

Thèse de Doctorat
de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI
Spécialité : Physique

Présentée par
Eric LE MOAL

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Développement et organisation de nanostructures :
applications à l'exaltation des processus optiques
pour la Biologie.

Soutenue publiquement le 26/02/2007 devant le jury composé de :

Michaël CANVA	Président du jury
Claude BOCCARA	Rapporteur
Hervé RIGNEAULT	Rapporteur
Agnès MAITRE	Examineur
Emmanuel FORT	Examineur
Christian RICOLLEAU	Directeur de thèse

SI L'ON VEUT CET OISEAU

*Savez-vous pourquoi ce roi de Mongolie
S'en alla envahir quelque lointain royaume ?
C'est qu'il y entendit un oiseau inconnu
Et voulu posséder son chant.
Par amour de ce chant, il souhaita capturer
L'oiseau, avec l'oiseau le nid,
Les branches soutenant le nid,
Et le tronc, l'arbre lui-même et ses racines,
Et la terre de ces racines et alentour,
Le village,
Les champs,
La région,
Le royaume tout entier...*

*Afin de les obtenir,
Il rassembla tout ce qu'il avait
D'éléphants, de chevaux, de chariots, de soldats ;
Il conquit ce royaume,
L'annexa à son empire,
Et n'en revint jamais.*

A. K. RAMANUJAN¹

à Séverine.

¹*La Parole et la saveur : anthologie de la poésie indienne du vingtième siècle*, publié par Z. Bianu, S. Sautreau et R. Dassin (Ed. Saint-Pierre-du-Mont : les Cahiers des brisants).

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été menés au Laboratoire de Physique du Solide de l'ESPCI (Paris), au sein de l'équipe Matériaux Nanostructurés et Nanoplasmonique (MN₂P, MPQ, Paris VII).

Pour son accueil et sa confiance accordée à l'ensemble de l'équipe MN₂P, j'adresse de chaleureux remerciements à Nicole Bontemps, Directrice du LPS.

Claude Boccara et Hervé Rigneault m'ont fait l'honneur et la grande joie de faire partie du jury de cette thèse, et d'en être les rapporteurs. Je remercie Michaël Canva d'avoir présidé le jury et apporté un regard critique et éclairé sur le mémoire. Ses commentaires m'ont été d'une aide précieuse pour achever la version finale du mémoire. Je remercie également Agnès Maitre d'avoir accepté d'être membre du jury comme examinatrice.

Ce travail de thèse a été dirigé par Christian Ricolleau (MPQ, Paris VII) en cotutelle avec l'équipe de Biophotonique du Laboratoire de Photophysique Moléculaire (LPPM, CNRS, Orsay), sous la codirection de Sandrine Lévêque-Fort. Je souhaite à Christian de garder le même instinct avec lequel il dirige l'équipe depuis que je le connais, et je le remercie pour ses choix entiers qui, s'ils n'ont pas toujours fait l'unanimité, nous ont menés sur ces terres de l'ESPCI si fertiles à l'innovation. D'autre part, je remercie Sandrine pour avoir permis, dès le départ, que ce stage de DEA puis cette thèse mêlent plusieurs "univers" : l'Optique, la Physique des matériaux, la Biologie. Peu de doctorants ont l'opportunité de vivre une aventure aussi riche, et de pouvoir cultiver un tel éclectisme scientifique tout en travaillant sur les sujets les plus passionnants avec le matériel le plus sophistiqué.

Toute ma reconnaissance va à Emmanuel Fort qui m'a guidé durant ces quatre années, et qui m'a enseigné son pragmatisme et son exigence en matière de sciences. Emmanuel m'a transmis sa vision très appliquée et très ouverte de la Physique. Cette "philosophie", qui prône les rencontres entre les disciplines scientifiques, est la mienne aujourd'hui, et je souhaite pouvoir un jour la transmettre à mon tour. Enfin, je tiens à saluer sa patience, "parfois" soumise à rude épreuve, et son optimisme contagieux grâce auquel règne dans l'équipe un indéfectible climat de confiance. Je lui adresse également mes remerciements pour ses multiples relectures du manuscrit, qui m'ont permis de gagner en cohérence et en clarté.

Je tiens à témoigner ma gratitude à l'ensemble des collaborateurs qui ont participé aux travaux présentés dans ce mémoire, et qui m'ont fait découvrir des environnements

passionnants et de multiples façons d'être chercheur. Romain Briandet et Jean-Michel Herry (UBHM, INRA, Massy) m'ont initié à la microscopie confocale et à l'AFM. Fabrice Cordelières (Institut Curie, Orsay) m'a donné un aperçu de ce qu'est l'imagerie cellulaire, et notre collaboration m'a permis d'écrire mon premier article. Anne Janin et Hideyuki Murata (Laboratoire de Pathologie, Hôpital Saint-Louis, Paris) m'ont sensibilisé à la réalité de la recherche en clinique et des applications biomédicales. J'ai découvert, grâce à Diane Le Clerre, Luc Talini et Fabrice Richard (entreprise Genescore), la passionnante "vie" d'une puce à ADN, de la lame de verre vierge jusqu'à son utilisation en laboratoire. Marie-Pierre Fontaine-Aupart et Francis Tfibel (LPPM, Orsay) m'ont également accordé de leur temps et fait partager leur savoir. Enfin, je remercie Jean-Pierre Lacharme qui a accompagné mes débuts, avec la gentillesse et la patience qu'on lui connaît.

Mille mercis aux personnes qui m'ont aidé et conseillé dans ma recherche de post-docs, en particulier Samuel Grésillon et Nordin Félidj.

Un clin d'oeil aux anciens occupants du "thésarium" période 2003-2006 (Mathieu, Alexandre, Sébastien, Yann) et à l'inénarrable Andrés pour son indéfectible sens de l'humour. Tous mes encouragements pour les futurs docteurs es sciences de l'ESPCI (Damien, Yannick, William) et du LPPM (Arianne, Pierre).

Pour finir, je souhaite remercier ma famille pour son soutien et ses encouragements. Ce mémoire est dédié à ma compagne et future femme Séverine, qui a également goûté aux joies et misères de la vie de thésard(e). Son amour et sa générosité, et ce qui nous avons construit ensemble ces dernières années, m'ont permis de ne pas perdre pied, et de garder intact un optimisme soumis à rude épreuve.

Table des matières

Remerciements	v
Introduction	xi
1 Contexte et état de l'art	1
1.1 Fluorescence appliquée à l'imagerie des systèmes biologiques	2
1.1.1 Mécanismes de la fluorescence moléculaire	2
1.1.2 Le marquage fluorescent en biologie	10
1.2 Nature et propriétés des plasmons	14
1.2.1 Qu'est-ce qu'un plasmon ?	15
1.2.2 Plasmons localisés dans les nanoparticules métalliques	16
1.2.3 Plasmons de surface	16
1.2.4 Comment coupler photons et plasmons de surface ?	20
1.3 Processus optiques en présence d'une structure métallique	25
1.3.1 Interaction émetteur ponctuel / miroir métallique	25
1.3.2 Interaction émetteur ponctuel / surface métallique structurée	33
1.3.3 Couplage émetteur ponctuel / nanoparticule métallique	35
1.4 Enjeux de l'exaltation des processus optiques en biologie	43
1.4.1 Imagerie cellulaire et tissulaire	43
1.4.2 Puces à ADN	46
2 Méthodes expérimentales et de simulation	53
2.1 Préparation des substrats métallisés	53
2.1.1 Fabrication	53
2.1.2 Caractérisation optique et morphologique	57

2.1.3	Dépôt des fluorophores	64
2.2	Techniques pour les applications biologiques	67
2.2.1	Puces à ADN	67
2.2.2	Méthodes pour l'imagerie cellulaire et tissulaire	71
2.3	Méthodes optiques	75
2.3.1	Microscopie de fluorescence monophotonique	75
2.3.2	Microscopie de fluorescence biphotonique résolue en temps	76
2.3.3	Spectroscopie de fluorescence monophotonique	79
2.4	Modélisation de l'interaction fluorophore/substrat	80
2.4.1	Géométrie des systèmes modélisés	80
2.4.2	Modèle de l'oscillateur dipolaire (théorie CPS)	81
2.4.3	Figures spatiales de rayonnement	83
2.4.4	Normalisation par rapport au taux d'excitation	84
2.4.5	Modélisation des échantillons d'épaisseur micrométrique	85
2.4.6	Modélisation de la perte de stigmatisme	86
3	Fluorescence moléculaire sur un film métallique nanostructuré	89
3.1	Résonance plasmon accordable	90
3.2	Mise en évidence des couplages métal-fluorophore	92
3.2.1	Couplage à l'excitation	93
3.2.2	Couplage à l'émission	96
3.3	Conclusion	101
4	Fluorescence et couplage intermoléculaire sur un film plan	103
4.1	Modifications des processus optiques	104
4.1.1	Exaltation à l'excitation	104
4.1.2	Exaltation à l'émission	105
4.1.3	Amélioration de la collection	108
4.1.4	Amplification du signal	111
4.1.5	Exaltation de la fluorescence biphotonique	114
4.2	Effet miroir pour les échantillons épais	119
4.2.1	Particularités des échantillons d'épaisseur micrométrique	119
4.2.2	Amplification moyenne du signal	120

4.2.3	Distribution angulaire de l'émission de fluorescence	121
4.3	Photostabilisation des fluorophores	124
4.3.1	Effets électromagnétiques	124
4.3.2	Mesure expérimentale de la photostabilité des fluorophores . . .	125
4.3.3	Influence de la configuration d'excitation	126
4.4	Modification des couplages intermoléculaires	127
4.4.1	Auto-extinction de la photoluminescence	127
4.4.2	Transfert résonant d'énergie de Förster	130
4.5	Conclusion	135
5	Effet plasmonique sur un film métallique nanorugueux	137
5.1	Élaboration et caractérisation des films nanorugueux	138
5.1.1	Structuration du film métallique	138
5.1.2	Étude topographique des films nanostructurés	138
5.2	Couplage avec les fluorophores	143
5.2.1	Influence de la morphologie du film métallique	143
5.2.2	Influence de la distance sur le couplage métal-fluorophore	144
5.3	Conclusion	146
6	Applications aux puces à ADN	149
6.1	Préparation des puces à ADN	149
6.1.1	Démonstration de principe	149
6.1.2	Mesure de l'épaisseur de la couche de polymère	150
6.2	Amplification du signal de fluorescence	151
6.2.1	Sur un film métallique plan	152
6.2.2	Sur un film métallique nanostructuré	153
6.2.3	Dispersion du signal de fluorescence	155
6.3	Conclusion	158
7	Applications à l'imagerie cellulaire et tissulaire	161
7.1	Imagerie de cellules épithéliales pour la cancérologie	162
7.1.1	Images de fluorescence	162
7.1.2	Étude statistique de l'exaltation du signal	166

7.1.3	Influence de l'ouverture numérique à la collection	167
7.1.4	Limites du modèle	168
7.2	Imagerie tissulaire pour le diagnostic médical	169
7.2.1	Contexte biomédical, limites et besoins	170
7.2.2	Conditions expérimentales	170
7.2.3	Imagerie et analyse des échantillons	171
7.3	Conclusion	173
7.3.1	Avantages pour l'imagerie biomédicale	173
7.3.2	Améliorations potentielles de la méthode	173
8	Conclusion générale	175
	Références	179

Introduction

La détection de fluorescence est maintenant une technologie centrale pour la recherche en médecine et en biologie, ainsi que dans les biotechnologies. Par exemple, le séquençage de l'ADN au moyen du marquage fluorescent, présenté pour la première fois en 1987 (Smith 1986, Prober 1987), a permis dès 2001 le décryptage de la quasi totalité du génome humain (Lander 2001, Pennisi 2001). La détection de fluorescence a supplanté la radioactivité dans la plupart des tests médicaux (Ichinose 1987, Anderson 1997). Plus récemment, des méthodes de fluorescence ont été adaptées à l'analyse haut-débit (*High-Throughput Analysis*) de l'expression des gènes, par l'utilisation de puces à ADN pouvant porter plus de 30 000 séquences d'ADN individuelles (*gene chips*) (Lipshutz 1999, Brown 1999).

La dernière décennie a également été marquée par une véritable renaissance de la microscopie de fluorescence (Conchello 2005, Lichtman 2005). L'introduction de nouveaux marqueurs fluorescents et le développement de techniques de microscopie originales ont rendu possible l'étude d'interactions biomoléculaires directement dans les cellules vivantes, et l'observation de leur structure et fonction dans les tissus vivants. L'émergence de ces techniques innovantes a eu un impact remarquable en biophysique, en neuroscience, en biologie du développement et cellulaire, ainsi que pour le diagnostic médical. Cependant, de nombreuses applications biologiques et médicales mettent en jeu la détection d'infimes quantités de biomolécules, et sont ainsi limitées par la faiblesse du signal dans des conditions d'observation standard.

Parallèlement au développement de nouveaux marqueurs fluorescents, un intérêt renouvelé pour les fluorophores moléculaires a été suscité par le développement de techniques optiques innovantes pour l'exaltation de fluorescence. Ces dix dernières années, l'utilisation des interactions fluorophore-métal pour l'exaltation de fluorescence, et ces applications en biologie, ont fait l'objet de nombreuses études et articles de revue (Barnes 1998, Amos 1999, Aslan 2005a, Aslan 2005b).

Le sujet de l'étude présentée dans ce mémoire de thèse est le développement de nanostructures métalliques pour l'exaltation des processus optiques, pour l'amélioration des techniques biologiques basées sur la détection de fluorescence. Différents types de nanostructures métalliques (miroirs plans, films nanostructurés, films nanorugueux) ont été élaborés sur des lames de verre et caractérisés par des méthodes de microscopie et de spectroscopie, dans le but de réaliser des substrats pour la biologie, qui puissent être utilisés à la place des substrats standard, pour améliorer les techniques de détection

et d'imagerie existantes.

L'organisation de ce mémoire de thèse est la suivante :

Le Chapitre 1 présente le contexte de l'étude, et l'état de l'art du contrôle électromagnétique des processus moléculaires. Nous détaillons les mécanismes de la fluorescence, ainsi que les propriétés particulières des *plasmons de surface*, qui jouent un rôle-clé dans le couplage fluorophore/métal. Les approches théoriques utilisées dans cette étude, notamment pour le travail de modélisation, sont exposées. Enfin, nous discutons les limites, les besoins et les principaux enjeux de deux applications majeures de la fluorescence : l'imagerie des cellules et des tissus, et les puces à ADN.

Le Chapitre 2 regroupe les méthodes expérimentales d'élaboration et de caractérisation des nanostructures métalliques, ainsi que les protocoles de préparation des échantillons pour les applications biologiques. Le détail des modèles pour la simulation de l'émission des fluorophores est donné à la fin de cette partie.

Le Chapitre 3 montre les résultats de l'étude expérimentale du couplage entre fluorophores et films métalliques nanostructurés. Le lien entre morphologie des nanostructures et propriétés optiques du substrat est étudié. Nous démontrons l'efficacité des films nanostructurés pour l'exaltation de la fluorescence et mettons en évidence le rôle crucial de la résonance plasmon.

Le Chapitre 4 est consacré à l'étude théorique et expérimentale de l'interaction entre un fluorophore et un film métallique plan (surface miroir). L'effet du substrat sur les processus d'excitation et d'émission du fluorophore est étudié par la modélisation, et par des mesures expérimentales de fluorescence mono- et bi-photonique (processus non-linéaire) résolues en temps et en fréquence. Enfin, l'influence du substrat sur les transferts d'énergie intermoléculaires est examinée.

Le Chapitre 5 traite du développement et de la caractérisation de films métalliques de rugosité contrôlée à l'échelle nanométrique. Nous étudions la possibilité de récupérer sous forme de lumière l'énergie transmise par les fluorophores au substrat métallique, en diffusant les plasmons de surface. Le gain d'amplification du signal de fluorescence, par rapport aux films métalliques plans, est évalué expérimentalement.

Les Chapitres 6 et 7 présentent les résultats des applications biomédicales de substrats métalliques plans et nanorugueux, pour l'amplification du signal et du contraste, sur les puces à ADN et pour l'imagerie des cellules et des tissus.

Chapitre 1

Contexte et état de l'art

Les interactions entre lumière et matière sont à la base d'un grand nombre de méthodes d'analyse, en physique fondamentale comme en chimie ou pour les sciences de la vie. Elles permettent généralement de sonder un échantillon sans contact et de manière non-destructive. Notamment, la fluorescence est couramment utilisée comme un "outil" d'analyse spectroscopique, *e.g.*, pour étudier la structure électronique d'un composé chimique. La fluorescence fournit également un contraste spécifique pour la microscopie, qui apporte des informations complémentaires aux contrastes d'absorption, de réflexion ou de diffusion. Cette technique d'imagerie s'est imposée avec le développement de *sondes fluorescentes* et de leur utilisation pour le marquage spécifique en biologie. Cependant, dans de nombreuses applications, les possibilités de cet "outil" sont limitées par la faiblesse du signal et la faible stabilité photochimique de ces sondes fluorescentes. Une des solutions proposées pour résoudre ce problème, outre le développement de nouvelles sondes fluorescentes plus performantes, et d'agir sur les "mécanismes" de la fluorescence, en modifiant les propriétés électromagnétiques de l'environnement local des sondes fluorescentes. Cela peut être fait en plaçant, dans leur environnement proche, une structure métallique (*e.g.*, un film métallique ou une nanoparticule métallique). L'interaction des sondes fluorescentes avec cette structure métallique est particulièrement forte lorsqu'elle met en jeu l'excitation résonante des *plasmons de surface*. Ces modes électromagnétiques peuvent être décrits comme des ondes de lumière piégées à l'interface entre le métal et le milieu diélectrique entourant la structure.

