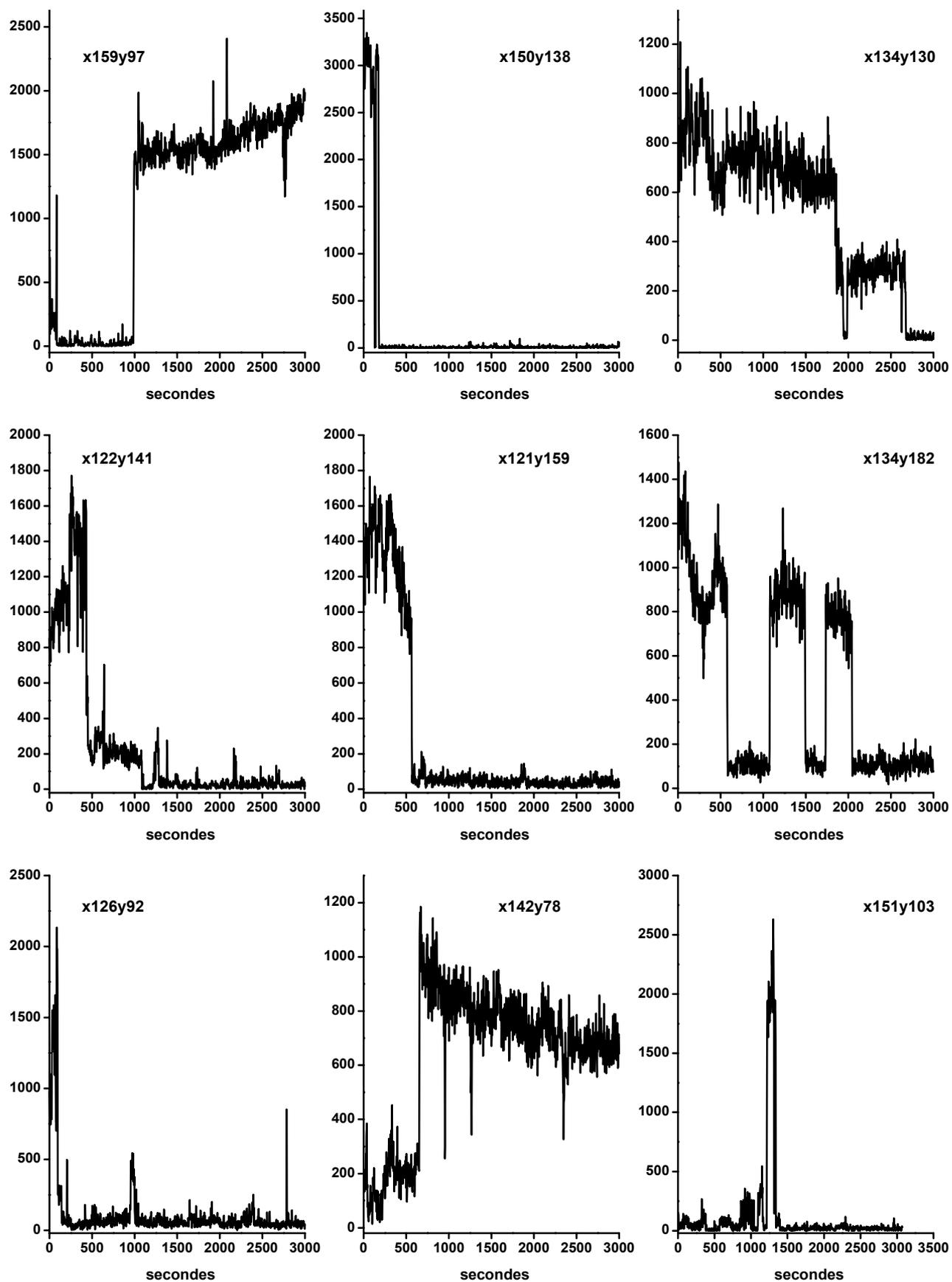
Annexes

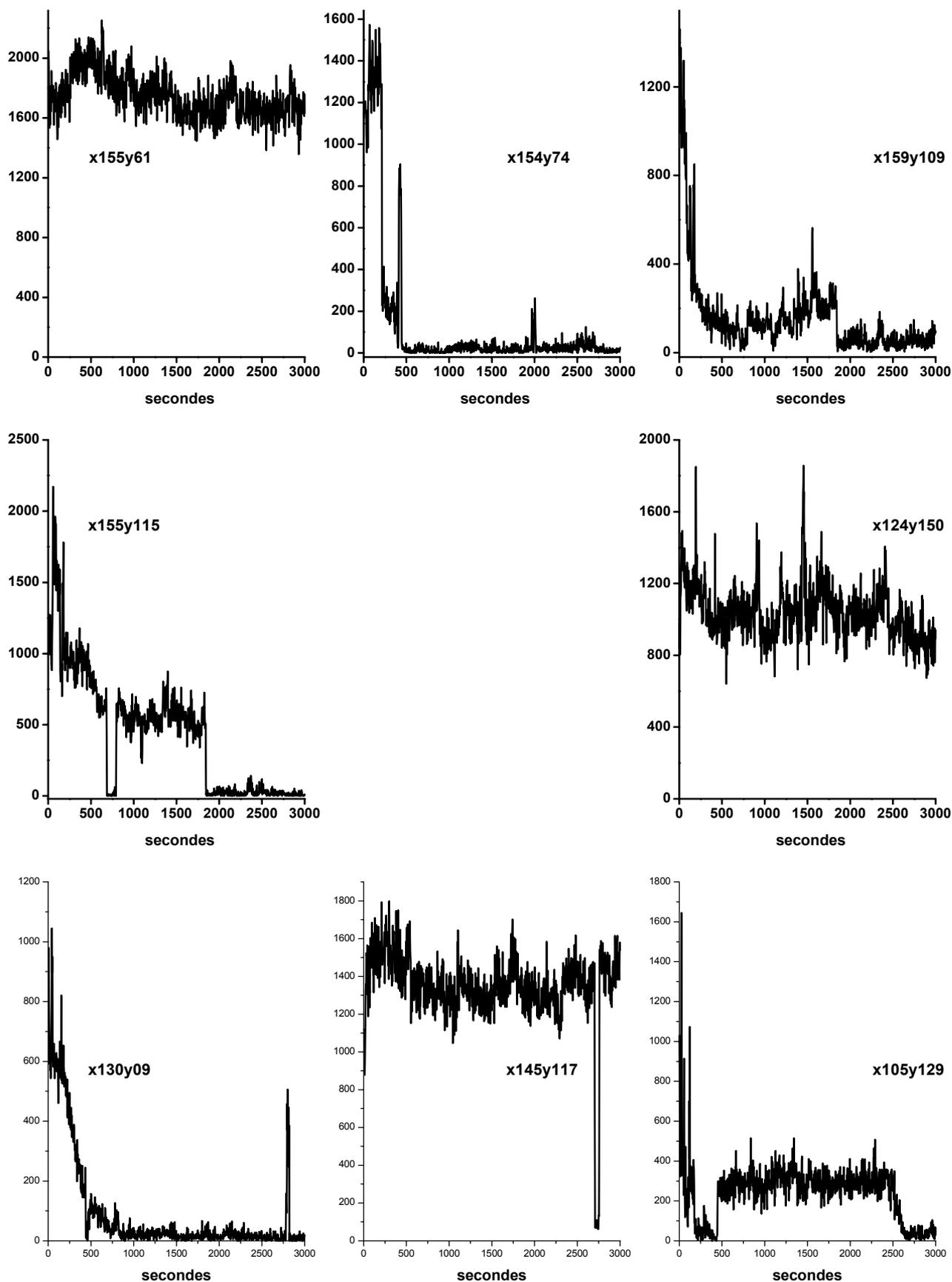
annexe A

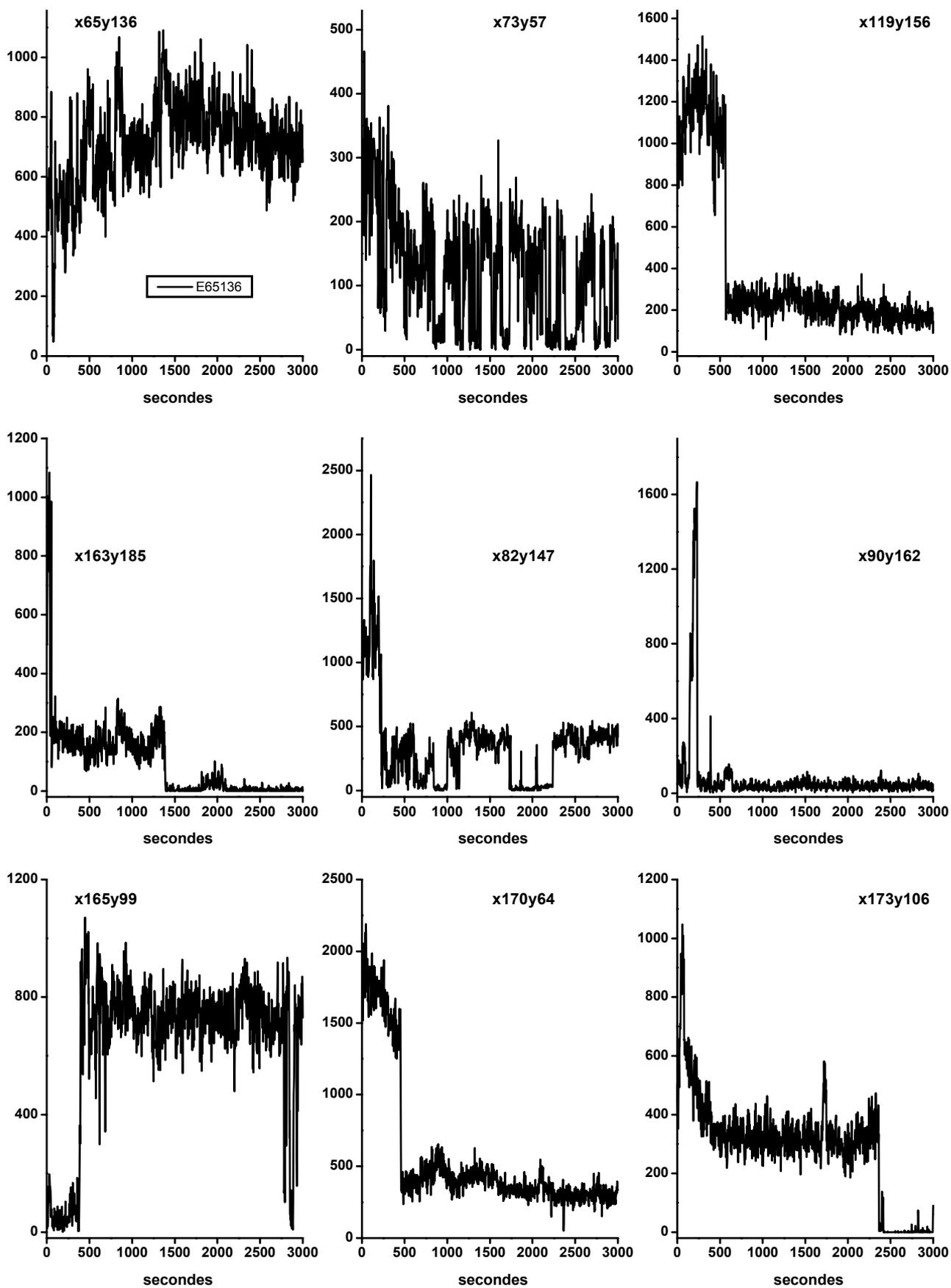
Traces temporelles d'émission de fluorescence de molécules individuelles de pérylène orange insérées en film solgel mince : dynamiques de 31 molécules distinctes, observées sur un même film enregistré sous vide pour une intensité d'excitation de $75\text{W}/\text{cm}^2$ avec une durée d'acquisition de 3s par image. Le film dont sont extraites ces traces correspond au premier film d'une expérience de photoblanchiment constituée, d'un total de 9 films de 1024 images chacun, pour arriver au photoblanchiment de la quasi totalité des molécules. L'ensemble des molécules se situent dans la zone d'irradiation correspondant à une surface d'environ $2000\mu\text{m}^2$. L'échantillonnage présenté reflète l'hétérogénéité observée dans les comportements des différentes molécules dans toutes les expériences, quelles que soient la puissance d'excitation ou l'atmosphère d'étude. Les coordonnées notées sont celles du pixel correspondant au "centre" de la molécule sur les images grand champ. Chaque pixel correspond à 209nm sur l'échantillon.

