



Nouvelles géométries optiques pour la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence

Yoann Blancquaert

► To cite this version:

Yoann Blancquaert. Nouvelles géométries optiques pour la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00148993

HAL Id: tel-00148993

<https://theses.hal.science/tel-00148993>

Submitted on 24 May 2007

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 JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
LABORATOIRE DE SPECTROMÉTRIE PHYSIQUE

THÈSE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Physique

Présentée par

Yoann BLANCQUAERT

Nouvelles géométries optiques pour la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence

Soutenue le 26 octobre 2006 devant le jury composé de :

François AMBLARD

Pierre-François LENNE

Eric AUDOUARD

Antoine DELON

Pierre KERN

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de Thèse

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
LABORATOIRE DE SPECTROMÉTRIE PHYSIQUE

THÈSE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Physique

Présentée par

Yoann BLANCQUAERT

Nouvelles géométries optiques pour la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence

Soutenue le 26 octobre 2006 devant le jury composé de :

François AMBLARD

Pierre-François LENNE

Eric AUDOUARD

Antoine DELON

Pierre KERN

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de Thèse

Je dédie cette thèse à Denis et à toute ma
famille

Haute volée

*Oh, j'échappai aux sombres attaches de la terre
Et dansai dans les cieux sur mes ailes au rire argenté ;
Montant vers le soleil, je rejoignis la cascade joyeuse
Des nuages fendus par les rayons – je fis mille choses
Défiant l'imagination – je tournoyai, pris mon essor et me balançai
Très haut dans le silence ensoleillé. Planant là-haut,
Je poursuivis le vent hurlant, et je précipitai
Mon avion impatient dans des puits d'air sans fond.
Toujours plus haut dans le long bleu brûlant et délirant
J'atteignis avec une grâce aisée les cimes ventées
Où aucune alouette, aucun aigle ne vola jamais ;
Et tandis que, l'esprit silencieux, élevé, je parcourrais
La sainteté intacte de l'espace éthéré,
Je tendis la main et touchai le visage de Dieu.*

John Gillespie Magee, Jr.

Remerciements

Je remercie, M. Roland Hérino, ancien directeur du Laboratoire de Spectrométrie Physique et le directeur actuel, M. Benoît Boulanger, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Ils m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Je suis très reconnaissant à M. Eric Audouard et M. Pierre-François Lenne d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, à l'intérêt porté à mon travail et d'avoir été patients dans la correction de mon manuscrit. Je remercie également les membres du jury M. François Amblard et M. Pierre Kern.

Les résultats de ce travail de thèse, comme beaucoup d'autres, sont le fruit du travail en équipe. Je remercie vivement mon directeur de thèse, Antoine Delon, pour m'avoir formé à la recherche expérimentale. Il m'a laissé la liberté de mener personnellement les expériences. J'ai pu commencer cette thèse dans de bonnes conditions grâce à Rodolphe Jaffiol, je me souviendrais longtemps des déjeuners au RU ... Je te souhaite bon courage pour tes travaux de recherche et pour tes enseignements. Je plains un peu tes étudiants : un prof avec un t-shirt d'HappyTreeFriends ! Je salue aussi les autres membres de l'équipe : Jacques, merci pour tous tes conseils, et Philippe : tu verras un jour, j'arriverai à mettre un panier dans la corbeille ! J'espère que bientôt tu passeras ton brevet planeur ou ULM pour voler ensemble.

Merci à l'ensemble des « permanents » du laboratoire et surtout à l'équipe de mécanique. Mes remerciements sont adressés aussi à Sylvain Rochat pour avoir réalisé l'électronique et la conception du programme de PHONOS.

Je salue chaleureusement mes camarades « d'infortune ». Pauline n'ait pas peur des araignées, la petite bête ne va pas manger la plus grande (au pire la tuer !), courage bientôt la fin de ta thèse. Cyrille, je ne suis pas sûr que les Elfs existent, peut-être les lutins ou les Korigans, (tu en vois plein quand tu bois du chouchen) et avec beaucoup de travail et d'obstination, un jour peut-être, tu seras aussi fort que moi (et oui, et oui je suis modeste).

C'est bien de travailler, mais les activités en dehors c'est encore mieux ! Dans cette optique, je remercie toute la fine équipe de Grenoble Vol à Voile, promis, je vais essayer de moins malmenager les planeurs, merci également à Bénédicte de m'avoir confié son pendulaire et aussi à Philippe, Pierre, Gégé, Guillaume, Christophe et Christian de l'Académie Grenobloise de Sambo.

Je ne serais rien sans ma famille, merci p'tit père, merci la p'tite mère. Nadia fait attention à Mickael, il a un regard étrange et en plus il me tape (au club de Sambo !). Ronald, grumo,

Cécile a bien du courage de te supporter. Frère, que de chemin parcouru depuis les mains brûlées, les deux doigts fendus et le tir du plomb dans l'œil ! Nous sommes tous des râleurs, n'est ce pas père ? (on est Blancquaert ou on ne l'est pas), mais je n'aurais pu espérer meilleure famille.

Dans ce monde si cartésien tout n'est pas forcément explicable, merci à mon ange gardien (qui que tu sois) de m'avoir permis de continuer mon p'tit bonhomme de chemin et de ne pas l'avoir arrêté en ce sombre jour de janvier 2003 ...

Pour finir je voudrais rendre hommage aux deux absents : le Savoyard et Daisy. Sans toi Denis, Termignon la Vanoise n'est plus la même, promis, les frangins ne divulgueront pas l'ingrédient secret de la saucisse !! Avec le frangin, nico et seb, nous irons faire un petit pèlerinage à ton chalet et boire la surprise (supérieur à 70° ?). Je vous rejoindrais un jour, c'est sur, mais pas tout de suite. Gardez moi une place auprès de vous.

Table des matières

INTRODUCTION	3
CHAPITRE 1 : LA SPECTROSCOPIE A CORRELATION DE FLUORESCENCE : FONDEMENTS – DISPOSITIF EXPERIMENTAL	7
A Fondements : origine de la fluorescence	7
A.1 Absorption de la lumière visible	7
A.2 Caractéristiques de l'émission de fluorescence	8
B Fondements : aspects théoriques et expérimentaux	14
B.1 Microscopie confocale	16
B.2 Théorie de la FCS	21
B.3 Résolution de la FCS	24
B.4 Théorie de la FCCS	29
B.5 Résolution de la FCCS	29
C Les différents objets étudiés et leurs caractéristiques	33
D FCS : le dispositif classique	39
CHAPITRE 2 : SPECTROSCOPIE A CORRELATION CROISEE SPATIALE DE FLUORESCENCE : GEOMETRIE 1	43
A Etat de l'art	43
B FCCS spatiale trou-trou	46
B.1 Collection du signal de fluorescence	46
B.2 Forme analytique de la fonction de corrélation croisée spatiale	55
C Dispositif expérimental de la FCCS - géométrie 1	56
D Les résultats	59
D.1 Mesures par FCS « classique »	59
D.2 Mesures en FCCS, géométrie 1	62
E Bilan de la FCCS géométrie 1	74
CHAPITRE 3 : SPECTROSCOPIE A CORRELATION CROISEE SPATIALE DE FLUORESCENCE : GEOMETRIE 2	77
A Etat de l'art	78
B FCCS spatiale trou anneau	82
B.1 Illumination laser et fonction d'efficacité de collection	82
B.2 Les volumes d'observation et la fonction de corrélation croisée	85
C Dispositif expérimental de la FCCS - géométrie 2	88
C.1 Vue d'ensemble	88

C.2	Les détecteurs	89
	Fabrication	89
D	Résultats	92
D.1	Résultats avec la Rhodamine 6G	94
D.2	Résultat avec les nanobilles fluorescentes	96
D.3	Etude avec des membranes de vésicules	99
E	Bilan de la FCCS géométrie 2	101
CHAPITRE 4 : SPECTROSCOPIE A CORRELATION CROISEE SPATIALE DE FLUORESCENCE : GEOMETRIE 3		103
A	Etat de l’art	104
B	Optique diffractive	105
B.1	Diffractive Optical Elements (DOE)	105
B.2	Modulateur Spatiaux de lumière	113
C	Matériel	115
C.1	Dispositif expérimental de la FCCS - géométrie 3	115
C.2	Le modulateur Spatial de Lumière (SLM)	116
D	Mise en forme de l’illumination au foyer d’un objectif et fonction de corrélation croisée en présence d’un flux	119
D.1	Mise en forme de l’illumination au foyer d’un objectif	119
D.2	Fonction de corrélation croisée en présence d’un flux	122
E	Résultats expérimentaux	123
E.1	Mesure d’un flux	123
F	Bilan de la FCCS géométrie 3	127
CONCLUSION ET PERSPECTIVE		129
BIBLIOGRAPHIE		133
ANNEXE 1		143
ANNEXE 2		149
ANNEXE 3		151
PUBLICATIONS		157

Introduction

La compréhension de la relation fluctuation-relaxation en thermodynamique a fait une grande avancée avec l'arrivée de la physique statistique. La théorie du mouvement brownien, présentée par Einstein en 1905, n'établit pas seulement une compréhension des conséquences de la présence d'un atome, mais elle ouvre aussi la voie de l'étude des systèmes proches de l'équilibre. Les premières expériences qui viennent « appuyer » cette théorie sont l'œuvre de Perrin. Il a observé avec un microscope le mouvement de particules browniennes. Les propriétés dynamiques macroscopiques (la viscosité du fluide) sont dérivées des fluctuations microscopiques (la diffusion des sondes). Les spécialistes de l'époque (début du XX^{ème} siècle) ont mis en évidence l'importance de la réduction de la taille des échantillons. La formulation explicite du théorème de fluctuation-relaxation montre que la dynamique qui gouverne la relaxation d'un système hors équilibre est compris dans la statistique de l'équilibre. Dans l'esprit de cette théorie, Eigen et al ont développé une technique basée sur le saut de température, où la relaxation du système après une perturbation se remet à l'équilibre thermodynamique.

D'autres méthodes basées sur la perturbation de l'équilibre thermodynamique du système étudié ont été introduites pour mesurer la diffusion de biomolécules. Citons la « Fluorescence Recovery After Photobleaching » (FRAP). Comme son nom l'indique la méthode consiste à étudier la dynamique du retour de la fluorescence après blanchiment des fluorophores. Cette technique photo destructive est très largement utilisée dans le milieu de la biologie, elle a notamment permis l'analyse de la dynamique membranaire de cellules.

Une autre méthode largement utilisée pour l'étude des changements d'échelles moléculaires (1-10 nm) est le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). Cette technique est basée sur le transfert d'énergie d'excitation entre deux fluorophores (un donneur et un accepteur). Ce transfert d'énergie correspond au recouvrement spectral de l'émission du donneur et de l'excitation de l'accepteur. Avec le FRET on peut notamment suivre l'association de deux molécules qui sont successibles d'interagir.

La FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) est une technique de haute résolution temporelle et spatiale d'analyse de milieux très dilués en biomolécules. En contraste avec les autres techniques basées sur l'analyse de la fluorescence le paramètre de premier intérêt n'est pas l'intensité de fluorescence elle-même mais les fluctuations spontanées d'intensité causées par des écarts par rapport à l'équilibre. Les paramètres physiques qui augmentent les fluctuations du signal de fluorescence sont accessibles par la FCS. Cette technique permet de déterminer une concentration locale, le coefficient de mobilité ...

Positionnement du sujet

La Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence (« Fluorescence Correlation Spectroscopy » ou FCS) est une technique créée au milieu des années 70 par Magde, Elson et Webb. A l'origine, la FCS a été développée pour caractériser la dynamique de processus moléculaires dans des systèmes à l'équilibre thermodynamique. Le dispositif expérimental était relativement simple : une source d'illumination est focalisée sur un milieu d'analyse dont la fluorescence est collectée, puis corrélée temporellement. Les principales applications de cette technique sont les mesures de la constante de diffusion et la détermination du nombre de molécules (fluorescentes) dans le milieu d'investigation. Avec l'apparition de la détection confocale dans le dispositif expérimental (H.Qian et E.Elson [11]) la FCS est devenue une technique d'analyse de haute résolution spatiale et temporelle. C'est pour cette raison que cette technique paraît si prometteuse et si séduisante pour les biologistes et les physiciens. Cependant la capacité de discrimination de deux molécules qui diffuseraient avec des constantes de diffusion proches peut être améliorée. La Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence (« Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy » ou FCCS) semble une voie intéressante à suivre. Avec la FCCS le signal est collecté et corrélé entre deux volumes. L'un des premiers dispositifs de FCCS a été créé par Xia [62]. L'idée principale est de réaliser la corrélation croisée temporelle à partir d'un faisceau laser argon séparé en deux par un prisme, l'avancée principale étant que deux faisceaux sont utilisés pour obtenir des informations sur l'environnement local. Depuis l'expérience de Xia d'autres dispositifs ont vu le jour. L'un d'entre eux est la FCCS à deux couleurs, développée en 1997 par P.Schwille [48]. Avec la FCCS à deux couleurs, deux fluorophores sont utilisés pour marquer deux types de molécules susceptibles d'interagir entre elles. Cette technique a prouvé qu'elle pouvait donner des informations sur l'association et la dissociation de deux types de molécules et qu'elle pourrait remplacer la FCS pour ce genre de mesures. La Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence est, selon M. Brinkmeier [59] une technique bien adaptée à la mesure d'un flux dans des microcapillaires. Dans ce dispositif expérimental un faisceau laser est séparé en deux de façon à créer deux volumes de détection de la fluorescence. C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse. Nous sommes partis de l'idée, comme les auteurs précédents, que l'amélioration de la sensibilité de discrimination de deux espèces passait nécessairement par une nouvelle technique comme la FCCS. Le travail de thèse a eu pour but de proposer d'autres géométries expérimentales pour tenter d'augmenter cette sensibilité.

Organisation du manuscrit

Le manuscrit est divisé en quatre chapitres. Dans le premier chapitre nous verrons différentes notions, notamment l'origine de la fluorescence et les préceptes de la microscopie confocale. Il sera également abordé le dispositif « classique » de la Spectroscopie à Corrélation de

Fluorescence : depuis la théorie jusqu'à la réalisation expérimentale. Le terme « classique » est relatif au schéma expérimental couramment utilisé. Pour conclure sur la FCS classique une « simulation » est introduite pour mettre en avant la sensibilité attendue pour les expériences réalisées avec cette technique. La FCS est basée sur la mesure de fluorescence dans un milieu donné. Nous verrons les objets fluorescents utilisés. Nous introduirons la théorie de la diffraction, nécessaire pour comprendre notre troisième géométrie.

Ce travail de thèse est avant tout expérimental. Nous présentons dans trois chapitres les trois dispositifs expérimentaux que nous avons réalisés : i) deux volumes de détection identiques simplement décalés latéralement, ii) un volume centré entouré d'un volume de détection de forme annulaire et iii) une illumination mise en forme via un Modulateur Spatial de Lumière. Les trois chapitres sont composés de la même manière. La première partie est consacrée aux dispositifs expérimentaux qui ont déjà été développés et leurs applications. Ensuite nous verrons la théorie indispensable pour la compréhension de chaque dispositif. Une partie sera consacrée à la description du dispositif expérimental et aux choix techniques qui ont été faits. Pour finir, nous présenterons les résultats obtenus.

Dans la dernière partie nous ferons le bilan des informations que nous avons pu obtenir avec les différentes géométries expérimentales et nous conclurons sur les perspectives.

Chapitre 1

La Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence : Fondements – dispositif expérimental

A Fondements : origine de la fluorescence

Quand une molécule est portée dans un état excité par absorption d'un (ou plusieurs) photons, le retour à l'état fondamental passe par l'émission de fluorescence, mais d'autres chemins de désexcitation sont aussi possibles comme la Conversion Interne, le Croisement Inter Systèmes, le changement de conformation,

Ces désexcitations sont en compétition avec l'émission de fluorescence si elles se produisent aux mêmes échelles de temps ou à des échelles de temps plus courtes [1-3].

Les différentes propriétés de l'émission de fluorescence, comme le spectre ou le temps de vie par exemple, nous seront utiles pour tirer des informations sur l'environnement local.

A.1 Absorption de la lumière visible

Nous allons voir dans cette partie comment se comporte (électroniquement) une molécule organique lors d'une excitation par la lumière.

On rappelle rapidement qu'une transition électronique est le passage d'un électron d'une orbitale occupée dans l'état fondamental à une orbitale non occupée et ceci par absorption d'un photon ($h\nu$).

En spectroscopie, deux types d'orbitales vont nous intéresser :

- l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie
- l'orbitale moléculaire libre de plus basse énergie

Considérons deux électrons de spins opposés, tous deux appartenant à la même orbitale moléculaire d'une molécule à l'état fondamental. Le nombre quantique (de spin) vaut zéro dans cette configuration ($S = \sum_i S_i$ avec $S_i = \pm \frac{1}{2}$). Quand l'un des deux électrons est « envoyé » vers une orbitale moléculaire de plus haute énergie, son spin est normalement inchangé, donc le nombre quantique S reste égal à zéro.

La valeur $2S+1$ s'appelle la multiplicité, elle est égale au nombre de valeurs que peut prendre M : $M=S, S-1, \dots, -S$. Pour deux électrons, la valeur $2S+1$ est 1 ou 3, les termes résultants sont appelés singulet ou triplet.

Notons que l'orbitale de l'état fondamental est notée S_0 , celle des états excités sont respectivement $S_1, S_2, \dots, S_n$ (ceci est reporté sur la figure 1.1 ci-dessous).

En accord avec la règle de Hund (voir par exemple [1]), l'état triplet a une énergie moins importante que celle de l'état singulet de la même configuration.

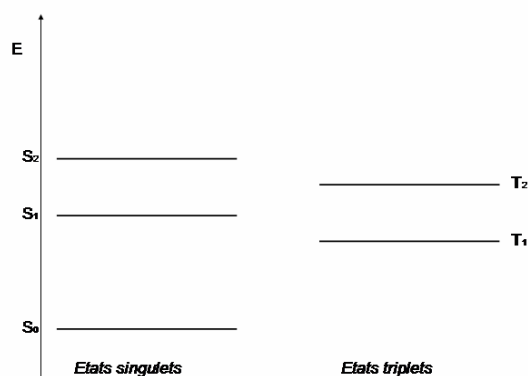


Figure 1.1 : Représentation schématique des niveaux d'énergie. L'état fondamental est noté S_0 et les états excités, S_1, S_2 . Les états triplets sont T_1 et T_2

A.2 Caractéristiques de l'émission de fluorescence

Le diagramme de Jablonski permet une visualisation générale des processus envisageables après l'absorption (voir figure 1.2). Sur le diagramme, les temps caractéristiques de chaque processus sont reportés.

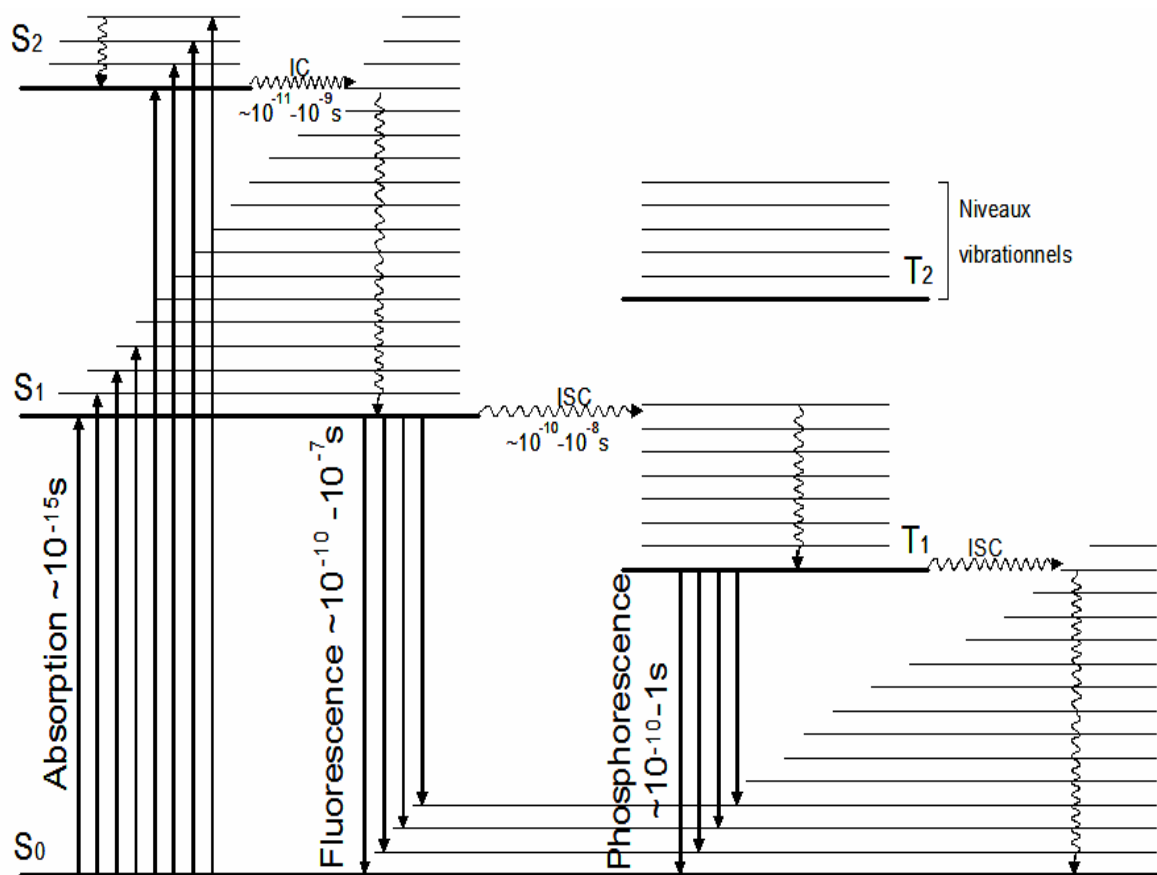


Figure 1.2 : Schéma typique (diagramme de Jablonski) des différents chemins de désexcitation qui suivent l'absorption d'un photon. Les temps caractéristiques de chaque processus sont indiqués, avec IC et ISC (respectivement 'Internal Conversion' et 'Croisement inter système'). Les états électroniques singulets sont notés S0, S1, S2 et les états triplets T1, T2.

Nous allons voir maintenant, de façon qualitative, les différentes voies de désexcitation possibles. Elles peuvent, soit se classer dans la catégorie des transitions radiatives ou dans la catégorie des transitions non radiatives.

Transitions non radiatives

Conversion Interne ('Internal Conversion IC')

C'est une transition entre deux états électroniques de même multiplicité de spin. La *Conversion Interne* conduit par exemple les molécules excitées du deuxième état singulet S₁ au premier état singulet S₀ (voir figure 1.2). Ce processus se produit à des échelles de temps de l'ordre de 10⁻¹¹-10⁻⁹ secondes.

Croisement inter systèmes (ISC)

Contrairement à la *Conversion Interne*, le *Croisement inter systèmes* est une transition entre deux niveaux vibrationnels de même énergie appartenant à deux états électroniques de multiplicités différentes.

Prenons l'exemple d'une molécule excitée dans le niveau vibrationnel 0 de l'état singulet S_1 . Elle peut atteindre le niveau vibrationnel de même énergie dans l'état triplet T_n ($n=1$ ou 2 dans la figure 1.2), puis la *relaxation vibrationnelle* la conduit vers le niveau vibrationnel de plus bas niveau de T_n . Le *Croisement inter systèmes* peut être plus rapide que les autres voies de désexcitation de S_1 , notamment la *Fluorescence* (abordée dans la partie transition radiative). Son échelle de temps est de l'ordre de 10^{-9} - 10^{-7} secondes.

Pour une étude plus approfondie des processus non radiatifs, on peut citer les travaux de Biscon [44]

Transitions radiatives

Fluorescence

C'est le processus de désexcitation qui nous intéresse. L'émission de *Fluorescence* est provoquée par la relaxation des molécules excitées de l'état singulet S_1 vers S_0 .

Notons que mis à part quelques exceptions, l'émission de *Fluorescence* est « originaire » de S_1 . Comme nous allons le voir, les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence ne sont pas infiniment fins et sont décalés spectralement. Pour tenter de l'expliquer nous allons introduire le principe de Franck-Condon.

Le passage d'une molécule d'un état électronique à un autre est très rapide. Comme le précise l'approximation de Born-Oppenheimer, le mouvement des électrons est plus rapide que celui du noyau. Les mouvements du noyau, telles que la rotation ou la vibration, s'effectuent à des temps de l'ordre de 10^{-13} secondes. Ce temps est grand devant celui de la transition électronique $\cong 10^{-15}$ - 10^{-17} sec. On peut donc dire que la géométrie de la molécule est inchangée pendant une transition électronique.

Du point de vue de la mécanique quantique, pour qu'un saut électronique se produise il faut que les fonctions d'onde associées aux deux états se chevauchent. En mécanique classique il faut que la distance inter nucléaire soit la même. C'est le principe de Franck-Condon.

On va représenter sur un graphique (figure 1.3) les courbes d'énergie potentielle et les niveaux de vibration en fonction de la distance inter nucléaire, q . Une transition ne sera possible que si on peut relier les deux niveaux par une droite verticale.

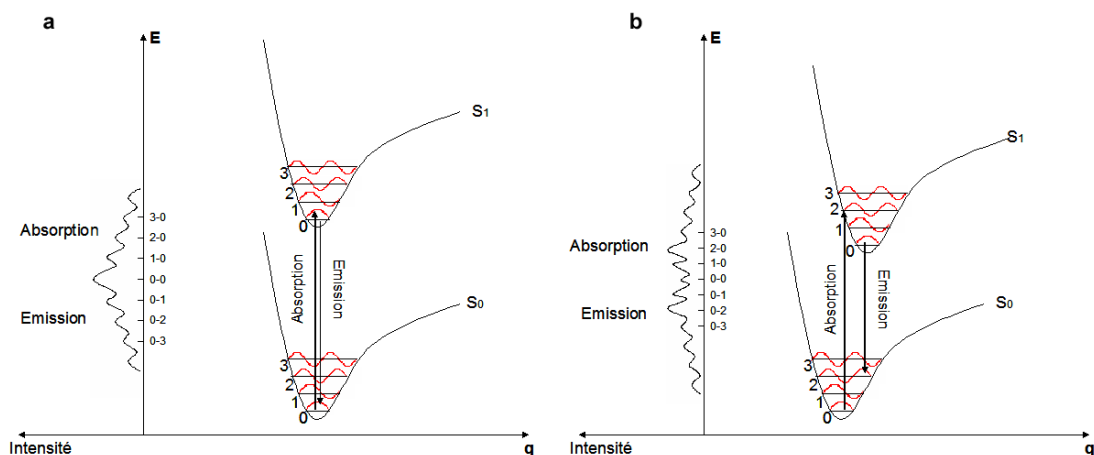


Figure 1.3 : Principe de Franck-Condon représenté par l'énergie potentiel (E) en fonction de la distance inter nucléaire (q). En plus de la transition électronique 0-0 (a), il existe d'autres transitions vibrationnelles qui accompagnent une transition électronique comme 0-2 (b).

A température ambiante la majorité des molécules sont dans le plus bas niveau vibrationnel de l'état fondamental (S₀). En plus de la « pure » transition électronique appelée transition 0-0, il existe d'autres transitions vibrationnelles qui accompagnent une transition électronique. Leurs intensités dépendent de la position relative et de la forme des courbes d'énergie potentielle (voir figure 1.3 (a) et (b)).

L'écart entre le maximum du spectre d'absorption et du spectre d'émission de fluorescence est le déplacement de Stokes, exprimé en nombre d'onde : $\Delta\bar{\nu}$ (figure 1.4). C'est un paramètre important qui peut fournir des renseignements sur les états excités.

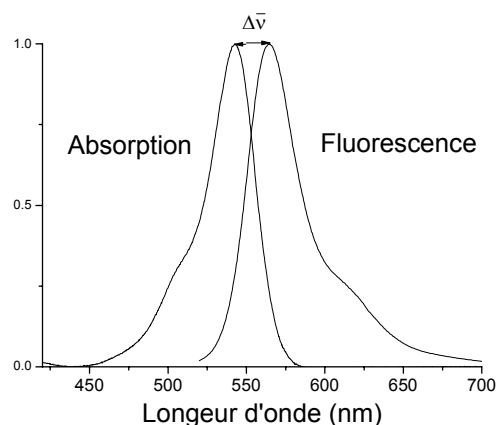


Figure 1.4 : Spectres d'absorption et de fluorescence d'une molécule organique, la Rhodamine B. Spectres obtenus à température ambiante et en solution aqueuse . L'écart entre le maximum du spectre d'absorption et du spectre d'émission de fluorescence est le déplacement de Stokes, exprimé en nombre d'onde : $\Delta\bar{\nu}$.

Concept de rendement quantique de fluorescence

Nous considérons un processus d'absorption d'une molécule à partir d'un état singulet S_0 vers l'état excité singulet de plus basse énergie (S_1). On note k , la constante cinétique du premier ordre, reliée à τ par la relation (1.1) :

$$\tau = \frac{1}{k} \quad (1.1)$$

En S_1 , la molécule peut, comme nous l'avons déjà vu, se désexciter vers l'état fondamental par un processus radiatif (comme la fluorescence) ou par un processus non radiatif. La constante cinétique du premier ordre contient alors une contribution radiative (k_r) et non radiative (k_{nr}) de sorte que :

$$\frac{1}{\tau} = \left(\frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_{nr}} \right) = k_r + k_{nr} \quad (1.2)$$

La durée τ_r du processus radiatif est plus bref que la durée de vie de l'état S_1 et peut être déterminée en utilisant la formule de Strickler et Berg [4], à partir du coefficient d'extinction molaire ε :

$$\frac{1}{\tau_r} = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \tilde{\nu}_f^{-3} \rangle^{-1} \int \varepsilon(\nu) d \ln(\nu) \quad (1.3)$$

avec n : l'indice de réfraction du milieu

$\langle \tilde{\nu}_f^{-3} \rangle^{-1}$: valeur moyenne du nombre d'onde d'émission (en cm^{-1})

ν : nombre d'onde d'absorption (en cm^{-1})

En prenant en compte tous les processus de désexcitation, τ est reliée à k_r et k_{nr} par la relation (1.4) :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1.4)$$

Nous pouvons aussi définir le rendement quantique de fluorescence, ϕ_f , comme étant le nombre de photons émis par fluorescence/nombre de quanta absorbés :

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1.5)$$

Dans le tableau suivant nous avons reporté pour différentes molécules fluorescentes les rendements quantiques de fluorescence.

Molécule fluorescente :	Rendement quantique de fluorescence :
Fluorescéine	0.79
Rhodamine 123	0.90
Rhodamine 6G	0.95
Rhodamine B	0.70
Lucifer Yellow	0.21

Loi de Beer-Lambert

Cette loi nous sera non seulement utile dans le cas de molécules fluorescentes en solution mais aussi dans le cas d'un dépôt métallique sur une surface (voir chapitre 2).

Dans la loi de Beer-Lambert (équation 1.6), une nouvelle grandeur physique est introduite, la densité optique DO. Cette grandeur caractérise l'efficacité d'absorption de la lumière, de longueur d'onde λ , par un milieu absorbant. On peut l'écrire de la façon suivante :

$$DO = \log \frac{I_\lambda^0}{I_\lambda} \quad (1.6)$$

Avec I_λ^0 : Intensité du faisceau incident

I_λ : Intensité du faisceau sortant

Expérimentalement la densité optique peut-être définie comme suit :

$$DO = \epsilon(\lambda) l C \quad (1.7)$$

Avec $\epsilon(\lambda)$: Coefficient d'extinction molaire décadique ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

l : longueur du chemin dans le milieu absorbant.

C : Concentration du milieu (en $mol \cdot L^{-1}$)

Cette loi est en accord avec les observations expérimentales. Il a été constaté en pratique que la densité optique ne suit pas une loi linéaire en fonction de la concentration du milieu. Ceci peut s'expliquer par la présence d'agrégats ou d'autres espèces dans la solution.

Pour des raisons pratiques, nous allons introduire le coefficient d'absorption à la place de la densité optique :

$$a(\lambda) = \frac{DO}{l} = \frac{1}{l} \log \frac{I_\lambda^0}{I_\lambda} \quad (1.8)$$

$$\text{c'est-à-dire } I_\lambda = I_\lambda^0 10^{-a(\lambda)l}$$

En physique le coefficient d'absorption est défini de façon différente de l'équation (1.8), avec le logarithme Népérien. Il est appelé dans ce cas coefficient d'absorption Népérien et s'écrit :

$$\alpha(\lambda) = \frac{1}{l} \ln \frac{I_\lambda^0}{I_\lambda} \quad (1.9)$$

$$\text{c'est-à-dire } I_\lambda = I_\lambda^0 e^{-\alpha(\lambda)l}$$

Notons que $a(\lambda)$ et $\alpha(\lambda)$ ont la dimension de l'inverse d'une longueur.

La loi de Beer-Lambert permet d'introduire la section efficace d'absorption, qui caractérise l'absorption des photons d'une molécule donnée. Elle est définie à partir du coefficient d'absorption Népérien $\alpha(\lambda)$, (équation 1.9), divisée par le nombre N d'entités contenues dans une unité de volume :

$$\sigma(\lambda) = \frac{\alpha(\lambda)}{N} \quad (1.10)$$

B Fondements : aspects théoriques et expérimentaux

La Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence (F.C.S. : Fluorescence Correlation Spectroscopy) a été développée en 1972 par D.Magde, E.Elson et W.W. Webb [5] dans le but de caractériser la dynamique de processus moléculaires dans des systèmes à l'équilibre thermodynamique. C'est aussi une technique d'analyse de haute résolution spatiale et temporelle. Notons qu'un ouvrage a été écrit sur le sujet par R.Rigler et par E.Elson [6]. A la différence d'autres méthodes d'analyse (comme le FRET ou le FRAP par exemple) le paramètre de premier intérêt n'est pas l'intensité émise en moyenne, mais les fluctuations spontanées d'intensité. Ainsi tous les paramètres physiques pouvant participer aux fluctuations du signal de fluorescence, tels que la concentration locale, le coefficient de diffusion ou les réactions intra et intermoléculaires

de biomolécules marquées par un fluorophore sont accessibles par cette technique. La figure 1.5 (tirée de la publication de P.Schwille et E.Haustein [46]) illustre les mécanismes moléculaires intervenant dans le volume d'observation, ils sont susceptibles d'augmenter les fluctuations de fluorescence. Citons le mouvement des particules, le changement de conformation et les réactions physico-chimiques. Le volume confocal d'observation sera décrit dans les trois prochains chapitres.

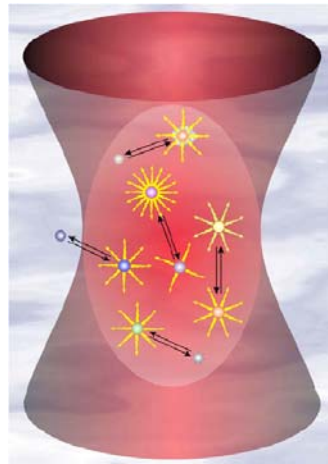


Figure 1.5 : Les mécanismes moléculaires intervenant dans le volume d'observation et susceptibles d'augmenter les fluctuations de fluorescence : le mouvement de particules, changement de conformation et les réactions physico-chimiques

Depuis sa conception il y a trente ans, et plus particulièrement ces dernières années, des avancées techniques et conceptuelles ont étendu le domaine d'application de la FCS. Citons par exemple :

- H.Qian et E.Elson [11] qui ont utilisé une illumination confocale dans leur dispositif expérimental
- P.Schwille et al [48] avec la Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence à deux couleurs
- Widengren et al [59] avec la réalisation de la Spectroscopie à Corrélation Croisée Spatiale de Fluorescence en présence d'un flux.
- Blom et al [98-99] avec le développement d'un système multifocales pour l'étude de biomolécules fluorescentes dans des micro canaux.
- P.F.Lenne [7] avec le développement d'une nouvelle méthode pour la mesure de la direction d'un flux en utilisant un profil de faisceau d'excitation transverse non symétrique.
- Et nous même [8-9] et les chapitres suivants.

Ce chapitre a été organisé de la façon suivante : dans une première partie nous verrons le principe de la microscopie confocale, puis dans une seconde partie nous verrons en détail la technique de la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence. Nous conclurons sur les aspects théoriques avec la résolution limite accessible de cette technique. Finalement nous présenterons notre dispositif expérimental.

B.1 Microscopie confocale

Principe

La paternité de la microscopie confocale revient à Marvin Minsky [16], qui, en 1957 dépose le brevet d'une technique qu'il nommera « Confocal Scanning Microscopy (CSM) ». Dans ce brevet, il pose les bases de la microscopie confocale comme l'illustre la figure 1.6 :

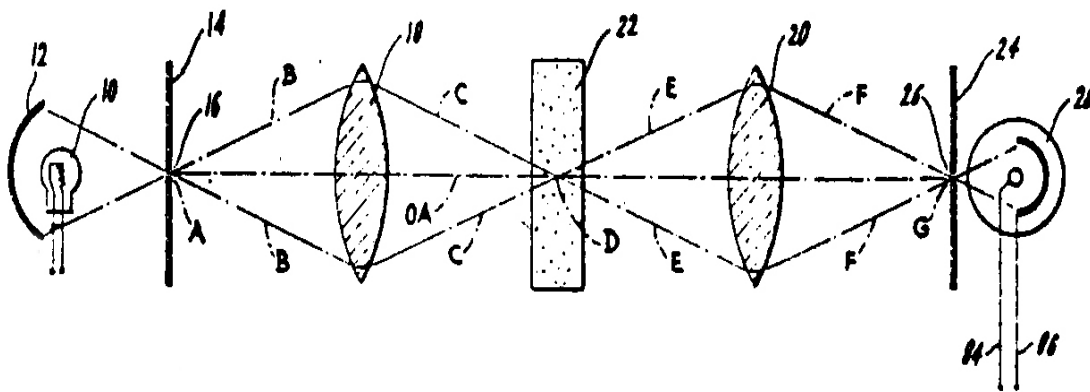


Figure 1.6 : Extrait de la première page du brevet de Marvin Minsky déposé en 1957 sur une technique qu'il nommera « Confocal Scanning Microscopy (CSM) ». Le système est composé d'une lentille (18), d'une ampoule (10) et de son réflecteur (12), ainsi qu'un trou de filtrage (16). L'échantillon (22) est placé au point de focalisation (D). La lumière venant de (22) est collectée par lentille d'objectif (20) et focalisée sur un second trou de filtrage (24). Le faisceau qui passe à travers le deuxième trou de filtrage est récolté par une cellule photoélectrique (28).

Nous allons passer en revue les différents éléments optiques utilisés, puis nous verrons les spécificités de cette invention.

La lentille du condenseur (18) fait l'image du point source, formé par une ampoule (10) équipée d'un réflecteur (12), et du premier trou de filtrage (16) sur une zone (D) de l'échantillon (22). La lumière venant de ce point est collectée par lentille d'objectif (20) elle est focalisée sur un second trou de filtrage (24), pour finir, le faisceau qui passe à travers le deuxième trou de filtrage est récolté par une cellule photoélectrique (28).

L'originalité de ce système inventé par Marvin Minsky, c'est l'utilisation de deux trous de filtrage (pinholes), le premier crée une source ponctuelle à partir d'une source étendue de lumière, laquelle illumine un échantillon et le second trou de filtrage, nommé « pinhole de sortie », sert de filtre spatial pour ne détecter que la lumière qui émerge du spot illuminé dans l'échantillon. Le filtre spatial assure une sélection optimale si le point source, la zone illuminée dans l'échantillon et le pinhole de sortie sont confocaux, c'est-à-dire conjugués, via le condenseur et la lentille d'objectif. Chaque position dans l'échantillon qui n'est pas conjuguée n'est pas seulement sous illuminée due au premier trou de filtrage mais elle ne sera pas non plus focalisée sur le pinhole de sortie. Avec cette sélection spatiale, nous obtenons des informations locales dans l'échantillon étudié.

A partir des années 60-70, le système d'excitation (ampoule, réflecteur et premier trou de filtrage) est remplacé par une source laser. Les sources laser permettent de produire un faisceau peu divergent et, spatialement et temporellement, cohérent.

Depuis les années 80, la microscopie confocale a connu un regain d'intérêt dans le milieu de la biologie, avec notamment l'arrivée d'outils de plus en plus performants pour le traitement des données. Les biologistes ont pu réaliser des images en trois dimensions de grande résolution. On peut aussi noter qu'au cours de ces dernières années de nombreux ouvrages ont été écrits sur le sujet, parmi lesquels [17], [18] et [19].

Le dispositif expérimental du microscope confocal que nous avons utilisé (figure 1.7) diffère un peu de la géométrie introduite par Marvin Minsky. Notre source ponctuelle d'illumination ne sera pas un trou de filtrage en avant d'une ampoule avec son déflecteur, mais un laser. Le pinhole de sortie joue le rôle de filtre spatial. Ainsi, on ne détectera que le signal qui provient du point focal dans l'échantillon (trait continu) et sera rejeté les signaux hors de cette zone (traits en pointillés et tirets).

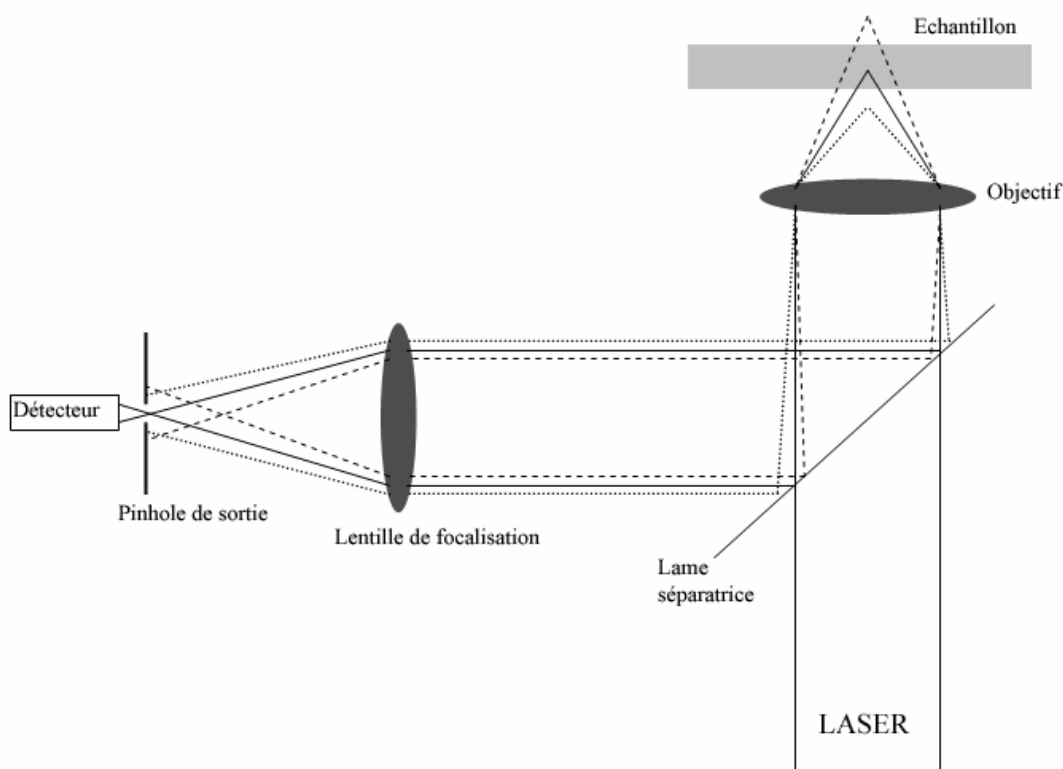


Figure 1.7 : Schéma de principe d'un microscope confocal. Ce dispositif expérimental diffère de la géométrie introduite par Marvin Minsky. La source ponctuelle d'illumination ne sera pas un trou de filtrage en avant d'une ampoule avec son déflecteur, mais un laser. Le pinhole de sortie joue le rôle de filtre spatial. On ne détectera que le signal qui provient du point focal dans l'échantillon (trait continu) et sera rejeté les signaux hors de cette zone (traits en pointillés et tirets).

Volume de détection en microscopie confocale

Les deux paramètres importants en microscopie confocale sont le volume d'observation simplement nommé le volume confocal, et l'intensité d'excitation.

Le volume d'observation dépend du profil de l'excitation laser dans la zone d'analyse et de la taille du pinhole de sortie. Nous verrons pourquoi la taille de ce pinhole est importante.

La distribution spatiale de l'intensité au point de focalisation d'un objectif peut être calculé exactement, ce qui sera l'objet des chapitres suivants. Dans cette partie on va donner l'ordre de grandeur du volume de collection d'un microscope confocal, en prenant comme base les calculs de diffraction dans l'approximation scalaire. Pour des calculs plus « rigoureux » (exactes) il faudra se placer dans l'approximation vectorielle [20].

Le profil de l'intensité lumineuse au voisinage du point de focalisation d'une lentille convergente de diamètre $D=2a$ et de focale f [20] est donné par deux expressions équivalentes (équations (1.11) et (1.12)):

$$I(u,v)=\left(\frac{2}{u}\right)^2 [U_1^2(u,v)+U_2^2(u,v)] I_0 \quad (1.11)$$

et par

$$I(u,v)=\left(\frac{2}{u}\right)^2 [1+V_0^2(u,v)+V_1^2(u,v) - 2V_0(u,v)\cos\left(\frac{1}{2}\left(u+\frac{v^2}{u}\right)\right) - 2V_1(u,v)\sin\left(\frac{1}{2}\left(u+\frac{v^2}{u}\right)\right)] I_0 \quad (1.12)$$

Où $I_0 = \left(\frac{\pi a^2 |A|}{\lambda f^2}\right)^2$ est l'intensité au point $u=v=0$.

Les deux expressions du profil d'intensité au voisinage du point de focalisation ont été écrites en utilisant les coordonnées réduites u et v :

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f}\right)^2 z \text{ (axial)} \quad (1.13)$$

et

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f}\right)^2 r \text{ (radial)} \quad (1.14)$$

$$\text{avec } r = \sqrt{x^2 + y^2}$$

Les équations (1.13) et (1.14) définissent les unités optiques, elles sont sans dimensions. De cette façon les expressions sont indépendantes de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique de l'objectif notée ON. L'ouverture numérique est égale à $n \sin(\alpha)$, avec n est l'indice de réfraction du milieu et α est la moitié de l'angle d'incidence. Dans l'approximation des petits angles $\sin(\alpha) \cong \alpha$.

Les deux expressions (1.11) et (1.12) font intervenir U_1 , U_2 , V_0 , V_1 . Ces termes sont des fonctions de Lommel ([20], [21] et [24]) et s'écrivent [22] et [23] :

$$U_1(u,v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{u}{v}\right)^{2s+1} J_{2s+1}(v) \text{ et } U_2(u,v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{u}{v}\right)^{2s+2} J_{2s+2}(v) \quad (1.15)$$

$$V_0(u,v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{v}{u}\right)^{2s} J_{2s}(v) \text{ et } V_1(u,v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{v}{u}\right)^{2s+1} J_{2s+1}(v) \quad (1.16)$$

Avec J_{2n+1} les fonctions de Bessel (pour plus de détails voir [24]).

Si on remplace (1.15) et (1.16) dans les expressions (1.11) et (1.12), l'intensité dans le plan focal ($u \rightarrow 0$) et l'intensité le long de l'axe optique ($v \rightarrow 0$) seront respectivement :

$$I(0,v) = \left[\frac{2J_1(v)}{v} \right]^2 I_0 \quad (1.17)$$

et

$$I(u,0) = \frac{4}{u^2} [2 - 2\cos(\frac{1}{2}u)] I_0 = \left[\frac{\sin(\frac{u}{4})}{\frac{u}{4}} \right]^2 I_0 \quad (1.18)$$

On retrouve ici la formule d'Airy [25]. Elle sert à définir la résolution latérale ($d_{\min}$) d'un microscope confocal. Cette résolution est donnée par la taille du disque d'Airy :

$$d_{\min} \cong 1.22 \lambda \frac{f}{a} \mu\text{m}.$$

En ce qui concerne la résolution ($z_{\min}$) le long de l'axe optique : une perte de 20% d'intensité est tolérée. La quantité $\left[\frac{\sin(\frac{u}{4})}{\frac{u}{4}} \right]^2$ décroît de cette quantité quand le plan image est décalé de

$$z_{\min} \cong 3.2 \frac{\lambda}{2\pi} \left(\frac{f}{a} \right)^2 \mu\text{m}.$$

Mais quels intérêts d'utiliser la microscopie confocale dans le cadre de la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence ?

Comme il sera précisé dans le paragraphe sur le formalisme de la FCS, plus le nombre de molécules sondées est important, plus l'amplitude des fonctions d'autocorrélation sera faible ($G(\tau) \propto \langle N \rangle^{-1}$). De plus, pour que le rapport signal sur bruit soit le plus important possible, il est indispensable d'optimiser l'excitation des molécules pour que le nombre de photons émis par ces molécules soit le plus grand possible.

C'est dans cet esprit que Qian et Elson [11] ont étudié théoriquement l'apport de la microscopie confocale pour la FCS, puis Kask et Rigler ont réalisé en 1993 les premières expériences de FCS en microscopie confocal [10]. Dans ce cas précis la taille du volume collection est de l'ordre du femtolitre (10^{-15} litre), le faisceau laser d'excitation est focalisé dans une petite région d'espace. Comme le volume d'observation est petit en microscopie confocal le nombre de molécules

sondées sera faible et l'amplitude de la fonction d'autocorrélation sera grande. Dernier avantage, comme le faisceau d'excitation est focalisé, le nombre de photons émis par molécules est grand par rapport aux autres configurations possibles.

La Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence utilisée avec la microscopie confocale a ouvert la porte aux études sur les objets uniques, nous pouvons citer par exemple [26], [27] et [28].

B.2 Théorie de la FCS

Dans cette partie nous allons calculer les fonctions d'autocorrélation, notées $G(\tau)$. La fluorescence émise par des molécules dans le volume focale (voir paragraphe B.1) est enregistrée photon par photon. En supposant une puissance d'excitation constante au cours du temps, les fluctuations du signal de fluorescence peuvent être définies via la moyenne temporelle du signal :

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (1.19)$$

avec

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad (1.20)$$

Si toutes les fluctuations de fluorescence sont dues aux changements de la concentration locale (δC), les variations s'écriront :

$$\delta F(t) = \kappa \int_V I(\vec{r}, z) * S(\vec{r}) \delta(\sigma \phi C(\vec{r}, t)) dV \quad (1.21)$$

avec

κ : l'efficacité de détection de l'ensemble

$I(\vec{r}, z)$: la distribution spatiale de l'énergie d'excitation

$S(\vec{r})$: la fonction optique de transfert de la combinaison

objectif-trou de filtrage. Cette fonction détermine la fonction d'efficacité de collection du système.

$\delta \sigma$: les fluctuations de la section efficace d'absorption

$\delta \phi$: les fluctuations du rendement quantique de fluorescence

$\delta C(\vec{r}, t)$: les fluctuations dans la concentration locale des particules

Les paramètres listés ci-dessous décrivent principalement la probabilité d'exciter un fluorophore animé d'un mouvement brownien dans le volume focale et de détecter les photons ainsi émis. La détermination de tous ces paramètres est difficile. Pour simplifier l'équation (1.21) le terme

$I(\vec{r}, z) * S(\vec{r})$ peut-être combiné en une fonction qui décrit l'Efficacité de Détection des Molécules par le système. Cette fonction sera notée : $MDE(\vec{r})$. Dans la grande majorité des situations cette fonction est décrite par une gaussienne dans les trois directions de l'espace :

$$MDE(\vec{r}) = e^{-2\left(\frac{r}{\omega_R}\right)^2} e^{-2\left(\frac{z}{z_0}\right)^2} \quad (1.22)$$

Les paramètres qui interviennent dans l'équation (1.22) à savoir ω_R et z_0 décrivent la taille du volume confocale. Les paramètres inconnus κ , σ et ϕ peuvent être combinée pour donner un paramètre qui détermine le nombre de photons par molécules et par seconde. Ce paramètre sera noté CRM. Dans ces conditions l'équation (1.21) devient :

$$\delta F(t) = \int_V MDE(\vec{r}) \delta(CRM C(\vec{r}, t)) dV \quad (1.23)$$

La fonction d'autocorrélation normalisée est définie ainsi :

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1.24)$$

Dans les cas les plus fréquemment rencontrés la concentration reste constante dans le système. En injectant l'équation (1.23) dans l'équation (1.24) et en prenant en compte la remarque précédente, la fonction d'autocorrélation devient :

$$G(\tau) = \frac{\iint MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t+\tau) \rangle dV dV'}{\left(\langle C \rangle \int MDE(\vec{r}) dV \right)^2} \quad (1.25)$$

Si on considère seulement des molécules qui diffusent librement à trois dimensions avec le coefficient de diffusion D , le terme $\langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t+\tau) \rangle$ peut être calculé grâce à la fonction de Green [70-74]. La fonction de Green donne la probabilité d'une particule, qui était à la position $\vec{r}$ au temps t , d'être à la position $\vec{r}'$ au temps $t+\tau$:

$$\langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t+\tau) \rangle = \frac{1}{\langle C \rangle (4\pi D \tau)^{3/2}} e^{-\frac{|\vec{r}-\vec{r}'|^2}{4D\tau}}$$

Donc

$$G(\tau) = \frac{e^{-\frac{|\vec{r}-\vec{r}'|^2}{4D\tau}}}{\langle C \rangle (4\pi D\tau)^{3/2}} \frac{\iint MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') e^{-\frac{|\vec{r}-\vec{r}'|^2}{4D\tau}} dV dV'}{\left(\langle C(\vec{r}, t) \rangle \int MDE(\vec{r}) dV \right)^2} \quad (1.26)$$

Nous allons introduire le temps de diffusion : τ_D . Ce temps représente le temps pendant lequel la molécule reste dans le volume d'observation. Il est défini de la façon suivante :

$$\tau_D = \frac{\omega_R^2}{4D} \quad (1.27)$$

En utilisant l'équation (1.27) et en utilisant la définition du volume effectif :

$$V_{eff} = \frac{\left(\int MDE(\vec{r}) dV \right)^2}{\int MDE^2(\vec{r}) dV} \quad (1.28)$$

En utilisant l'équation (1.29), le volume effectif deviendra :

$$V_{eff} = \frac{\left(\int e^{-2\left(\frac{r}{\omega_R}\right)^2} e^{-2\left(\frac{z}{z_0}\right)^2} dV \right)^2}{\int e^{-4\left(\frac{r}{\omega_R}\right)^2} e^{-4\left(\frac{z}{z_0}\right)^2} dV} \quad (1.29)$$

En intégrant l'intégrale (1.29) sur l'ensemble de l'espace, le volume efficace devient : $V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_R^2 z_0$. Finalement on peut calculer la fonction d'autocorrélation $G_{3D}(\tau)$ (simplement écrit $G(\tau)$ dans la suite) pour une espèce diffusant librement à trois dimensions :

$$G_{3D}(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)} \frac{1}{\left(1 + \frac{\omega_R^2 \tau}{z_0^2 \tau_D} \right)^{1/2}} \quad (1.30)$$

La première partie de l'équation (1.30) est égale à l'inverse du nombre de molécule dans le volume confocale. Nous avons représenté sur la figure ci-dessous (1.8) un exemple de courbe d'autocorrélation qu'il est possible d'obtenir expérimentalement. Dans un premier temps nous collectons le signal de fluorescence du milieu d'analyse (figure 1.8 (a)). Ici c'est une solution de Rhodamine 6G diluée dans de l'eau (Concentration, $C=7.5\text{nM}$). La puissance d'excitation à l'entrée de l'objectif est $P=240\mu\text{W}$. Une fois le signal acquis, nous le corrélons comme décrit ci-

dessus, ce qui nous permet d'obtenir la courbe d'autocorrélation représentée figure (1.8(b)). L'ajustement de cette courbe permet d'obtenir des informations sur la taille du volume de collection à travers le temps de diffusion et le facteur « S » ($\tau_D = \frac{\omega_R^2}{4D}$ et $S = \frac{z_0}{\omega_R}$). Ici $S=5.53$ et $\tau_D=21.41\mu s$, connaissant le coefficient de diffusion de la Rhodamine 6G ($2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$), nous pouvons donner de le volume efficace : $V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_R^2 z_0 \cong 0.11 \mu\text{m}^3$. L'ajustement permet aussi d'obtenir des informations sur la concentration du milieu fluorescent à travers le nombre de molécule ($\langle N \rangle = V_{eff} \langle C \rangle$). Dans notre exemple $\langle N \rangle \cong 0.81$ molécules donc $\langle C \rangle \cong 7.34 \cdot 10^{-9} \text{ M}$.

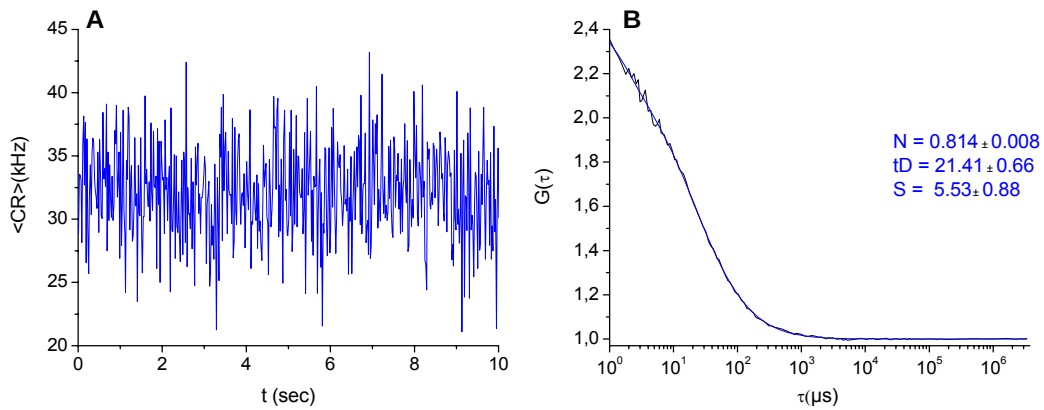


Figure 1.8 : Exemple d'acquisition du signal de fluorescence (A) d'un milieu fluorescent, ici une solution de Rhodamine 6G (concentration 7.4nM). La puissance d'excitation à l'entrée de l'objectif est de $240\mu W$. Après l'acquisition des photons, le signal est corrélé ce qui permet d'obtenir une courbe d'autocorrélation (B). L'ajustement de cette courbe permet d'obtenir des informations sur le nombre moyen de molécule (ici $\langle N \rangle = 0.81$) ou la taille du volume de collection via le temps de diffusion (ici $t_D = 21.4 \mu s$).

B.3 Résolution de la FCS

La précision statistique des mesures de FCS a été traitée par un certain nombre d'auteurs parmi lesquels Koppel [12] (et Annexe2) ou Meseth [31]. La résolution limite de la FCS est de grande importance pour les mesures en biologie où les processus d'agrégation jouent un rôle essentiel pour le fonctionnement de ces systèmes. Dans cette discussion nous allons examiner « théoriquement » quelle précision on peut attendre avec les expériences de FCS.

Nous allons considérer pour notre modèle le cas où deux espèces sont en présence dans le même milieu d'investigation. On fait l'hypothèse qu'elles ont le même rendement quantique de fluorescence. Pour simuler les courbes expérimentales nous calculons les fonctions

d'autocorrélation (les paramètres sont donnés ci-dessous) auxquelles nous rajoutons un bruit statistique et nous les ajustons avec l'équation (1.30). Le critère de première importance dans le cas présent est la différence entre courbe théorique affectée du bruit et la courbe purement théorique, caractérisée par le paramètre $\chi_{réduit}^{(2)}$:

$$\chi_{réduit}^{(2)} = \frac{\chi^{(2)}}{N-p}$$

$$\text{avec } \chi^{(2)} = \sum_i \left[\frac{y - y_i}{\sigma_i} \right]^2 \quad (1.31)$$

et y : la fonction théorique

y_i : données brutes

σ_i : écart-type du point expérimental i

N : nombre de points expérimentaux

p : nombre de paramètres libres

Dans notre étude nous ajusterons les courbes expérimentales « simulées » avec un modèle à une composante et à deux composantes et nous comparerons les $\chi_{réduit}^{(2)}$ pour nous donner une idée de la précision attendue. Pour l'ajustement à une particule $p=2$ ($N=150$) et pour un ajustement à deux particules $p=4$ ($N=150$). Ainsi $N-p$ à une et deux composantes sont comparables, on pourra donc s'affranchir du $\chi_{réduit}^{(2)}$ pour travailler avec le $\chi^{(2)}$.

L'écart type des points expérimentaux sont calculés (Koppel [12], équation 34) en utilisant la fonction de corrélation pour la diffusion. Ainsi la variance s'écrira, conformément à Meseth [31] et al :

$$\sigma^2[G(\tau)] = \frac{1}{M \langle N \rangle^2} \left\{ \frac{(1+G_{2D}^2(\Delta\tau))(1+G_{2D}^2(\tau))}{1-G_{2D}^2(\Delta\tau)} + 2mG_{2D}^2(\tau) \right\}$$

$$+ \frac{1}{M} \left\{ \frac{2(1+G_{2D}^2(\tau))}{\langle N \rangle \langle CR \rangle} + \frac{1}{\langle CR \rangle^2} \left(1 + \frac{G_{2D}^2(\tau)}{\langle N \rangle} \right) \right\} \quad (1.32)$$

Avec $\Delta\tau$: largeur temporelle de la période d'échantillonnage

$M = t/\Delta\tau$: nombre d'intervalles de comptage

$m = \tau/\Delta\tau$

t : durée de l'expérience

$\langle N \rangle$: nombre moyen de molécules

$\langle CR \rangle$: taux de comptage moyen

le calcul est basé sur le signal d'une fonction de diffusion à deux dimensions :

$$G_{2D}(\tau) = \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}$$

L'estimation de σ est seulement une approximation du cas réel mais doit être correcte qualitativement.

Dans la « simulation » on considère que $\omega_r = 0.25\mu\text{m}$, nous avons en moyenne qu'une molécule dans le volume de collection. Pour le coefficient de diffusion, nous avons pris celui de la Rhodamine 6G ($D = 2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$). La durée d'acquisition sera de 26 secondes et le nombre de photons détectés par seconde est 1000 (équivalent : $\langle CR \rangle = 1000 \text{ Hz}$). La figure (1.9) est une illustration de courbe d'autocorrélation « simulée » avec ces paramètres.

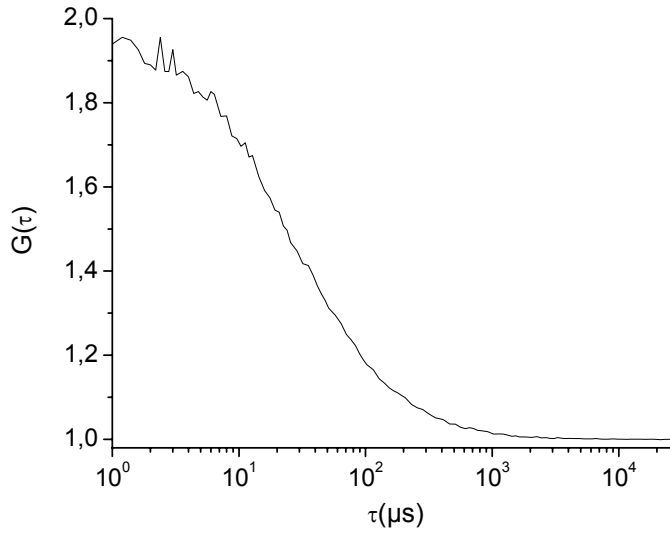


Figure 1.9 : Courbe d'autocorrélation simulée avec $\omega_r = 0.25\mu\text{m}$, $\langle N \rangle = 1$, $\langle CR \rangle = 1\text{kHz}$ et un temps d'acquisition de 26sec. Le temps de diffusion utilisé est celui de la Rhodamine 6G ($D = 2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$). Un bruit est rajouté à la courbe ainsi obtenue.

Nous avons reporté sur trois graphiques (figure 1.10) le résultat des simulations : χ^2 en fonction du rapport τ_{D2}/τ_{D1} . τ_{D2} et τ_{D1} sont respectivement les temps moyens de passage de l'espèce 2 et 1 à travers le volume de collection. Sur la figure 1.10 (a) la proportion de l'espèce 1 dans le milieu est de 50 %, cette quantité est de 30 et 10 % pour les graphiques (b) et (c). Sur la figure (1.10) les courbes noires représentent χ^2 en fonction du rapport τ_{D1}/τ_{D2} avec le modèle « diffusion d'une

seule espèce » et les courbes rouges représentent l'ajustement avec le modèle « diffusion de deux espèces ».

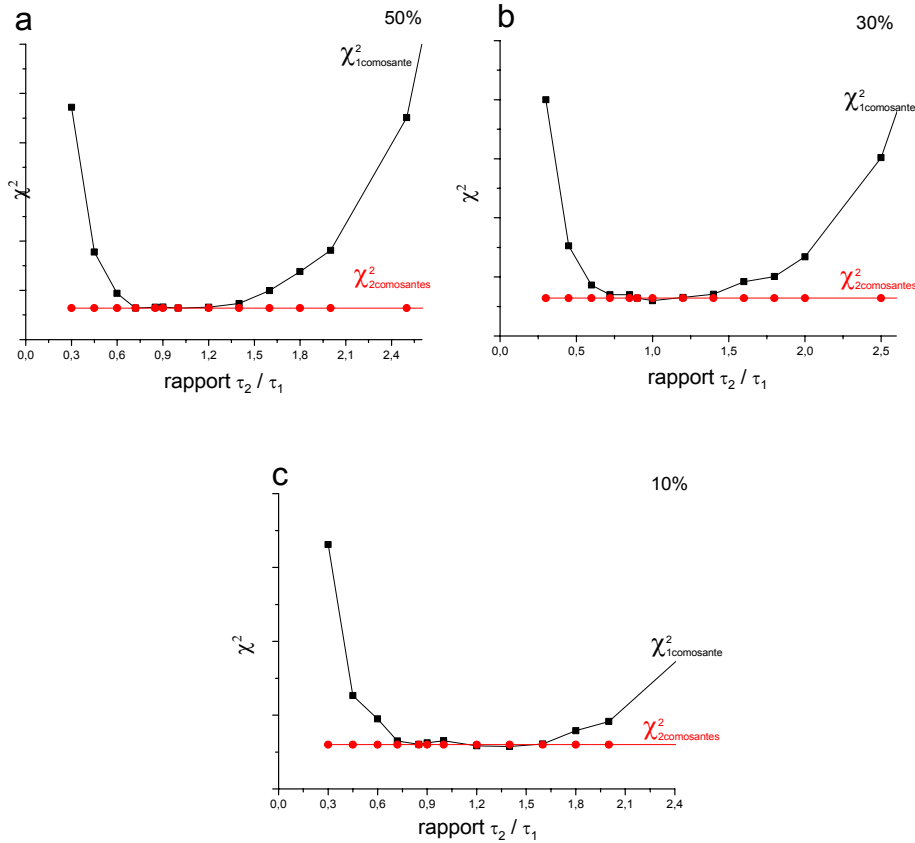


Figure 1.10 : Résultat des simulations : χ^2 en fonction du rapport τ_{D2}/τ_{D1} . τ_{D2} et τ_{D1} sont respectivement le temps moyen de passage de l'espèce 2 et 1 à travers le volume de collection. Dans la simulation τ_{D2} τ_{D1} est fixe (25 μ s) et τ_{D1} est variable. Deux ajustements ont été utilisés, le modèle à une composante (courbes rouges) et le modèle à deux composantes (courbes noires). Les trois courbes correspondent à trois proportions de l'espèce 2 par rapport à l'espèce 1 : 50% (a), 30%(b) et 10%(c).

Nous allons dans un premier temps définir les conditions pour abandonner l'ajustement à une composante au profit d'un ajustement à deux composantes. Le critère du choix du modèle d'ajustement est le suivant : pour comparer les valeurs du χ^2 obtenus avec les deux modèles, on utilise le paramètre F, introduit par Meseth [31]. F est simplement le rapport entre le χ^2 obtenu avec le modèle à une composante et le χ^2 obtenu avec le modèle à deux composantes. En pratique il est admis d'abandonner l'ajustement à une composante quand $F \geq 1.4$.

D'après ce critère, la résolution limite des expériences de FCS serait donnée pour un rapport τ_{D2}/τ_{D1} supérieur à 1.6, comme on peut le voir sur la figure 1.10 (dans notre modèle : $\langle CR \rangle = 1\text{kHz}$) et ceci pour une proportion de l'espèce 1 de 50%. Nous avons reporté sur la figure 1.11(a) le rapport τ_{D2}/τ_{D1} minimal pour discerner les deux espèces, en fonction de la proportion de l'espèce 1 dans le milieu ($\langle CR \rangle = 1000\text{Hz}$). Quand l'espèce 1 devient largement minoritaire devant l'espèce 2, il faut que τ_{D2}/τ_{D1} soit bien plus important que 1.6. Pour une proportion de 10% de l'espèce 1, il est indispensable que le rapport soit supérieur à 2.2 (pour $\langle CR \rangle = 1000\text{ Hz}$). Sur la figure 1.11 (b) le nombre moyen de photons collectés par seconde est de 500. Si on compare les deux graphiques (figure 1.11 (a) et (b)), on constate que si le $\langle CR \rangle$ est moins important, alors τ_{D2}/τ_{D1} devra être plus grand à même proportion de l'espèce 1 dans le milieu.