Le Chapitre 1 débute par une présentation des "mécanismes" de la fluorescence moléculaire et de ses applications en biologie (§ 1.1, p. 2). Puis les propriétés des plasmons et leur interaction avec la lumière sont décrites dans la section 1.2 (p. 14). De nombreuses études théoriques et expérimentales ont été menées sur la nature des interactions impliquées dans la modification des processus optiques, en présence de structures métalliques : les plus significatives sont résumées dans la section 1.3 (p. 25). Enfin, les principaux enjeux de la modification des processus optiques sont détaillés, pour deux applications majeures de la fluorescence en Biologie : l'imagerie des cellules et des tissus, et les puces à ADN (§ 1.4, p. 43).

1.1 Fluorescence appliquée à l'imagerie des systèmes biologiques

Nous présentons, dans cette première section du Chapitre 1, les mécanismes de la fluorescence moléculaire (§ 1.1.1, p. 2) et les possibilités de modification de ces processus, pour le développement de ses applications en biologie. Puis nous expliquons le principe du marquage fluorescent en biologie et de la microscopie de fluorescence (§ 1.1.2, p. 10).

1.1.1 Mécanismes de la fluorescence moléculaire

1.1.1.1 Historique

Premières observations de la photoluminescence

Les exemples d'émission de lumière par la matière, innombrables dans la Nature, sont depuis toujours sujets d'observation et de questionnement (pensons à la lueur émise par certains insectes tels les lucioles, par exemple). La luminescence de la matière peut être induite, *e.g.*, par une réaction chimique ou biochimique (c'est le cas pour les lucioles), une action mécanique ou électrique, *etc.* Elle peut également intervenir après que la matière a été exposée à la lumière (*photoluminescence*). Les premières études scientifiques sur ce phénomène remontent au début du *XVII^e* siècle, avec la préparation de la pierre de Bologne (Vincenzo Casciarolo, 1603), un matériau *phosphorescent* auquel les alchimistes donnèrent le surnom d'"éponge à lumière", car dans l'obscurité la pierre semblait rendre la lumière absorbée en plein jour. Le *XVII^e* siècle porte également le témoignage des premières observations de la *fluorescence* (Athanasius Kircher, 1646), dans des solutions contenant des extraits végétaux. Il faut toutefois attendre le *XIX^e* siècle pour que le terme "fluorescence" soit employé et le processus associé à cette émission de lumière colorée soit expliqué.

Découverte de la fluorescence

En 1845, le mathématicien et astronome John F. W. Herschell décrit la couleur superficielle d'une solution de quinine, observée à la lumière du soleil. La solution, qui semble transparente comme de l'eau en transmission, présente une couleur bleue sous une certaine incidence de la lumière. Reprenant l'expérience de Herschell, le physicien irlandais George G. Stokes élucide la nature du phénomène qu'Herschell nomme "dispersion épipolique". En dispersant la lumière du soleil au moyen d'un prisme, Stokes montre que seule la lumière ultra-violette induit l'émission de lumière bleue en surface de la solution de quinine. Stokes renouvelle l'expérience avec un minéral de fluorite, et nomme le phénomène "fluorescence" en référence au minéral. Suite à ces découvertes, Stokes formule la loi qui porte aujourd'hui son nom et qui stipule que la lumière émise par fluorescence a toujours une longueur d'onde plus grande que la lumière d'excitation. Les premières découvertes de Stokes forment la base de son travail futur sur l'utilisation de la fluorescence comme outil de spectroscopie de la lumière ultraviolette.

1.1.1.2 Principes fondamentaux de l'excitation et de l'émission moléculaires

La *fluorescence* est un des nombreux processus de luminescence permettant à une molécule de passer d'un état électronique excité à un état d'énergie plus basse, par émission de lumière. La luminescence induite par l'absorption de lumière est un phénomène appelé *photoluminescence*, ou plus précisément *fluorescence* et *phosphorescence*, suivant la nature de l'état excité et la voie de désexcitation. La fluorescence est la propriété qu'ont certains atomes et molécules d'absorber la lumière à une certaine longueur d'onde et d'émettre ensuite de la lumière à une longueur d'onde plus grande après un bref intervalle de temps nommé *durée de vie de fluorescence* (Abramowitz 2006b).

Le processus de fluorescence est gouverné par trois principaux événements, lesquels se déroulent sur des échelles de temps très différentes (séparées de plusieurs ordres de grandeur). La durée caractéristique associée au processus d'excitation d'une molécule par absorption d'un photon est de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s), tandis que la durée de relaxation vibrationnelle des électrons, qui fait suite immédiate à l'absorption d'un photon, est plus longue et se mesure en picosecondes (10^{-12} s). Le processus final, l'émission d'un photon de fluorescence et le retour de la molécule à l'état fondamental, nécessite un temps relativement long de l'ordre de la nanoseconde (10^{-9} s).

Pour une molécule donnée, il existe différents états excités (notés $S(0)$, $S(1)$ et $S(2)$ sur la Figure 1.1), selon l'énergie totale de l'électron et la symétrie des différents états de spin. Chaque état électronique est subdivisé en un certain nombre de niveaux d'énergie vibrationnelle et rotationnelle associés au noyau atomique et aux orbitales de liaison. L'état fondamental, pour la plupart des molécules organiques, est un état électronique singulet dans lequel tous les électrons ont des spins appariés (spins de signe opposé).

Les différents niveaux d'énergie du fluorophore impliqués dans l'absorption et l'émission de lumière sont conventionnellement présentés dans un *diagramme de Jablonski* (voir Fig. 1.1). Les lignes horizontales épaisses représentent les états électroniques singulets $S(0)$, $S(1)$ et $S(2)$, tandis que les lignes fines correspondent aux états vibrationnels (ici, l'existence d'états rotationnels n'est pas considérée). Les transitions entre ces états sont schématisées par des flèches verticales droites ou ondulées, suivant la nature du processus qui leur est associé. L'absorption et l'émission d'un photon sont représentées par une flèche droite, tandis que la conversion moléculaire interne et la relaxation non-radiative sont représentées par des flèches ondulées.

La molécule absorbe la lumière par quantités discrètes (quanta) d'énergie, chaque quantum correspondant à la différence d'énergie entre l'état initial (généralement l'état fondamental) et l'état final (un certain état excité de la molécule). La loi de Planck ($E = h\nu$) lie la fréquence du photon absorbé au quantum d'énergie. Si le photon absorbé contient plus d'énergie que nécessaire pour une simple transition électronique, alors l'excès d'énergie est converti en excitation vibrationnelle et rotationnelle. A température ambiante, le spectre d'absorption du fluorophore est un large *spectre de bande* (par opposition au *spectre de raies*) en raison de la proximité spectrale des niveaux

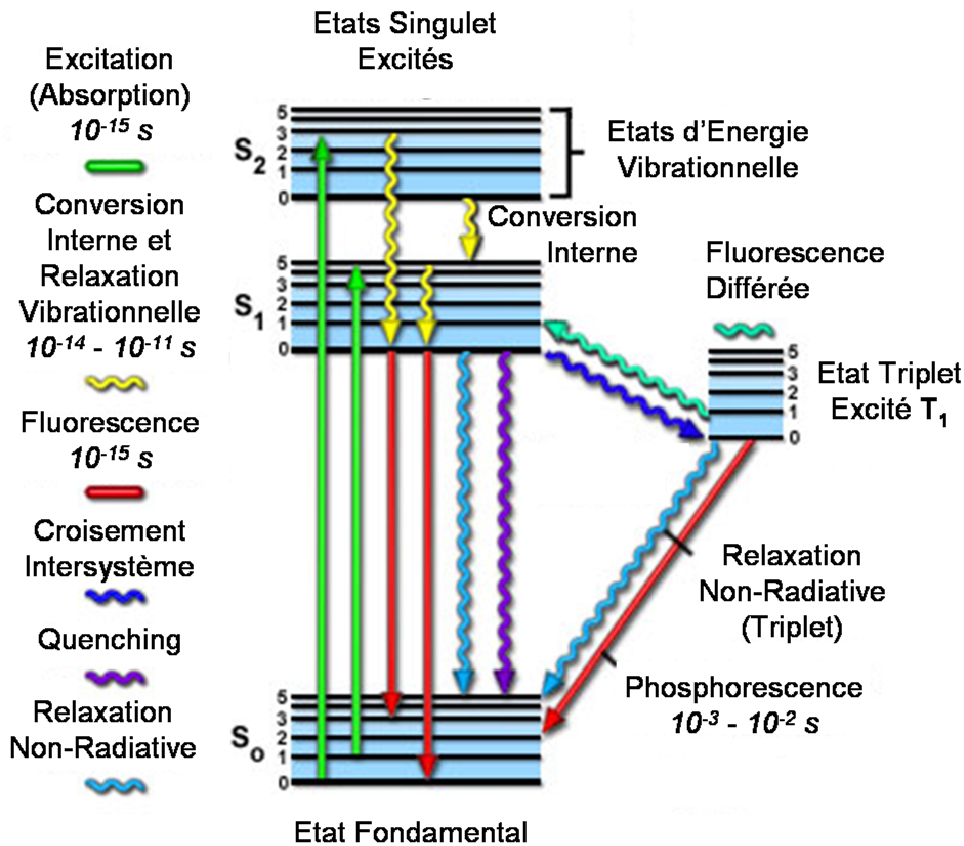


FIG. 1.1: Diagramme de Jablonski.

d'énergie vibrationnelle et de leur élargissement dû à l'agitation thermique. L'émission d'un photon par photoluminescence obéit également à une loi de quanta, et le spectre d'émission est un large spectre de bande pour les mêmes raisons invoquées pour l'absorption (Lakowicz 1999).

Immédiatement après l'absorption d'un photon, plusieurs processus peuvent intervenir, le plus probable étant la relaxation vers le niveau vibrationnel le plus bas du premier état électronique excité, noté $S(1) = 0$. Ce processus, nommé *conversion interne*, ou *relaxation vibrationnelle*, correspond à une perte d'énergie sans émission de lumière, dissipée sous forme de chaleur transmise aux autres fluorophores lors de collisions.

Une molécule excitée reste dans l'état $S(1) = 0$ durant une période de l'ordre de la nanoseconde, puis relaxe vers l'état électronique fondamental. Si cette relaxation s'accompagne de l'émission d'un photon, alors il s'agit d'un processus de fluorescence.

D'autres voies de relaxation, avec différents degrés de probabilité, sont en compétition avec le processus d'émission de fluorescence. L'énergie de l'état excité peut être dissipée non-radiativement sous forme de chaleur, le fluorophore excité peut interagir avec une autre molécule et lui transférer son énergie par une autre voie de relaxation, ou un phénomène nommé *croisement intersystème* avec le plus bas état triplet excité

$T(1)$ peut avoir lieu. Ce dernier événement est relativement rare, mais peut donner lieu à l'émission d'un photon par phosphorescence ou à une transition vers l'état singulet excité $S(1)$ pour une émission de fluorescence différée. Les transitions de l'état triplet excité à l'état singulet fondamental étant interdites, les durées de vie de phosphorescence sont plus grandes de plusieurs ordres de grandeur que celles de fluorescence.

1.1.1.3 Réactivité des fluorophores

La plupart des fluorophores peuvent répéter le cycle d'excitation/émission plusieurs centaines à plusieurs milliers de fois avant que la molécule excitée dans un état hautement réactif ne soit photoblanchie (destruction de la fluorescence). Par exemple, la *fluorescéine isothiocyanate* (FITC), sonde fluorescente très utilisée en Biologie, peut effectuer approximativement 30 000 cycles avant que la molécule soit détruite.

Les deux transitions possibles à partir de l'état triplet (phosphorescence et fluorescence différée) sont représentées sur le diagramme de Jablonski, à droite dans la Figure 1.1. La faible probabilité du croisement intersystème vient du fait que les molécules doivent d'abord effectuer une conversion de spin pour présenter des spins non-appareillés (de même signe), lequel processus est peu probable. L'importance première de l'état triplet est le haut degré de réactivité chimique des molécules dans cet état, qui souvent mène au photoblanchiment (*photobleaching*) et à la formation de radicaux libres. Dans les échantillons biologiques, l'oxygène dissout est un agent de *quenching* (extinction de la photoluminescence) efficace pour les fluorophores dans l'état triplet. La molécule d'oxygène à l'état fondamental, qui est normalement un état triplet, peut être excitée vers un état singulet réactif, donnant lieu à des réactions qui détruisent le fluorophore (par réaction photochimique) et présente un effet phototoxique sur les cellules vivantes. Les fluorophores dans l'état triplet peuvent réagir directement avec les molécules biologiques, ce qui a souvent pour effet de désactiver les deux espèces (Abramowitz 2006b).

1.1.1.4 Influence de paramètres extérieurs

L'émission de fluorescence est un processus d'émission spontanée. Rien ne peut être dit sur la réalisation d'un événement particulier d'émission de fluorescence, mais une probabilité d'émission peut être établie pour un ensemble de fluorophores.

Dans le cadre de la théorie quantique, pour un atome à deux niveaux notés $|a\rangle$ pour le niveau fondamental et $|b\rangle$ pour le niveau excité, le taux d'émission spontanée par couplage avec un champ électromagnétique monochromatique de fréquence ω_0 se calcule par la méthode des perturbations (on utilise la *règle d'or de Fermi*). Pour un atome placé dans le vide (espace libre), on obtient :

$$\Gamma_0^{b \rightarrow a} = \frac{4\omega_0^3}{3\hbar c^3} |\langle a | \mathbf{p} | b \rangle|^2 \quad (1.1)$$

où $\langle a|\mathbf{p}|b\rangle$ est l'élément de matrice de l'opérateur moment dipolaire électrique entre les états $|a\rangle$ et $|b\rangle$ (Lahmani 2004, Rahmani 2000). Les approches classique et quantique donnent des résultats strictement identiques pour le taux d'émission normalisé, *i.e.*, la variation du taux d'émission en présence d'un objet dans l'environnement de l'émetteur :

$$\left(\frac{\Gamma^{b\rightarrow a}}{\Gamma_0^{b\rightarrow a}}\right)_{\text{quantique}} = \left(\frac{\Gamma}{\Gamma_0}\right)_{\text{classique}} \quad (1.2)$$

La densité du champ électromagnétique à la fréquence ω_0 , également nommée densité de modes photoniques (*Photonic Mode Density*, PMD), décrit la capacité de la structure environnant l'émetteur à porter un photon (Barnes 1998). Les taux de relaxation de l'atome dépendent de son environnement électromagnétique, et peuvent être contrôlés *via* la PMD, en modifiant les conditions aux limites du champ électromagnétique. Par exemple, cela peut être réalisé en plaçant l'émetteur dans une cavité ou près d'une interface.

1.1.1.5 Contrôle électromagnétique de la fluorescence

Le contrôle de la PMD est un concept présent dans un nombre croissant d'applications biotechnologiques. Avant d'en expliquer le principe, présentons brièvement le contexte dans lequel émerge cette nouvelle approche de la fluorescence.

Contexte

La généralisation de la fluorescence comme outil pour la détection a été en partie motivée par les progrès technologiques réalisés dans le domaine des optiques, des détecteurs et de l'électronique. Cependant, les limites actuelles de cet outil sont celles de la chimie des sondes fluorescentes. Ces vingt dernières années, un grand nombre de nouveaux fluorophores ont été développés, principalement des molécules organiques (Lakowicz 1994, Haugland 1996) avec des pics d'absorption et d'émission dans un large spectre allant de l'ultraviolet au proche infrarouge.

La conception de fluorophores aux propriétés spectrales désirées est généralement réalisée par combinaison de fonctions chimiques simples et par essais systématiques de synthèse organique, en faisant très peu appel à des notions de physique quantique. Les maxima d'absorption et d'émission des fluorophores peuvent généralement être déduits par analogie de structure avec des fluorophores connus, et à l'aide de quelques principes généraux simples. Par contre, il est plus difficile de prédire si ces molécules sont fortement ou faiblement fluorescentes, ou bien même non-fluorescentes. Même si un fluorophore présente des propriétés spectrales intéressantes en solution, celles-ci sont susceptibles de changer lorsqu'il forme une liaison covalente avec une biomolécule. La conception et la synthèse de fluorophores utiles est un processus long, menant à autant d'échecs que de succès. C'est pourquoi l'idée de pouvoir contrôler physiquement – plutôt que chimiquement – les propriétés d'émission des fluorophores est si séduisante.

Cette nouvelle approche de la fluorescence consiste donc à influencer les fluorophores en perturbant leur environnement proche. En plaçant les fluorophores à proximité de surfaces réfléchissantes ou de structures métalliques de dimensions nanométriques, il est possible de modifier la PMD autour des fluorophores. En fonction de paramètres tels que la forme et la taille de ces nanostructures, ou la distance à la surface, des fluorophores peuvent voir leur émission exaltée ou annihilée, ou modifiée en termes de spectre et de durée de vie. Des combinaisons surface/fluorophore ou nanostructure/fluorophore peuvent également produire à une émission directionnelle plutôt qu'isotrope (Lukosz 1977a, Lukosz 1977b).