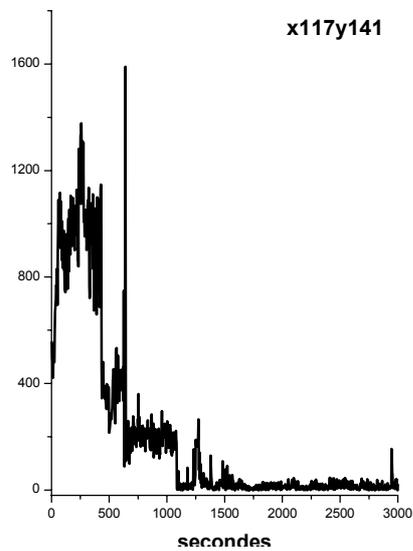
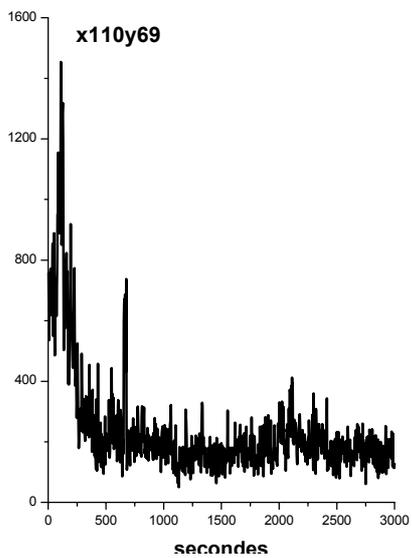
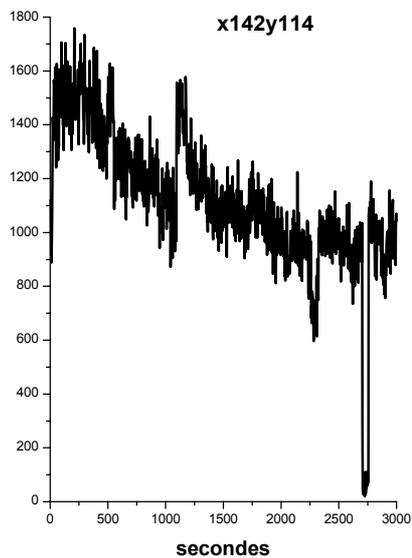
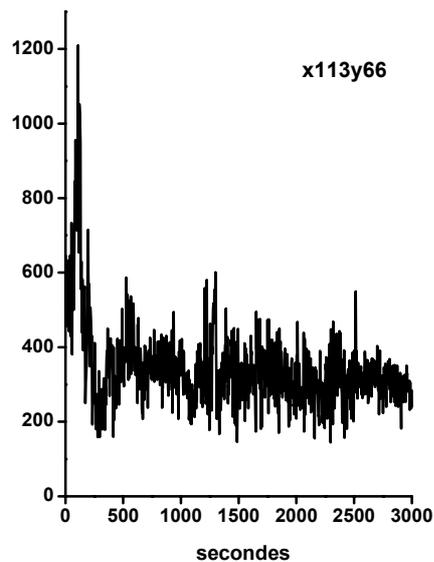
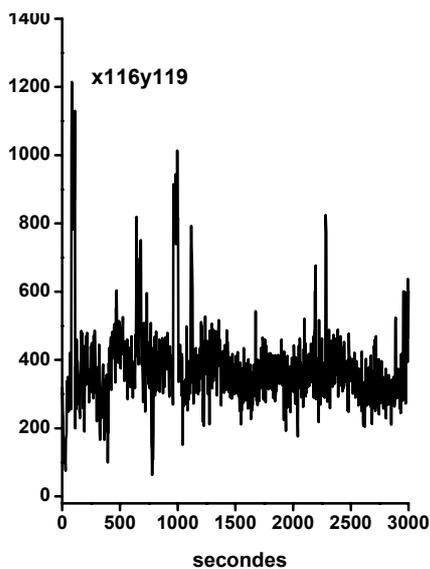
annexe B

Traces temporelles de molécules situées au voisinage d'une molécule de comportement "cyclique" (cf. figure 2.33 p134) présentée sur fond gris. Au cours de la même période d'irradiation, on trouve dans la zone irradiée des molécules de comportements différents – stables ou avec clignotement – et qui ne présentent pas de motifs répétitifs.