En conclusion, il faut retenir la possibilité de travailler avec des fluorophores ayant un rendement quantique de fluorescence élevé (comme la Rhodamine 6G par exemple), pour être le plus proche possible de la résolution maximum de la FCS ($\tau_{D2}/\tau_{D1} = 1.6$). La seconde conclusion, c'est l'objectif de cette thèse, c'est l'investigation de nouvelles méthodes pour améliorer cette résolution. Nous verrons les pistes qui ont été choisies (chapitres 2, 3 et 4).

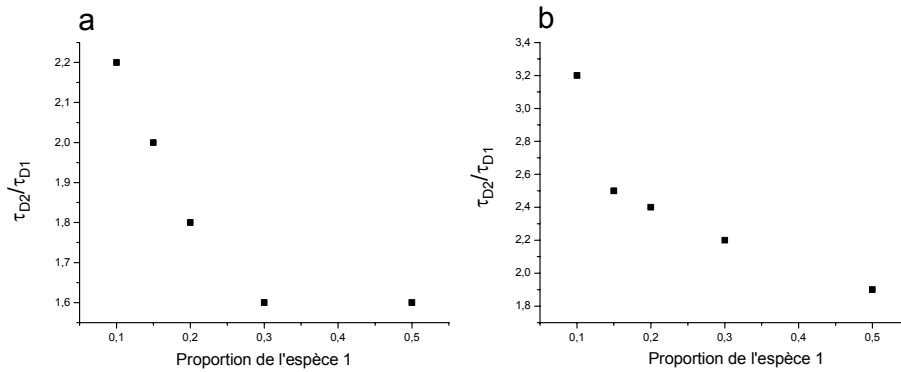


Figure 1.11 : Graphiques représentant τ_{D2}/τ_{D1} minimum (test de « F ») pour discriminer les deux espèces en solution. Sur la partie gauche (a), le nombre de photons collectés par seconde vaut 1000 (1kHz), sur la partie droite (b) il est de 500 (0.5 kHz). La discrimination des deux espèces en solution dépend du taux de comptage (nombre de photons collectés par seconde).

B.4 Théorie de la FCCS

De la même manière que pour la FCS nous allons donner la fonction de corrélation croisée que nous reverrons au cas par cas pour chaque géométrie de FCCS.

La fonction de corrélation croisée peut être formulée en utilisant la fonction de Green ($\psi(\vec{r}, \tau)$) pour la cinétique de diffusion [70-74].

$$\psi(\vec{r}, \tau) = \frac{\langle C \rangle}{(4\pi D \tau)^{3/2}} e^{-\frac{|\vec{r}|^2}{4D\tau}} \quad (1.33)$$

Avec $\langle C \rangle$ est la valeur moyenne de la concentration de fluorophores en solution, D est leur constante de diffusion. La fonction de Green donne la probabilité d'une particule, qui était à la position $\vec{r}$ au temps 0, d'être à la position $\vec{r}'$ au temps τ . La fonction de corrélation croisée normalisée, $G_{CC}(\tau)$, est obtenue en intégrant le produit des fonctions d'efficacité de détection des molécules des deux volumes ($MDE_1(\vec{r})$ et $MDE_2(\vec{r}')$) par la fonction de Green définie ci-dessus :

$$G_{CC}(\tau) = \frac{\iint MDE_1(\vec{r}) \times MDE_2(\vec{r}') \times \psi(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r} d\vec{r}'}{\langle C \rangle^2 \int MDE_1(\vec{r}) d\vec{r} \times \int MDE_2(\vec{r}') d\vec{r}'} \quad (1.34)$$

Cette fonction dépendra des volumes de collection mis en jeu que nous verrons dans les chapitres 2, 3 et 4.

B.5 Résolution de la FCCS

Une des raisons pour laquelle il est préférable de choisir la FCCS spatiale plutôt que la FCS classique vient du fait que, théoriquement, la spectroscopie à corrélation croisée spatiale de fluorescence possède une meilleure résolution dans la discrimination des espèces en solution. La résolution de la FCS a été présentée au paragraphe B.3. La même étude va être réalisée pour la FCCS spatiale. Nous allons considérer le cas où deux espèces sont en présence dans le même milieu d'investigation, avec deux rendements quantiques de fluorescence identiques.

Le but de cette étude est d'évaluer la sensibilité de FCCS spatiale en présence de deux espèces diffusantes. Des courbes simulées vont être ajustées par un modèle à une composante et un modèle à deux composantes.

Les courbes de la « simulation » sont générées à partir de la fonction de corrélation croisée (chapitre 2, équation 2.9). Les paramètres sont identiques à ceux utilisés au paragraphe B.3

($\langle N \rangle = 1$, $\omega_r \cong 0.25 \mu\text{m}$, $S=5$ et $D=2.8 \text{ cm}^2/\text{s}$) avec $R=0.5 \mu\text{m}$, la durée d'acquisition de l'expérience sera de 26 secondes. Un bruit statistique est ensuite ajouté à ces courbes. Comme pour l'étude de la sensibilité de l'autocorrélation, le critère de première importance est la différence entre la courbe théorique affectée du bruit et la courbe purement théorique. La courbe « simulée » (affectée du bruit) à partir des paramètres précédents est représentée sur la figure (1.12).

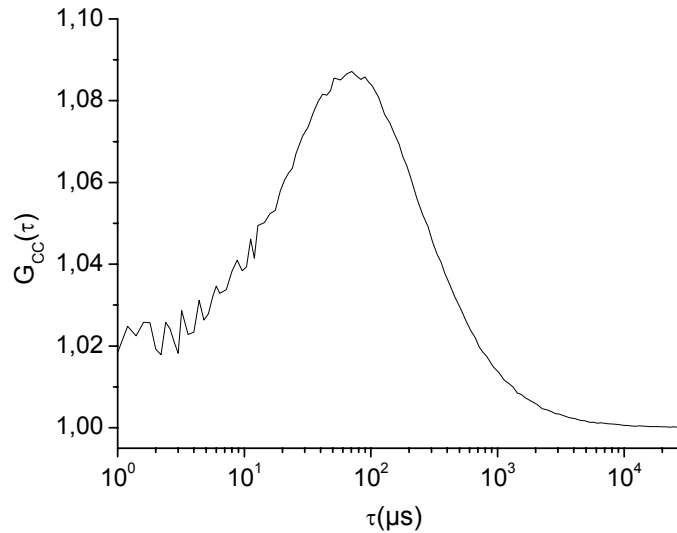


Figure 1.12 : Courbe de corrélation croisée simulée avec $\omega_r=0.25 \mu\text{m}$, $\langle N \rangle=1$, $\langle CR \rangle=1 \text{ kHz}$, $R=0.5 \mu\text{m}$ et un temps d'acquisition de 26sec. Le temps de diffusion utilisé est celui de la Rhodamine 6G ($D=2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$). Un bruit est rajouté à la courbe ainsi obtenue.

Nous avons réalisé quatre « simulations » qui correspondent à quatre proportions de l'espèce 1 dans le milieu d'investigation (espèce 1+espèce 2) : 50% (figure 1.13(a)), 30 % (figure 1.13(b)), 10% (figure 1.13(c)) et 2% (figure 1.13(d)). Les courbes de chaque « simulation » sont ensuite ajustées avec les deux modèles, nous déduisons ainsi le χ^2 . Sur la figure (1.13) les courbes noires représentent χ^2 en fonction du rapport τ_{D1}/τ_{D2} avec le modèle « diffusion d'une seule espèce » et les courbes rouges représentent l'ajustement avec le modèle « diffusion de deux espèces ».

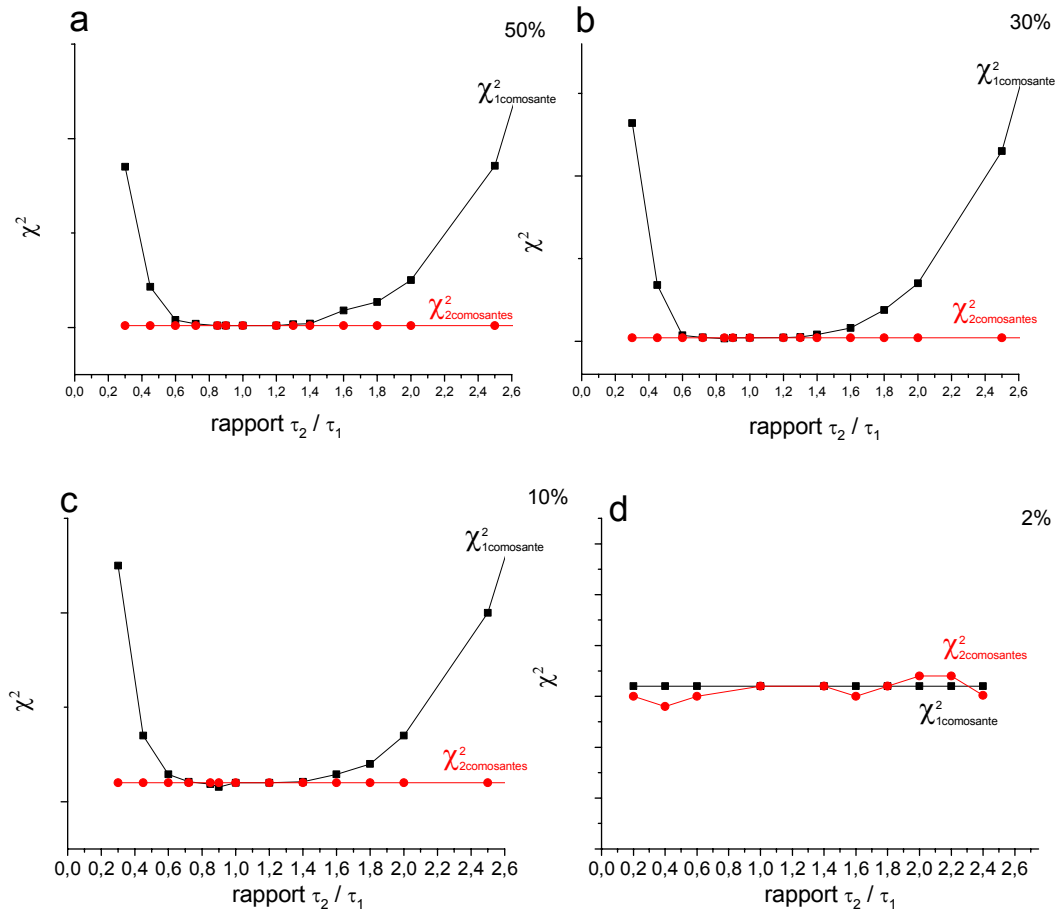


Figure 1.13 : Résultat des simulations : χ^2 en fonction du rapport τ_{D2}/τ_{D1} . τ_{D2} et τ_{D1} sont respectivement le temps moyen de passage de l'espèce 2 et 1 à travers le volume de collection. Dans la simulation τ_{D2} est fixe (25 μ s) et τ_{D1} est variable. Deux ajustements ont été utilisés, le modèle à une composante (courbes rouges) et le modèle à deux composantes (courbes noires). Les trois courbes correspondent à trois proportions de l'espèce 2 par rapport à l'espèce 1 : 50% (a), 30%(b), 10%(c) et 2%(d).

Comme pour l'étude de la FCS, nous allons dans un premier temps définir les conditions pour abandonner l'ajustement à une composante au profit d'un ajustement à deux composantes. Le critère du choix du modèle d'ajustement est le test de F (voir paragraphe B.3).

En observant la courbe 1.13(a) la résolution de la FCCS spatiale sera meilleure que la FCS classique. En effet pour une proportion de 50% de l'espèce 1 dans le milieu (figure 1.13 (a)), le rapport τ_{D1}/τ_{D2} qui donne $F \geq 1.4$ est proche de 1.4 en FCCS contre 1.6 en FCS. Plus la proportion de l'espèce 1 est faible dans le milieu (30% et 10%) et plus le temps de diffusion de

l'espèce 1 devra être grand par rapport à celui de l'espèce 2 pour pouvoir les différencier. Le rapport τ_{D1}/τ_{D2} devra être de 1.6 si seul 10% de l'espèce 1 est présente dans le milieu. Ce résultat est particulièrement encourageant pour la FCCS spatiale, en effet nous avons conclu lors de l'étude de la sensibilité de la FCS que si la proportion de l'espèce 1 devient trop faible (<10%) alors il ne serait plus possible de différencier deux espèces dans le milieu [31]. En FCCS cette limite doit être beaucoup plus basse, mais au moins supérieure à 2% comme l'illustre la figure 1.13 (d).

Pour comparer les sensibilités de la FCCS spatiale et la FCS en présence de deux espèces diffusantes, nous avons reporté le facteur F en fonction du rapport τ_{D1}/τ_{D2} et de la proportion de l'espèce 1 dans le milieu. Le résultat est reporté sur la figure 1.14 (a) 50 % de l'espèce 1, b) 30 % de l'espèce 1, c) 10 % de l'espèce 1).

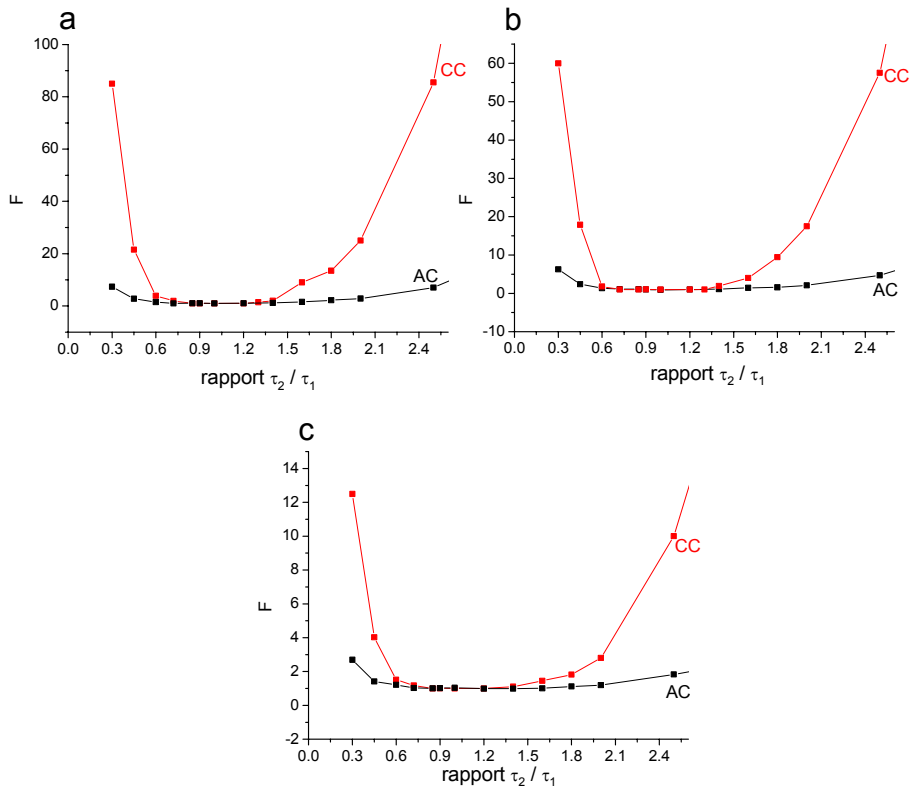


Figure 1.14 : Graphiques représentant le facteur F en fonction du rapport τ_{D1}/τ_{D2} . Les trois courbes correspondent à trois proportions de l'espèce 2 par rapport à l'espèce 1 : 50% (a), 30%(b), 10%(c). Sur chaque graphique, les résultats obtenus par FCS (courbes noires) et ceux obtenus par FCCS (courbes rouges).

La figure 1.14 illustre bien la tendance du facteur F obtenu par FCCS, il prend rapidement de grandes valeurs par rapport au facteur F obtenu par FCS, nous pouvons ainsi espérer obtenir une

meilleure discrimination des deux espèces pour toutes les proportions de l'espèce 1 dans le milieu d'investigation.

Comme l'illustre la figure 1.14, pour les trois proportions de l'espèce 1 dans le milieu d'investigation (50, 30 et 10 %), les valeurs de F obtenues par FCCS spatiale sont plus élevées que celles obtenues par FCS. Nous pouvons conclure que le pouvoir de distinction de deux espèces est meilleur en FCCS spatiale qu'en FCS.

Lors de notre étude sur la résolution de la FCS, nous avons conclu que pour différencier le mieux possible les deux espèces il faut dans la mesure du possible travailler avec des fluorophores ayant un rendement quantique de fluorescence élevé, comme la Rhodamine 6G. Mais il n'est pas toujours évident d'utiliser ce fluorophore, notamment en biologie, où les expériences imposent d'autres colorants. Prenons l'exemple de l'étude de la diffusion dans les bicouches phospholipidiques avec un lipide fluorescent comme le 3,3'-di-octadécylindotricarbocyanine (diI) [56] ou encore le Nile Red [57] qui est un fluorophore utilisé en biologie. Ces deux molécules fluorescentes ont un rendement quantique de fluorescence (beaucoup) plus faible que la Rh6G. En FCCS spatiale nous pourrions nous permettre de travailler avec des chromophores ayant un rendement quantique de fluorescence moins élevé que celui de la Rhodamine 6G.

C Les différents objets étudiés et leurs caractéristiques

Le choix des objets étudiés dépend beaucoup du type d'application recherchée. Pour les premiers essais avec les nouvelles géométries de FCCS, il est nécessaire d'utiliser une molécule fluorescente stable par rapport au photoblanchiment [45], dont les différentes caractéristiques chimiques et physiques sont bien connues. Cette molécule est la Rhodamine 6G (Rh6G) ; nombre de développements et d'études sur la FCS ont été menés avec la Rh6G en solution (eau, éthanol ou méthanol) ; citons J.Widengren [32] pour l'étude de la FCS de l'état triplet en solution ou encore K.Starchev [14] pour la détermination du bruit en FCS ou enfin U.Meseth [31] pour l'investigation de la résolution minimale des mesures de FCS.

Cette thèse a porté sur l'étude et la réalisation d'un instrument novateur, basé sur la FCS, pour l'étude de la diffusion de molécules fluorescentes. Pour mettre en valeur notre nouveau système de détection, nous avons utilisé des objets de tailles nanométriques qui comme la Rhodamine 6G, ont des caractéristiques chimiques connues et ont une section efficace de fluorescence « importante ». Ces objets sont des Nanosphères de polystyrène dopées avec des molécules fluorescentes [33].

L'instrument que nous avons développé (comme la FCS d'ailleurs !) est destiné avant tout au milieu aux biologistes et chimistes. Il était donc nécessaire de le valider à travers des expériences en rapport avec des échantillons biologiques. Les vésicules géantes peuvent être une première approche des cellules. Leur préparation est relativement simple [34], [35], ce genre d'échantillon peut nous donner une idée des problèmes relatifs aux expérimentations avec des objets du vivant.

C.1 La Rhodamine 6G, une molécule organique

Dans les expériences de détection du signal de fluorescence, la molécule « sonde » sera en général une molécule organique, photostable et présentant un bon rendement quantique. La Rhodamine 6G présente ces différents avantages. La structure moléculaire, le spectre d'absorption et de fluorescence dans une solution d'éthanol sont donnés figure 1.15.

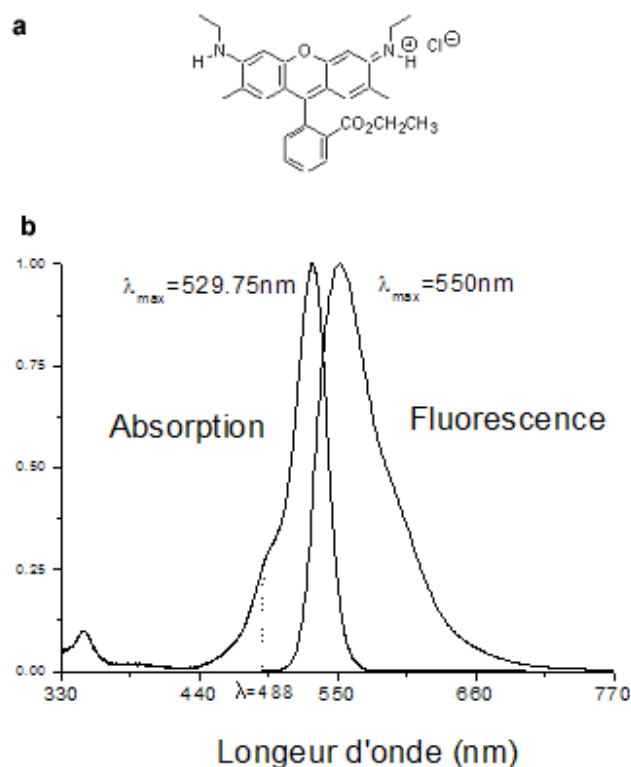


Figure 1.15 : Structure moléculaire de la Rhodamine 6G (a). Les spectres normalisés d'absorption et de fluorescence en solution aqueuse sont représentés en (b). Le maximum du spectre d'absorption se situe à $\lambda_{\text{max}} = 529.75\text{nm}$ et maximum du spectre de fluorescence se situe à $\lambda_{\text{max}} = 500\text{nm}$

Cette molécule a une structure plane et rigide comparable au Xanthène, comme les autres Rhodamines (Rhodamine 123, Green, ...). Le spectre d'absorption (figure 1.15 (b)) présente un

maximum prononcé à la longueur d'onde de 529,75 nm, pour le cas d'une dilution en milieu aqueux. A $\lambda=488$ nm, cette molécule est encore relativement bien excitée, nous pouvons obtenir son spectre d'émission de fluorescence en solution [47].

Son coefficient de diffusion dans une solution aqueuse est $D=2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [47].

Le modèle de dynamique intra moléculaire des molécules de Rh6G [32] est similaire à celui utilisé pour caractériser les fluctuations de fluorescence des molécules immobiles dans une matrice [37-39]. Dans le schéma simplifié suivant (figure 1.16), k_{12} , k_{21} , k_{23} et k_{31} sont respectivement les constantes pour i) l'excitation ii) la désexcitation de l'état singulet iii) le croisement inter systèmes iv) la désexcitation de l'état triplet T.

Il est supposé que le déclin de l'état singulet par fluorescence ou conversion interne est plus rapide que les processus de déclin vers l'état triplet ou le Croisement inter systèmes :

$$k_{21} \gg k_{23}, k_{31}$$

Il faut aussi noter que k_{12} , l'excitation de l'état singulet, peut s'écrire comme le produit de la section efficace d'excitation, σ_{exc} , par l'intensité d'excitation, I .

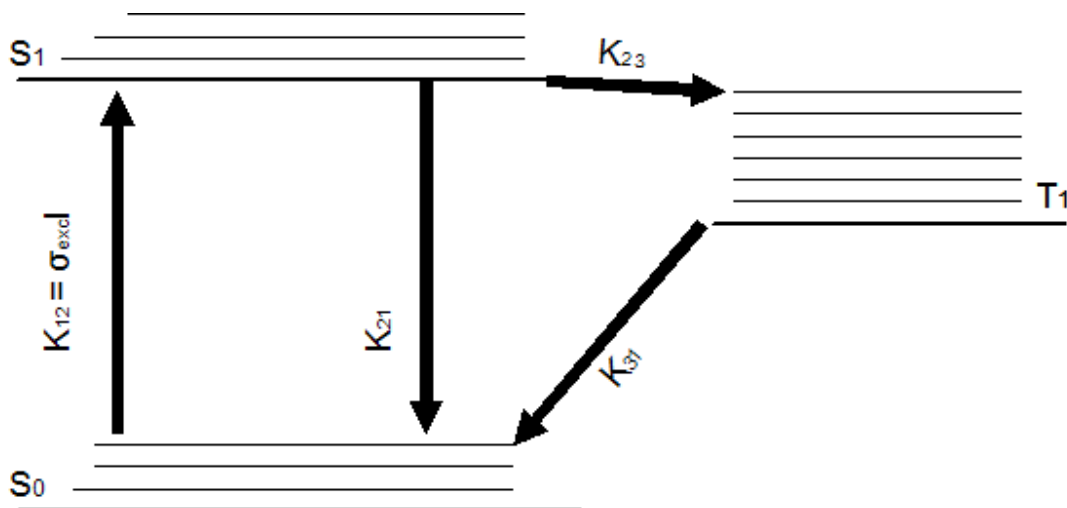


Figure 1.16 : Modèle des états électroniques de la Rhodamine 6G et ses constantes correspondantes. k_{12} , k_{21} , k_{23} et k_{31} sont respectivement les constantes pour i) l'excitation ii) la désexcitation de l'état singulet iii) le croisement inter systèmes iv) la désexcitation de l'état triplet T.

Dans le tableau suivant nous avons reporté à partir des travaux [40][43] les valeurs σ_{exc} , k_{23} et k_{31} de la Rhodamine 6G présente dans différents solvants :

	$\sigma_{\text{exc}} (\times 10^{-16} \text{cm}^2)$	$k_{23} (\mu\text{s}^{-1})$	$K_{31} (\mu\text{s}^{-1})$
Eau	1.8	0.4	0.3
Ethylène Glycol	3	0.64	0.25
Ethanol	1.8	0.42	2.2

C.2 Les Nanosphères

Comme il a été dit précédemment, nous avons utilisé un autre genre d'échantillons. Les Nanosphères proviennent de la société Molecular Probes [4], ce sont des sphères de polystyrène de différentes dimensions, dopées avec des molécules fluorescentes. Notre kit (F8888) est composé de nanosphères dont les diamètres sont 0.02 μm , 0.1 μm , 0.2 μm , 0.5 μm , 1.0 μm et 2.0 μm . Pour nos expérimentations, seules les billes de diamètres de 0.02 μm , 0.1 μm et 0.2 μm seront utilisées. La notice technique précise que les billes fluorescentes de diamètre 20nm présentent une dispersion de taille proche de 20% autour de la valeur annoncée, déterminée par microscopie électronique.

La longueur d'onde d'absorption des chromophores liés aux nanosphères est proche de 488nm et 515nm pour l'émission de fluorescence. Il est aussi précisé que chaque nanosphère émet un signal de fluorescence équivalent à 180 molécules de fluoresceine.

La dernière information importante pour la préparation des solutions est le nombre de billes par unité de volume. Celui ci est donné par Molecular Probes :

$$\text{microsphères/ml} = \frac{6C \times 10^{12}}{\rho \times \pi \times \phi^3} \quad (1.35)$$

Où : C la concentration de billes en suspension (0.02g/ml ici)
 ϕ le diamètre en μm des microsphères
 ρ la densité du polymère en g/ml (1.05 pour le polystyrène)

Cela donne comme concentration, pour les solutions initiales du kit : 4.54×10^{15} billes/ml (0.02 μm), 3.63×10^{13} billes/ml (0.1 μm) et 4.54×10^{12} billes/ml (0.2 μm).

C.3 Les vésicules

Pour commencer à confronter notre nouvel instrument aux difficultés liées aux échantillons biologiques, il a été décidé d'utiliser des vésicules.

Une vésicule est une sphère creuse de taille microscopique (de 0.5 à 100 μ m de diamètre dans le cas des **Giant Unilamellar Vesicles**). Ce « sac » est constitué d'une membrane dont la structure locale est une bicouche phospholipidique (quelque nm d'épaisseur). Cette structuration est due à la propriété d'auto association des phospholipides. Ces molécules sont mises en contact avec de l'eau, elles s'alignent les unes par rapport aux autres pour former deux feuillets bidimensionnels. Les « queues » hydrophobes des phospholipides se trouvent ainsi protégées des molécules d'eau par les « têtes » hydrophiles. Il se forme une lamelle dont les bords instables se referment pour donner une structure de forme sphérique : la vésicule.

Décrivons maintenant la technique de fabrication de ces GUVs :

La technique utilisée est l'électroformation[34][35]. La chambre de préparation est composée de plaques de verres recouvertes d'un film conducteur d'ITO (Indium Tin Oxyde) séparées par un espaceur en téflon. Les lipides, EPC (L- α - phosphatidylcholine) dans notre cas, sont dissous dans un mélange de chloroforme/méthanol (9:1) à la concentration de 0.5mg de lipides/ml. Un volume de 2.5 μ l est déposé sur l'une des plaques de verre conductrices puis le tout est séché par un évaporateur à vide (ou mieux avec un flux d'azote gazeux). Une fois la solution de chloroforme/méthanol évaporée un courant alternatif de 10 Hz, 1V est appliqué au dépôt d'ITO et une solution de sucre est introduite (constituant interne des vésicules) entre les deux plaques de verres. La chambre d'électroformation est placée sur un microscope inversé (IX70) et la croissance des vésicules est observée par l'intermédiaire d'un objectif à contraste de phase (40 $\times$, ON 0.60). Sur la figure 1.17 nous voyons une coupe schématique d'une vésicule.

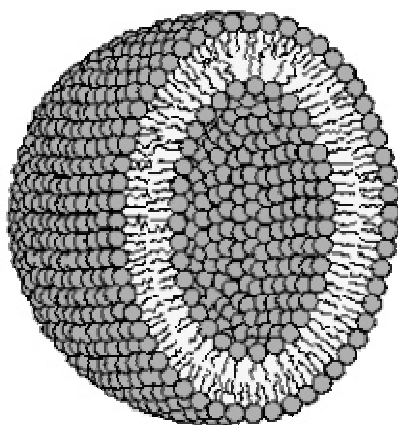


Figure 1.17 : Schéma de la coupe transversale d'une vésicule

Les sondes fluorescentes telles que le Bodipy-PC ou DiI-C₂₀ sont éventuellement ajoutées à la solution initiale de lipides. Il sera ainsi possible d'analyser les différentes phases de la membrane [36] telles que la phase fluide, spatialement arrangée ou saturée en Cholestérol. En ce qui concerne nos expériences, les vésicules sont formées comme décrit plus haut (sans aucun colorant) puis une solution de Rhodamine 6G de concentration nano Molaire (20 nM en général)

est ajoutée. Les molécules de Rhodamine 6G (hydrophobes) vont de préférence rentrer dans la membrane de la vésicule qui est aussi hydrophobe. L'analyse de la diffusion de cette molécule fluorescente nous renseignera localement sur la viscosité de la membrane lipidique.

C.4 Coefficient de diffusion. Equation de Stokes-Einstein

C'est au cours de sa thèse portant sur l'étude du coefficient de diffusion d'une particule de « stokes » animée d'un mouvement brownien dans un liquide au repos qu'Einstein a introduit l'équation maintenant connue sous le nom d'équation de Stokes-Einstein. Cette équation est maintenant connue sous le nom d'équation Stokes-Einstein. Ce résultat fait partie de sa publication sur la théorie du mouvement brownien (1905).

Einstein a montré que le coefficient de diffusion D d'une particule sphérique de rayon a dans un fluide de viscosité dynamique η à la température absolue T est :

$$D = \frac{RT}{N_A} \frac{1}{6\pi\eta a} \quad (1.36)$$

où R est la constante des gaz parfaits

N_A est le nombre d'Avogadro

Le coefficient de diffusion déterminé par cette formule ne sera valable que pour une particule sphérique. En pratique, les molécules fluorescentes que nous étudions, telle que la Rhodamine 6G (figure 1.18 (b)), ne sont pas sphériques. Le rayon qui est pris en compte dans cette situation est la taille apparente de la particule en mouvement dans le fluide (figure 1.18 (a)). Ce rayon est appelé rayon hydrodynamique et noté R_H . Sur la figure 1.18 (b)) la structure cristallographique de la Rhodamine 6G est représentée avec sa taille et le cercle de rayon R_H .

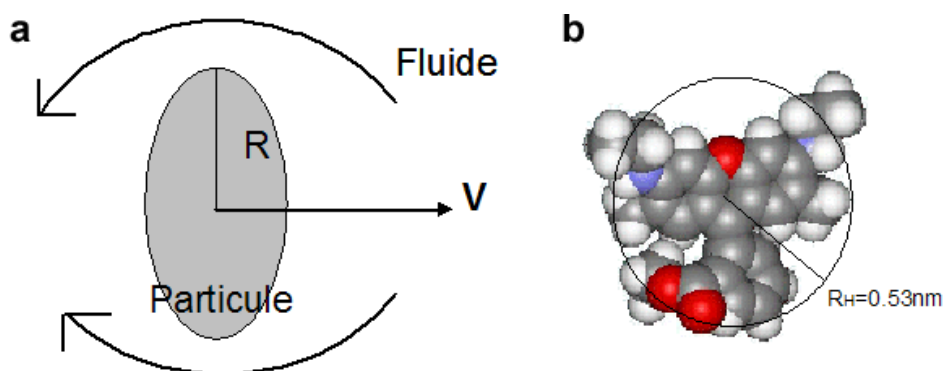


Figure 1.18 : (a) Définition du rayon hydrodynamique R . La particule se déplace avec une vitesse V dans un fluide. (b) Le rayon hydrodynamique de la Rhodamine 6G : $R_H = 0.53 \text{ nm}$

La masse M de la particule en question peut s'écrire en fonction de sa masse volumique ρ et de son rayon hydrodynamique : $M=4/3\pi\rho R_H^3$. Dans la formule d'Einstein le rapport des constantes R/N_A est égale à la constante de Boltzmann k_B . La formule qui donne le coefficient de diffusion peut donc se réécrire :

$$D=\frac{k_BT}{6\pi\eta R_H}$$

ou

$$D=\frac{k_BT(4/3\pi\rho)^{1/3}}{6\pi\eta M^{1/3}}$$
(1.37)

De la deuxième expression nous remarquons que le coefficient de diffusion varie comme l'inverse de la masse à la puissance 1/3. En conséquence, deux molécules l'une de masse M_1 et une autre de masse M_2 auront un rapport de coefficient de diffusion de 0.8.

D FCS : le dispositif classique

Nous allons présenter dans ce paragraphe le dispositif classique de la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence. C'est ce type de géométrie qui est largement utilisé. Notons que cette version va nous servir de point de départ pour nos différents développements expérimentaux. Nous décrirons les différents composants optiques et électroniques qui la composent.

La figure 1.19 représente une version d'ensemble de cette réalisation expérimentale. Ce système peut-être partagée en 3 parties :

- 1) L'excitation
- 2) Le microscope (confocal)
- 3) La détection

Ces trois parties vont être décrites successivement. Dans les chapitres suivants nous expliquerons comment le système « excitation-détection » va être modifié pour, à partir du dispositif classique de la FCS, réaliser de nouveaux développements pour la Spectroscopie à Corrélation Croisée spatiale de Fluorescence. Nous verrons notamment dans le dernier chapitre une façon originale d'exciter les molécules fluorescentes avec un modulateur spatiale de lumière.

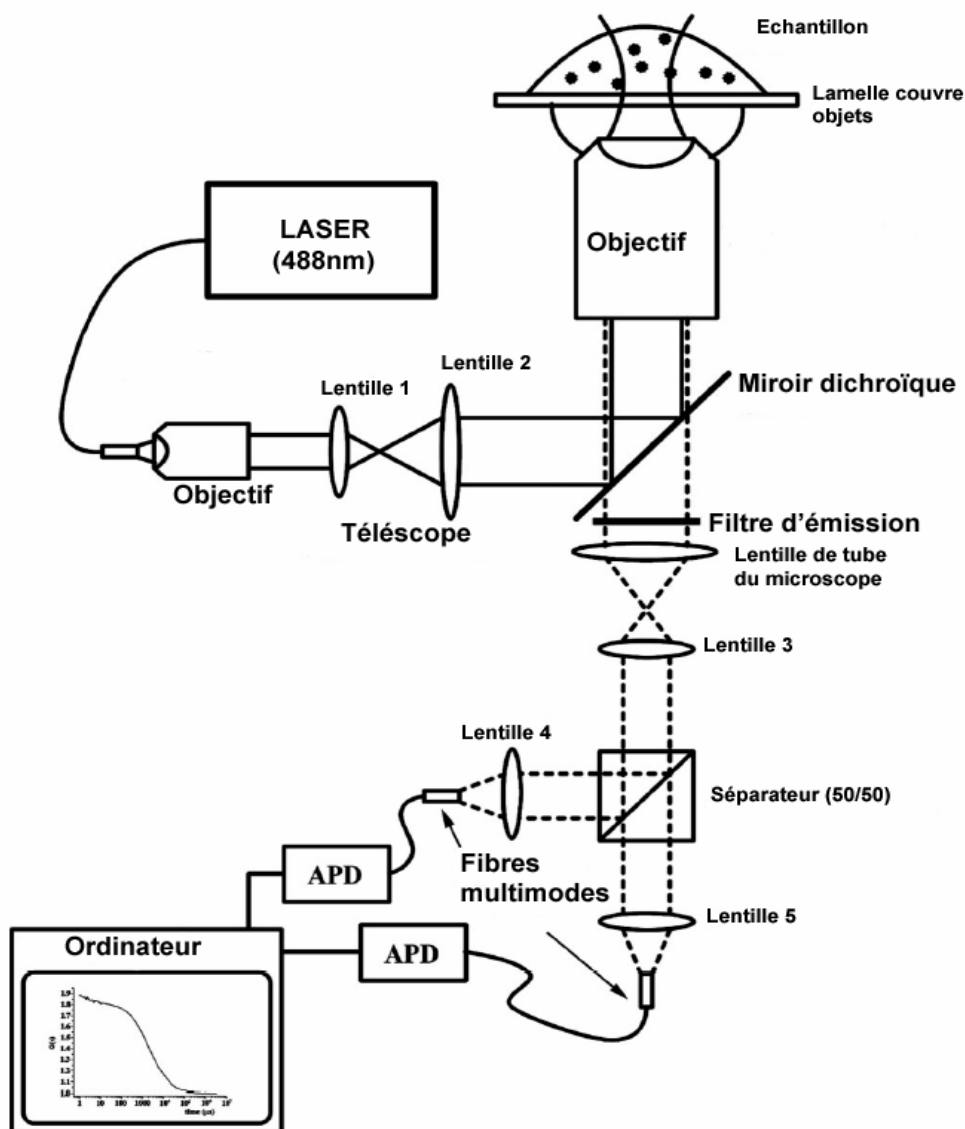


Figure 1.19 : Schéma du dispositif expérimental pour les expériences de FCS classique.

Pour les développements expérimentaux, deux sources lasers ont été utilisées. La première source est un laser Argon commercialisé par LASOS, les longueurs d'onde de l'Argon (476.5 , 488.0, 496.5 et 514.5 nm), nous exploiterons la longueur d'onde $\lambda = 488$ nm. A cette longueur d'onde, les molécules étudiées (Rhodamine 6G, nanobilles) sont efficacement excitées, la puissance continue disponible est proche de 80mW. La seconde source est un laser solide KYMA 488 commercialisé par MELLES GRIOT, il émet une seule longueur d'onde à 488nm, avec une puissance continue de 20 mW. Le laser est couplé à une fibre monomode, elle nous servira de source ponctuelle pour nos expériences. La source fibrée va nous procurer une référence de position pour les réglages optiques du dispositif, la source ponctuelle ne se déplacera jamais

spatialement d'une expérience à l'autre. Cette source est éventuellement atténuée par un filtre neutre à dépôt métallique d'épaisseur variable. Quand le laser Argon est utilisé comme source d'excitation des molécules, un filtre spectral est nécessaire pour sélectionner les longueurs d'onde. Le faisceau laser est ensuite agrandi grâce à un télescope composé de deux lentilles. Elles sont choisies pour permettre à la pupille d'entrée de l'objectif d'être correctement illuminée (voir aussi chapitre 2). Dans le cas présent nous utilisons des doublets, Lentille 1 et Lentille 2 qui ont respectivement comme focale $f_1 = 25\text{mm}$ et $f_2 = 60\text{mm}$, ce qui donne un grandissement du faisceau de $G_t = \frac{f_2}{f_1} = 2.4$, amenant ainsi le diamètre du faisceau de 0.6mm à 1.4mm. Il reste plus petit que la pupille d'entrée de l'objectif, de façon à ne pas tronquer le faisceau.

Le faisceau laser ainsi grandi est ensuite envoyé, via un périscope, vers un miroir dichroïque (U-MNB2, OLYMPUS) incliné à 45° . Ce miroir réfléchit la longueur d'onde d'excitation ($\lambda = 488\text{nm}$) mais en transmission il se comporte comme un filtre passe-haut qui ouvre à partir de $\lambda = 520\text{nm}$ (fluorescence de l'échantillon). Le faisceau laser réfléchi est focalisé par un objectif de grande ouverture numérique, $ON = 1.2$, $\times 60$, c'est un objectif à immersion à eau (UPLAPO60XW3, OLYMPUS) possédant une bague de correction de l'épaisseur de la lamelle de verre (0.13 à 0.21 μm). La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite collectée par le même objectif, traverse le miroir dichroïque puis est séparée en deux par un cube séparateur 50/50. Chaque faisceau est injecté dans une fibre optique.

La principale caractéristique de ce dispositif expérimental est que le pinhole de sortie (du microscope confocal) est assuré par le cœur d'une fibre optique multimodes de diamètre de cœur 100 μm (notons son rayon r_{pinhole}). Il est donc nécessaire d'adapter la taille du disque d'Airy à la taille du pinhole de sortie. Le grandissement est assuré par l'objectif et par un deuxième télescope de grandissement G_t^2 . Compte tenu de l'ouverture numérique de notre objectif, la taille du rayon du disque d'Airy : $r_{\text{Airy}} = 0.61 \frac{\lambda}{ON} \approx 0.255 \mu\text{m}$. Pour que la détection soit confocale il faut

que $\frac{r_{\text{pinhole}}}{60 \times G_t^2} \approx r_{\text{Airy}}$, soit G_t^2 proche de 3. Le télescope 2 est composé de deux lentilles : lentilles 3 et lentille 4. La lentille 5 est identique à la lentille 4 mais sur la seconde voie de détection. Parmi les focales possibles nous avons choisi $f_3 = 10\text{mm}$ pour la lentille 3 et $f_4 = f_5 = 30\text{mm}$ pour la lentille 4 et la lentille 5.

Le détecteur utilisé est une photodiode à avalanche en silicium (SPCM-AQR-13, PerkinElmer). Son efficacité quantique est de 0.65 à 650 nm, son bruit d'obscurité est proche de 250 coups/sec, son entrée est fibrée (pinhole de sortie).

L'enregistrement et la corrélation des photons sont assurés par PHONOS (développé au Laboratoire de Spectrométrie Physique), ce corrélateur possède deux voies d'entrée (quatre dans la nouvelle version). L'enregistrement des photons est possible sur plusieurs dizaines de secondes, le nombre d'événements « stockables » dépend de la mémoire vive allouée à l'application : nous avons la possibilité de stocker 5 millions de photons, ce qui équivaut à une acquisition de 50 secondes à raison de 100000 photons collectés par secondes. Le temps mort pendant lequel une voie est inactive est de 30nsec, sachant que pendant ce laps de temps l'autre voie reste active.

C'est ce dispositif expérimental que nous avons tenté d'améliorer. Nous allons voir dans le premier chapitre une façon simple d'obtenir un dispositif expérimental de FCCS : deux détecteurs simplement décalés l'un par rapport à l'autre. Dans les chapitres suivants nous montrerons comment ce dispositif expérimental peut être modifié pour élargir le domaine d'application de la FCS.

Chapitre 2

Spectroscopie à Corrélation Croisée Spatiale de Fluorescence : Géométrie 1

L'objectif initial de ce travail de thèse est de proposer de nouveaux dispositifs expérimentaux pour tenter d'améliorer la résolution des expériences de FCS. Dans le chapitre 1, nous avons introduit le principe de base et les applications de la FCS et l'une des principales limitations : si deux espèces en présence ont des coefficients de diffusions relativement proches, il ne sera pas possible de les différencier dans le milieu d'investigation.

La corrélation croisée de fluorescence (FCCS) semble être une voie intéressante, comme en témoigne le travail de Xia [62] sur la diffusion dynamique de la lumière pour la mesure locale de la vitesse d'un fluide. L'idée principale de Xia est de faire la corrélation croisée temporelle à partir d'un faisceau laser argon séparé en deux par un prisme. Le concept à retenir ici est que deux faisceaux sont utilisés pour obtenir des informations sur un environnement local.

La première partie de ce chapitre est consacrée aux dispositifs expérimentaux de FCCS de P.Schwille et M.Brinkmeier. Nous expliquerons la piste choisie. Dans une seconde partie le formalisme de la FCCS spatiale va être exposé, et pour finir, nous verrons en détail notre dispositif expérimental et les résultats obtenus.

A Etat de l'art

Le but de cette partie est de présenter de façon qualitative les nouvelles géométries déjà proposées, les applications possibles avec ces nouveaux dispositifs et les perspectives en terme de résolution pour les expériences de FCS.

La première expérience de corrélation croisée à deux couleurs est due à P.Schwille en 1997 [48]. Dans cette expérience, deux fluorophores spectralement séparés, par exemple

l'Alexa488 ($\lambda_{\text{Fluorescence}} \cong 540\text{nm}$) et la Cy5 ($\lambda_{\text{Fluorescence}} \cong 660\text{nm}$), sont utilisés pour marquer deux types de molécules susceptibles d'interagir entre elles. Les émissions de fluorescence des deux fluorophores venant du même volume de collection sont séparées grâce à un miroir dichroïque et sont collectées par deux détecteurs. Un filtre supplémentaire est placé avant chaque détecteur pour qu'il collecte la fluorescence d'un seul fluorophore.

Dans cette expérience, une fonction de « corrélation croisée a deux couleurs » va être obtenue [65] ainsi que deux fonctions d'autocorrélation (une pour les molécules marquées avec le colorant 1 et une autre pour les molécules marquées avec le colorant 2). Cette fonction de corrélation croisée pourra s'écrire :

$$G_{CC}(\tau) = \frac{\langle \delta F_{\text{colorant 1}}(t) \delta F_{\text{colorant 2}}(t+\tau) \rangle}{\langle F_{\text{colorant 1}} \rangle \langle F_{\text{colorant 2}} \rangle} \quad (2.1)$$

Cette fonction de corrélation croisée dépend de l'interaction entre les molécules des deux espèces. Dans le cas où il n'y a pas d'interaction l'amplitude de $G_{CC}(\tau)$ sera nulle [65], car la corrélation entre les deux signaux est nulle.

Cette technique, très utilisée [65-69], a prouvé qu'elle pouvait donner des informations sur l'association et la dissociation de deux types de molécules et pourra remplacer la FCS pour ce genre de mesures. Le problème principal de la corrélation croisée à deux couleurs est la mauvaise statistique des mesures. En plus de cet aspect statistique, il est indispensable de trouver deux fluorophores spectralement décalés pour éviter le « cross-talk ».

La seconde expérience de FCCS que l'on va présenter a été développée par Brinkmeier en 1999 [59-60] pour déterminer les paramètres d'un flux (vitesse et direction). Dans cette expérience, deux volumes confocaux sont créés par l'intermédiaire d'un faisceau laser partagé en deux [62] et deux pinholes de sortie identiques. La fluorescence est focalisée sur l'ouverture de deux fibres optiques empaquetées ensemble. En principe, il est possible, sous certaines conditions, de mesurer un flux en FCS « classique », c'est-à-dire avec un seul volume confocal, mais le problème est que la vitesse du flux doit être faible et les fluorophores doivent diffuser lentement. C'est dans ce contexte que Brinkmeier a introduit la corrélation croisée spatiale qui sera mieux adaptée pour la détermination des paramètres du flux. La fonction de corrélation croisée s'écrit de façon un peu différente de ce qui a été vu (équation 2.1). Dans cette « nouvelle » fonction de corrélation croisée, il faudra faire intervenir les coordonnées spatiales des volumes V_1 et V_2 : $\vec{r} = (x, y, z)$ et $\vec{r}' = (x', y', z')$. La corrélation se fait aussi entre les deux volumes de collection.

Le problème principal de cette technique est l'existence d'une autocorrélation. En théorie les volumes V_1 et V_2 sont suffisamment éloignés l'un de l'autre pour le sondage de zones d'espaces

différentes. En pratique, la distance entre ces deux volumes est telle qu'il apparaît un recouvrement entre ces deux zones d'espace. Par conséquent, dans toute cette zone de recouvrement, chaque molécule peut être détectée par l'un ou l'autre des détecteurs, faisant ainsi apparaître une contribution de type autocorrélation à cette zone de recouvrement.

Notre philosophie pour le développement d'un nouveau montage expérimental a été différente de celle de P.Schwille ou celle de Brinkmeier. L'idée première était d'obtenir une meilleure discrimination des différentes espèces présentes simultanément dans un milieu donné. Pour cela il était nécessaire de passer par la Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence spatiale (FCCS), mais avec la contrainte d'avoir un instrument qui puisse, très rapidement, passer des expériences de FCS aux expériences de FCCS spatiale. Les dispositifs cités ci-dessus ne répondaient pas totalement à nos critères.

Notre idée est relativement simple : une seule illumination adaptée (on définira dans le prochaine paragraphe ce que veut dire « adaptée »), et deux volumes confocaux séparés d'une certaine distance R (figure 2.1), réalisés en décalant latéralement les deux pinholes.

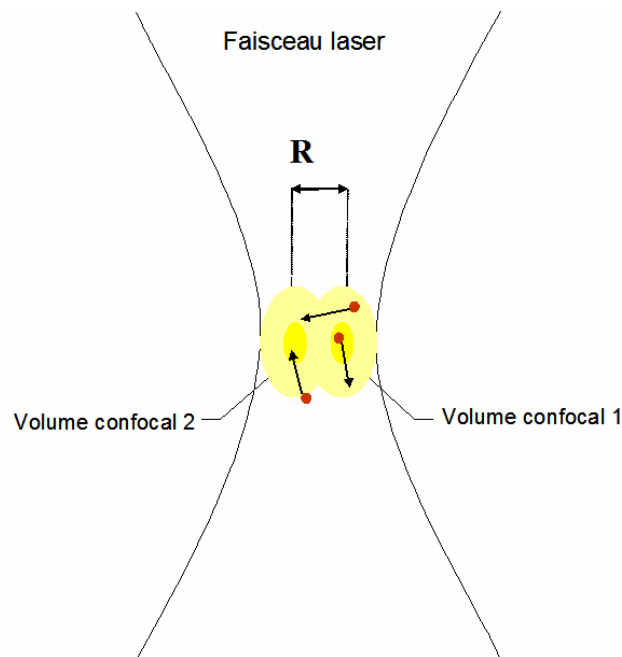


Figure 2.1 : Géométrie optique pour la FCCS. La distance R représente le décalage latéral entre les volumes confocaux. Un seul faisceau laser élargie assure l'illumination des volumes confocaux.

Le signal de fluorescence provenant de chaque volume confocal est ensuite corrélé avec le signal provenant de l'autre volume. Dans cette configuration, il est très simple de passer d'une

expérience de FCCS spatiale à une expérience de FCS classique, car il suffit juste d'utiliser le bon système d'illumination-détection.

Théoriquement, avec cette technique il devrait être possible de mesurer la diffusion libre avec une meilleure discrimination entre espèces présentes. Dans la partie B sont présentés les aspects théorique de la Spectroscopie à Corrélation Croisée spatiale de Fluorescence, la forme analytique de la fonction de corrélation croisée, $G_{CC}(\tau)$, ainsi que la comparaison de la précision de la FCS avec la FCCS spatiale.

B FCCS spatiale trou-trou

B.1 Collection du signal de fluorescence

La fonction d'autocorrélation, $G_{AC}(\tau)$, est définie comme étant la moyenne temporelle des produits des fluctuations d'intensité, normalisée par l'intensité moyenne au carré. Cette définition peut-être étendue pour la fonction de corrélation croisée : la fonction de corrélation croisée, $G_{CC}(\tau)$, est définie comme étant la moyenne des produits des fluctuations provenant de deux volumes confocaux, respectivement aux positions spatiales : $\vec{r}$ et $\vec{r}'$. La fonction de corrélation croisée s'écrira comme l'équation (2.1) déjà vu précédemment.

Dans cette équation n_1 et n_2 sont les nombres de photons détectés par intervalle de temps provenant des deux volumes confocaux.

Pour donner une forme analytique à la fonction d'autocorrélation, nous avons fait l'approximation que le profil de détection était Gaussien dans les trois directions de l'espace. Cette approximation est vérifiée pour l'illumination classique : une seule illumination et une seule détection optimisées ; autrement dit la pupille d'entrée de l'objectif est complètement illuminée (voir ci-dessous la définition de la fonction de remplissage) couplée avec un pinhole de sortie de taille adaptée. Dans le cas de la géométrie 1 l'illumination est plus étendue que dans le cas classique, afin d'illuminer le mieux possible les molécules fluorescentes qui diffusent à travers les deux zones d'observation décalées (figure 2.1). Nous verrons en outre dans quel cas l'approximation « gaussienne » est valide.

Dans le cas particulier de notre géométrie, il est nécessaire de définir plus précisément $n(t)$ en fonction des caractéristiques des pinholes de sorties.

Le nombre de photons détectés après le pinhole de sortie peut être écrit, conformément à Goodman [50], comme étant la fraction détectée du signal total dans le plan du détecteur, notée $f_i(r_i, t)$. De plus, il est pratique de décrire cette fraction à partir de l'image de l'échantillon donnée par la lentille d'objectif. Dans le traitement scalaire [20] de la formation incohérente d'images, l'image est la convolution de l'intensité de fluorescence, f_0 , dans l'échantillon par la

PSF (Point-Spread Function) de la lentille d'objectif. Dans ces conditions le nombre de photons détectés peut s'écrire :

$$\begin{aligned} n(t) &= \int P(\vec{r}_i) f_i(\vec{r}_i, z_i, t) d\Omega_i \\ &= \int P(\vec{r}_i) (f_o * PSF)(\vec{r}_i, z_i, t) d\Omega_i \end{aligned} \quad (2.2)$$

Où $P(\vec{r}_i)$ est la fonction de détection de la pupille du pinhole de sortie
 Les indices o et i font référence au signal dans l'espace objet et image
 $d\Omega_i$ est un élément de volume
 $*$ est l'opérateur de convolution

En FCS classique le signal de fluorescence, f_o , est proportionnel à l'intensité d'excitation, $I(\vec{r}_o)$ et à la concentration des espèces fluorescentes $C(\vec{r}_o, t)$:

$$f_o(\vec{r}_o, t) = \kappa I(\vec{r}_o, z_o) C(\vec{r}_o, z_o, t) \quad (2.3)$$

κ est une constante qui englobe le rendement quantique de fluorescence du fluorophore, Φ_f , la section efficace d'absorption, $\sigma(\lambda)$, et l'efficacité de collection et de détection du microscope avec son détecteur.

L'intégrale de l'équation (2.2) peut être réécrite pour faire intervenir le terme qui décrit le volume d'observation, $MDE(\vec{r}_o, z_o)$, qui est le produit de la fonction de l'efficacité de collection, $CEF(\vec{r}_o, z_o)$ (équation 2.4), par le profil d'excitation, I , ce qui donne l'équation (2.5) :

$$CEF(\vec{r}_o, z_o) = \int P(\vec{r}_i) PSF(\vec{r}_i - \vec{r}_o, z_i - z_o) d\Omega_i \quad (2.4)$$

$$\begin{aligned} n(t) &= \kappa \int I(\vec{r}_o, z_o) C(\vec{r}_o, z_o, t) CEF(\vec{r}_o, z_o) d\Omega_o \\ &= \kappa \int MDE(\vec{r}_o, z_o) C(\vec{r}_o, z_o, t) d\Omega_o \end{aligned} \quad (2.5)$$

Il apparaît que le volume est défini non seulement par le profil d'illumination mais aussi par la fonction d'efficacité de collection (CEF). Cette fonction est définie par deux paramètres intervenant dans l'équation (2.4), à savoir la taille du détecteur confocal, représenté par $P(\vec{r}_i)$ et les propriétés de la lentille d'objectif, exprimées par $PSF(\vec{r}_i - \vec{r}_o, z_i - z_o)$.

B.1.1 Illumination laser et fonction d'efficacité de collection

Il existe, dans la littérature, deux modèles de description du profil d'excitation de la région focale.

La première description, présentée il y a plusieurs dizaines d'années par Born et Wolf [20], donne dans une approche scalaire la distribution d'intensité lumineuse dans la région du point focal pour une onde incidente plane. Ce modèle est souvent utilisé pour les simulations des systèmes confocaux dans l'approximation paraxiale [49].

Le second modèle, proposé par Richards et Wolf [53], est consacré à la description vectorielle par l'utilisation d'une décomposition quasi-géométrique. Ce modèle donne une bonne description de la focalisation avec de grandes ouvertures numériques allant jusqu'à 1.45 [51-52]. Pour les deux descriptions on considère le cas idéal d'un système aplanétique dans lequel aucune aberration n'intervient. Les mesures de Juskaitis et Wilson [54] de la PSF, pour un objectif à immersion à eau d'ouverture numérique 1.2, ont montré que l'approximation paraxiale donne une bonne description de la distribution d'intensité lumineuse au voisinage du point focal. Il est donc raisonnable d'utiliser l'approche de Born et Wolf et ceci pour simplifier les calculs, au lieu de la description vectorielle. De plus, l'approche scalaire donne une bonne explication des solutions. En FCCS spatiale, on considère seulement le mouvement des molécules fluorescentes et pas, en première approximation, l'effet de polarisation du à l'orientation du dipôle moléculaire. L'utilisation du modèle vectoriel, pour une description basique du système illumination/collection/détection, n'est pas justifiée.

Avant de poursuivre la description, il est utile de définir les unités optiques (unité sans dimensions) (chapitre 1). Dans ce système de coordonnées, u et v sont les coordonnées axiale et radiale, l'indice i est relatif à l'espace image et l'indice o à l'espace objet.

$$\begin{aligned} u_o &= \frac{8\pi}{\lambda} n \left(\sin^2 \frac{\alpha}{2} \right) z_o & u_i &= \frac{8\pi}{\lambda} n \left(\sin^2 \frac{\alpha}{2} \right) \frac{z_i}{M} \\ v_o &= \frac{2\pi}{\lambda} n (\sin \alpha) r_o & v_i &= \frac{2\pi}{\lambda} n (\sin \alpha) \frac{r_o}{M} \end{aligned} \quad (2.6)$$

L'ouverture numérique de l'objectif, ON est égale à $n(\sin \alpha)$ et dans l'approximation des petits angles ($\sin \alpha \cong a/f$) on retrouvera les expressions du chapitre 1. M est le grandissement total du système (grandissement du au télescope et à l'objectif), λ est la longueur d'onde de la lumière et n est l'indice de réfraction du milieu. Pour une longueur d'onde, λ , de 560 nm et pour un objectif

d'ouverture 1.2 on aura les équivalences suivantes entre les coordonnées optiques et les coordonnées cylindriques : $v_o \cong 13.5r_o$ et $u_o \cong 17z_o$

Dans le cadre de l'approximation paraxiale, pour une onde sphérique convergente diffractée par une ouverture circulaire, la distribution de l'intensité lumineuse au voisinage du point focal est proportionnelle à la fonction $|h(u_o, v_o)|^2$. Cette expression peut s'exprimer de la façon suivante [49] :

$$h(u_o, v_o) = K \int_0^1 e^{-\frac{1}{2}j u_o \rho^2} J_0(\rho v_o) e^{-\left(\frac{\rho}{\beta}\right)^2} \rho d\rho \quad (2.7)$$

où $\beta = \omega / r$

r est le rayon de la pupille d'entrée de l'objectif et ω est le rayon du faisceau gaussien incident. ρ est une coordonnée du système de coordonnées polaires (ρ, θ) [61]. Dans cette équation J_0 est la fonction de Bessel d'ordre 0 et K est une constante. Le terme $e^{-\left(\frac{\rho}{\beta}\right)^2}$ permet de décrire le faisceau gaussien incident avec β la fraction de la pupille d'entrée de l'objectif illuminée. Le montage expérimental permet, grâce à un télescope composé de deux lentilles (voir paragraphe : montage expérimental), de faire varier ω et donc β .

L'intensité normalisée à l'origine, $I(u_o, v_o)$, est représentée figure 2.2 pour plusieurs valeurs de β .

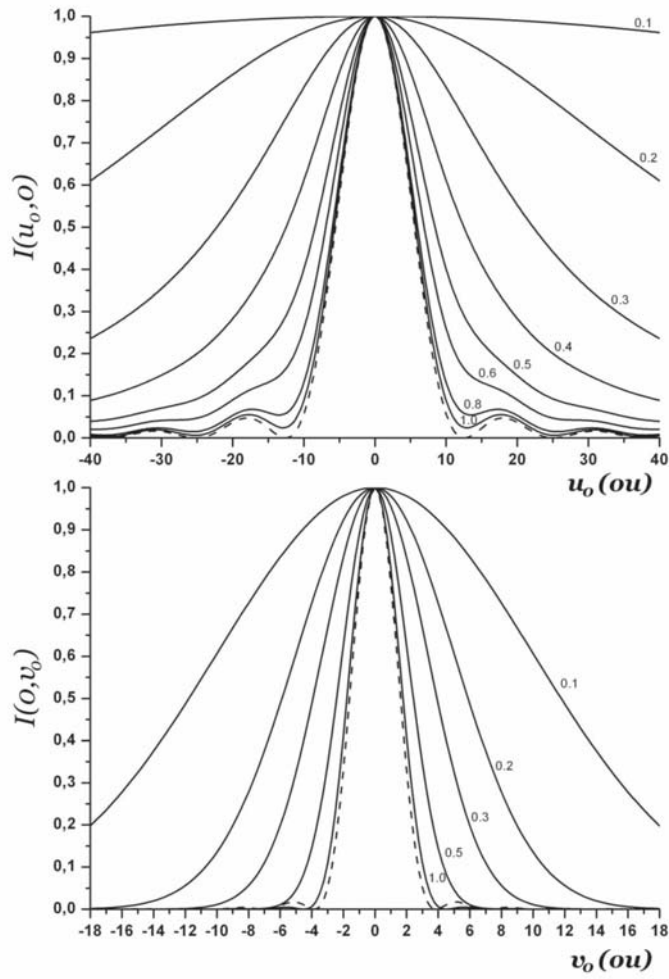


Figure 2.2 : Evolution de l'illumination $I(u_o, 0)$ et $I(0, v_o)$ le long de l'axe optique et de la direction latérale. Toutes ces courbes sont normalisées à 1. La valeur de β est indiquée à coté de chaque courbe. La courbe en pointillé correspond à l'onde plane incidente ($\beta \gg 1$, pupille d'entrée de l'objectif sur-illuminée).

Pour nos expériences de FCCS spatiale il était nécessaire, comme il a déjà été précisé, d'élargir suffisamment le spot focal. Nous avons représenté sur la figure 2.3, le profil d'illumination pour trois valeurs différentes de β (figure 2.3 (a) $\beta = 1$, (b) $\beta = 0.5$ et (c) $\beta = 0.1$).

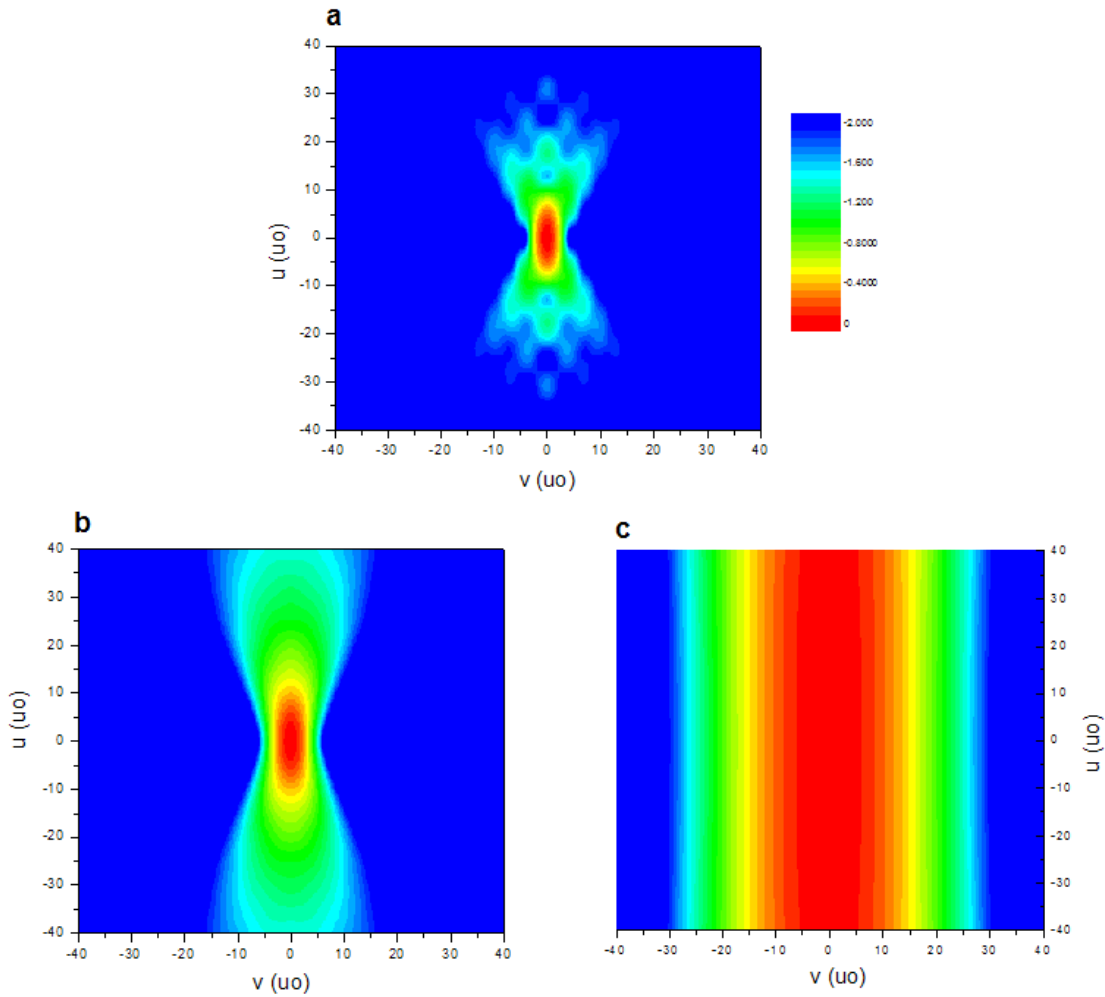


Figure 2.3 : Profil de l'intensité dans le plan (u,v) pour différentes valeur du facteur de remplissage β : (a) $\beta=1$, (b) $\beta=0.5$ et (c) $\beta=0.1$. L'amplitude est représentée en échelle de niveau de couleur logarithmique. Les distances sont représentées en unité optique (uo).

Ce qui frappe à première vue, c'est lorsque β diminue l'intensité d'illumination s'étend le long de l'axe optique. Par conséquent, le fait d'élargir latéralement l'illumination pour exciter le plus efficacement possible les molécules fluorescentes diffusant à travers les deux zones d'observations décalées, engendre aussi une extension de l'illumination le long de l'axe optique. Cette constatation sera à prendre en compte pour nos expériences.

Après la spécificité de l'illumination, nous allons maintenant nous intéresser à la fonction d'efficacité de collection (CEF). Pour obtenir la CEF il est nécessaire d'intégrer la PSF de la lentille d'objectif sur le plan du pinhole. La PSF est l'image de la distribution d'intensité d'un point source, comme une molécule fluorescente unique, donnée par la lentille d'objectif. Dans notre dispositif le même objectif est utilisé pour l'illumination et la collection de fluorescence, la

PSF implique ainsi une fonction $h'(u, v)$, elle est similaire à la fonction d'illumination (équation 2.7). Dans ces conditions la fonction d'efficacité de collection peut s'écrire à partir de l'équation (2.4) :

$$CEF(u_o, v_o) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{2\pi} \int_0^{s_i} |h'(u_i - u_o, v_i - v_o)|^2 \delta(u_i) \text{circ}_{s_i}(v_i) v_i du_i dv_i d\varphi$$

$$= \int_0^{s_i} \int_0^{2\pi} |h'(u_o, (v_i^2 + v_o^2 - 2v_i v_o \cos\varphi)^{1/2})| v_i dv_i d\varphi \quad (2.8)$$

s_i est le rayon d'ouverture du détecteur en unité optique, il est relié au rayon de la fibre optique multimode. La taille infinitésimale du détecteur le long de l'axe optique est représenté par $\delta(u_i=0)$ et l'ouverture du pinhole par $\text{circ}_{s_i}(v_i)$. Cette fonction vaut 0 pour $v_i > s_i$ et 1 pour $v_i \leq s_i$.