Modification des taux de transition du fluorophore

Les mécanismes mis en jeu dans cette interaction sont détaillés tout au long du Chapitre 1. Le principe général de l'exaltation de fluorescence peut être résumé dans un diagramme simplifié représentant schématiquement les niveaux excité $S(1)$ et fondamental $S(0)$ de la molécule. La Figure 1.2 représente sous forme de flèches les transitions entre ces deux niveaux.

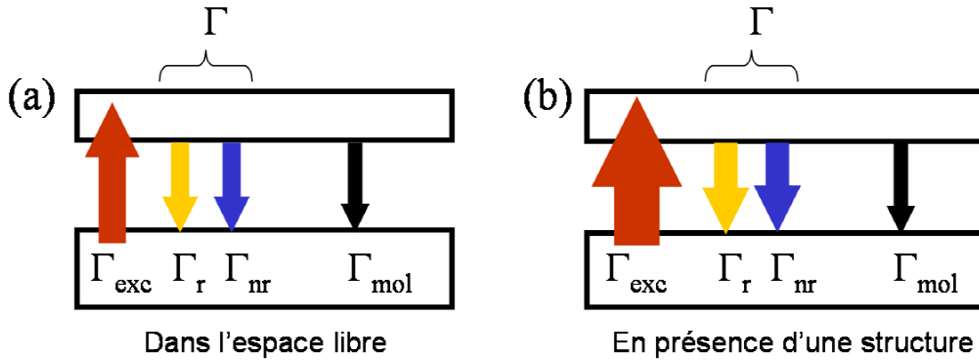


FIG. 1.2: Schémas simplifiés représentant les niveaux excité $S(1)$ et fondamental $S(0)$ d'un fluorophore, et les transitions entre ces deux niveaux (flèches de couleur), pour un fluorophore dans l'espace libre (a) et un fluorophore couplé à une structure quelconque (b). Γ_{exc} , Γ_r , Γ_{nr} et Γ_{mol} désignent les taux d'excitation, d'émission radiative et non-radiative, et de relaxation par des processus moléculaires. $\Gamma = \Gamma_r + \Gamma_{nr}$ est le taux d'émission, décrivant l'ensemble des processus de relaxation par couplage à un mode électromagnétique de l'environnement du fluorophore.

Les processus de relaxation par couplage à un mode électromagnétique de l'environnement du fluorophore sont caractérisés par le taux d'émission Γ . Une partie de ces modes sont radiatifs : ce sont les modes photoniques (taux d'émission radiative Γ_r). Les autres modes électromagnétiques (*e.g.*, des modes guidés) sont non-radiatifs (taux d'émission non-radiative Γ_{nr}). Le fluorophore peut également se désexciter par des processus internes, des processus photochimiques (*e.g.*, le photoblanchiment), ou par transfert incohérent de son énergie d'excitation aux autres molécules ou à une structure quelconque. Ces processus, caractérisés par le taux Γ_{mol} , sont indépendants de l'environnement électromagnétique du fluorophore. On note Γ_{tot} le taux de désexcitation total du fluorophore. La durée de vie de l'état excité de la molécule est définie comme l'inverse du taux de désexcitation total : $\tau = 1/\Gamma_{tot}$.

On définit le rendement quantique Q du fluorophore comme la proportion des processus électromagnétiques dans l'ensemble des processus de relaxation de la molécule excitée. Notez que le rendement quantique Q n'est pas défini comme le rendement radiatif Q_r du fluorophore, qui ne décrit que la proportion de processus menant à l'émission d'un photon (processus radiatifs).

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma_{tot}} = \frac{\Gamma_r + \Gamma_{nr}}{\Gamma_r + \Gamma_{nr} + \Gamma_{mol}} \quad (1.3)$$

$$Q_r = \frac{\Gamma_r}{\Gamma_{tot}} = \frac{\Gamma_r}{\Gamma_r + \Gamma_{nr} + \Gamma_{mol}} \quad (1.4)$$

L'interaction avec un élément extérieur peut fournir de nouveaux modes électromagnétiques auxquels le fluorophore peut se coupler pour émettre. Cela se traduit par un accroissement des taux d'émission radiative et non-radiative (*i.e.*, une augmentation de Q), et une réduction de la durée de vie de l'état excité. Le rendement quantique radiatif Q_r du fluorophore est soit augmenté (exaltation) soit diminué (*quenching*), suivant que cette interaction est en faveur des processus radiatifs ou non-radiatifs.

Enfin, la présence d'une surface ou d'une nanostructure modifie localement le champ électromagnétique, et est susceptible d'avoir une influence sur les processus d'excitation du fluorophore (modification du taux d'excitation Γ_{exc}). Ce type d'interaction met en jeu des effets d'interférences (avec les surfaces réfléchissantes) et des phénomènes d'excitation résonante de charges électriques confinées dans les nanostructures métalliques (*plasmon*).

Application à l'exaltation de fluorescence

A titre d'exemple, la Figure 1.3 présente une étude sur l'exaltation de la fluorescence intrinsèque de l'ADN (sans marqueur). Lakowicz *et al.* (Lakowicz 2001b) ont utilisé des lames de quartz couvertes d'un film d'îlots d'argent pour former une microcuvette (Fig. 1.3a) dans laquelle l'émission de fluorescence est amplifiée, grâce au couplage entre les molécules et les particules métalliques. Le spectre d'absorption des îlots d'argent (Fig. 1.3b) révèle une forte interaction avec la lumière, pour une certaine fréquence d'excitation (pic d'absorption). La comparaison des spectres de fluorescence de l'ADN (Fig. 1.3c) avec et sans métal met en évidence l'amplification de l'intensité du signal de fluorescence, ordinairement faible à cause du très bas rendement quantique de l'ADN. Des mesures résolues en temps (Fig. 1.3d) révèlent une baisse de la durée de vie de l'état excité de la molécule en présence des particules d'argent, signe d'une augmentation des taux de désexcitation.

Influence sur le photoblanchiment

Une limite majeure en spectroscopie moléculaire est le nombre fini de cycles d'excitation/émission qu'une molécule fluorescente peut effectuée avant d'être photodétruite. Dans l'un de ces travaux théoriques, Enderlein (Enderlein 1999) rappelle que le taux de

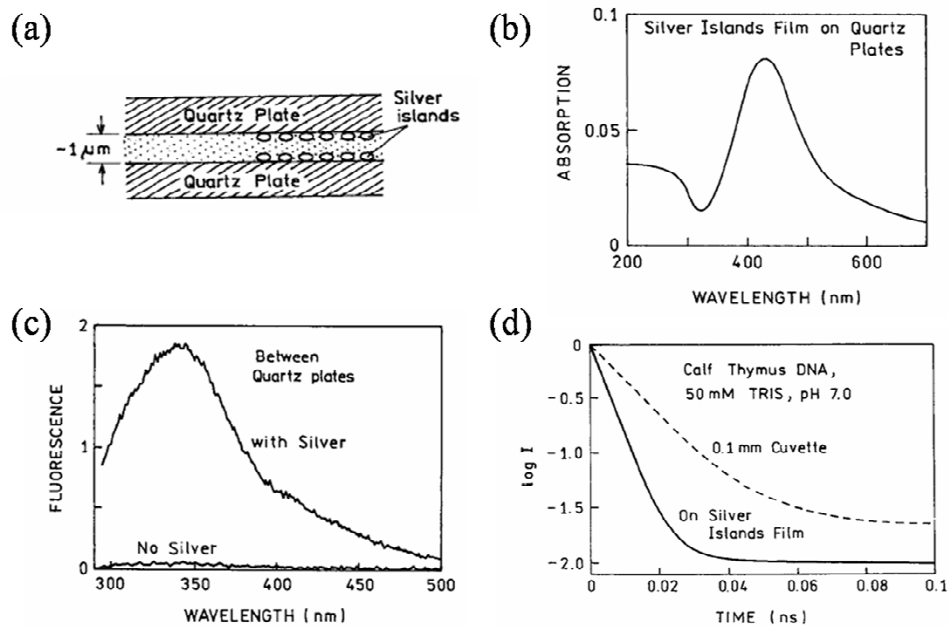


FIG. 1.3: Exaltation de la fluorescence intrinsèque de l'ADN sur un film d'îlots d'argent (Lakowicz 2001b). (a) Dispositif expérimental. (b) Spectre d'absorption d'une lame de quartz couverte d'un film d'îlots d'argent. (c) Spectres d'émission de l'ADN entre deux lames de quartz (sans argent) et avec des îlots d'argent. (d) Déclins de fluorescence (intensité émise en fonction du temps) de l'ADN en solution (sans argent) et entre deux films d'îlots d'argent.

photoblanchiment d'une molécule est proportionnel au temps qu'elle passe dans l'état excité. L'auteur démontre ensuite que le couplage de la molécule avec un substrat métallique est susceptible d'écourter la durée de vie de son état excité et de limiter, de fait, l'effet du photoblanchiment. Lorsqu'elle est située à une distance appropriée optimisant le couplage au substrat, la molécule accomplit un plus grand nombre de cycles d'excitation/émission, émettant un plus grand nombre de photons avant d'être détruite. Vasilev *et al.* (Vasilev 2004) ont vérifié expérimentalement ce phénomène en mesurant l'atténuation progressive de la fluorescence de molécules DiICl(5) (des colorants de type cyanine), sous excitation continue, déposées sur un substrat d'or ultra plat et séparées de sa surface par une couche d'un matériau isolant. Les auteurs ont constaté la variation du rendement de photoblanchiment en fonction de la distance au métal et de l'orientation relative des molécules (par rapport à la surface). Ainsi, ils ont vérifié l'influence de la force du couplage fluorophore/substrat sur la photostabilité des fluorophores.

1.1.2 Le marquage fluorescent en biologie

1.1.2.1 Historique

Premiers fluorophores synthétiques et premières utilisations en biologie

En travaillant avec de l'*aniline* obtenue par distillation à partir de déchets de goudron de houille, William H. Perkin découvre en 1856 le premier colorant utilisable à l'échelle industrielle, pour teindre la laine ou la soie : la *mauvéine*. Sa découverte, qui est aujourd'hui associée à la naissance de l'industrie des colorants synthétiques, attire alors l'intérêt d'un grand nombre de chimistes. En 1871, le chimiste allemand Adolph von Baeyer synthétise pour la première fois un colorant fluorescent : la *fluorescéine*. Dès 1880, la firme allemande Dr. G. Greublers Chemisches Laboratorium teste et débute la distribution de colorants pour la recherche biologique et médicale. La première utilisation de colorants synthétiques pour une étude biologique *in vivo* est réalisée en 1882, par Paul Erlich. Karl Noack en 1887, puis Heinrich Kayser en 1908, publient des ouvrages de références recensant plus d'un millier de composés fluorescents, laissant présager de l'extraordinaire richesse de molécules fluorescentes aujourd'hui proposées dans le commerce pour la biologie et la médecine.

Émergence de la microscopie de fluorescence

En 1904, August Köhler (scientifique allemand et expert en microscopie dans l'entreprise Zeiss Optical Works) met au point le premier microscope opérant dans le domaine ultraviolet du spectre. Le microscope imaginé par Köhler comprend une source de lumière ultraviolette (lampe à arc cadmium) et des lentilles en quartz. Malgré les limites considérables de l'appareil, le premier *microscope ultraviolet* ouvre la voie aux multiples possibilités de la microscopie de fluorescence.

Les premiers *microscopes de fluorescence* sont développés entre 1911 et 1913, par les physiciens allemands Otto Heimstädt et Heinrich Lehmann, à partir de microscopes à lumière ultraviolette. Les microscopes de fluorescence sont d'abord employés pour observer l'autofluorescence (fluorescence naturelle des molécules biologiques) de bactéries, de cellules animales et végétales. En 1914, le biologiste allemand Stanislav von Provazek initie une nouvelle ère en utilisant le microscope de fluorescence pour étudier le marquage avec des colorants de tissus fixés et de cellules vivantes. En 1929, les biochimiste et biologiste allemands Philipp Ellinger et August Hirt modifient le microscope de fluorescence en transmission pour pouvoir étudier des échantillons épais tels que des organes vivants. Leur invention, qu'ils nomment "microscope intravital", est considérée comme le premier microscope d'*épi-fluorescence* (lumière d'excitation acheminée par l'objectif de collection de la fluorescence). Un pas supplémentaire vers l'imagerie biologique moderne est franchi avec le développement par Albert Coons, dans les années 1940, d'une technique de marquage des anticorps avec des colorants, donnant ainsi naissance à l'*immunofluorescence*. Au tournant du XXI^e siècle, le domaine de la microscopie de fluorescence a été à l'origine d'une révolution dans la biologie cellulaire, en couplant la puissance de l'imagerie de cellules vivantes au marquage multiple et

hautement spécifique d'organelles et de complexes macromoléculaires avec des sondes fluorescentes synthétiques et génétiques.

1.1.2.2 Nature des marqueurs fluorescents

Les molécules capables de subir des transitions électroniques menant à l'émission d'un photon de fluorescence sont désignées par le terme de *sondes fluorescentes*, *fluorophores*, ou simplement *colorants*. En général, on distingue les fluorophores *intrinsèques* et *extrinsèques*. Les fluorophores intrinsèques, telles que les acides aminés aromatiques, les porphyrines et les protéines fluorescentes, se forment naturellement.

Les fluorophores extrinsèques sont des colorants synthétiques, ou des produits biochimiques modifiés, introduits dans le système biologique pour marquer spécifiquement un élément qui ne fluoresce pas (ou pas assez) naturellement. Les fluorophores les plus utilisés sont des molécules aromatiques, polycycliques et fortement conjuguées. Un système chimique conjugué est un ensemble d'atomes liés par une succession alternée de simples et doubles (ou triples) liaisons covalentes (mise en commun d'une ou plusieurs paires d'électrons des couches externes des deux atomes liés) dans une molécule d'un composé organique. Il prend la forme de chaînes linéaires (généralement formées d'atomes de carbone) et/ou de cycles (chaînes de 5 ou 6 atomes fermées sur elles-mêmes). Un tel système crée, dans la molécule, une région où les électrons n'appartiennent plus à un atome ou une liaison en particulier, mais sont délocalisés. Ce phénomène accroît la stabilité de la molécule et diminue son énergie totale. Cela permet aux photons de basse énergie, *i.e.*, du domaine visible du spectre électromagnétique, d'être absorbés par excitation des liaisons de la molécule. Des effets de délocalisation particulièrement forts (résonance) sont observés pour certains types de cycles (les cycles aromatiques) (Schleyer 2001, Schleyer 2005) que l'on retrouve dans de nombreuses molécules fluorescentes. Une grande variété de chaînes et des cycles conjugués différents peuvent être assemblés suivant diverses géométries, pour former autant de fluorophores différents possédant chacun des propriétés optiques particulières.

L'exemple de la famille des cyanines, colorants couramment utilisés en biologie et notamment pour le marquage fluorescent de l'ADN, illustre bien l'influence que peut avoir un changement minime de structure moléculaire sur les propriétés optiques d'un fluorophore. L'indocarbocyanine (Cy3), l'indodicarbocyanine (Cy5) et l'indotricarbocyanine (Cy7) ne diffèrent que par la longueur de leur chaîne conjuguée hydrocarbonée. Comme le montre le spectre d'absorption de ces trois molécules (voir Fig. 1.4), ce paramètre structural détermine l'énergie du système conjugué et, de fait, l'énergie des photons absorbés.

1.1.2.3 Principe de détection

Jusqu'à la fin du *XIX*^e siècle, la microscopie optique était uniquement basée sur le contraste d'absorption de l'échantillon. Les microscopes ne permettant alors que l'observation en transmission de l'échantillon, le contraste de l'image était faible et limité

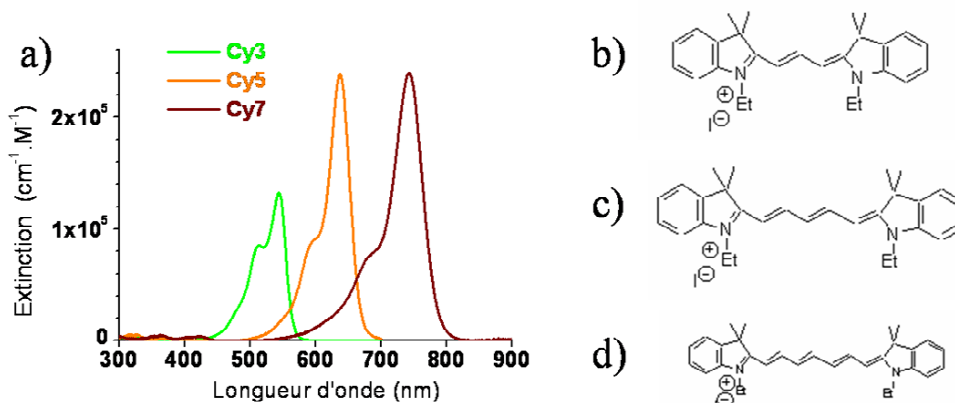


FIG. 1.4: Spectres d'absorption et formules développées de trois sondes fluorescentes de structure moléculaire proche. (a) Coefficient d'extinction en fonction de la longueur d'onde d'excitation. (b-d) Formules développées de l'indocarbocyanine ($Cy3^{TM}$), de l'indodicarbocyanine ($Cy5^{TM}$) et de l'indotricarbocyanine ($Cy7^{TM}$).

par la diffusion de la lumière. Pour les besoins de la biologie cellulaire en particulier, des techniques nouvelles d'exaltation du contraste en microscopie ont été développées au début du XX^e siècle. Les plus significatives de ces inventions sont le contraste de phase (F. Zernike et C. Zeiss, 1934), le contraste d'interférences différentielles (G. Nomarski, 1953), et surtout la microscopie de fluorescence (voir § 1.1.1.1, p.2).