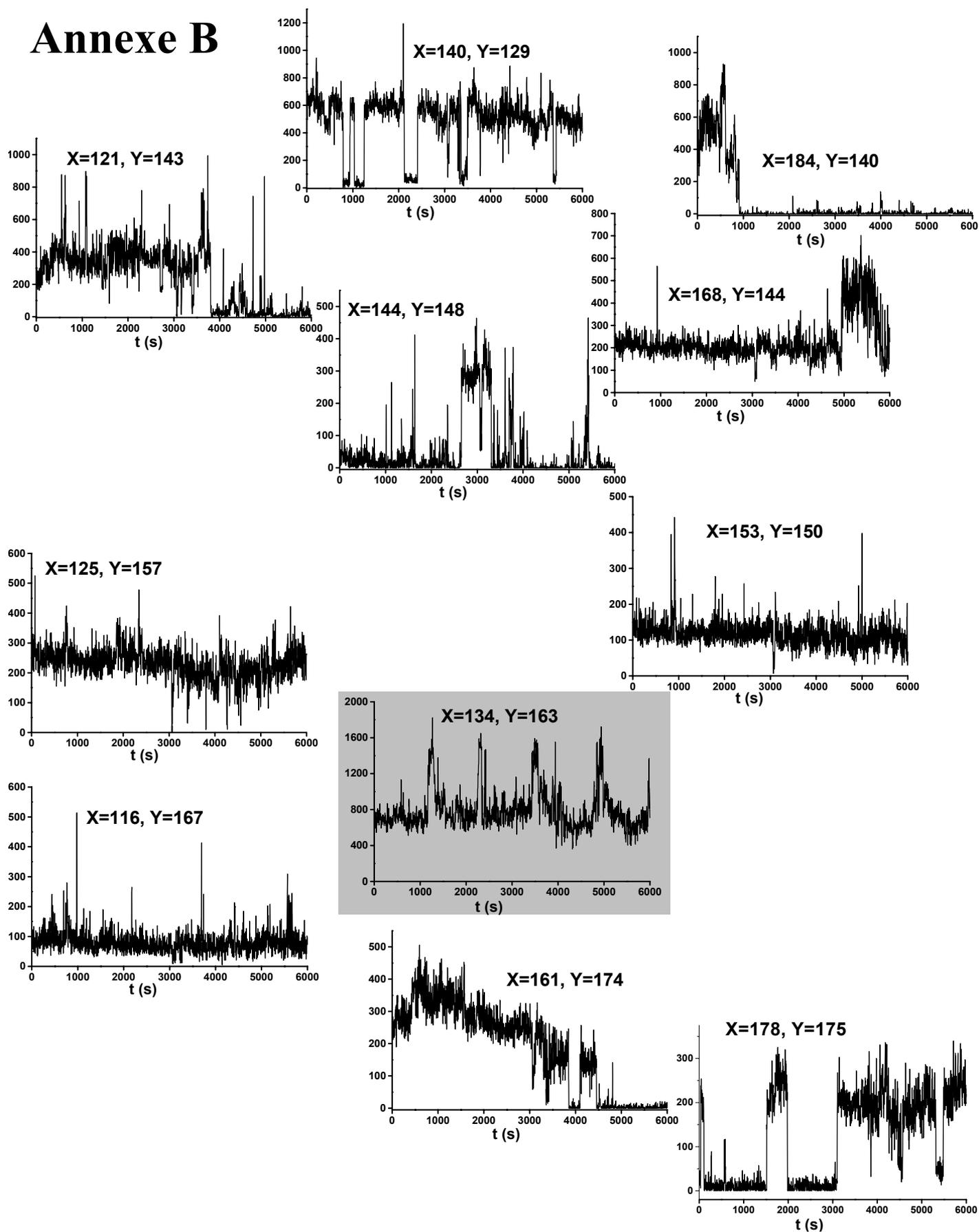








Annexe B



Bibliographie

- [1] W. E. Moerner et L. Kador, *Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in Solids*, Phys. Rev. Lett. **62**, (1989) 2535.
- [2] J. Bernard et M. Orrit, *Détection de molécules individuelles de pentacène dans un cristal de p-terphenyle par excitation de la fluorescence*, C. R. Acad. Sci. Paris série II **311**, (1990) 923.
- [3] F. Guttler, T. Irnagartinger, T. Plakhotnik, A. Renn, et U. Wild, *Fluorescence microscopy of single molecules*, Chem. Phys. Lett. **217 (4)**, (1994) 393.
- [4] S. Weiss, *Fluorescence spectroscopy of single biomolecules*, Science **283**, (1999) 1676.
- [5] W. E. Moerner, *A Dozen years of Single-Molecule Spectroscopy in Physics, Chemistry and Biophysics*, J. Phys. Chem. B **106**, (2002) 910.
- [6] A.B. Myers, P. Tchénio, M.Z. Zgierski, et W.E. Moerner, *Vibronic spectroscopy of individual molecules in solid*, J. Phys. Chem. **98**, (1994) 10377.
- [7] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, et M. Feld, *Single Molecule Detection using Surface-enhanced Raman Scattering (SERS)*, Phys. Rev. Lett. **78(9)**, (1997) 1667.
- [8] S. Nie et S.R. Emory, *Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering*, Science **275**, (1997) 1102.
- [9] Fresenius Carl Remigius *Précis d'analyse chimique qualitative* ; Fortin, Masson , Paris : 1845.
- [10] Russel S. DRAGO *Physical methods for chemists* ; Saunders College Publishing : 1992.
- [11] F. ROUESSAC *Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes* ; Dunod,Paris : 2000.
- [12] W. Ho, *Single molecule chemistry*, J. Chem. Phys. **117(24)**, (2002) 11033.
- [13] J.I. Pascual, N. Lorente, Z. Song, H. Conrad, et H.P. Hurst, *Selectivity in vibrationally mediated single-molecule chemistry*, Nature **423**, (2003) 525.
- [14] G. Herzberg *Molecular spectra and molecular structure. Vol. 1 : spectra of diatomic molecules* ; Van Nostrand, New York : 1966.

- [15] G. Herzberg *Molecular spectra and molecular structure. Vol. 3 : Electronic spectra and electronic structure of polyatomic molecules*; Van Nostrand, New York : 1966.
- [16] Schafer F.P.; Snavely BB; Shank C; Ippen P et Hansch T *Topics in applied physics Vol 1 : Dye lasers*; Springer-Verlag, New York : 1973.
- [17] K.H. Drexhage, *What's ahead in laser dyes*, Laser Focus **9(3)**, (1973) 35.
- [18] C.V. Raman et K.S Krishnan, *A new type of secondary transition*, Nature **121**, (1928) 3048.
- [19] K. Nakamoto *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds.(part A B)*; Wiley-Interscience, New York : 1997.
- [20] G. Herzberg *Molecular spectra and molecular structure. Vol. 2 : Infrared and Raman spectra of polyatomic molecules*; Van Nostrand, New York : 1966.
- [21] P. Tchénio, A.B. Myers, et W.E. Moerner, *Optical studies of single terrylene molecules in polyethylene*, J. Lumin. **56**, (1993) 1.
- [22] Th. Basché, W.E. Moerner, M. Orrit, et H. Talon, *Photon Antibunching in the fluorescence of a Single molecule Trapped in a Solid*, Phys. Rev. Lett. **69(10)**, (1992) 1516.
- [23] T. Ha, Th. Enderle, D.S. Chemla, P.R. Selvins, et S. Weiss, *Quantum jumps of single molecules at room temperature*, Chem. Phys. Lett. **271**, (1997) 1.
- [24] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, et P. Alivisatos, *Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels*, Science **281**, (1998) 2013.
- [25] H. Szmacinsky et J.R. Lakowicz, *Optical measurements of pH using fluorescence lifetimes and phase-modulation fluorometry*, Anal. Chem. **65(13)**, (1993) 1668.
- [26] M. Pirotta, F. Guttler, H. Gygax, A. Renn, J. Sepiol, et U.P. Wild, *Single molecule spectroscopy. Fluorescence-lifetime measurements of pentacene in p-terphenyl*, Chem. Phys. Lett. **208(5,6)**, (1993) 379.
- [27] R.A.L. Vallée, N. Tomczak, L. Kuipers, G.J. Vannco, et N.F. van Hulst, *Single Molecule Lifetime Fluctuations Reveal Segmental Dynamics in Polymers*, Phys. Rev. Lett. **91(3)**, (2003) 038301.
- [28] P.C. Schneider et R. M. Clegg, *Rapid acquisition, analysis, and display of fluorescence lifetime-resolved images for real-time applications*, Rev. Sci. Inst. **68**, (1997) 4107.
- [29] J. Widengren, U. Mets, et R. Rigler, *Fluorescence correlation Spectroscopy of Triplet state in solution : a Theoretical and Experimental study*, J. Phys. Chem. **99**, (1995) 13368.
- [30] W. P. Ambrose et W. E. Moerner, *Fluorescence spectroscopy and spectral diffusion of single impurity molecules in a crystal*, Nature **349**, (1991) 225.