Juskaitis [54] a proposé une mesure de la PSF pour un objectif à immersion à eau de 1.2 d'ouverture numérique, du même type que celui utilisé dans notre expérience. La valeur expérimentale de la largeur à mi-hauteur de la PSF est similaire à nos prédictions théoriques pour une fonction de sous illumination $\beta=1$. Le calcul numérique de la CEF dans le plan méridien est représenté figure 2.4. L'intégration de l'équation (2.8) est évaluée numériquement de $(u_o, v_o) = (-40, -40)uo$ à $(u_o, v_o) = (40, 40)uo$ par pas de 0.5 uo et linéairement interpolée (comme pour la figure 2.4).

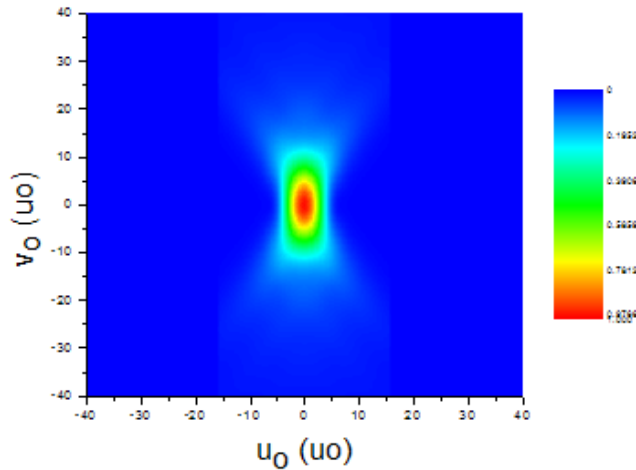


Figure 2.4 : Représentation de la fonction d'efficacité de collection représenté dans le plan u_o, v_o ($CEF(u_o, v_o)$) pour un pinhole de 4 uo. L'amplitude est représentée en échelle logarithmique de niveau de couleur. Les distances sont représentées en unité optique (uo).

B.1.2 Les volumes d'observation

Qian et Elson [11] ont décrit le volume d'observation (représenté par la MDE) comme étant le produit de la fonction d'efficacité de collection par le profil d'excitation : $MDE(u_o, v_o) = CEF(u_o, v_o) \times I(u_o, v_o)$. Pour être le plus proche possible de notre dispositif expérimental (voir paragraphe C), toutes les simulations numériques des profils des $MDE(u_o, v_o)$ ont été réalisées en prenant un rayon de $4u_o$ pour le trou de filtrage (pinhole de sortie) comme représenté figure 2.5. Les $MDE(u_o, v_o)$ sont représentées dans le plan méridien pour deux remplissages de la pupille d'entrée de l'objectif : figure 2.5 a) $\beta=1$ et b) $\beta=0.1$, identique au cas expérimental. Sur les figures c) et d) sont représentées les $MDE(u_o, v_o)$ pour deux pinholes décalés (sens opposé) de $6u_o$ par rapport à l'axe optique. Sur les figures e) et f) cette distance est de $10u_o$. Les quatre dernières représentations du profil des volumes d'observation sont données pour $\beta=0.1$. On voit bien la modification du profil des MDE lorsque le remplissage de la pupille d'entrée de l'objectif est modifié, de $\beta=1$ à $\beta=0.1$ ou lorsque les pinholes de sortie sont déplacés latéralement. Pour une illumination fortement focalisée et un remplissage totale de la pupille d'entrée de l'objectif, figure 2.5(a), le profil prédit numériquement semble être similaire au profil typique 3D Gaussien. Quand on élargit latéralement l'illumination (étendue par conséquent le long de l'axe) avec une sous remplissage $\beta=0.1$, la figure 2.5 (b) montre une modification et un fort élargissement des profils méridionaux des $MDE(u_o, v_o)$. Ces volumes d'observation ne peuvent pas être décrits avec un modèle gaussien. Cette prédiction du volume non gaussien avec une sous illumination de la pupille d'entrée de l'objectif est en accord avec les études menées par Hess et Webb [51].

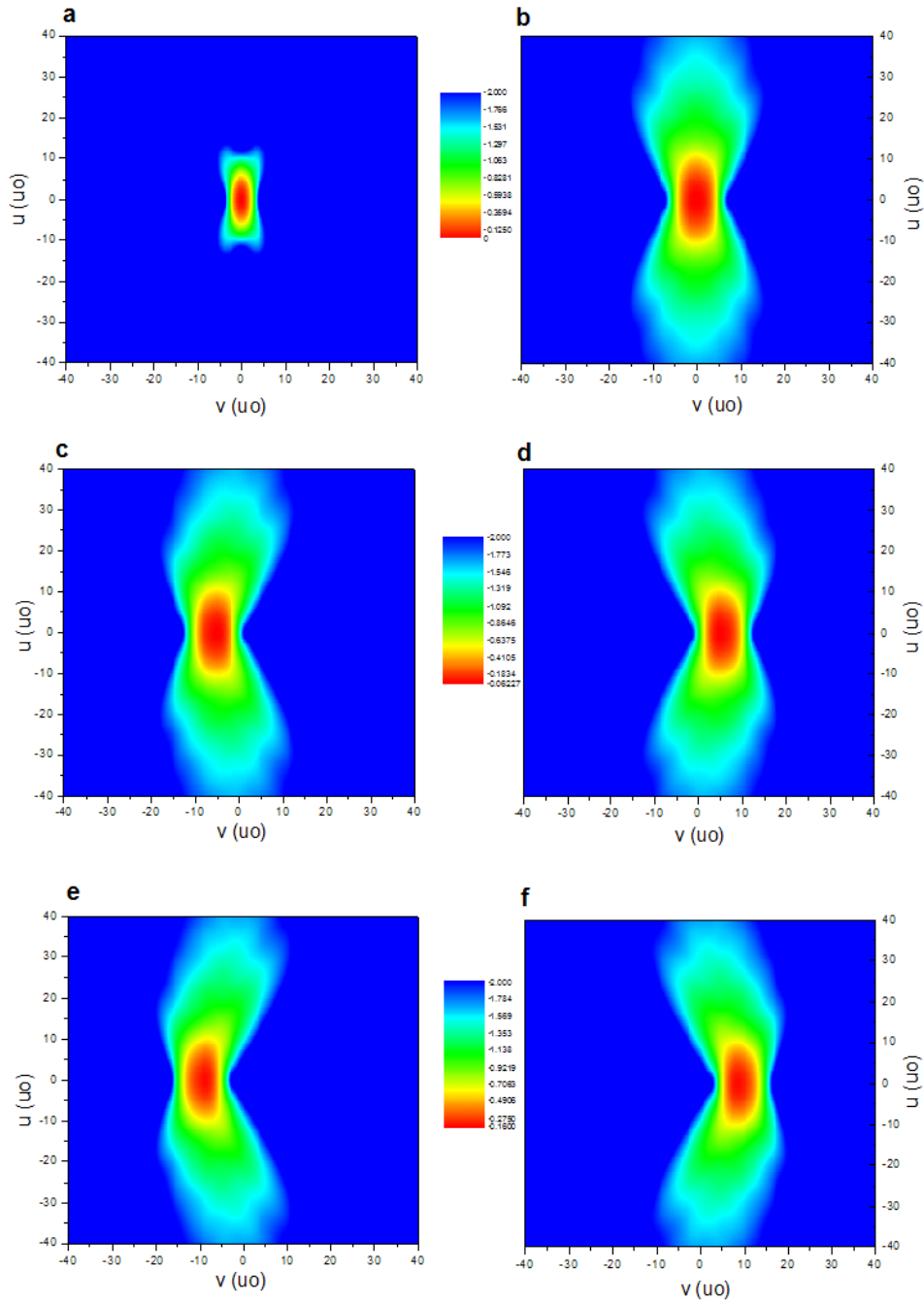


Figure 2.5 : Comparaison de différents profils de la fonction normalisée d'efficacité de détection des molécules ($MDE(u_o, v_o)$). Tous les profils sont évalués pour la même taille de pinhole ($s_i=4 u_o$). (a) pour un remplissage de 100% ($\beta=1$) de la pupille d'entrée de l'objectif, (b)-(f) pour $\beta=0.1$. Pour (c) et (d) décalage de 6 u_o (à droite et à gauche) des pinholes, pour (e) et (f) de décalage est de 10 u_o .

En microscopie confocale, un déplacement latéral du pinhole est équivalent au déplacement de la CEF(u_o, v_o) le long de la direction v_o , moyennant le grandissement total du microscope. Nous avons ainsi représenté les profils des MDE(u_o, v_o) sur la figure 2.5 (c) à (f), pour deux décalages par rapport à l'axe : 6 et 10 uo. Les figures 2.5 (c) – (f) illustrent bien, lorsque le pinhole est décalé latéralement, l'éloignement de la forme des MDEs par rapport à une gaussienne. Nous verrons par la suite les conséquences de cette perte de symétrie sur les résultats expérimentaux.

B.2 Forme analytique de la fonction de corrélation croisée spatiale

Pour obtenir la forme analytique de la fonction de corrélation croisée spatio-temporelle, nous faisons l'approximation que les deux volumes d'observations sont gaussiens et symétriques. Ils ont le même rayon latéral ($\omega_r \cong 0.25 \mu m$) et étendue axiale ($S\omega_r = \omega_z \cong 1.25 \mu m$). Ils sont séparés dans le plan de la distance R. En résolvant l'équation différentielle hydrodynamique [55] puis en intégrant la corrélation croisée normalisée (équation 1.34), nous obtenons une forme analytique de la corrélation croisée [59] :

$$G_{CC}(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2} e^{\left(-\frac{R^2}{\omega_r^2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \right)} \quad (2.9)$$

avec $\tau_D = \frac{\omega_r^2}{4D}$

La figure 2.6 illustre l'évolution de la forme de la courbe de corrélation croisée en fonction de la valeur de R. Ces différentes courbes ont été obtenues en prenant les paramètres expérimentaux de notre dispositif ($\omega_r \cong 0.25 \mu m$ et $S=5$). Les molécules fluorescentes étudiées sont la Rhodamine 6G ($D=2.8 \text{ cm}^2/\text{s}$), nous prenons $\langle N \rangle = 1$.

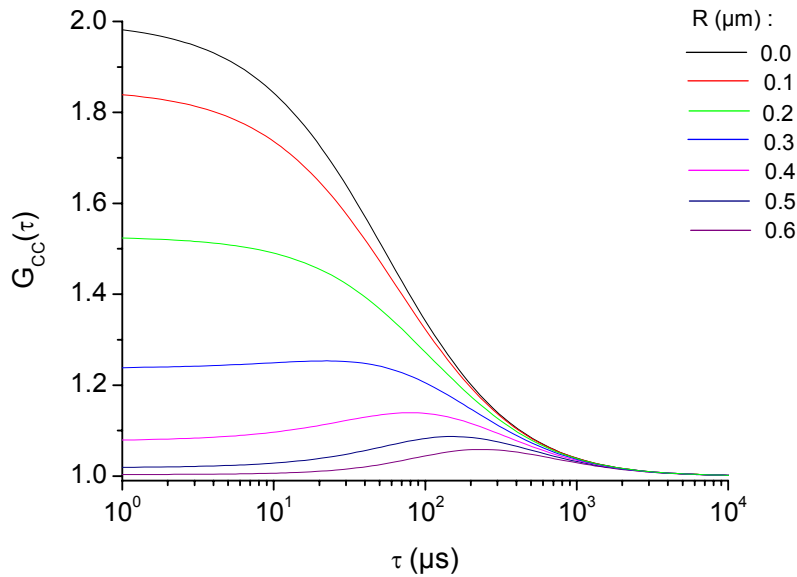


Figure 2.6 : Evolution de la forme de la courbe de corrélation croisée en fonction de la valeur de R . Ces différentes courbes ont été obtenues en prenant les paramètres expérimentaux de notre dispositif ($\omega_r \cong 0.25 \mu\text{m}$ et $S=5$). Les molécules fluorescentes étudiées sont la Rhodamine 6G ($D=2.8 \text{cm}^2/\text{s}$), le nombre moyen de molécule est pris égal à 1

Sur la figure 2.6, nous pouvons conclure que plus R est grand et plus la forme de la corrélation croisée s'éloigne de la forme d'une fonction d'autocorrélation. Le second effet de l'augmentation de la distance entre les volumes de collection est la (forte) diminution de l'amplitude de la fonction de corrélation croisée et le déplacement vers les temps longs de la position du maximum d'amplitude.

C Dispositif expérimental de la FCCS - géométrie 1

L'un des atouts de ce dispositif expérimental, c'est la possibilité de réaliser des expériences de FCS « classique », ou de FCCS, comme l'illustre le schéma en figure 2.7. Il suffit pour cela de basculer les miroirs 1 et miroir 4, ils permettent de choisir le type d'illumination, en sélectionnant le télescope 1 ou 1'.

Ce dispositif est étudié pour obtenir plusieurs tailles de volume de collection en contrôlant l'étendue spatiale du faisceau laser à l'entrée de l'objectif et la taille des pinholes de sortie.

En modifiant la valeur du grandissement du télescope 1' (par modification de la focale de la lentille 1' et 2'), il est possible de modifier le rayon du profil d'illumination gaussien à d'entrée de l'objectif de microscope (60×, ON, 1.2). Ici la focale de la lentille 1' est $f_{1'}=60mm$ et celle de la lentille 2' $f_{2'}=25mm$, ce qui donne un grandissement de $G_t'=\frac{f_{2'}}{f_{1'}}=\frac{1}{2.4}$. Avec ce dispositif il est

possible d'allonger et d'élargir le profil d'illumination au point focal de l'objectif en diminuant le rayon du faisceau gaussien [51]. Nous avons déjà introduit, au chapitre B.2, le facteur β qui rend compte du remplissage de la pupille d'entrée de l'objectif. Ce facteur est le rapport entre ω , le rayon du faisceau incident, et r le rayon de la pupille d'entrée de l'objectif. Pour $\beta \gg 1$ la pupille d'entrée est « sur remplie » et pour $\beta < 1$ la pupille d'entrée est « sous remplie ». Nous avons vu avec les figures 2.2 et 2.3, pour plusieurs valeurs de β , l'évolution de l'illumination laser, dans le plan focal et le long de l'axe optique.

Le faisceau laser passe par les télescopes 1 ou 1', il est ensuite envoyé vers le milieu d'investigation.

Comme pour la FCS classique, l'émission de fluorescence est collectée par le même objectif, ensuite nous utilisons deux fibres optiques multimodes comme détecteurs pour la détection confocale. Le grandissement du deuxième télescope composé de la lentille 3, 4 et 5 a déjà été calculé pour la FCS classique, il est de 3 avec $f_3=10mm$, $f_4=30mm$ et $f_5=30mm$. Pour la géométrie 1, ces fibres optiques multimodes ont un cœur de $100\mu m$ de diamètre, elles sont placées sur un support XYZ qui offre la possibilité de les positionner dans les trois directions de l'espace avec une précision micrométrique. Le système d'acquisition et de corrélation (PHONOS) est lui aussi multi taches, il permet, soit d'autocorréler le signal de fluorescence acquis, soit de calculer la corrélation croisée (spatiale et temporelle) du signal de fluorescence passant à travers les deux pinholes de sortie.

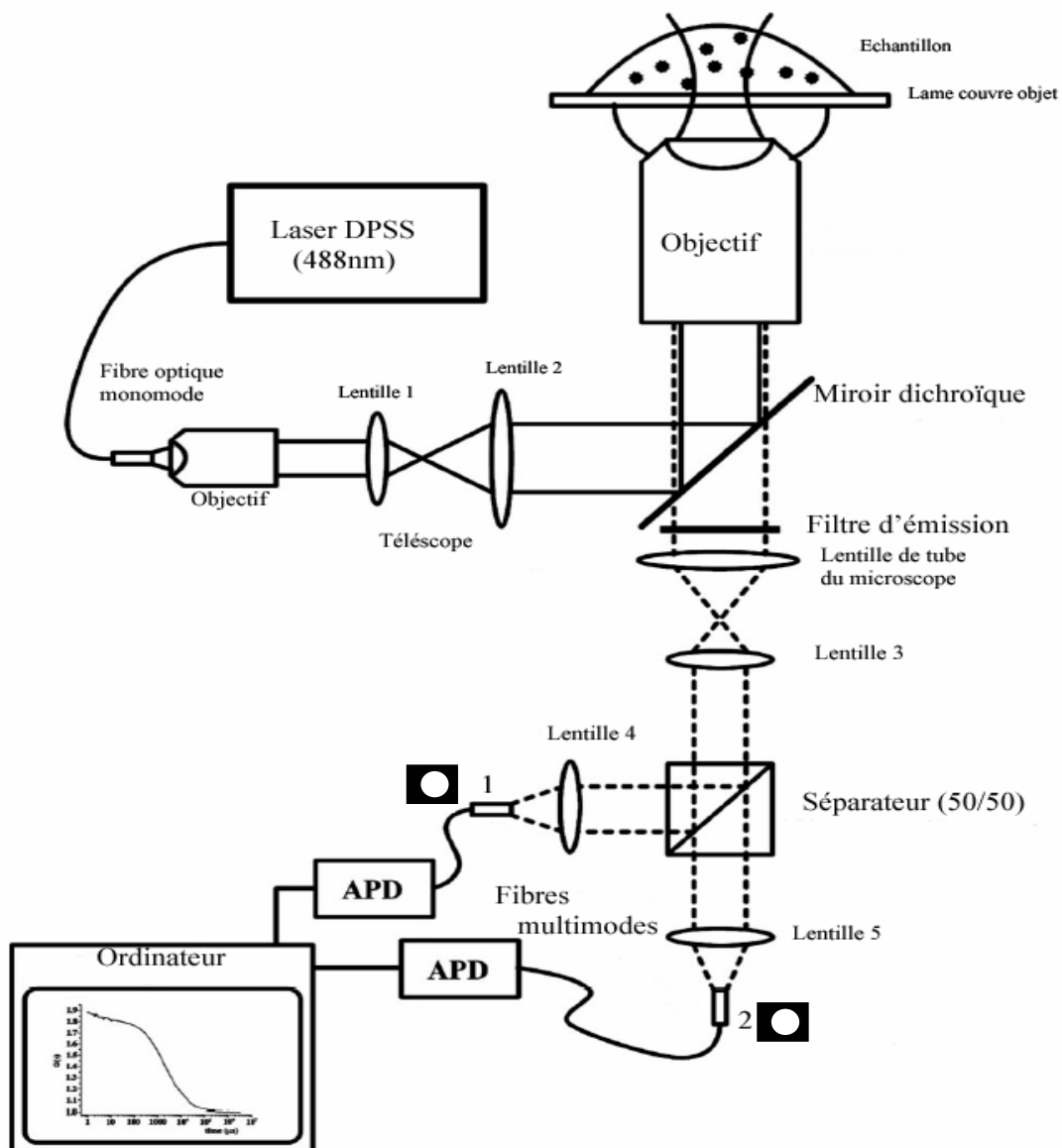


Figure 2.7 : Dispositif expérimental pour la FCCS géométrie 1. La détection est assurée par deux pinholes identiques décalés latéralement.

D Les résultats

Pour les premiers essais de notre géométrie 1 nous avons choisi d'utiliser des billes fluorescentes de petit diamètre (voir chapitre 1) commercialisées par Molecular Probes [33] (20nm de diamètre (+/- 20%)). Un des avantages de ces billes fluorescentes c'est leur faculté à émettre un signal de fluorescence intense. Chaque bille émet un signal de fluorescence équivalent à la fluorescence de 180 molécules de fluoresceine. Ces billes fluorescentes sont diluées dans l'eau désionisée à raison d'un volume de solution « mère » pour 10000 volumes d'eau. Le nombre approximatif de microbilles par unité de volume est donné par Molecular Probes. Par exemple, pour des billes de 20nm, $C_{\text{mère}} \cong 10^{15}$ billes/ml et donc $C_{\text{solution}} \cong C_{\text{mère}}/10000 \cong 10^{11}$ billes/ml ou 0.1 bille/ μm^3 .

D.1 Mesures par FCS « classique »

Dans un premier temps, des mesures de FCS sont réalisées avec les deux pinholes de sortie décalés latéralement d'environ 0.8 μm , soit environ 12 uo. Cette valeur approximative est due à la difficulté de relier l'écart physique entre les deux pinholes de sortie avec le décalage entre les deux volumes d'observation. Une des causes d'incertitude provient de l'incertitude sur la valeur du grandissement du deuxième télescope, qui devrait valoir 3.

Tous les résultats de ce paragraphe traitant de la géométrie 1 sont obtenus avec la valeur $R \cong 0.8$ μm .

Les deux volumes décalés sont symétriques par rapport à l'axe optique (voir figure 2.5). Pour cette expérience, la puissance laser mesurée à l'entrée de l'objectif est de 5mW. Cette valeur est élevée pour une expérience de FCS, mais en géométrie 1 seule 10% de la pupille d'entrée de l'objectif est illuminée. Par conséquent l'illumination au point focal est très étendue. Sur la figure 2.8 est présenté un enregistrement du signal de fluorescence (nombre de photons par seconde) en fonction du temps. Le temps d'enregistrement est de 30 secondes et le temps d'intégration 100ms. Le taux de comptage moyen est de 23 kHz, et le nombre moyen de molécule est de 1.25 ce qui donne un taux de comptage par molécule approximatif de 19kHz/molécule. On observe aussi sur cette figure des pics de fluorescence de grande intensité (jusqu'à 140kHz) qui peuvent être attribués à la diffusion de billes à travers le centre du volume de détection.

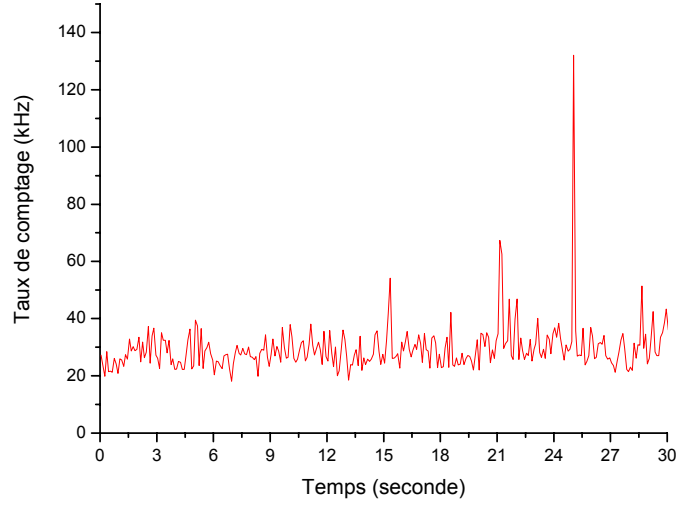


Figure 2.8 : Enregistrement classique du signal de fluorescence en fonction du temps (un seul détecteur) pour des billes fluorescentes de 20nm de diamètre. Le temps d'enregistrement est de 30 secondes et le temps d'intégration 100ms. Le taux de comptage moyen est 23 kHz.

La FCS donne la possibilité d'obtenir des informations sur le volume d'observation (ω_r et S , voir chapitre 1).

Avant de réaliser des expériences de FCCS avec les nanobilles, nous allons, dans un premier temps mesurer la diffusion d'une molécule dont le comportement est bien connu, la Rhodamine 6G ($D=280\mu\text{m}^2/\text{s}$ dans l'eau). Le paramètre que l'on va pouvoir déterminer est le temps de diffusion, τ_D , des molécules de Rh6G à travers le volume de détection.

La courbe d'autocorrélation obtenue avec la FCS est ajustée en utilisant la formule (1.30) en présence de triplet [32] :

$$G_{AC}(\tau) = G(\tau=\infty) + \left(1 + \frac{T_{eq}}{1-T_{eq}} e^{-\tau/\tau_T}\right) \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad (2.10)$$

Où $G(\tau=\infty)=1$ (en général, dans le cas usuel)

T_{eq} est la fraction de molécules dans l'état triplet

τ_T est le temps de vie de l'état triplet.

Le temps de diffusion déterminé en ajustant les données expérimentales avec cette formule est de $120 \pm 1\mu\text{s}$. A partir de ce temps de diffusion et connaissant le coefficient de diffusion de la Rhodamine 6G (chapitre 1), le rayon effectif du volume d'observation est : $\omega_r = 0.37 \pm 0.05\mu\text{m}$ ($\tau_D = \omega_r^2/4D$). Dans le cas classique (chapitre 1) le temps de diffusion de la Rhodamine 6G est

20 μ s, donc le rapport entre les rayons du volume efficace est de 2,5 ($\sqrt{120/20}$). Ce qui permet de dire que le volume est effectivement étendu radialement.

Ensuite l'expérience de FCS est réalisée (volume étendu) avec les nanobilles fluorescentes. La figure 2.9 représente le résultat de cette expérience, elle est le résultat de 10 mesures de 30 secondes.

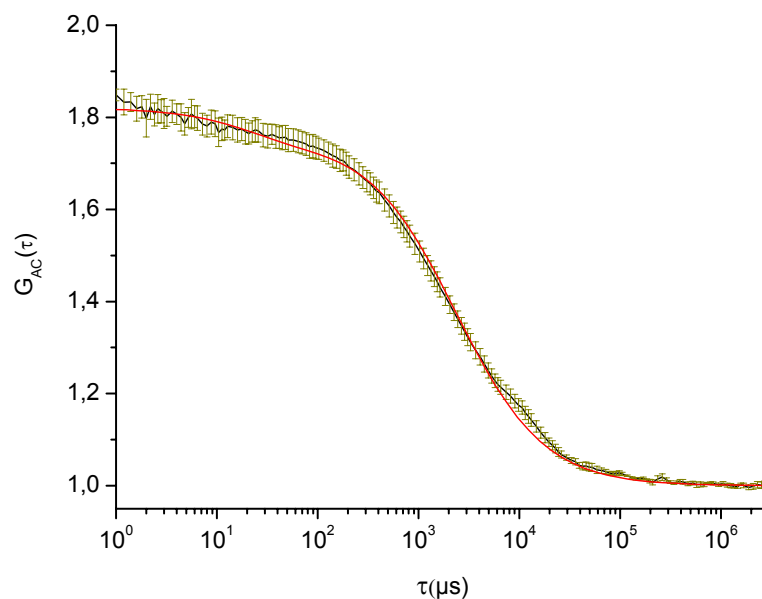


Figure 2.9 : Courbes d'autocorrélation obtenues en corrélant le signal de fluorescence de nanobilles fluorescentes (20nm) passant par un volume confocal décalé latéralement (0.8 μ m). La durée d'acquisition est de 30 secondes. L'ajustement de la courbe d'autocorrélation donne $\langle N \rangle \cong 1.3$ molécules et $\tau_D \cong 2100\mu$ s.

La courbe expérimentale est ajustée en pondérant chaque point par l'incertitude expérimentale. La valeur du temps de diffusion obtenu est $\tau_D = 2100 \pm 30 \mu$ s. Expérimentalement la statistique des nanobilles fluorescentes est moins bonne que la statistique de la Rhodamine 6G de ce fait l'incertitude sur la valeur du temps de diffusion des nanobilles fluorescentes est plus importante que l'incertitude sur le temps de diffusion de la Rh6G. Le coefficient de diffusion déduit de ces expériences sera de : $D = 17 \pm 4 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Cette valeur est cohérente avec la valeur théorique, $D = 11 \mu\text{m}^2/\text{s}$, déterminée avec la relation de Stokes-Einstein. Pour les expériences de FCCS, nous prendrons comme valeur de D , la valeur déterminée par FCS.

D.2 Mesures en FCCS, géométrie 1

D.2.1 Mesures

Nous avons reporté dans ce paragraphe, les mesures réalisées avec deux volumes d'observation confocaux décalés latéralement l'un par rapport à l'autre.

Mais comme nous l'avons déjà présenté, si la distance R entre les deux volumes devient petite devant ω un fort recouvrement apparaît entre les deux volumes de détection $MDE_1(\vec{r}, z)$ et $MDE_2(\vec{r}, z)$. La figure 2.10 illustre ce recouvrement pour deux valeurs de décalage par rapport à l'axe optique : $R=6u_0$ (figure 2.10 (a)) et $R=10u_0$ (figure 2.10 (b)). La détection des molécules s'éloigne du cadre de deux gaussiennes simplement décalé de l'axe optique. Pour $R=6u_0$ cette détection est semblable à un anneau selon l'axe optique !

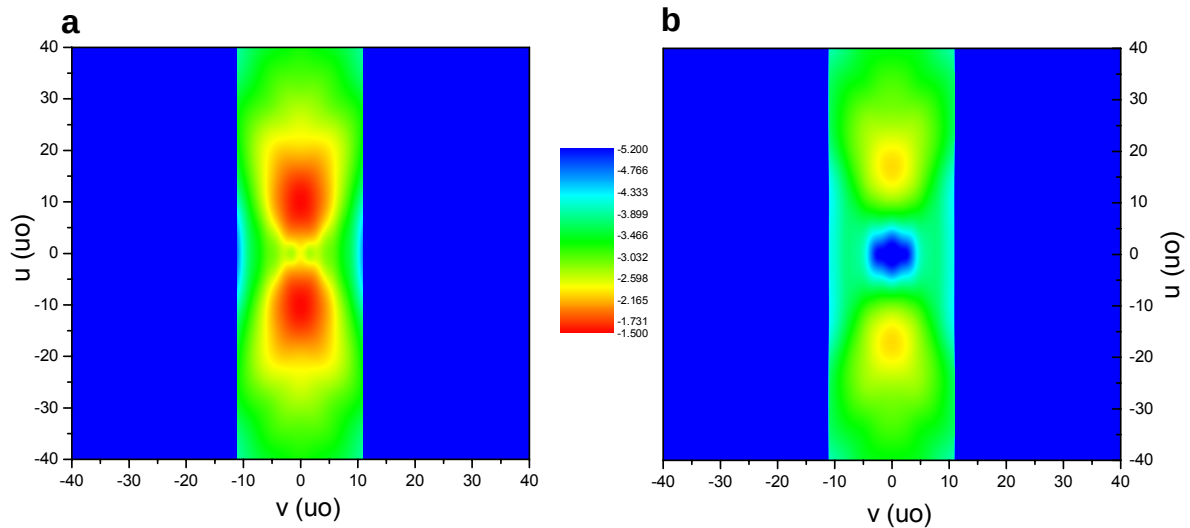


Figure 2.10 : Illustration de la densité de recouvrement des deux volumes de détection des molécules $MDE_1(\vec{r}, z)$ et $MDE_2(\vec{r}, z)$. La zone en rouge illustre une forte détection des molécules. La distance entre les volumes est $R = 6u_0$ (a) et $R = 10u_0$ (b). La détection des molécules s'éloigne du cadre de deux gaussiennes simplement décalé de l'axe optique. Le recouvrement est d'autant moins important que la distance entre les volumes est grande.

Ce recouvrement important est dû aux « ailes » des deux volumes de détections. La principale conséquence de ce recouvrement sera la détection par $MDE_1(\vec{r}, z)$ et par $MDE_2(\vec{r}, z)$ du signal de

fluorescence. Un compromis a été choisi entre l'écartement des deux volumes et le recouvrement des volumes. $R=10\mu\text{o}$ semble être une valeur raisonnable. Nous verrons par la suite comment ce recouvrement va pouvoir être réduit par un judicieux traitement numérique.

Sur la figure 2.11 nous avons reporté un exemple de signal de fluorescence enregistré par deux volumes. La durée d'acquisition est de 30 secondes, et le temps d'intégration pour la représentation est de 100ms. Il est logique de constater que les deux signaux figure 2.11 (a) et figure 2.11(b) ne sont pas strictement identiques, cela est dû aux faibles concentrations ($0.1 \text{ billes}/\mu\text{m}^3$) et aux fluctuations statistiques qu'elles entraînent.

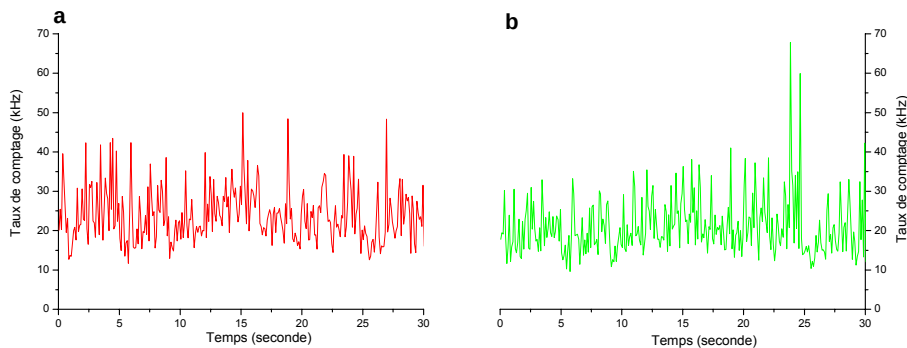


Figure 2.11 : Enregistrement classique du signal de fluorescence en fonction du temps pour deux détecteurs (a) et (b), pour des billes fluorescentes de 20nm de diamètre.

Pour les premiers essais de corrélation croisée spatiale de fluorescence les deux volumes de détection sont décalés de 10 μo . Cette valeur est, rappelons le, un compromis :

- Si le décalage entre les détecteurs est moins important, le recouvrement entre les zones d'observation sera tel que la composante d'autocorrélation (ou pseudo-autocorrélation) dans la corrélation croisée aura une très grande proportion.
- Si le décalage entre les détecteurs est plus important deux problèmes émergent : le premier est qu'il faudrait encore plus étendre l'illumination radialement au foyer de l'objectif avec les conséquences que l'on connaît, le second est que la probabilité d'observer des billes passer d'un volume d'observation à l'autre (un des objectifs de la corrélation croisée spatiale) sera d'autant plus faible que les volumes sont éloignés (l'angle solide sous lequel chaque volume voit l'autre diminue).

Nous avons reporté sur la figure 2.12, la moyenne de 10 expériences et l'écart type correspondant. Le temps d'acquisition est de 30 secondes. La puissance à l'entrée de l'objectif est

la même que pour les expériences précédentes : 5mW. La courbe expérimentale obtenue est loin de répondre à nos attentes. Dans l'étude menée par Brinkmeier [59], les courbes expérimentales présentent un maximum, illustrant, en outre, le passage des molécules fluorescentes d'un volume d'observation à l'autre. Dans ces conditions, il est difficile d'expliquer la forme de la courbe obtenue. L'explication est simple : le recouvrement des volumes d'observation est tel qu'il existe une très grande proportion d'autocorrélation dans la corrélation croisée spatiale. La formule (2.10) contient déjà l'autocorrélation, puisque son amplitude en $\tau = 0$ n'est pas nulle. En pratique le recouvrement est plus important que le recouvrement correspondant à deux volumes gaussiens décalés. Nous allons ajouter un terme supplémentaire d'autocorrélation (première partie de l'équation 2.11) dans la fonction de corrélation croisée pour décrire au mieux les résultats expérimentaux :

$$G_{CC}(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \left[P \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Dac}} \right)^{-3/2} + (1-P) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2} e^{\left(\frac{R^2}{\omega_D^2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \right)} \right] \quad (2.11)$$

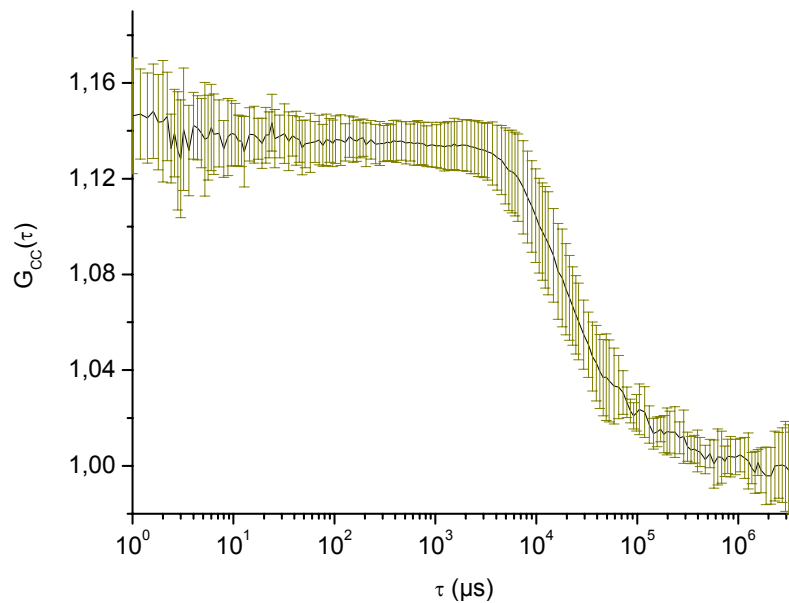


Figure 2.12 : Courbe expérimentale de corrélation croisée obtenue en moyennant 10 acquisitions de 30 sec. La puissance à l'entrée de l'objectif est de 5mW.

Sur la figure 2.13, nous avons représenté plusieurs fonctions de corrélation croisées spatiales, simulées à partir de l'équation (2.11), présentant une proportion d'autocorrélation, P , de plus en plus importante :

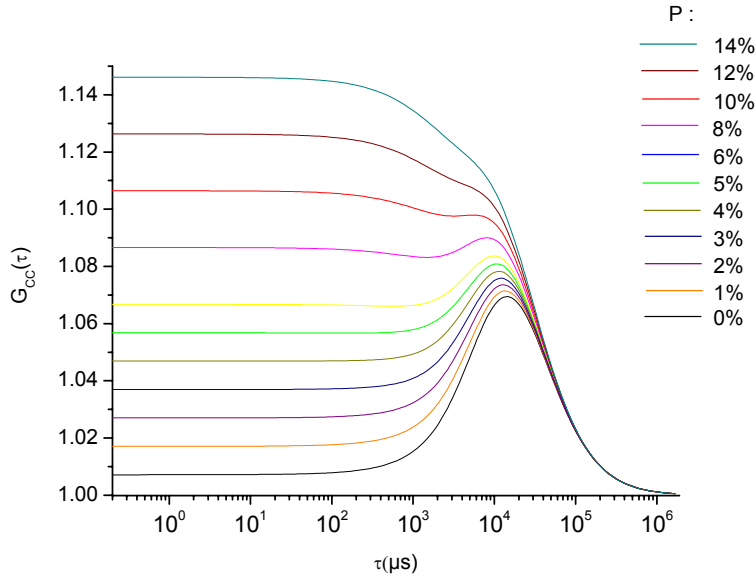


Figure 2.13 : Courbes de Corrélation croisée simulée. P représente la proportion d'autocorrélation dans les courbes de corrélation croisée. Pour ces courbes : $\omega_R=0.36\mu\text{m}$, $S=5$, $\tau_{\text{Dac}}=10\text{ms}$, $R=0.8\mu\text{m}$ et $\langle N \rangle=1$.

En comparant les courbes théoriques de corrélation croisées spatiales de la figure 2.13 avec la courbe obtenue il est raisonnable de penser que la proportion d'autocorrélation dans la corrélation croisée expérimentale est proche de 8%. Comme nous l'avons déjà signalé la zone commune d'observation est due à la forte étendue spatiale des volumes confocaux le long de l'axe z et à la déformation de ces mêmes volumes causée par le décalage latéral. Expérimentalement, la seule possibilité pour diminuer le recouvrement entre les deux volumes passe par l'augmentation du décalage par rapport à l'axe optique. Cependant un des paramètres mesuré par cette expérience est la libre diffusion de molécules ou billes fluorescentes d'un volume confocale d'observation à l'autre, sans la présence de flux. Il n'est donc pas raisonnable d'augmenter le décalage entre les zones d'observations au risque de diminuer la probabilité d'observer des molécules passant d'un volume à l'autre.

En conclusion, il ne semble pas y avoir de bonne solution, mais on va pouvoir résoudre partiellement ce problème par un traitement numérique des données. C'est l'objet du paragraphe suivant.

D.2.2 Traitement numérique des données. Le seuillage

L'idée du traitement numérique est de « réduire » les ailes des volumes confocaux, c'est-à-dire réduire leur étendue spatiale et leur déformation due au décalage, et par voie de conséquence

réduire la zone commune d'observation (figure 2.14). Autrement dit le traitement numérique va faire tendre les volumes confocaux vers des volumes gaussiens, avec pour effet de réduire P, le but étant d'atteindre $P=0$.

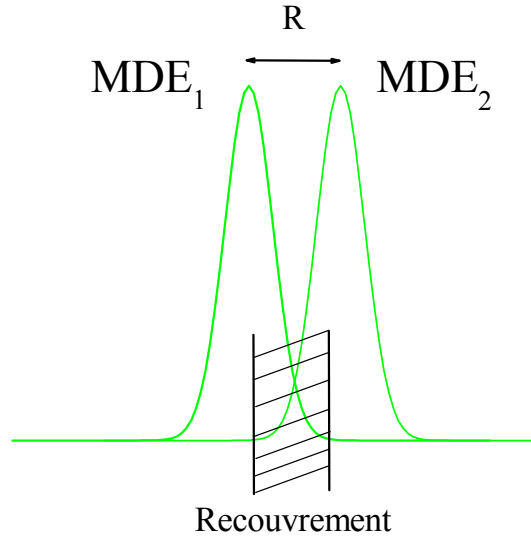


Figure 2.14 : illustration du recouvrement entre les fonctions d'efficacité de détection des molécules.

Plus le seuillage sera important et plus les ailes seront petites. Nous allons présenter ici le concept de seuillage appliqué aux données brutes et l'effet du seuillage sur les courbes d'autocorrélation et sur les courbes de corrélation croisée spatiale.

On se place dans le cas où une particule diffuse à travers un volume V . Si ce volume d'observation est suffisamment plat (profil de type « top-hat »), cette molécule a la même probabilité d'apparaître à n'importe quel position de V . Dans ce cas la probabilité d'observer N molécules est donnée par la relation [63-64], $\langle N \rangle$ étant le nombre moyen de molécule :

$$P(N; \langle N \rangle) = \frac{1}{V} \int \text{Poisson}[N, \langle N \rangle] d\vec{r}$$

$$\cong \text{Poisson}[N, \langle N \rangle] = \frac{\langle N \rangle^N}{N!} e^{-\langle N \rangle} \quad (2.12)$$

Le nombre de molécules est distribué de façon poissonnienne dans le volume de détection $MDE(\vec{r}, z)$. De la même façon le nombre de photons, k , détectés avec un nombre N de molécule pendant la période temporelle δt (petite par rapport au temps caractéristique du processus physique étudié, la diffusion) est aussi distribué selon une loi poissonnienne :

$$p(k;N,\varepsilon)=\frac{(\varepsilon N)^k}{k!}e^{-(\varepsilon N)} \quad (2.13)$$

Où ε est la brillance des molécules, de sorte que εN correspond au nombre moyen de photons, $\langle k \rangle$, détectés pour N molécules.

Vu les équations (2.12) et (2.13), deux remarques peuvent être faites :

- aucun photon ne pourra être détecté si aucune particule n'est présente dans le volume car le courant d'obscurité du détecteur est négligé.
- Chen et al [63] ont mis en évidence que cette expression (équation (2.13)) est indépendante du choix de volume V , tant que ce volume est suffisamment grand pour obtenir une probabilité non nulle d'obtenir un nombre nul de photon.

A partir des équations (2.12) et (2.13) nous pouvons introduire $\hat{p}(k;N,\varepsilon)$, c'est la probabilité d'observer k photons dans un système ouvert pour une solution de particules. Mathématiquement, $\hat{p}(k;N,\varepsilon)$ est la moyenne pondérée des probabilités de détecter k photons pour N molécules :

$$\hat{p}(k;N,\varepsilon)=\sum_{N=0}^{\infty} p(k;N,\varepsilon)P(N;\langle N \rangle) \quad (2.14)$$

Cette fonction n'est valable que pour une seule espèce de molécules fluorescentes, de brillance ε . Dans notre étude l'idée de seuillage va être appliquée à la distribution du nombre de photon k . La valeur du seuillage du nombre de photon sera notée k_S . Notons que k_S est relié à CR_S , la fréquence de seuillage, par la relation : $k_S=CR_S \times \delta t$, où δt est l'intervalle de temps d'échantillonnage.

La distribution du nombre de photon sera modifiée de la façon suivante :

$$\begin{aligned} \text{Si } k < k_S \text{ alors } k' &= 0 \\ \text{Si } k \geq k_S \text{ alors } k' &= k - k_S \end{aligned}$$

Ceci va nous donner une nouvelle distribution du nombre de photons après seuillage (à partir des équations (2.12), (2.13) et (2.14)) :

$$\begin{aligned} \text{Pour } k > k_S : \hat{p}'(k';N',\varepsilon') &= \hat{p}(k;N,\varepsilon) \\ \text{Pour } k = k_S : \hat{p}'(k';N',\varepsilon') &= \sum_{k=0}^{k_S} \hat{p}(k;N,\varepsilon) \end{aligned} \quad (2.15)$$

Autrement dit, tous les intervalles de temps δt pour lesquelles le nombre de photons est plus petit ou égal à la valeur de seuillage k_s contribuent à la classe « zero photon » de la distribution seuillée, tandis que les intervalles contenant k_s+1 photons contribuent à la nouvelle classe d'un photon et ainsi de suite. Sur la figure 2.15, nous avons représenté la distribution du nombre de photon avant et après le seuillage (figure 2.15 (a) et (b)). Le nombre moyen de molécules dans le volume d'observation est fixé arbitrairement à 6, le seuillage est ici égal à 3.

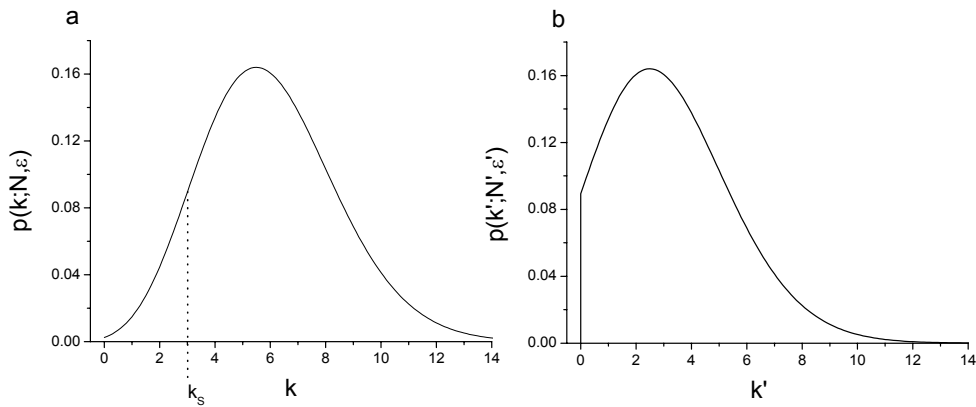


Figure 2.15 : Distributions du nombre de photons avant (a) et après le seuillage (b).Le nombre moyen de molécules dans le volume d'observation est fixé arbitrairement à 6, le seuillage est ici égal à 3.

Connaissant la distribution du nombre de photons seuillée il est maintenant possible de calculer le nombre moyen de molécules après seuillage $\langle N' \rangle$ ainsi que le taux de comptage moyen $\langle CR' \rangle$. Ces deux grandeurs vont être déterminées à partir du nombre moyen de photons seuillé et de la variance $\langle \Delta k'^2 \rangle$:

$$\left\{ \begin{array}{l} \langle k \rangle = \sum_{k=0}^{\infty} k p(k; N, \varepsilon) P(N; \langle N \rangle) \\ \langle k' \rangle = \sum_{k'=0}^{\infty} k' p(k'; N', \varepsilon') P(N; \langle N \rangle) \end{array} \right. \quad (2.16)$$

et

$$\left\{ \begin{array}{l} \langle \Delta k^2 \rangle = \sum_{k=0}^{\infty} k^2 p(k; N, \varepsilon) P(N; \langle N \rangle) - \langle k \rangle^2 \\ \langle \Delta k'^2 \rangle = \sum_{k'=0}^{\infty} k'^2 p(k'; N', \varepsilon') P(N; \langle N \rangle) - \langle k' \rangle^2 \end{array} \right. \quad (2.17)$$

Le nombre moyen de molécules est relié à la moyenne et à la variance de la distribution du nombre de photons [9][63]:

$$\langle N \rangle = \frac{\langle k \rangle^2}{\langle \Delta k^2 \rangle - \langle k \rangle} \quad (2.18)$$

Le nombre moyen de molécules après seuillage s'écrit de la même façon :

$$\langle N' \rangle = \frac{\langle k' \rangle^2}{\langle \Delta k'^2 \rangle - \langle k' \rangle} \quad (2.19)$$

Grâce à cette approche, la simulation du nombre moyen de molécules attendues après seuillage est possible. Les résultats de cette simulation vont être comparés avec les résultats des expériences que nous avons réalisées. Nous présenterons aussi l'influence du seuillage sur les courbes d'autocorrélation et sur les courbes de corrélation croisée spatiale.

D.2.3 Les résultats

D.2.3.1 Influence du seuillage sur l'autocorrélation

Nous avons vu les conséquences du recouvrement des volumes d'observation sur les courbes de corrélation croisée spatiale. C'est dans le but de diminuer cette zone de recouvrement qu'a été introduit le seuillage numérique des données. Avant de découvrir l'influence du seuillage sur les courbes de corrélation croisée spatiale nous allons voir cette influence sur les courbes d'autocorrélation et comparer les résultats expérimentaux obtenus ($\langle CR \rangle$ et $\langle N \rangle$) aux résultats obtenus par « simulation ». Nous repartons de l'expérience introduite au paragraphe D.1 pour étudier l'influence du seuillage sur les courbes d'autocorrélation. Le taux moyen de photons par seconde est $\langle CR \rangle \cong 23 \text{ kHz}$. Différents seuillage vont être appliqués aux données brutes : 10, 20, 40 et 70 kHz. Les différentes courbes d'autocorrélation sont représentées sur la figure 2.16. Chaque courbe $G_{AC}(\tau)$ résulte de la moyenne de cinq acquisitions de trente secondes. Les courbes d'autocorrélation sont ajustées avec la formule standard utilisée pour la diffusion en présence de triplet (équation 2.10).

A partir des expériences avec la Rhodamine 6G et avec les nanobilles on avait estimé le rayon effectif du volume d'observation décalé ($\omega = 0.37 \pm 0.05 \mu\text{m}$). Avec l'outil numérique que nous avons développé (le seuillage), ce volume d'observation va pouvoir être réduit de façon significative. Comme l'illustre la figure 2.16, l'amplitude des courbes d'autocorrélation augmente quand la valeur du seuillage augmente. Le nombre moyen de molécules est inversement

proportionnelle à l'amplitude de $G_{AC}(\tau)$, donc l'augmentation de la fréquence de seuillage induit une diminution du nombre moyen de molécules dans le volume de collection. Cet effet est illustré sur la figure 2.17 (a), où est également reporté le résultat de la simulation. L'incertitude sur les valeurs simulées est due à l'effet de discrétisation. Le nombre moyen de molécule passe de $\langle N' \rangle = 1.4$ si aucun seuillage n'est appliquée aux données brutes à 0.04 pour un seuillage de 80 kHz. Rappelons que la valeur moyenne du taux de comptage avant seuillage est égale à 23kHz.

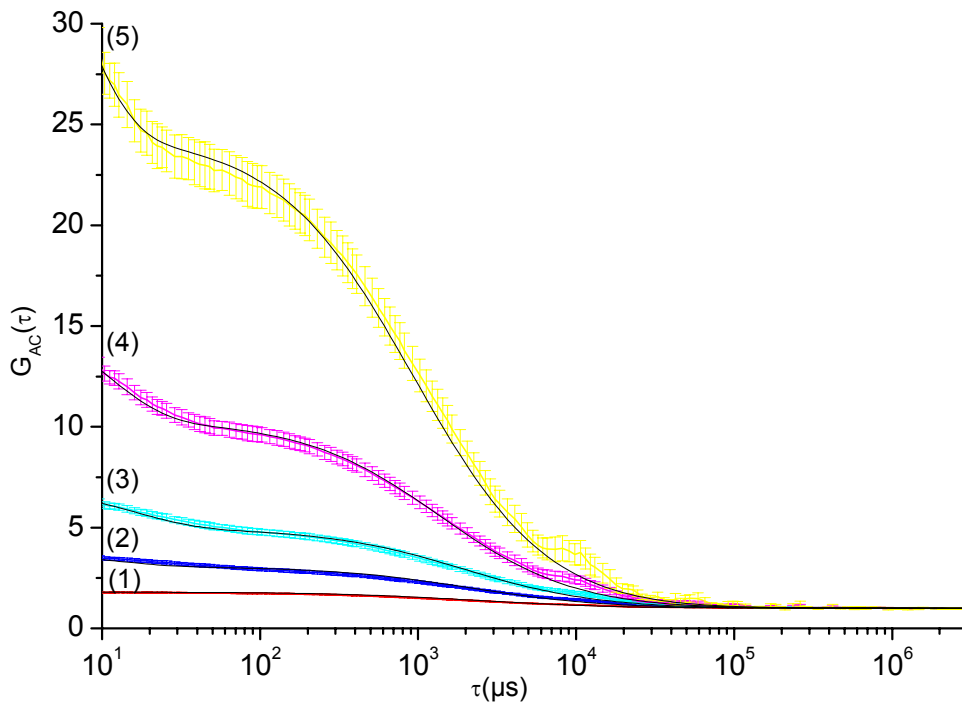


Figure 2.16 : Courbes d'autocorrélation en fonction du seuillage appliqué (exprimé en kHz) pour une solution de billes fluorescentes (20nm): (1) courbe initiale sans seuillage ($\langle CR \rangle = 23\text{kHz}$), (2) $CR_s = 10\text{ kHz}$, (3) $CR_s = 20\text{ kHz}$, (4) $CR_s = 40\text{ kHz}$ et (5) $CR_s = 80\text{ kHz}$. Les barres d'erreur sont obtenues par la réalisation de cinq acquisitions. La courbe superposée sur chaque courbe d'autocorrélation est le résultat de l'ajustement : Le temps de diffusion passe de 2.1ms (aucun seuillage) à 1ms (80kHz).

En parallèle de l'évolution du nombre moyen de molécules, les temps de diffusion obtenus par ajustement des courbes d'autocorrélation expérimentales diminuent quand la fréquence de seuillage augmente. Le temps de diffusion à travers le volume de collection passe de 2,1 ms (pas de seuillage) à 1,0 ms.

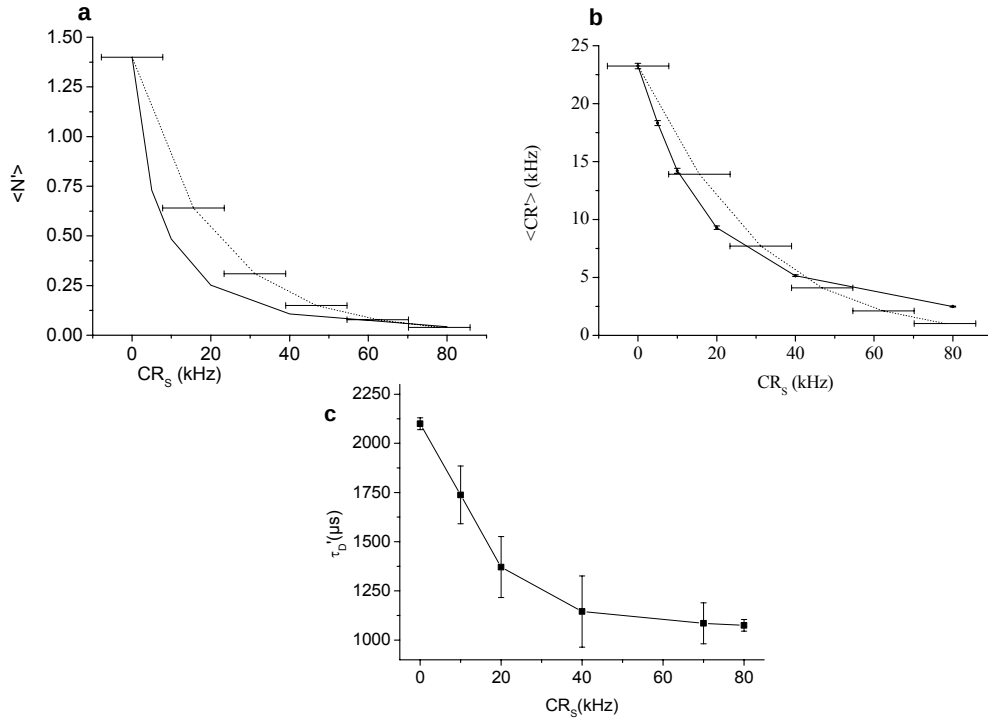


Figure 2.17 : a) Nombre moyen de molécule après seuillage en fonction de la valeur du seuillage CR_s (exprimé en kHz). La courbe en trait continu est obtenue par ajustement des courbes d'autocorrélation expérimentales. La courbe en pointillés avec son incertitude est le résultat de la simulation introduite précédemment. b) Taux de comptage après seuillage en fonction de la valeur du seuillage CR_s . La courbe en trait continu est formée par les valeurs expérimentales. En pointillés, le résultat de la simulation. c) Variations du temps de diffusion obtenu par ajustement des courbes d'autocorrélation expérimentales (figure précédente).

Nous avons fait l'hypothèse que les deux volumes de détection décalés étaient gaussiens. Cette approximation nous a permis de proposer une forme analytique pour la corrélation croisée spatiale de deux volumes de détection décalés latéralement. Cependant comme l'illustre la figure 2.5 (c) – (f), nos volumes de détection s'éloignent de ce profil idéal gaussien. Une conséquence de cette forme non gaussienne est l'impossibilité d'obtenir pour les faibles valeurs de la fréquence de seuillage ($CR_s < 40\text{kHz}$) une valeur expérimentale (obtenue par ajustement des courbes $G_{AC}(\tau)$ expérimentales) pour le facteur S (ω_z/ω_r). Par conséquent pour les faibles valeurs de fréquence de seuillage, la valeur de S sera fixée à la valeur obtenue pour les plus grandes valeurs du seuillage ($CR_s \geq 40\text{kHz}$). Nous voyons également sur la figure 2.17 (a) que l'accord entre le nombre moyen de molécules obtenu par la simulation et expérimentalement est très discutable. Cela est du, en partie, à la simplicité du modèle. Mais il donne quand même une bonne idée de l'évolution de la valeur moyenne du nombre de molécules en fonction du seuillage.

Comme l'illustre la figure 2.17 (b) le taux de comptage moyen diminue quand la fréquence de seuillage augmente, ce qui est parfaitement logique.

Le traitement numérique que nous avons proposé semble être une méthode simple et efficace pour réduire la taille du volume d'observation $MDE(u,v)$. De plus, pour les grandes valeurs de la fréquence de seuillage nous pourrions faire l'approximation du volume de détection gaussien. Toutes ces constatations semblent indiquer que les « ailes » des $MDE(u,v)$ décalées latéralement diminuent quand la fréquence de seuillage augmente. Dans le paragraphe suivant nous allons présenter l'effet du seuillage sur l'expérience de corrélation croisée spatiale déjà entrevue dans le précédent paragraphe. Il est important de préciser, avant de poursuivre, que le seuillage est une méthode qui semble être indiquée pour les expériences de corrélation croisée spatiale (deux ou plusieurs volumes d'observation). Ce traitement numérique n'a pas une méthode « post-acquisition » qui permettrait, dans des expériences de FCS classique, de réduire la taille du volume d'observation ou de le faire tendre vers un volume parfaitement gaussien dans les trois directions de l'espace.

D.2.3.2 Influence du seuillage sur la corrélation croisée

Dans ce paragraphe nous allons voir comment les expériences de corrélation croisée spatiale (géométrie 1) vont pouvoir être améliorées en appliquant un seuillage des données. Avec le seuillage on va pouvoir résoudre partiellement le problème de recouvrement déjà observé par M.Brinkmeier et P.Schwille [58-59]. La figure 2.18 illustre l'effet du seuillage sur la courbe de corrélation croisée spatiale. Notons que seule la moyenne de chaque corrélation croisée seuillée est reportée sur cette figure. La courbe numéro (1) est la courbe expérimentale déjà vu au paragraphe D.2.1. La valeur des fréquences de seuillage sont : 20 kHz pour la courbe numéro (2), 40 kHz pour la courbe numéro (3), 60 kHz pour la courbe numéro (4), 120 kHz pour la courbe numéro (5) et 200 kHz pour la courbe numéro (6). Plus le seuillage est important et plus la proportion d'autocorrélation dans la courbe de corrélation croisée spatiale diminue, le recouvrement étant donc a priori de moins en moins important. Notons que chaque acquisition génère deux courbes qui correspondent à la corrélation croisée du signal de fluorescence de la première voie de détection vers la seconde, notée $G_{CC1 \rightarrow 2}(\tau)$ et inversement, notée $G_{CC2 \rightarrow 1}(\tau)$. Par conséquent, pour une acquisition, chaque courbe expérimentale sera la moyenne de deux corrélation croisée, $G_{CC1 \rightarrow 2}(\tau)$ et $G_{CC2 \rightarrow 1}(\tau)$.

Comme il a été montré au paragraphe précédent, plus la fréquence de seuillage est importante et plus le volume de détection tend vers un volume de détection réduit. Dans ces conditions il est raisonnable d'utiliser l'équation (2.12). Rappelons que R est la distance latérale qui sépare les deux volumes d'observation, ω_R est le rayon du volume et τ_{Dac} est le temps de diffusion effectif des nonobilles dans la partie commune aux deux volumes d'observation. La forme analytique de

la fonction de corrélation croisée est appliquée à la courbe expérimentale de corrélation croisée obtenue en seuillant à la fréquence de 200 kHz. C'est pour cette valeur de la fréquence de seuillage que la valeur de P est la plus faible. Nous ne pouvons pas appliquer une fréquence de seuillage plus importante pour deux raisons : le taux de comptage moyen après le seuillage à 200 kHz est seulement de 1kHz contre 23 kHz avant seuillage et comme l'illustre la figure 2.17, à partir d'une fréquence de seuillage de 60 kHz une augmentation du niveau de seuillage engendre une augmentation du bruit aux temps courts ($\leq 500 \mu s$).

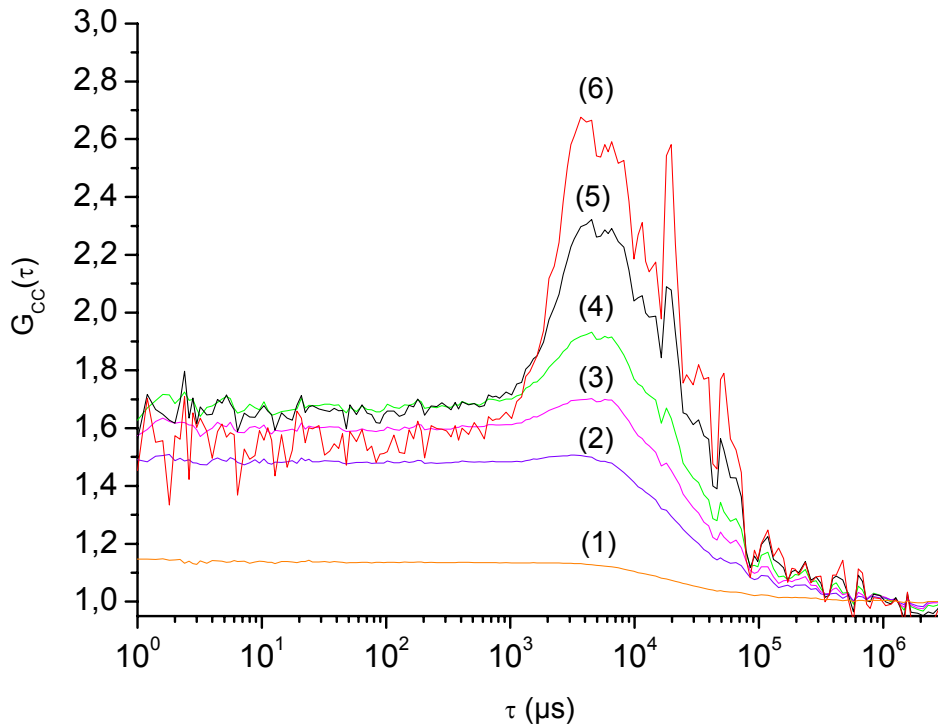


Figure 2.18 : Courbes de corrélation croisée en fonction du seuillage appliqué (exprimé en kHz) pour une solution de billes fluorescentes (20nm): (1) courbe initiale sans seuillage ($CR_s=0kHz$), (2) 20kHz (3) 40kHz (4) 60kHz (5) 120kHz (6) 200kHz. Les courbes représentées sont obtenues en moyennant 10 acquisitions de 30sec.

Dans cet ajustement le facteur S et le rayon ω_r , du volume de détection sont obtenus grâce à l'ajustement des deux courbes d'autocorrélation (relatives aux deux volumes de détection) avec le même seuillage que pour les courbes de corrélation croisée. Dans ces conditions ces paramètres sont $S=3.2\pm0.5$ et $\omega_r=0.25\pm0.04 \mu m$, comparés à $S=7\pm1$ et $\omega_r=0.30\pm0.04 \mu m$ pour une fréquence de seuillage de 70 kHz et $\omega_r=0.37\pm0.05 \mu m$ (S indéterminé) sans seuillage. Dans l'ajustement de la courbe $G_{cc}(\tau)$ ces deux paramètres seront fixés. Connaissant le coefficient de diffusion des nanobilles ($D=11 \mu m^2/s$), les paramètres libres qui pourront être déterminés sont R,

$\langle N \rangle$, τ_{Dac} et P . Le résultat de l'analyse donne $R=0.83\pm0.02 \mu\text{m}$. Cette valeur est indépendante de fréquence de seuillage, elle représente donc l'écart entre les centres des volumes de détection. Le nombre moyen de molécules va être dans cette expérience $\langle N \rangle=0.020\pm0.002$ comparé au nombre moyen de molécules mesuré par autocorrélation $\langle N \rangle=0.014\pm0.002$. Les paramètres P et τ_{Dac} expriment le recouvrement restant entre les deux volumes de détection.

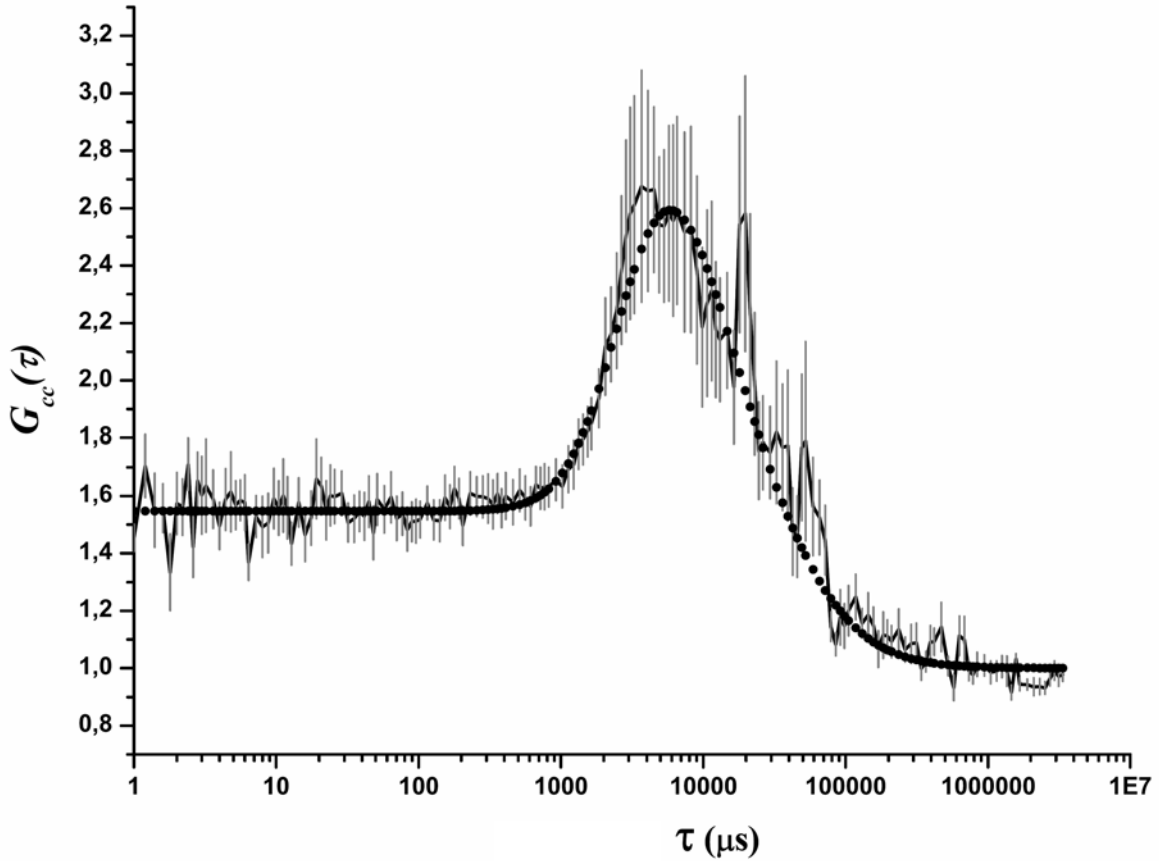


Figure 2.19 : Courbe expérimentale de Corrélation Croisée obtenue avec un seuillage de 200kHz. En pointillé, la courbe d'ajustement. Nous obtenons $\langle N \rangle=0.02$ molécules, $S=3.2$, $\omega_R=0.25\mu\text{m}$ et $R=0.83\mu\text{m}$.