L'avantage majeur de la fluorescence sur les autres techniques de microscopie optique réside dans la loi de Stokes (voir § 1.1.1.1, p.2) : la longueur d'onde de l'émission de fluorescence est toujours plus grande que la longueur d'onde d'excitation. Les sources d'excitation ultraviolette, associées aux premiers microscopes de fluorescence, permettaient d'éclairer l'échantillon d'une lumière invisible à l'oeil nu et induisant une émission dans la partie visible du spectre (généralement bleue). L'échantillon apparaissait clair sur fond sombre, permettant ainsi un bien meilleur contraste.

Les progrès constants dans la réalisation des filtres optiques permettent de séparer l'excitation de l'émission de fluorescence, quelle que soit la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, le domaine spectral d'application de la microscopie de fluorescence s'est étendu à tout le spectre visible, le proche ultraviolet et le proche infrarouge, notamment depuis l'essor technologique des sources lasers et grâce au développement du marquage fluorescent en biologie.

Chaque fluorophore est caractérisé par un spectre d'absorption et un spectre d'émission, lesquels se recouvrent très peu. Ces spectres présentent un pic d'absorption et un pic d'émission, généralement bien marqués, séparés d'un intervalle spectral nommé *déplacement de Stokes* (*Stokes shift*), en référence à la loi de Stokes. En utilisant des filtres ne laissant passer que certaines bandes du spectre, il est possible d'imager uniquement la partie fluorescente (ou marquée avec un fluorophore synthétique) de l'échantillon. Avec un filtre à l'excitation et un filtre à l'émission, dont les spectres de transmission ne se recouvrent pas, on élimine la lumière d'excitation diffusée par l'objet (voir Fig. 1.5). C'est le principe du microscope de fluorescence (Abramowitz 2006a), qui comprend en

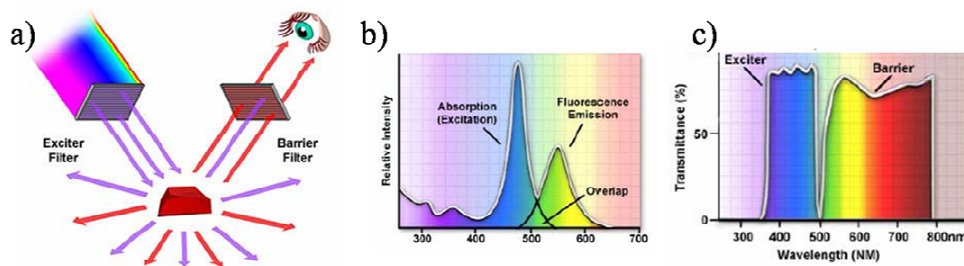


FIG. 1.5: Principe de la détection de fluorescence. (a) Schéma de principe de l'utilisation de filtres à l'excitation (*Exciter filter*) et à l'émission (*Barrier filter*). (b) Spectres d'absorption et de fluorescence d'une molécule. (c) Spectres de transmission de deux filtres optiques passe-bandes : le spectre du filtre à l'excitation est centré sur le pic d'absorption de la molécule, tandis que le spectre à l'émission est centré sur son pic de fluorescence. Les spectres de transmission des deux filtres ne se recouvrent pas, afin de ne pas détecter la lumière d'excitation.

plus un objectif et un *miroir dichroïque* pour pouvoir exciter et collecter la fluorescence par le même objectif (épifluorescence) (voir Fig. 1.6). Le miroir dichroïque réfléchit vers l'objectif la lumière venant de la source d'excitation, tandis qu'il transmet vers l'oculaire la lumière de fluorescence émise par l'échantillon. On doit cette configuration innovante à Johan S. Ploem qui inventa le *cube optique* : élément du microscope regroupant les filtres d'excitation et d'émission, ainsi que le miroir dichroïque, associés à la détection d'un fluorophore. Les microscopes modernes comportent généralement une série de cubes interchangeables, afin de pouvoir observer successivement différents fluorophores.

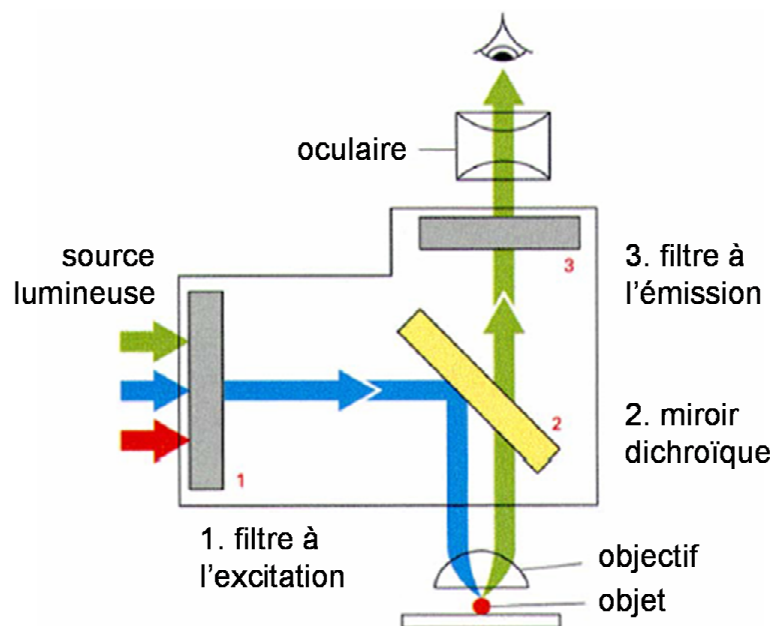


FIG. 1.6: Schéma du microscope de fluorescence.

Le microscope de fluorescence offre donc une solution au problème du contraste, en séparant l'émission de l'excitation, mais fournit surtout un contraste sélectif permettant de reconnaître différentes parties de l'objet étudié, la sélectivité étant apportée par la présence des fluorophores.

1.1.2.4 Avantages et limites

De nombreuses études et applications biologiques mettent en jeu la détection de biomolécules par des mesures de fluorescence. L'utilisation de marqueurs fluorescents est notamment la technique de marquage la plus répandue pour l'imagerie cellulaire. Une large gamme de fluorophores est disponible, avec des caractéristiques spectrales distinctes, offrant de multiples possibilités pour un marquage biologique multicolore. La plupart des fluorophores moléculaires utilisés en biologie cellulaire ont été élaborés dans le but d'assurer une haute biocompatibilité. Lorsqu'ils sont associés à des molécules biologiques actives, les fluorophores moléculaires permettent de marquer spécifiquement des entités cellulaires (organelles, ADN, *etc.*) qui jouent un rôle essentiel dans les processus cellulaires. Par exemple, la technique d'immunofluorescence rend possible la détection d'antigènes grâce à leur reconnaissance par des anticorps couplés à des molécules fluorescentes uniques. En utilisant un jeu multicolore de colorants fonctionnalisés (biomarqueurs) et de filtres optiques appropriés, on peut ainsi imager sélectivement des parties de la cellule, ou encore suivre plusieurs biomolécules actives à l'intérieur de la cellule.

Alors que la biocompatibilité et le marquage multicolore sont les principaux avantages des molécules fluorescentes, leur coefficient d'extinction est relativement faible par rapport à celui de nanoparticules fluorescentes telles que les nanocristaux de semi-conducteurs (Seydack 2005). Par conséquent, la détection de faibles concentrations de fluorophores (même de rendement quantique idéal) est limitée par la faiblesse du signal.

Un autre inconvénient des fluorophores moléculaires est lié à leur faible photostabilité. Lorsqu'elle est excitée, une molécule fluorescente peut en effet être impliquée dans des réactions chimiques, en particulier avec des radicaux libres d'oxygène. Ce phénomène de photoblanchiment cause la perte irréversible des propriétés de fluorescence de la molécule. Par conséquent, sous excitation continue, la lumière émise par une assemblée de fluorophores s'atténue progressivement au fur et à mesure de leur photodestruction.

1.2 Nature et propriétés des plasmons

Les *plasmons* sont des modes électromagnétiques associés aux variations locales de la densité de charges électriques dans les métaux (§ 1.2.1, p. 15). Dans les nanostructures telles que les nanoparticules métalliques, ces modes sont fortement résonants et interagissent avec la lumière (§ 1.2.2, p. 16). Sur une surface métallique plane, les plasmons de surface ne peuvent pas se coupler directement avec la lumière, mais se

propagent le long de l'interface métallique (§ 1.2.3, p. 16). Différentes configurations permettent, cependant, de réaliser ce couplage pour bénéficier des intenses amplifications de champ local associées à l'excitation de ces modes (§ 1.2.4, p. 20).

1.2.1 Qu'est-ce qu'un plasmon ?

Les électrons libres d'un métal peuvent être décrits comme un liquide d'électrons de haute densité ($\sim 10^{23} \text{ cm}^{-3}$), *i.e.*, un *plasma*. Ce modèle simple, dans lequel la présence du réseau d'atomes est ignorée, permet de retrouver les propriétés électroniques fondamentales des métaux à l'état solide. Cette approche prévoit l'existence de modes d'oscillation collective des électrons, appelés *plasmons* (Raether 1988). Les électrons portant une charge électrique, leurs oscillations sont associées à des champs électromagnétiques. Il est nécessaire, pour décrire les plasmons, d'étudier l'interaction entre ces champs et les charges électriques. Les conditions aux limites des champs électromagnétiques imposent des conditions à l'existence des plasmons, lesquelles diffèrent suivant la géométrie du système. On distingue quatre familles de plasmons, en fonction de la dimension du confinement spatial des électrons de conduction dans le métal (Sönnichsen 2001) : (i) les *plasmons de volume*, dans un matériau massif (pas de confinement spatial) ; (ii) les *plasmons de surface*, à l'interface entre un métal et un matériau non-conducteur (confinement 2D) ; (iii) les *plasmons guidés*, le long d'un fil métallique de section nanométrique (confinement 1D) ; et (iv) les *plasmons localisés*, dans une particule métallique de taille nanométrique (confinement 0D).

Les plasmons de volume sont associés aux ondes longitudinales de fluctuation de la densité électronique qui se propagent dans le volume d'un métal massif. Le quantum d'énergie associé aux plasmons de volume est

$$\hbar\omega_p = \hbar\sqrt{\frac{ne^2}{m_0\epsilon_0}} \quad (1.5)$$

où n , e , m_0 et ϵ_0 sont respectivement la densité électronique, la charge élémentaire, la masse effective des électrons et la permittivité du vide ($\hbar\omega_p \sim 10 \text{ eV}$). La fréquence $\omega_p/(2\pi)$ associée à ce quantum d'énergie est nommée *fréquence plasmon*. Les plasmons de volume peuvent être excités par tirs d'électrons dans le métal, ce qui a été étudié en détails théoriquement et expérimentalement par spectroscopie de perte d'électrons (Raether 1980).

Les plasmons jouent un rôle majeur dans les propriétés optiques des métaux. Une onde électromagnétique de fréquence *inférieure* à la fréquence plasmon est réfléchiée car les électrons du métal écrantent le champ incident. Une onde électromagnétique de fréquence *supérieure* à la fréquence plasmon est transmise car les électrons ne répondent pas suffisamment rapidement pour l'écranter. Dans la plupart des métaux, la fréquence plasmon se situe dans l'ultraviolet, ce qui leur donne cet aspect "luisant" (réfléchissant) dans le domaine visible. Notez que certains métaux, tels que le cuivre, doivent leur couleur particulière au fait que leur fréquence plasmon est située dans le visible.

1.2.2 Plasmons localisés dans les nanoparticules métalliques

Un des aspects les plus intéressants des nanoparticules métalliques est que leur propriétés optiques dépendent fortement de leur taille. Éclairé en lumière blanche, l'or massif "brille" d'une teinte jaune (en réflexion) tandis qu'une lame de verre couverte d'un film mince d'or apparaît bleue (en transmission). En outre, la couleur d'une solution colloïdale d'or varie continûment du bleu à l'orange, en passant par différentes teintes pourpres et rouges, lorsque la taille des nanoparticules est réduite jusqu'à ~ 3 nm (voir Fig. 1.7).



FIG. 1.7: Photographie en lumière blanche, en transmission (a) et en réflexion (b), de solutions colloïdales contenant des nanoparticules sphériques de différentes tailles. Le rayon moyen des nanoparticules est, en prenant les flacons de gauche à droite : 150 / 100 / 80 / 60 / 40 / 20 nm. La teinte des solutions colloïdales d'or (en transmission) passe du bleu au rouge lorsque la taille des particules diminue (Liz-Marzán 2004).

Lorsque leur taille est petite devant la longueur d'onde, les propriétés optiques des nanoparticules métalliques sont dominées par l'oscillation collective des électrons de conduction (*plasmon de surface localisé*) induite par interaction avec un rayonnement électromagnétique. Le champ électrique du rayonnement incident induit la formation d'un dipôle dans la nanoparticule (voir Fig. 1.8). Une force de rappel s'oppose alors aux déplacements des électrons par rapport au centre de la particule (*confinement spatial*). Comme pour un oscillateur harmonique mécanique, l'oscillation des charges dans la nanoparticule est résonante pour une certaine fréquence d'excitation (*résonance plasmon*). Seuls les métaux possédant des électrons libres (essentiellement l'or, l'argent, le cuivre, et les métaux alcalins) possèdent des résonances plasmons dans le spectre visible, et présentent pour cette raison de telles couleurs intenses. La fréquence de résonance plasmon est déterminée par la force de rappel des électrons de conduction, laquelle dépend d'un grand nombre de paramètres tels que la composition, la taille (voir Fig. 1.7) et la forme des particules (Kreibig 1996, Mock 2002).

1.2.3 Plasmons de surface

1.2.3.1 Nature des plasmons de surface

Au niveau d'une interface entre un métal et un matériau diélectrique, la densité de charge possède des modes de fluctuation cohérente (oscillation collective des charges)

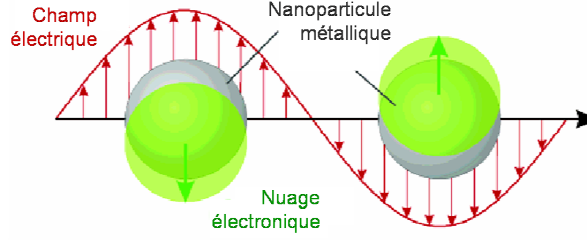


FIG. 1.8: Schéma illustrant l'action d'un champ électromagnétique sur le plasmon d'une nanoparticule métallique, montrant le déplacement du nuage électronique par rapport au centre la nanoparticule (Kelly 2003).

appelées *plasmons de surface* (Ritchie 1957). Leur existence a été démontrée expérimentalement par Powell & Swan, par des mesures de spectroscopie de perte d'électrons (Powell 1960). Les plasmons de surface sont associés à des ondes électromagnétiques se propageant à l'interface des deux matériaux et un champ électromagnétique possédant des composantes transversales et longitudinales. L'intensité de ce champ est maximale au niveau de l'interface et décroît exponentiellement suivant la direction normale à l'interface, dans le métal comme dans le matériau diélectrique. Le champ a pour expression :

$$E = E_0^\pm \exp [+i(k_x x \pm k_z z - \omega t)] \quad (1.6)$$

où z et x sont les variables d'espace dans les directions normale et parallèle à la surface. Le signe \pm est positif pour $z \geq 0$ et négatif pour $z \leq 0$. En raison du confinement de l'onde suivant la direction normale à la surface, son vecteur d'onde possède une composante normale k_z purement imaginaire, d'où la décroissance exponentielle du champ. La composante parallèle k_x est complexe, et son expression est obtenue par dérivation des équations de Maxwell (Raether 1988) :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right)^{1/2} \quad (1.7)$$

On note ε_1 et ε_2 les permittivités respectives du métal et du matériau diélectrique, et $\varepsilon_1 = \varepsilon_1/\varepsilon_0$ et $\varepsilon_2 = \varepsilon_2/\varepsilon_0$ leurs *permittivités relatives* – ou *fonctions diélectriques* (sans dimension). La fréquence d'oscillation de l'onde $\omega/(2\pi)$ est supposée purement réelle, tout comme ε_2 . La fonction diélectrique du métal ε_1 est complexe ($\varepsilon_1 = \varepsilon_1' + i\varepsilon_1''$) et sa partie réelle est négative ($\varepsilon_1' < 0$). Dans le cas où $\varepsilon_1'' < |\varepsilon_1'|$, alors on peut écrire l'expression de la composante complexe $k_x = k_x' + ik_x''$ avec

$$k_x' = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_1' \varepsilon_2}{\varepsilon_1' + \varepsilon_2} \right)^{1/2} \quad (1.8)$$

$$k_x'' = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_1' \varepsilon_2}{\varepsilon_1' + \varepsilon_2} \right)^{3/2} \frac{\varepsilon_1''}{2(\varepsilon_1')^2} \quad (1.9)$$

Pour que k_x' soit réel, il est nécessaire de vérifier $|\varepsilon_1'| > \varepsilon_2$. Cette condition, qui est associée au comportement métallique du matériau, est généralement vérifiée par les métaux dans le domaine des fréquences optiques.