-
- [31] H.P. Lu et X.S. Xie, *Single-molecule spectral fluctuations at room temperature*, Nature **385**, (1997) 143.
- [32] A.J. Meixner et M.A. Weber, *Single molecule spectral dynamics at room temperature*, J. Lumin. **86**, (2000) 181.
- [33] S. Brasselet et W.E. Moerner, *Fluorescence Behavior of Single-Molecule pH-Sensors*, Single Mol. **1**, (2000) 17.
- [34] F. Kulwinder et J.D. Brennan, *Fluorometric detection of Ca^{2+} based on an induced change in the conformation of sol-gel entrapped Parvalbumin*, Anal. Chem. **70**, (1998) 4505.
- [35] A. Débarre, R. Jaffiol, C. Julien, D. Nutarelli, A. Richard, et P. Tchénié, *Quantitative determination of the 3D dipole orientation of single molecule*, Eur. Phys. J. D **28**, (2004) 67.
- [36] Rodolphe Jaffiol *Spectroscopie optique de nano-objets individuels*, Thèse, Université Paris XI, 2003.
- [37] H. Sosa, E. J.G. Peterman, W.E. Moerner, et L.S.B. Goldstein, *ADP-induced rocking of the kinesin motor domain revealed by single-molecule fluorescence polarization microscopy*, Nature Struct. Biol. **8(6)**, (2001) 540.
- [38] J.N. Forkey, M.E. Quinlan, M.A. Shaw, et J.E. Corrie, *Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization*, Nature **422**, (2003) 399.
- [39] T. Ha, Th. Enderle, D.F. Ogletree, D.S. Chemla, P.R. Selvins, et S. Weiss, *Single Molecules Dynamics Studied by Polarization Modulation*, Phys. Rev. Lett. **77(19)**, (1996) 3979.
- [40] T. Ha, T.A. Laurence, D.S. Chemla, et S. Weiss, *Polarization spectroscopy of single fluorescent molecules*, J. Phys. Chem. B. **103**, (1999) 6839.
- [41] G.S. Harms, M. Sonnleitner, G.J. Schutz, H.J. Gruber, et Th. Schmidt, *Single-Molecule Anisotropy Imaging*, Biophys. J. **77**, (1999) 2864.
- [42] Claudine Courjon, Daniel et Bainier *Le champ proche optique, théorie et applications*; Springer : 2001.
- [43] S. Iijima, *Helical microtubules of graphitic carbon*, Nature **354**, (1991) 56.
- [44] M. Fleischmann, P.J. Hendra, et A.J. McQuillan, *Raman Spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*, Chem. Phys. Lett. **26 (2)**, (1974) 163.
- [45] K. Kneipp, H. Kneipp, V.B. Kartha, R. Manoharan, G. Deinum, I. Itzkan, R.R. Dasari, et M. Feld, *Detection and identification of a single DNA base molecule using Surface-enhanced Raman Scattering (SERS)*, Phys. Rev. E **57(6)**, (1998) R6281.

- [46] J. Azoulay, A. Débarre, et A. Richard et P. Tchénio, *Polarized Raman spectroscopy of a single class of single wall nanotubes : breathing mode study*, Europhys. Lett. **51(4)**, (2000) 374.
- [47] A. Débarre, R. Jaffiol, C. Julien, D. Nutarelli, A. Richard, et P. Tchénio, *Antenna effect in dimetallofullerene peapods*, Chem. Phys. Lett. **380**, (2003) 6.
- [48] F. Devreux, J.P. Boilot, F. Chaput, et A. Lecomte, *Sol-gel condensation of rapidly hydrolyzed silicon alkoxides : A joint ^{29}Si NMR and small angle x-ray scattering study*, Phys. Rev. A **41(12)**, (1990) 6901.
- [49] C. Sanchez, B. Lebeau, F. Chaput, et J-P Boilot, *Optical properties of fonctionnal hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites*, Adv. Mat. **15(23)**, (2003) 1969.
- [50] D. Avnir, D. Levy, et R. Reisfeld, *The nature of the silica cage as reflected by spectral changes and enhanced photostability of trapped Rhodamine 6G*, J. Phys. Chem. **88**, (1984) 5956.
- [51] E.T. Knobbe, B. Dunn, P.D. Fuqua, et F. Nishida, *Laser behavior and photostability characteristics of organic dye doped silicate materials*, Appl. Opt **29(18)**, (1990) 2729.
- [52] F. Salin, G. Le Saux, P. Georges, A. Brum, C. Bagnall, et J. Zarzycki, *Efficient tunable solid-state laser near 630nm using sulforhodamine 640-doped silica gel*, Opt. Lett. **14(15)**, (1989) 785.
- [53] G. Seybold et G. Wagenblast, *New Perylene and Violanthrone Dyestuffs for Fluorescent Collectors*, Dyes and Pigments **11**, (1989) 303.
- [54] M. Canva, P. Georges, JF Perlgritz, A. Brum, F. Chaput, et JP Boilot, *Perylene and pyrromethene-doped xerogel for a pulsed laser*, App. Opt. **34(3)**, (1995) 428.
- [55] M. Faloss, M. Canva, P. Georges, A. Brum, F. Chaput, et JP Boilot, *Toward millions of laser pulses with pyrromethene and perylene-doped xerogel*, App. Opt. **36(27)**, (1997) 6760.
- [56] J.P. Cocquerez et S. Philipp *Analyse d'images : filtrage et segmentation*; Masson : 1995.
- [57] S. Wennmalm et R. Rigler, *On Death Numbers and Survival Times of Single Dye Molecule*, J. Phys. Chem B **103**, (1999) 2516.
- [58] C.R. Viteri, J.W. Gilliland, et W.T. Yip, J. Am. Chem. Soc. **125**, year 1980.
- [59] C.G. Hubner, A. Renn, I. Renge, et U. Wild, *Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen*, J. Chem. Phys. **115 (21)**, (2001) 9619.
- [60] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, et C.A.M. Seidel, *Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection : Evidence of a Two-Step Photolysis*, Anal. Chem. **70**, (1998) 2651.