E Bilan de la FCCS géométrie 1

Dans ce chapitre nous avons présenté une nouvelle géométrie pour la spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence. Ce dispositif expérimental est caractérisé par sa simplicité d'utilisation, un seul faisceau laser agrandi et deux voies d'acquisition du signal de fluorescence.

L'avantage de la corrélation croisée spatiale est qu'elle permet l'analyse du seul processus de transport et élimine tout ce qui se produit dans un seul volume. La forte corrélation observée sur la figure 2.18 vers 4 ms est liée aux particules qui se déplacent d'un volume d'observation à l'autre [59]. Par conséquent les applications de cette technique concerneront surtout les mesures de flux. Avec cette géométrie, nous avons montré qu'il était possible de faire des mesures de diffusion libre (des nanobilles) bien que la probabilité qu'une molécule diffuse librement d'un volume de détection à l'autre soit faible. En conséquence, l'amplitude des courbes de corrélation croisée sera faible pour des grands écarts entre les volumes d'observation, mais si R est petit c'est le recouvrement entre les zones d'observation qui va devenir important. Ce recouvrement se traduira par une proportion d'autocorrélation dans les courbes de corrélation croisée. Pour contrer ces deux principales limitations nous avons introduit une procédure de traitement des données, le seuillage. Avec le seuillage du signal de fluorescence nous avons montré qu'il était possible d'augmenter la discrimination entre les deux volumes d'observation, ce qui a permis une nette amélioration des mesures de corrélation croisée. Dans notre dispositif expérimental le recouvrement est plus significatif que celui obtenu avec deux faisceaux d'excitation focalisés [58-59]. Le principal avantage de ce dispositif expérimental par rapport à celui de Brinkmeier est qu'il s'adaptera plus facilement aux microscopes « commerciaux ». Avec la FCCS spatiale géométrie 1 il suffira de sous illuminer la pupille d'entrée de l'objectif du microscope et de décaler latéralement les deux détecteurs. Cette étude a été réalisée avec un fluorophore dont le nombre de photons émis par seconde et par molécule est particulièrement élevé (50kHz/molécule). Les chromophores utilisés en biologie ont des taux de comptage par molécule beaucoup plus faible ($\cong 5$ kHz/molécule), il sera donc particulièrement délicat de seuiller des courbes de corrélation croisée obtenues avec ce genre de fluorophores (le rapport signal sur bruit diminue avec le seuillage). Il sera donc très délicat d'utiliser cette technique en biologie, l'expérience de Brinkmeier sera sans doute plus adaptée dans ce cadre.

Chapitre 3

Spectroscopie à Corrélation Croisée Spatiale de Fluorescence : Géométrie 2

Au chapitre précédent nous avons proposé un dispositif expérimental particulièrement simple pour passer des mesures de FCS classique à des mesures de FCCS spatiale. Il suffit simplement d'élargir le faisceau d'illumination à l'entrée de l'objectif et de décaler les deux pinhole de sortie. La FCCS spatiale est, nous l'avons vu, adaptée pour des mesures de flux. Dans ce chapitre nous allons continuer dans l'esprit « mise en forme des volumes » dans le but d'améliorer la FCS (nouvelles mesures, meilleur sensibilité, ...). Cette piste n'a pas été à notre connaissance beaucoup explorée. Nous pouvons quand même citer H.Blom [98][99] avec la création d'un système multifocale (matrice de 2×2 spots) pour l'excitation et la détection de molécules fluorescentes dans des microcanaux. Une autre motivation importante est la réduction du volume d'observation, cela permettra d'étudier plus efficacement les systèmes biologiques, pour lesquels les concentrations typiques sont plus proches du mM ($10^{-3}M$) que du nM ($10^{-9}M$) (condition requise en FCS standard). Citons ainsi J. Wichmann et S.Hell [80], ils ont réalisé des expériences de FCS avec un volume de détection nanométrique généré par émission stimulée. Une autre approche est basée sur la réflexion totale et concerne l'étude des réactions au voisinage des surfaces [79]. Et nous finirons ce tour d'horizon avec l'expérience de Levenne et al [119]. Cette expérience est une réelle avancée. La taille des volumes confocaux est (beaucoup) plus petite que la taille des volumes confocaux limités par la diffraction.

Dans ce chapitre nous allons présenter une nouvelle géométrie des volumes confocaux, le but étant d'atteindre une meilleure précision dans la mesure des constantes de diffusion et une meilleure discrimination entre la diffusion et les autres processus (dynamique singulet-triplet ou photoblanchiment) qui peuvent participer aux fluctuations d'intensité à des temps courts (voir paragraphe 1). L'idée que nous avons eue, c'est de faire la corrélation croisée entre le signal de fluorescence collecté par un volume interne et un volume qui l'entoure, de forme annulaire. Nous notons $\delta n_{V_{interne}}$ les fluctuations de fluorescence détectées par le volume interne et $\delta n_{V_{externe}}$ celles collectées par l'anneau qui l'entoure :

$$G_{CC}(\tau) = \frac{\langle \delta n_{V_{interne}}(\vec{r}, t) \delta n_{V_{externe}}(\vec{r}', t + \tau) \rangle}{\langle n_{V_{interne}}(\vec{r}, t) \rangle \langle n_{V_{externe}}(\vec{r}', t + \tau) \rangle} \quad (3.1)$$

Dans une expérience idéale, le recouvrement des volumes est nul de sorte que le signal de corrélation croisée est également nul au temps initial : $G_{CC}(\tau=0)=0$. En pratique ce n'est pas le cas à cause du recouvrement qui peut exister entre les volumes. Les courbes de corrélation croisée obtenues présenteront cependant un maximum correspondant à la diffusion des molécules entre les deux volumes. Nous espérons obtenir une meilleure résolution et précision de la constante de diffusion des espèces fluorescentes observées. En effet sa détermination dépend de la mesure de la largeur et de la position du maximum du signal de corrélation.

Nous allons voir dans la suite le dispositif expérimental et l'approche théorique en supposant un modèle à 2D. Nous verrons ensuite les expériences avec des molécules fluorescentes en solution (Rhodamine 6G et nanobilles) et les premiers essais avec des vésicules.

A Etat de l'art

Dans ce paragraphe vont être exposées trois méthodes originales de mises en forme spécifique de la fonction d'efficacité de détection des molécules (MDE).

P.F.Lenne et H.Rigneault [83] ont récemment montré que la présence d'un miroir au point de focalisation d'un faisceau affecte la forme du volume d'observation. Dans le principe : un miroir à large bande spectrale est placé perpendiculairement à l'axe optique au voisinage du waist. Le faisceau d'excitation qui est reflété produit une figure d'interférence le long de l'axe optique avec une distance d'interfranges valant $\lambda_0/2n$ où λ_0 est la longueur d'onde d'interférence et n l'indice de réfraction. Sur la figure suivante, extraite de la publication de P.F.Lenne et H.Rigneault [83], nous voyons comment est affectée la MDE en fonction de la position du waist par rapport à la surface du miroir.

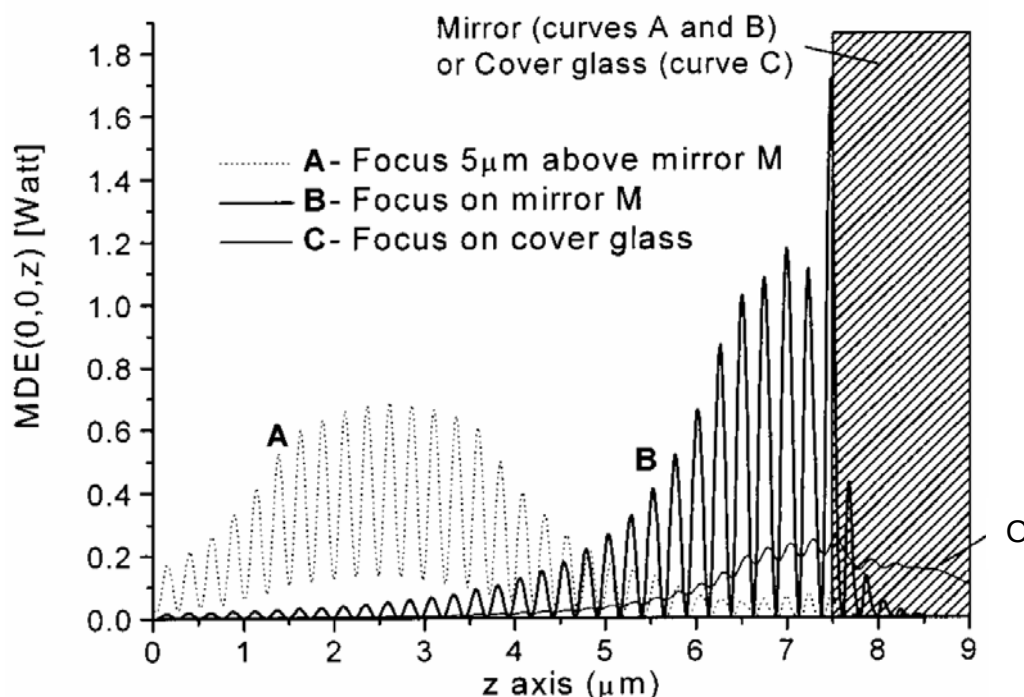


Figure 3.1 : Principe de l'expérience de P.F.Lenne et H.Rigneault. Différentes fonctions d'efficacité de détection des molécules : $MDE(r=0,z)$ pour un volume de collection localisé $5\mu m$ avant la surface M (A), sur la surface M(B) et sur la lamelle couvre objets (C).

La forme des fonctions d'efficacité de détection des molécules est très différente des formes obtenues dans le cas « général » où elle est le plus souvent assimilée à une fonction gaussienne. Les auteurs ont montré que la présence du miroir altère la forme de l'émission de radiation et du champ d'excitation. Cette altération conduit à une augmentation du nombre de photons émis par molécule et donc réduit l'écart type dans les fonctions d'autocorrélation (chapitre1). Cela conduit à une meilleure précision dans les mesures du coefficient de diffusion.

La deuxième méthode est basée sur la réduction du volume de détection. Il est admis que le spot confocal n'est pas réductible en deçà de la longueur d'onde de la lumière λ . En effet la diffraction implique un étalement proche de $\lambda/3$ dans la direction latérale et λ selon l'axe de propagation. S.Hell [80-82] suggère qu'il est possible de réduire la taille du spot focal en deçà de la limite de diffraction. Le dispositif « utilise » deux trains d'impulsions laser synchronisées : un train d'impulsions visibles pour l'excitation des molécules fluorescentes et un autre pour le STED (STimulated Emission Depletion) de longueur d'onde dans le proche infrarouge. Pour réduire la taille du spot focal il est nécessaire que la distribution d'intensité du faisceau-STED soit intense à la périphérie de la zone excitée et nulle au centre. Pour ce faire, une lame $\lambda/2$ est placée sur le chemin de ce faisceau. A l'entrée de l'objectif la moitié de l'amplitude est en inversion de phase,

de sorte que le front d'onde focalisé produit des interférences destructives au centre du plan focal. Le dispositif expérimental est présenté sur la figure 3.2 (extraite de la publication de S.Hell [81]).

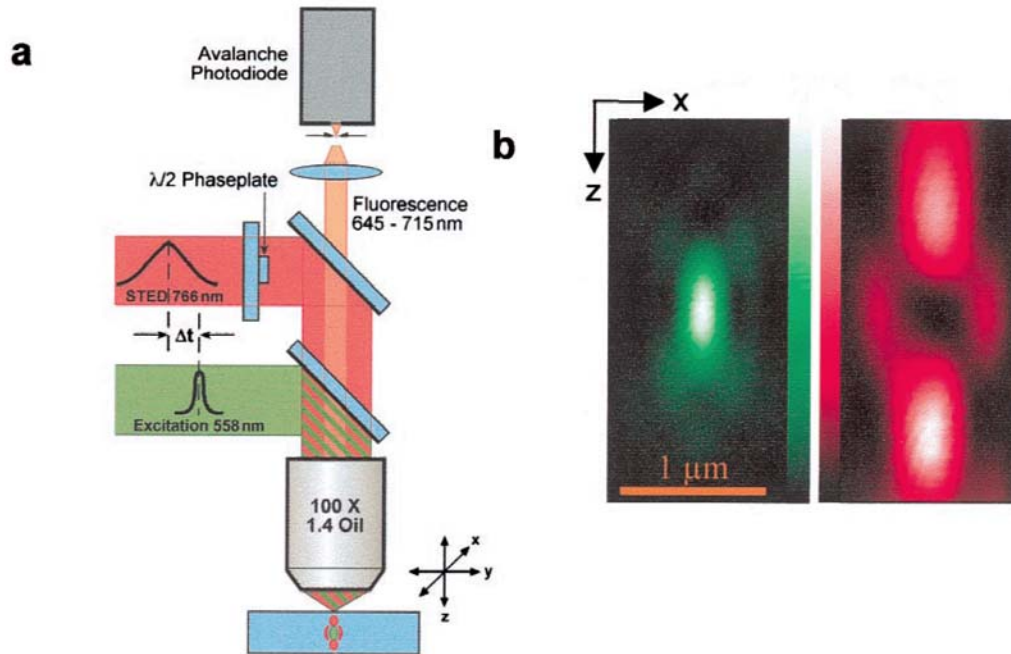


Figure 3.2 : Principe du STED de S.Hell. (a) les pulses d'excitation sont suivit par les pulses STED (stimulated emission depletion) pour inhiber la fluorescence. La fluorescence est détectée à travers un pinhole de sortie par une photodiode à avalanche. (b gauche) PSF d'excitation mesurée (b droite) PSF du faisceau-STED mesurée.

La figure 3.2 (b) montre que la la dépletion de la zone périphérique conduit à un spot focal plus petit. Dans ces conditions il est possibles d'obtenir des volumes de l'ordre de 0.67 attolitre (18 fois plus petit qu'en microscopie confocale). Cette méthode peut paraître séduisante avec des spot focaux de petit diamètre (90-110nm) mais sa mise œuvre est délicate et son utilisation en routine (en biologie notamment) parait difficilement envisageable.

La dernière méthode est l'œuvre de W.W.Webb et al [119]. Les auteurs sont partis du constat que l'observation de la dynamique des molécules uniques est compatible avec des concentrations pico ou nano molaires dans le but d'isoler les molécules individuelles. En biologie beaucoup de processus se produisent à des concentrations milli molaire. Il est donc nécessaire de réduire la taille du volume d'observation. Webb et al ont eu une idée originale basée sur des guides d'ondes un peu particuliers.

Les guides d'ondes métalliques présentent une longueur d'onde de coupure (λ_c) au dessus de laquelle aucune propagation n'est possible dans le guide. Cette longueur d'onde est liée à la forme et à la longueur du guide. Dans le cas présent, le guide d'onde est circulaire. Ils ont mis en

évidence que pour ce genre de guide l'intensité de l'onde incidente décroît exponentiellement le long de l'axe z. La rapide décroissance de l'intensité de l'illumination à l'entrée du guide permet de créer des volumes proche du zepto litre (10^{-21} l). Le schéma de principe est reporté figure (3.3).

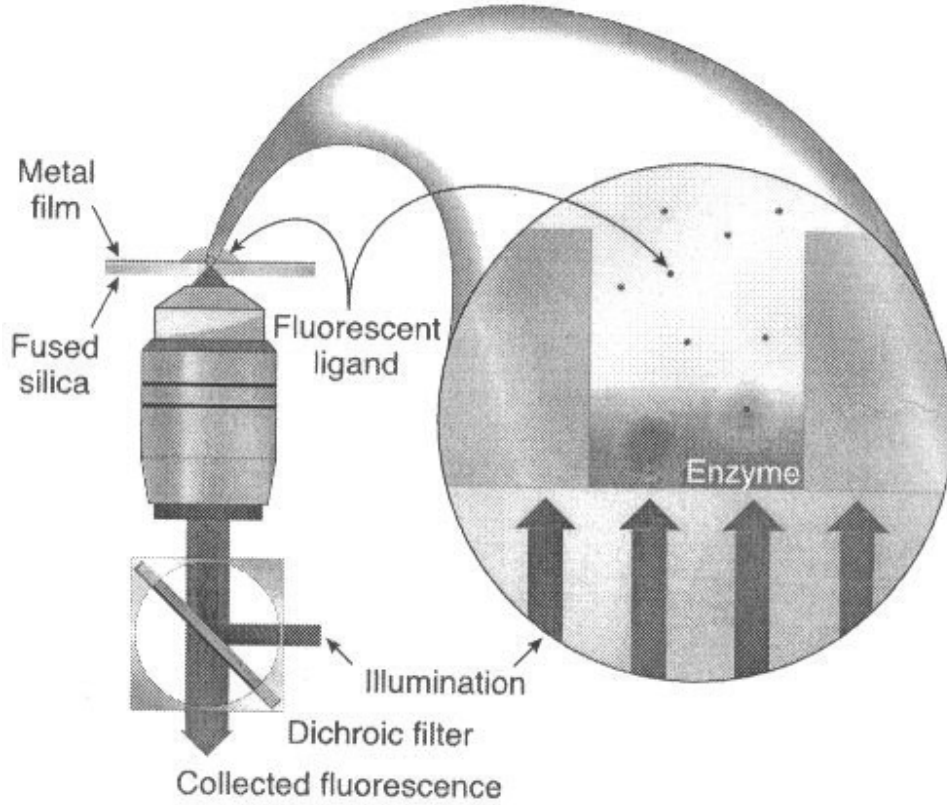


Figure 3.3 : Schéma de principe de l'expérience de Webb et al. Le faisceau de d'excitation est focalisé par un objectif de microscope. Le faisceau ainsi focalisé est « guidé » par un guide d'onde, obtenu grâce à une plaque métallique percée de trou circulaire de diamètre d. Ce système permet d'obtenir des volumes efficaces proches du zepto litre (10^{-21} l).

Le dispositif expérimental semble relativement simple. Le guide d'onde est obtenu via une plaque métallique avec un réseau de trou. Les auteurs ont mis en évidence que le volume efficace est relié au diamètre (d) du guide (équation (3.2)) :

$$V_{\text{eff}} = \frac{\pi d^2}{4} \frac{\left(\int MDE(z) dz \right)^2}{\int MDE^2(z) dz} \quad (3.2)$$

Les auteurs ont montré que cette méthode est tout à fait adaptée pour les expériences de FCS. Les courbes expérimentales obtenues avec la deoxycytidine triphosphate R110-dCTP ($C=10\mu\text{M}$, $d=43\text{nm}$) illustrent bien la taille du volume effectif. Avec une concentration aussi élevée, en FCS classique, l'amplitude des courbes de corrélation devrait être (très) faible de l'ordre de $1/10000$. Ici ce n'est pas le cas. L'amplitude est comparable aux mêmes expériences qui auraient été réalisées en FCS classique avec une concentration de 4nM ! Les auteurs soulignent aussi l'apport que cette technique pourrait apporter pour la FCCS où le nombre de molécules sondées est un paramètre de première importance.

Le chemin que nous avons choisi n'est pas la réduction du volume confocale. Nous nous sommes orienté vers la mise en forme de la détection confocale. Le but étant comme pour la géométrie 1 de tenter d'accroître la résolution de la FCS.

B FCCS spatiale trou anneau

B.1 Illumination laser et fonction d'efficacité de collection

Au chapitre 2 nous avons vu que les deux volumes de détection pouvaient être définis avec leur Efficacité de Détection des Molécules. Dans ce chapitre nous noterons $\text{MDE}_{V_{\text{interne}}}(\vec{r}, z)$ et $\text{MDE}_{V_{\text{externe}}}(\vec{r}, z)$ respectivement les Efficacités de Détection des Molécules du volume de détection intérieur et extérieur. Rappelons que ces fonctions sont le produit des Fonctions d'Efficacité de Collection, notées $\text{CEF}_{V_{\text{interne}}}(\vec{r}, z)$ et $\text{CEF}_{V_{\text{externe}}}(\vec{r}, z)$ et du profil d'illumination du faisceau laser. Notons que pour la FCCS spatiale (géométrie 2) un seul laser est utilisé grâce à la sous illumination de la pupille d'entrée de l'objectif (voir paragraphe : dispositif expérimental).

Les Fonctions d'Efficacité de Collection sont représentées sur la figure 3.4. Elles ont été obtenues, comme pour la géométrie 1, par intégration de la PSF sur la section de détection du pinhole (central et annulaire). Le pinhole central est le même que pour la géométrie 1 (diamètre : 4uo), le pinhole annulaire a un diamètre intérieur de 4.92uo ($0.36\mu\text{m}$) et extérieur de 7.03uo ($0.52\mu\text{m}$) (correspondance en μm : chapitre 2). Le diamètre intérieur est choisi pour avoir un faible recouvrement avec le pinhole intérieur et le diamètre extérieur. Il est également choisi pour qu'une illumination simplement étendue soit suffisante pour couvrir tout l'anneau. Les amplitudes des Fonctions d'Efficacité de Collection sont normalisées par $\text{CEF}_{V_{\text{interne}}}(0,0)$ (pour avoir $\text{CEF}_{V_{\text{interne}}}(0,0)=1$). L'autre caractéristique intéressante du pinhole annulaire est que sa Fonction d'Efficacité de Collection, $\text{CEF}_{V_{\text{externe}}}(\vec{r}, z)$, présente en plus des maxima dans la direction radiale (v) des maximum secondaires moins intenses le long de l'axe optique (u). Dans un raisonnement à 3 dimensions la $\text{CEF}_{V_{\text{externe}}}(\vec{r}, z)$ forme une coque autour de la $\text{CEF}_{V_{\text{interne}}}(\vec{r}, z)$.

Pour la compréhension et pour simplifier les calculs, une approche à deux dimensions a été choisie. De notre point de vue la coupe 2 dimensions dans le plan focale ($u=0$) est la plus appropriée pour analyser les données expérimentales.

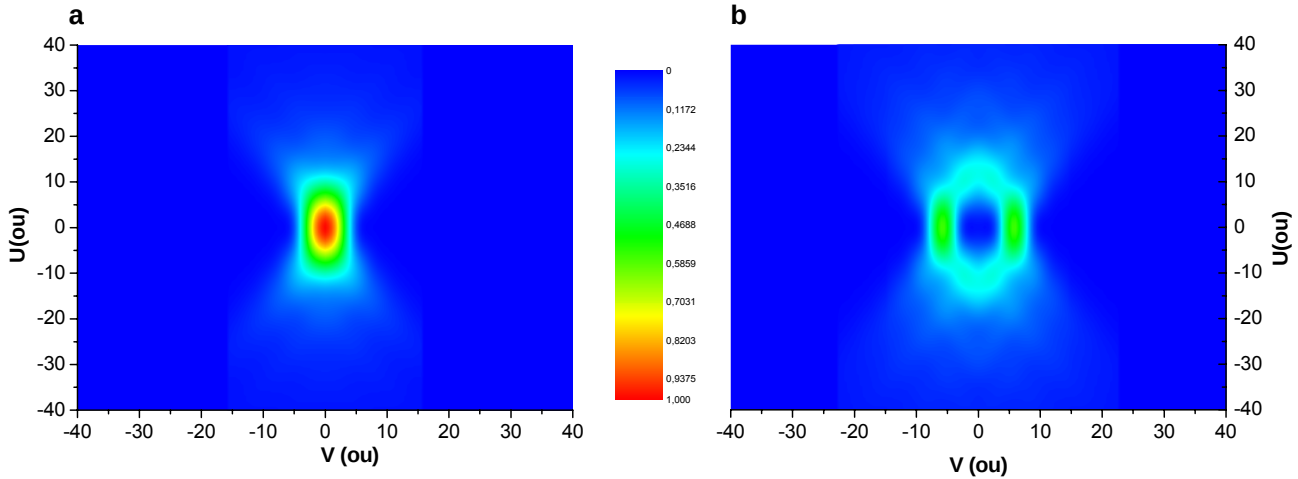


Figure 3.4 : Représentation de la fonction d'efficacité de collection représenté dans le plan u_o, v_o ($CEF(u_o, v_o)$) pour un pinhole de 4 uo (a) et pour un anneau de diamètre intérieur 4.92 uo et extérieur 7.03 uo. L'amplitude est représentée en échelle logarithmique de niveau de couleur. Les distances sont représentées en unité optique (uo).

Après les CEF (figure 3.4) voyons maintenant le profil d'illumination (figure 3.5). Comme pour la géométrie 1, il n'y a ici qu'une source d'illumination laser. Elle est mise en forme par un télescope (section : dispositif expérimental) de façon à obtenir une sous illumination de la pupille d'entrée de l'objectif. Cette illumination est caractérisée par le facteur $\beta = \omega/r$ avec r le rayon de la pupille d'entrée de l'objectif et ω est le rayon du faisceau gaussien incident. Pour illuminer efficacement les molécules il est nécessaire d'utiliser un remplissage $\beta=0.1$. Le profil d'illumination correspondant est représenté sur la figure suivante :

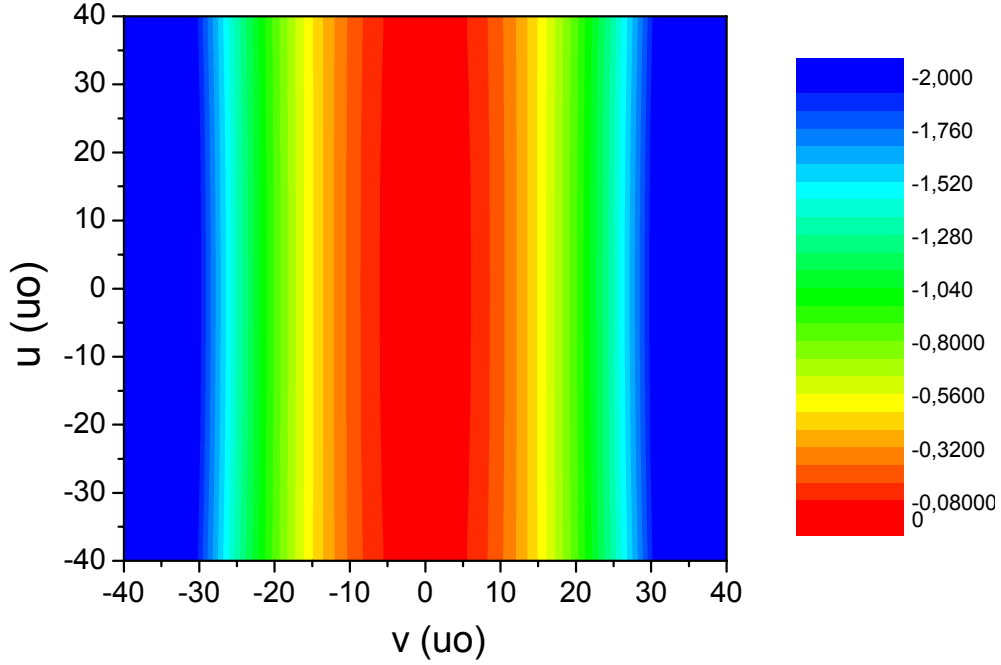


Figure 3.5 : Profil de l'intensité dans le plan (u,v) pour un facteur de remplissage $\beta=0.1$. L'amplitude est représentée en échelle de niveau de couleur logarithmique. Les distances sont représentées en unité optique (uo).

Sur la figure 3.6 les Fonctions d'Efficacité de Collection et l'illumination étendue ($\beta=0.1$) sont représentées dans le plan $u=0$. A deux dimensions le profil laser peut être représenté par la fonction suivante :

$$I^{2D}(r)=I(r,z=0)=I_0 \times e^{-2\left(\frac{r}{\omega_0}\right)^2} \quad (3.3)$$

avec $\omega_0 = \frac{\lambda}{\pi \beta ON}$

Il peut être montré que si β est plus petit que 0.5, alors le profil du faisceau laser focalisé reste gaussien et on peut écrire l'équation (3.3) [9][10].

L'illumination ($\beta=0.1$), représentée avec des traits mixtes, est suffisamment large pour illuminer la CEF de l'anneau (en pointillés) et la CEF du trou centré (tirets). Pour justifier un élargissement de l'illumination au foyer de l'objectif, nous avons également reporté sur cette figure

l'illumination pour $\beta=1$ (trait continu). Dans ce cas la fonction d'efficacité de collection de l'anneau n'est même pas illuminée.

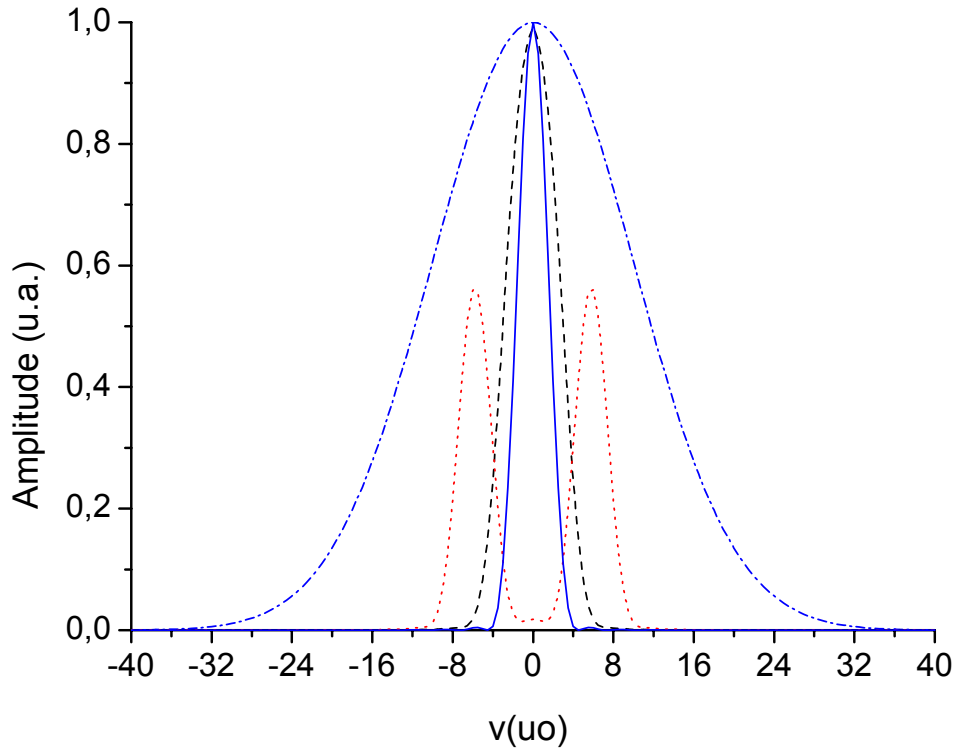


Figure 3.6 : Coupe en $u=0$ des Fonctions d'Efficacité de Collection (figure 3.4) ($CEF_{V_{interne}}(\vec{r}, z=0)$, tirets et $CEF_{V_{externe}}(\vec{r}, z=0)$, pointillés). Le profil d'illumination est représenté pour $\beta=0.1$ (tiret pointillé) et $\beta=1$ (trait plein).

B.2 Les volumes d'observation et la fonction de corrélation croisée

B.2.1 Les fonctions d'Efficacité de Détections des Molécules

Les volumes d'observation, représentés par la MDE, sont le produit de la fonction d'efficacité de collection par le profil d'excitation : $MDE(u_o, v_o) = CEF(u_o, v_o) \times I(u_o, v_o)$ (chapitre 2). Pour être le plus proche possible de notre dispositif expérimental, toutes les simulations numériques des

profils des $MDE(u_0, v_0)$ ont été réalisées en prenant un rayon de $4u_0$ pour le trou de filtrage centrale et un trou de filtrage annulaire de diamètre intérieur de $4.92u_0$ ($0.36\mu m$) et extérieur de $7.03u_0$ ($0.52\mu m$).

Sur la figure 3.7 (a) et (b) sont représentées les deux formes de $MDE(u_0, v_0)$ pour un trou de filtrage centrale (a) et annulaire (b) dans le plan méridien et pour un remplissage de la pupille d'entrée de l'objectif $\beta=0.1$. La figure 3.7 (c) est une coupe en $u=0$ de la MDE annulaire (pointillés) et centrale (tirets). Sur la figure 3.7 (c), les MDE à deux dimensions ont une forme proche d'une fonction gaussienne.

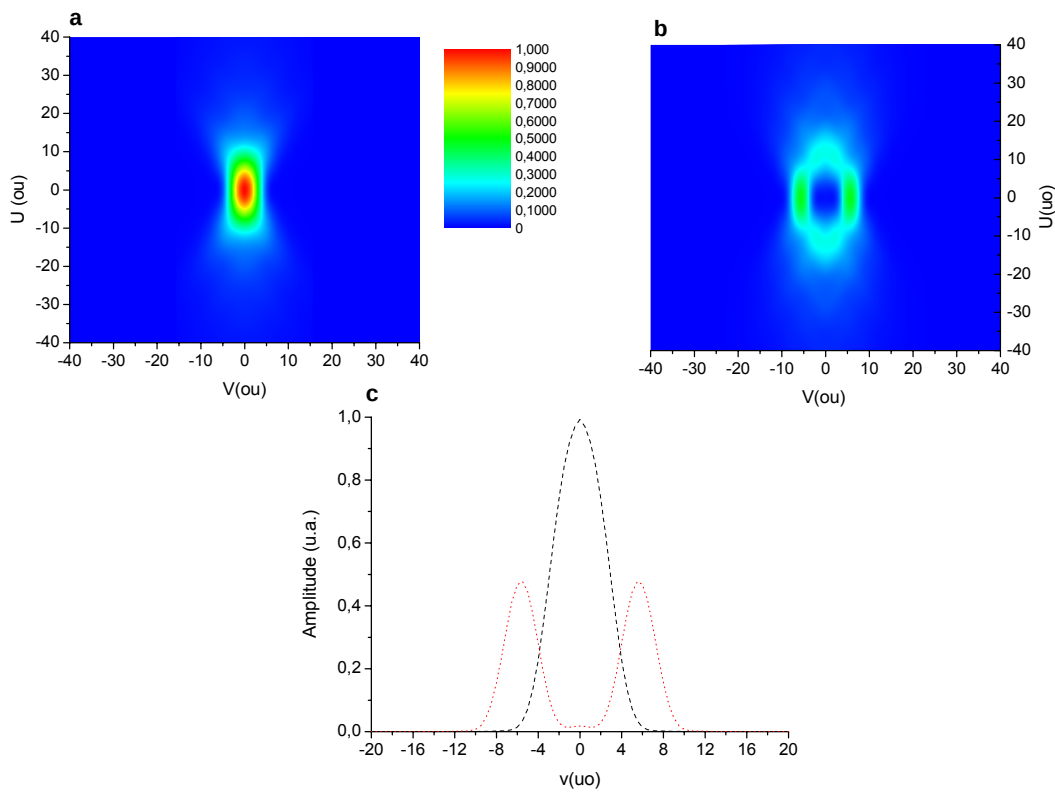


Figure 3.7 : Profils des MDE pour un pinhole de $4 u_0$ (a) et pour un anneau de diamètre intérieur $4.92 u_0$ et extérieur $7.03 u_0$. Les profils des MDE dans le plan $u=0$ (c)

Il est donc possible de donner une forme analytique aux fonctions de corrélation croisée. L'efficacité de détection du volume centrale à deux dimensions est décrite par une fonction gaussienne de demi largeur ($\omega_{V_{interne}}$) à mi-hauteur :

$$MDE_{V_{interne}}^{2D}(r)=A_{V_{interne}}e^{-2\left(\frac{r}{\omega_{V_{interne}}}\right)^2} \quad (3.4)$$

de même pour l'efficacité de détection du volume extérieur :

$$MDE_{V_{externe}}^{2D}(r)=A_{V_{externe}}e^{-2\left(\frac{r-r_{V_{externe}}}{\omega_{V_{externe}}}\right)^2} \quad (3.5)$$

où $r_{V_{externe}}$ est le rayon moyen de l'anneau et $\omega_{V_{externe}}$ est la demi largeur à mi-hauteur.

B.2.2 Fonction de corrélation croisée

Si les équations (3.4), (3.5) et (1.33) sont utilisées pour la fonction de corrélation croisée [78][59], l'intégrale (équation (1.34)) peut être résolue analytiquement (en utilisant la fonction de Bessel imaginaire J_0). On obtient la fonction de corrélation croisée suivante :

$$G_{CC}(\tau)=1+(C\pi\omega_{eff}^2)^{-1}\left(1+\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}e^{-r^2\left(1+\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}} \quad (3.6)$$

avec

$$\omega_{eff}^2=\frac{(\omega_{V_{interne}}^2+\omega_{V_{externe}}^2)}{2} \quad (3.7)$$

$$\tau_D=\frac{\omega_{eff}^2}{4D} \quad (3.8)$$

$$r=\frac{r_{V_{externe}}}{\omega_{eff}} \quad (3.9)$$

Où C est la concentration des molécules fluorescentes et D la constante de diffusion correspondante. La fonction de corrélation croisée présente un maximum dont la position temporelle est τ_{max} . Cette valeur est donnée par :

$$\frac{dG_{CC}(\tau_{max})}{d\tau}=0$$

c'est-à-dire

$$(C\pi\omega_{eff}^2)^{-1} \left(\frac{r^2}{\tau_D} \left(1 + \frac{\tau_{max}}{\tau_D} \right)^{-3} e^{-r^2 \left(1 + \frac{\tau_{max}}{\tau_D} \right)^{-1}} - \frac{1}{\tau_D} \left(1 + \frac{\tau_{max}}{\tau_D} \right)^{-2} e^{-r^2 \left(1 + \frac{\tau_{max}}{\tau_D} \right)^{-1}} \right) = 0 \quad (3.10)$$

Le maximum est donc localisé au temps $\tau_{max} = \frac{r_{Vexterne}^2 - \omega_{eff}^2}{4D}$ (3.11).

Il faut souligner que le modèle à deux dimensions peut fournir des informations sur le signal de fluorescence détecté par le pinhole central et le pinhole annulaire. Cette propriété va nous être utile dans la suite, notamment pour la discussion des résultats expérimentaux.

C Dispositif expérimental de la FCCS - géométrie 2

C.1 Vue d'ensemble

Le dispositif expérimental de la géométrie 2 est très semblable à celui de la géométrie 1, seuls changent les pinholes de sortie (figure 3.8) et la focale de la lentilles 4. Un des deux trous de filtrage est remplacé par un pinhole de forme annulaire. L'illumination à l'entrée de l'objectif (60×, ON, 1.2) est la même que pour la FCCS spatiale géométrie 1. Cette illumination est mise en forme de façon à avoir $\beta \approx 0.1$. Le signal de fluorescence acquis est « cross corrélé », de la même que pour la géométrie précédente, par notre système d'acquisition et de corrélation (PHONOS).

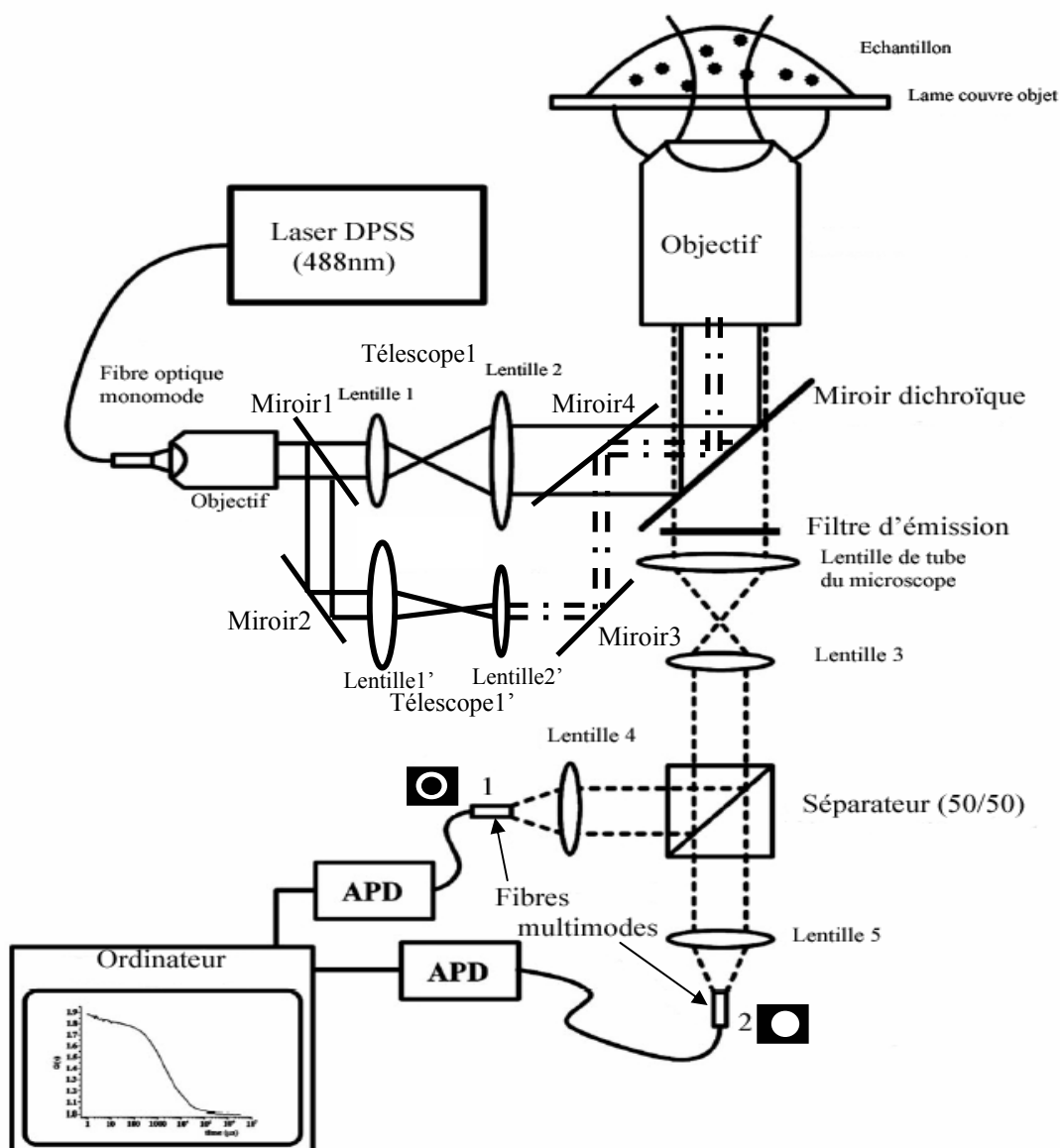


Figure 3.8 : Dispositif expérimental de la FCCS géométrie 2. La collection du signal est assurée par un trou et un anneau.

C.2 Les détecteurs

Fabrication

Un des buts de cette thèse est de trouver des façons différentes et originales pour l'excitation et la détection de molécules fluorescentes.

La détection de la fluorescence est, nous l'avons déjà vu, assurée par le cœur d'une fibre multimode. Ce paragraphe explique comment, à partir d'une fibre multimode, nous avons réalisé une nouvelle façon de collecter les photons de fluorescence.

Pour fabriquer ce détecteur nous avons au préalable déposé une couche métallique sur le cœur de la fibre optique. La surface de collection est ensuite réalisée par ablation laser. Nous allons montrer en détail les différentes étapes, depuis le dépôt sur la fibre et jusqu'à l'ablation laser.

La couche métallique est déposée par évaporation. Pour le choix du métal trois facteurs rentrent en compte. Le premier est l'épaisseur de peau, c'est-à-dire l'épaisseur sur laquelle le champ électrique pénètre dans le métal. Cette épaisseur est nulle seulement dans le cas d'un métal parfaitement conducteur. Plus l'épaisseur de peau est faible et plus l'épaisseur à déposer sera faible. Il faut aussi choisir un métal pouvant être facilement évaporé (possédant une température de fusion pas trop élevée). Le dernier facteur dans le choix du métal concerne l'adhésion sur le cœur de la fibre. L'aluminium présente certains avantages, comme une faible épaisseur de peau, de l'ordre de 7nm et peut être facilement évaporé, mais son adhésion à la surface de fibre est médiocre. La solution est de faire évaporer au préalable une fine couche de Nickel-Chrome (3nm).

Pour l'évaporation du métal, la fibre est fixée sur un support et l'ensemble est placé dans une chambre. Le vide est fait dans cette chambre ($P=10^{-6}$ mbar), un courant électrique est appliqué au creuset (contenant le métal) pour atteindre la température de fusion. Pour avoir un dépôt le plus homogène possible, le support sera placé au plus prêt du creuset.

Un détecteur (cristal de quartz) placé dans la chambre d'évaporation permet de contrôler l'épaisseur et la rapidité du dépôt.

L'épaisseur d'aluminium choisie pour notre pinhole de sortie est 180nm, la zone de collection de ce détecteur est de forme annulaire (3.9).

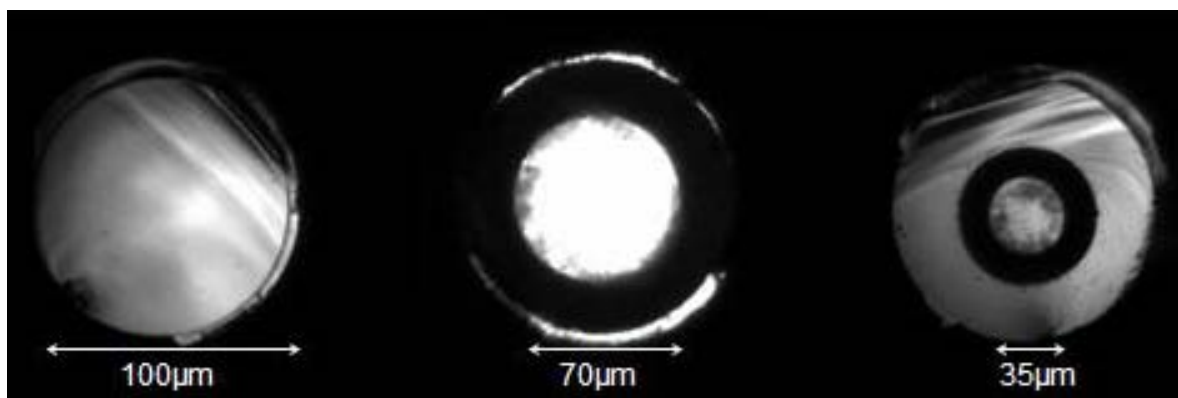


Figure 3.9 : Fibre optique (diamètre 100µm) avant ablation de la zone de collection (à gauche) et après ablation (70 et 35 µm).

Le dispositif expérimental d'ablation de la couche métallique est schématisé en figure 3.10. Le faisceau d'un laser pulsé (Nd:YAG) de puissance moyenne 20mW est focalisé par un objectif de microscope, $ON = 0.40$, $\times 20$ (LCPlanFI, OLYMPUS) sur le dépôt métallique de la fibre optique. La fibre est maintenue en place par un mandrin, il est déplacé par un piézoélectrique (PiezoSystem, JENA) contrôlé par une interface informatique (PCI 6024-E, National Instrument). Cette interface est programmée via un programme Labview (National Instrument), qui engendre un anneau de diamètre intérieur et extérieur variable. La vitesse de remise à jour, autrement dit la vitesse entre deux points successif, est 500 Hz. Pour les besoins expérimentaux de la « géométrie2 », le diamètre intérieur de l'anneau est $70\mu\text{m}$ et le diamètre extérieur est $100\mu\text{m}$ (il correspond aussi au diamètre extérieur du cœur de la fibre)

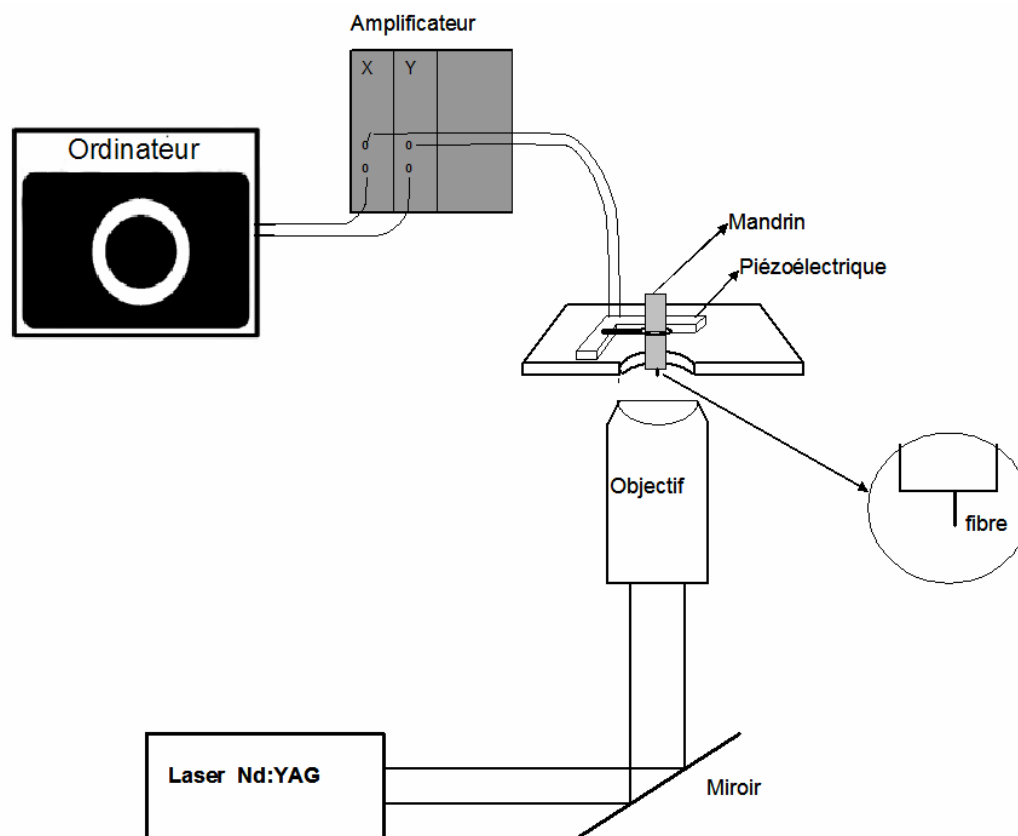


Figure 3.10 : Dispositif expérimental d'ablation laser. L'objectif de microscope focalise un faisceau laser. Le piezoélectrique déplace la fibre selon un déplacement prédéfini par programmation.

Taille des volumes de détection

La taille de l'anneau est choisie de façon à créer une surface de collection qui soit supérieure à celle du trou centré, pour compenser le fait que l'intensité d'excitation est moins intense pour la surface de détection extérieure (anneau). Comme pour la FCS, le grandissement G_t^2 du deuxième télescope composé de la lentille 3 et de la lentille 5 est choisi pour adapter la taille du disque d'Airy ($r_{Airy} \cong 0.255 \mu m$) à la taille du cœur de la fibre (100 μm de diamètre). Ce grandissement vaut 3 les focales des lentilles 3 et 5 sont respectivement $f_3 = 10 mm$ et $f_5 = 30 mm$. Pour les raisons évoquées précédemment nous choisissons une surface de détection de l'anneau S_{anneau} deux fois plus grande (choix arbitraire) que la surface du trou centré S_{trou} . Si on raisonne dans l'espace objet, pour qu'il y ait un minimum de recouvrement entre la Fonction d'Efficacité de Collection du trou centré et celle de l'anneau il faut lui choisir un rayon intérieur ($r_{Vinterieur}$) plus grand que le rayon du trou centré, ici 0.35 μm . Connaissant la surface de l'anneau et son rayon intérieur on déduit son rayon extérieur ($r_{Vextérieur}$) :

$$r_{Vextérieur} = \sqrt{\frac{S_{anneau}}{\pi} + r_{Vinterieur}^2} = \sqrt{2 \frac{S_{trou}}{\pi} + r_{Vinterieur}^2} \cong 0.50 \mu m.$$

Pour la focale de la lentille 5 (télescope 2') nous choisissons pour des raisons pratiques $f_5 = 16 mm$. Ceci qui donne un grandissement $G_t^{2'}$ de 1.6. Dans l'espace image le rayon extérieur vaut environ 50 μm ($0.52 \times 60 \times 1.6$) et le rayon intérieur 34 μm ($0.36 \times 60 \times 1.6$).

D Résultats

Quelque soit l'espèce fluorescente observée (Rhodamine 6G, billes de 20, 100 et 200nm) le rapport entre le signal de fluorescence du pinhole central et du pinhole annulaire, (noté K) se situe dans l'intervalle [0.38-0.46]. Le résultat contraste avec la valeur attendue pour $\beta \cong 0.1$. Nous pouvons en effet calculer le rapport K à partir des sections à deux dimensions des MDE :

$$K = \frac{\int MDE_{Vinterne}^{2D}(\vec{r}) r d\vec{r}}{\int MDE_{Vexterne}^{2D}(\vec{r}) r d\vec{r}} \quad (3.12)$$

Les MDE ainsi calculées sont représentées figure 3.11 (obtenues avec $\beta = 0.1$). Le rapport K peut être retrouvé si on suppose que le rayon du faisceau d'illumination, ω_R , est compris entre 0.37 et 0.40 μm . Ceci correspond à un facteur β compris dans l'intervalle [0.32-0.35]. Il faut noter qu'en ajustant l'extension du faisceau laser au foyer, on modifie non seulement le rapport des amplitudes des MDE centrale et annulaire, mais également la position et la largeur de celles-ci.

Il est nécessaire de représenter à nouveau les MDE (à deux dimensions) en prenant $\beta=0.35$ (figure 3.11).

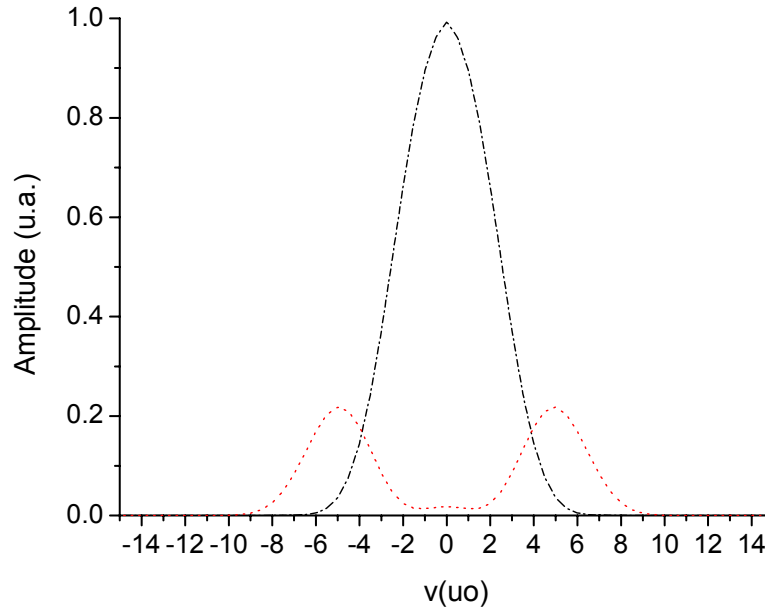


Figure 3.11 : Fonctions d'Efficacité de Détection des Molécules dans le plan $u=0$. Le facteur de remplissage est $\beta=0.35$. En noir la MDE correspondant au « trou » et en rouge la MDE qui correspond au détecteur annulaire.

En prenant en compte l'incertitude sur la valeur de ω_0 ($0.385 \pm 0.015 \mu\text{m}$), l'ajustement des fonctions d'efficacité de détection des molécules donne : $\omega_{\text{externe}} = 0.270 \pm 0.005 \mu\text{m}$, $\omega_{\text{interne}} = 0.201 \pm 0.001 \mu\text{m}$, $r_{\text{externe}} = 0.314 \pm 0.006 \mu\text{m}$ et $\omega_{\text{eff}} = 0.238 \pm 0.003 \mu\text{m}$.

Des MDE recalculées (figure 3.11) il est possible d'évaluer le recouvrement existant entre les deux zones de collection. Pour cela une nouvelle fonction de recouvrement est introduite, $\text{Recouvrement}(\vec{r}) = MDE_{\text{externe}}^{2D}(\vec{r}) \times MDE_{\text{interne}}^{2D}(\vec{r})$. La fonction est représentée figure 3.12. Le recouvrement est encore relativement important entre les deux zones. Expérimentalement il n'est pas possible de le diminuer. Il faudrait que r_{externe} soit plus grand mais cela impliquerait une illumination plus large au point focale, ce qui n'est pas envisageable. La solution est d'utiliser le seuillage (chapitre 2) pour réduire autant que possible la surface de collection centrale et annulaire. Dans les paragraphes suivants nous allons exposer les résultats obtenus pour des molécules de Rhodamine 6G dans de l'éthanol et pour des nanobilles fluorescentes de différents diamètres (20, 100 et 200nm). Nous verrons aussi des mesures de FCCS spatiale géométrie 2 sur une membrane de vésicule.

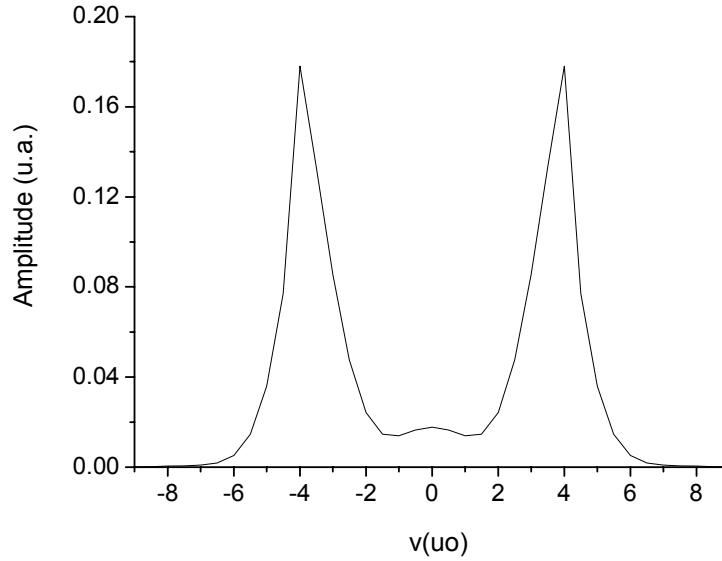


Figure 3.12 : recouvrement des fonctions d'efficacité de détection des molécules de l'anneau est du trou dans le plan u. Cette fonction de recouvrement est définie de la façon suivante $\text{Recouvrement}(\vec{r}) = MDE_{V_{\text{externe}}}^{2D}(\vec{r}) \times MDE_{V_{\text{interne}}}^{2D}(\vec{r})$.

D.1 Résultats avec la Rhodamine 6G

Les premières mesures ont été effectuées avec des molécules de Rhodamine 6G diluées dans de l'éthanol (concentration 7.5nM). La puissance à l'entrée de l'objectif est 240μW. Sur la figure 3.13 (a,b et c) la moyenne de 10 expériences de 30 secondes est reportée. Figure 3.13(a), la courbe obtenue sans seuillage des données et en (b) avec un seuillage ($\frac{\langle CR \rangle}{CR_s} = 1.3$). Notons que

cette valeur relative du seuillage est beaucoup plus faible que celle de la géométrie 1, la raison étant que le recouvrement est moins important pour la géométrie 1. Il faut signaler également que pour la géométrie 2, le seuillage n'affecte pas la position temporelle du maximum. La courbe de corrélation croisée seuillée présente un maximum proche de 70μs, ce qui correspond à une constante de diffusion D compris entre 130 et 170 μm²/s. Cette valeur est un peu trop faible, connaissant la viscosité à 20°C, de l'éthanol (1.20 Pa.s) et de l'eau (1 Pa.s) [75], et la constante de diffusion de la Rhodamine 6G dans l'eau (entre 250 et 280 μm²/s). En utilisant la relation de Stokes-Einstein (chapitre 1) et en supposant qu'il n'a pas de changement de conformation de la Rhodamine 6G entre l'éthanol et l'eau, nous pouvons nous attendre à obtenir un coefficient de diffusion de la Rhodamine 6G dans l'éthanol compris entre 200 et 230μm²/s. Il est à noter que

cette valeur de D , rapidement estimée à partir de la position du maximum, est très proche de la valeur obtenue par ajustement de la courbe de corrélation croisée, qui donne D compris entre 160 et 180 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

La différence entre la valeur expérimentale et la valeur théorique du coefficient de diffusion peut être attribuée à l'approximation à deux dimensions de la MDE et donc de la corrélation croisée. De plus, nous observons (figure 3.13 (c)) que les courbes expérimentales de corrélation croisée obtenue avec la Rhodamine 6G dans l'eau ne présentent pas de maximum aussi prononcé que pour la Rhodamine 6G dans l'éthanol. La différence des résultats obtenus avec l'éthanol et l'eau est reliée à la différence des propriétés photophysiques de la Rhodamine 6G diluées dans ces deux solvants. Nous avons remarqué que le rendement quantique de fluorescence, le spectre de fluorescence, la saturation, le transfert Singulet-Triplet et le photoblanchiment dépendent du solvant [76-77]. Nous pensons donc qu'à la puissance laser nécessaire pour obtenir un signal exploitable pour la corrélation croisée (spécialement pour la surface annulaire qui est faiblement excitée par le faisceau laser) le photoblanchiment empêche de nombreuses molécules de franchir intactes le volume central. Plus précisément, les molécules qui contribuent quand même au signal de corrélation croisée, diffusent probablement à travers les ailes du volume central plutôt qu'à travers son centre. Par conséquent, cette sous classe de molécules ne contribuent pas à un maximum bien prononcé, car les ailes du volume central et celles du volume annulaire se recouvrent trop.

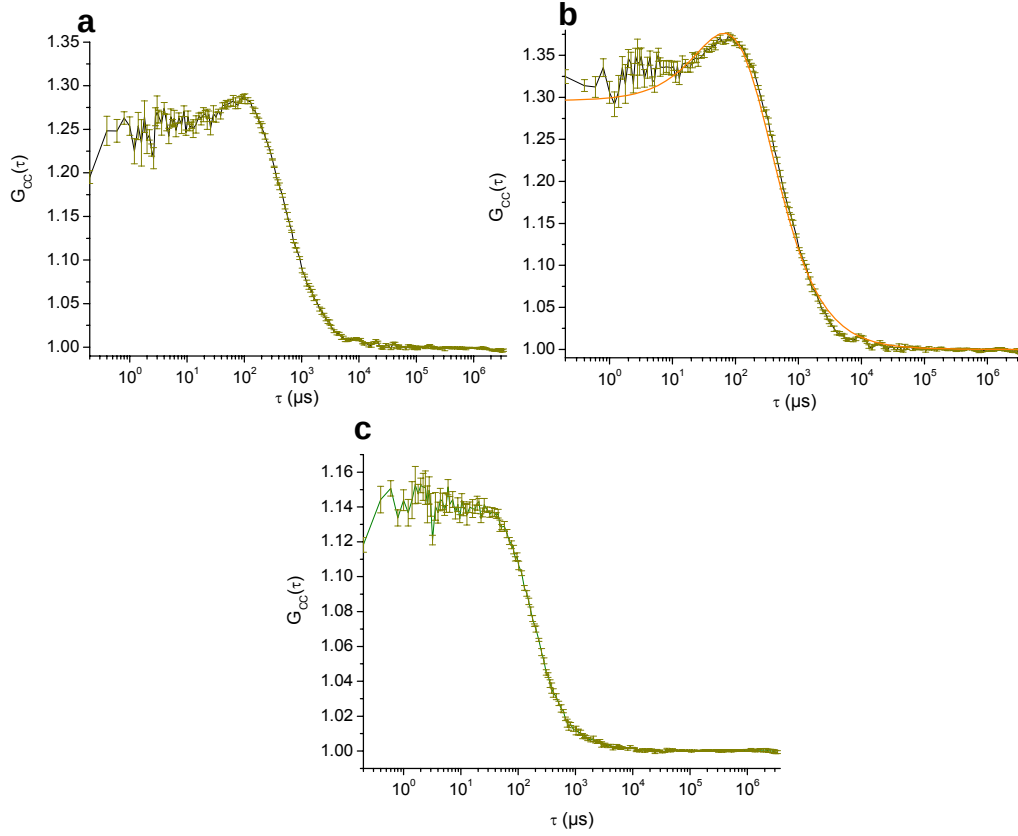


Figure 3.13 : Courbe de corrélation croisée de la Rhodamine 6G (concentration 7.5nM). La puissance à l'entrée de l'objectif est 240μW. Chaque courbe est la moyenne de 10 expériences de 30 secondes. En (a) la courbe obtenue sans seuillage des données (dans l'éthanol), en (b) avec un seuillage : $\frac{\langle CR \rangle}{CR_s} = 1.3$ ($\langle CR \rangle / CR_s = 1.3$ (éthanol) et (b) avec un seuillage : $\langle CR \rangle / CR_s = 1.3$ (eau).

D.2 Résultat avec les nanobilles fluorescentes

Nous avons choisi d'analyser en FCCS spatiale géométrie 2 des nanobilles fluorescentes de différentes tailles. Parmi les diamètres disponibles et adaptés à nos volumes d'observation, nous avons choisi 20nm, 100 nm et 200nm. L'étude des nanobilles fluorescentes devrait nous permettre de voir le changement de forme des courbes de corrélation croisée et notamment le déplacement temporel de $\tau_{\max}$ en fonction de la taille des billes. Les billes sont diluées dans de

l'eau micro pure de façon à obtenir trois solutions de concentration presque identiques, nous avons reporté dans le tableau ci-dessous les tailles des billes et la concentration correspondante.

Diamètre des nanobilles	Nombre de billes/ μm^3
20nm	4.5
100nm	3
200nm	1.5

Pour chaque taille de billes nous faisons 15 acquisitions de 30 secondes. La moyenne avec l'écart type est représentée sur la figure 3.14. La puissance utilisée pour les différentes tailles de billes est respectivement $90\mu\text{W}$ pour les billes de 20nm, $0.6\mu\text{W}$ pour les billes de 100nm et $0.6\mu\text{W}$ pour les billes de 200nm

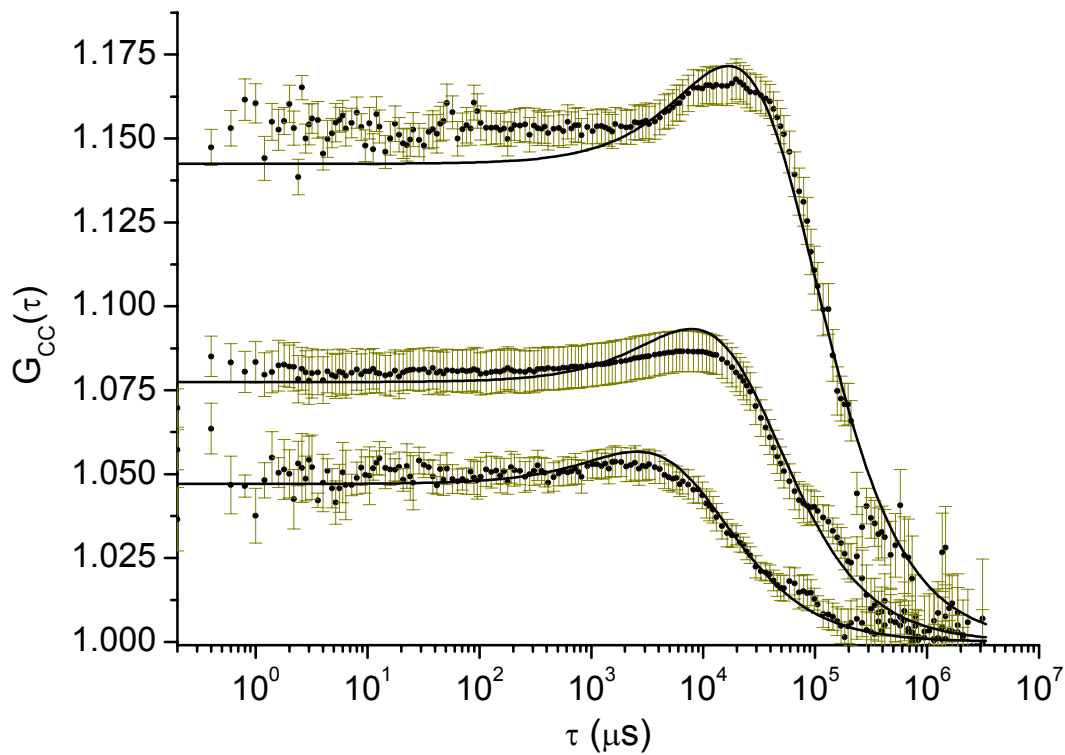


Figure 3.14 : Courbes de corrélation croisées obtenues avec 10 acquisitions de 30 sec pour des billes diluées dans l'eau de diamètre 20, 100 et 200nm (de bas en haut). Les courbes d'ajustements sont obtenues en fixant r_{externe} à $0.314\mu\text{m}$ et ω_{eff} à $0.238\mu\text{m}$. Les coefficients de diffusions déduits de l'ajustement des courbes sont respectivement : $4.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les billes de 20nm, $1.3\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les billes de 100nm et $0.63\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les billes de 200nm.