1.2.3.2 Dispersion

Le vecteur d'onde et la fréquence d'oscillation d'une onde électromagnétique sont liés par la *relation de dispersion*. Celle d'un photon se propageant dans le milieu diélectrique (ε_2) s'écrit $k = (\omega/c)\sqrt{\varepsilon_2}$. Celle d'un plasmon de surface se propageant à l'interface métal/diélectrique décrite précédemment est donnée par la relation 1.8. Contrairement à celle des photons, la relation de dispersion des plasmons de surface n'est pas linéaire, car ε_1 est une fonction de ω . La Figure 1.9 présente la courbe de dispersion des plasmons à l'interface argent/air (Sönnichsen 2001). La fréquence d'oscillation et le vecteur d'onde sont exprimés en unités d'énergie.

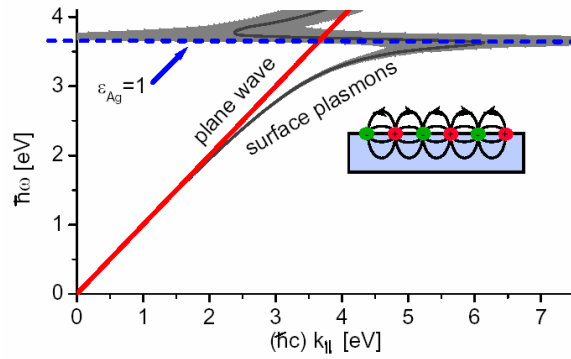


FIG. 1.9: Dispersion des plasmons à l'interface argent/air. La fréquence d'oscillation et le vecteur d'onde sont exprimés en unités d'énergie. La largeur de la ligne représente l'incertitude sur le moment $\hbar k$ du plasmon, due à sa durée de vie finie. Les modes de basse énergie sont des plasmons de surface (le schéma montre les charges électriques de surface), tandis que les modes de haute énergie se propagent dans le volume (à ces fréquences, l'argent n'a pas un comportement métallique). La ligne en pointillés indique la limite stationnaire des plasmons de surface non-propagatifs ($\omega = \omega_{sp}$). La largeur de la ligne, à cette fréquence, indique un fort amortissement (Sönnichsen 2001).

Dans le domaine des basses fréquences $\omega < \omega_p/\sqrt{1 + \varepsilon_2}$, dans lequel la condition $|\varepsilon'_1| > \varepsilon_2$ est vérifiée, la composante parallèle du vecteur d'onde des plasmons de surface est plus grand que celle des photons incidents. Ce désaccord de vecteur d'onde est responsable de la nature non-radiative des plasmons de surface. En effet, la conversion d'un plasmon de surface en un photon requiert la conservation de l'énergie $\hbar\omega$ et du moment $\hbar k_{||}$, et n'est donc autorisée qu'aux points d'intersection de leurs courbes de dispersion. Aux grands vecteurs d'onde $k_{||}$, *i.e.*, lorsque ε'_1 tend vers $-\varepsilon_2$ (sur la Fig. 1.9, $\varepsilon'_{Ag} \rightarrow -1$), la fréquence d'oscillation de l'onde tend asymptotiquement vers

$$\omega_{sp} = \left(\frac{\omega_p^2}{1 + \varepsilon_2} \right)^{1/2}$$

(sur la Fig. 1.9, $\omega_{sp} = \omega_p/\sqrt{2}$). Vers cette limite, la vitesse de groupe $\partial k_{||}/\partial \omega$ tend vers 0, tout comme la vitesse de phase $k_{||}/\omega$, si bien que le plasmon de surface s'apparente alors à une fluctuation localisée de la densité électronique (plasmons de surface non-propagatifs) (Raether 1988, Sönnichsen 2001).

Le domaine des hautes fréquences ($\omega > \omega_p$) est associé à un comportement non-métallique (l'argent ne réfléchit pas la lumière à ces fréquences élevées) : les modes de haute énergie se propagent seulement dans le volume et ne sont pas à proprement parler des plasmons de surface.

1.2.3.3 Extension spatiale

La composante normale k_{zi} ($i = 1$ dans le métal, $i = 2$ dans le matériau diélectrique) et la composante parallèle k_x du vecteur d'onde vérifient la relation suivante :

$$k_{zi} = \left[\varepsilon_i \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 - k_x^2 \right]^{1/2}, \quad i \in \{1, 2\} \quad (1.10)$$

Dans le domaine des basses fréquences $\omega < \omega_p / \sqrt{1 + \varepsilon_2}$, k_x est toujours supérieur à $\sqrt{\varepsilon_i} \left(\frac{\omega}{c} \right)$, d'où la nature imaginaire de k_{zi} .

L'amplitude du champ associé aux plasmons de surface décroît exponentiellement suivant une loi en $\exp(-|k_{zi}||z|)$, où z est la distance normale à l'interface. La pénétration du champ dans le métal et le matériau diélectrique est caractérisée par l'épaisseur de peau \hat{z} , définie comme la distance à laquelle l'amplitude du champ a décré d'un facteur e .

$$\hat{z}_i = |k_{zi}|^{-1}, \quad i \in \{1, 2\} \quad (1.11)$$

Soit, dans le matériau diélectrique :

$$\hat{z}_2 = \frac{\lambda}{2\pi} \left(\frac{\varepsilon'_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_2^2} \right)^{1/2} \quad (1.12)$$

et dans le métal :

$$\hat{z}_1 = \frac{\lambda}{2\pi} \left(\frac{\varepsilon'_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1'^2} \right)^{1/2}. \quad (1.13)$$

A titre d'exemple, à $\lambda = 600$ nm, on obtient à l'interface métal/air les épaisseurs de peau suivantes :

- pour l'argent : $\hat{z}_2 = 390$ nm et $\hat{z}_1 = 24$ nm ;
- pour l'or : $\hat{z}_2 = 280$ nm et $\hat{z}_1 = 31$ nm.

Notez que la profondeur de pénétration du champ dans le métal n'est pas indépendante du matériau diélectrique (ε_2 figure dans l'expression de \hat{z}_1).

Pour les grands vecteurs d'onde k_x , \hat{z} est donné en approximation par $1/k_x$, d'où une forte concentration de champ près de l'interface, dans les deux milieux. Pour les petits vecteurs d'onde k_x (ou les grandes valeurs de $|\varepsilon'_1|$), le champ dans le milieu diélectrique a une composante transverse E_{z2} très grande devant sa composante longitudinale E_x ($E_{z2}/E_x = -\imath |\varepsilon'_1|^{1/2}$) et le plasmon de surface est semblable à un photon guidé le long de la surface métallique (onde de Zenneck-Sommerfeld). E_z et E_x tendent à s'égaliser pour les grands k_x ($E_{z2} = \imath E_x$ et $E_{z1} = -\imath E_x$).

1.2.3.4 Longueur de propagation

L'intensité des plasmons de surface se propageant le long d'une interface plane sans défaut décroît suivant une loi en $\exp(-2k_x''x)$ où k_x'' est la partie imaginaire de la composante parallèle du vecteur d'onde. La *longueur de propagation* \mathcal{L} après laquelle l'intensité de l'onde a été atténuée d'un facteur e est :

$$\mathcal{L} = (2k_x'')^{-1}. \quad (1.14)$$

A titre d'exemple, à l'interface argent/air, $\mathcal{L} = 22 \mu\text{m}$ à $\lambda = 514,5 \text{ nm}$ et $\mathcal{L} = 500 \mu\text{m}$ ($0,05 \text{ cm}$) à $\lambda = 1060 \text{ nm}$. L'énergie absorbée dans le film métallique est dissipée sous forme de chaleur.

1.2.3.5 Modes d'excitation

A proprement parler, le terme "plasmons de surface" désigne les modes de fluctuation de la densité électronique sans en préciser le mode d'excitation mis en jeu. Historiquement, l'excitation des plasmons de surface a d'abord été étudiée par spectroscopie de perte d'électrons (Raether 1980). Les électrons pénétrant dans le métal transfèrent un moment et une énergie aux électrons du solide. La projection de ce moment sur la surface du métal détermine le vecteur d'onde et, d'après la relation de dispersion, la perte d'énergie $\Delta\mathcal{E} = \hbar\omega$ de l'électron diffusé. Comme les électrons sont diffusés à différents angles, ils transfèrent différents moments $\hbar k_x$. La détection des électrons diffusés permet, en reliant leur énergie à leur angle de diffusion, d'étudier la relation de dispersion $k_x(\omega)$ des plasmons de surface, sur un large domaine d'énergie (Raether 1988).

Par la suite, les plasmons de surface ont suscité un très large intérêt dans la communauté de l'Optique et de la Photonique, en raison des possibilités de pouvoir confiner la lumière à la surface d'un métal en couplant photons et plasmons de surface. Ce mode d'excitation est nommé *polariton de plasmon de surface* (*Surface Plasmon Polariton*, SPP). Toutefois, nous avons vu précédemment que l'absence d'intersection entre les courbes de dispersion des plasmons de surface et des photons signifiait l'impossibilité de coupler ces deux modes électromagnétiques. Plusieurs solutions existent cependant, et sont exposées dans la sous-section qui suit (§ 1.2.4).

1.2.4 Comment coupler photons et plasmons de surface ?

Lorsque la molécule est à moins de $\lambda/4$ d'une surface, un effet d'atténuation de la fluorescence intervient. Cet effet, fortement dépendant de la distance, met en jeu le transfert d'énergie du dipôle moléculaire excité vers le substrat (processus non radiatif). La partie évanescente du champ dipolaire se couple aux plasmons de surface, lesquels sont confinés à l'interface métal/diélectrique et se propagent le long de cette interface uniquement (voir Fig. 1.17, p.29) (Ditlbacher 2002a, Ditlbacher 2003).

Comme l'illustre la Figure 1.10a, à une fréquence d'oscillation donnée, le vecteur d'onde associé à la propagation des plasmons de surface est toujours plus grand que celui de la lumière. Par conséquent, l'illumination en onde plane ne peut pas exciter de manière cohérente les plasmons de surface à une interface plane. Réciproquement, la conversion des plasmons de surface en photons est interdite et l'énergie cédée par l'émetteur à ces modes non radiatifs ne contribue pas à l'émission de lumière. Cependant, il est possible de tirer avantage de ce couplage en structurant le film métallique qui couvre les substrats, afin d'accroître le signal de fluorescence.

1.2.4.1 Lois de dispersion et accord de phase

L'examen des courbes de dispersion associées à des modes électromagnétiques de natures différentes (*e.g.*, photons et plasmons de surface) aide à la compréhension des possibilités de couplages entre ces modes.

Une conversion d'un mode vers un autre n'est possible que s'il y a conservation de l'énergie $\hbar\omega$ et du moment $\hbar k_{\parallel}$. Par conséquent, les possibilités de couplage entre deux modes sont visualisées par les intersections de leurs courbes de dispersion.

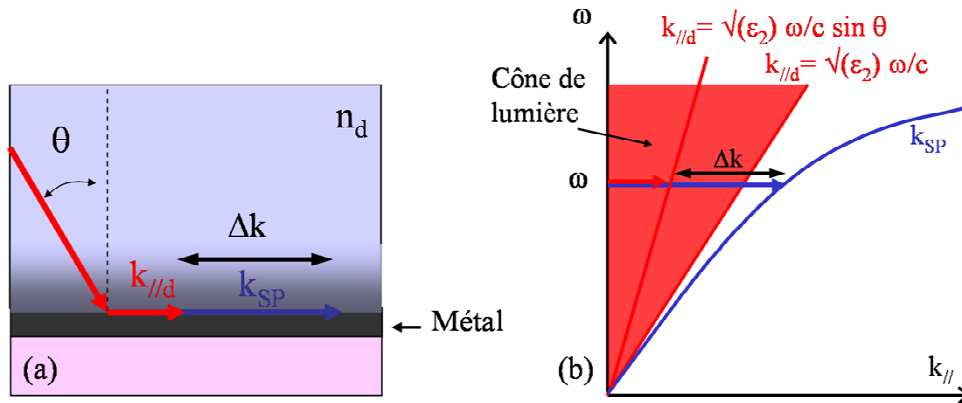


FIG. 1.10: Couplage aux plasmons de surface sur une surface métallique plane. (a) Schéma représentant un film métallique sur une lame de verre et montrant les composantes parallèles à l'interface métal/air des vecteurs d'onde d'une onde de lumière incidente k_d et du plasmon de surface k_{sp} . (b) Courbes de dispersion des photons (ligne rouge) et des plasmons de surface (ligne bleue). La ligne de lumière (ligne rouge) correspond à la courbe de dispersion de la lumière émise ou incidente avec un angle nul par rapport à la normale à l'interface métal/diélectrique. Le cône de lumière (zone rouge) correspond à l'ensemble des courbes de dispersion de la lumière émise ou incidente suivant tous les angles à la normale compris entre 0 et $\pi/2$.

La Figure 1.10b représente les courbes de dispersion des plasmons de surface se propageant le long d'une interface métal/air et des photons se propageant dans l'air. Quelque soit l'angle θ formé par le vecteur d'onde d'un photon incident ou émis, sa courbe de dispersion $k_{\parallel} = (\omega/c) \sin \theta$ se situe toujours à gauche de la *ligne de lumière* $k_{\parallel} = (\omega/c)$, dans le dénommé *cône de lumière*. Par contre, la courbe de dispersion des plasmons de surface se trouve invariablement à droite de la ligne de lumière et, par

conséquent, en-dehors du cône de lumière. L'absence d'intersection entre leurs courbes de dispersion interdit tout couplage : l'énergie des plasmons de surface ne peut pas être convertie sous forme de lumière et, réciproquement, une onde plane ne peut pas exciter de manière cohérente les plasmons de surface.

Comme le montre la Figure 1.10, le vecteur d'onde des plasmons de surfaces est toujours plus grand que celui d'une onde plane de même fréquence d'oscillation. Toutefois, il existe différentes manières de contourner ce problème, et de réaliser malgré cela l'accord des vecteurs d'onde.

1.2.4.2 Configurations optiques permettant le couplage aux plasmons

Il existe trois principales techniques permettant de combler l'écart de vecteur d'onde qui s'oppose au couplage entre photons et plasmons de surface (Barnes 2003).

Illumination au travers d'un prisme

La première de ces solutions consiste à illuminer la surface métallique au travers d'un milieu d'indice optique élevé, *e.g.*, au moyen d'un prisme en verre. La lumière peut être projetée sur le métal, soit en approchant un prisme de la surface métallique (configuration d'Otto (Otto 1968), voir Fig.1.11a), soit en éclairant la face arrière d'un film métallique au travers du prisme (configuration de Kretschmann (Kretschmann 1971), voir Fig.1.11b).

Dans la configuration d'Otto (Fig. 1.11a), l'espace séparant le prisme du métal doit être extrêmement réduit, puisque c'est le champ évanescent se formant à l'interface verre/air, par réflexion totale de la lumière sur la face interne du prisme, qui se couple avec les plasmons de surface. En sortie du prisme, la composante normale du vecteur d'onde k_{\perp} est purement imaginaire. Sa composante parallèle à la surface k_{\parallel} peut donc être arbitrairement grande, et donc être supérieure à la norme du vecteur d'onde $k = \sqrt{k_{\perp}^2 + k_{\parallel}^2}$. C'est ce qui permet de réaliser l'accord avec le vecteur d'onde des plasmons de surface.

Dans la configuration de Kretschmann, (Fig. 1.11b et 1.12) le film métallique doit être très fin (épaisseur $\lesssim 0,1 \mu\text{m}$) afin que le champ puisse le traverser et exciter

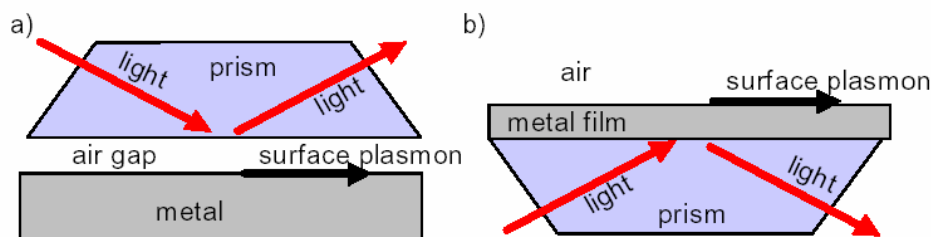


FIG. 1.11: Configurations permettant l'excitation des plasmons de surface par une onde de lumière (Sönnichsen 2001). (a) Configuration d'Otto. (b) Configuration de Kretschmann.

les plasmons de surface se propageant sur la face opposée du film. Dans ce cas-ci, le couplage est réalisable en raison de la différence d'indice optique entre les milieux diélectriques (*e.g.*, l'air et le verre) situés de chaque côté du film. Pour une même fréquence d'oscillation, le vecteur d'onde est plus grand dans le verre $k_{verre} = (\omega/c)n_{verre}$ ($n_{verre} \sim 1,5$) que dans l'air $k_{air} = (\omega/c)n_{air}$ ($n_{air} \sim 1,0$). Pour un certain angle d'incidence θ , la composante parallèle du vecteur d'onde $k_{verre} = (\omega/c)n_{verre} \sin \theta$ coïncide avec le vecteur d'onde des plasmons de surface à la fréquence ω . A cet angle particulier, nommé *angle de résonance plasmon*, l'énergie des photons incidents est convertie pour l'excitation des plasmons de surface.