- [61] L.A. Deschenes et D.A. Vanden Bout, *Single molecule photobleaching : increasing photon yield and survival time through suppression of two-step photolysis*, Chem. Phys. Lett. **365**, (2002) 387.
- [62] M. Sadrai, L. Hadel, R.R. Sauers, S. Husain, K. Kreogh-Jespersen, J.D. Westbrook, et G.R. Bird, *Lasing Action in a Family of Perylene Derivatives : Singlet Absorption and Emission Spectra, Triplet Absorption and Oxygen Quenching Constants, and Molecular Mechanics and Semiempirical Molecular Orbital Calculations*, J. Phys. Chem. **96**, (1992) 7988.
- [63] Joel Azoulay *Méthodes spectroscopiques originales pour exploiter les propriétés de sonde locale d'un nanoobjet individuel*, Thèse, Université Paris XI, 2001.
- [64] Th. Schmidt, G.J. Schutz, W. Baumgartner, H.J. Gruber, et H. Schindler, *Characterization of Photophysics and Mobility of Single Molecules in a Fluid Lipid Membrane*, J. Phys. Chem. **99**, (1995) 17662.
- [65] N. Periasamy et A.S. Verkman, *Analysis of Fluorophore Diffusion by Continuous Distributions of Diffusion Coefficients : Application to Photobleaching Measurements of Multicomponent and Anomalous Diffusion*, Biophys. J. **75**, (1998) 557.
- [66] K. Malek et M-O. Coppens, *Knudsen self- and Fickian diffusion in rough nanoporous media*, J. Chem. Phys **119(5)**, (1978) 2801.
- [67] A.M. Bardo, M.A. Collinson, et D.A. Higgins, *Nanoscale Properties and Matrix-Dopant Interactions in Dye-Doped Organically Modified Silicate Thin Films*, Chem. Mater. **13**, (2001) 2713.
- [68] M.D. Rahn et T.A. King, *Comparison of laser performance of dye molecules in sol-gel, polycom, ormosil, and poly(methylmethacrylate) host media*, Appl. Opt **34(36)**, (1995) 8260.
- [69] G. Qian, Y. Yang, Z. Wang, C. Yang, Z. Yang, et M. Wang, *Photostability of perylene orange, perylene red and pyrromethene 567 laser dyes in various precursors derived gel glasses*, Chem. Phys. Lett. **368**, (2003) 555.
- [70] R.A. Marcus, *On the Theory of Shifts and Broadening of Electronic Spectra of Polar Solutes in Polar Media*, J. Chem. Phys. **43**, (1965) 1261.
- [71] Y. Hou, A.M. Bardo, C. Martinez, et D.A. Higgins, *Characterization of Molecular Scale Environments in Polymer Films by Single Molecule Spectroscopy*, J. Phys. Chem. B **104**, (2000) 212.
- [72] C. Burgdorff, H.G. Lohmannsroben, et R.Reisfeld, *A perylene dye in sol-gel matrices : photophysical properties of N,N'-bis(2,5-tert-butylphenyl)-3,4 :9,10-perylenebis(dicarboximide) in glasses and thin films*, Chem. Phys. Lett. **197(4,5)**, (1992) 358.

- [73] H. Wang, A.M. Bardo, M.A. Collinson, et D.A. Higgins, *Microheterogeneity in Dye-Doped Silicate and Polymer Films*, J. Phys. Chem.B. **102**, (1998) 7231.
- [74] D.A. Higgins, M.A. Collinson, G. Saroja, et A.M. Bardo, *Single-Molecule Spectroscopic studies of Nanoscale Heterogeneity in Organically Modified Silicate Thin Films*, Chem. Mater. **14**, (2002) 3734.
- [75] S.K. Lam, E. Namdas, et D. Lo, *Effect of oxygen and temperature on phosphorescence and delayed fluorescence of erythrosinB trapped in sol-gel silica*, J. Photochem. Photobiol. A **118**, (1998) 25.
- [76] K. Matsui et K.Nozawa, *Molecular Probing for the Microenvironment of Photonics Materials Prepared by the Sol-gel Process*, Bull. Chem. Soc. Jpn. **70**, (1997) 2331.
- [77] M. Maus, W. Rettig, D. Bonafoux, et R. Lapouyade, *Photoinduced Intramolecular Charge Transfer in a Series of Differently Twisted Donor-Acceptor Biphenyls as revealed by Fluorescence*, J. Phys. Chem. A **103**, (1999) 3388.
- [78] K. D. Weston, P. J. Carson, H. Metiu, et S. K. Buratto, *Room-temperature fluorescence characteristics of single dye molecules adsorbed on a glass surface*, J. Chem. Phys. **109**, (1998) 7474.
- [79] H. Laguitton-Pasquier, R. Pansu, J-P. Chauvet, A. Collet, J. Faure, et R. Lapouyade, *Rhe charge transfer state of excited bianthryl and a derivative : solvatochromisme, emission CT Spectra broadening in homogeneous solvents*, Chem. Phys. **212**, (1996) 437.
- [80] Y. Hou et D.A. Higgins, *Single-Molecule Studies of Dynamics in Polymer Thin Films and at Surfaces : Effect of Ambient Relative Humidity*, J. Phys. Chem. B **106**, (2002) 10306.
- [81] A.G.T Ruiter, J.A. Veerman, M.F. Garcia-Parajo, et N.F. van Hulst, *Single Molecule Rotational and Translational Diffusion Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy*, J. Phys. Chem. A **101**, (1997) 7318.
- [82] A.P. Bartko, K. Xu, et R.M. Dickson, *Three-dimensional Single Molecule Rotational Diffusion in Glassy State Polymer Films*, Phys. Rev. Lett. **89(2)**, (2002) 0626101-1.
- [83] W. E. Moerner et M. Orrit, *Illuminating Single Molecules in Condensed Matter*, Science **283**, (1999) 1670.
- [84] E. Mei, A.M. Bardo, M.A. Collinson, et D.A. Higgins, *Single-Molecule Studies of Sol-Gel Derived Silicate Films. Microenvironments and Film-drying Conditions*, J. Phys. Chem. B **104**, (2000) 9973.
- [85] K. D. Weston, P. J. Carson, J.A. DeAro, et S. K. Buratto, *Single-molecule detection fluorescence of surface-bound species in vacuum*, Chem. Phys. Lett. **308**, (1999) 58.