Sur la figure 3.14 est également représentés les ajustements des trois courbes expérimentales, obtenus (comme pour la Rhodamine 6G) en fixant r_{externe} à $0.314\mu\text{m}$ et $\omega_{\text{eff}}=0.238\mu\text{m}$. D'après la relation de Stokes-Einstein, les valeurs attendues du coefficient de diffusion des billes de 20, 100 et 200 nm sont respectivement 11, 2.2 et $1.1\mu\text{m}^2/\text{s}$. Le résultat de l'ajustement des courbes de corrélation croisée expérimentales donne un coefficient de diffusion, de $4.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ (20nm), $1.3\mu\text{m}^2/\text{s}$ (100nm) et $0.63\mu\text{m}^2/\text{s}$ (200nm). Ces valeurs obtenues sont sous estimées par rapport à la valeur théorique, comme pour la Rhodamine 6G dans l'éthanol, mais avec un écart encore plus prononcé. Ceci peut être attribué à la différence d'indice de réfraction entre l'eau et l'éthanol, qui affecte différemment la forme des fonctions d'efficacité de détection des molécules pour des échantillons dans l'éthanol et dans l'eau. Nous avons aussi fait des hypothèses sur les tailles des volumes de détection et notamment r_{externe} ce qui doit affecter la résolution de la FCCS spatiale géométrie 2.

Pour comparer les valeurs du coefficient de diffusion obtenues en FCS et FCCS spatiale géométrie 2, nous avons mesuré la diffusion des billes fluorescentes en FCS classique. Le résultat est exposé sur la figure 3.15. Chaque courbe est le résultat de 10 acquisitions de 30 secondes.

La première constatation est que la puissance nécessaire pour exciter efficacement les billes de 20, 100 et 200nm est plus faible, respectivement $40\mu\text{W}$, $0.38\mu\text{W}$ et $0.13\mu\text{W}$ contre $90\mu\text{W}$, $0.6\mu\text{W}$ et $0.6\mu\text{W}$, pour la FCCS géométrie 2.

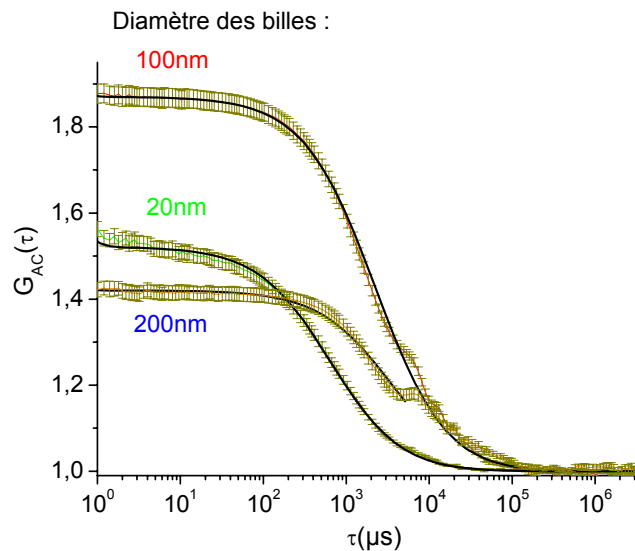


Figure 3.15 : Courbes d'autocorrélation obtenues avec 10 acquisitions de 30 sec pour des billes diluées dans l'eau de diamètre 20, 100 et 200nm. Les courbes d'ajustements sont obtenues en fixant S à 5. Les coefficients de diffusions déduits de l'ajustement des courbes sont respectivement : $9.5\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les billes de 20nm, $2.4\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les billes de 100nm et $1.3\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les billes de 200nm.

L'ajustement des courbes d'autocorrélation donne les temps de diffusion suivant : 600 μ s pour les billes de 20nm, 2300 μ s pour les billes de 100nm et 4000 μ s pour les billes de 200nm. Connaissant ω_R (0.25 μ m) nous pouvons déterminer le coefficient de diffusion de chacune des espèces de billes : 9.5 μ m²/s pour les billes de 20nm, 2.4 μ m²/s pour les billes de 100nm et 1.3 μ m²/s pour les billes de 200nm. Ces valeurs sont relativement proches des valeurs déterminées avec la relation de Stokes-Einstein. La FCCS spatiale géométrie 2 est donc moins bien adaptée que la FCS pour la détermination des coefficients de diffusion.

D.3 Etude avec des membranes de vésicules

L'un des intérêts de la FCCS spatiale par rapport à la FCS est de permettre de sonder seulement le processus de transport (comme la diffusion). En effet, en autocorrélation, les fluctuations de fluorescence dépendent non seulement de la diffusion à travers le volume confocal mais aussi des transitions entre états fluorescents et non fluorescents et qui se produisent à des échelles de temps plus rapides (comme la transition singulet-triplet). La plus grande précaution devra être prise pour éviter ces artefacts [9][67]. Pour cette raison il est intéressant de faire des mesures en corrélation croisée (deux volumes de détection). Dans ce paragraphe nous allons montrer, en plus des avantages déjà exposés, la possibilité en corrélation croisée de caractériser la dynamique dans une bicouche lipidique. Cette étude est très importante pour les biologistes, les bicouches lipidiques étant un modèle des membranes cellulaires. Ces dernières sont le siège, notamment, des échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Vu la taille des volumes confocaux, il sera possible d'obtenir des informations locales de la membrane.

Dans ce paragraphe nous allons présenter les mesures réalisées en FCCS spatiale pour l'étude de la diffusion d'une molécule fluorescente (la Rhodamine 6G) dans la membrane d'une vésicule géante unilaminaire (GUV) (mode de fabrication chapitre 1). La concentration en chromophores est faible ($C \approx 5$ nM) de façon à n'observer que quelques molécules dans les volumes de détection. La puissance est choisie pour exciter au mieux les molécules fluorescentes (50 μ W). Dans les bicouches lipidiques seule la diffusion transverse est possible [84], une étude du système à deux dimensions est pleinement justifiée ici. D'après J.Korlach [84] dans la membrane, le coefficient de diffusion transverse (D_T) de la molécule fluorescente DiI-C₂₀ est compris entre 10⁻⁹cm²/s (phase de la membrane riche en cholestérol) et 10⁻¹⁰cm²/s (phase de la membrane ordonnée spatialement) comparé à $D_T \approx 10^{-8}$ cm²/s dans la phase fluide. Si on extrapole ces données à la Rhodamine 6G, le coefficient de diffusion transverse devrait être, dans la membrane, compris entre 10⁻⁷cm²/s et 10⁻⁸cm²/s ($\approx 10^{-6}$ cm²/s en solutions aqueuses).

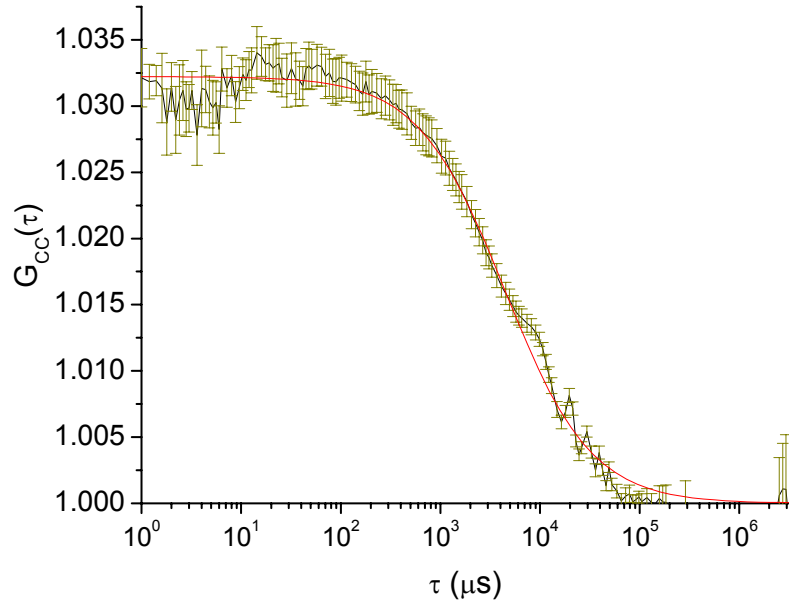


Figure 3.16 : Courbes de corrélation croisées obtenues avec 10 acquisitions de 30 sec pour des molécules de Rhodamine 6G dans une membrane de vésicule. La puissance à l'entrée de l'objectif est de 50μW. La courbe d'ajustement est obtenue en fixant r_{out} à 0.314μm et w_{eff} à 0.238μm. L'ajustement donne une diffusion transverse $D_T \cong 5.10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$

La corrélation croisée de la figure 3.16 est le résultat de 10 expériences de 30 secondes. Cette courbe expérimentale ne présente pas de maximum, comme pour les molécules de Rhodamine 6G diluée dans l'eau. Sans doute la puissance laser utilisée est encore trop importante.

Le résultat de l'ajustement de la courbe expérimentale obtenu en fixant $r_{externe}$ à 0.314μm et $w_{eff}=0.238 \mu\text{m}$ donne un coefficient de diffusion transverse $D_T \cong 5.10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$. Ce qui est tout à fait cohérent avec les valeurs attendues. Le second paramètre qui peut être mesuré avec ce dispositif expérimental est le nombre moyen de molécules présent dans le volume d'observation effectif. Il a été détecté 23 molécules en moyenne.

Nous avons montré qu'il est possible avec la FCCS spatiale d'étudier la diffusion de molécules fluorescentes, comme la Rhodamine 6G par exemple, dans une membrane de GUV. Le temps moyen nécessaire pour obtenir des fonctions de corrélation représentatives est inférieur à 30 secondes. Le nombre de sondes (molécules fluorescentes) nécessaires à l'analyse est lui aussi faible, de l'ordre du nano Molaire ($\text{nM}=10^{-9}\text{M}$) soit quelques molécules dans le(s) volume(s) d'observation.

E Bilan de la FCCS géométrie 2

Bien que la FCS soit de plus en plus utilisée, l'amélioration de ses capacités de discrimination des différentes espèces à partir de leur constante de diffusion est nécessaire. Nous avons ainsi proposé une méthode qui utilise la corrélation croisée entre deux volumes encapsulés. Il est intéressant que les fonctions de corrélation croisée présentent un maximum, il permet de donner rapidement une estimation du coefficient de diffusion. L'autre aspect attractif de cette nouvelle géométrie est l'isotropie des mesures, ce qui est un avantage certain, par rapport à la géométrie 1, pour des mesures de flux par exemple. Mais nous n'avons pas réussi à montrer que cette géométrie améliorerait la sensibilité en présence de deux espèces diffusantes, et surtout nous n'avons pas réussi à mettre en valeur nos volumes confocaux (trou-anneau) par rapport aux configurations déjà existante (W.W.Webb notamment).

Il est clair qu'une meilleure détermination du coefficient de diffusion implique une meilleure description à trois dimensions des fonctions d'efficacité de détection des molécules (MDE) et une diminution du recouvrement qui peut exister entre les volumes de détection. Pour ce dernier point nous sommes limité expérimentalement : pour illuminer le mieux possible le volume extérieur la source doit être étendue le plus possible au point focale. Une solution peut venir des modulateurs spatiaux de lumière. Ils permettent en outre la mise en forme de l'illumination. C'est l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 4

Spectroscopie à Corrélation Croisée Spatiale de Fluorescence : Géométrie 3

A travers les deux précédents paragraphes nous avons vu qu'il était possible de faire évoluer la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence « classique » grâce à la Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence. Deux nouvelles géométries du dispositif expérimental ont été proposées. La première consiste à décaler latéralement les deux volumes d'observation d'une certaine distance R , ce qui permet notamment de mesurer la diffusion libre de molécules fluorescentes d'un volume d'observation à l'autre. Dans cette configuration expérimentale, il est indispensable de traiter les données acquises pour obtenir des courbes de corrélation croisée exploitables. Le principal avantage de la FCCS géométrie 1 est sa simplicité de mise en œuvre. Le deuxième dispositif expérimental est plus subtil, car il est basé sur la mise en forme des fonctions d'efficacité de détection des molécules (MDE). Les différents résultats expérimentaux pour des objets en solutions aqueuses ont mis en évidence la limite de notre modèle théorique à deux dimensions. Cependant l'étude de la diffusion de la Rhodamine 6G dans une membrane a montré que cette méthode est bien adaptée à l'étude de la diffusion transverse. Grâce aux courbes de corrélation croisée obtenues avec la géométrie 2 il est possible de donner rapidement et facilement l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion de molécules fluorescentes dans un milieu donnée.

La géométrie 3 est techniquement plus complexe. Malgré cela notre dispositif expérimental doit permettre de réaliser des mesures de FCS, c'est notre leitmotiv. Pour cette géométrie, le système d'illumination va être modifié par l'ajout d'un Modulateur Spatiale de Lumière (SLM). Avec ce genre d'appareil il est possible, en théorie, d'obtenir une grande variété de forme au foyer de l'objectif [85]. Dans le cadre de la FCCS spatiale les SLM vont ouvrir la voie à de nouvelles expériences comme la création de points focaux multiple ou une illumination très spécifique (un anneau autour d'un cercle !).

Pour la géométrie 3, nous proposons de commencer par créer au foyer de l'objectif deux points focaux. L'originalité est la possibilité de positionner un volume par rapport à l'autre n'importe où dans le plan focale. Nous verrons dans ce chapitre ce qui a déjà été proposé comme dispositif pour réaliser de multiple point focaux ; dans un second paragraphe la théorie sur la modulation

spatiale de lumière sera développé. Les premières expériences de l'étude d'un flux en présence de nanobilles fluorescentes sont exposées au paragraphe E.

A Etat de l'art

Les premiers travaux, à notre connaissance, sur l'utilisation de multiples points focaux sont attribués à H.Blom et collaborateurs [98-99]. L'idée est d'utiliser des éléments d'optique diffractive dans le dispositif expérimental. Le but ici est d'analyser des micro-matrices de biopuces. Une application courante des micro-matrices de biopuces, cibler l'ADN avec une séquence inconnue, marquée avec un chromophore, mélangée avec des sondes oligonucléotides qui sont distribuées sur la micro-matrice. Cependant d'autres expériences sont réalisables avec ce dispositif expérimental comme la mesure de flux dans des microcanaux par exemple. La méthode consiste à combiner la FCS avec des éléments d'optique diffractive (DOE). Cette combinaison permet de faire des mesures parallèles de flux (dans ce cas il y a 4 points focaux en ligne). Nous proposons un schéma explicatif (figure 4.1) pour saisir le sens de l'expérience.

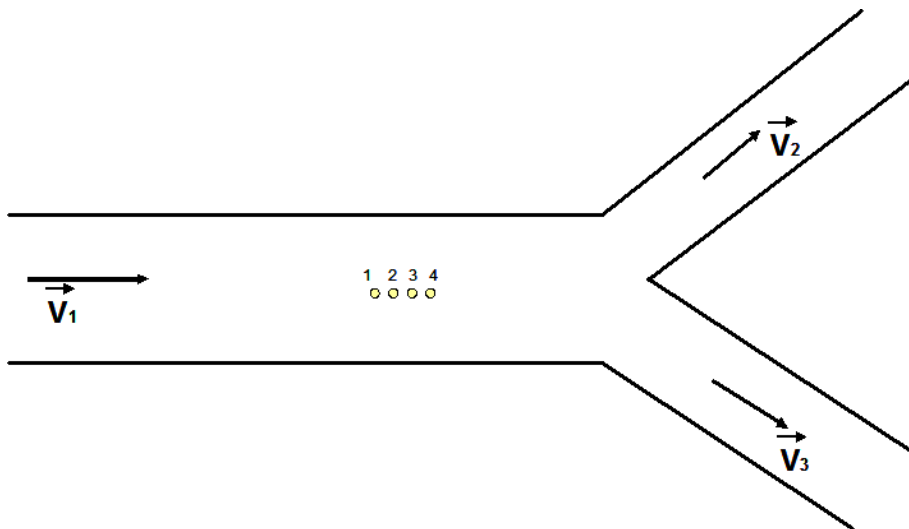


Figure 4.1 : représentation d'un microcanal et des 4 volumes confocaux tel que définie par H.Blom dans son dispositif expérimental.

La mesure du flux est possible en faisant la corrélation croisée du signal de fluorescence détecté par les volumes. Il est ainsi possible d'obtenir la courbe de corrélation croisée du volume 1 vers le volume 2, de 1 vers 3 et de 1 vers 4. Pour mesurer un flux qui ne serait pas dans la même direction que l'alignement des points focaux il faut déplacer ou tourner le DOE dans le parcours du faisceau d'illumination. Ici, la méthode paraît limitée. Il serait plus judicieux d'avoir un dispositif expérimental permettant de régler en un temps limité la distance entre les points focaux mais aussi la position spatiale et la configuration (nombre, forme, ...) des points focaux. La

solution peut venir des modulateurs spatiaux de lumière. Ils permettent de créer toutes sortes de formes d'illumination au foyer de l'objectif et ils peuvent en quelques dizaines de millisecondes changer la forme de l'illumination. Ce genre d'appareil n'a pas encore été utilisé (à notre connaissance) dans le cas de la corrélation de fluorescence, ces applications concernent pour l'heure la micro fabrication [86] ou les pinces optiques.

B Optique diffractive

L'optique diffractive est une technique particulièrement bien adaptée pour la création de différentes distributions spatiales d'intensité en utilisant un faisceau laser incident. Deux types de distributions d'intensité sont couramment rencontrés : le premier type est l'illumination homogène d'une zone assez grande (souvent utilisé pour la mise en forme de faisceau [101-102]), le second type est la « division » de la lumière en plusieurs spots limités par la diffraction [98-99][103-104].

B.1 Diffractive Optical Elements (DOE)

La déviation de la lumière par la diffraction est connue depuis longtemps (chapitre 1), mais depuis quelques dizaines années des composants d'optique diffractive sont utilisés pour « l'amélioration » de systèmes optiques. Le contrôle de la propagation de la lumière avec ce genre de composant apparaît réellement avec l'invention de l'holographie par Gabor en 1948 (prix Nobel de physique en 1971). Avec l'holographie il est désormais possible de contrôler la propagation de la lumière en enregistrant « optiquement » au préalable un composant diffractif. La construction des hologrammes est basée sur l'enregistrement interférométrique d'un objet réel. La technologie des années 60 a rendu possible la génération d'enregistrements interférométriques simulés par ordinateur (l'holographie digitale). Les premiers hologrammes simulés par ordinateur (CGH) ou éléments d'optiques diffractive (DOE) ont été réalisés par Brown et Lohmann [105]. Avec les DOE il est possible de modifier la propagation de la lumière de sorte que les objets qui n'ont pas d'existence réelle sont reconstruits. Dans les années 80 il [106] a suggéré que seule la modulation de phase d'un faisceau incident est nécessaire pour représenter les fonctions CGH (et DOE). Ceci a été réalisé en générant des reliefs de grandes dimensions sur la surface d'un substrat transparent. Quand la lumière traverse ce substrat le relief module la phase du faisceau, de sorte que la distribution d'intensité est modifiée après cet élément diffractif. Ces éléments diffractifs de « phase » n'absorbe pas d'énergie et permettent la génération de diffraction dans un seul ordre, ce qui conduit une grande efficacité de diffraction. Ces premiers éléments de diffraction ont pu être réalisés avec des méthodes comme la photolithographie (1980) [107-108].

Les DOE sont aujourd'hui largement utilisés [86][100]. Nous avons vu précédemment comment la lumière est perturbée par la diffraction. Nous allons voir ensuite quelles structures diffractives vont donner la distribution d'intensité souhaitée.

B.1.1 Génération d'hologrammes

Nous avons vu dans le paragraphe précédent et Annexe 3 comment un champ est perturbé par une « forme diffractive ». La perturbation du champ est donnée par l'intégrale Fresnel Kirchhoff (C.7), la résolution de cette intégrale dépend de la forme de la diffraction. Nous rappelons que seules sont considérées les éléments de diffraction de « phase ». Dans ce cas précis la structure de diffraction est formée de reliefs à sa surface qui crée une fonction de retard de phase (notée $\phi(x,y)$). Le DOE agit comme une gravure qui module la phase d'un faisceau incident, donc la distribution d'intensité dans le plan d'observation. Pour déterminer la structure du DOE nous devons déterminer une fonction de phase $\phi(x,y)$ qui, pour des conditions d'illumination spécifiques, donnera une distribution d'intensité aussi proche que possible de celle recherchée. Dans ce paragraphe nous allons étudier une méthode de détermination de la phase. Cette méthode est adaptée pour le cas spécifique de DOE pour la mise en forme de faisceau. Signalons que dans le cas particulier où la distribution d'intensité requise dans le plan image est de forme géométrique simple, comme un cercle ou un rectangle, la forme de diffraction recherchée peut être représentée par une fonction mathématique.

B.1.2 Méthode itérative

(Algorithme itératif de la transformée de Fourier : IFTA)

Cette méthode a été développée à l'origine par Gerchberg et Saxton [111-113] pour établir la phase d'un faisceau laser à partir de sa distribution d'intensité. Cette méthode peut être appliquée, dans le cas particulier de la mise en forme de faisceaux, pour calculer le motif de phase dans un plan donné. Comme le modèle de phase recherché dans un plan peut être gravé « sur » la lumière avec un hologramme, ceci permet une mise en forme à deux dimensions de la lumière.

L'hypothèse est faite, pour simplifier les calculs numériques, que le second plan (plan du modèle d'intensité) est éloigné du premier plan (plan de l'hologramme) et chacun des deux plans peut être vu comme la transformée de Fourier de l'autre.

La notation utilisée est la suivante :

- La distribution d'intensité d'un faisceau non mis en forme dans le plan de l'hologramme (plan 1) : $I_H(x,y)$

- La distribution d'intensité dans le plan de Fourier (plan 2), autrement dit la distribution d'intensité souhaitée : $I_T(u,v)$

Les « champs » de lumière dans les deux plans, $I_H(x,y)$ et $I_T(u,v)$, sont représentés par des tableaux à deux dimensions de nombres complexes U_n (plan1) et $\tilde{U}_n$ (plan2), n étant le numéro de l'itération.

- La distribution de phase initiale, $\phi_0^H \cong 0$

Une itération de l'algorithme qui calcule une distribution d'intensité améliorée - ϕ_n^H - dans le plan de l'hologramme à partir de la valeur précédente - ϕ_{n-1}^H - procède de la façon suivante :

$$U_n^H = \sqrt{I_H} \exp(i\phi_{n-1}^H) \quad (4.1)$$

$$\phi_n^T = \text{Arg}(\text{FFT}(U_n^H)) \quad (4.2)$$

$$U_n^T = \sqrt{I_T} \exp(i\phi_n^T) \quad (4.3)$$

$$\phi_n^H = \text{Arg}(\text{FFT}^{-1}(i\phi_n^T)) \quad (4.4)$$

avec FFT : Fast Fourier Transform et $I_n^T = |U_n^T|^2$.

De l'équation (4.1) on déduit le champ initial dans le plan de l'hologramme, l'équation (4.2) donne la distribution de phase dans le plan 2. L'équation (4.3) relie la distribution de phase dans le plan 2 et la distribution d'intensité du même plan pour donner U_n^T . Finalement avec l'équation (4.4) on calcule la distribution de phase dans le plan 1, ϕ_n^H , c'est-à-dire l'hologramme de phase que nous recherchons pour produire le champ dans le plan 2.

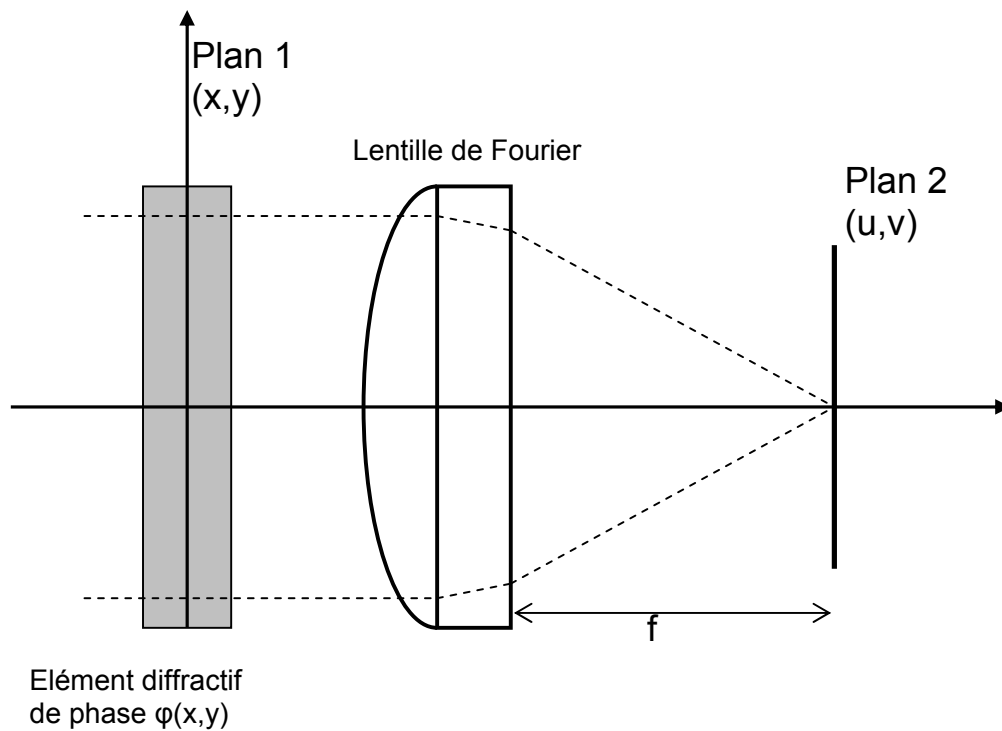


Figure 4.2 : Dispositif de l'algorithme itératif de Fourier

B.1.3 Reliefs des DOE

Nous avons vu dans le paragraphe précédent comment générer des hologrammes pour obtenir le profil d'illumination souhaité, nous allons voir ici l'influence du relief du DOE sur la fonction de phase $\phi(x,y)$.

Un élément diffractif (de phase) est une fine structure plane transparente avec une structure en relief sur un côté. Le relief rajoute une modulation de phase au faisceau affecté et donc modifie la distribution d'intensité dans le plan après le plan de diffraction.

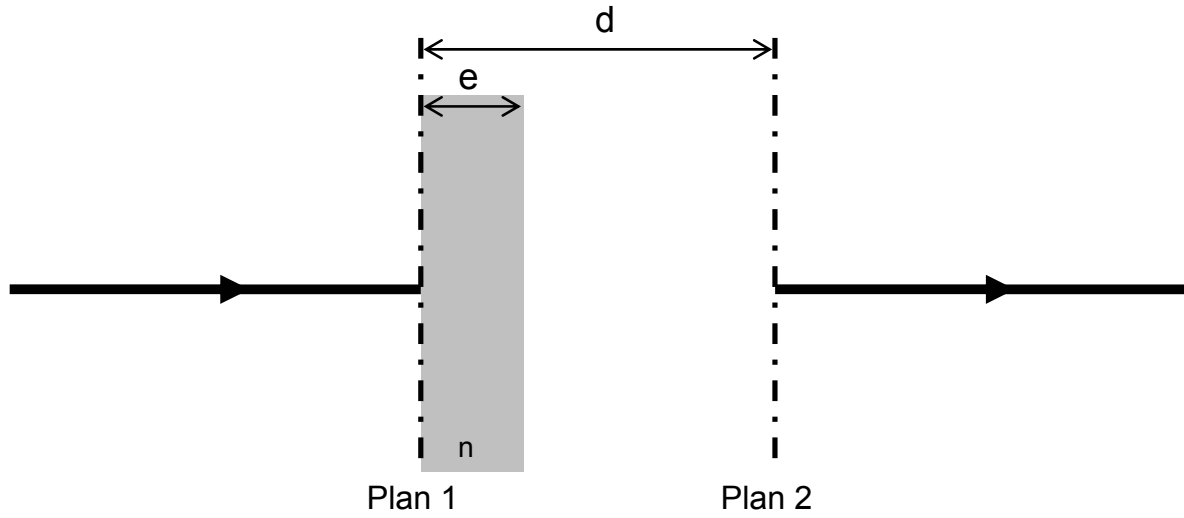


Figure 4.3 : Structure d'un DOE en relief d'épaisseur e et d'indice n . La distance entre le plan 1 (plan du DOE) et le plan 2 (Fourier) est d .

Ayant déterminé la fonction de phase $\varphi(x,y)$ souhaitée, nous allons voir que cette fonction peut être convertie en une fonction d'épaisseur $e(x,y)$. On considère, comme l'illustre la figure 4.3, un front d'onde de longueur d'onde λ localisé dans le plan 1, il lui faut un temps ΔT pour arriver au plan 2 et nous pouvons écrire :

$$\Delta T = \frac{e}{c/n} + \frac{d-e}{c} = \frac{e(n-1)}{c} + \frac{d}{c} \quad (4.5)$$

où d est la distance entre les deux plans
 n est l'indice du milieu

La phase du front d'onde est changée du passage du plan 1 au plan 2. La phase s'écrira :

$$\varphi = 2\pi \frac{\Delta T}{T} = \frac{2\pi}{\lambda} c \Delta T = \frac{2\pi e}{\lambda} (n-1) + \frac{2\pi d}{\lambda} \quad (4.6)$$

Le dernier terme est constant et ne joue aucun rôle dans la propagation de la lumière, nous allons donc le négliger. Nous venons de voir que la modulation de phase d'un faisceau incident est proportionnelle à l'épaisseur e du relief. Dans le cas d'une variation d'épaisseur le paramètre e devient $e(x,y)$ et la fonction de phase à deux dimensions est reliée à $e(x,y)$ par la relation suivante :

$$\varphi(x,y) = \frac{2\pi}{\lambda}(n-1)e(x,y) \quad (4.7)$$

B.1.4 Fabrication

La fabrication des DOE [88-91] sort largement du cadre des travaux qui sont exposés dans ce manuscrit. La lithographie est très souvent utilisée pour ce genre de microfabrication [92-95]. Signalons que cette technique peut produire des structures dont les dimensions peuvent être inférieures à 50 nm.

B.1.5 DOE couramment utilisées - Efficacité de diffraction

B.1.5.1 linear blazed grating

Ces calculs d'efficacité de diffraction peuvent être réalisés pour la majorité des structures périodiques en utilisant la Transformée de Fourier (TF). L'exemple le plus représentatif est la « linear blazed grating » (dent de scie périodique) de profondeur e et de période R .

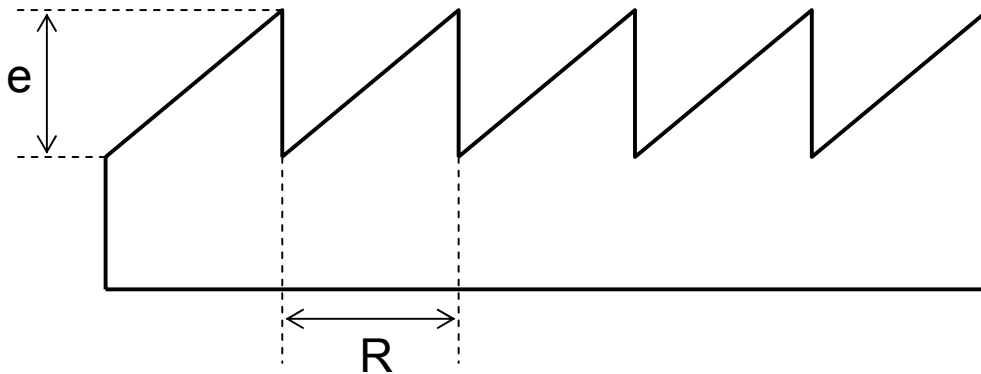


Figure 4.4 : « linear blazed grating » de période R et de profondeur e

Ce motif de phase transmet la lumière sans atténuation mais donne une variation de phase au front d'onde. Si le front d'onde incident est plan alors le front d'onde transmis peut s'exprimer

comme la convolution du peigne de Dirac (peigne¹) avec une fonction rectangle (rect²), multiplié par un terme de phase (de pente ϕ/R) :

$$U(x) = \text{peigne}\left(\frac{x}{R}\right) * \text{rect}\left(\frac{x}{R}\right) \exp\left(j \frac{\phi x}{R}\right) \quad (4.8)$$

Le dernier terme rend compte de la différence de phase, il est dû à la profondeur du réseau : $\phi = 2\pi(n-1)e/\lambda$ (équation 4.7). Le motif (figure 4.4) est une structure périodique, loin de la surface la lumière se propage en ordre de diffraction discret d'angles de propagation θ_m , donnés par l'équation suivante : $R\sin(\theta_m) = m\lambda$. Les ordres de diffraction sont donnés par la TF de $U(x)$. La séparation angulaire des ordres de diffraction est contrôlée par la période R du motif. La lumière sera diffractée en plusieurs ordres de diffraction mais l'efficacité de diffraction de chacun des ordres est déterminée par la profondeur e . Nous pouvons montrer [91] que la fraction diffractée dans le $m^{\text{ième}}$ ordre est donnée par la fonction suivante :

$$\eta_m = \left[\frac{\sin(\pi(k-m))}{\pi(k-m)} \right]^2 \quad (4.9)$$

avec k : vecteur de propagation

Vu l'équation (4.9) on déduit que plus l'ordre de diffraction est grand et plus la fraction de lumière allant vers cet ordre est faible.

Fonctionnement du motif en réflexion

De plus en plus de réseau de diffraction « fonctionnent » en réflexion. La physique est presque la même que pour la transmission. Les concepts qui ont été vus dans les paragraphes précédents s'appliqueront de la même manière que pour la réflexion d'un front d'onde sur une surface diffractante (voir figure 4.5). La formule $R\sin(\theta_m) = m\lambda$ est toujours valable dans le cas présent, l'angle θ_m sera l'angle de propagation sur la surface.

¹ Le peigne de Dirac est une fonction périodique et il est définie de la façon suivante : $\text{peigne}\left(\frac{x}{R}\right) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x-nR)$

² La fonction rect est définie de la façon suivante : $\text{rect}(x/b) = 1$ si $-b/2 < x < b/2$

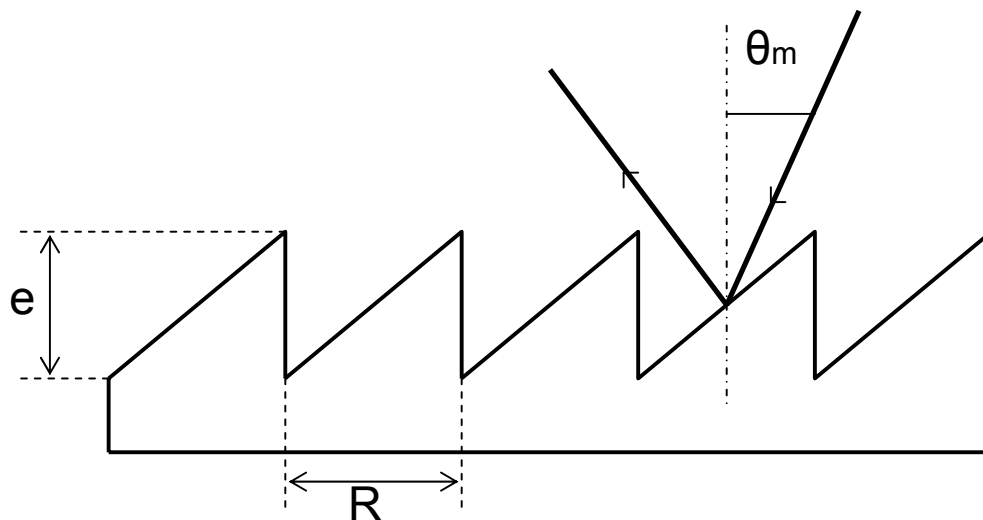


Figure 4.5 : « linear blazed grating » de période R et de profondeur e , fonctionnement en réflexion

B.1.5.2 Rectangles périodiques

Nous allons voir une forme encore plus simple que la forme précédente : les rectangles périodiques (voir figure 4.6) :

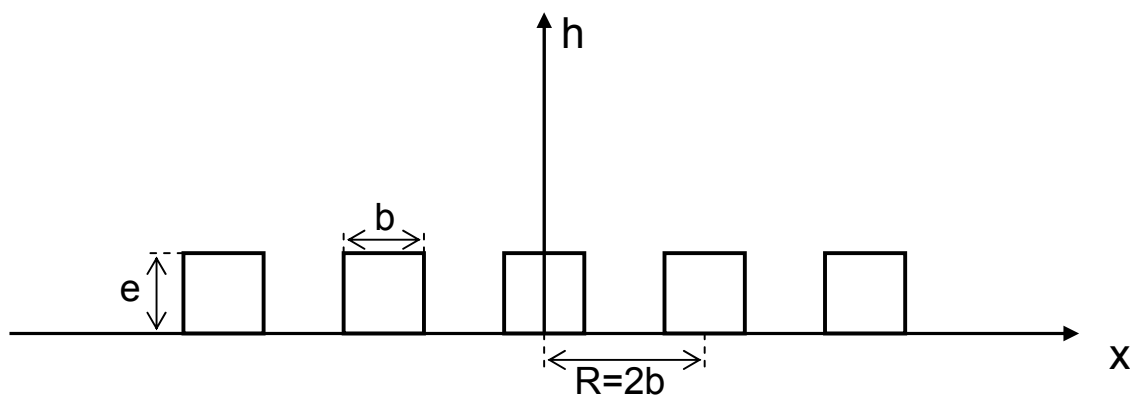


Figure 4.6 : Structure périodique composée de rectangle de hauteur e et de largeur b . La période R est deux fois plus grande que la largeur d'un rectangle.

La largeur b d'un rectangle est choisie de sorte qu'elle soit deux fois plus petite que la période R du motif, ce qui introduit une différence de π entre sections voisines. La description mathématique d'une cellule est donnée par la fonction f suivante :

$$f(x) = \text{rect}\left(\frac{x}{e}\right) * \delta(x) + \text{rect}\left(\frac{x}{e}\right) * \delta(x-b) \exp(j\varphi) \quad (4.10)$$

Les ordres discrets sont séparés par l'angle θ_m (défini pour le pas). De plus la transformée de Fourier du motif est définie seulement à des intervalles discrets correspondants à la transformée du peigne de Dirac : $\text{peigne}(x/R)$. La Transformée de $f(x)$, $F(q)$, forme une fonction qui définit l'amplitude et la phase relative de chaque ordre de diffraction. Sachant que la TF de $\text{rect}(x)$ est $\text{sinc}(q)$, alors :

$$F(q) = TF\{f(x)\} = \frac{1}{2} \frac{\sin(\pi b q)}{\pi b q} \exp(j2\pi q \frac{b}{2}) + \frac{1}{2} \frac{\sin(\pi b q)}{\pi b q} \exp(-j2\pi q \frac{b}{2}) \exp(j2\pi \varphi) \quad (4.11)$$

Dans le cas idéale d'une phase binaire, $\varphi = \pi$:

$$F(q) = \frac{1}{2} \frac{\sin(\pi b q)}{\pi b q} [\exp(j\pi b q) - \exp(-j\pi b q)] \quad (4.12)$$

Dans le cas qui nous intéresse $b = R/2$, de sorte que pour déterminer l'efficacité de diffraction de chaque ordre on remplace q par m/R dans la fonction $F(q)$:

$$\eta_m = \left| F\left(\frac{m}{R}\right) \right|^2 = \left| \frac{\sin\left(\pi \frac{m}{2}\right)}{\pi \frac{m}{2}} [j \sin\left(\pi \frac{m}{2}\right)] \right|^2 \quad (4.13)$$

Remarquons que cette fonction est nulle pour les valeurs paires de m et non nulle dans le cas où elles sont impaires, il n'y aura pas d'ordre 0 pour ce motif.

B.1.5.3 Conclusion

Pour générer nos motifs diffractifs nous avons utilisé un modulateur spatial de lumière. Ici le DOE est une matrice deux dimensions contrôlable électroniquement.

B.2 Modulateur Spatiaux de lumière

Les modulateurs spatiaux de lumière (SLM) permettent de créer des modèles de DOE ; durant ces vingt dernières années les SLM ont vu leurs performances augmenter [115-118]. Le principal intérêt des modulateurs spatiaux est de réaliser quasi instantanément (quelques ms) le forme ad

hoc dans l'espace des phases pour obtenir l'illumination souhaitée dans le plan de Fourier. Le SLM que nous avons utilisé pour nos expériences est un cristal liquide (LC) sur silicium (LCoS). Les LCoS sont composés d'une matrice de pixel LC, ils permettent un retard de phase (contrôlable grâce à une tension appliquée à chaque pixel). Le principe d'un LCoS est illustré sur la figure 4.7 :

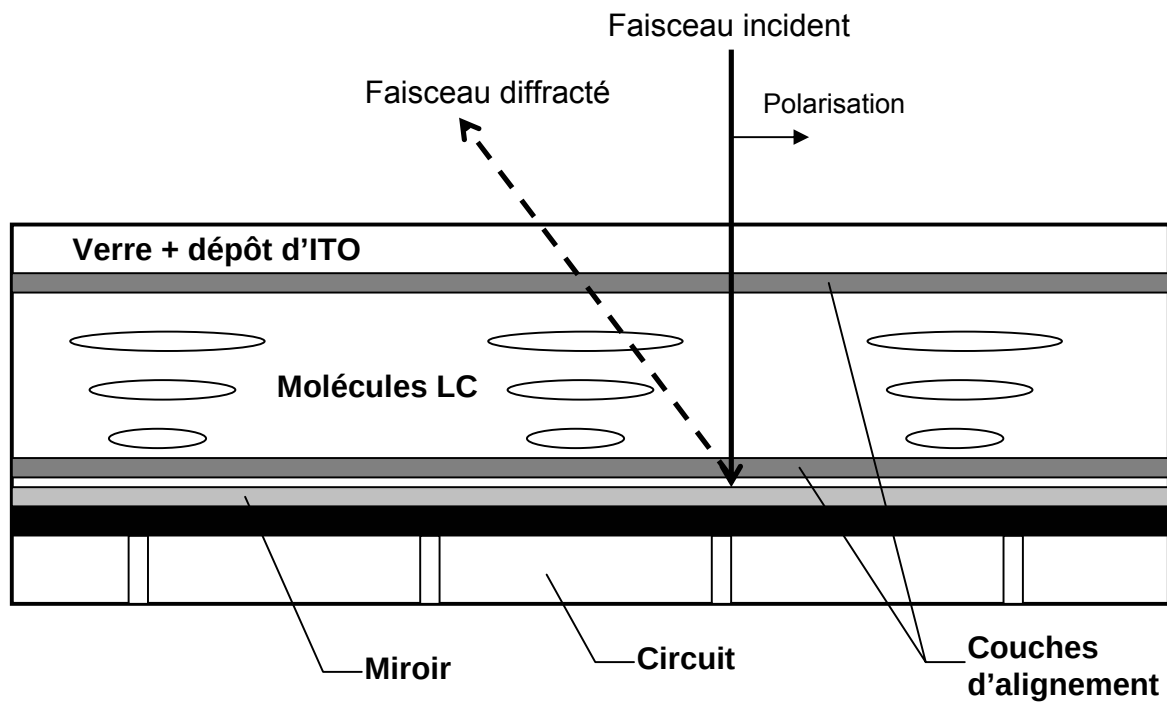


Figure 4.7 : Principe de construction d'un LCoS

Un pixel de LCoS est constitué d'un film de cristaux liquides nématiques, d'une électrode d'ITO (Indium Tin Oxyde), un miroir électrode en aluminium et un circuit intégré de contrôle sur une base en silicium. Le circuit intégré est utilisé pour orienter les pixels de LC. Tous les pixels individuels sont contrôlables pour obtenir le retard de phase nécessaire. C'est pour ces raisons que ce genre d'appareil est de plus en plus utilisé pour la mise en forme de l'illumination. Notre matériel utilise un LC commercial (PHILIPS).

C Matériel

C.1 Dispositif expérimental de la FCCS - géométrie 3

Le dispositif expérimental de la géométrie 3 diffère sensiblement des deux autres géométries. En effet, ici un Modulateur Spatial de Lumière (LC-R 720, HOLOEYE) est placé dans le trajet du faisceau. Avec ce dispositif expérimental il est toujours possible de réaliser des expériences en FCS « classique », il suffit de basculer deux miroirs (Miroir1 et Miroir3). Dans ce schéma expérimental un seul télescope est suffisant, car il n'est plus nécessaire de jouer sur la taille du faisceau laser à l'entrée de l'objectif pour optimiser l'illumination au point focale. Le télescope en question est composé de la lentille 1 et de la lentille 2 de focales $f_1 = 25\text{mm}$ et $f_2 = 60\text{mm}$ (grandissement égal à 2.4, cf chapitre 1). Comme l'illustre la figure 4.8, le SLM fonctionne en réflexion. Il est installé sur des platines de translation qui permettent de centrer le faisceau laser sur la matrice du SLM et de positionner l'illumination à l'entrée de l'objectif.

Un polariseur placé juste avant le modulateur spatial, monté sur une bague tournante, permet de polariser l'illumination. Comme pour les précédentes géométries, le faisceau d'illumination est réfléchi par le miroir dichroïque puis est focalisé sur l'échantillon par l'objectif de grande ouverture numérique. La fluorescence est collectée par ce même objectif, elle est séparée en deux par le cube séparateur 50/50 et envoyé vers deux fibres optiques identiques (pinhole de sortie). Les signaux de fluorescence acquis sont ensuite corrélés par notre corrélateur (PHONOS). Il est aussi possible d'enregistrer des images de l'illumination au foyer de l'objectif. Une caméra numérique (SPOT Insight, DiagnosticInstruments) est connectée à la deuxième sortie du microscope. Elle permettra d'évaluer, via un logiciel de traitement des images (ImageTool), la distribution d'intensité au foyer de l'objectif.

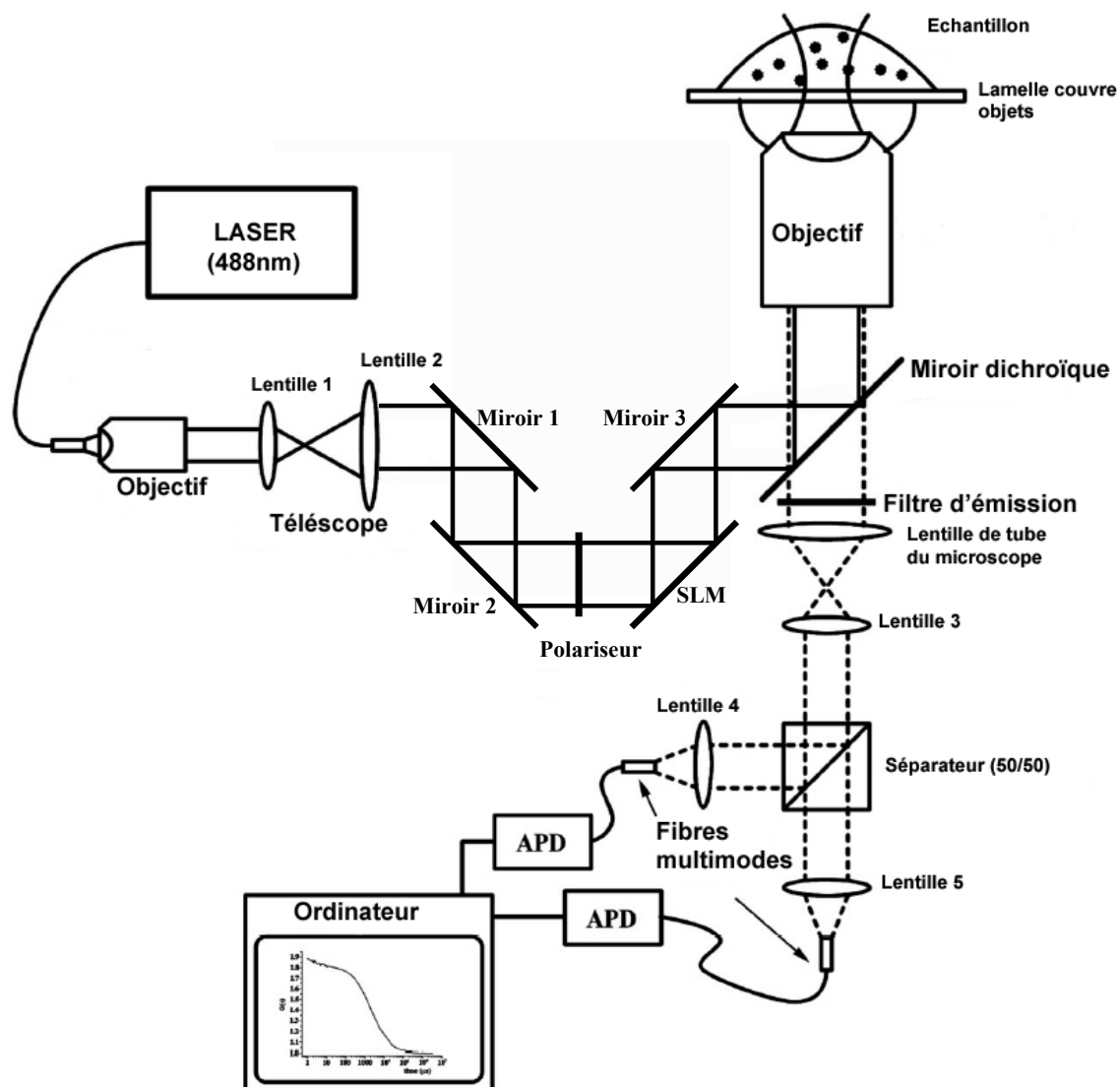


Figure 4.8 : dispositif expérimental de la FCCS géométrie 3. La détection est assurée par deux pinholes identiques. L'illumination est mise en forme par un modulateur spatial de lumière.

C.2 Le modulateur Spatial de Lumière (SLM)

C.2.1 Caractéristiques générales

Le LC-R 720 OEM est un SLM basé sur une matrice de cristal liquide sur silicium (LCoS), il fonctionne en réflexion. Avec ce matériel, il est possible de moduler (amplitude ou phase) le front

d'onde de la lumière. Le SLM utilise le signal vidéo provenant de la sortie numérique (DVI) de la carte graphique d'un ordinateur avec la résolution du WXGA. Les dimensions de la matrice LCD sont $25.6 \times 15.4 \text{ mm}$; la résolution est 1280×768 pixels, d'où la taille d'un pixel ($20 \times 20 \mu\text{m}$). La fréquence de remise à jour est 180 Hz et l'illumination maximum acceptée est 2 W/cm^2 (dans notre cas elle est de 0.3 W/cm^2).

C.2.2 Propriétés de la modulation de phase

Avec ce modulateur spatial, il est possible de moduler soit en amplitude, soit en phase l'onde lumineuse. Dans notre cas l'illumination est modulée en phase. La particularité du LC-R 720 OEM est de moduler seulement de 0 à π . Le changement de phase est équivalent au changement de la profondeur e du motif (équation (4.7)) [114] donc la gamme des DOE accessibles ne sera pas aussi importante par rapport à une modulation 0- 2π . Le niveau de modulation dépend du niveau de gris de l'image envoyée sur la matrice. La figure 4.9 (a) illustre la valeur de la modulation de phase en fonction du niveau de gris (de 0 à 255) avec un angle de polarisation à 30° par rapport à la direction verticale de la matrice et pour une longueur d'onde de 633nm. Sur la figure 4.9 (b) et (c) la modulation de phase est obtenue avec une polarisation de 10° et de 45° . Pour ces deux derniers cas, la longueur d'onde vaut 543nm.

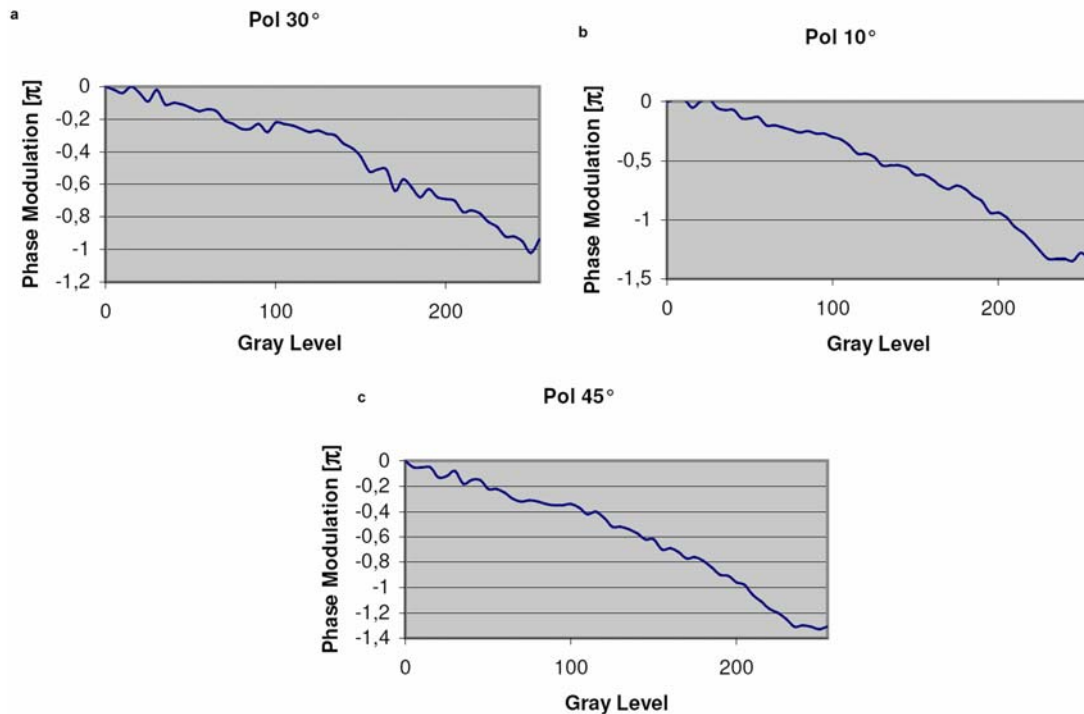
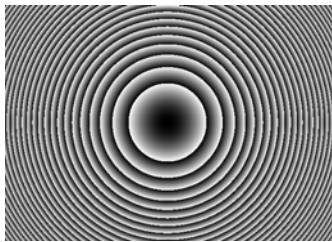


Figure 4.9 : modulation de phase, pour une certaine valeur de la polarisation et de la longueur d'onde, en fonction du niveau de gris.

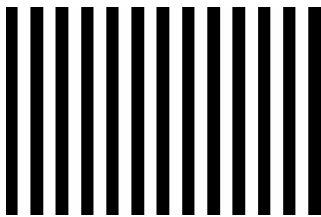
C.2.3 Fonctions optiques simples

Le logiciel qui est livré avec le modulateur de phase permet de créer des fonctions mathématiques simples, comme celles qui ont été vues dans le paragraphe B. Parmi ces fonctions :

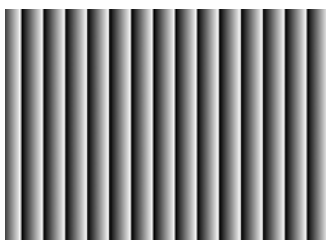
- Lentille de Fresnel (le rayon de la petite zone est défini par l'utilisateur)



- Ligne périodique (de période R variable)



- Dent de scie (période R variable)



Ce logiciel permet en plus de créer par une méthode itérative le DOE à partir du profil d'illumination recherché.

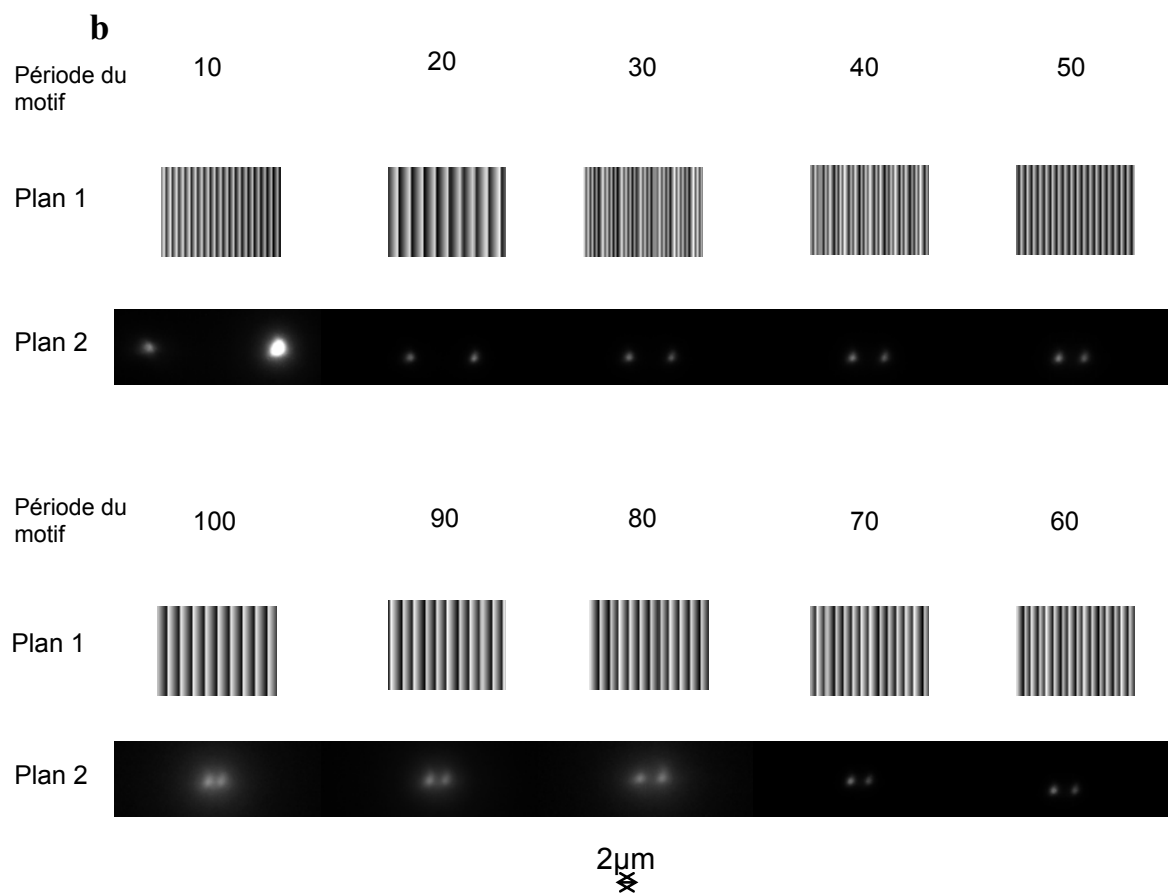
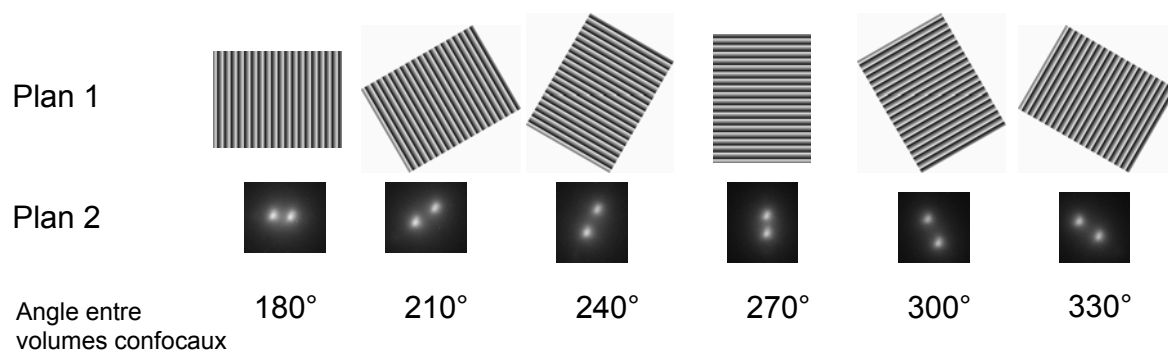
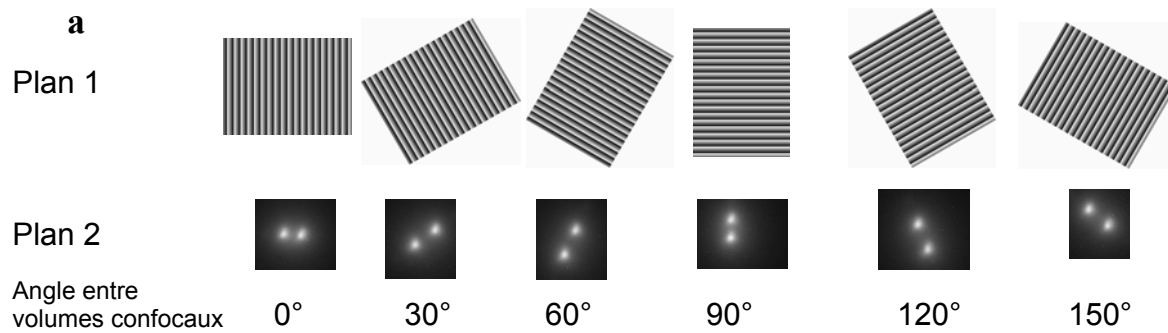
D Mise en forme de l'illumination au foyer d'un objectif et fonction de corrélation croisée en présence d'un flux

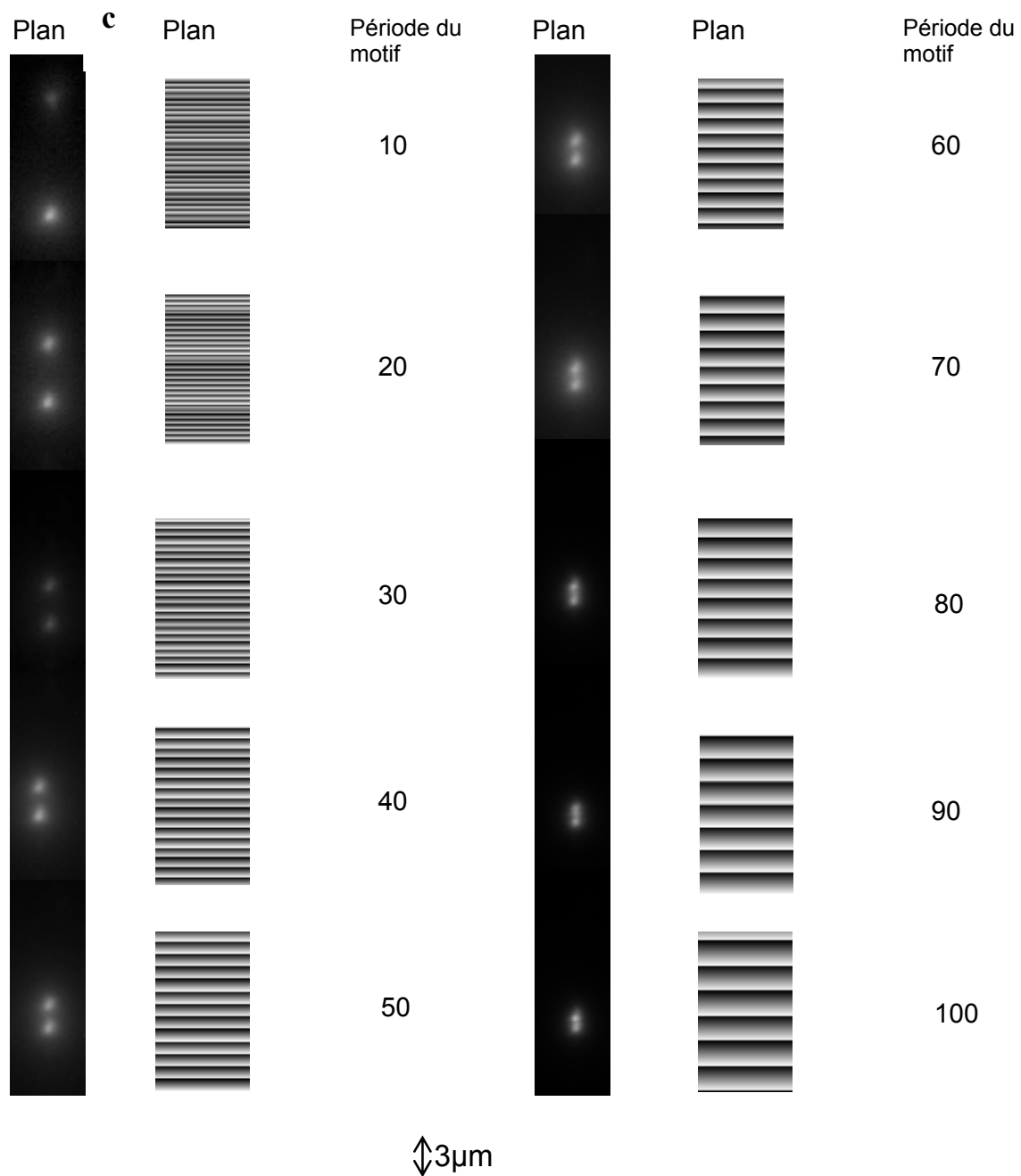
Dans ce paragraphe nous allons voir les possibilités qu'offre ce système de modulation de phase pour la mise en forme de l'illumination au foyer d'un objectif de grande ouverture numérique, nous verrons également la forme analytique de la fonction de corrélation croisée en présence de flux. Le motif envoyé sur la surface du modulateur de phase (plan1) est une dent de scie de période variable. Au foyer de l'objectif de microscope l'efficacité de diffraction est telle que seul l'ordre 0 de diffraction et l'ordre 1 sont observés, la fraction de lumière présent dans les autres ordres étant trop faible pour qu'ils puissent être observés. Comme attendu, une variation de la période du motif, R , engendre une modification de l'angle de diffraction θ_1 et donc une variation de la distance entre les deux volumes limités par la diffraction (figure b et c). Si maintenant le motif présente un angle sur la surface du SLM alors au foyer de l'objectif les deux volumes confocaux présenteront un angle similaire au foyer de l'objectif (figure a, b et c). Sur le tableau ci-dessous nous avons reporté l'écartement entre les volumes d'observation au foyer de l'objectif en fonction de la période du motif vertical (c) et horizontal (b).

Dans le deuxième paragraphe nous déterminerons la forme analytique de la fonction de corrélation croisée en présence d'un flux

D.1 Mise en forme de l'illumination au foyer d'un objectif

Période du motif vertical	Ecartement entre les volumes (μm)	Période du motif horizontal	Ecartement entre les volumes (μm)
10	10.2	10	9.2
20	5.1	20	4.6
30	3.4	30	3.1
40	2.4	40	2.2
50	2.1	50	1.8
60	1.7	60	1.6
70	1.4	70	1.2





On voit tout de suite l'intérêt de ce genre d'illumination. Ce système peut être vu comme une extension directe des travaux proposés par H.Blom (paragraphe A), avec l'atout d'avoir deux point focaux limités par la diffraction dans des configurations très variées (distances et angle variables) et disponibles en direct.

Nous avons proposé une illumination confocale composée de deux volumes confocaux limités par la diffraction. Il est bien sur possible de créer plusieurs autres types d'illuminations comme par exemple une matrice de points focaux. Ce genre de géométrie serait une considérable avancé pour la FCS et offrirait une mine d'informations pour différents domaines. Cependant il faut nuancer cette perspective : expérimentalement nous avons constaté la présence permanente de l'« ordre 0 » (annexe 3) pour toutes les formes créées. Cet ordre 0 est très gênant surtout si l'objectif est de générer un anneau ...

D.2 Fonction de corrélation croisée en présence d'un flux

La fonction de corrélation croisée en présence d'un flux va s'écrire de façon analogue à la fonction de corrélation croisée qui a été utilisé pour la FCCS spatiale géométrie 1. En présence d'un flux il faudra ajouter un terme de vitesse dans la fonction de Green (1.33) :

$$\psi(\vec{r}-\vec{r}',\tau)=\frac{\langle C \rangle}{(4\pi D\tau)^{3/2}}\exp\left[-\frac{|\vec{r}-\vec{r}'+\vec{V}\tau|^2}{4D\tau}\right] \quad (4.14)$$

Cette expression remplace la précédente (1.33) dans l'équation (1.34). Les fonctions d'Efficacité de Détection des Molécules des deux volumes limités par la diffraction décalés de la distance R vont s'écrire, dans l'approximation d'un volume gaussien dans les trois directions de l'espace :

$$MDE_1(\vec{r})=MDE_{01}\exp\left[-2\frac{(\vec{r}^2)}{\omega_r^2}-2\frac{z^2}{\omega_z^2}\right] \quad (4.15)$$

et

$$MDE_2(\vec{r}')=MDE_{02}\exp\left[-2\frac{(\vec{r}'-\vec{R})^2}{\omega_r^2}-2\frac{z^2}{\omega_z^2}\right] \quad (4.16)$$

Où MDE_{01} et MDE_{02} sont les termes de normalisation des deux MDE et $\vec{R}$ est le vecteur décalage entre les volumes. Si les équations (4.15), (4.16) et (4.13) sont utilisées dans l'intégrale (1.34), le résultat donne :

$$G_{CC}(\tau)=1+(C\pi\omega_r^2)^{-1}\left(1+\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}\left(1+\frac{\tau}{S\tau_D}\right)^{-1/2}\exp\left[-\frac{(\vec{V}_r\tau-\vec{R})^2}{\omega_r^2}\left(1+\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}\right]$$

ou

$$G_{CC}(\tau) = 1 + (C\pi\omega_r^2)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S\tau_D}\right)^{-1/2} \text{Exp} \left[-\frac{(|\vec{V}_r|^2 \tau^2 + |\vec{R}|^2 - 2\tau |\vec{V}_r| |\vec{R}| \cos(\theta))}{\omega_r^2} \right] \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \quad (4.17)$$

Avec $S = \omega_z / \omega_r$ (chapitre 1), $\vec{V}_r$ est le flux (limité au plan $\vec{r}(x,y)$) et θ l'angle entre la direction de ce flux et le vecteur $\vec{R}$ qui joint les deux volumes (voir figure 4.10).