Pour reprendre le formalisme de la courbe de dispersion (Fig. 1.12) : en changeant l'indice du milieu de propagation de la lumière, on a modifié la courbe de dispersion de la lumière, laquelle croise à présent celle des plasmons de surface (voir Fig. 1.12b). Notez que cette configuration d'excitation n'est pas compatible avec tous les dispositifs de microscopie.

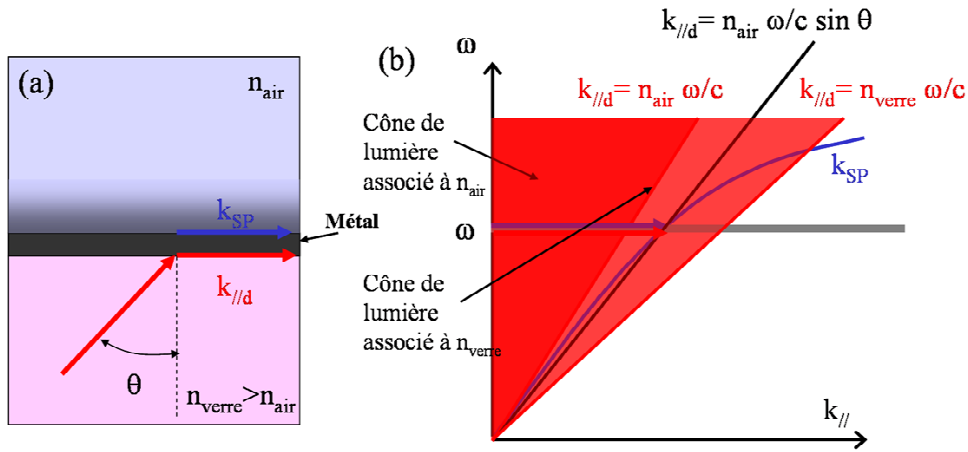


FIG. 1.12: Accord des vecteurs d'onde dans la configuration de Kretschmann. (a) Schéma représentant un film métallique déposé sur la face d'un prisme en verre d'indice optique n_{verre} . Le demi-espace supérieur (*i.e.*, l'air) est caractérisé par un indice $n_{air} < n_{verre}$. k_{sp} est la composante réelle du vecteur d'onde du plasmon de surface se propageant à l'interface métal/air. k_d est le vecteur d'onde d'une onde de lumière se propageant dans le prisme et arrivant sur la face opposée du film métallique avec un angle d'incidence θ , et $k_{//d}$ est sa composante parallèle à la surface du film. (b) Courbes de dispersion des photons (lignes rouges) dans l'air (ligne de lumière $k_{//d} = n_{air}\omega/c$) et dans le verre (ligne de lumière $k_{//d} = n_{verre}\omega/c$), et des plasmons de surface (ligne bleue) à l'interface métal/air.

Couplage local

La deuxième technique repose sur la diffusion des ondes électromagnétiques par un défaut topographique à la surface du film métallique, tel qu'un trou ou une protrusion de taille inférieure à la longueur d'onde. Un tel défaut permet d'exciter localement des plasmons de surface (couplage lumière/plasmons de surface) et de convertir les plasmons de surface en photons (couplage SP/lumière). Une limite majeure de cette

technique est qu'elle ne permet de coupler plasmons de surface et lumière que localement, et n'est donc pas destinée à l'imagerie.

Réseau de Bragg

La troisième et dernière technique utilise la corrugation périodique d'une surface métallique (*e.g.*, un réseau métallique). Les vecteurs de Bragg associés aux périodicités spatiales d'une telle surface peuvent fournir la composante de vecteur d'onde manquante, qui permettrait l'accord de phase nécessaire au couplage. Comme le montre la Figure 1.13, les plasmons de surface sont diffusés dans les directions (θ, ϕ) de l'espace qui vérifient la relation $\mathbf{k}_0 \sin \theta = \mathbf{k}_{SPP} \pm m\mathbf{G}$, $m \in \mathbb{N}^*$, où \mathbf{G} est le vecteur de Bragg du réseau et \mathbf{k}_0 et \mathbf{k}_{SPP} sont les vecteurs d'onde du photon et du plasmon de surface à une fréquence donnée. Lorsque $G < k_{SPP}$ (Fig. 1.13b), plusieurs angles de diffusion θ peuvent être observés.

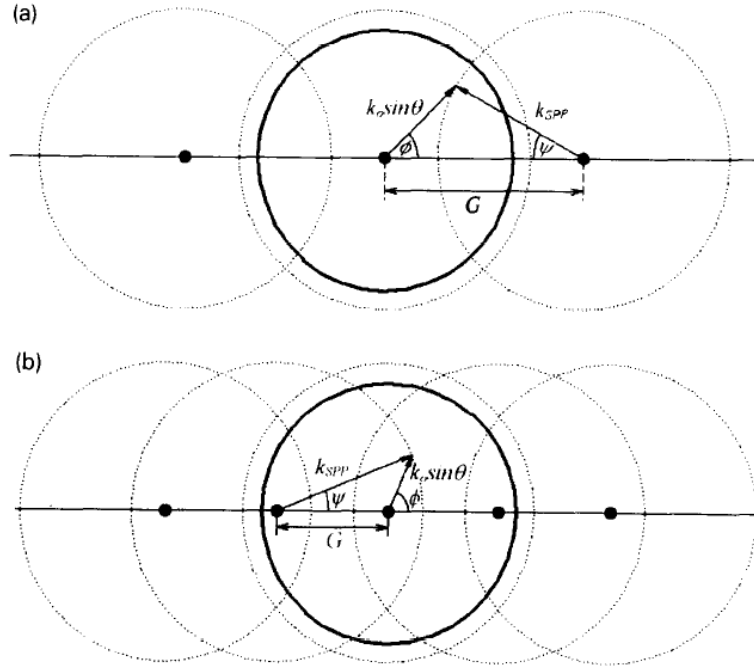


FIG. 1.13: Couplage de la lumière aux plasmons de surface au moyen d'un réseau métallique. Représentation du réseau périodique dans l'espace réciproque (*espace des k*). La période L du réseau est associée à un vecteur de Bragg $G = 2\pi/L$. Le cercle tracé en ligne continue a pour rayon $k_0 = \omega/c$ et représente la valeur maximale que peut prendre la projection du vecteur d'onde d'un photon sur la surface du réseau. Les cercles tracés en pointillés ont pour rayon k_{SPP} et représentent la composante réelle du vecteur d'onde associé à un mode polariton du plasmon de surface. (a) $G > k_{SPP}$. Un polariton se propageant à la surface du réseau, dans une direction formant un angle ψ avec le vecteur de Bragg G du réseau, peut se coupler, *via* le réseau, à un photon émis à un angle θ dans un plan défini par l'angle azimutal ϕ . (b) $G < k_{SPP}$. Le polariton peut dans ce cas se coupler au photon par diffusion par soit $\pm G$, soit $\pm 2G$.

1.3 Processus optiques en présence d'une structure métallique

La présence d'une structure métallique dans l'environnement proche d'un émetteur ponctuel (*e.g.*, un fluorophore) modifie ses propriétés optiques (Ford 1984). Nous présentons dans cette section les mécanismes impliqués dans la modification des processus d'excitation et d'émission du fluorophore, en présence d'un miroir métallique (§ 1.3.1, p. 25), d'une surface métallique nanostructurée (§ 1.3.2, p. 33), et de nanoparticules métalliques (§ 1.3.3, p. 35).

1.3.1 Interaction d'un émetteur ponctuel avec un miroir métallique

Un atome ou une molécule, dans un état excité permettant une transition de type *dipôle électrique*, émet à une fréquence particulière ω_0 et son spectre a généralement la forme d'une Lorentzienne de largeur γ_0 . Cette largeur est reliée au taux d'émission spontanée Γ_0 . Lorsqu'un émetteur de ce type est placé à proximité d'une surface partiellement réfléchissante, son taux d'émission et sa fréquence sont modifiés d'une façon qui dépend de la distance séparant l'émetteur de la surface, des propriétés diélectriques de la surface, et du milieu dont lequel se trouve l'émetteur (Hellen 1987). A la suite des premiers travaux menés par Drexhage *et al.* (§ 1.3.1.1, p. 25), Chance *et al.* ont développé un modèle dipolaire qui permet de décrire l'influence d'un substrat métallique sur l'émission d'un fluorophore (§ 1.3.1.2, p. 27). Ce modèle permet de calculer l'énergie transférée au substrat par couplage aux plasmons de surface (§ 1.3.1.3, p. 28). Par la suite, des améliorations ont été apportées à ce modèle pour prendre en compte des interactions avec le substrat autres que les couplages électromagnétiques (§ 1.3.1.4, p. 31). Enfin, la modification du taux d'émission influence également les processus de transfert d'énergie résonant entre les émetteurs (§ 1.3.1.5, p. 31).

1.3.1.1 Premiers travaux

Dans les années soixante, Drexhage *et al.* menèrent une célèbre série d'expériences sur le comportement optique de molécules fluorescentes séparées de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres de la surface de substrats métalliques plans (Drexhage 1966, Drexhage 1968, Drexhage 1970, Drexhage 1974). Ils mesurèrent la durée de vie de l'état excité des molécules, en fonction de la distance à la surface métallique, et observèrent des oscillations pour des distances de séparation de l'ordre de la longueur d'onde d'émission. Ils proposèrent d'expliquer ces résultats expérimentaux par un phénomène d'interférences.

Cet effet peut être compris en considérant le cas d'une molécule excitée placée au centre d'un miroir sphérique (Fig.1.14). Si le rayon du miroir est, par exemple, $1,75\lambda$ (Fig.1.14a), alors les faisceaux émis dans le demi-espace supérieur directement et par

réflexion sur le miroir interfèrent de manière constructive. L'intensité rayonnée étant proportionnelle au carré de l'amplitude du champ, la probabilité d'émission radiative est quatre fois plus grande qu'en l'absence du miroir. Il n'y a aucun rayonnement dans le demi-espace inférieur, à cause du miroir. Par conséquent, la probabilité d'émission radiative intégrée sur tout l'espace est deux fois plus grande qu'en l'absence du miroir. La durée de vie de la molécule excitée est donc deux fois plus courte au centre du miroir que dans l'espace libre (en supposant l'absence de processus de désexcitation non-radiative). Par contre, si le rayon du miroir est, par exemple, 2λ (Fig. 1.14b), alors les faisceaux direct et réfléchi interfèrent de manière destructive et la molécule ne peut pas émettre radiativement. Dans ces conditions, la durée de vie de la molécule excitée est infinie.

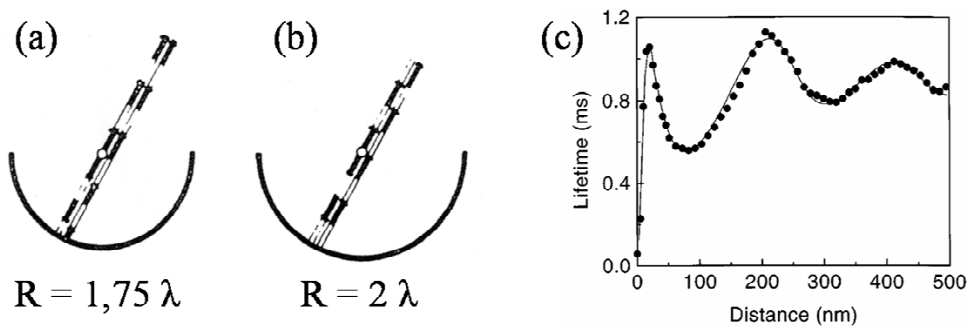


FIG. 1.14: Rayonnement d'une molécule excitée au centre d'un miroir sphérique (a,b) (Drexhage 1970). (a) Amplification par interférence : la puissance rayonnée par le dipôle est deux fois plus grande qu'en l'absence du miroir. (b) *Quenching* par interférence : le dipôle ne peut pas rayonner. Durée de vie de l'état excité d'ions Eu^{3+} en fonction de la distance les séparant d'un miroir d'argent (c) (Amos 1997). La ligne continue est la dépendance théorique calculée avec le modèle dipolaire classique (théorie CPS).

De la même façon, la durée de vie d'une molécule excitée est affectée par la présence d'un miroir plan. Notez que, dans ce cas, les coefficients de réflexion et le déphasage entre les faisceaux direct et réfléchi dépendent de l'angle d'incidence et de la polarisation de la lumière. Un traitement purement interférentiel (Kuhn 1970) permet de calculer la figure spatiale de rayonnement (lobe d'émission dans le champ lointain), l'amplitude et la phase du champ réfléchi étant déterminées grâce aux lois de Fresnel (coefficients de réflexion pour un faisceau polarisé). La lumière est émise dans des directions préférentielles du demi-espace supérieur, ces directions étant celles où les faisceaux direct et réfléchi interfèrent constructivement (Voir Fig. 1.15). Les directions varient suivant la distance au miroir et l'orientation relative du dipôle d'émission par rapport à la surface. Notez que, lorsque la distance à la surface est très petite devant la longueur d'onde d'émission, un dipôle parallèle tend à s'annuler avec son image, alors qu'un dipôle orthogonal est amplifié.

D'autre part, Drexhage *et al.* ont observé des durées de vie exceptionnellement courtes lorsque la molécule est séparée du métal par des distances très petites devant la longueur d'onde. Cette baisse subite de durée de vie est la signature d'un transfert d'énergie non-radiatif de la molécule vers le métal. Si la compétition entre l'émission

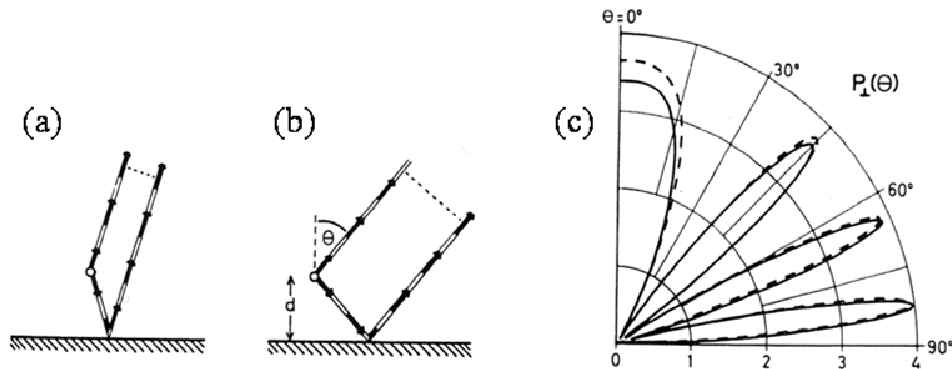


FIG. 1.15: Rayonnement d'un dipôle électrique interagissant avec un miroir plan (a,b) (Drexhage 1970). Amplification (a) et *quenching* (b) par interférence. Distribution angulaire de la fluorescence d'ions Eu^{3+} placés à 677 nm d'un miroir d'or (c) (Drexhage 1970, Kuhn 1970). Le fluorophore est un complexe europium-dibenzoylméthane : les ligands absorbent dans l'ultraviolet puis, après transfert d'énergie intramoléculaire, les ions Eu^{3+} émettent ($\lambda = 612$ nm) avec un rendement quantique élevé. Les mesures expérimentales (—) sont en bon accord avec le modèle interférentiel (- - -) pour un dipôle orthogonal à la surface.

de fluorescence et cette voie de désexcitation non-radiative tourne en faveur de cette dernière, alors la fluorescence est annihilée (*quenching*).

Par la suite, dans les années soixante-dix, un grand nombre d'études théoriques ont été menées dans le but de modéliser ce couplage métal/fluorophore à courte distance. Des traitements classiques améliorés (Kuhn 1970), semi-classiques (Morawitz 1969) et de mécanique quantique (Philpott 1975) ont contribué à une meilleure compréhension des observations expérimentales. Cependant, le meilleur accord entre modèle et expérience a été atteint avec une description purement classique de l'interaction molécule/substrat, dont la théorie a notamment été développée par Chance, Prock et Silbey (CPS) (Tews 1970, Tews 1974, Chance 1974).

1.3.1.2 Modèle de l'oscillateur dipolaire

Dans la théorie CPS, un émetteur à proximité d'une surface réfléchissante est assimilé à un oscillateur dipolaire amorti et forcé ; *amorti* parce qu'il perd de l'énergie ; *forcé* parce qu'il répond à une fraction de son propre champ électromagnétique réfléchi par la surface. Les équations du modèle dipolaire dans la théorie CPS sont détaillées dans le Chapitre 2 (voir § 2.4.2, p.81).

Le problème de l'émission d'un dipôle face à une surface réfléchissante se résume au calcul du champ réfléchi au niveau du dipôle. Suivant son retard, le champ réfléchi est en phase ou hors de phase, provoquant une augmentation ou une baisse du taux d'émission (Amos 1997). La composante en phase du champ réfléchi induit également un déplacement de la fréquence de résonance de l'oscillateur, ainsi qu'un élargissement spectral de cette résonance (Chance 1975a).