- [86] J. Azoulay, A. Débarre, et A. Richard et P. Tchénio, *Quenching and enhancement of single molecule fluorescence under metallic and dielectric tip*, Europhys. Lett. **53(3)**, (2001) 407.
- [87] T. Ha, Th. Enderle, D.F. Ogletree, D.S. Chemla, P.R. Selvins, et S. Weiss, *Probing the interaction between two single molecules : Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, (1996) 6264.
- [88] I. Gautier, M. Tramier, C Durieux, J. Coppey, R.B. Pansu, J-C. Nicolas, K. Kemnitz, et M. Coppey-Moisan, *Homo-FRET Microscopy in Living Cells to Measure Monomer-Dimer Transition of GFP-Tagged Proteins*, Biophys. J. **80**, (2001) 3000.
- [89] D.L. Jeanmaire et R.P. Van Duyne, *Surface Raman Spectroelectrochemistry. part I : heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode*, J. Electroanal. Chem. **84**, (1977) 1.
- [90] M.G. Albrecht et J.A. Creighton, *Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode*, J. Am. Chem. Soc. **99**, (1977) 5215.
- [91] J. Billmann et A. Otto, *Enhanced Raman effect from cyanide adsorbed on a silver electrode*, Surf. Sci. **92**, (1980) 153.
- [92] E.J. Bjerneld, P. Johansson, et M. Kall, *Single Molecule Vibrational Fine-structure of Tyrosine Adsorbed on Ag Nano-Crystals*, Single Mol. **1**, (2000) 239.
- [93] W.E. Doering et S. Nie, *Single-Molecule and Single-Nanoparticle SERS : Examining the Roles of Surface Active Sites and Chemical Enhancement*, J. Phys. Chem. B **106**, (2002) 311.
- [94] R.M. Stockle, Y.D. Suh, V. Deckert, et R. Zenobi, *Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy*, Chem. Phys. Lett. **318**, (2000) 131.
- [95] H. Xu, J. Aizpurua, M. Kall, et P. Apell, *Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering*, Phys. Rev. E **62(3)**, (2000) 4318.
- [96] S. Corni et J. Tomasi, *Enhanced response properties of a chromophore physisorbed on a metal particle*, J. Chem. Phys. **114(8)**, (2001) 3739.
- [97] S. Corni et J. Tomasi, *Theoretical evaluation of Raman spectra and enhancement factors for a molecule adsorbed on a complex-shaped metal particle*, Chem. Phys. Lett. **342**, (2001) 135.
- [98] S. Corni et J. Tomasi, *Surface enhanced Raman scattering from a single molecule adsorbed on a metal particle aggregate*, J. Chem. Phys. **116**, (2002) 1156.

- [99] R.H. Ritchie, *Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films*, Phys. Rev. **106**, (1957) 874.
- [100] Jean-Louis Bijeon *Etude théorique et expérimentale de l'effet Raman augmenté sur des substrats constitués de particules métalliques de taille submicrobique*, Thèse, Université de Bourgogne, 1989.
- [101] B. Pettinger, *Light scattering by adsorbates at Ag particles : Quantum-mechanical approach for energy transfer induced interfacial optical processes involving surface plasmons, multipoles, and electron-hole pairs*, J. Chem. Phys. **85(12)**, (1986) 7442.
- [102] S. Ducourtieux, V.A. Podolskiy, S. Grésillon, S. Buil, B. Berini, P. Gadenne, A.C. Boccara, J.C. Rivoal, W.D. Bragg, K. Banerjee, V.P. Safonov, V.P. Drachev, Z.C. Ying, A.K. Sarychev, et V.M. Shalaev, *Near-field optical studies of semicontinuous metal films*, Phys. Rev. B. **64**, (2001) 165403-1.
- [103] T. Klar, M. Perner, S. Gosse, G. von Plessen, W. Spirkl, et J. Feldmann, *Surface-Plasmon Resonances in Single Metallic Nanoparticles*, Phys. Rev. Lett. **80(19)**, (1998) 4249.
- [104] I. Mrozek et A. Otto, *Long- and short-range Effects in SERS from Silver*, Europhys. Lett. **11**, (1990) 243.
- [105] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, et W. Akemann, *Surface-Enhanced Raman Scattering*, J. Phys. Condens. Matter **4**, (1992) 1143.
- [106] T. Watanabe, O. Kawanami, K. Honda, et B. Pettinger, *Evidence for Surface Ag Complexes as the SERS-Active Sites on Ag Electrodes*, Chem. Phys. Lett. **102(6)**, (1983) 565.
- [107] D. Roy et T.E. Furtak, *Characterization of surface complexes in enhanced Raman scattering*, J. Chem. Phys. **81(9)**, (1984) 4168.
- [108] J. A. Creighton, *The resonance Raman contribution to sers : Pyridine on copper or silver in aqueous media*, Surf. Sci. **173(2-3)**, (1986) 665.
- [109] J.F. Arenas, M.S. Wooley, I. Lopez Tocon, J.C. Otero, et J.I. Marcos, *Complete analysis of the surface-enhanced Raman scattering of pyrazine on the silver electrode on the basis of a resonant charge transfer mechanism involving three state*, J. Chem. Phys. **112(17)**, (2000) 7669.
- [110] A.M. Michaels, J. Jiang, et L. Brus, *Ag Nanocrystal Junctions as the sites for Surface-Enhanced Raman Scattering of single Rhodamine 6G molecules*, J. Phys. Chem. B **104**, (2000) 11965.
- [111] P. Hildebrandt et M. Stockburger, *Surface enhanced Resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver*, J. Phys. Chem. **88**, (1984) 5935.

-
- [112] A. Otto, A. Bruckbauer, et Y. X. Chen, *On the chloride activation in SERS and single molecule SERS*, J. Mol. Struct. **661-662**, (2003) 501.
- [113] H. Xu, E.J. Bjerneld, M. Kall, et L. Borjesson, *Spectroscopic of single hemoglobin molecules by SERS*, Phys. Rev. Lett. **83(21)**, (1999) 4357.
- [114] A. Otto, *What is observed in single molecule SERS, and why?*, J. Raman. Spectrosc. **33**, (2002) 593.
- [115] A.M. Michaels, J. Jiang, et L. Brus, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of single Rhodamine 6G molecules on large Ag Nanocrystal*, J. Am. Chem. Soc. **121**, (1999) 9932.
- [116] D.J. Maxwell, S.T. Emaury, et S. Nie, *Nanostructured Thin-Film Materials with Surface-Enhanced Optical Properties*, Chem. Mater. **13**, (2001) 1082.
- [117] S. Remita, M. Mostafavi, et M.O. Delcourt, *Stabilization, growth and reactivity of silver aggregates produced by radiolysis in the presence of EDTA*, New J. Chem. **18**, (1994) 581.
- [118] H. Wetzel, B. Pettinger, et U. Wenning, *Surface-Enhanced Raman Scattering from Ethylenediaminetetraacetic-disodium salt on Silver electrode*, Chem. Phys. Lett. **75**, (1980) 173.
- [119] R. Jin, Y. Cao, C.A. Mirkin, K.L. Kelly, G.C. Schatz, et J.G. Zheng, *Photoinduced Conversion of Silver Nanospheres to Nanoprisms*, Science **294**, (2001) 1901.
- [120] A.J. Meixner, T. Vosgrone, et M. Sackrow, *Nanoscale surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy of single molecules on isolated silver clusters*, J. Lumin. **94-95**, (2001) 147.
- [121] A. Weiss et G. Haran, *Time-Dependent Single-Molecule Raman Scattering as a probe of surface Dynamics*, J. Phys. Chem B **105**, (2001) 12348.
- [122] K.A. Bosnick, J. Jiang, et L.E. Brus, *Fluctuations and Local Symmetry in Single-Molecule Rhodamine 6G Raman Scattering on Silver Nanocrystal Aggregates*, J. Phys. Chem. B **106**, (2002) 8096.
- [123] M. Moskovits et J.S. Suh, *Surface Selection Rules for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy : Calculations and Application to the Surface-Enhanced Raman Spectrum of Phthalazine on Silver*, J. Phys. Chem. **88**, (1984) 5526.
- [124] D.A. Guzonas, G.F. Atkinson, D.E. Irish, et W.A. Adams, *SERS and normal Raman spectroscopic studies of the silver electrode/KCl+EDTA solution interface*, J. Electroanal. Chem. **150**, (1983) 457.
- [125] M.F. Garfallo Esteban, R. Vilaplana Serrano, et F. Gonzales Vilchez, *Synthesis and vibrational study of some polydentate ligands*, Spectrochim. Acta **43A (8)**, (1987) 1039.