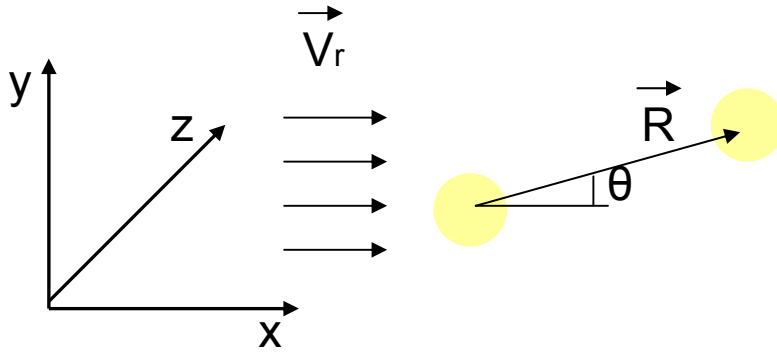


Figure 4.10 : Position des deux volumes par rapport au flux, $\vec{V}_r$, appliqué dans le plan (x,y). Le vecteur $\vec{R}$ qui joint les centres des deux volumes fait un angle θ avec la direction du flux.

E Résultats expérimentaux

Nous venons de voir qu'avec le Modulateur Spatial de Lumière le cas le plus simple de mise en forme de l'illumination est obtenu avec deux points focaux d'écartement variable. Dans ces conditions ce dispositif expérimental doit être adapté aux mesures de flux. Nous espérons obtenir des résultats similaires aux mesures de H.Blom et montrer que notre système permet plus de degré de liberté.

E.1 Mesure d'un flux

Contrairement à H.Blom, notre système d'étude n'est pas exactement un flux dans un microcanal. Nous avons choisi de simuler le flux grâce à un dispositif piezoélectrique. Il suffit juste de déplacer un liquide (avec le piezoélectrique) dans lequel sont présentes des molécules

fluorescentes (nanobilles), voir figure 4.11. Le principal avantage de ce système est sa simplicité, car il va nous permettre d'accéder à une large gamme de vitesse de flux.

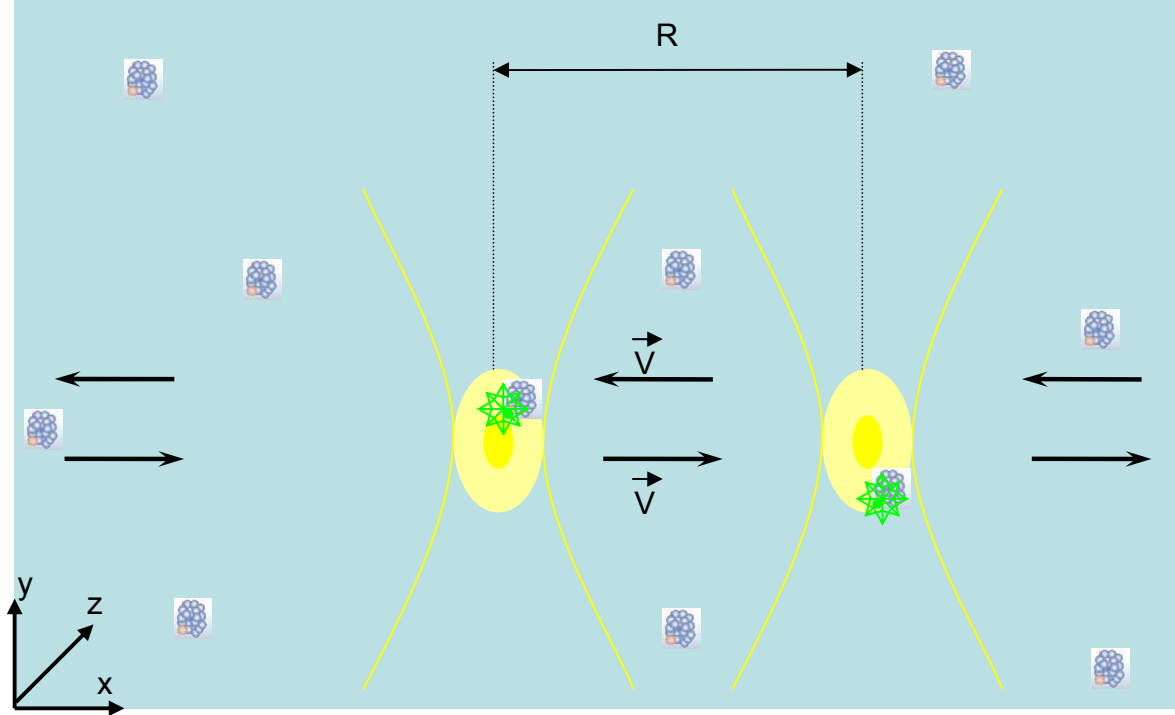


Figure 4.11 : Illustration d'un liquide déplacé par un piezoélectrique (de vitesse de déplacement V) pour la simulation d'un flux. Egaleme nt illustré sur cette figure les deux volumes de détection décalés de la distance R .

Nous avons créé un flux dans le plan (x,y) , la composante selon z est nulle.

Nous introduisons le temps de flux, $\tau_f = \frac{|\vec{R}|}{|\vec{V}_r|}$ [59]. Pour obtenir des résultats raisonnables (peu

gêné par la diffusion) le temps de flux, τ_f , doit être plus petit que le temps de diffusion

$\tau_D = \frac{\omega_f^2}{4D}$. Autrement dit la condition sur la vitesse du flux à appliquer est la suivante :

$|\vec{V}_r| > \frac{|\vec{R}|4D}{\omega_f^2}$. Pour les expériences de mesure du flux, nous avons choisi deux valeurs différentes

d'écartement entre les volumes d'observation : $|\vec{R}| = 3.1 \mu\text{m}$ et $|\vec{R}| = 1.4 \mu\text{m}$. Sachant que le

coefficient de diffusion des nanobilles fluorescentes (20nm de diamètre, concentration $\cong 4$ billes/ μm^3) est $D = 11 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$, pour être gêné le moins possible par la diffusion des molécules,

la vitesse du flux devra être supérieure à $1.4 \mu\text{m}/\text{ms}$ (pour $R = 1.4 \mu\text{m}$) et supérieure à $3.0 \mu\text{m}/\text{ms}$

(pour $R = 3.1 \mu\text{m}$). Le piezoélectrique ne nous permet pas d'atteindre ce genre de vitesse. Les

courbes de corrélation croisée que nous allons obtenir seront donc influencées par la diffusion libre des molécules. Dans nos expériences le flux qui a été appliqué se situe dans l'intervalle $[0.2-1.5]\mu\text{m/ms}$.

Deux séries d'expériences ont été réalisées avec deux écartements différents des volumes d'observation : $R=3.1\mu\text{m}$ et $R=1.4\mu\text{m}$. Dans les deux cas $\theta=0^\circ$. Les courbes expérimentales sont reportées sur la figure 4.12 (a) pour $R=3.1\mu\text{m}$ et figure 4.12 (b) pour $R=1.4\mu\text{m}$. Chaque courbe de corrélation croisée est le résultat de 10 acquisitions de 20 sec. La puissance à l'entrée de l'objectif est de $540\mu\text{W}$, le taux de comptage sur chacune des deux voies est de 140KHz .

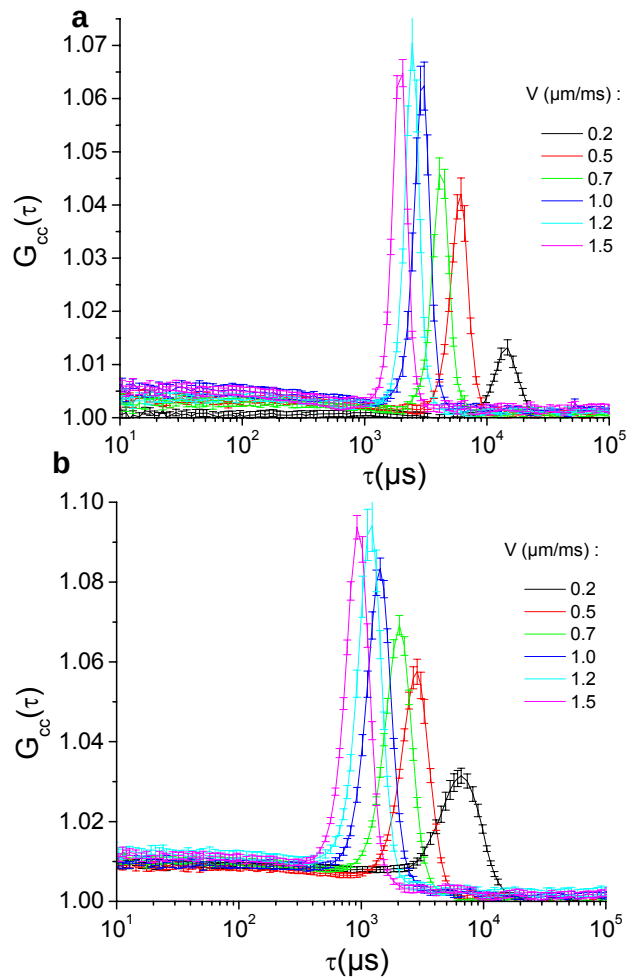


Figure 4.12 : Courbes de corrélation croisée en fonction du flux appliqué, de 1.5 à 0.2 $\mu\text{m/ms}$, pour $R = 3.1 \mu\text{m}$ (a) et pour $1.4\mu\text{m}$ (b). Dans les deux cas $\theta=0^\circ$. Chaque courbe de corrélation croisée est le résultat de 10 acquisitions de 20 sec. La puissance à l'entrée de l'objectif est de $540\mu\text{W}$, le taux de comptage sur chacune des deux voies est de 140KHz

Les courbes qui sont représentées sur la figure 4.12 (a) et (b) montrent qu'à R constant, plus la vitesse du flux est importante est plus le maximum de la courbe de corrélation croisée se situe à des temps courts. Cet effet s'explique avec l'équation (4.17), à écartement constant entre les volumes de détection, une augmentation de la vitesse du flux engendre une diminution du terme exponentiel et donc une diminution de l'amplitude de la fonction de corrélation croisée.

Une seconde constatation peut être faite. A vitesse de flux constante, l'amplitude du maximum de la courbe de corrélation croisée est plus faible pour un R grand. L'explication se trouve aussi dans l'équation (4.12). A vitesse constante une augmentation de l'écartement entre les volumes provoque une diminution du terme exponentiel et donc une diminution de la fonction de corrélation croisée.

Un des attraits de la FCCS spatiale géométrie 3 est que la forme des courbes de corrélation croisée va nous donner directement le temps de flux, et ainsi donc la vitesse du flux. La fonction de corrélation croisée entre deux volumes décalés (4.17) présente un maximum localisé à la position temporelle $\tau_{\max}$:

$$\tau_{\max} = - \left(\tau_D + \frac{\tau_f^2}{2\tau_D} \left(\frac{\omega_r}{R} \right)^2 \right) + \left(\left(\tau_D + \frac{\tau_f^2}{2\tau_D} \left(\frac{\omega_r}{R} \right)^2 \right)^2 + \tau_f^2 \left(1 + \left(\frac{\omega_r}{R} \right)^2 \right) \right)^{1/2} \quad (4.18)$$

Dans cette expérience : $R \gg \omega_r$ et donc $\left(\frac{\omega_r}{R} \right)^2$ tend vers 0. Après simplification on voit que la position temporelle du maximum coïncide avec le temps de flux. Dans le tableau ci-dessous nous avons reporté la position temporelle du maximum pour chaque vitesse du flux et pour les deux écartements entre les volumes. Nous avons également reporté le temps de flux calculé à partir de la formule $\tau_f = \frac{|\vec{R}|}{|\vec{V}_r|}$.

Vitesse ($\mu\text{m/ms}$)	R=3.1 μm		R=1.4 μm	
	$\tau_{\max}$ expérimental	$\tau_f = R/V_r$	$\tau_{\max}$ expérimental	$\tau_f = R/V_r$
0.2	14740 $\pm$ 100	15500	6500 $\pm$ 200	7000
0.5	6140 $\pm$ 100	6200	2800 $\pm$ 150	2800
0.7	4200 $\pm$ 100	4400	2050 $\pm$ 100	2000
1.0	2920 $\pm$ 100	3100	1400 $\pm$ 100	1400
1.2	2460 $\pm$ 50	2583	1210 $\pm$ 100	1160
1.5	1890 $\pm$ 50	2060	920 $\pm$ 50	930

Les valeurs « pseudo-théorique » de τ_f et les valeurs expérimentales de $\tau_{\max}$ correspondent particulièrement bien. L'écart maximum observé est de 8%, cette méthode est particulièrement précise et rapide pour la détermination du temps de flux. Ainsi pour un flux dont la vitesse est inconnue, il suffira de déterminer la position temporelle du maximum de la courbe de corrélation croisée. Connaissant l'écart entre les deux volumes d'observation, nous pourrons donner précisément la vitesse du flux.

F Bilan de la FCCS géométrie 3

A partir de cette expérience nous avons pu voir qu'un modulateur spatial de lumière peut servir pour la FCS. Nous n'avons pas encore pu montrer que ce dispositif expérimental pouvait améliorer la sensibilité de la FCS. Nous avons pu voir avec les mesures de flux, que notre dispositif expérimental permettait d'obtenir des résultats similaires à H. Blom et al. Nous avons l'avantage d'avoir un outil versatile.

La FCCS spatiale géométrie 3 semble une technique prometteuse pour la biologie comme nous allons le voir avec l'étude de la perméabilité d'une membrane (conclusion et perspective). L'étape suivante sera d'utiliser le dispositif sur des cellules vivantes. L'expérience que nous avons réalisée sur la mesure d'un flux, est elle aussi assez prometteuse. Les résultats obtenus sont semblables à ceux de M. Brinkmeier ou H. Blom, mais notre dispositif expérimental permet de positionner dans n'importe quelles positions les deux volumes confocaux. Ceci est donc un avantage certain par rapport aux techniques précédentes.

Conclusion et perspective

Conclusion

Initialement le but de cette thèse était de proposer des travaux pour augmenter la sensibilité de la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence (FCS) vis-à-vis de la discrimination de deux espèces dans un même milieu d'investigation. Actuellement il faut que les deux espèces aient un rapport entre leur temps de diffusion supérieur à 1.6 pour pouvoir les différencier. L'étude théorique que nous avons présentée indique que la Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence spatiale (FCCS spatiale) pouvait être plus sensible que la FCS. Fort de ce constat nous avons proposé une première géométrie pour la FCCS spatiale. Le dispositif expérimental de la géométrie 1 est relativement simple car, il est simplement obtenu grâce à une illumination large au foyer, tandis que la détection est assurée par deux pinholes de sortie décalés latéralement par rapport à l'axe optique. L'avantage de cette géométrie est qu'elle permet l'analyse du seul processus de transport et élimine les processus intramoléculaires. Les courbes obtenues présentent une corrélation qui est liée aux particules qui se déplacent d'un volume d'observation à l'autre. C'est pourquoi la principale application, de notre point de vue, pour la FCCS géométrie 1 concerne les mesures de flux. Pour augmenter la discrimination entre les deux volumes de discrimination nous avons introduit le traitement post acquisition : le seuillage. Appliqué à la Corrélation Croisée le seuillage permet effectivement de réduire les zones communes aux deux volumes d'observation, elles introduisaient une forte proportion de pseudo autocorrélation dans nos courbes de corrélation croisée. Avec cette géométrie nous avons montré qu'il était possible de faire des mesures de diffusion libre, avec des nanobilles fluorescentes, bien que la probabilité qu'une molécule diffuse librement d'un volume de détection à l'autre soit faible. En revanche, les résultats obtenus ne nous ont pas confirmé que la sensibilité de la FCCS (spatiale) géométrie 1 était meilleure que la FCS. C'est pourquoi la géométrie 2 a été introduite.

Le dispositif expérimental de la FCCS géométrie 2 reprend en parti celui de la géométrie 1, en particulier pour l'illumination étendue au foyer, mais la détection est par contre différente. Nous avons conclu avec le précédent dispositif qu'avec deux pinholes simplement décalés, la probabilité pour observer une molécules passer d'un volume d'observation à l'autre est relativement faible. Fort de ce constat nous avons mis au point une détection composée d'un pinhole central entouré par un pinhole annulaire. Le principal intérêt de la FCCS (spatiale) géométrie 2 par rapport à la géométrie 1 est l'isotropie des mesures. Le second aspect attractif est la présence d'un maximum qui permet de donner une estimation du coefficient de diffusion. Mais le même constat que pour la géométrie 1 peut être fait pour la géométrie 2, malgré les nouvelles mesures proposées, la sensibilité n'est pas meilleure que la FCS. Il est certain qu'une meilleure

description des fonctions d'Efficacité de Détection des Molécules (MDE) impliquera une meilleure détermination du coefficient de diffusion. En parallèle, il est indispensable de diminuer le recouvrement qui peut exister entre les deux volumes de détection. Avec la géométrie 3, c'est une avancée qui est faite pour la Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence. Un Modulateur Spatiale de Lumière (SLM) est utilisé pour mettre en forme l'illumination. Grâce au SLM il a été possible de créer deux volumes focaux, de taille limitée par la diffraction, dont la séparation est variable. Ces deux volumes ont notamment permis la mesure d'un flux. Nous n'avons pas fini d'exploiter toutes les possibilités de notre géométrie 3. Notamment, il sera possible de proposer d'autres formes de volumes confocaux et d'étudier la perméabilité d'une membrane de vésicule (perspective).

Perspective

La FCCS spatiale avec un Modulateur Spatiale de Lumière est un dispositif intéressant pour déterminer un la vitesse d'un flux. Cependant la FCS est avant tout une technique destinée à l'analyse de milieux biologiques. Pour évaluer si notre dispositif expérimental peut être adapté à ce genre de milieu, nous l'avons testé pour l'étude de la perméabilité d'une membrane de vésicule.

Dans cette expérience, les vésicules sont fabriquées (chapitre1) de façon à avoir une concentration semblable de molécules à l'intérieur et à l'extérieur d'une vésicule ($C \cong 1\text{nM}$). Le principe de l'expérience consiste à mesurer la diffusion libre de molécules fluorescente par FCCS avec les deux volumes d'observation : i) à l'intérieur de la vésicule, ii) à l'extérieur de la vésicule ; puis de part et d'autre de la membrane. Nous espérons que les courbes de corrélation croisée seront relativement semblables pour les mesures effectuées à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule. Inversement la courbe obtenue avec les deux volumes de part et d'autre de la membrane on attend que la corrélation croisée soit dépendante de la perméabilité de la membrane.

Les molécules fluorescentes employées pour l'expérience sont des molécules de Sulforhodamine G, dont la longueur d'émission de fluorescence se situe vers 548nm. La molécule de Sulforhodamine G a une composition relativement proche de la Rhodamine 6G. La seule différence est la présence d'une chaîne alkyle dans la Rhodamine 6G substituée par deux groupements sulfonates (SO_3^-) dans la Sulforhodamine G. Les groupements sulfonates sont connus pour être (fortement) hydrophiles tandis que la chaîne alkyle a des affinités avec les lipides. C'est pourquoi nous pourrions trouver des molécules de Rhodamine 6G dans la membrane des vésicules et pourquoi la sulforhodamine G en solution ne peut pas pénétrer la membrane d'une vésicule. En résumé une membrane est très imperméable à la sulforhodamine G. Les résultats expérimentaux sont reportés figure 1 : (a) à l'extérieur de la vésicule, (b) à l'intérieur de la vésicule et (c) les deux volumes d'observation à cheval sur la membrane. Chaque courbe est la moyenne de 10 acquisitions de 30 secondes. La distance entre les volumes est choisie de façon à

ce qu'il n'y ait qu'un minimum de recouvrement entre les deux zones d'observation et pour que la probabilité de passage d'une molécule fluorescente du premier au deuxième volume ne soit pas trop faible. Compte tenu des résultats qui ont été obtenus au chapitre 2 nous créons deux volumes décalés de $R=2.0\mu\text{m}$.

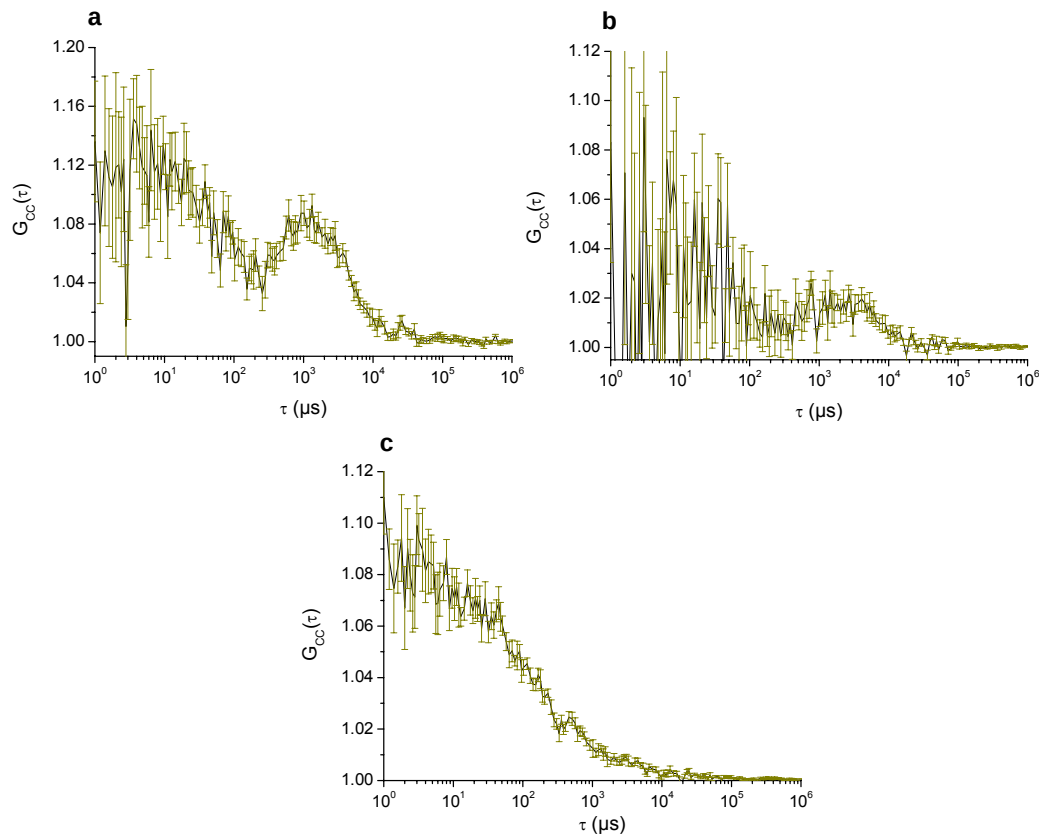


Figure 1 : Courbes expérimentales de Corrélation pour trois positions des volumes d'observation différentes : (a) en dehors de la vésicule, (b) dans la vésicule (c) de part et d'autre de la membrane. Les molécules utilisées pour l'expérience sont des molécules de sulforhodamine G. Chaque courbe est le résultat de 10 acquisition de 30 secondes. Le décalage entre les volumes est de $2\mu\text{m}$.

Vu les courbes figure 1(a) et figure 1(b) nous pouvons conclure que les molécules de Sulforhodamine G diffusent dans le milieu extérieur et intérieur de la vésicule. La position des maxima et les amplitudes sont différentes pour les deux courbes. En l'absence de flux la position du maximum est directement reliée au temps de diffusion de la Sulforhodamine G. A l'intérieur de la vésicule les molécules fluorescentes sont diluées dans une solution de sucrose et à

l'extérieur du glucose. Donc les chromophores diffusent plus lentement à l'intérieur de la vésicule qu'à l'extérieur. L'amplitude, elle, est proportionnelle au nombre moyen de molécules. Comme l'illustre la figure 1(c) la courbe de corrélation croisée obtenue avec deux volumes d'observation de part et d'autre de la membrane est très différente des deux courbes précédentes. L'absence de maximum sur la courbe de corrélation croisée permet penser que localement aucune molécule fluorescente n'est passée d'un volume d'observation à l'autre, car la membrane est non perméable à la Sulforhodamine G. Ce résultat est reproductible puisque la mesure a été répétée 10 fois avec le même résultat. Une partie d'un article de C.Fradin [97] sur les fluctuations des membranes porte sur le profil d'intensité de fluorescence à travers la membrane. Cette étude montre qu'il est possible de conclure qu'une membrane est perméable en déplaçant simplement un volume d'observation. Au cours de son déplacement le volume passe de la solution externe à l'intérieur de la vésicule. Un profil d'intensité est ainsi obtenu. Ce profil permet, par comparaison de l'intensité entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule, de déduire si des molécules fluorescentes ont pu traverser la membrane. L'expérience est relativement simple mais aucune conclusion ne peut être faite si les vésicules sont initialement remplies avec une solution de fluorophores. Dans ce cas, le profil d'intensité sera presque constant au cours du déplacement du volume de détection. Nous pensons que notre méthode permet de suivre localement (volumes de collection de petite dimension) la perméabilité d'une membrane, la mesure étant obtenue presque immédiatement (quelques dizaines de seconde d'acquisition). Dans le cas où la membrane est perméable à un type de molécules fluorescentes, l'amplitude de la courbe de corrélation croisée donnera des renseignements sur la quantité de fluorophores qui sont passés à travers la membrane.

La prochaine étape sera de réaliser cette expérience avec d'autres types de molécules fluorescentes telles que la Rhodamine 6G. Cette famille de molécules est connue pour pénétrer la membrane. Nous espérons que ces nouvelles expériences permettront de mieux comprendre la forme des courbes obtenues pour des volumes de part et d'autre de la membrane. A plus long terme la FCCS géométrie 3 devrait pouvoir être utilisée pour l'étude de la perméabilité d'une membrane de cellule, dans le but de comprendre les différents processus qui sont susceptibles de modifier la perméabilité de la membrane d'une cellule.

Il est clair que cette étude, que nous avons commencée il y a trois ans avec simplement deux volumes décalés et une illumination mise en forme par un télescope, est loin d'être finie avec l'arrivée du Modulateur Spatiale de Lumière. De notre point de vue la prochaine étape est la création d'une matrice de point focaux. Le plus délicat dans cette réalisation sera de créer la matrice équivalente pour la détection. Cette technique sera d'une grande importance pour obtenir le maximum d'informations sur une cellule par exemple. Avec la matrice des points focaux il sera possible d'obtenir de précieux renseignements sur plusieurs environnements locaux de façon simultanée et d'inter corrélérer entre eux les points focaux. Nous attendons avec grande impatience les premiers résultats expérimentaux ...

Bibliographie

- [1] J.M. Hollas, *Spectroscopie*
Collection Dunod (1998)
- [2] Rodney Loudon, *The Quantum Theory of Light*
Oxford science publications, 3^{ème} édition (2000)
- [3] Bernard Valeur, *Molecular Fluorescence*
Wiley-Vch (2002)
- [4] S.J. Strickler, Robert A. Berg, *Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence lifetime of molecules*
The Journal of chemical Physics, vol 37, n°4, august 15 1962
- [5] D.Magde, E.Elson et W.W. Webb, *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System-Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*
Phys. Rev. Lett., 29, pp.705-708 (1972)
- [6] R.Rigler and E.Elson, *FCS theory and applications*
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2001)
- [7] P.F. Lenne, D. Colombo, H. Giovannini, and H. Rigneault, *Flow Profiles and Directionality in Microcapillaries Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy*
Single Mol., **3**, 194-200 (2002)
- [8] R.Jaffiol, Y. Blancquaert, A.Delon, J. Derouard, *Spatial fluorescence cross-correlation spectroscopy*
Applied Optics, 45(6), pp. 1225-1235 (2006)
- [9] Y. Blancquaert, A.Delon, J. Derouard and R.Jaffiol, *Spatial Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy between core and ring pinholes*
Proc. SPIE, 6191, pp. 88-96 (2006)
- [10] R.Rigler, Ü.Mets, J.Widengren, P.Kask, *Fluorescence Correlation Spectroscopy With High Count Rate and Low Background : Analysis of Translationnal Diffusion*
Euro. Biophy. J., 22, pp. 169-175 (1993)
- [11] H.Qian and E.Elson, *Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy*
Applied Optics, 30, pp. 1185-1195 (1991)

- [12] D.E. Koppel, *Statistical Accuracy in Fluorescence Correlation Spectroscopy* Phys.Rev., 10, pp. 1938-1945 (1974)
- [13] H.Qian, *On the Statistics of Fluorescence Correlation Spectroscopy* Biophys. Chem., 38, pp. 49-57 (1990)
- [14] Konstantin Starchev, Jaro Ricka, Jacques Buffle, *Noise on Fluorescence Correlation Spectroscopy* Journal of Colloid and Interface Science 233, 50-55 (2001)
- [15] K.Starchev, J.Ricka, and J.Buffle, *Noise on Fluorescence Correlation Spectroscopy* Journal of Colloid and Interface Science, 233, pp 50-55 (2001)
- [16] Microscopy Apparatus, U.S. Patent 301467, issued 1961, Marvin Minsky
- [17] T. Wilson, *Confocal Microscopy* (1990)
- [18] J.P. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy* New-York : Plenum (1994)
- [19] J.K. Stevens, R.L. Mills and J.E. Trogadis, *Three-dimensionnal confocal microscopy* London : Academic (1994)
- [20] M.Born and E.Wolf, *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference, and Diffraction of Light*, 6th ed., New York: Pergamon Press (1989)
- [21] S.Chandrasekhar, *Radiative Transfer* New York: Dover, pp. 369 (1960)
- [22] E.C.J.von Lommel, *Die Beugungserscheinungen einer kreisrunden Oeffnung und eines kreisrunden Schirmchens theoretisch und experimentell bearbeitet.* Abh. der math. phys. Classe der k. b. Akad. der Wiss. (München) **15**, pp. 229-328, 1884-1886a.
- [23] E.C.J. von Lommel, *Die Beugungserscheinungen geradlinig begrenzter Schirme* Abh. der math. phys. Classe der k. b. Akad. der Wiss. (München), **15**, pp. 529-664, 1884-1886b.
- [24] G.N.Watson, *A Treatise on the Theory of Bessel Functions*, 2nd ed, Cambridge, England: Cambridge University Press, pp. 537-550, 1966.
- [25] G.B. Airy, Trans.Camb. Phil. Soc., **5** (1835), 283
- [26] M.A. Osborne, S. Balasubramanian, W.S. Furey, and D. Klenerman, *Optically Biased Diffusion of Single Molecules Studied by Confocal Fluorescence Microscopy* J. Phys. Chem B, **102**, pp. 3160-3167 (1998)

- [27] Ü. Metz and R. Rigler, *Submillisecond detection of single rhodamine molecules in water* J. Fluorescence, **3**, pp. 259-264 (1994)
- [28] S.Nie, D.T. Chiu, and R.N. Zare, *Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy* Science, **266**, pp. 1018-1021 (1994)
- [29] P.R. Bevington and D.K. Robinson, *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*. McGraw Hill, New York (1992).
- [30] M. Roubens, *Eléments de statistique mathématique*. Université de Liège (2001)
- [31] U.Meseth, T.Wolhand, R.Rigler, and H.Vogel, *Resolution of Fluorescence Correlation Spectroscopy* Biophysical Journal, **76**, pp. 1619-1631 (1999)
- [32] J.Widengren, Ü.Mets, and R.Rigler, *Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution : A Theoretical and Experimental Study* J.Phys.Chem, **99**, pp.13368-13379 (1995)
- [33] <http://probes.invitrogen.com>
- [34] M.I. Angelova, S. Soléau, Ph. Méléard, J.F. Faucon, P. Bothorel, *Preparation of Giant Vesicles by external AC electric field. Kinetics and applications* Progr Colloid Polym Sci **89**:127-131 (1992)
- [35] M.I. Angelova, S. Soléau, Ph. Méléard, J.F. Faucon, P. Bothorel, *AC Field Controlled Formation of Giant Fluctuating Vesicles and Bending Elasticity Measurements* Springer proceedings in physics, vol 66. *The structure and conformation of Amphiphilic Membranes*. Editors : R.Lipowsky, D. Richter, K. Kremer (1992)
- [36] Jonas Korlach, Petra Schwille, Watt.W. Webb, Gerald Feigensohn, *Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy* PNAS, **96**, pp 8461-8466, (1999)
- [37] J.Bernard, L.Fleury, H.Talon, and M.Orrit, *Photon bunching in the fluorescence from single molecules: A probe for intersystem crossing* J. chem. Phys., **98**, pp. 850, (1993)
- [38] H.de Vries and D.A.Wiersma, *Fluorescence transient and optical free induction decay spectroscopy of pentacene in mixed crystals at 2K. Determination of intersystem crossing and internal conversion rates*. J. Chem. Phys., **70**, pp. 5807, (1979)

- [39] M.Orrit, J.Bernard, R.I.Personov, *High-resolution spectroscopy of organic molecules in solids : from fluorescence line narrowing and hole burning to single molecule spectroscopy* J.Phys.Chem., 97(40), pp. 10256-10268 (1993)
- [40] A.Penzkofer, W.Falkenstein, W.Kaiser, *Vibronic relaxation in the S_1 state of Rhodamine dye solutions* Chem. Phys. Lett, 44(1), pp.82-87 (1976)
- [41] V.E.Korobov and A.K.Chibisov
J. Photochem., 9, pp. 411 (1978)
- [42] M.M.Dempster, T.Morrow, M.F.Quinn
J. Photochem., 2, pp. 343 (1973)
- [43] E.Thiel, K.H.Drexhage, *New method to investigate weakly populated transient states* Chem. Phys. Lett, 199, pp.329-334 (1992)
- [44] M.Biscon and J.Jortner, *Intramolecular Radiationless transitions* J. Chem. Phys., 48(2), pp. 715-726 (1968)
- [45] A.Delon, Y.Usson, J.Derouard, T.Biben and C.Souchier, *Photobleaching, Mobility, and Compartmentalisation : Inferences in Fluorescence Correlation Spectroscopy* Journal of Fluorescence, 14, pp.255 (2004)
- [46] P. Schwille and E.Haustein, *Fluorescence Correlation Spectroscopy : An Introduction to its Concepts and Application*
- [47] H.Du, R.A.Fuh, J.Li, A.Corkan, J.S.Lindsey, *PhotochemCAD : A computer-aided design and reserach tool in photochemistry* Photochemistry and Photobiology, 68, pp. 141-142 (1998)
- [48] P. Schwille, F.J. Meyer-Almes, R.Rigler, *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution* Biophysical Journal, 72, pp. 1878-86 (1997)
- [49] Optics Letters, 12(4), pp.227-229 (1987), *Size of the detector in confocal imaging systems*
T.Wilson and A.R.Carlini
- [50] J.Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, 2nd ed
McGraw Hill (1996)
- [51] S.T.Hess and W.W.Webb, *Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy* Biophys. J., 83, pp. 2300-2317 (2002)
- [52] C.Sheppard and H.Matthews, *Imaging in high-aperture optical systems*

J.Opt.Soc.Am. A, 4, pp. 1354-1360 (1987)

[53] B.Richards and E.Wolf, *Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system*
Proc. R. Soc. London Ser. A, 253, pp. 349-379 (1959)

[54] R.Juskaitis and T.Wilson, *The measurement of the amplitude point spread function of microscope objective lenses*

[55] N.L.Thompson, *Fluorescence Correlation Spectroscopy, Vol1 of Topics in Fluorescence Spectroscopy*
J.R.Lakowicz, ed. (Plenum, New York) (1991)

[56] P.F.Fahey and W.W.Webb, *Lateral Diffusion in Phospholipid Bilayer Membranes and Multilamellar Lipid Crystals*
Biochemistry, 17(15), pp. 3046-3053, (1978)

[57] P.Greenspan, E.Mayer and S.Fowler, *Nile Red : A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets*
The Journal of Cell Biology, 100, pp. 965-973 (1985)

[58] P.S.Dittrich and P.Schwille, *Spatial Two-Photon Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Controlling Molecular Transport in Microfluidic Structures*
Anal. Chem, 74, pp. 4472-4479, (2002)

[59] M. Brinkmeier, K.Dörre, J.Stephan, and Manfred Eigen, *Two-Beam Cross-Correlation: A Method To Characterize Transport Phenomena in Micrometer-Sized Structures*
Anal. Chem, 71, pp. 609-616, (1999)

[60] M. Brinkmeier, Thesis, *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Mikro-strukturen*
Braunschweig, Germany, (1997)

[61] M.Born and E.Wolf, *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference, and Diffraction of Light*, 7th ed. : pp. 439
New York: Pergamon Press (1989)

[62] K.Q. Xia and Y.B. Xin, *Dual-beam incoherent cross-correlation spectroscopy*
J. Opt. Soc. Am. A, 12, pp. 1571-1578 (1995)

[63] Y.Chen, J. Müller, P.T.C. So, and E.Gratton, *The Photon Counting Histogram in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy*
Biophysical Journal, 77, pp. 553-567, (1999)

[64] B. Huang, T.D. Perroud, and R.N. Zare, *Photon Counting Histogram: One-Photon Excitation*
ChemPhysChem, 5, pp. 1523 – 1531 (2004)

- [65] K.Bacia and P.Schwille, *A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy*
Methods, 29, pp. 74-85, (2003)
- [66] H.Qian and E.Elson, *Fluorescence correlation spectroscopy with high-order and dual-color correlation to probe nonequilibrium steady states*
PNAS, 101, pp. 2828-2833 (2004)
- [67] A. Amediek, E. Haustein, D. Scherfeld, and P.Schwille, *Scanning Dual-Color Cross-Correlation Analysis for Dynamic Co-Localization Studies of Immobile Molecules*
Single Mol., 3, pp. 201-210 (2002)
- [68] K.Bacia, I.V. Majoul, and P.Schwille, *Probing the Endocytic Pathway in Live Cells Using Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Analysis*
Biophysical Journal, 83, pp. 1184-1193 (2002)
- [69] T. Weidemann, M. Wachsmuth, M. Tewes, K. Rippe, and J. Langowski, *Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*
Single Mol., 3, pp. 49-61 (2002)
- [70] R.von Zon and E.G.D. Cohen, *Green's functions and hydrodynamics for isotopic binary diffusion* (2005)
- [71] W. A. Steele, *Time-correlation functions*, in: *Transport Phenomena in Fluids*
New York: Marcel Dekker, pp. 209–312 (1969)
- [72] J.M.Kincaid, *Self-diffusion on all time scale*
Phys.Rev.Lett., 74, pp. 2985 (1995)
- [73] J.M.Kincaid and E.G.D. Cohen, *Deviations from hydrodynamics on the nanoscale*
Mol.Phys., 100, pp.3005 (2002)
- [74] J.M.Kincaid and E.G.D. Cohen, *Nano- and Pico-scale transport phenomena in fluids*
J.Stat.Phys., 109, pp.361 (2002)
- [75] www.efunda.com
- [76] J.Windengren and R.Rigler, *Mechanism of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy*
Bioimaging, 4, pp. 149-157 (1996)
- [77] C.Eggeling, A.Volkmer and C.A.M. Seidel, *Molecular Photobleaching Kinetics of Rhodamine 6G by one-and two-Photon Induced Confocal Fluorescence Microscopy*
ChemPhysChem, 6, pp. 791-804 (2005)
- [78] M.Weiss, H.Hashimoto, and T.Nilsson, *Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by Fluorescence Correlation Spectroscopy*

Biophysical Journal, 84, pp. 4043-4052 (2003)

[79] T. E. Starr and N. L. Thompson, Local diffusion and concentration of IgG near planar membranes: measurement by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy J. Phys. Chem. B, 106, pp. 2365 (2002)

[80] S.W. Hell and J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy* Optics Letters, 19, pp. 780-782 (1994)

[81] T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A.Egner, and S.W. Hell, *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission* PNAS, 97, pp. 8206-8210 (2000)

[82] L. Kastrup, H. Blom, C. Eggeling, and S.W. Hell, *Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in Subdiffraction Focal Volumes* Physical Review Letters, 94, pp. 178104 (2005)

[83] H. Rigneault and P-F. Lenne, *Fluorescence correlation spectroscopy on a mirror* J. Opt. Soc. Am. B, 20, pp. 2203-2214 (2003)

[84] P.Schwille, J.Korlach, and W.W. Webb, *Fluorescence Correlation Spectroscopy With Single-Molecule Sensitivity on Cell and Model Membranes* Cytometry, 36, pp.176–182 (1999)

[85] www.holoeye.com

[86] N.Sanner, N.Huot, E.Audouard, C.Larat, J.P.Huignard and B.Loiseaux, *Programmable focal spot shaping of amplified femtosecond laser pulses* Optics Letters, 30(12), pp 1479-1481 (2005)

[87] J.Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, 2nd ed, p4 McGraw Hill (1996)

[88] M.R.Taghizadeh, P.Blair, B.Layet, I.M.Waddie, N.Ross, *Design and fabrication of diffractive optical elements* Microelectronic Engineering, 34, pp. 219-242 (1997)

[89] J.Leach, K.Wulff, G.Sinclair, P.Jordan, J.Courtial, L.Thomson, G.Gibson, K.Karunwi, J.Cooper, Z.J.laczik and M.Padgett, *An Interactive Approach to Optical Tweezers Control* Proceedings of the SPIE, 5736,pp. 37-45 (2005)

[90] G.Whyte and J.Courtial, *Experimental demonstration of holographic three-dimensional light shaping using a Gerchberg-Saxton algorithm* New Journal of Physics, 7, pp.117-129 (2005)

- [91] D.C. O'Shea, T.J. Suleski, A.D. Kathman, and D.W. Prather, *Diffractive Optics Design, Fabrication, and Test*
Bellingham: SPIE Press (2004)
- [92] W.Daschner, M.Larsson ,S.H.Lee, *Fabrication of monolithic diffractive optical elements by the use of e-beam direct write on an analog resist and a single chemically assisted ion-beam-etching step*
Applied optics, 34, pp. 2534-2539 (1995)
- [93] W.Daschner, P.Long, R.Stein, C.Wu, S.H.Lee, *Cost-effective mass fabrication of multilevel diffractive optical elements by use of a single optical exposure with a gray-scale mask on high-energy beam-sensitive glass.*
Applied optics, 36, pp. 4675-4680 (1997)
- [94] M.Ekberg, M.Larsson, S.Hard, B.Nilsson, *Multilevel phase holograms manufactures by electron-beam lithography*
Optics letters, 15, pp.568-569 (1990)
- [95] D.C. O'Shea, T.J. Suleski, A.D. Kathman, and D.W. Prather, *Diffractive Optics Design, Fabrication, and Test : chapitre 6 et 7*
Bellingham: SPIE Press (2004)
- [96] www.med.univ-rennes1.fr/etud/neuro/SEP.htm
- [97] C.Fradin, A. Abu-Arish, R. Granek, and M. Elbaum, *Fluorescence Correlation Spectroscopy Close to a Fluctuating Membrane*
Biophysical Journal, 84, pp. 2005-2020 (2003)
- [98] H.Blom, M.Johansson, A.-S.Hedman, L.Lundberg, A.Hanning, S.Hård, and R.Rigler, *Parallel fluorescence detection of single biomolecules in microarrays by a diffractive-optical-designed 2 * 2 fan-out element*
Applied Optics, 41, pp. 3336-3342 (2002)
- [99] H.Blom, M.Johansson, M.Gösch, T.Sigmundsson, J.Holm, S.Hård, and R.Rigler, *Parallel flow measurements in microstructures by use of a multifocal 4*1 diffractive optical fan-out element*
Applied Optics, 41, pp. 6614-6620 (2002)
- [100] M.Reicherter, T.Haist, E.U.Wagemann, and H.J. Tiziani, *Optical particle trapping with computer-generated holograms written on a liquid-crystal display*
Optics Letters, 24, pp. 608-610, (1999)
- [101] C.F.Mattern, F.S.Brackett, and B.J.Olson, *Determination of number and size of particles by electrical grating : blood cells.*
J. Applied. Physiol., 10, pp.56 (1957)
- [102] W.Coulter, *High speed automatic blood cell counter and cell size analyser*

Proc. Natl. Electronics Conf., 12, pp.1034 (1956)

[103] M.Bartholdi and G.C.Salzman, *Differential lightscattering photometer for rapid analysis of single particle in flow*
Applied Optics, 19, pp. 1573-1581 (1980)

[104] M.Hammer and D.Schweitzer, *Single scattering by red blood cells*
Applied Optics, 37, pp. 7410-7418 (1998)

[105] B.R.Brown and A.W. Lohmann, *Complex spatial filtering with binary masks*
Applied Optics, 5, pp. 967 (1966)

[106] H.Dammann, *Blazed synthetic phase-only holograms*
Optik, 31, pp. 95-105 (1970)

[107] B.Veldkamp, *Laser beam profile shaping with diffraction gratings*
Opt. Comm., 38, pp. 381-386 (1981)

[108] B.Veldkamp, *Laser beam profile shaping with interlaced binary diffraction gratings*
Applied Optics, 21, pp.3209-3212 (1982)

[109] E.W.Marchand and E.Wolf
J. Opt. Soc. Am, 56, pp.1712 (1966)

[110] A.Sommerfeld, *Optics*
New York, Academic Press (1954)

[111] R.W.Gerchberg and W.O.Saxton, *A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures*
Optik, 35, pp.237-246 (1972)

[112] W.O. Saxton, *Computer Techniques for Image Processing in Electron Microscopy*
Academic, New York (1978)

[113] W.T. Rhodes, J.R. Fienup, and B.E.A. Saleh, *Reconstruction and Synthesis Applications of an Iterative Algorithm*
Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham (1982)

[114] J. Bengtsson and M. Johansson, *Fan-out diffractive optical elements designed for increased fabrication tolerances to linear relief depth errors*
Applied Optics, 41, pp. 281-289 (2002)

[115] K.Ohkubo and J.Ohtsubo, *Evaluation of LCTV as a spatial light modulator*
Optics Communications, 102, pp. 116-124 (1993)

[116] J.Chen, G.Lai, K.Ishizuka, and A.Tonomura, *Method of compensating for aberrations in electron holography by using a liquid-crystal spatial-light modulator*

Applied Optics, 33, pp1187-1193 (1994)

[117] M.E.Karim and A.A.S.Awwal, *Electrooptic Displays for Optical Information Processing* Proceedings of the IEEE, 84, pp.814-827 (1996)

[118] E.Martin-Badosa, A.Carnicier, I.Juvells, and S.Vallmitjana, *Complex modulation characterization of luquid crystal devices by interferometric data correlation* Meas. Sci. Technol., 8, pp.764-772 (1997)

[119] M.J.Levenne, J.Korlach, S.W.Turner, M.Foquet, H.G. Craighead, and W.W.Webb, *Zero-mode Waveguides for Single-Molécule Analysis at High Concentrations* Science, 299, pp 682-686 (2003)

Annexe 1

Formalisme de la FCS

Nous étudions le cas le plus général possible, donc nous considérons que p espèces moléculaires sont présentes dans une solution idéale. La composante j est caractérisée par sa concentration $C_j(\vec{r}, t)$. La valeur moyenne de la concentration est notée $\langle C_j(\vec{r}, t) \rangle$ et la variation est notée $\delta C_j(\vec{r}, t) (\equiv C_j(\vec{r}, t) - \langle C_j(\vec{r}, t) \rangle)$

Nous pouvons définir un jeu d'équations différentielles couplées pour chaque position spatiale ($\vec{r}$) et temporelle (t), sous le forme :

$$\frac{\partial \delta C_j(\vec{r}, t)}{\partial t} = D_j \nabla^2 \delta C_j(\vec{r}, t) + \sum_{k=1}^p T_{jk} \delta C_k(\vec{r}, t) \quad (A.1)$$

Dans l'expression (A.1), D_j correspond au coefficient de diffusion de la composante j et T_{jk} est un élément de la matrice des coefficients linéaires d'interaction chimique.

Dans la suite on considérera que le nombre de photon émis et collectés par chaque molécule est proportionnel à lumière d'excitation. Le nombre de photons collectés par période temporelle Δt est donné par l'expression suivante :

$$n(t) = \Delta t \int d^3 \vec{r} I(\vec{r}) \sum_{k=1}^p Q_k C_k(\vec{r}, t) \quad (A.2)$$

où Q_k est défini comme étant le produit de la section efficace d'absorption σ par le rendement quantique de fluorescence ϕ_f (équation 1.5) et par l'efficacité de collection de la fluorescence de la composante k . La distribution de la lumière d'excitation dans l'échantillon est notée $I(\vec{r})$.

Les fluctuations de n données par (A.2) sont :

$$\delta n(t) = n(t) - \langle n(t) \rangle = \Delta t \int d^3 \vec{r} I(\vec{r}) \sum_{k=1}^p Q_k \delta C_k(\vec{r}, t) \quad (A.3)$$

La fonction d'autocorrélation est définie comme étant la moyenne temporelle des produits des fluctuations d'intensité, normalisée par l'intensité moyenne au carré ($\langle n \rangle^2$). T sera le nombre d'intervalles d'échantillonnage, Δt , accumulés. $G(\tau)$ s'écrira ainsi :

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle n \rangle^2 T} \sum_{i=0}^{T-1} \delta n(t) \delta n(t+\tau) \quad (A.4)$$

Le système est ergodique, autrement dit l'évolution du signal au cours du temps apporte la même information qu'un ensemble de réalisations. A partir de (A.4) nous pouvons donc obtenir l'équation suivante :

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle n \rangle^2} \langle \delta n(0) \delta n(\tau) \rangle \quad (\text{A.5})$$

Si maintenant on injecte (A.3) dans (A.5) nous obtenons la forme très générale de la fonction d'autocorrélation :

$$G(\tau) = \left(\frac{\Delta t}{\langle n \rangle} \right)^2 \iint d^3 \vec{r} d^3 \vec{r}' I(\vec{r}) I(\vec{r}') \sum_{j,l} Q_j Q_l \langle \delta C_j(\vec{r}, 0) \delta C_l(\vec{r}', \tau) \rangle \quad (\text{A.6})$$

Nous considérons maintenant que $\delta C_k(\vec{r}, t)$ est solution de l'équation (A.1). Il va être utile d'utiliser les Transformées de Fourier (TF) pour déterminer les solutions.

La TF de $\delta C_l(\vec{r}, t)$ se note $\tilde{C}_l(\vec{q}, t)$ et s'écrit :

$$\tilde{C}_l(\vec{q}, t) = (2\pi)^{-3/2} \int \delta C_l(\vec{r}, t) e^{i\vec{q}\vec{r}} d^3 \vec{r} \quad (\text{A.7})$$

La Transformée de Fourier appliquée à l'équation (A.1) donne :

$$\frac{d\tilde{C}_l(\vec{q}, t)}{dt} = \sum_{k=1}^n M_{lk} \tilde{C}_k(\vec{q}, t) \quad (\text{A.8})$$

Les coefficients $M_{lk} = T_{lk} - D_l q^2 \delta_{lk}$ forment la matrice M , dont les valeurs propres sont notées λ et les vecteurs propres sont notés X (la matrice inverse des vecteurs propres est X^{-1}).

La solution de l'équation (A.8) peut s'exprimer avec les valeurs propres et les vecteurs propres correspondants de la matrice M :

$$\tilde{C}_l(\vec{q}, t) = \sum_{s=1}^n X_l h_s e^{\lambda_s t} \quad (\text{A.9})$$

La valeur h_s introduite dans l'équation (A.9) est définie avec la matrice inverse des vecteurs propres de M :

$$h_s = \sum_{k=1}^n (X^{-1})_k \tilde{C}_k(\vec{q}, t=0) \quad (\text{A.10})$$

En injectant (A.10) dans l'équation (A.9) on obtient l'équation (A.11) :

$$\tilde{C}_l(\vec{q},t)=\sum_{s=1}^n X_l e^{\lambda t} \sum_{k=1}^n (X^{-1})_k \tilde{C}_k(\vec{q},t=0) \quad (A.11)$$

Faire la transformée de Fourier ou moyenner des ensembles sont deux opérations linéaires indépendantes. De plus $\delta C_l(\vec{r},t)$ et $\tilde{C}_l(\vec{q},t)$ sont reliés par la transformée de Fourier inverse de sorte que $\delta C_l(\vec{r},t)=(2\pi)^{-3/2} \int \tilde{C}_l(\vec{q},t) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{q}$, ainsi la valeur moyenne du produit des concentrations locales (équation (A.6)) à l'instant initiale et à l'instant initiale + t va pouvoir s'écrire :

$$\begin{aligned} \langle \delta C_j(\vec{r},0) \delta C_l(\vec{r}',t) \rangle &= \langle \delta C_j(\vec{r},0) (2\pi)^{-3/2} \int \tilde{C}_l(\vec{q},t) e^{-i\vec{q}\vec{r}'} d^3\vec{q} \rangle \\ &= (2\pi)^{-3/2} \int \langle \delta C_j(\vec{r},0) \tilde{C}_l(\vec{q},t) \rangle e^{-i\vec{q}\vec{r}'} d^3\vec{q} \quad (A.12) \end{aligned}$$

On peut remplacer la valeur de la Transformée de Fourier de la concentration locale par son expression donnée par l'équation :

$$\langle \delta C_j(\vec{r},0) \delta C_l(\vec{r},t) \rangle = (2\pi)^{-3/2} \int \sum_{s=1}^n X_l e^{\lambda t} \sum_{k=1}^n (X^{-1})_k \langle \delta C_j(\vec{r},0) \tilde{C}_k(\vec{q},t=0) \rangle e^{-i\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{q} \quad (A.13)$$

Il est important de noter que dans le cas de la solution chimique, la longueur de corrélation est plus petite que la distance entre molécules. Les positions des différentes molécules d'une même espèce, comme celles d'espèces différentes, sont décorréliées et on peut écrire :

$$\langle \delta C_j(\vec{r},0) \delta C_k(\vec{r}',0) \rangle = \langle C_j \rangle \delta(\vec{r}-\vec{r}') \quad (A.14)$$

En prenant les équations (A.6), (A.13) et (A.14) et intégrant sur $\vec{r}$ et $\vec{r}'$ on obtient une expression générale pour la fonction d'autocorrélation :

$$G(\tau) = \left(\frac{\Delta t}{\langle n \rangle} \right)^2 \int |\tilde{I}(\vec{q})|^2 \sum_{j,l} Q_j Q_l \langle C_j \rangle \sum_s X_l e^{\lambda \tau} (X^{-1})_j d^3\vec{q} \quad (A.15)$$

Où $\tilde{I}(\vec{q}) = (2\pi)^{-3/2} \int I(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{r}$ est la Transformée de Fourier de $I(\vec{r})$.

Si maintenant on reprend l'équation (A.2) et si on remarque que $\int I(\vec{r}) d^3\vec{r} = \int I(\vec{r}) e^{-i\vec{r}(\vec{q}=0)} d^3\vec{r} = (2\pi)^{3/2} \tilde{I}(\vec{q}=0)$, l'expression de la valeur moyenne de n peut s'écrire :

$$\langle n(t) \rangle = \Delta t (2\pi)^{3/2} \tilde{I}(0) \sum_{i=1}^n Q_i \langle C_i \rangle \quad (A.16)$$

Comme nous l'expliquions dans l'introduction sur la FCS, de récents travaux [10] ont introduit un système d'illumination/collection confocale dans le dispositif expérimental. Nous allons réécrire la fonction d'autocorrélation (équation (A.15)) pour tenir compte de la détection confocale, en supposant que son profil est gaussien dans les trois directions de l'espace. $I(\vec{r})$ s'écrira dans ces conditions :

$$I(\vec{r})=I_0 \text{Exp}\left[-2\frac{(x^2+y^2)}{\omega_r^2}-2\frac{z^2}{\omega_z^2}\right] \quad (\text{A.17})$$

Avec ω_z et ω_r les rayons du profil de détection dans le plan de propagation du faisceau et dans la direction de propagation.

L'expression de $G(\tau)$ (équation (A.15)) fait intervenir la TF de $I(\vec{r})$, la forme proposée ci-dessous est le résultat de l'intégration sur $\vec{r}$:

$$\tilde{I}(\vec{q})=\frac{I_0\omega_r^2\omega_z}{8}\text{Exp}\left[-\frac{\omega_r^2(q_x^2+q_y^2)}{8}-\frac{\omega_z^2q_z^2}{8}\right] \quad (\text{A.18})$$

A l'aide de cette équation et des équations (A.16) et (A.17) nous obtenons finalement la forme très générale de la fonction d'autocorrélation qui nous servira *a posteriori* pour l'étude des différents cas rencontrés (diffusion d'une ou plusieurs composantes, ...) :

$$G(\tau)=\frac{(2\pi)^{-3}}{\sum Q_i^2 <C_i>^2}\int \text{Exp}\left[-\frac{\omega_r^2(q_x^2+q_y^2)}{4}-\frac{\omega_z^2q_z^2}{4}\right]\sum_{j,l}Q_jQ_l <C_j>\sum_s X_l e^{\lambda\tau}(X^{-1})_j d^3\vec{q} \quad (\text{A.19})$$

Diffusion à une composante

A partir de l'équation (A.19) nous allons pouvoir donner une forme analytique à la fonction d'autocorrélation, dans le cas très simple où seule une espèce diffuse dans le milieu.

Dans ce cas précis la matrice M a une seule valeur propre, $\lambda=-D(q_x^2+q_y^2+q_z^2)$ et le vecteur propre est simplement $X=1$. Si on remplace la valeur propre et le vecteur propre dans l'équation (A.19), la fonction d'autocorrélation s'écrira après simplification (sur $<C>$ et Q) :

$$G(\tau)=\frac{(2\pi)^{-3}}{<C_i>}\int \text{Exp}\left[-q_x^2\left(\frac{\omega_r^2}{4}+D\tau\right)-q_y^2\left(\frac{\omega_r^2}{4}+D\tau\right)-q_z^2\left(\frac{\omega_z^2}{4}+D\tau\right)\right]d^3\vec{q} \quad (\text{A.20})$$

Et après intégration de l'équation (A.20) sur $\vec{q}$, l'équation devient :

$$G(\tau) = \frac{\pi^{-3/2}}{\langle C \rangle \omega_r^2 \omega_z} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_r^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} \quad (\text{A.21})$$

Il peut être nécessaire de réécrire l'équation (A.21) en fonction du nombre moyen de molécules analysées et le volume de collection.

Ainsi $\pi^{3/2} \omega_r^2 \omega_z (=V)$ est simplement la taille du volume confocal (de forme ellipsoïdale) et $S = \omega_z / \omega_r$ le facteur de forme de ce volume. Plus le facteur S sera grand et plus le volume confocal sera allongé. Le nombre moyen de molécule s'exprime à partir de $\langle C \rangle$ et V : $\langle N \rangle = \langle C \rangle V$. Le temps de diffusion $\tau_D = \omega_r^2 / 4D$, qui est le temps moyen de passage des molécules sondées à travers le volume V. Par conséquent la fonction d'autocorrélation réécrite donne :

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2} \quad (\text{A.22})$$

C'est cette expression qui nous servira pour les différents ajustements de courbes d'autocorrélation expérimentales. De ces ajustements nous tirerons directement, $\langle N \rangle$, τ_D et S, et implicitement $\langle C \rangle$.

Diffusion à n composantes

C'est le cas où on trouve en présence p types de molécules qui ne sont pas susceptibles d'interagir ensemble. Prenons le cas où $p=2$, la matrice M a deux valeurs propres $\lambda_1 = -D_1(q_x^2 + q_y^2 + q_z^2)$ et $\lambda_2 = -D_2(q_x^2 + q_y^2 + q_z^2)$ ainsi que deux vecteurs propres $X_1 = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}$ et $X_2 = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$. L'autocorrélation s'écrit alors, en prenant l'équation (A.19) :

$$G(\tau) = \frac{Q_1^2 \langle N_1 \rangle}{(Q_1 \langle N_1 \rangle + Q_2 \langle N_2 \rangle)^2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D1}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{D1}} \right)^{-1/2} + \frac{Q_2^2 \langle N_2 \rangle}{(Q_1 \langle N_1 \rangle + Q_2 \langle N_2 \rangle)^2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D2}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{D2}} \right)^{-1/2} \quad (\text{A.23})$$

Les indices 1 et 2 de l'équation (A.23) font références aux deux espèces en présence.

La généralisation à p composantes, qui n'interagissent pas, découle des équations (A.22) et (A.23) :

$$G(\tau) = \frac{1}{\left(\sum_{k=1}^p Q_k \langle N_k \rangle \right)^2} \sum_{i=1}^p Q_i^2 \langle N_i \rangle \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{Di}} \right)^{-1/2} \quad (\text{A.24})$$

La fonction d'autocorrélation de p composantes est simplement la somme des autocorrélations de chaque composante indépendante pondérée notamment par les termes Q_k^2 et $\langle N_k \rangle^2$.

Annexe 2

Expression du signal sur bruit (S/B) (KOPPEL)

Nous allons dans cette partie discuter de la précision de la FCS, sachant que cette étude a été historiquement abordé par Koppel en 1974 [12]. Cet auteur a conclu que le paramètre critique qui gouverne la précision (statistique) est la quantité de photons par temps de corrélation et par molécules fluorescentes dans le volume de collection.

Des travaux plus récents [13] et [14] se sont focalisés sur l'expression du rapport signal sur bruit des fonctions d'autocorrélation à l'instant $\tau=0$. Ces études supposent que la fonction d'autocorrélation présente un déclin, ce qui n'est pas totalement exact. En effet c'est seulement vrai pour une diffusion libre dans un profil de faisceau gaussien. Plus important, il est supposé que les fluctuations d'intensité de fluorescence correspondent à un processus aléatoire gaussien, ce qui n'est correct que pour les grandes valeurs du nombre de molécules [15].

Le rapport signal sur bruit S/B est défini ainsi [12] :

$$S/B = \frac{G(\tau)}{\sqrt{\text{var}[\hat{G}(\tau)]}} \quad (\text{B.1})$$

Où $\hat{G}(\tau)$ est l'estimation expérimentale de $G(\tau)$

Nous rappelons que la fonction d'autocorrélation peut s'exprimer en fonction de la moyenne des fluctuations d'intensité, normalisée par l'intensité moyenne au carré.

Nous allons maintenant réexprimer $\delta n(t)$ ainsi que $\delta n(t+\tau)$ en fonction de l'intensité moyenne et du nombre de photons échantillonnés.

$$\delta n(t) = n_i - \langle n \rangle \text{ et } \delta n(t+\tau) = n_{i+m} - \langle n \rangle \quad (\text{B.2})$$

Où n_i et n_{i+m} sont la quantité de photons échantillonnés aux temps $t=i\Delta\tau$ et $t+\tau=(i+m)\Delta\tau$.

Nous allons faire intervenir dans l'expression de la fonction d'autocorrélation, $T\Delta\tau$, le temps total de l'expérience, et τ qui correspond au temps de décalage m de sorte que $m = \frac{\tau}{\Delta\tau}$. Nous pouvons donc réécrire $G(\tau)$ et $\text{var}[\hat{G}(\tau)]$:

$$G(\tau) = \frac{1}{T} \sum_{i=0}^{T-1} \frac{\delta n_i \delta n_{i+m}}{\langle n \rangle^2} = \frac{\langle \delta n_0 \delta n_m \rangle}{\langle n \rangle^2} \quad (\text{B.3})$$

et

$$\text{var}[\hat{G}(\tau)] = \frac{1}{T^2} \text{var} \left[\sum_{i=0}^{T-1} \frac{\delta n_i \delta n_{i+m}}{\langle n \rangle^2} \right] = \frac{1}{T \langle n \rangle^4} \text{var}[\delta n_0 \delta n_m] \quad (\text{B.4})$$

Voyons les deux principales sources de fluctuations dans le nombre de photons détectés :

- 1) Les fluctuations dans le nombre de molécules fluorescentes, due à la diffusion ou autres réactions chimiques. Dans ce cas les fluctuations relatives de la quantité de photons sont reliées aux fluctuations du nombre de molécules, notées $\frac{\sqrt{\text{var}[\delta n]}}{\langle n \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}}$. Elles contribuent au signal d'autocorrélation ainsi qu'à la variance de $G(\tau)$.
- 2) Emission de photons. Cette source de fluctuations contribue seulement au bruit. Ces fluctuations s'écrivent $\frac{\sqrt{\text{var}[\delta n]}}{\langle n \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\nu \langle N \rangle}}$ avec ν le nombre moyen de photons détectés par molécules et par intervalle d'échantillonnage $\Delta\tau$.

Dans les expériences, ν est petit, ce qui permettra de négliger la première cause de fluctuation par rapport à la seconde : $\frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}} \ll \frac{1}{\sqrt{\nu \langle N \rangle}}$.

En reprenant l'équation (1.38) et en soulignant le fait que le bruit est décorrélé [12], la variance s'écrira :

$$\begin{aligned} \text{var}[\hat{G}(\tau)] &= \frac{1}{T \langle n \rangle^4} \text{var}[\delta n_0 \delta n_m] \\ &\cong \frac{1}{T \langle n \rangle^4} \text{var}[\delta n_0] \text{var}[\delta n_m] \\ &= \frac{1}{T \nu^2 \langle N \rangle^2} \end{aligned} \quad (\text{B.5})$$

et finalement le signal sur bruit s'exprime de la façon suivante, sachant que $G(\tau) \propto \langle N \rangle^{-1}$:

$$\frac{S}{B} = \frac{G(\tau)}{\sqrt{\text{var}[\hat{G}(\tau)]}} \cong G(\tau) \nu \sqrt{T} \langle N \rangle \propto \nu \sqrt{T} \quad (\text{B.6})$$

De l'expression (B.6) nous déduisons que le rapport signal sur bruit dépend seulement de la racine carrée du temps d'acquisition et du nombre moyen de photons détectés par molécules. Pour augmenter le signal sur bruit il sera donc plus intéressant de chercher à augmenter ν que d'augmenter le temps d'acquisition.

Annexe 3

Théorie de la diffraction

Dans cette annexe nous allons développer les concepts les plus importants de la diffraction afin de comprendre comment il est possible de mettre en forme l'illumination au foyer d'un objectif (chapitre 4).

La réfraction et la réflexion sont des concepts qui permettent de décrire un large éventail de systèmes optiques. Cependant, il faut souligner la limitation de ces notions pour des régions proches d'une ouverture. Dans ce cas la théorie de la diffraction doit être introduite [91].

La lumière est décrite par un champ électrique $\vec{E}$ et magnétique $\vec{H}$ liés par les équations de Maxwell :

$$\begin{aligned} \overrightarrow{\text{Rot}}(\vec{E}) &= -\mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} & \text{div}(\varepsilon \vec{E}) &= 0 \\ \overrightarrow{\text{Rot}}(\vec{H}) &= \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} & \text{div}(\mu \vec{H}) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{C.1})$$

où μ et ε sont les tenseurs de perméabilité et de permittivité. Si l'analyse est restreinte à un milieu isotrope et homogène, alors la perméabilité et la permittivité sont des constantes scalaires. Dans ces conditions particulières il est possible de réécrire les équations de Maxwell de la façon suivante :

$$\nabla^2 \vec{U} - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \vec{U}}{\partial t^2} = 0 \quad (\text{C.2})$$

$\vec{U}$ représente le champ électrique $\vec{E}$ ou magnétique $\vec{H}$ et $v^2 = \frac{1}{\mu \varepsilon}$

L'équation (C.2) est appelée équation de vecteur d'onde. Cette équation peut être réécrite pour chaque composante du vecteur U dans la base (x, y, z) :

$$\begin{cases} \nabla^2 U_x - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 U_x}{\partial t^2} = 0 \\ \nabla^2 U_y - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 U_y}{\partial t^2} = 0 \\ \nabla^2 U_z - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 U_z}{\partial t^2} = 0 \end{cases} \quad (\text{C.3})$$

Chaque composante du champ doit satisfaire à la même équation :

$$\nabla^2 U - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 U}{\partial t^2} = 0 \quad (C.4)$$

Dans le cas particulier d'ondes planes monochromatiques, l'amplitude et la phase des composantes du champ peuvent être représentées par une fonction complexe :

$$U(x,y,z,t) = A(x,y,z) e^{-j\varphi(x,y,z)} e^{j\omega t} \quad (C.5)$$

avec $\omega = 2\pi\nu$, $\varphi(x,y,z)$ est la phase de l'onde et $A(x,y,z)$ l'amplitude. Si on remplace dans l'équation (C.4) U par son expression (équation (C.5)) on obtiendra finalement :

$$(\nabla^2 + k^2)U = 0 \quad (C.6)$$

avec $k = \frac{2\pi}{\lambda}$.