Reprenons maintenant le formalisme de la PMD (voir § 1.1.1.4, p.5). Si le champ réfléchi est en phase avec l'émetteur, la PMD au niveau du dipôle sera élevée, les oscillations du dipôle seront alors amplifiées et l'émission radiative exaltée (*super-radiance*). Au contraire, si le champ réfléchi est hors de phase, l'émission radiative sera atténuée (*sub-radiance*). Le facteur d'exaltation varie périodiquement en fonction de la distance au métal, avec une période égale à $\sim \lambda/2$, alternant des conditions de *super-radiance* et de *sub-radiance*. Au fur et à mesure que le dipôle est éloigné de la surface miroir, cet effet d'interférence s'affaiblit, en raison de la nature ponctuelle du dipôle émetteur.

1.3.1.3 Couplage et transfert d'énergie

Le champ électromagnétique produit par le dipôle comprend une partie propagative (champ lointain) responsable du rayonnement énergétique (émission de photons) et une partie évanescence (champ proche) qui prédomine à courte distance et décroît exponentiellement en s'éloignant de l'émetteur. En utilisant la fonction complexe de la permittivité diélectrique du métal, Chance *et al.* ont modélisé la réponse optique globale de la surface, *i.e.*, non seulement la réflexion du champ lointain mais aussi le couplage du champ proche avec le métal.

Par la suite, nous décrirons les différents modes d'émission du dipôle en utilisant la composante tangentielle u du vecteur d'onde normalisé. A une fréquence d'émission $\omega/(2\pi)$ donnée, $u = k_{\parallel}/k_0$ où $k_0 = \omega/c$ est le vecteur d'onde d'un photon dans l'espace libre. La Figure 1.16a représente, en fonction de u , la distribution de l'énergie rayonnée par le dipôle dans le demi-espace supérieur ($u \in [0; 1]$) et transférée au substrat ($u \in]1; \infty[$) calculée pour un dipôle orthogonal à la surface, pour différentes distances dipôle/surface.

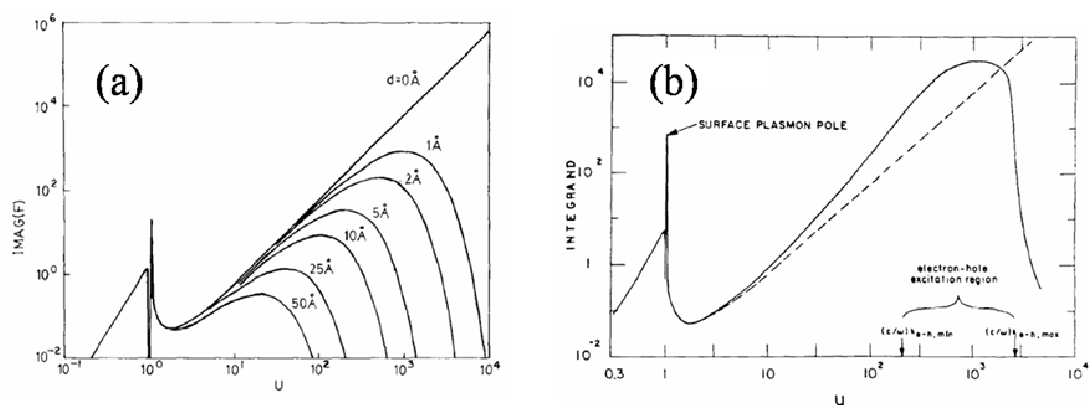


FIG. 1.16: Distribution de l'énergie émise en fonction du vecteur d'onde normalisé u , calculée pour un dipôle orthogonal émettant à $\lambda=632,8$ nm localisé à différentes distances d'une surface d'argent, dans le modèle de la réponse diélectrique locale de Chance, Prock et Silbey (Whitmore 1982) (a), et dans le modèle non-local de Ford et Weber (Ford 1981) pour une distance nulle (b). La courbe en pointillés dans la figure (b) correspond au modèle local pour une distance nulle.

La théorie CPS inclut la présence de charges électriques confinées à l'interface entre le métal et le milieu isolant (ici l'air). Les modes d'oscillation collective de ces charges (*plasmons de surface*, voir § 1.2, p.14) peuvent être excités par couplage au dipôle. Le transfert d'énergie aux plasmons de surface apparaît dans la Figure 1.16a sous la forme d'un pic étroit à $u_{sp} \sim 1,3$. Les propriétés des plasmons de surface ont été largement traitées d'un point de vue théorique (Ritchie 1973, Morawitz 1974) et expérimental (Benner 1979, Eagen 1979). Weber et Eagen (Weber 1979) ont démontré que l'efficacité du transfert d'énergie aux plasmons de surface décroît exponentiellement en fonction de la distance au métal. Au niveau d'une surface métallique plane, seul le champ proche du dipôle (partie évanescente du champ dipolaire) peut se coupler aux plasmons de surface, car le vecteur d'onde des plasmons de surface est toujours plus grand que celui d'un photon de même énergie ($u_{sp} > 1$). Pour les mêmes raisons, l'énergie des plasmons de surface ne peut pas être convertie sous forme de lumière, à moins qu'ils soient diffusés par des défauts topographiques (rugosité) de la surface métallique.

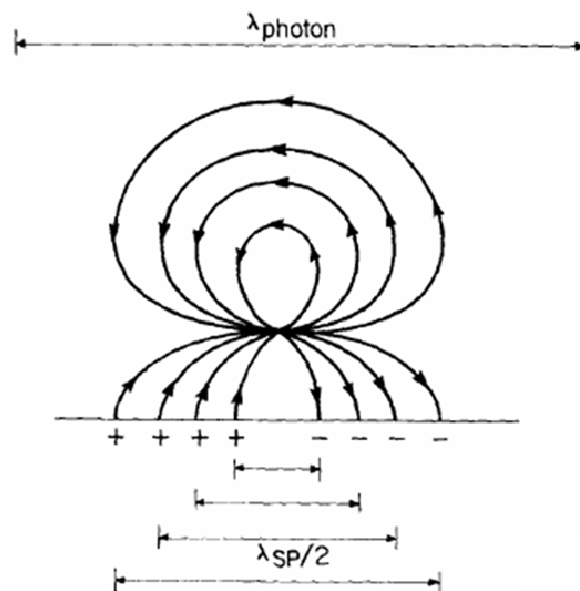


FIG. 1.17: Représentation schématique des lignes de champ électrique associé à un dipôle proche d'une surface métallique, à un instant donné de son excitation, et des charges de surface induites par le champ proche du dipôle (Whitmore 1982).

La Figure 1.17 représente les lignes de champ électrique associées à un dipôle proche d'une surface métallique, à un instant donné de son excitation. Le champ proche du dipôle modifie la distribution des charges de surface, et induit ainsi des dipôles de surface. Les longueurs d'onde associées à ces dipôles de surface sont plus courtes que celle du champ radiatif ($u > 1$). Les oscillations des charges de surface dont la longueur d'onde correspond à celle du plasmon de surface à cette énergie ($u \simeq u_{sp}$) se propagent loin du dipôle et transfèrent l'énergie du dipôle. Les autres composantes de champ de grand vecteur d'onde ($u \gg u_{sp}$) dissipent l'énergie du dipôle par couplage avec des processus de diffusion dans le volume (Whitmore 1982). Ces derniers modes sont

appelés *ondes de perte de surface* (*Lossy Surface Waves*, LSW) car l'énergie dissipée dans la structure du substrat métallique ne peut pas être convertie sous forme de lumière (même en présence de nanostructures diffusantes en surface du substrat).

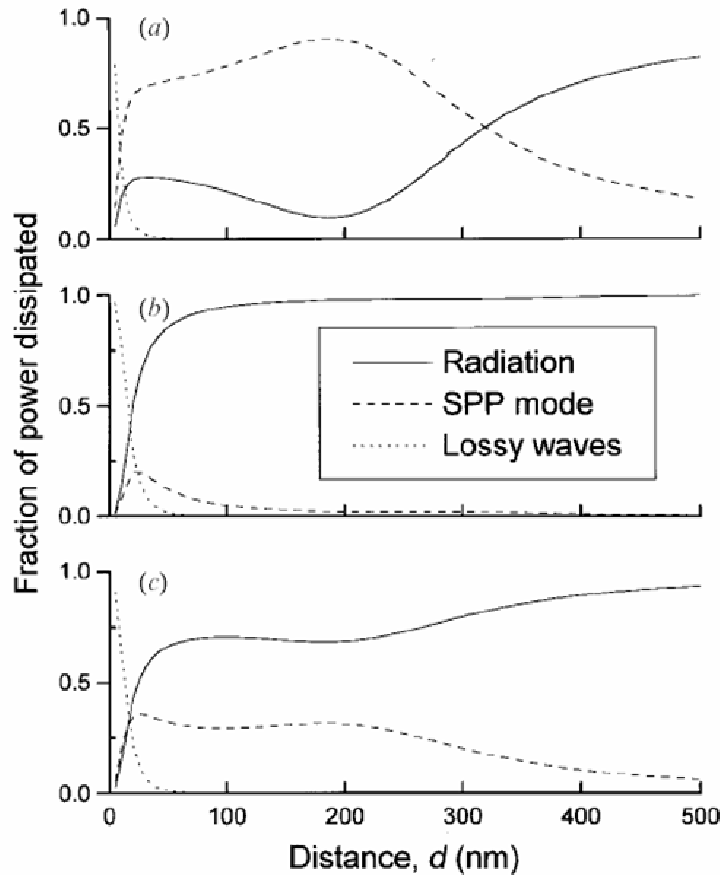


FIG. 1.18: Fraction d'énergie dissipée par un dipôle immergé dans le vide et positionné près d'une surface plane d'argent, dans différentes voies de désexcitation (Barnes 1998), calculée en fonction de la distance à la surface, pour un dipôle perpendiculaire (a) et parallèle (b) à la surface, et pour une combinaison isotrope des deux (c). Le dipôle émet à $\lambda = 614 \text{ nm}$ et la constante diélectrique de l'argent est $-16 + 0,6i$. Les voies de désexcitations sont l'émission de photons dans le vide (—) et le couplage non-radiatif aux plasmons de surface (- - -) et aux ondes de pertes (. . .).

Comme le montre la Figure 1.16a, l'importance des différentes voies d'émission – rayonnement ($u < 1$) et transfert d'énergie au plasmons de surface ($u \simeq u_{sp}$) et aux ondes de pertes ($u \gg u_{sp}$) – change en fonction de la distance à la surface métallique. La Figure 1.18 donne la fraction d'énergie dissipée par émission radiative et non-radiative, en fonction de la distance séparant un dipôle d'une surface plane d'argent (Barnes 1998). Il apparaît que les processus de couplage avec le métal varient différemment en fonction de la distance suivant l'orientation relative du dipôle. Notamment, le couplage aux plasmons de surface est beaucoup plus fort pour un dipôle orthogonal à la surface métallique (Fig. 1.18). On note également que l'efficacité du couplage aux ondes de perte chute avec la distance beaucoup plus brutalement que celle du couplage aux

plasmons de surface. Par conséquent, le couplage aux ondes de perte prédomine à très courte distance. En raison du processus de compétition entre ces deux voies de désexcitation non-radiatives, le couplage aux plasmons de surface présente un maximum d'efficacité pour une distance émetteur/métal finie. Pockrand *et al.* (Pockrand 1980) ont étudié expérimentalement le transfert d'énergie aux plasmons de surface pour des molécules de colorants placées à une distance contrôlée d'un substrat d'argent. Ils ont observé une efficacité maximale pour une distance de 18 nm, et une efficacité quasi-nulle lorsque les molécules sont très proches du métal. Des séparations optimales différentes peuvent cependant être trouvées pour des fréquences d'excitations différentes, ou pour d'autres métaux et d'autres matériaux isolants.

1.3.1.4 Quenching et transfert de charge

Bien que la théorie CPS soit en bon accord avec les résultats obtenus dans un grand nombre de configurations expérimentales, elle est basée sur plusieurs hypothèses de base dont la pertinence peut être remise en question lorsque les molécules sont placées à moins de 10 Å ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$) de la surface du métal. Notamment, la théorie CPS prédit que l'énergie transférée au métal tend vers l'infini lorsque la distance molécule/métal tend vers zéro (Maniv 1980, Ford 1981) (voir Fig. 1.16b). A la suite des travaux théoriques de Chance *et al.*, plusieurs auteurs proposèrent des corrections au modèle classique CPS, ainsi que des approches alternatives faisant appel à la mécanique quantique (Persson 1984). Brièvement, lorsque l'on tient compte de la variation continue de la densité électronique près de l'interface métal/isolant (conditions de continuité du champ électrique), les contributions de la surface et du volume du substrat à la réponse optique globale dépendent de la distance suivant deux lois différentes. Persson *et al.* (Persson 1984) ont défini un régime de distance ($d = 20 - 100 \text{ \AA}$) et de fréquence pour lequel le transfert d'énergie de la molécule au substrat métallique est principalement dû aux effets de surface, et est par conséquent régi par une loi en $1/d^4$. En plus du transfert d'énergie classique, un autre processus de couplage à très courte distance ($d < 10 \text{ \AA}$) ouvre une voie additionnelle de désexcitation ultra rapide (Gebauer 2004). Ce processus de *quenching* est un effet typiquement quantique, associé à un transfert de charges et qui ne peut pas être traité classiquement, même en considérant les multipôles d'ordre supérieur dans le modèle de l'oscillateur dipolaire (Maniv 1980).

1.3.1.5 Modification des interactions résonantes entre dipôles

Comme nous l'avons vu précédemment, l'émission spontanée peut être contrôlée en plaçant l'émetteur dans une structure (*e.g.*, une cavité optique) qui modifie la densité de modes photoniques (PMD), *i.e.*, en manipulant les modes optiques dans lesquels l'émission peut avoir lieu (Drexhage 1974). La modification de la PMD est également susceptible d'influencer les interactions résonantes entre dipôles, telles que le transfert résonant d'énergie de Förster (FRET) (Agarwal 1998, Finlayson 2001).

Théorie de Förster

Le FRET est un processus cohérent et non-radiatif (sans émission de photon) de transfert d'énergie entre deux molécules suffisamment proches l'une de l'autre pour que se couplent les composantes évanescentes de leur champ dipolaire (Förster 1948). Généralement, le FRET implique deux molécules fluorescentes – un fluorophore donneur (D) et un fluorophore accepteur (A) (les fluorophores d'un couple D/A ont des propriétés spectrales différentes), et peut mener à l'émission d'un photon de fluorescence par A .

D'après la théorie de Förster, le taux de FRET (Γ_{FRET}) varie linéairement en fonction du taux d'émission spontanée du donneur et, pour une distribution bidimensionnelle aléatoire, est inversement proportionnel à la puissance quatre de la distance intermoléculaire r (Kuhn 1972) :

$$\Gamma_{FRET} = \Gamma_{DA} - \Gamma_D = \Gamma_D \left(\frac{r_c}{r} \right)^4 \quad (1.15)$$

où Γ_{DA} et Γ_D sont respectivement les taux d'émission du donneur en présence et en l'absence de l'accepteur. Lorsque la distance séparant le donneur de ces plus proches voisins accepteurs est égale à la distance critique r_c , le taux de FRET est égal à la somme des taux associés aux autres processus d'émission du donneur ($\Gamma_{FRET} = \Gamma_D$). Typiquement, r_c est de l'ordre de 5 nm (Andrew 2000).

Influence de la densité de modes photoniques

Le taux d'émission spontanée du donneur est une mesure directe de la PMD (Fermi 1932). Une structure permettant de modifier la PMD est donc susceptible de changer le taux de FRET. Andrew & Barnes (Andrew 2000) ont montré que le taux d'émission spontanée du donneur augmente d'un facteur 2,5 lorsqu'il est placé au centre d'une cavité formée par deux miroirs plans distants d'une demi-longueur d'onde d'émission, *i.e.*, lorsque son émission spontanée est résonante avec le mode principal de la cavité. Hopmeier *et al.* (Hopmeier 1999) ont étudié le transfert entre des fluorophores donneurs et accepteurs aléatoirement distribués dans une cavité de ce type. Les auteurs ont observé une amplification de l'émission de l'accepteur lorsque le transfert d'énergie était résonant avec un mode de la cavité.

Comme nous l'avons vu précédemment (voir § 1.3.1.2, p.27), la présence d'un miroir unique (cavité ouverte ou "demi-cavité") modifie également la PMD et se comporte comme une cavité optique avec ses modes propres. Le taux d'émission des fluorophores est amplifié lorsque leur émission est résonante avec un mode de la cavité, ce qui est le cas lorsque la distance au miroir d vérifie l'équation $d = (2j - 1) \frac{\lambda_{em}}{4n_d}$ où λ_{em}/n_d est la longueur d'onde d'émission dans la cavité et j est un nombre entier ($j = 0$ correspond au mode principal de la cavité).