- [126] K.A. Bunding Lee, G. McLENNAN, et J.G. Gordon, *Surface-Enhanced Raman Scattering from Ethylenediaminetetraacetic Acid*, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **91**, (1987) 305.
- [127] K. Kneipp, Y. Wang, J. Berger, R.R. Dasari, et M.S. Feld, *Surface-Enhanced Raman Scattering of CO₂ Dissolved in Aqueous Solutions of Silver and Gold*, J. Raman Spectrosc. **26**, (1995) 962.
- [128] M. Moskovits et J.S. Suh, *Conformation of Mono- and Dicarboxylic acids Adsorbed on Silver Surfaces*, J. Am. Chem. Soc. **107(24)**, (1985) 6826.
- [129] Sun Kai, Wan Chaozhi, et Xu Guangzhi, *Surface enhanced Raman spectra of carbonate, hydrocarbonate, and substituted acetic acids on silver hydrosols*, Spectrochim. Acta **45A (10)**, (1989) 1029.
- [130] A.A. MacConnell, R.H. Nutall, et D.M. Stackler, *Spectroscopic studies of the metal complexes of ethylenediaminetetra-acetic acid in aqueous solution*, Talanta **25**, (1978) 425.
- [131] Sun Kai, Wan Chaozhi, et Xu Guangzhi, *Multiple Adsorbed States and Surface enhanced Raman spectra of Crotonic and Sorbic Acids on Silver Hydrosols*, J. Raman Spectro. **20**, (1989) 267.
- [132] J.L. Castro, J.C. Otero, et J.I. Marcos, *Anomalous SERS of monocarboxylic acids*, J. Raman Spectrosc. **28**, (1997) 765.
- [133] A. Kudelski et B. Pettinger, *SERS on carbon chain segments : monitoring locally surface chemistry*, Chem. Phys. Lett. **321**, (2000) 356.
- [134] K. Ferraro, J.R. and Nakamoto, Ed.; *Introductory Raman spectroscopy*; Academic Press : 1994.
- [135] T. Wohland, R. Rigler, et H. Vogel, *The Standard Deviation in Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Biophys. J. **80**, (1995) 2987.
- [136] U. Meseth, T. Wohland, R. Rigler, et H. Vogel, *Resolution of Fluorescence Correlation Measurements*, Biophys. J. **76**, (1999) 1619.
- [137] U. Siemon, D. Bahnemann, J.J. Testa, D. Rodríguez, M.I. Litter, et N. Bruno, *Heterogeneous photocatalytic reactions comparing TiO₂ and Pt/TiO₂*, J. Photochem. Photobio. A **148**, (2002) 247.
- [138] M. Kerker, O. Siiman, L.A. Bumm, et D.S. Wang, *Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of citrate ion adsorbed on colloidal silver*, Appl. Opt **19(19)**, (1980) 3253.

RÉSUMÉ

Deux études distinctes mettant en œuvre la détection et l'analyse de signaux spectroscopiques optiques de molécules individuelles- colorants ou molécules organiques- ont été menées.

Par microscopie grand champ de fluorescence, l'émission de molécules uniques de pérylène orange insérées dans un film solgel mince, par enregistrement de films d'une large zone de l'échantillon sur laquelle plus d'une centaine d'émetteurs individuels sont détectés, fournit des informations sur cette espèce et la matrice sondée. Pour exploiter les films, un outil logiciel a été développé. Les processus de photoblanchiment, la mobilité moléculaire, la nucléation des molécules excitées sont mis en évidence et discutés. On note une grande richesse des dynamiques temporelles d'émission, mais aussi des spectres qui reflètent notamment la reconformation proposée du pérylène orange excité. Il s'ensuit l'existence de nombreux nanoenvironnements différents dans la matrice poreuse.

Par microscopie confocale à balayage, le signal de diffusion Raman exaltée de surface de molécules uniques organique adsorbées sur des agrégats d'argent de morphologie complexe est exploité. Certains objets présentent une exaltation géante, estimée être de plus de 14 ordres de grandeur, ce qui permet l'enregistrement de spectres résolus en seulement une seconde. L'analyse chimique offerte permet de distinguer différentes espèces, et la présence nécessaire sur ces points chauds d'Ag⁺ est démontrée. Une caractérisation corrélée par microscopie électronique des agrégats actifs repérés met aussi en avant l'existence d'une morphologie privilégiée, avec de nombreuses protubérances de dimension nanométrique et interstices.

ABSTRACT

Two independent studies, both involving detection and analysis of optical spectroscopic signals at the single molecule level have been conducted.

By mean of wide-field fluorescence spectroscopy, the emission of single perylene orange dyes embedded in a thin solgel film has been monitored. It consists of recording movies of a large area of the sample, with a hundred or more of single emitters in focus whose signal report as much on the species photo-properties as on the matrix. The films have been harvested thanks to a specially devoted tailored software. The photobleaching processes, spatial mobility and an aggregation-like phenomenon are pointed out and discussed. The molecules also exhibit a rich variety of temporal dynamics, and spectral characteristics reflecting most notably the proposed excited state reconformation of perylene orange.

Scanning confocal microscopy is the second setup used. Here, we focus on the surface-enhanced Raman scattering of single organic molecules adsorbed on silver nano-cluster with complex shape. Some of them exhibit giant enhancement, estimated to be at least of 14 orders of magnitude, offering the possibility to record nicely resolved spectra with a collection time of one second. The associated chemical analysis give evidence that different chemical species are present, and permits to highlight the presence of Ag⁺ at the hot spot. At last, a cross characterization of the active aggregates by electronic microscopy shows up that a specific class of cluster morphology, with nano-bumps, seems to be preferentially required for the hot spot to exist.

Mots-Clés

*spectroscopie
microscopies
Raman
solgel*

*molécule unique
Fluorescence
exaltation de surface
agrégat d'argent*