L'expression précédente est connue sous le nom d'équation de Helmholtz. Comme le stipule la théorie de la diffraction la dépendance spatiale d'un champ $U(x,y,z)$ doit obéir à l'équation de Helmholtz.

1 Théorie de Fresnel-Kirchhoff

Pour prévoir la propagation de l'onde diffractée, Huygens a formulé la règle suivante: « chaque élément d'une surface d'onde peut être vu comme le centre d'une perturbation secondaire qui donne naissance à de nouvelles ondelettes sphériques ; la position de la surface d'onde à un instant postérieur est l'enveloppe de toutes ces ondelettes ». Fresnel a rajouté que les ondelettes secondaires interfèrent mutuellement. La démonstration mathématique du principe de Huygens-Fresnel a fait l'objet de plusieurs recherches, en particulier par Kirchhoff.

La théorie de Kirchhoff inclut l'idée du principe de Huygens-Fresnel mais en plus elle intègre un terme pour l'orientation de l'onde.

Considérons maintenant une onde monochromatique de point source P_0 et se propageant à travers un plan ouvert. P est le point où la perturbation de l'onde doit être analysé. Nous supposons que les dimensions de l'ouverture sont grandes comparées à la longueur d'onde et petites comparées aux dimensions P_0 -écran et écran- P (voir figure Annexe.1). Pour déterminer la perturbation de l'onde au point P nous prenons l'intégrale de Kirchhoff sur une surface S formée par l'ouverture (A), la face de l'écran non illuminée (B) et la sphère de rayon R centrée sur P ; A,B et C est une surface close (figure Annexe.1):

$$U(P) = \frac{1}{4\pi} \iint_{A,B,C} \left[U \frac{\partial}{\partial n} \left(\frac{1}{s} e^{jks} \right) - \left(\frac{1}{s} e^{jks} \right) \frac{\partial U}{\partial n} \right] dS \quad (C.7)$$

où U est le champ et $\vec{n}$ est le vecteur normal à l'écran.

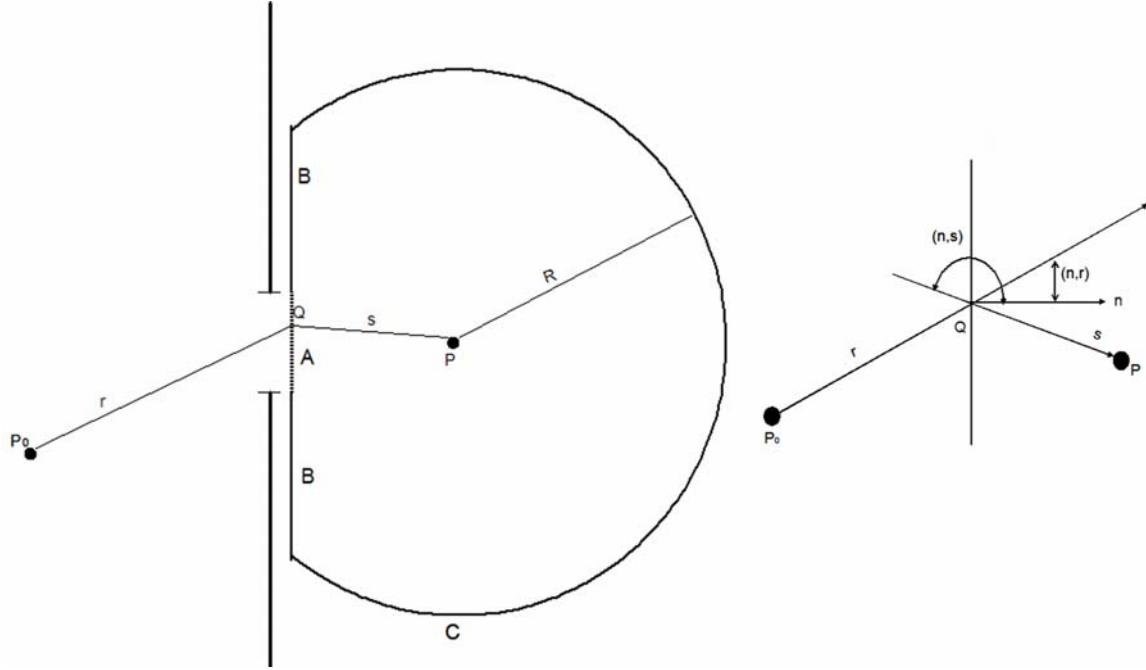


Figure Annexe.1 : La surface formée de l'écran (A), de la face de l'écran non illuminée (B) et de la sphère de rayon R centrée sur P est utilisée pour l'évaluation de l'intégrale de Kirchhoff

Il peut être montré [87] que la contribution de la portion de cercle C à l'intégrale (équation C.7) est nulle. En prenant R suffisamment grand, il est évident que la valeur de U et de $\frac{\partial U}{\partial n}$ sur C seront arbitrairement rendus petites, cela implique que la contribution sur C peut être négligée. Pour évaluer l'intégrale sur les surfaces A et B , Kirchhoff a fait deux suppositions, en gardant à l'esprit que les valeurs sur A et B ne sont jamais connues exactement. Il a supposé qu'à n'importe quel endroit de A , sauf aux bords de l'ouverture de l'écran, U et $\frac{\partial U}{\partial n}$ ne différeront pas des valeurs obtenues sans écran. Pour B ces quantités seront proches de 0 :

- 1) Sur la surface B : $U=0$ et $\frac{\partial U}{\partial n}=0$
- 2) Sur la surface A : $U=U^{(i)}$ et $\frac{\partial U}{\partial n}=\frac{\partial U^{(i)}}{\partial n}$

Dans ce cas l'intégrale de Kirchhoff se réduit à une intégration sur la surface A :

$$U(P)=\frac{1}{4\pi}\iint_A\left[U\frac{\partial}{\partial n}\left(\frac{1}{s}e^{jks}\right)-\left(\frac{1}{s}e^{jks}\right)\frac{\partial U}{\partial n}\right]dS \quad (C.8)$$

Si on considère que l'ouverture est illuminée par une onde sphérique, $U^{(i)}$ peut s'écrire : $U^{(i)} = \frac{\xi}{r} e^{jk r}$ (ξ est une constante) et sa dérivée $\frac{\partial U^{(i)}}{\partial n} = \xi \left(jk - \frac{1}{r} \right) e^{jk r} \cos(\vec{n}, \vec{r})$.

Si ces expressions sont reportées dans l'intégrale (équation C.8), nous obtiendrons l'intégrale de diffraction de Fresnel Kirchhoff :

$$U(P) = \frac{\xi}{j\lambda} \iint_A \frac{e^{jk(r+s)}}{rs} \left[\frac{\cos(\vec{n}, \vec{r}) - \cos(\vec{n}, \vec{s})}{2} \right] dS \quad (C.9)$$

Dans le cas particulier d'une onde normale plane incidente, $U(P)$ est simplement :

$$U(P) = \frac{\xi}{j\lambda} \iint_A \frac{e^{jk(r+s)}}{rs} \left[\frac{1 + \cos(\theta)}{2} \right] dS \quad (C.10)$$

θ remplace l'angle formé par les vecteurs $\vec{n}$ et $\vec{r}$.

La théorie de Fresnel Kirchhoff est largement employée, elle rend compte avec précision des constatations expérimentalement [109-110]

2 Diffraction de Fraunhofer

Dans ce paragraphe, nous allons étudier plus en détail l'intégrale de Kirchhoff définie précédemment (équation C.9).

Si les distances r (P_0 -écran) et s (écran- P) sont grandes comparées aux dimensions de l'ouverture alors le terme $[\cos(\vec{n}, \vec{r}) - \cos(\vec{n}, \vec{s})]$ ne va pas beaucoup varier sur l'ouverture. De plus on suppose que pour n'importe quel point O de l'ouverture, l'angle formé par les lignes (P_0O) et (OP) sera faible. Le terme $[\cos(\vec{n}, \vec{r}) - \cos(\vec{n}, \vec{s})]$ va donc être remplacé par $2\cos(\varphi)$ où φ est l'angle entre (P_0P) et la normale à l'écran. Le terme $\frac{1}{rs}$ quant à lui va être remplacé par $\frac{1}{r's'}$ où r' et s' sont respectivement les distances P_0O et OP . Dans ces conditions l'intégrale s'écrit :

$$U(P) \cong \frac{\xi}{j\lambda} \frac{\cos(\varphi)}{r's'} \iint_A e^{jk(r+s)} dS \quad (C.11)$$

Nous prenons le repère d'origine O (voir figure Annexe.2). Dans ce repère, les coordonnées de P_0 sont (x_0, y_0, z_0) , celles de P sont (x, y, z) et les coordonnées d'un point Q de l'ouverture sont $(\chi, \psi, 0)$.

Dans ce cas :

$$\begin{cases} r^2 = (x_0 - \chi)^2 + (y_0 - \psi)^2 + z_0^2 \\ s^2 = (x - \chi)^2 + (y - \psi)^2 + z^2 \end{cases} \quad (C.12)$$

et

$$\begin{cases} r'^2 = x_0^2 + y_0^2 + z_0^2 \\ s'^2 = x^2 + y^2 + z^2 \end{cases} \quad (C.13)$$

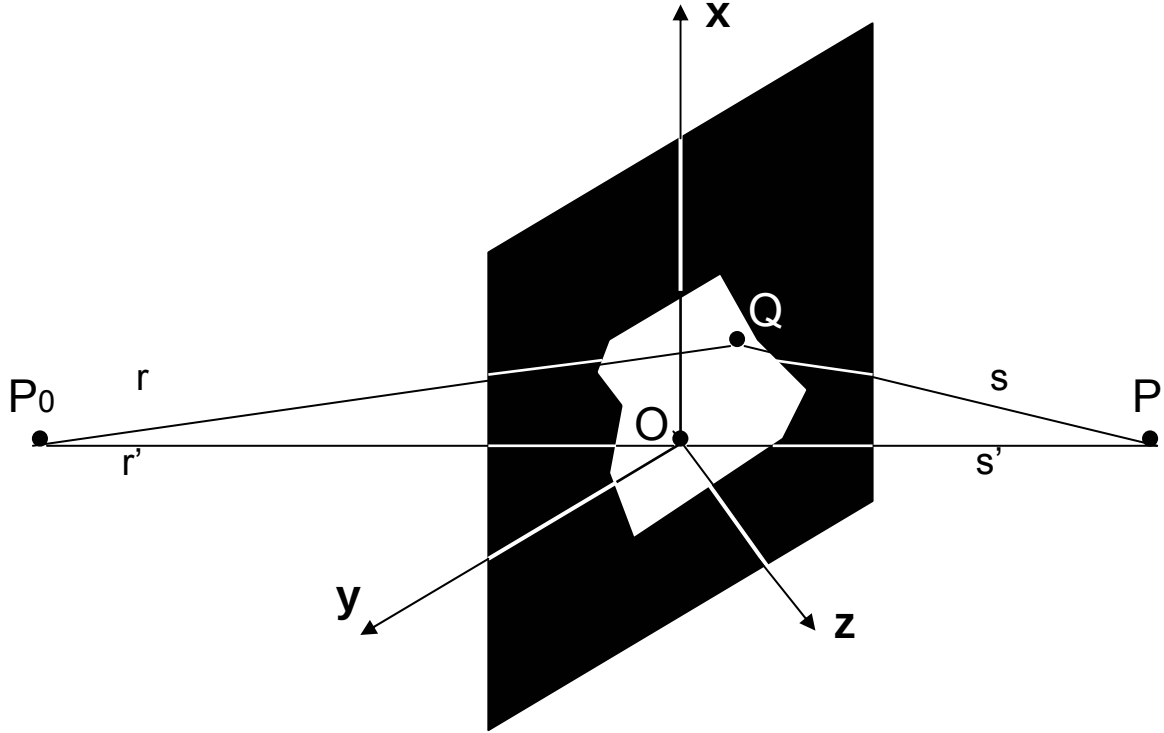


Figure Annexe.2 : Diffraction d'une ouverture sur un écran. Nous prenons le repère d'origine O. Dans ce repère, les coordonnées de P₀ sont (x₀, y₀, z₀), celles de P sont (x, y, z) et les coordonnées d'un point Q de l'ouverture sont (χ, ψ, 0).

En injectant l'équation (C.13) dans l'équation (C.12) on obtient le système d'équation suivant :

$$\begin{cases} r^2 = r'^2 + \chi^2 + \psi^2 - 2(x_0 \chi + y_0 \psi) \\ s^2 = s'^2 + \chi^2 + \psi^2 - 2(x \chi + y \psi) \end{cases} \quad (C.14)$$

Nous avons fait l'hypothèse que les dimensions de l'ouverture sont petites devant r' et s', nous pouvons dans ce cas développer r et s en série :

$$\begin{cases} r \cong r' - \frac{x_0 \chi + y_0 \psi}{r'} + \frac{\chi^2 + \psi^2}{2r'} - \frac{(x_0 \chi + y_0 \psi)^2}{2r'^3} - \dots \\ s \cong s' - \frac{x \chi + y \psi}{s'} + \frac{\chi^2 + \psi^2}{2s'} - \frac{(x \chi + y \psi)^2}{2s'^3} - \dots \end{cases} \quad (C.15)$$

Maintenant nous remplaçons r et s dans l'intégrale (C.11) :

$$U(P) \cong \frac{\xi}{j\lambda} \frac{\cos(\varphi)}{r's'} e^{jk(r'+s')} \iint_A e^{jkf(\chi,\psi)} d\chi d\psi \quad (C.16)$$

$$\text{où } f(\chi,\psi) = -\frac{x_0 \chi + y_0 \psi}{r'} + \frac{\chi^2 + \psi^2}{2r'} - \frac{x \chi + y \psi}{s'} + \frac{\chi^2 + \psi^2}{2s'} + \dots$$

Nous venons de voir que l'étude de la perturbation de la lumière au point P revient à évaluer l'intégrale, équation (C.16). Cette évaluation peut être simplifiée si les termes quadratiques et d'ordre supérieur de χ et ψ peuvent être négligés dans la fonction f de l'intégrale (équation (C.16)). Dans ce cas précis on parle de diffraction de Fraunhofer, la source et le lieu d'observation sont loin de l'ouverture (r' et s' tendent vers l'infini).

Cette théorie va nous être utile dans le dernier chapitre. Elle va nous donner les éléments de compréhension pour l'optique diffractive et ses applications en microscopie confocale.

Publications

Spatial fluorescence cross-correlation spectroscopy

Rodolphe Jaffiol, Yoann Blancquaert, Antoine Delon, and Jacques Derouard

We present an alternative method for diffusion measurements of fluorescent species in solution by use of confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy techniques. It consists of making a time and spatial dual correlation in which one detects the fluorescence signals from two nearby separate confocal volumes and cross correlates them. To improve the spatial discrimination between the two confocal volumes we propose filtering of fluorescence photocounts by rejecting the fluorescence background, which corresponds to particles located far from the center of the detection volumes. © 2006 Optical Society of America

OCIS codes: 170.2520, 170.6280, 300.2530.

1. Introduction

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a useful method for measuring and studying dynamic biomolecules in living cells. An excellent introduction to FCS applications in biophysics was given in a recent book edited by Rigler and Elson.¹ Most of the experiments described were carried out in solution with a confocal microscope to decrease the probing volume as much as possible. The most attractive feature of a confocal scheme is its ability to have axial selection. This axial selection makes it possible to decrease the spatial extent of the observation volume to the diffraction limit. In practice, the usual limited confocal volume is smaller than a femtoliter and can contain a small number of molecules if the dilution of the fluorescence species is significantly weak (typically of the order of nanomolar concentration). This approach, which combines confocal microscopy and a diluted sample, is essential if we intend to make local FCS analyses, for example, at the single-molecule level.^{2–4}

FCS is based on the temporal autocorrelation of the collected fluorescence signal $F(t)$ that is emitted from dye molecules diffusing or flowing through a confocal volume^{5,6}:

$$G_{AC}(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} + 1, \quad (1)$$

where $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ is the fluctuation in the measured fluorescence $F(t)$ from the average value $\langle F(t) \rangle$. In most experimental cases, $F(t)$ is stationary, and the time average of $F(t)$ can be denoted $\langle F \rangle$. The rate and the shape of the $G_{AC}(\tau)$ decay are related to the physical or chemical processes that are the source of the fluorescence fluctuations. Therefore, for molecules in solution, the analytical form of the autocorrelation function depends on these processes, always including the Brownian motion of the particles and the molecular dynamics as singlet–triplet interaction or conformational changes. At some point, one must consider that chemical reactions can occur in the sample volume as binding and unbinding or photophysics reactions as fluorescence quenching. Thus an analysis of autocorrelation $G_{AC}(\tau)$ becomes particularly complex as different processes coexist in the probing volume. An additional limitation of the standard FCS technique is its inefficiency in discriminating two species with nearby diffusion constants (less than a factor of 2).⁷ With respect to this problem, a dual-color cross correlation was developed to measure the interaction between two molecules.^{8–10} Spatial cross-correlation spectroscopy^{11–14} (sFCCS) is based on a time and spatial dual correlation, in which the fluorescence signals are detected from two separate volumes; it usually implies two shifted laser spots. Until now the applications of such a technique were rare and concerned only flow measurement in microfluidic devices but could be extended to permeability through cellular compartments or active transport within living cells. However, sFCCS can

When this research was conducted, the authors were with the Laboratoire de Spectrometrie Physique, UMR CNRS 5588, Université Joseph Fourier, B.P. 87, 38402 Saint Martin d'Heres cedex, France. R. Jaffiol (rodolphe.jaffiol@utt.fr) is now with the Laboratoire de Nanotechnologie et d'Instrumentation Optique, Université de Technologie de Troyes, B.P. 2060, 10010 Troyes cedex, France.

Received 20 July 2005; accepted 13 September 2005.

0003-6935/06/061225-11\$15.00/0

© 2006 Optical Society of America

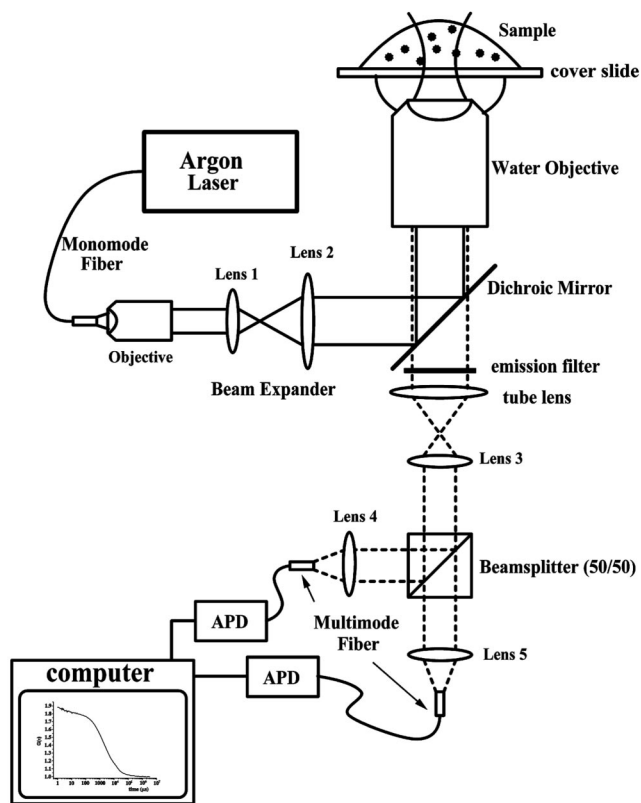


Fig. 1. Experimental setup for sFCCS.

also be used for passive transport, i.e., the translational diffusion of fluorescence species in solution. Indeed, with a spatial cross-correlation approach we eliminate all physical or chemical processes that occur in a single detection volume, which considerably simplifies the analytical form of the fit function (one must observe a strong cross correlation only for particles traveling from one detection volume to the other). Our purpose in this paper is to confirm the utility of sFCCS in free diffusion analysis by use of a simplified illumination laser scheme (only one laser spot) combined with filtering of the background photocount to improve the discrimination between the two volumes. Corresponding theoretical approaches are presented.

The paper is organized as follows: in Section 1 we outline the optical setup for sFCCS and the detection geometry. Then in Section 2 we introduce a theoretical concept with which to understand sFCCS observation. Finally, some cross-correlation curves are presented and discussed.

2. Optical Device for sFCCS Investigation

Our optical device is a home-built system dedicated to FCS measurement based on the association of a standard backscattering laser confocal microscope (an inverted microscope) and two input homemade correlators. A schematic diagram of the experiment is presented in Fig. 1. This setup is designed for probing various small volumes by controlling the spatial ex-

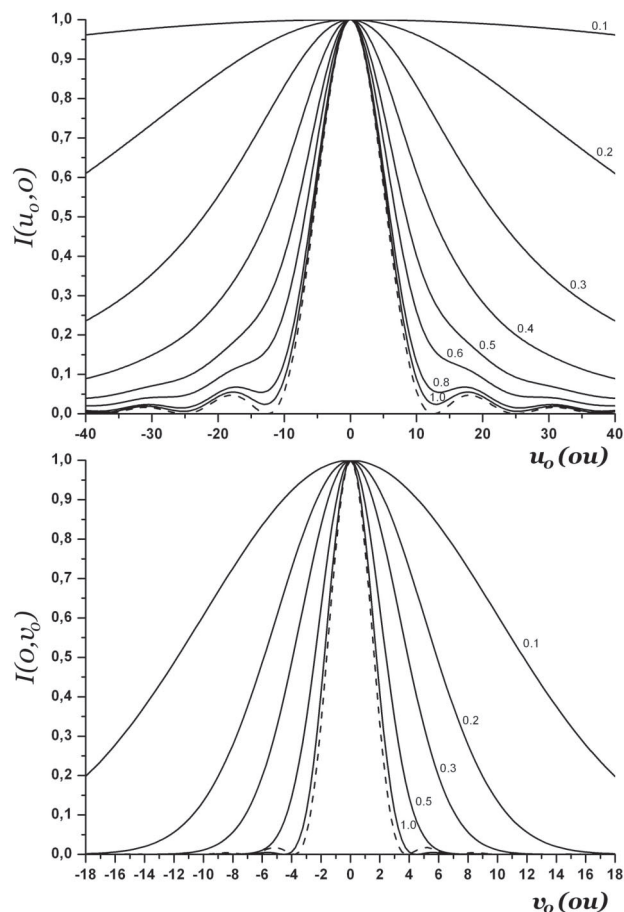


Fig. 2. Evolution of illumination $I(u_o, 0)$ and $I(0, v_o)$ along the optical axis and in the lateral direction, respectively. All curves are normalized to unity. The maximum of illumination is 1.0 at the geometrical focal point ($u_o = 0, v_o = 0$). The value of underfilling fraction β is given for each curve. The dashed curves correspond to incident plane waves (large β). ou, optical units.

tent of the laser beam at the entrance pupil of the objective and the size of the pinhole detector.

The optical geometry of illumination is controlled by a beam expander: by adjusting the focal length of lenses 1 and 2 (Fig. 1) we can modulate the radius of the Gaussian illumination profile at the entrance pupil of the microscope objective (a water objective; $60\times$; NA = 1.2). In this way it becomes possible to elongate and enlarge the illumination profile at the focus of the objective by decreasing the Gaussian beam radius.¹⁵ To address a value of the filling back-aperture objective, we introduce the underfilling fraction $\beta = \omega/R$, which is defined as the ratio of beam radius ω to entrance pupil radius R (ω is the $1/e^2$ intensity radius of the collimated incident Gaussian beam). For $\beta \gg 1$ the backaperture is overfilled, and for $\beta < 1$ the backaperture is underfilled. Figure 2 presents the evolution of the laser illumination, in the focal plane and along the optical axis, for various values of β . Details of these calculations are given in Section 3 below.

The fluorescence emission is collected through the

same objective, after which we use multimode optical fibers as point detectors for confocal detection.¹⁶ The optical fibers have two important advantages: First, the fiber core offers a natural small circular aperture. Second, it allows us to send the fluorescence signal on both photon detectors. These photon detectors are two avalanche photodiodes (APDs; Fig. 1) with high quantum efficiency in the visible range and a low dark count rate (≈ 100 counts/s). In our experiment we chose multimode fibers with core diameters of $100\text{ }\mu\text{m}$ according to total magnification M of our microscope ($M = 180, 60\times$ for the water objective and $3\times$ for an additional optical imaging part that comprises lenses 3, 4, and 5 in Fig. 1). These fibers are mounted onto a three-axis translation stage, which provides micrometer displacement along the optical axis (z) and in the plane perpendicular to the optical axis (x, y). Finally, a homemade external acquisition card (running in a single-photon counting mode) is connected to the APDs. This acquisition module (Phonos) is capable of distinguishing the photon counts with a resolution time better than the APDs' dead time. A computational multi-tau procedure calculates the autocorrelation and cross-correlation functions with a quasi-geometrical progression of the lag time from $0.2\text{ }\mu\text{s}$ to $\sim 3.3\text{ s}$.¹⁷ To perform these calculations efficiently we increased the binning time of the raw data from 50 to 100, 200 ns, and more.

Unlike the first experiments of Brinkmeier *et al.*¹¹ and Dittrich and Schwille,¹² we perform sFCCS with a single expanded focal beam and two close, small detection volumes, as described schematically in Fig. 3. These two equal detection volumes, which can be reduced to a diffraction-limited size, are represented by two ellipsoids in Fig. 3. To explore sFCCS, we shifted both detection volumes in the focal plane by lateral distance a . Two fluorescence signals, F_1 and F_2 , come from two small volumes, V_1 and V_2 . $(\mathbf{r}, z)$ and $(\mathbf{r}', z')$ are the spatial positions of V_1 and V_2 , respectively, in the focal spot. In this case the spatial cross-correlation function can be written as follows:

$$G_{\text{CC}}(\tau) = \frac{\langle F_1(\mathbf{r}, z, t) F_2(\mathbf{r}', z', t + \tau) \rangle}{\langle F_1(\mathbf{r}, z, t) \rangle \langle F_2(\mathbf{r}', z', t) \rangle} = \frac{\langle \delta F_1(\mathbf{r}, z, t) \delta F_2(\mathbf{r}', z', t + \tau) \rangle}{\langle F_1(\mathbf{r}, z) \rangle \langle F_2(\mathbf{r}', z') \rangle} + 1. \quad (2)$$

δF_1 and δF_2 always denote the deviations of photocounts from their mean value.

3. Theoretical Background

A. General Formalism of Fluorescence Confocal Imaging

It is commonly assumed that the observation volume in FCS is a Gaussian in three dimensions that decays to $\exp(-2)$ at ω_0 in the lateral direction and at z_0 along the optical axis. For this Gaussian profile the autocorrelation function (and also the cross-correlation function) can be solved easily analytically. For trans-

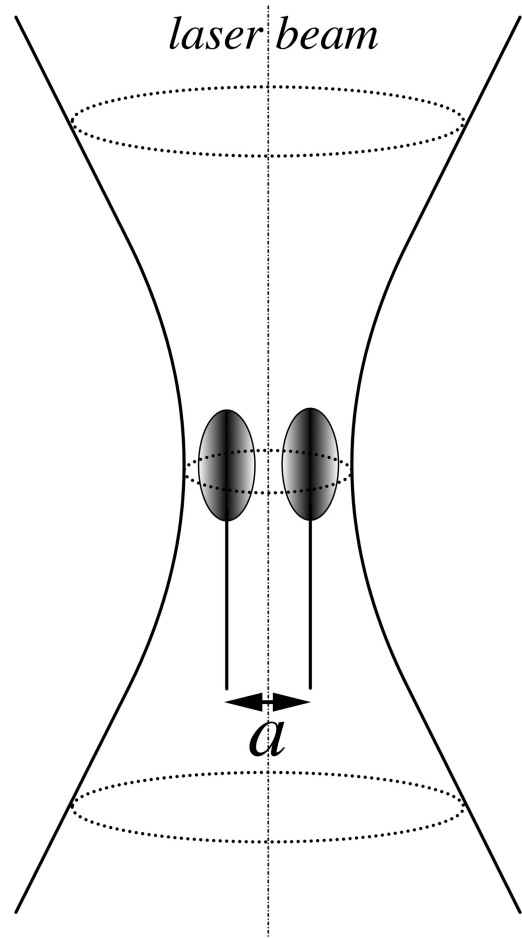


Fig. 3. Optical geometry for sFCCS; a is the lateral shift between the two detection volumes, which are approximated by two ellipsoids in this representation.

lational diffusion, Aragon and Pecora have given the form $G_{\text{AC}}(\tau)$.¹⁸ It appears that the amplitude of the correlation function is inversely proportional to the average number of fluorescent particles in the observation volume and that the $G_{\text{AC}}(\tau)$ decay time is derived from ω_0 , z_0 and translational diffusion coefficient D . Therefore FCS and also sFCCS measurements require small sampling volumes to ensure a small number of particles and hence a high-amplitude correlation function. However, it should be noted that this often-used approximate description of the observation volume is verified for just one experimental illumination and detection scheme, i.e., when the entrance pupil of the objective is overfilled ($\beta \approx 1$) with an appropriate conjugate pinhole (the size of the detector pinhole must be accurately adapted to the laser's diffraction-limited Airy spot¹⁹). Our sFCCS optical illumination-detection scheme is different. We chose to expand the illumination as much as possible to irradiate simultaneously the fluorescence molecules that are diffusing through the two nearby small detection volumes, as shown in Fig. 3. So, here we consider the way to describe our specific sFCCS observation volume.

Although our confocal microscope uses several lenses for fluorescence imaging (Fig. 1), we can re-

duce this imaging optical arrangement to a single objective lens.¹⁹ The fluorescence photocounts recorded just after the pinhole, $F(t)$, can be written as a fraction of the total signal in the detector plane, denoted $f_i(\mathbf{r}_i, z_i, t)$ [Eq. (3)]. $P(\mathbf{r}_i)$ is the pupil function of the pinhole. Moreover, it is convenient to describe $f_i(\mathbf{r}_i, z_i, t)$ as an image of the sample given by the objective lens. In the scalar treatment of incoherent image formation, the image may be written as the convolution of the fluorescence intensity in the sample with point-spread function PSF of the objective lens [Eq. (3)].²⁰ We use the subscript o for the signal in the sample (i.e., object space) and the subscript i for the signal in the pinhole (i.e., image space):

$$\begin{aligned} F(t) &= \int_{D_i} d\Omega_i P(\mathbf{r}_i) f_i(\mathbf{r}_i, z_i, t) \\ &= \int_{D_i} d\Omega_i P(\mathbf{r}_i) (f_o * \text{PSF})(\mathbf{r}_i, z_i, t), \end{aligned} \quad (3)$$

where $*$ denotes the convolution operation and $d\Omega_i$ is the cylindrical volume element. In the usual FCS experiments the fluorescence signal is not saturated and is directly proportional to the excitation intensity and the time-dependent concentration of the fluorescence species [assuming that the laser excitation profile in the sample is $I(\mathbf{r}_o, z_o)$]:

$$f_o(\mathbf{r}_o, z_o, t) = \kappa I(\mathbf{r}_o, z_o) C(\mathbf{r}_o, z_o, t), \quad (4)$$

where κ includes some constant such as the quantum yield of the fluorophore, the absorption cross section, or the collection efficiency of the microscope. The integral of Eq. (3) can be rewritten to exhibit, as previously described by Qian and Elson,²¹ the observation volume $W(\mathbf{r}_o, z_o)$, that is, the product of collection efficiency function $\text{cef}(\mathbf{r}_o, z_o)$ and the excitation profile. This gives

$$\begin{aligned} F(t) &= \kappa \int_{S_o} d\Omega_o I(\mathbf{r}_o, z_o) C(\mathbf{r}_o, z_o, t) \text{cef}(\mathbf{r}_o, z_o) \\ &= \kappa \int_{S_o} d\Omega_o W(\mathbf{r}_o, z_o) C(\mathbf{r}_o, z_o, t), \end{aligned} \quad (5)$$

$$\text{cef}(\mathbf{r}_o, z_o) = \int_{D_i} d\Omega_i P(\mathbf{r}_i) \text{PSF}(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_o, z_i - z_o). \quad (6)$$

It appears that the observation volume is defined not only by the laser illumination profile $I(\mathbf{r}_o, z_o)$ but also by the collection profile factor $\text{cef}(\mathbf{r}_o, z_o)$, which results from the properties of the objective lens (by means of the PSF) and the confocal detector size (by means of the pupil function P).

B. Laser Illumination and Collection Efficiency Function

Throughout the literature, either of two popular descriptions of the focus profile obtained with a microscope objective has been used. The first one, presented a long time ago by Born and Wolf,²² gives in a scalar approach the distribution of light in the region of focus for an incident plane wave. This focusing model is often used to simulate confocal systems in the paraxial approximation.¹⁹ The second one, proposed by Richards and Wolf a few years later, was dedicated to a vectorial description by use of a quasi-geometrical decomposition (they considered not the diffraction of a converging spherical wave toward the geometrical focal point as in the scalar model but the framework of a converging plane wave).²³ This model is not limited to paraxial rays and gives a good description of the focusing at a high aperture (typically with a 1.3–1.45 NA oil-immersion objective).^{15,24} Note that, in both approaches, we consider the ideal case of an aplanatic imaging system in which no aberration occurs. It is assumed that the validity limit of the paraxial approximation is for objective NAs of ~ 0.8 in the air and ~ 1.08 in water. A recent measurement of the PSF for a 1.2 NA water-immersion objective has shown that the paraxial approach always gives a good description of the distribution of intensity in the neighborhood of the focus.²⁵ So, to simplify the numerical calculation, we opt for the Born–Wolf model, which is still quite good, and add a term to describe the Gaussian profile of the incident laser beam. Moreover, the scalar choice is tailored to explain sFCCS experiments performed in solution. Indeed, with the sFCCS method we consider only the motion, i.e., the diffusion of the fluorescence species, and not in a first approximation the polarization effect related to the molecular dipole orientation. Thus it appears that a vectorial model of the illumination is not necessary for a basic quantitative description to be presented.

Let us consider the cylindrical dimensionless optical units u and v that correspond to the axial and lateral coordinates, respectively, of our model. In image space and object space we define

$$\begin{aligned} u_o &= \frac{8\pi}{\lambda} n \left(\sin^2 \frac{\theta}{2} \right) z_o, & u_i &= \frac{8\pi}{\lambda} n \left(\sin^2 \frac{\theta}{2} \right) \frac{z_i}{M}, \\ \mathbf{v}_o &= \frac{2\pi}{\lambda} n (\sin \theta) \mathbf{r}_o, & \mathbf{v}_i &= \frac{2\pi}{\lambda} n (\sin \theta) \frac{\mathbf{r}_i}{M}, \end{aligned} \quad (7)$$

where $r = \sqrt{x^2 + y^2}$, M is the total magnification of the imaging system, λ is the wavelength of the light, and n is the sample's refractive index. The term $(n \sin \theta)$ corresponds to the NA of the objective. Within the framework of the paraxial approximation, for a converging spherical wave diffracted by a circular aperture the distribution of intensity near the focus, $I(u_o, v_o)$, is proportional to $|h(u_o, v_o)|^2$, where the function $h(u_o, v_o)$ is given by

$$h(u_o, v_o) = C_n \int_0^1 J_0(\rho v_o) \exp\left(-\frac{1}{2} i u_o \rho^2\right) \times \exp\left(-\frac{\rho^2}{\beta^2}\right) \rho d\rho, \quad (8)$$

where J_0 is the zero-order Bessel function and C_n is a normalized constant. The term $\exp[-(\rho^2/\beta^2)]$ allows us to describe the incident Gaussian laser beam (β is the underfilling fraction introduced in Section 1). The normalized intensity at the origin, $I(u_o, v_o)$, along the optical axis and in the focal plane are plotted in Fig. 2 for various values of β . The dashed curves correspond to the smaller diffraction-limited focus that is obtained with $\beta \gg 1$. In practice, for our own sFCCS experimental studies we need to enlarge the focal spot far enough as is obviously possible for a small value of β (Fig. 2).

For collection efficiency function $\text{cef}(u_o, v_o)$ we need to integrate the objective lens's PSF over the pinhole plane. The PSF is the image distribution of the intensity around the geometrical point ($u_i = 0, v_i = 0$) of a pointlike source (practically, a single small fluorescent particle) given by the objective lens. In our setup the same objective lens is used for illuminating and collecting the light, so the PSF involves a function $h'(u, v)$ that is similar to the illumination function [Eq. (8)]. Equation (6) can be written as follows:

$$\begin{aligned} \text{cef}(u_o, v_o) &= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_0^{+\infty} \int_0^{2\pi} v_i du_i dv_i d\varphi \\ &\quad \times |h'(u_i - u_o, \mathbf{v}_i - \mathbf{v}_o)|^2 \delta(u_i) \text{circ}_{s_i}(v_i) \\ &= \int_0^{s_i} \int_0^{2\pi} |h'[u_o, (v_i^2 + v_o^2 \\ &\quad - 2v_i v_o \cos \varphi)^{1/2}]|^2 v_i dv_i d\varphi, \end{aligned} \quad (9)$$

where s_i is the detector aperture's radius in dimensionless optical units (related to the radius of the optical fiber in the experimental setup). Note that the infinitesimal size of the pinhole along the optical axis is represented by a delta function at $u_i = 0$ and the pinhole aperture by the disk function $\text{circ}_{s_i}(v_i)$ ($\text{circ}_{s_i} = 1$ if $v_i \leq s_i$ and $\text{circ}_{s_i} = 0$ if $v_i > s_i$). Juskaitis and Wilson²⁵ presented a measurement of the PSF for a 1.2 NA water-immersion objective; the function $h'(u_o, v_o)$ can be given for an underfilling fraction $\beta = 1$. Indeed, their FWHM experimental value of the PSF is similar to our theoretical prediction for $\beta = 1$ (the theoretical value of the Airy disk's FWHM is 3.55 in optical units and the z -axis FWHM is 11.47 ou). Two numerical calculations of the cef function in the meridional plane in the neighborhood of the geometrical focal point are displayed on Fig. 4. The integration in Eq. (9) is numerically evaluated from $(u_o, v_o) = (-40, -40)$ in optical units to $(u_o, v_o) = (40,$

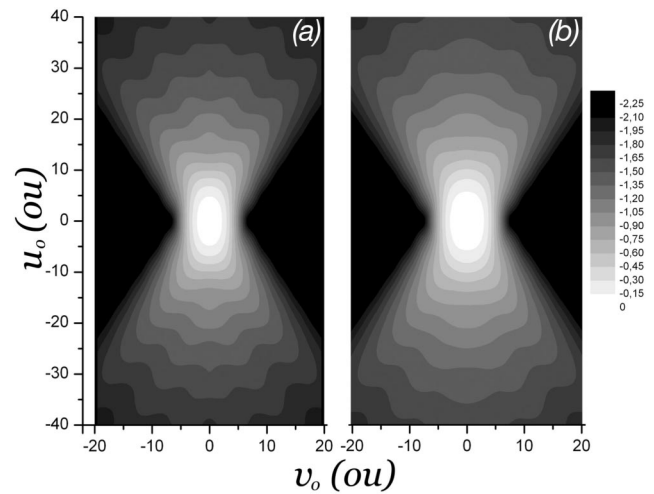


Fig. 4. $\text{cef}(u_o, v_o)$ pattern for two different pinhole radii: (a) $s_i = 3.2$ ou, (b) $s_i = 4.0$ ou. The amplitude is displayed on a log-base-10 gray-level scale. ou, optical units.

40) in optical units in steps of 0.5 ou and interpolated linearly. In our context it is more convenient to plot the cef function normalized at the origin ($u_o = 0, v_o = 0$).

C. Observation Volumes

Let us consider now the computational simulations of the observation volumes in FCS, $W(u_o, v_o) = I(u_o, v_o) \text{cef}(u_o, v_o)$ [Eq. (5)]. According to our experimental configuration, all $W(u_o, v_o)$ computational simulation profiles are evaluated for the same pinhole radius size, $s_i = 4$ ou [Fig. 4(b)].

Figure 5 presents several observation volume patterns with contour lines of equal intensity in a meridional plane for two cases of underfilling illumination and three pinhole positions. Here one can readily see an important modification of the $W(u_o, v_o)$ profile related to a change in backaperture underfilling illumination or pinhole displacement. For a strong focusing illumination, with underfilling fraction $\beta = 1$ [Fig. 5(a)], the numerically predicted profile seems to be similar to the typical three-dimensional ellipsoidal Gaussian approximate profile. When we enlarge and elongate the laser illumination $I(u_o, v_o)$ with a significantly smaller underfilling value ($\beta = 0.1$), Fig. 5(b) exhibits an important broadening and shape modification of the $W(u_o, v_o)$ meridional profile. This extended volume cannot be described with a Gaussian model. This non-Gaussian prediction of the observation volume according to a small value of β is in good agreement with the studies of Hess and Webb.¹⁵ However, the most significant prediction appears when we consider the effect of the lateral offset of the pinhole detector [Figs. 5(c) and 5(d)]. In a confocal imaging scheme, the lateral displacement of the pinhole from the optical axis is equivalent to a similar shift of the $\text{cef}(u_o, v_o)$ function along the v_o direction, of course according to the total magnification of the microscope. The cef pattern joined to a displaced pinhole can be easily evaluated

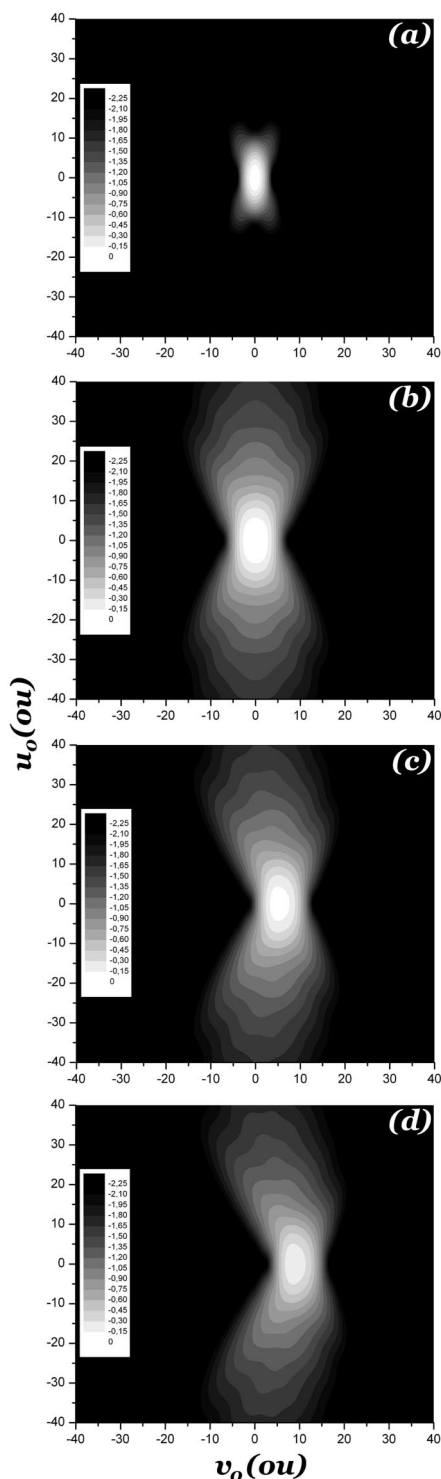


Fig. 5. Comparison of several normalized $W(u_o, v_o)$ profile images. All calculations used $\text{cef}(u_o, v_o)$ and illumination $I(u_o, v_o)$ as described in the text: (a) a filled illuminated configuration ($\beta = 1$), (b)–(d) an underfilled illuminated configuration ($\beta = 0.1$). For (c) and (d) we introduce lateral pinhole offsets of $v_o = 6$ ou and 10 ou, respectively. The amplitude is displayed in a log base $= 10$ gray-level scale. ou, optical units.

because for an aplanetic imaging optical system the cef functions at different locations in the sample plane differ by only a simple translation along the v_o

direction. So we present in Figs. 5(c) and 5(d) the detection volume profile $W(u_o, v_o)$ for two pinhole offsets from the optical axis, $v_i = 6, 10$ ou. In this calculation the cef profile is moved to the left along the v_o axis, whereas the illumination (with $\beta = 0.1$) is always aligned over the geometrical focal point. Figure 5(d) depicts the pinhole offset fingerprint on the $W(u_o, v_o)$ pattern. The axial symmetry clearly disappears. We shall see in Subsection 3.D below that this asymmetric pattern of the observation volume is an important factor in explaining the experimental $G_{CC}(\tau)$ curves.

D. Thresholding

As a single fluorescent particle enters and escapes from observation volume $W(u, v)$, the corresponding count rate increases, goes through a maximum, and then decreases. In our optical sFCCS configuration (Fig. 3) the $W(u, v)$ function cannot be described by a three-dimensional Gaussian volume (Fig. 5), and this expanded volume exhibits some longer wings that continue to spread out when the illumination underfilling fraction β decreases and the pinhole size increases. Huang *et al.* also recently showed for one-photon excitation that the actual $W(u, v)$ volume has longer wings than its three-dimensional Gaussian approximation, and the corresponding volume can exceed the Gaussian volume by as much as 50%.²⁶ As a consequence of this, a molecule moving in the wings of volume $W(u, v)$ will contribute to the low values of the fluorescent count rate. This suggests that it must be possible to shorten the wings of $W(u, v)$ by applying a threshold to the raw data: the higher the threshold level, the shorter the wings. So in this section we present the effect of this thresholding from a conceptual point of view.

First, when thresholding is applied, one expects the effective time of diffusion through volume $W(u, v)$ to decrease, as the wings are shortened. However, it is difficult to calculate this effect because it depends on the exact shape of the observation volume. Another consequence of thresholding is a decrease of the mean number of molecules, $\langle N \rangle$, in volume $W(u, v)$. To evaluate this effect roughly, we assume a Poissonian distribution of the number of molecules N in the observation volume, i.e., with variance $\langle \Delta N^2 \rangle = \langle (N - \langle N \rangle)^2 \rangle = \langle N \rangle$. Then, assuming that fluorescence intensity $F(t)$ is proportional to the number of molecules $N(t)$, we deduce that

$$\frac{\langle \Delta F^2 \rangle}{\langle F \rangle^2} = \frac{\langle \Delta N^2 \rangle}{\langle N \rangle^2} = \frac{1}{\langle N \rangle}. \quad (10)$$

If the threshold level F_T is low compared with the mean intensity $\langle F \rangle$, the variance of the intensity, $\langle \Delta F^2 \rangle$, is not modified, in contrast to the mean intensity that decreases by an amount F_T . Henceforth the relative variance becomes, after thresholding,

$$\frac{\langle \Delta F^2 \rangle}{\langle F - F_T \rangle^2} = \frac{\langle \Delta F^2 \rangle}{\langle F \rangle^2 [1 - (F_T / \langle F \rangle)]^2} = \frac{\langle \Delta F'^2 \rangle}{\langle F' \rangle^2}. \quad (11)$$

Following Eq. (11), the mean number of molecules after thresholding $\langle N' \rangle$ is therefore decreased to

$$\langle N' \rangle = \langle N \rangle \left(1 - \frac{F_T}{\langle F \rangle} \right)^2. \quad (12)$$

This equation is an approximation that is valid if the relative thresholding, $F_T / \langle F \rangle$, is much smaller than 1. In addition, it does not take into account photon shot noise. As a consequence, the fluorescence signal F must be replaced by photon count rate CR. To go beyond these limits we consider the Poissonian distribution of the number of molecules within the volume $W(u, v)$:

$$P_{\langle N \rangle}(N) = \frac{\langle N \rangle^N}{N!} \exp(-\langle N \rangle). \quad (13)$$

In addition, for a given number of molecules N , the number of photons k detected during a fixed time interval δt (smaller than the diffusion time) is also distributed according to a Poisson law, with mean value εN , where ε is the brightness²⁷:

$$P_{\varepsilon N}(k) = \frac{\langle \varepsilon N \rangle^k}{k!} \exp(-\varepsilon N). \quad (14)$$

The convolution of these two distributions [Eqs. (13) and (14)] provides a rough estimation of the distribution of photons, $P_{\langle N \rangle, \varepsilon}(k)$, that does not take into account the actual shape of observation volume $W(u, v)$ (Refs. 26, 28, and 29):

$$P_{\langle N \rangle, \varepsilon}(k) = \sum_{N=0}^{\infty} P_{\langle N \rangle}(N) P_{\varepsilon N}(k). \quad (15)$$

It is easy to check that the mean value $\langle k \rangle$ and the variance $\langle \Delta k^2 \rangle$ of the distribution verify:

$$\langle N \rangle = \frac{\langle k \rangle^2}{\langle \Delta k^2 \rangle - \langle k \rangle}. \quad (16)$$

Let CR_T be the thresholding frequency applied to the photon stream, the count rate of which is $\text{CR} = \langle k \rangle / \delta t$. The thresholding frequency corresponds to a threshold value of the number of photons counted during a time bin δt that is $k_T = \text{CR}_T \times \delta t$. Therefore the new distribution of photocounts after thresholding is given by

$$P_{\langle N' \rangle, \varepsilon'}(k' > 0) = P_{\langle N \rangle, \varepsilon}(k_T + k'), \quad (17)$$

$$P_{\langle N' \rangle, \varepsilon'}(k' = 0) = \sum_{k=0}^{k_T} P_{\langle N \rangle, \varepsilon}(k). \quad (18)$$

In other words, all the time intervals δt for which the number of photons is smaller than or equal to k_T contribute to the zero-photon class of the thresholded distribution, while the events with $k_T + 1$ photons contribute to the new class of one photon, and so on. Because of thresholded distribution $P_{\langle N' \rangle, \varepsilon'}(k')$, it is now possible to calculate the mean value $\langle k' \rangle$ and the variance $\langle \Delta k'^2 \rangle$ of the number of photons from which we derive the thresholded values of the count rate, CR' , and of the number of molecules, $\langle N' \rangle$:

$$\text{CR}' = \frac{\langle k' \rangle}{\delta t}, \quad (19)$$

$$\langle N' \rangle = \frac{\langle k' \rangle^2}{\langle \Delta k'^2 \rangle - \langle k' \rangle}. \quad (20)$$

This approach makes it possible to simulate the variation of the number of molecules $\langle N' \rangle$ and of count rate CR' versus threshold frequency level CR_T , to compare with the effect of thresholding on the experimental raw data. Note that, owing to the values of thresholding frequency CR_T (a few tens of kilohertz), and of bin time, δt (64 μs chosen to fit the number of molecules given by autocorrelation when no thresholding is applied), the values of k_T fall by a few units, implying important discretization effects.

E. Thresholding of the Raw Data

For thresholding of the raw data, a characteristic local count rate CR_i is attached to each photon event number i , according to time lapses $\Delta t_{i-1, i}$ and $\Delta t_{i, i+1}$ that separate this event from its two nearest neighbors:

$$\text{CR}_i = n_i / \left(\frac{\Delta t_{i-1, i} + \Delta t_{i, i+1}}{2} \right). \quad (21)$$

Here n_i is the number of photons detected during time bin number i (not to be confused with time interval δt). The thresholded number of photons, n_i' , is given by this condition according to threshold level CR_T :

$$\text{CR}_i \leq \text{CR}_T \Rightarrow n_i' = 0, \quad (22)$$

$$\text{CR}_i > \text{CR}_T \Rightarrow n_i' = n_i - \text{CR}_T \frac{\Delta t_{i-1, i} + \Delta t_{i, i+1}}{2}. \quad (23)$$

In practice, the CR_T value depends on the experimental fluorescence signal distribution. This operation is performed on the initial raw data, the binning time of which is 50 ns. Therefore each photon, or burst of photons, that is not deleted [Eq. (22)] is given a non-integral weight n_i' [Eq. (23)]. Delon *et al.* recently showed that giving nonintegral values to the photon numbers does not prevent autocorrelation or intensity fluctuation analysis from being performed.³⁰

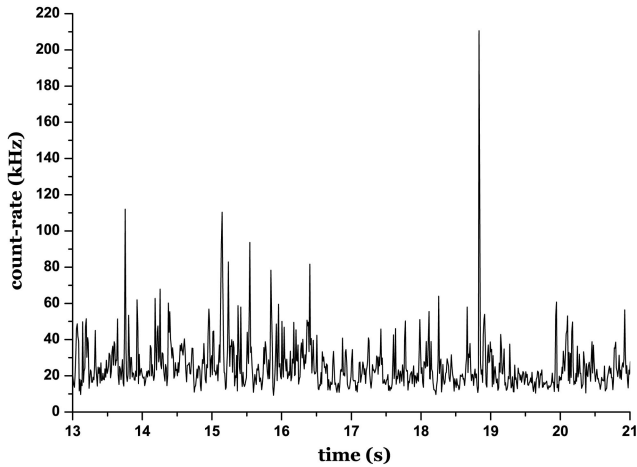


Fig. 6. Typical fluorescence photon counts recorded with one detector channel from a dilute solution of nanobeads.

4. Results

A. Sample

The fluorescent probes employed in the cross-correlation measurements were small nanobeads suspended in deionized water. We used commercial water-soluble beads manufactured by Molecular Probe. They had a mean diameter of 20 nm, with a size variation of 20%. One of the major advantages of fluorescent nanobeads is the ability of a single bead to emit an intense fluorescence signal with almost no photobleaching. The fluorescence signal of one 20 nm nanobead is equivalent to the signal produced by ≈ 180 fluorescein dye molecules; moreover, its emission spectrum is similar to that of fluorescein, with a maximum near 515 nm. The bead suspensions were prepared by dilution in ultrapure water. The approximate number of nanobeads was 10^{-1} – $10^{-2}/\mu\text{m}^3$, which guarantees a high dilution of the fluorescence particles in solution.

B. Autocorrelation of the Fluorescence Signal Recorded with the Two Shifted Detection Volumes

To demonstrate the sFCCS we adjusted the (x, y) positions of the two fiber cores to obtain a small lateral shift $a \approx 0.8 \mu\text{m}$ equivalent to ≈ 12 optical units (the uncertainty of this value is due to difficulty in relating the physical shift of two pinholes to shifts of the observation volumes). All the following results were obtained with this value of a . In this subsection we examine an autocorrelation trace recorded with one of the two shifted volumes $W(u, v)$.

A typical fluorescence photocount recording (with a time bin of 100 ms) is shown in Fig. 6. The laser excitation power used in these FCS experiments was ≈ 5 mW, measured at the entrance pupil of the objective, with an incoming laser beam that fills a small part of the pupil ($\beta = 0.1$). The background value of the fluorescence count rate was ~ 20 kHz, which corresponds to the diffusion of beads into the long wings of confocal volume $W(u, v)$, as shown in Fig. 5(c). We can also observe from Fig. 6 some sharp peaks that

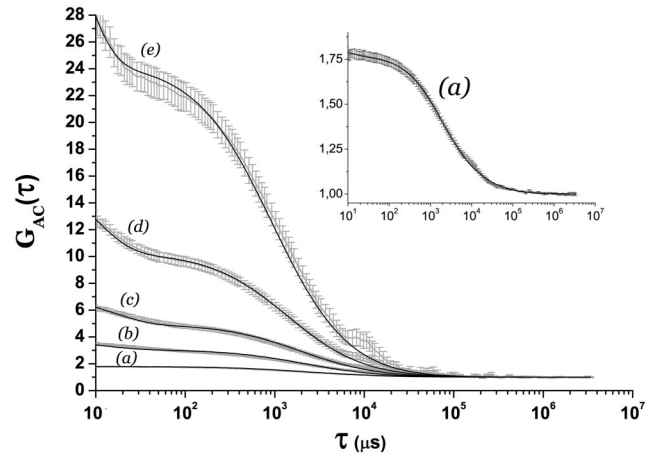


Fig. 7. Autocorrelation curves corresponding to the photon stream recorded with one of the two shifted pinholes as a function of thresholding frequency CR_T : (a) initial signal without thresholding; (b) $CR_T = 10$ kHz, (c) $CR_T = 20$ kHz, (d) $CR_T = 40$ kHz, (e) $CR_T = 80$ kHz. The error bars are the standard error of the mean calculated from five different acquisitions. The superimposed solid curves are the result of least-square fits. The inset magnifies the autocorrelation curve without thresholding.

correspond to a fast increase of the count rate (up to 200 kHz), which can obviously be attributed to the beads' diffusing through the center of the observation volume. With the thresholding procedure presented in Subsection 3.D, we propose to study just this class of nanobeads that produce peaks with count rate CR greater than the fluorescence background associated with the beads' moving in the wings.

Figure 7 shows the evolution of autocorrelation curve $G_{AC}(\tau)$ as a function of thresholding frequency CR_T . Each $G_{AC}(\tau)$ curve results from an average over five raw data recordings of 30 s. The autocorrelation curves were fitted with the standard formula used for translational diffusion in presence of a triplet dynamics, that is,¹

$$G_{AC}(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_d} \right)^{-1/2} \times \left[1 + \frac{T_{eq}}{1 - T_{eq}} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right) \right]. \quad (24)$$

$\langle N \rangle$ is the mean number of beads, with diffusion constant D in the confocal volume, T_{eq} is the fraction of these molecules in the triplet state, τ_T is the triplet lifetime, and $\tau_d = \omega_o^2/4D$ is the diffusion time through radial width ω_o of the observation volume (the axial width of which is $S\omega_o$). The diffusion time of the autocorrelation function measured with 20 nm beads is ~ 2 ms. We evaluated the diffusion constant of the beads by comparing their corresponding diffusion times with those of Rhodamine 6G dye molecules ($D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$) and found $19 \pm 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. This is consistent with the value deduced from the Stoke–Einstein relation at room temperature, $22 \mu\text{m}^2/\text{s}$. From this we can estimate the effective radius, $\omega_o =$

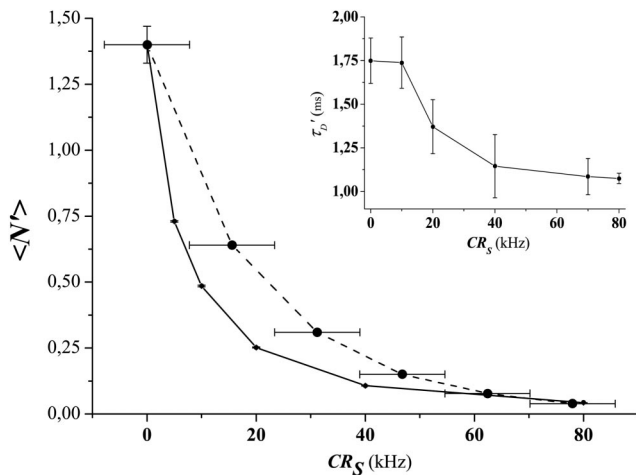


Fig. 8. Thresholded number of molecules $\langle N' \rangle$ as a function of thresholding frequency CR_T . Solid curve with small vertical error bars, values obtained by fitting the experimental autocorrelations curves (such as shown in Fig. 7). Dashed curve, result of the simulation that takes into account the discretization effect through the horizontal error bars. Inset, variation of the diffusion time obtained by fitting the experimental autocorrelation curves (such as shown in Fig. 7). For $\langle N' \rangle$ the error bars are sometimes smaller than the size of the data points.

$(4D\tau_d)^{1/2}$, of the observation volume to be $0.37 \pm 0.05 \mu\text{m}$. We can significantly decrease this observation volume by imposing a threshold on the raw data, as can be seen from Figs. 7 and 8: the number of molecules decreases from 1.4 to 0.04 as thresholding frequency CR_T increases from 0 to 80 kHz (the initial count rate is 23.2 kHz). Concurrently, the diffusion time decreases from ~ 2 ms to 1 ms. Note that to fit the experimental curve properly for low thresholding frequencies we had to add a slow component.¹ Because this slow component is artifactual and expresses the discrepancy from the Gaussian ideal volume, its relative weight decreases when the thresholding frequency increases. Another consequence of the non-Gaussian shape at low frequencies of thresholding is that it is impossible to fit the S value. When S can be fitted, the number of molecules (i.e., the observation volume) varies consistently with the diffusion time. We can also see from Fig. 8 that the agreement between the simulated number of molecules and the observed number is not good, which is not surprising when the roughness of the model is taken into account [Eqs. (19) and (20)]. Nevertheless, our simulations describe quite well the evolution of $\langle N' \rangle$ with respect to the thresholding. The horizontal error bars of the simulated curve represent the discretization effect that is due to the low value of the thresholding number of photons, k_T . The decrease of count rate CR' as the thresholding frequency increases can also be observed from Fig. 9, together with the increase of the count rate per molecule, CRM.

Quite obviously our alternative proposal, based on data processing, appears to be a simple method with which to keep the fluorescent beads from moving too far from the center of volume $W(u, v)$. In this way it

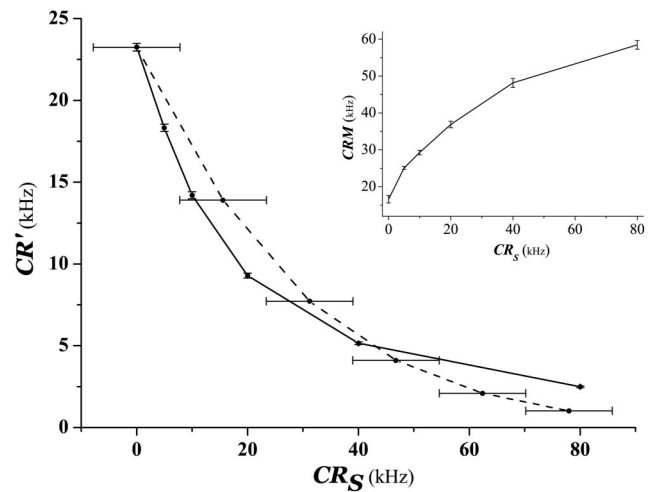


Fig. 9. Count rate CR' as a function of thresholding frequency CR_T . Solid curve with small vertical error bars, experimental data. Dashed curve with large horizontal error bars (discretization effect), result of the simulation. Inset, count rate per molecule (CRM) obtained by dividing experimental count rate CR' by the number of molecules $\langle N' \rangle$ (obtained by fitting the experimental autocorrelation curves).

becomes possible to reduce observation volume $W(u, v)$.

C. Spatial Fluorescence Cross-Correlation Measurements

The term $F_1(\mathbf{r}, z, t)$ in Eq. (2) describes the fluorescence signal emitted in one of the two observation volumes, denoted $W_1(\mathbf{r}, z)$. For solving Eq. (2), ideally we assume that only the photons produced by beads diffusing into volume $W_1(\mathbf{r}, z)$ are detected by detector 1, which gives the signal $F_1(\mathbf{r}, z, t)$, and so on. However, our calculation presented in Subsection 3.C showed that, if distance a between the two volumes remains small relative to ω_0 , an important overlap appears between the two shifted observation volumes, $W_1(\mathbf{r}, z)$ and $W_2(\mathbf{r}, z)$. Once more, Figs. 5(c) and 5(d) reveal that this overlap occurs along the long curved wings of these two volumes. So each observation volume is to a certain extent represented in both detector signals, $F_1(t)$ and $F_2(t)$, which produce autocorrelation background in the $G_{CC}(\tau)$ curves. This inherent problem of spatial cross correlation was also suggested in a recent paper by Dittrich and Schwille.¹² To overcome this problem, we employed a threshold of the raw data. Figure 10 shows the growth of the relative weight of the cross-correlation part relative to the autocorrelation background, with increasing values of thresholding frequency CR_T . It should be noted that each cross-correlation measurements generates two curves, which correspond to the cross correlation of fluorescence $F_1(t)$ from the first channel with signal $F_2(t)$ from the second channel, which can be denoted $G_{CC}^{1,2}(\tau)$ and $G_{CC}^{2,1}(\tau)$, respectively. So the cross-correlation curves presented in Figs. 10 and 11 are the mean values of both $G_{CC}^{1,2}(\tau)$ and $G_{CC}^{2,1}(\tau)$ and were obtained with the same raw data used previously for the autocorrelation analysis (Subsection 4.B).

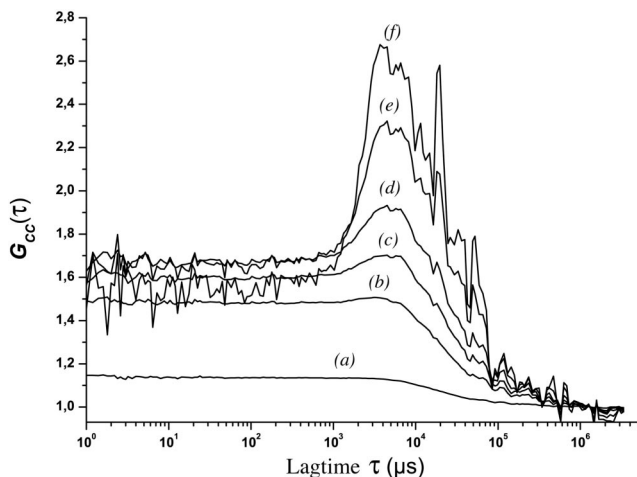


Fig. 10. Cross-correlation curves for several values of thresholding CR_T : (a) initial signal, (b) 20 kHz, (c) 40 kHz, (d) 60 kHz, (e) 120 kHz, (f) 200 kHz.

To perform a fit of cross-correlation curves $G_{CC}(\tau)$, we consider two similar Gaussian observation volumes with the same lateral and axial beam waists, ω_o and $S\omega_o$, separated by lateral distance a . Solving the hydrodynamic differential equation⁵ and then performing the integrations of normalized cross correlation [Eqs. (2) and (5)] result in a pure spatial cross-correlation analytical expression,^{11,12} which appears as the second term of the following expression:

$$G_{CC}(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \left[P \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{ac}} \right)^{-3/2} + (1 - P) \times \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_d} \right)^{-1/2} \times \exp \left\{ -\frac{a^2}{\omega_o^2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d} \right)^{-1} \right\} \right]. \quad (25)$$

The first term in Eq. (25) describes the autocorrelation background, and τ_{ac} is the effective diffusion time of the nanobeads in the wings of the observation volumes. To extract the fingerprint of the spatial cross correlation we introduce P to describe the fraction of this autocorrelation background. By applying this analytical form of function $G_{CC}(\tau)$ [Eq. (25)], we evaluated the experimental curve obtained with the higher threshold level of 200 kHz (Fig. 11). It is worth noting that the parameters S and ω_o that appear in Eq. (25) can also be determined from the autocorrelation curves obtained with the same threshold. For instance, we found $S = 3.2 \pm 0.5$ and $\omega_o = 0.25 \pm 0.04 \mu\text{m}$, to be compared with $S = 7 \pm 1$ and $\omega_o = 0.30 \pm 0.04 \mu\text{m}$ for 70 kHz thresholding. Taking into account the diffusion constant of the nanobeads ($D = 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$), we could fit the cross-correlation curve by fixing S and ω_o to the values given above, obtaining the free parameters P , τ_{ac} , $\langle N \rangle$, and a . As a result, a was found to be $0.83 \pm 0.02 \mu\text{m}$, a value that is quite stable for different thresholdings (this must be contrasted with the depen-

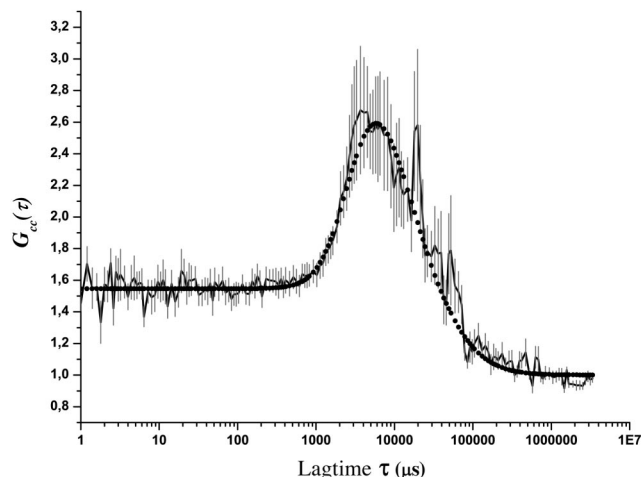


Fig. 11. Fitting results for the cross-correlation curve according to threshold level $CR_T = 200$ kHz. Solid curve, the experimental $G_{CC}(\tau)$ curve. Filled circles, the total fit according to Eq. (25).

dency of ω_o on thresholding frequency CR_T). The number of molecules is $\langle N \rangle = 0.020 \pm 0.002$, to be compared with that measured by autocorrelation in the same condition, $\langle N \rangle = 0.014 \pm 0.002$, while the two parameters P and τ_{ac} express the overlap of the non-Gaussian wings of the observation volume.

5. Discussion and Conclusions

We have developed a simplified spatial cross-correlation spectroscopy optical setup (only one laser beam) and a new numerical data procedure dedicated to diffusion measurements in solution. Among the advantages of the spatial cross-correlation method, the most important one is that it can probe only the transport processes (it eliminates those that occur in a single volume). The strong correlation observed in Fig. 11 near 3 ms is related to the particles traveling between the two observation volumes. Until now the applications of this spectroscopic technique concerned mostly active flow measurements. In this paper we have confirmed the ability of sFCCS to make free diffusion measurements, even though the probability that one particle will freely diffuse from one volume to the other is very weak. Consequently the amplitude range of the cross-correlation curve is still small and, to a large extent, one must also take into account the autocorrelation background related to the overlap between the two close observation volumes. Note that this residual autocorrelation had already been observed when using two laser spots, especially in the case of one-photon excitation. To overcome this major limitation, we proposed a numerical procedure based on filtering of the fluorescence photocounts. With thresholding of the fluorescence count rate we have shown that it is possible to improve the spatial discrimination between the two detection volumes, which clearly permits an enhancement of the cross correlation. From our simulations we have clearly shown that the major part of the overlap between the two nearby observation volumes occurs out of the focal plane and along the long curved wings. In our experimental configuration the overlap is more

significant than the one that appears when two focused beams are used (as first proposed by Brinkmeier *et al.*¹¹). Henceforth we always need to apply thresholding to improve the spatial discrimination between the two volumes. We believe that this numerical procedure will be a key step in all spatial cross-correlation analysis. The fundamental advantage of the present procedure is its changeability, which makes it possible to easily modify a conventional FCS setup to perform sFCCS. Indeed, many FCS systems already use two detectors, fiber connected to eliminate the so-called afterpulsing effect. So, to perform sFCCS, one just needs to introduce a small shift between the two fibers and simultaneously reduce as far as possible the diameter of the incoming laser beam. More generally, we suggest that it is high time, 30 years after the first pioneering FCS experiments, to think about designing new observation volumes. The common idea is that the smallest volume is best, because it leads to large fluorescence intensity fluctuations that are more easily distinguished from the background. This is certainly true because it allows one to observe media that are not (or cannot be) prepared with small concentrations of fluorescent molecules.³¹ However, there is another direction to think about, that of optimizing the shape and size of observation volumes according to the molecular processes that one is interested in. In this respect, two shifted volumes are well suited for active transport or permeability measurements. However, this configuration may also be interesting for passive transport, to get rid of short time processes. More sophisticated volumes can also be imagined and achieved because of the availability of new optical phase modulators. The ideal FCS microscope of the future would certainly be one with which the experimentalist can choose the various observation volumes that he or she wants to probe and correlate simultaneously.

References

1. R. Rigler and E. Elson, eds., *Fluorescence Correlation Spectroscopy, Theory and Applications* (Springer-Verlag, 2001).
2. R. Rigler, U. Mets, J. Windengren, and P. Kask, "Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion," *Eur. Biophys. J.* **22**, 169–175 (1993).
3. J. Mertz, C. Xu, and W. Webb, "Single molecule detection by two-photon excited fluorescence," *Opt. Lett.* **20**, 2532–2534 (1995).
4. L. Edman, "Theory of fluorescence correlation spectroscopy on single molecules," *J. Phys. Chem. A* **104**, 6165–6170 (2000).
5. N. L. Thompson, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Vol. 1 of *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz, ed. (Plenum, New York, 1991).
6. O. Krichinsky and G. Bonnet, "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications," *Rep. Prog. Phys.* **65**, 251–297 (2002).
7. U. Meseth, T. Wohland, R. Rigler, and H. Vogel, "Resolution of fluorescence correlation measurements," *Biophys. J.* **76**, 1619–1631 (1999).
8. K. Bacia, I. Majoul, and P. Schwill, "Probing the endocytic pathway in live cells using dual-color fluorescence cross-correlation analysis," *Biophys. J.* **83**, 1184–1193 (2002).
9. K. Bacia and P. Schwill, "A dynamics view of cellular processes by *in vivo* fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy," *Methods* **29**, 74–85 (2002).
10. A. Amediek, E. Haustein, D. Scherfeld, and P. Schwill, "Scanning dual-color cross-correlation analysis for dynamic co-localization studies of immobile molecules," *Single Mol.* **3**, 201–210 (2002).
11. M. Brinkmeier, K. Dörre, J. Stephan, and M. Eigen, "Two-beam cross-correlation: a method to characterize transport phenomena in Micrometer-sized structures," *Anal. Chem.* **71**, 609–616 (1999).
12. P. Dittrich and P. Schwill, "Spatial two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy for controlling molecular transport in microfluidic structures," *Anal. Chem.* **74**, 4472–4479 (2002).
13. H. Blom, M. Johansson, A.-S. Hedman, L. Lundberg, A. Hanning, S. Hard, and R. Rigler, "Parallel fluorescence detection of single biomolecules in microarrays by a diffractive-optical-designed 2×2 fan-out element," *Appl. Opt.* **41**, 3336–3342 (2002).
14. H. Blom, M. Johansson, M. Gosch, T. Sigmundsson, J. Holm, S. Hard, and R. Rigler, "Parallel flow measurements in microstructures by use of a multifocal 4×1 diffractive optical fan-out element," *Appl. Opt.* **41**, 6614–6620 (2002).
15. S. T. Hess and W. W. Webb, "Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy," *Biophys. J.* **83**, 2300–2317 (2002).
16. T. Wilson, "Fluorescence imaging modes in fibre-optic based confocal scanning microscopes," *Opt. Commun.* **96**, 133–141 (1993).
17. T. Wohland, R. Rigler, and H. Vogel, "The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy," *Biophys. J.* **80**, 2987–2999 (2001).
18. S. Aragon and R. Pecora, "Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics," *J. Chem. Phys.* **64**, 1791–1803 (1976).
19. T. Wilson and A. Carlini, "Size of the detector in confocal imaging systems," *Opt. Lett.* **12**, 227–229 (1987).
20. J. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, 2nd ed. (McGraw-Hill, 1996).
21. H. Qian and E. Elson, "Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy," *Appl. Opt.* **30**, 1185–1195 (1991).
22. M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*, 6th ed. (Cambridge U. Press, 1980).
23. B. Richards and E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system," *Proc. R. Soc. London Ser. A* **253**, 349–379 (1959).
24. C. Sheppard and H. Matthews, "Imaging in high-aperture optical systems," *J. Opt. Soc. Am. A* **4**, 1354–1360 (1987).
25. R. Juskaitis and T. Wilson, "The measurement of the amplitude point spread function of microscope objective lenses," *J. Microsc.* **189**, 8–11 (1998).
26. B. Huang, T. Perroud, and R. Zare, "Photon counting histogram: one-photon excitation," *Chem. Phys. Chem.* **5**, 1523–1531 (2004).
27. B. Saleh, *Photoelectron Statistics* (Springer-Verlag, 1978).
28. Y. Chen, J. Muller, P. So, and E. Gratton, "The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy," *Biophys. J.* **77**, 553–567 (1999).
29. J. Muller, "Cumulant analysis in fluorescence fluctuation spectroscopy," *Biophys. J.* **86**, 3981–3992 (2004).
30. A. Delon, Y. Usson, J. Derouard, T. Biben, and C. Souchier, "Photobleaching, mobility and compartmentalisation: inferences in fluorescence correlation spectroscopy," *J. Fluoresc.* **14**, 255–267 (2004).
31. L. Kastrop, H. Blom, C. Eggeling, and S. Hell, "Fluorescence fluctuation spectroscopy in subdiffraction focal volumes," *Phys. Rev. Lett.* **94**, 178104 (2005).

Spatial Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy between core and ring pinholes

Yoann Blancquaert^a, Antoine Delon^a, Jacques Derouard^a and Rodolphe Jaffiol^b

^aLaboratoire de Spectrométrie Physique (UMR CNRS-UJF 5588), Université Joseph Fourier, B.P. 87, 38402 Saint Martin d'Hères cedex, France;

^bLaboratoire de Nanotechnologie et d'Instrumentation Optique, Université de Technologie de Troyes, B.P. 2060, 10010 Troyes cedex, France

ABSTRACT

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) is an attractive method to measure molecular concentration, mobility parameters and chemical kinetics. However its ability to discriminate different diffusing species needs to be improved. Recently, we have proposed a simplified spatial Fluorescence cross Correlation Spectroscopy (sFCCS) method, allowing, with only one focused laser beam to obtain two confocal volumes spatially shifted. Now, we present a new sFCCS optical geometry where the two pinholes, a ring and core, are encapsulated one in the other. In this approach all physical and chemical processes that occur in a single volume, like singlet-triplet dynamics and photobleaching, can be eliminated; moreover, this new optical geometry optimises the collection of fluorescence. The first cross Correlation curves for Rhodamine 6G (Rh6G) in Ethanol are presented, in addition to the effect of the size of fluorescent particules (nano-beads, diameters : 20, 100 and 200 nm). The relative simplicity of the method leads us to propose sFCCS as an appropriate method for the determination of diffusion parameters of fluorophores in solution or cells. Nevertheless, progresses in the ingeniering of the optical Molecular Detection Efficiency volumes are highly desirable, in order to improve the discrimination between the cross correlated volumes.

Keywords: Fluorescence Correlation Spectroscopy, confocal microscopy, cross-correlation, diffusion

1. INTRODUCTION

The Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) can no longer be called a recent invention. Its principle consists in analysing, in terms of concentration and mobility, the fluorescence fluctuations emanating from a small number of particles. It has been invented in the early seventies by Madge, Elson and Webb, to study the thermodynamic fluctuations of a reacting system.¹ However its instrumental developments and its potential applications are still growing rapidly, mainly for life-sciences.^{2,3} Since the first experiments, FCS has benefited from two major technical improvements: the combination of highly sensitive detectors (avalanche photodiodes) and of the confocal detection scheme. Aside from this, the advances lie in an increasing computing power (that makes it possible real time calculations) and in better experimental methodology and data analysis.⁴ In fact, another direction of progress exists, that has been weakly investigated up to now. It concerns the shaping of one or more detection volumes.⁵⁻⁹ To our knowledge the first works in this area have been reported by,¹⁰⁻¹² who performed the cross-correlation between two observation volumes, to measure active transport. This technique will be, hereafter, named spatial Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy - sFCCS. Although velocity measurements are also doable by FCS,¹³⁻¹⁶ the use of two volumes, shifted along the direction of flow, is more efficient. The tailoring of a single observation volume is another direction of research, not very investigated.^{8,17} The most popular one is based on total internal reflection and is devoted to surface reaction studies.¹⁸ Another important motivation is the reduction of the 3D observation volume, that should permit to study more "comfortably" biological systems, for which the typical concentration of the molecules of interest is rather of the order

Corresponding authors:

A.Delon: E-mail: adelon@spectro.ujf-grenoble.fr

Y.Blancquaert: E-mail: yoann.blancquaert@ujf-grenoble.fr

of the mM, than the nM (10^{-9} M) (as required in standard FCS).^{8, 19–21}

In this paper, we present a new tailoring of detection volumes, the ultimate goal of which is to achieve a better precision of the diffusion constant measurement, in addition to a better discrimination between diffusion and other processes that bias the intensity fluctuations at shorter times (typically the singlet-triplet and the photo-bleaching dynamics). Our basic idea consists in cross-correlating the fluorescence signal of the molecules located within an inner volume, $F_{in}(t)$, with that of those located around in an annular (or doughnut shaped) outer volume, $F_{out}(t+\tau)$:

$$G_{CC}(\tau) = \frac{\langle F_{in}(t)F_{out}(t+\tau) \rangle}{\langle F_{in}(t) \rangle \langle F_{out}(t+\tau) \rangle} = 1 + \frac{\langle \delta F_{in}(t)\delta F_{out}(t+\tau) \rangle}{\langle \delta F_{in}(t) \rangle \langle \delta F_{out}(t+\tau) \rangle}, \quad (1)$$

where δF stands for the corresponding intensity fluctuations and $\langle \rangle$ represent a temporal average.

In an ideal experiment, the two volumes do not overlap so that the cross-correlation signal is nil at zero time lag, i.e. $G_{CC}(0) = 0$. This is because the molecules cannot be in two separated observation zones at the same time. In practice $G_{CC}(0)$ is different from 0 due to the overlap of the two volumes. Nevertheless, when the time lag goes on, $G_{CC}(\tau)$ reaches a maximum corresponding to the diffusion time between the two volumes. One may expect ultimately a better resolution and/or precision of the diffusion constant of the observed fluorescent species, because its determination relies on the measure of both the width and the position of the maximum of the correlation signal.

In the present work the two detection volumes are obtained by using, in the corresponding detection channels, a core pinhole and an annular one (see the next *Experimental set-up* section for the practical realisation). Note that in this first reported trial, only one gaussian laser beam, somewhat widened to illuminate both volumes, is focused in the fluorescent solution. In the *Theoretical approach* section we will present a simple 2D model for calculating the observation volumes. Then, in the *Experimental results* section we will present and discuss our experimental data within the framework of the theoretical predictions. Finally will come the *Conclusion*.

2. EXPERIMENTAL SETUP

2.1. General overview

The spatial Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy set-up is organised around an inverted microscope (IX70, Olympus) (see figure 1, left). A solid state laser is used to excite the fluorescence of the sample (488nm, KYMA, Melles Griot). The spatial extent of this laser beam (radius ω) at the entrance pupil of the objective is adjusted with the lenses 1 and 2. Then, the laser is directed into a water objective (60 $\times$, NA,1.2) via a dichroic mirror and focused in the sample. The fluorescence signal of the sample is collected with the same objective and passes through the dichroic mirror and the emission filter. The two multimode optical fibers, used as point detectors for confocal detection, are installed in an image plane of the microscope. Each multimode fiber is mounted onto a three axis translation stage which allows the best positioning of the two detectors. These fibers are placed behind two additional telescopes of magnifications $\times 3$ (lenses 3 and 4) and $\times 1.6$ (lenses 3 and 5).

The collected fluorescence light is then detected by two avalanche photodiodes (APDs) (PerkinElmer Optoelectronics), connected to a home-made acquisition module (PHONOS, Laboratoire de Spectrométrie Physique). Finally a computational multi-tau procedure calculates the cross-correlation functions. When necessary, we apply a thresholding procedure to reject the photons emitted too far in the wings of the detection volumes.⁹

2.2. Collection ring and core pinholes

As described previously, we use two multimode optical fibers as point detectors; one of them plays the role of a standard pinhole (core diameter : 100 μ m), while the other one has a ring shaped transmission function, with an inner diameter of 70 μ m and an outer one of 100 μ m.

The realization of the annular pinhole involves two steps, metallization and ablation :

i) Two factors play a role for the choice of the metallic coating, obtained by evaporation. The first concerns the penetration depth of the light into the metal. The second factor, more practical, implies a relative low melting temperature (for our evaporator). Aluminium has a quite small skin depth and can be easily evaporated, but its adhesion on silicon surface of the fiber's core is limited. Therefore, a first thin coating (3nm) of Nickel-Chromium

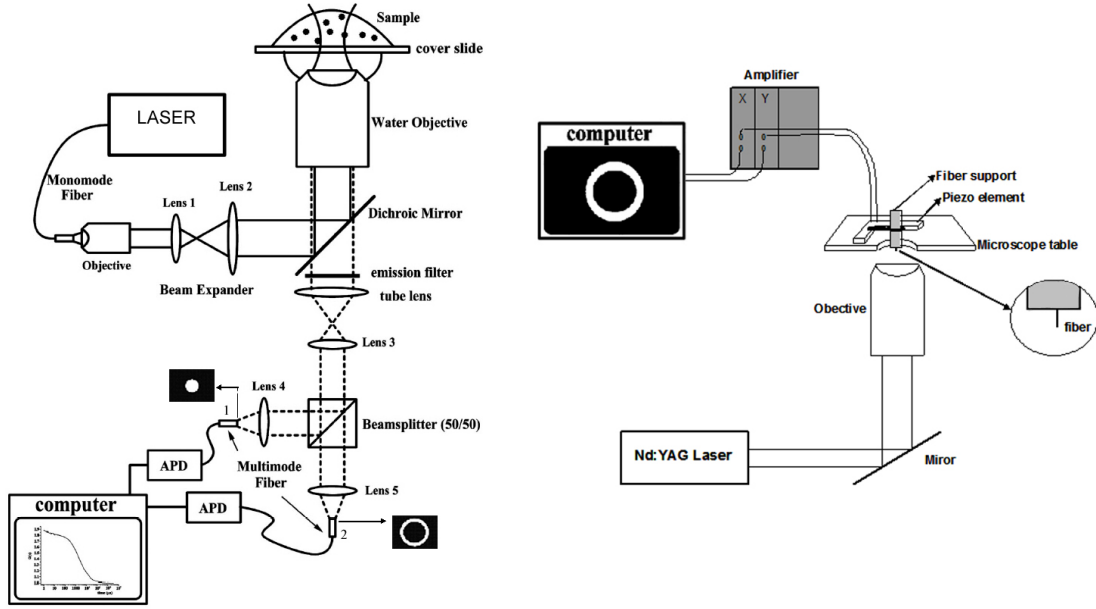


Figure 1. Experimental setup for spatial Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy(left) and for realizing the annular detection (right)

that adheres very well is deposited, followed by an Aluminum layer of about 180 nm thickness.

ii) The ablation of the annular zone is obtained by focusing, through a microscope objective (20 $\times$, NA,0.40), the beam of a pulsed laser (Nd:YAG) on the metallic layer (see figure 1 right). The scanning of the fiber is realised by a xy-piezoelectric device(Piezsystem Jena) controlled by a PC-card(PCI 6024-E, National Instrumental). The computer interface is programmed using Labview (National Instrument).

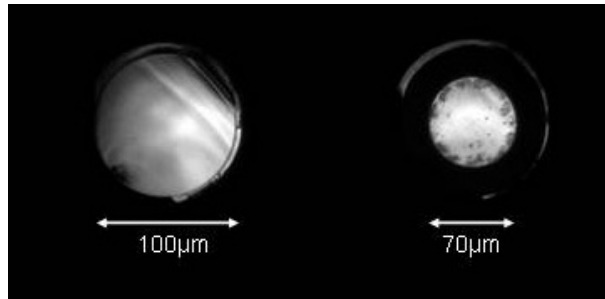


Figure 2. Entrance face of the annular fiber, before (left) and after (right) the laser ablation of the mataltic coating

Finally, in the object space, the diameter of the core detection volume is approximately $100/(60 \times 3) = 0.56 \mu\text{m}$, while the annular volume has inner and external diameters of $70/(60 \times 1.6) = 0.73 \mu\text{m}$ and $100/(60 \times 1.6) = 1.04 \mu\text{m}$.

2.3. Samples

Two kinds of samples have been studied : 20, 100 or 200 nm nanobeads (FluoSpheres, Invitrogen) and Rhodamine 6G (Invitrogen), diluted in ultra pure water or ethanol. The concentration of nanobeads is approximately $10^{-1} \sim 10^{-2}$ nM, while that of molecules is typically a few nM.

3. THEORETICAL APPROACH

The two detection volumes (the inner and the outer one), are characterized by the so-called Molecular Detection Efficiencies, $MDE_{in}(r,z)$ and $MDE_{out}(r,z)$, where r and z are the radial and axial coordinates in the object space. These functions are the product of the Collection Efficiency Functions of the two pinholes, $CEF_{in}(r,z)$ and $CEF_{out}(r,z)$, by the excitation profile, $I(r,z)$, of the single laser beam used in the present experiment. The Collection Efficiency Functions are shown in Fig. 3. They have been calculated by integrating the Point Spread Function (i.e. the image, by the objective, of a point-like source) over the pinhole detection sector (either central or annular).⁹ The amplitudes of the Collection Efficiency Functions have been normalised so that $CEF_{in}(0,0) = 1$. Under this condition the maximum value of CEF_{out} is smaller than 1, because the width (in the object space) of the annular pinhole is $0.16 \mu\text{m} = 1/2(1.04-0.73) \mu\text{m}$ (see the 2.2 section), compared to the diameter of the core pinhole ($0.56 \mu\text{m}$). Another interesting feature of the annular pinhole is that CEF_{out} exhibits, in addition to the expected radial maximum located around $r = 0.44 \mu\text{m}$ in the focal plane ($z = 0$), less intense maxima along the z axis ($r = 0$). However, although the actual Collection Efficiency Functions are 3D, hereafter we will restrict our study to a 2D approach, for sake of simplicity. In addition, we believe that the 2D cuts in the focal plane ($z = 0$), are the more relevant and solid features necessary to analyse the experimental data.

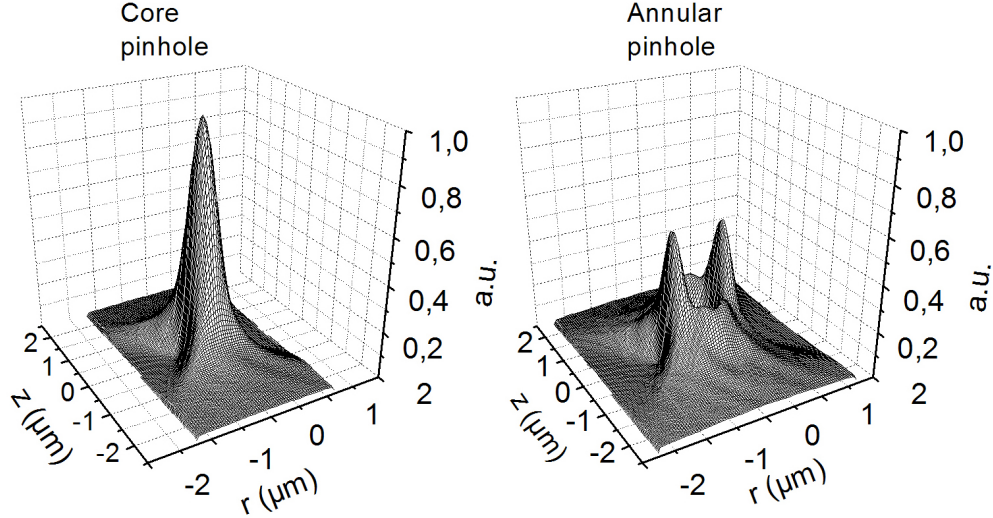


Figure 3. 3D representation of the Collection Efficiency Functions of the central pinhole, CEF_{in} (left) and of the annular one, CEF_{out} (right)

We therefore see, in Fig. 4(left), the $z = 0$ sections (dashed and dotted lines) of the Collection Efficiency Functions shown in Fig. 3. The continuous superimposed solid line is an example of laser profile (with $\omega_0 = 1 \mu\text{m}$), very well represented by:

$$I^{2D}(r) = I(r, z = 0) = I_0 \times \exp(-2r^2/\omega_0^2), \quad (2)$$

$$\omega_0 = \frac{\lambda}{\pi\beta NA}, \quad (3)$$

where $\beta = \omega/R$ is the under-filling fraction of the incoming gaussian laser beam (of vacuum wavelength λ). The incident beam, of radius ω , is injected in the entrance pupil of the objective of radius R , the numerical aperture of which is NA . It can be shown that if β is small enough (roughly smaller than 0.5), then the focused laser profile is still gaussian and follows Eq.(2) and (3).^{9, 22}

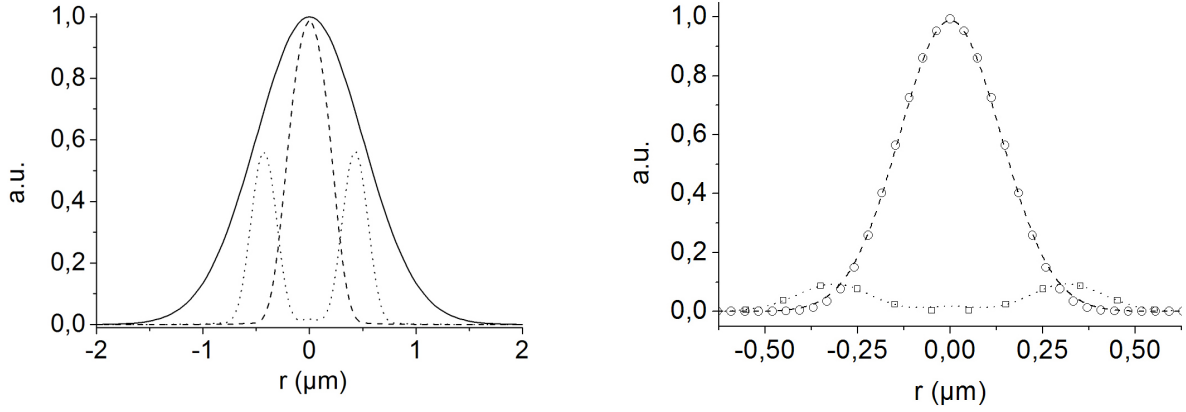


Figure 4. (left) $z=0$ cuts of the Collection Efficiency Functions shown in Fig. 3 (CEF_{in} , dashed line and CEF_{out} , dotted line). An example of laser profile is shown for a waist $\omega_0=1\mu\text{m}$. (Right) $z=0$ cuts of the central and annular MDE functions calculated with the CEF, shown in the left side, and a laser waist $\omega_0=0.385\mu\text{m}$. The corresponding fits are represented by open circles and squares.

Interesting enough is the fact that the 2D Molecular Detection Efficiency functions, $MDE^{2D}(r) = CEF^{2D}(r) \times I^{2D}(r)$, are still very close to gaussian functions. This is helpful, since it makes it possible to perform analytical calculations of cross-correlation functions. The MDE function of the inner volume, $MDE_{in}^{2D}(r)$, is described by a gaussian with a e^{-2} half-width ω_{in} :

$$MDE_{in}^{2D}(r) = A_{in} \text{Exp} \left[-2 \left(\frac{r}{\omega_{in}} \right)^2 \right], \quad (4)$$

and that of the outer volume by an annular gaussian :

$$MDE_{out}^{2D}(r) = A_{out} \text{Exp} \left[-2 \left(\frac{r - r_{out}}{\omega_{out}} \right)^2 \right], \quad (5)$$

where r_{out} is the radius and ω_{out} the e^{-2} half-width. One can see in Fig. 4(right) the Molecular Detection Efficiency functions, $MDE_{in}^{2D}(r)$ and $MDE_{out}^{2D}(r)$, corresponding to a laser waist $\omega_0 = 0.385\mu\text{m}$ (see below) and to the Collection Efficiency Functions of Fig. 4(left), together with their respective fits given by Eq. (4) and (5). Then, by integrating the product of the diffusion propagator²³ times the two MDE functions (using imaginary Bessel function J_O), one obtains the following cross-correlation functions:

$$G_{CC}(\tau) = 1 + \frac{1}{C\pi\omega_{eff}^2} \times \frac{\text{Exp} \left[-\frac{r^2}{(1+\tau/\tau_D)} \right]}{(1 + \tau/\tau_D)}, \quad (6)$$

with

$$\omega_{eff}^2 = \frac{(\omega_{in}^2 + \omega_{out}^2)}{2}, \quad (7)$$

$$\tau_D = \frac{\omega_{eff}^2}{4D}, \quad (8)$$

$$r = \frac{r_{out}}{\omega_{eff}}, \quad (9)$$

where C is the concentration of fluorescent molecules and D is the corresponding diffusion constant. Since Eq.(6) results from a 2D calculation, the concentration C is an effective 2D concentration, depending upon the actual axial depth of the confocal volume. In addition, the cross-correlation function exhibits a maximum located at :

$$\tau_{max} = \frac{r_{out}^2 - \omega_{eff}^2}{4D}. \quad (10)$$

Finally, it must be stressed that the 2D integrations of the MDE functions, $2\pi \int \text{MDE}^{2D}(r) r dr$, provide approximations of the central and annular pinhole fluorescent signals, $F_{in}(t)$ and $F_{out}(t)$. This property will be used in the next *Experimental results* section, to adjust the numerical value of the laser beam waist at the focal plane, ω_0 (and concomitantly β), that fits the ratio of the central and annular fluorescent signals. As a matter of fact the annular signal is strongly dependent upon the under-filling factor β .

4. EXPERIMENTAL RESULTS

Whatever are the observed fluorescent species (fluorescent beads from 20 to 200 nm, Rh6G in water or ethanol), the ratio of the central and annular pinhole fluorescent signals, $F_{out}(t)/F_{in}(t)$, lies in the range 0.38~0.46. The fact that the fluorescent signal of the annular pinhole is weaker than that of the central pinhole is due to the relatively narrow laser waist at the focus. More precisely, the ratio of the central and annular signals can be retrieved by assuming a laser waist, ω_0 , ranging between 0.37 and 0.40 μm , wich corresponds to an under-filling fraction $\beta = 0.35 \sim 0.32$. The corresponding MDE functions, calculated with the mean value $\omega_0 = 0.385 \mu\text{m}$, are shown in Fig. 4(right). Taking into account the uncertainty range of ω_0 , the fits of the MDE functions provide the values of the parameters of Eq.(6) to Eq.(9): $\omega_{in} = 0.266 \sim 0.275 \mu\text{m}$; $r_{out} = 0.308 \sim 0.320 \mu\text{m}$; $\omega_{out} = 0.200 \sim 0.202 \mu\text{m}$ and, consequently, $\omega_{eff} = 0.235 \sim 0.241 \mu\text{m}$.

Assuming that these figures are reasonable estimations, although they are based on 2D calculations, we can evaluate the value of the diffusion constant by locating the position of the maximum, τ_{max} , of the correlation function, according to Eq.(10).

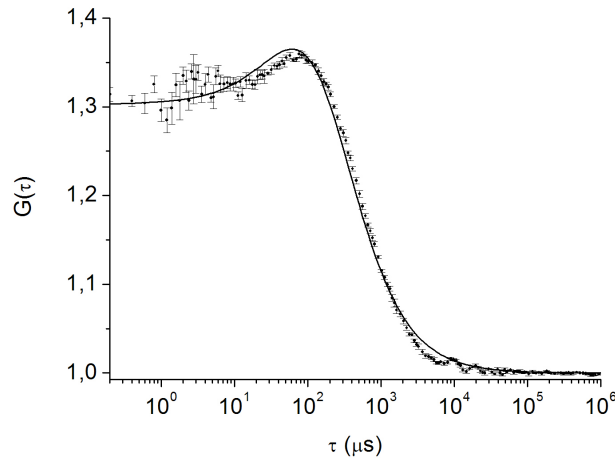


Figure 5. cross-correlation curve obtained with ten acquisitions of 30 s, with Rh6G in ethanol; the error bars are standard deviations. The superimposed curve is the fit with Eq.(6), obtained by fixing r_{out} to 0.314 μm and ω_{eff} to 0.238 μm , the result of which is $D = 172 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

For instance the cross-correlation curve obtained with Rh6G, diluted in ethanol, is shown in Fig. 5. Its maximum is close to $70 \mu\text{s}$, that corresponds to a diffusion constant D , between 130 and $170 \mu\text{m}^2/\text{s}$. This value is a little bit too low, knowing the viscosity, at 20°C , of ethanol ($1.20 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) and of water ($1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$),²⁴ and the diffusion constant of Rh6G in water ($250\sim 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$).²⁵ Using the Stokes-Einstein relation and assuming no conformational change of Rh6G between ethanol and water, one would rather expect to find a diffusion constant of Rh6G in ethanol in between 200 and $230 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Note that the D value, quickly estimated from the location of the maximum, is very close to that obtained by fitting the experimental cross-correlation curve, which gives $D = 160\sim 180 \mu\text{m}^2/\text{s}$ as shown in Fig. 5.

The difference between the expected and measured value of the diffusion constant can be attributed to the 2D approximations performed when deriving the cross-correlation function $G_{CC}(\tau)$ given by Eq.(6). Additionally, we observed that the experimental cross-correlation curves obtained with Rh6G in water (not shown) do not exhibit a maximum as pronounced as for Rh6G in ethanol. We suggest that this is because, at the laser power necessary to obtain a signal good enough (especially for the annular pinhole channel that is weakly excited by the laser beam), photobleaching prevents numerous molecules to reach, intact, the annular volume. More precisely, the molecules that still contribute to the cross-correlation signal, probably diffuse through the wings of the central volume rather than exploring its central part. Therefore, this sub-class of molecules do not participate to a cross-correlation function having a maximum, because the wings of the central volume and the annular one overlap to much.

Finally, we see in Fig. 6 the cross-correlation functions obtained with nano-beads of diameter 20 , 100 and $200 \mu\text{m}$, suspended in water. We show the fit, with Eq.(6), of the three experimental curves, obtained (as for Rh6G) by fixing r_{out} to $0.314 \mu\text{m}$ and ω_{eff} to $0.238 \mu\text{m}$. While, according to the Stokes-Einstein relation, the expected values of the diffusion constants of the 20 , 100 and 200 nm beads are 11 , 2.2 and $1.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, we respectively found 4.1 , 1.3 and $0.63 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Clearly, we also observe an underestimation of the diffusion constant as for Rh6G in ethanol, although more pronounced. This can be attributed to the difference of refraction index between water and ethanol (practically important with a water objective), that may differently affect the shape of the Molecular Detection Efficiency function for ethanol and water samples.

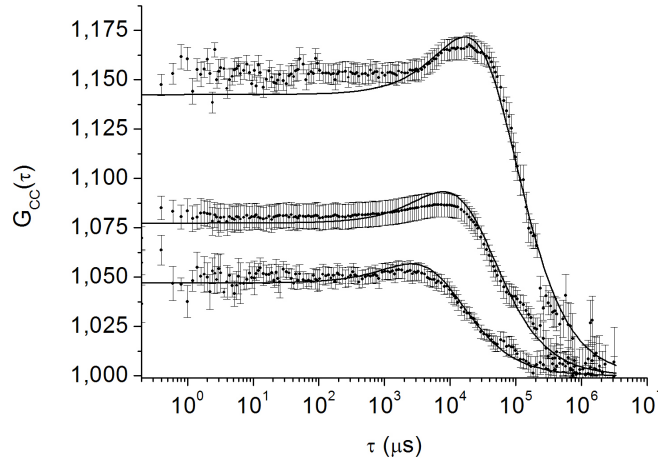


Figure 6. cross-correlation data obtained with ten acquisitions of 30 s , with 20 , 100 and 200 nm beads in water (from bottom to top); to avoid superimposition of the cross-correlation functions, the relative amplitude of the curve corresponding to the 200 nm beads has been multiplied by a factor 3 ; the error bars are standard deviations. The superimposed solide lines are the fits with Eq.(6), obtained by fixing r_{out} to $0.314 \mu\text{m}$ and ω_{eff} to $0.238 \mu\text{m}$.

5. CONCLUSION

Although the traditional FCS technique is more and more widely used, the improvement of its capability to discriminate fluorescence species on the basis of their diffusion constants is highly desirable. In this paper we have presented a first trial using the cross-correlation between two encapsulated volumes. An interesting point is that, according to Eq. (10), the position, τ_{max} , of the maximum of the cross-correlation function gives a quick estimation of the diffusion constant, providing one knows the optical geometry of the detection, that is r_{out} and ω_{eff} . It is clear that a better determination of the diffusion constant implies, both a better, 3D, description of the Molecular Detection Efficiency volumes, in addition to a better rejection of the cross-talk between the two detection channels, due to the overlap of the corresponding volumes. The new capabilities offered by spatial light modulators is certainly a promising track to explore.

REFERENCES

1. D. Magde, E. Elson and W. W. Webb, "Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurements by fluorescence correlation spectroscopy", *Phys. Rev. Lett.* **29**, pp. 705-708, 1972.
2. W. W. Webb, "Fluorescence Correlation Spectroscopy: Inception, Biophysical Experimentations, and Prospectus", *Appl. Opt.* **40**, pp. 3969-3983, 2001.
3. European workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy Techniques Applications in Biology, Medicine and Pharmacology *Le Kremlin-Bicêtre - 24-25 March 2005*.
4. V. V. Skakun, M. A. Hink, A. V. Digris, R. Engel, E. G. Novikov, V. V. Apanasovich and A. J. Visser, "Global analysis of fluorescence fluctuation data", *Eur. Biophys. J.* **34**, pp. 323-334, 2005.
5. P. Dittrich and P. Schuille, "Spatial Two-Photon Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Controlling Molecular Transport in Microfluidic Structures", *Anal. Chem.* **74** pp. 4472-4479, 2002.
6. H. Blom, M. Johansson, A.-S. Hedman, L. Lundberg, A. Hanning, S. Hard and R. Rigler, "Parallel fluorescence detection of single biomolecules in microarrays by a diffractive-optical-designed 2x2 fan-out element", *App. Opt.* **41**, pp. 3336-3342, 2002
7. H. Blom, M. Johansson, M. Gosch, T. Sigmundson, J. Holm, S. Hard and R. Rigler, "Parallel flow measurements in microstructures by use of a multifocal 4x1 diffractive optical fan-out element", *App. Opt.* **41**, pp. 6614-6620, 2002.
8. L. Kastrup, H. Blom, C. Eggeling and S. Hell, "Fluorescence fluctuation spectroscopy in subdiffraction focal volumes", *Phys. Rev. Lett.* **94**, pp. 178104-1-4, 2005
9. R. Jaffiol, Y. Blancquaert, A. Delon and J. Derouard, "Spatial fluorescence cross-correlation spectroscopy", *Appl. Opt.* **45**(6), pp. 1225-1235, 2006.
10. M. Brinkmeier, K. Dorre, J. Stephan and M. Eigen, "Two beam cross-correlation: a method to characterize transport phenomena in Micrometer-sized structures", *Anal. Chem.* **71**, pp. 609-616, 1999.
11. K. Q. Xia, Y. B. Xin and P. Tong, "Dual-beam incoherent cross-correlation spectroscopy", *J. Opt. Soc. Am. A* **12**, pp. 1571-1578, 1995.
12. M. Brinkmeier, R. Rigler, "Flow analysis by means of fluorescence correlation spectroscopy", *Exp. Tech. Phys.* **41**, pp. 205-210, 1995.
13. M. Gosch, H. Blom, J. Holm, T. Heino and R. Rigler, "Hydrodynamic Flow Profiling in Microchannel Structures by Single Molecule Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Anal. Chem.* **72**, pp. 3260-3265, 2000.
14. P.-F. Lenne, D. Colombo, H. Giovannini and H. Rigneault, "Flow Profiles and Directionality in Microcapillaries Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Single Mol.* **3**, pp. 194-200, 2002.
15. D. Magde, E. L. Elson and W. W. Webb, "Fluorescence correlation spectroscopy. III. Uniform translation and laminar flow", *Biopolymers* **17**, pp. 361-376, 1978.
16. R. H. Kohler, P. Schuille, W. W. Webb and M. Hanson, "Active protein transport through plastid tubules: Velocity quantified by fluorescence correlation spectroscopy", *J. Cell Sci.* **113**, pp. 3921-3930, 2000.
17. A. Asai, "Proposal of a Simple Method of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Measuring the Direction and Magnitude of a Flow of Fluorophores", *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**, pp. 2279-2282, 1980.
18. T. E. Starr and N. L. Thompson, "Local diffusion and concentration of IgG near planar membranes: measurement by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy", *J. Phys. Chem. B* **106**, pp. 2365, 2002.
19. M. J. Levene, J. Korch, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead and W. W. Webb, "Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations", *Science* **299**, pp. 682-686, 2003.
20. T. Ruckstuhl and S. Seeger, "Attoliter detection volumes by confocal total-internal-reflection fluorescence microscopy", *Opt. Lett.* **29**, pp. 569-571, 2004.
21. H. Rigneault, J. Capoulade, J. Dintinger, J. Wenger, N. Bonod, E. Popov, T. W. Ebbesen and P.-F. Lenne, "Enhancement of single molecule fluorescence detection in subwavelength apertures", *Phys. Rev. Lett.* **95**, pp. 117401-4, 2005.

22. R. Rigler, U. Mets, J. Widengren and P. Kask, "Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion", *Eur. Biophys. J.* **22**, pp.169-175, 1993.
23. M. Weiss, M. Elsner, F. Kartberg and T. Nilsson, "Anomalous Subdiffusion Is a Measure for Cytoplasmic Crowding in Living Cells", *Biophys. J.* **87**, pp. 3518-3524, 2004.
24. <http://www.efunda.com>
25. J. Schuster, F. Cichos, J. Wrachtrup and C. von Borczyskowski, "Diffusion of Single Molecules Close to Interfaces", *Single Mol.* **1**, pp. 299-305, 2000.

Low-temperature properties and ESR in the quasi-one-dimensional random compound MnMgB_2O_5

J. C. Fernandes, R. B. Guimarães, and M. A. Continentino*

Instituto de Física, Universidade Federal Fluminense, Campus da Praia Vermelha, 24210-340 Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

R. Rapp

Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68528, 21945-970 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

J.-L. Tholence and J. Dumas

Laboratoire d'Etudes des Propriétés Electroniques des Solides, CNRS, Boîte Postale 166, 38042 Grenoble, Cedex 9, France

Y. Blancquaert, S. Yates, and C. Paulsen

Centre de Recherches sur les Très Basses Températures, CNRS, Boîte Postale 166, 38042 Grenoble, Cedex 9, France

(Received 11 July 2003; revised manuscript received 17 October 2003; published 20 February 2004)

Low-temperature magnetization, ac susceptibility, and specific heat have been measured on powdered MnMgB_2O_5 between 100 mK and 6.8 K. A power-law temperature dependence of the susceptibility has been found down to 2 K in agreement with previous measurements. The exponent describing this behavior is close to that found for the warwickite ScMnOBO_3 , another Mn^{2+} compound with a similar low dimensional random magnetic arrangement of Mn ions. The magnetic and specific-heat measurements indicate that, below 600 mK, the MnMgB_2O_5 pyroborate freezes in a glassy state. Electron-spin resonance measurements (ESR) on a single crystal of this compound are also presented. The linewidth and the g factor show different temperature dependencies for different directions of the applied field. Finally a theory is presented for ESR in random exchange Heisenberg antiferromagnetic chain (REHAC) compounds.

DOI: 10.1103/PhysRevB.69.054418

PACS number(s): 75.20.Ck, 75.60.Ej, 76.30.-v

I. INTRODUCTION

This work presents an investigation of the low-temperature magnetic and thermodynamic properties of the pyroborate MnMgB_2O_5 compound. Magnetization, ac susceptibility, specific heat as well as the electron-spin resonance (ESR) parameters are presented as a function of temperature. A theory for explaining the temperature dependence of the ESR linewidth and g factor in the framework of a random chain compound is also given.

The crystalline structure of MnMgB_2O_5 has been studied by Utzolino and Bluhm.¹ It is triclinic with space group $P-1$ (number 2). The metal ions Mn^{2+} and Mg^{2+} are found inside oxygen octahedra that share edges and form substructures such as *ribbons*, four rows wide, as shown in Fig. 1. These ribbons are parallel to the crystal a axis and contain two distinct crystallographic sites for the metal ions. Both ions occupy the two metal sites so that this compound is *intrinsically* disordered. Metal spins in neighbor ribbons interact through the *super-super-exchange* mechanism while the spin interaction between neighbor ions within the same ribbon is mainly due to the *super-exchange* mechanism, as this is an electrically insulating material.

In a recent paper Fernandes *et al.*² have measured the ac susceptibility and the magnetization of the *heterometallic* pyroborate MnMgB_2O_5 , down to 2 K. This study also presented measurements for the *homometallic* isomorph pyroborate $\text{Mn}_2\text{B}_2\text{O}_5$. The latter shows antiferromagnetic order below 23.3 K while the heterometallic pyroborate has a behavior typical of random exchange Heisenberg antiferromagnetic chain (REHAC) systems below 19 K. This is charac-

terized by a power-law dependence of the susceptibility on temperature and of the magnetization on the applied field for high fields. No magnetic order was found in the former system down to the lowest temperatures (2K) attained in this study.

In this work we present magnetization, ac susceptibility, and specific-heat measurements, down to approximately 100 mK, as a tentative to observe magnetic ordering of the heterometallic pyroborate. We have observed that this magnetic system actually freezes below 600 mK in a magnetic glass state which is destroyed by field cooling under 100 Oe. The

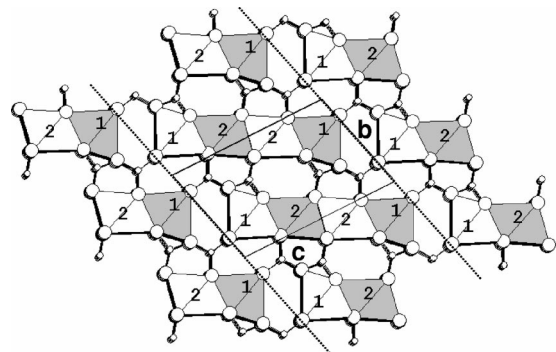


FIG. 1. The structure of the pyroborates projected in the plane bc , from Ref. 2. We may notice the ribbons, the borate groups, and the sides b and c of the unit cell. The largest circles indicate oxygen ions while the smallest ones indicate boron ions. The dashed lines indicate one column of ribbons. The a coordinates of metal 1 and metal 2 sites within dark octahedra are the same while the clear ones differ from those by $a/2$.

magnetization curve at 100 mK shows a small hysteresis due to a small magnetic component freezing in the direction of the magnetic field. Another goal of the present study is to compare the main features of ESR measurements in this inorganic insulating REHAC, with those obtained by Tippie and Clark³ on quinolinium (TCNQ)₂, a well studied organic REHAC conductor. The overall behavior of ESR is very similar in both systems in spite of the different magnitudes of linewidths in each compound. In the pyroborate the linewidths are more than two orders of magnitude greater than those in quinolinium (TCNQ)₂. To the best of our knowledge this paper presents the first ESR measurements in an inorganic REHAC. These systems are the subject of intensive investigations mostly from the theoretical point of view.⁴ The thermodynamic properties and ground state of spin-1/2 REHAC are now well known. However the expected physical behavior of REHAC systems with $S > 1/2$ is still under intense debate.⁴ For this reason it is very important to have as many as possible candidate systems and results for these kind of material. The heterometallic pyroborate investigated here provides unambiguous experimental evidence for the existence of a Griffiths phase in this $S = 5/2$ REHAC material. The Griffiths phase consists of singlet pairs with a large distribution of exchange couplings which form along the ribbons.

II. EXPERIMENT

A. The sample

The sample has been synthesized following the method presented in Ref. 2. For the ESR measurements we have employed an as grown single crystal whose size is circa $0.5 \times 0.8 \times 2$ mm³. The crystalline structure has been identified through x-ray powder diffraction. We used a powdered sample for susceptibility and specific-heat measurements.

B. Susceptibility and Magnetization

The low-temperature magnetization and ac susceptibility measurements were made using a low-temperature high-field SQUID magnetometer developed at the CRTBT in Grenoble. A miniature dilution refrigerator was used to reach temperatures down to 90 mK. A powder sample of MnMgB₂O₅, weighting 19.5 mg, was mixed with a small amount of apiezon grease and squeezed into a small copper pouch. The sample and pouch were thermally anchored to a copper coil foil sample holder suspended from the bottom of the mixing chamber of the dilution refrigerator. During measurements, the sample was extracted through the gradiometer coils of a superconducting flux transformer coupled to the SQUID. In this way absolute value measurements were made.

Figure 2 shows the M/H dc susceptibility between 100 mK and 5 K in field-cooled (FC) and zero-field-cooled (ZFC) regimes, respectively, both under an applied field of 100 G. The ac susceptibility, χ_{ac} , vs temperature curve, for 2.1 Hz, also appears in this figure. There is a very broad peak in the ac susceptibilities and in the warm-up ZFC magnetization curves. For the ac data the peak position has a very weak frequency dependence consistent with a spin glass-like

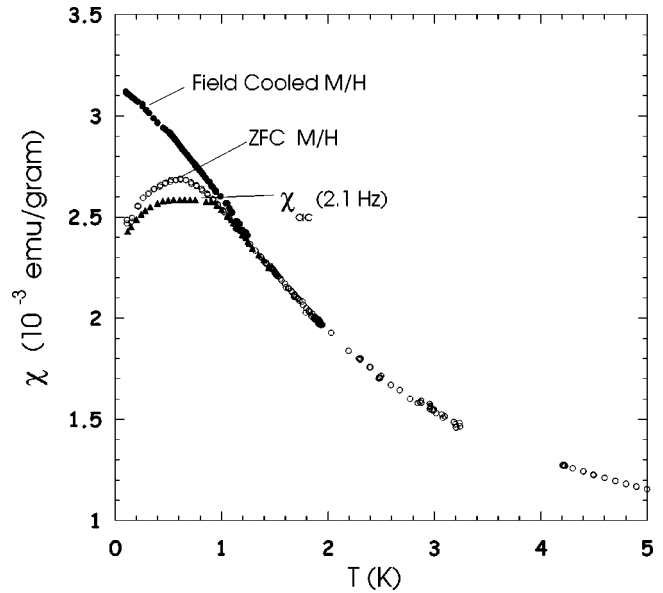


FIG. 2. The (M/H) vs temperature curves, at 100 G, for field-cooled (FC) and warm-up zero-field-cooled (ZFC) regimes. Also shown is the real part of the ac susceptibility vs temperature curve for MnMgB₂O₅ at 2.1 Hz. Similar curves are obtained for 0.21 and 21 Hz.

ordering below 600 mK. Moreover specific-heat measurements down to very low temperatures to be presented below, show no anomaly in this temperature region clearly ruling out long-range magnetic ordering. The imaginary parts of the ac susceptibility for different frequencies is very small. Figure 3 shows the M vs H curves for 100 mK and 4.2 K with H running between 0 and 1000 G. At 100 mK there is a slight hysteresis possibly due to a small magnetic component freezing in the direction of the applied field. The linearity at these low fields is not surprising. Figure 4, the last of this subsection, shows the $\ln(M/H)$ vs $\ln(T)$ curve under 100 G for ZFC. From this curve we conclude that, down to 2 K, $\chi_{dc} \propto T^{-\alpha}$ where $\alpha = 0.56$. This result agrees with the previous

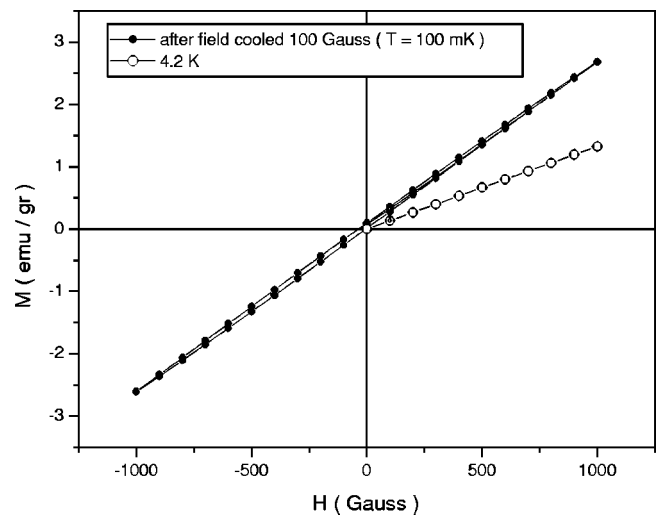


FIG. 3. Field dependence of magnetization for MnMgB₂O₅ at 100 mK and 4.2 K. A slight hysteresis at 100 mK may be observed.

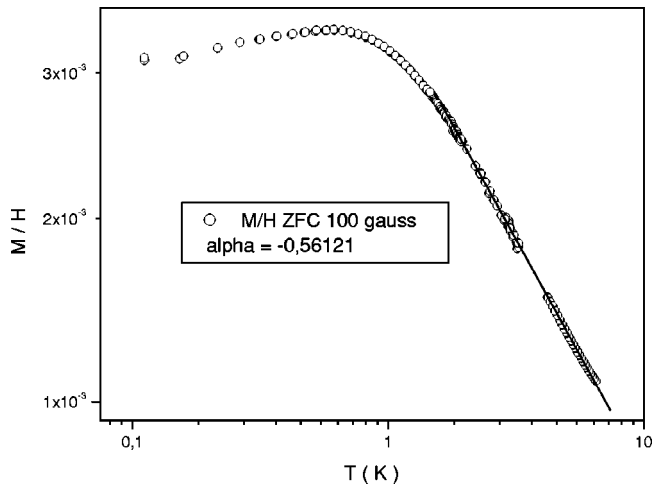


FIG. 4. Double logarithmic plot of (M/H) vs T curve for MnMgB_2O_5 from 100 mK to 6.8 K. A $\chi_{dc} \propto T^{-\alpha}$ law above 1 K is found with $\alpha = 0.56$ (full line).

measurements on this compound² which yield to $\alpha = 0.55$. This strongly suggests the existence of a Griffiths phase in this low dimensional random magnetic oxide above 1 K. Below this temperature a crossover to three dimensions occurs leading to the appearance of magnetic long-range order. It is important here to remark that the warwickite MnScOBO_3 , a random chain compound with Mn^{2+} ions, also presents such a phase with an exponent $\alpha = 0.50$ in the low-temperature susceptibility.⁶

C. Specific heat

Specific heat measurements were performed using one calorimeter mounted in a dilution refrigeration cryostat (model DRI 420, SHE Corporation, USA) and covers the temperature range 0.08–3 K. Measurements were made using a semiadiabatic pulse method. The specific heat is measured with a relative uncertainty of 2%. The samples were prepared⁷ as to improve the expected low thermal conductivity of the material. Powdered material, with particle size of about 100 μm , was mixed with a similar quantity of powdered copper with particle size of about 5 μm . The sample copper mixture wrapped with 0.04 mm thick copper foil, forming a chip, was compressed with about 25 MPa for about 30 min. The mass of the sample, copper, and grease were about 0.1, 0.2, and 0.002 g, respectively. In this way we obtained a good thermal conducting copper path around each sample particle, while keeping small the specific-heat background due to the added material. This provided a sample temperature equilibration time constant shorter than 60 sec in the full measuring range. This chip was glued with apiezon *N* grease to the calorimeter base copper plate, where the thermometer and heater were attached. When taking data, heat was applied to the sample during intervals of about 80 sec as to produce temperature changes of 5% of the sample temperature. The evolution of the temperature to equilibrium of the sample was measured during more than 500 sec. The specific-heat background of the calorimeter was determined in a separate measurement. The total heat capacity of the

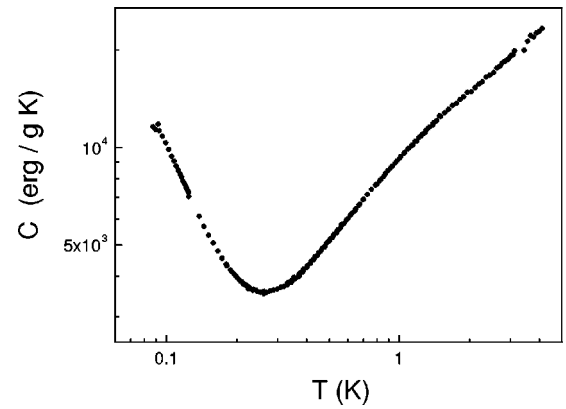


FIG. 5. Specific heat of MnMgB_2O_5 as a function of temperature.

sample, C_{tot} , was obtained after subtracting to the measured value, the heat capacity of the calorimeter, the contributions of the copper powder and foil and the apiezon grease. The results are shown in Fig. 5. The heat capacity is a smooth function of temperature at the temperature where the susceptibility shows a maximum ruling out an antiferromagnetic transition. At very low temperatures the heat capacity rises with decreasing temperature due to a Schottky-like nuclear contribution associated with the 100% abundant isotope Mn^{55} .⁸

D. ESR

ESR measurements were performed on a platelet of MnMgB_2O_5 whose dimensions are given above. A cw 9.5 GHz Bruker spectrometer was employed. The spectra have been taken, as a function of temperature, for dc applied field perpendicular and parallel to the largest edge of the platelet. Figure 6 shows the linewidth vs temperature curves for each orientation and the inset shows the low-temperature power-

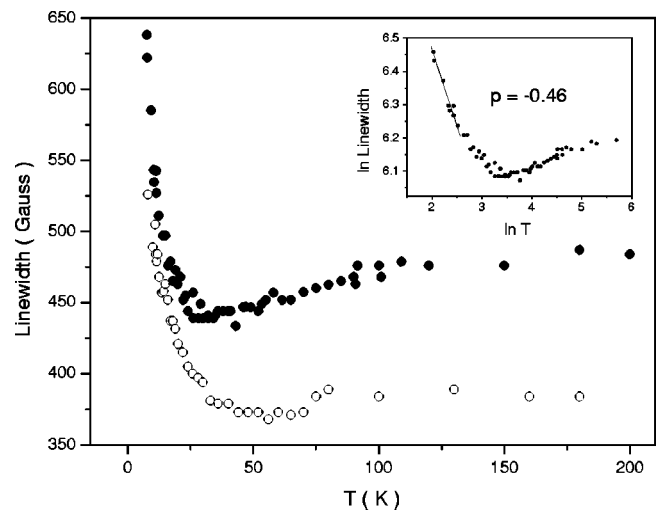


FIG. 6. Linewidth as a function of temperature for applied field parallel (filled circles) and perpendicular (open circles) to the direction of the ribbons. The inset shows the power-law behavior of the linewidth for the parallel direction.

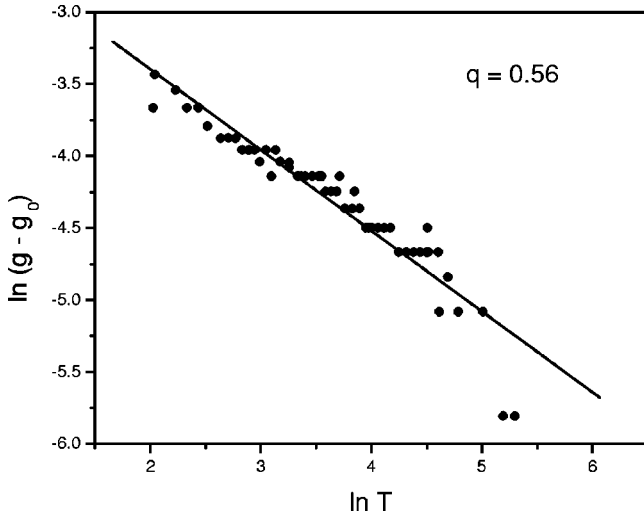


FIG. 7. The logarithmic plot of the g shift as a function of temperature for the applied field parallel to the ribbons' direction. The reference g factor $g_0 = 2.0161$ is that measured at room temperature. The linear fitting of the data yields an inclination $q = 0.56$ close to the temperature exponent of the susceptibility.

law behavior. Linewidths have also been measured as a function of the angle between the applied field and the largest edge for both directions in the plane perpendicular to the largest face. At any field orientation and temperature the spectrum consists of a single intense, broad, and essentially symmetric Lorentzian line. We remark that the linewidths are larger for the applied field parallel to the largest edge of the platelet. This is the hard magnetization direction for $\text{Mn}_2\text{B}_2\text{O}_5$ as shown in Ref. 2. For the applied magnetic field parallel to this direction, the linewidth curve presents a minimum at 30 K (see Fig. 6) while, for applied field parallel to the two other edges of the platelet, the minima are found near 50 K. It is important to remark that the onset of the power law for the magnetic susceptibility is 19 K (Ref. 2), a temperature out of the range of the minima of the linewidth curves. These results must be compared with those obtained for quinolinium $(\text{TCNQ})_2$, the above mentioned REHAC conductor. This compound orders magnetically at circa 1.5 mK (Ref. 5) and has ESR linewidths running between 0.05 G and 0.3 G below 20 K (Ref. 3). Although these quantities are very different from the corresponding ones in MnMgB_2O_5 , the onset of the $T^{-\alpha}$ law for the susceptibility and the minimum of the linewidth vs temperature curve are very near to those for MnMgB_2O_5 . They are 20 K (Ref. 9) and 25 K (Ref. 3), respectively. In both compounds the linewidths are larger for applied fields parallel to the chains' direction. In Fig. 7 we plot $\ln(g - g_0)$ vs $\ln T$ where $g_0 = 2.0161$ is the room temperature g factor. Notice that $g - g_0$ has a power-law behavior with temperature at low temperatures with an exponent very close to that found for the magnetic susceptibility.

III. THEORY FOR ESR IN RANDOM QUANTUM CHAINS

For an understanding of the temperature dependence of the ESR linewidth and g shift in this compound, we consider

that the radio frequency (RF) is absorbed by $S = 5/2$ free manganese ions in the chains. These ions, in an S state with zero angular momentum, absorb energy essentially at their Zeeman frequency in the applied external magnetic field. The relaxation of the energy absorbed from the RF source occurs via the weak coupling of the resonant ions to the singlet pairs forming a random singlet or Griffiths phase and from these to the lattice. The former interactions are dipolar or other kind of anisotropic coupling. We also assume that the random singlet pairs have a first excited state which couples to the lattice, such that, ultimately energy is transferred to this reservoir. This mechanism gives rise to a linewidth which can be written as¹⁰

$$\Delta H = \frac{D^2 N}{g \mu_B N_0} \frac{1}{4kT} \text{sech}^2(E/2kT) \frac{\omega \tau}{1 + \omega^2 \tau^2}, \quad (1)$$

where D is the anisotropic coupling of the free ions to the singlet pairs and ω is the resonance frequency. (N/N_0) is the concentration of pairs. The relaxation time τ of the pairs to the lattice quite generally depends on the energy E of the first excited state of the pair which is treated here as a two level system. These energies are random with a normalized probability distribution $P(E)$ which is essentially the distribution of the random exchange couplings of the singlet pairs given by¹¹

$$P(E) = \frac{1}{Z\Omega} \left(\frac{E}{\Omega} \right)^{-\alpha},$$

where $\alpha = 1 - 1/Z$ with Z the dynamic exponent¹¹ and Ω is the cutoff of the distribution. The average linewidth is given by,

$$\overline{\Delta H} = \frac{D^2}{g \mu_B Z \Omega} \int_0^\Omega \frac{dE}{4kT} \left(\frac{E}{\Omega} \right)^{-\alpha} \text{sech}^2(E/2kT) \frac{\omega \tau(E)}{1 + \omega^2 \tau^2(E)}. \quad (2)$$

The E dependence of τ is determined by the particular mechanism of relaxation of the pairs to the lattice, the relevant dimension of the elastic array, etc. Here we shall neglect this explicit dependence and assume for simplicity an average relaxation time with a power-law dependence on temperature, i.e., $\overline{\tau}(T) = \tau_0 (kT/\Omega)^{-z}$. The average linewidth can be written as,

$$\overline{\Delta H} = \frac{D^2}{g \mu_B Z \Omega} \left(\frac{kT}{\Omega} \right)^{-\alpha} \frac{\omega \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \int_0^{\Omega/kT} dy y^{-\alpha} \text{sech}^2(y) \quad (3)$$

or, considering that the relevant low-temperature limit for this insulating material is $\omega \tau \gg 1$,

$$\overline{\Delta H} = \frac{D^2 A(\alpha, \Omega/kT)}{g \mu_B Z \Omega (\omega \tau_0)} \left(\frac{kT}{\Omega} \right)^{-\alpha+z}, \quad (4)$$

where $A(\alpha, \Omega/kT)$ stands for the integral. The exponent α is obtained from the susceptibility measurements and for the present system is given by $\alpha = 0.56$. Since the linewidth, as

shown in Fig. 5, behaves as $\overline{\Delta H} \propto T^{-p}$, with $p = -0.46$, we have from $p = \alpha - z$, that $z \approx 0.1$. This implies a very weak temperature dependence of the relaxation time of the singlet pairs to the lattice which however increases with decreasing temperature. Notice that this relaxation mechanism probably involve low dimensional phonons propagating along the ribbons.

The same mechanism responsible for the linewidth calculated above gives rise to a contribution to the g shift which is given by,¹⁰

$$\overline{\Delta g} = \frac{D^2 A(\alpha, \Omega/kT)}{\mu_B H_0 Z \Omega} \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \left(\frac{kT}{\Omega} \right)^{-\alpha}, \quad (5)$$

where H_0 is the room-temperature resonance field. In the low-temperature limit where $\omega^2 \tau^2 \gg 1$, the equation above yields a g shift which is frequency independent and has the same temperature dependence of the uniform magnetic susceptibility determined by the exponent $\alpha = -0.56$. This is indeed the case found experimentally, as shown in Fig. 6, lending further support to the proposed relaxation mechanism.

IV. DISCUSSION

In this paper we have presented magnetization, specific heat, and ESR results for the pyroborate system MnMgB_2O_5 . This is an intrinsically disordered one-dimensional magnetic material. The low dimensionality is a consequence of the existence of ribbons in its structure which interact very weakly. Although the Mn^{2+} ions have a

large magnetic moment, due to the random occupation of the metal sites in the low dimensional ribbons the system can only freeze and even so below 600 mK. This freezing is evident from a broad maximum in the susceptibility and the absence of a peak in the specific heat curve in the temperature range of this maximum. The magnetic behavior of this system above 2 K is characteristic of random exchange Heisenberg antiferromagnetic chains with a power-law behavior of the uniform susceptibility as a function of temperature and of the magnetization as function of the applied magnetic field. Such behavior is well documented in spin-1/2 REHAC systems where it is associated with the existence of a random singlet phase. However in spin-5/2 systems, as the case investigated here, it is not clear if such a phase does exist for strong disorder. Our results are consistent however with the existence of a Griffiths phase in this Mn pyroborate which gives rise to the power-law behavior with temperature independent exponents. In order to explain our ESR experiments, we have proposed a theory for the linewidth and g shift in this REHAC material. In this theory the energy absorbed of the radio-frequency field from free Mn ions is transferred to the lattice through the spin singlets associated with the Griffiths phase.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Brazilian agencies FAPERJ, CNPq, and CNRS (France). Dr. C.O. Paiva-Santos has taken the x-ray diffractogram from MnMgB_2O_5 at the LIEC-UNESP.

*Electronic address: mucio@if.uff.br

¹A. Utzolino and K. Bluhm, Z. Naturforsch. B **51**, 912 (1996).

²J.C. Fernandes, F.S. Sarrat, R.B. Guimarães, R.S. Freitas, M.A. Continentino, A.C. Doriguetto, Y.P. Mascarenhas, J. Ellena, E.E. Castellano, J.-L. Tholence, J. Dumas, and L. Ghivelder, Phys. Rev. B **67**, 104413 (2003).

³L.C. Tippie and W.G. Clark, Phys. Rev. B **23**, 5854 (1981).

⁴D.S. Fisher, Phys. Rev. B **50**, 3799 (1994); A. Saguia, B. Boechat, and M.A. Continentino, *ibid.* **62**, 5541 (2000); S. Bergkvist, P. Henelius, and A. Rosengren, *ibid.* **66**, 134407 (2002).

⁵H.M. Bozler, C.M. Gould, T.J. Bartolac, W.G. Clark, K. Glover,

and J. Sanny, Bull. Am. Phys. Soc. **25**, 217 (1980).

⁶R.B. Guimarães, J.C. Fernandes, M.A. Continentino, H.A. Borges, C.S. Moura, J.B.M. da Cunha, and C.A. dos Santos, Phys. Rev. B **56**, 292 (1997).

⁷M.L. Siqueira, R.E. Rapp, and R. Calvo, Phys. Rev. B **48**, 3257 (1993).

⁸J.C. Ho and N.E. Phillips, Phys. Lett. **10**, 34 (1964).

⁹L.C. Tippie and W.G. Clark, Phys. Rev. B **23**, 5846 (1981).

¹⁰M.A. Continentino, J. Phys. C **16**, L71 (1983).

¹¹A. Saguia, B. Boechat, and M.A. Continentino, Phys. Rev. Lett. **89**, 117202 (2002).

Résumé

Dans sa forme habituelle, la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence (Fluorescence Correlation Spectroscopy ou FCS), consiste à enregistrer pendant quelques dizaines de secondes la fluorescence émise par un petit nombre de molécules diffusant dans un petit volume de collection ($\leq 0,1 \mu\text{m}^3$) situé au foyer de l'objectif de grande ouverture numérique d'un microscope confocal. La fonction d'autocorrélation du signal correspondant est directement reliée au nombre moyen de molécules observées et à leur constante de diffusion. Les applications de cette technique concernent la biologie cellulaire et la biochimie, avec comme objectif de mesurer les concentrations de molécules de tailles différentes et leurs interactions.

Le but initial de ce travail de thèse est de proposer une technique pour améliorer la sensibilité dans la discrimination de deux molécules ayant des constantes de diffusion proches. Dans ce contexte, nous avons étudié, théoriquement et expérimentalement, la Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy ou FCCS). Cette technique ne consiste pas simplement à enregistrer la fluorescence émise par un petit nombre de molécules diffusant dans un volume de collection mais dans deux volumes. A défaut d'améliorer la sensibilité de la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence, nous avons proposé trois géométries de FCCS pour élargir le champ d'application de la corrélation de fluorescence.

La première géométrie consiste à enregistrer le signal de fluorescence par l'intermédiaire de deux volumes identiques séparés l'un de l'autre par plusieurs centaines de nanomètres.

Dans la seconde géométrie les volumes de détections ne sont plus identiques, ils sont imbriqués l'un dans l'autre (anneau autour d'un trou).

La dernière géométrie fait intervenir les Modulateurs Spatiaux de Lumière (Spatial Light Modulator ou SLM). Ces instruments modifient localement le front d'onde d'une illumination, ce qui permet, au foyer d'un objectif de créer une grande variété d'illuminations.

Pour les trois géométries nous présentons les résultats expérimentaux obtenus.

Mots clefs :

Fluorescence Correlation Spectroscopy, concentration, constante de diffusion, Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, volumes identiques, anneau, Spatial Light Modulator