Nakamura *et al.* (Nakamura 2005, Nakamura 2006) ont étudié le FRET dans des films d'oxyde de silicium contenant des nanocristaux photoluminescents de silicium (donneur) et dopés avec des ions fluorescents Er^{3+} (accepteur), séparés d'un film d'or

par une couche d'épaisseur contrôlée. Par des mesures de durée de vie, les auteurs ont évalué Γ_{DA} et Γ_D , en présence et en l'absence de l'accepteur, et en ont déduit Γ_{FRET} . Les variations de Γ_{FRET} constatées, en fonction de la distance au miroir d'or, correspondent aux variations théoriques de la PMD.

1.3.2 Interaction d'un émetteur ponctuel avec une surface métallique structurée

De nombreux travaux théoriques et expérimentaux ont été consacrés à la façon dont les propriétés optiques des molécules fluorescentes peuvent être modifiées par l'interaction avec une surface métallique non plane, présentant une morphologie allant du film d'îlots de métal (Wokaun 1983, Weitz 1983) au film continu de rugosité aléatoire (Arias 1982, Agassi 1986, Biteen 2005) et à la surface métallique structurée périodiquement (réseau) à l'échelle nanométrique (Aravind 1981, Sullivan 1994, Blacke 1997, Andrew 2001, Kreiter 2001).

Lorsque les fluorophores excités sont positionnés devant un réseau métallique, à une distance bien contrôlée, une émission de fluorescence extrêmement anisotrope (directionnelle) peut être observée, pourvu que la période du réseau soit inférieure à la longueur d'onde d'émission (voir Fig. 1.19) (Sullivan 1994, Andrew 2001). La présence de structures périodiques permet à la surface métallique de diffuser le champ proche du dipôle (Amos 1999). Une émission de lumière directionnelle peut également être observée pour des fluorophores directement adsorbés sur le réseau métallique (principalement due à l'effet Raman). Dans ce cas, l'énergie des fluorophores est transférée au métal et rayonnée par diffusion des plasmons de surface (Kitson 1996). Les vecteurs de Bragg associés à la périodicité de la surface fournissent en effet la différence de vecteur d'onde nécessaire à coupler les plasmons de surface et les modes photoniques (Raether 1988). Le couplage aux plasmons de surface n'est alors plus une voie de désexcitation non-radiative, et l'énergie cédée par le fluorophore au métal contribue à accroître le taux global d'émission radiative. La puissance rayonnée par le fluorophore couplé au réseau métallique atteint un maximum lorsque le couplage fluorophore/métal est le plus fort (Lakowicz 2001a).

Le cas des surfaces métalliques de rugosité aléatoire a été examiné par Arias *et al.* (Arias 1982). Les auteurs calculèrent les variations de durée de vie de fluorophores excités à proximité de telles surfaces, pour une faible distance de séparation (50 Å) et une faible rugosité (~ 20 Å en écart quadratique). Ils trouvèrent que le taux de transfert d'énergie du fluorophore vers le métal augmente avec la rugosité. Contrairement aux réseaux métalliques, dont la surface est structurée périodiquement, les surfaces métalliques de rugosité aléatoire présentent une large distribution de périodes spatiales (Bozhevolnyi 2002). Par conséquent, elles fournissent une large gamme de vecteurs de Bragg permettant le couplage SP/photon pour toutes les directions d'émission. Ce type de surface est donc susceptible de diffuser les plasmons de surface avec une sélectivité sur la direction d'émission beaucoup plus basse qu'un réseau métallique, modifiant ainsi

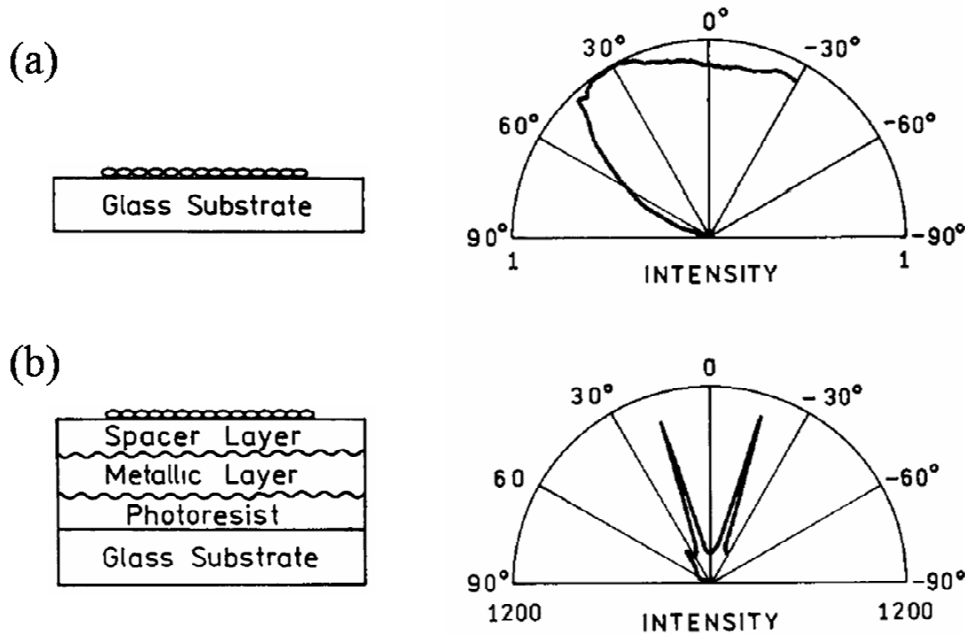


FIG. 1.19: Émission d'un fluorophore couplé à un réseau métallique (Lakowicz 2001a). Configuration de l'échantillon : film de molécules fluorescentes (rhodamine B) sur une lame de verre (a) et sur un film métallique structuré périodiquement (période $L = 300$ nm) par traitement d'une sous-couche photorésistante (b). Le film de colorant est séparé de la surface métallique par une couche de diélectrique (LiF) d'épaisseur $d = 200$ nm. Lobes d'émission de fluorescence (mesures expérimentales) sur la lame de verre (a) et sur le réseau métallique (b). Notez la différence d'échelle d'intensité entre les deux graphes.

la totalité de la figure spatiale de rayonnement. La rugosité de la surface permet également le couplage de la lumière incidente avec les plasmons de surface. L'excitation des plasmons de surface qui résulte de ce couplage mène à l'amplification locale du champ d'excitation près de la surface du métal, et à l'exaltation des processus de fluorescence.

La validité de cette description est toutefois limitée à de faibles rugosités, typiquement quelques dizaines d'angströms en écart quadratique. De plus grandes rugosités perturbent la propagation des plasmons de surface. Cela provoque leur localisation dans les protrusions de la surface métallique. Une fois confinés dans des zones de taille petite devant la longueur d'onde, les modes plasmons deviennent fortement résonants. De plus, ils sont alors libres de se coupler aux modes photoniques, quelque soit leur vecteur d'onde. Les protrusions d'une surface métallique rugueuse présentent de nombreuses similarités avec les nanoparticules métalliques, les deux étant généralement décrites à l'aide des mêmes concepts théoriques. Les deux se comportent comme des antennes lorsque les modes plasmons localisés sont excités à la résonance, provoquant d'intenses amplifications locales du champ électromagnétique. L'exaltation intense de l'excitation moléculaire proche de telles structures favorise fortement les processus optiques non-linéaires tels que la diffusion Raman (*Surface Enhanced Raman Scattering*, SERS) (Moskovits 1985, Campion 1998).

1.3.3 Couplage d'un émetteur ponctuel et d'une nanoparticule métallique

L'influence que peut avoir la présence d'une nanoparticule métallique sur le comportement optique d'un fluorophore présente des similitudes avec celle que peut avoir la présence d'une surface métallique plane. De manière similaire à ce que nous avons vu au paragraphe précédent pour le système émetteur - miroir plan, le couplage nanoparticule - fluorophore peut être contrôlé en modifiant différents paramètres expérimentaux. Sous certaines conditions, de fortes exaltations des processus optiques sont observées. Cependant, les mécanismes responsables de ces exaltations diffèrent entre les deux systèmes, c'est pourquoi le couplage nanoparticule-fluorophore fait l'objet d'un paragraphe séparé.

Tout d'abord, à proximité d'une particule de taille petite devant la longueur d'onde de la lumière, il n'y a pas d'effet miroir. L'émetteur dipolaire (le fluorophore) n'interagit pas avec son dipôle-image mais avec les multipôles de la nanoparticule. D'autre part, en présence d'une nanoparticule métallique, le champ d'excitation au niveau du fluorophore dépend du couplage entre le champ incident et la particule, et non d'un phénomène d'interférence comme c'est le cas en présence d'un miroir plan. Enfin, la présence d'une nanoparticule métallique ne "redirige" pas le lobe d'émission dans la direction opposée, comme le ferait un miroir plan, mais peut néanmoins modifier sa forme.

1.3.3.1 Exaltation des processus optiques et photochimiques

Les propriétés optiques de fluorophores moléculaires adsorbés sur des nanoparticules métalliques sphériques ont été étudiées par Gersten & Nitzan (Gersten 1980, Gersten 1981), et Weitz *et al.* (Weitz 1983). Nitzan & Brus (Nitzan 1981a, Nitzan 1981b) ont mis en évidence la compétition entre les processus d'exaltation à l'excitation et à l'émission, et les processus de désexcitation non-radiative à proximité de la particule métallique. Les auteurs montrèrent que, pour les fluorophores de faibles rendements quantiques, la photoluminescence et la photochimie sont exaltées pour les molécules placées à une distance optimale de la nanoparticule et annihilées pour les molécules en contact direct avec le métal. Les démonstrations théoriques de Nitzan & Brus furent vérifiées par la suite, notamment par Chen & Osgood (Chen C. J. 1983), Wokaun *et al.* (Wokaun 1983), et Franzke & Wokaun (Franzke 1992).

Nous utiliserons, dans ce paragraphe, un formalisme introduit par Gersten & Nitzan (Gersten 1981), et qui fait intervenir le *rendement quantique apparent* Y . Y inclut les variations des taux d'émission et d'excitation, en présence de la nanoparticule métallique. Notez que Y peut prendre des valeurs supérieures à 1, ce qui ne signifie pas que le fluorophore émet plus de photons qu'il n'en absorbe, mais simplement que l'intensité du champ local d'excitation au niveau du fluorophore est plus grande que celle du champ incident. Y est défini comme le facteur d'amplification de la fluorescence observée en présence de nanoparticules métalliques, par rapport aux mêmes fluorophores

dans les mêmes conditions d'éclairement et en l'absence de nanoparticules. Y est analogue au facteur d'exaltation du signal de fluorescence mesuré dans le cas des surfaces miroirs, hormis qu'il n'y a ici aucune notion d'efficacité de collection de l'émission de fluorescence. L'expression de Y donnée par Gersten & Nitzan est :

$$Y = |L(\omega_{exc})|^2 Z(\omega_{fluor}) \quad (1.16)$$

Le terme $|L(\omega_{exc})|^2$ décrit l'influence de la nanoparticule sur les processus d'excitation du fluorophore. Au niveau du fluorophore, le champ d'excitation a pour amplitude $L(\omega_{exc})E_0$, où E_0 est celle du champ incident et $L(\omega_{exc})$ le facteur d'amplification du champ local à la fréquence d'oscillation $\omega_{exc}/(2\pi)$. Le terme $Z(\omega_{fluor})$ traduit la partition de l'énergie d'excitation dans les différentes voies de désexcitation radiatives et non-radiatives, à la fréquence d'émission $\omega_{fluor}/(2\pi)$, en présence de la nanoparticule métallique. Les deux termes de l'expression du rendement quantique apparent sont détaillée ci-dessous.

1.3.3.2 Amplification du champ électrique local

Des champs électriques très intenses se forment localement autour des particules métalliques lorsqu'elles sont excitées à la résonance plasmon. Pour des nanoparticules non-sphériques, des amplifications particulièrement grandes sont prévues là où les rayons de courbure sont les plus courts (au niveau des pointes) (Moskovits 1985, Wokaun 1985). Les nanoparticules métalliques se comportent comme des antennes à l'échelle nanométrique (Bouhelier 2003, Anger 2006), cet effet est lié aux conditions aux limites du champ électromagnétique au niveau de la surface des particules.

De nombreux auteurs ont réalisé des études de simulation des résonances plasmons dans les nanoparticules, pour prévoir les facteurs d'exaltation du champ électrique local. ¹ Des facteurs d'amplification maximale de l'intensité du champ $|L(\omega_{exc})|^2 \sim 140$ ont été calculés à la surface d'une sphéroïde oblate (sphère aplatie) de rapport de forme 0,4:1 excitée à la résonance plasmon (Kümmerlen 1993). Un facteur $|L(\omega_{exc})|^2 \sim 430$ a été prédit au niveau des pointes d'une nanoparticule d'or de forme allongée puis vérifiée expérimentalement par diffusion du champ local au moyen d'une pointe métallique (*Scanning Near-Field Microscopy*, SNOM) (Bouhelier 2003) (voir Fig. 1.20).

Grâce à une modélisation bidimensionnelle, Kottmann *et al.* (Kottmann 2000a, Kottmann 2000b, Kottmann 2000c) ont mis en évidence le lien entre distribution de champ local et polarisation des charges à la surface des nanoparticules métalliques. La Figure 1.21 montre la distribution de l'amplitude du champ électrique (images du haut) et de la polarisation des charges (images du bas) pour une ellipse de dimension 20:10 nm. Le champ électrique incident est polarisé suivant la direction $(\bar{1} \ 1)$, de manière à pouvoir exciter le plasmon suivant le petit axe et le grand axe de l'ellipse.

¹Une synthèse des travaux couvrant la période précédant 1985 peut être trouvée dans l'article de revue de Wokaun (Wokaun 1985). Pour les méthodes de simulation les plus récentes, on se référera aux travaux de Moreno *et al.* (Moreno 2002) et Liaw (Liaw 2006).

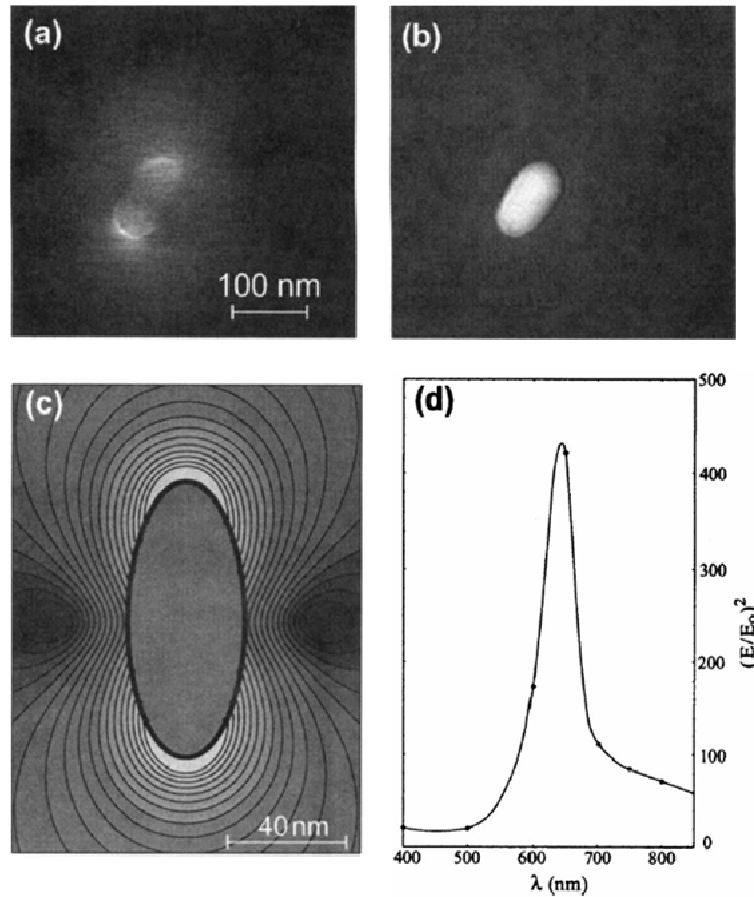


FIG. 1.20: Image de fluorescence biphotonique d'un dimère de particule d'or de forme elliptique, réalisée en microscopie de champ proche optique (SNOM) (a), et image de topographie correspondante (b). (c) Distribution calculée de l'intensité du champ autour d'une ellipsoïde de mêmes dimensions, excitée proche de la résonance $\lambda = 650$ nm. (d) Exaltation normalisée de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Un maximum est atteint à $\lambda = 644$ nm (Bouhelier 2003).

La particule présente deux résonances plasmons, associée chacune à un axe, la plus intense étant celle du grand axe (à $\lambda = 358$ nm). Lorsqu'est atteinte cette résonance (voir Fig. 1.21c), l'amplitude du champ local à la surface de la particule est ~ 20 fois supérieure à celle du champ incident. Une molécule fluorescente adsorbée sur la surface de la particule voit donc un champ d'intensité 400 fois plus grande ($|L(\omega_{exc})|^2 \sim 400$) et son taux d'excitation est alors augmenté d'un facteur ~ 400 .

Pour autant, le signal de fluorescence n'est pas amplifié d'un facteur 400. Si l'amplitude du champ d'excitation décroît avec la distance à la surface du métal (l'exaltation est confinée dans la zone des dix premiers nanomètres), le contact direct avec la particule n'est pas la configuration qui procure l'exaltation de fluorescence maximale. Il faut en effet tenir compte de la partition de l'énergie d'excitation dans les différentes voies de désexcitation radiatives et non-radiatives.

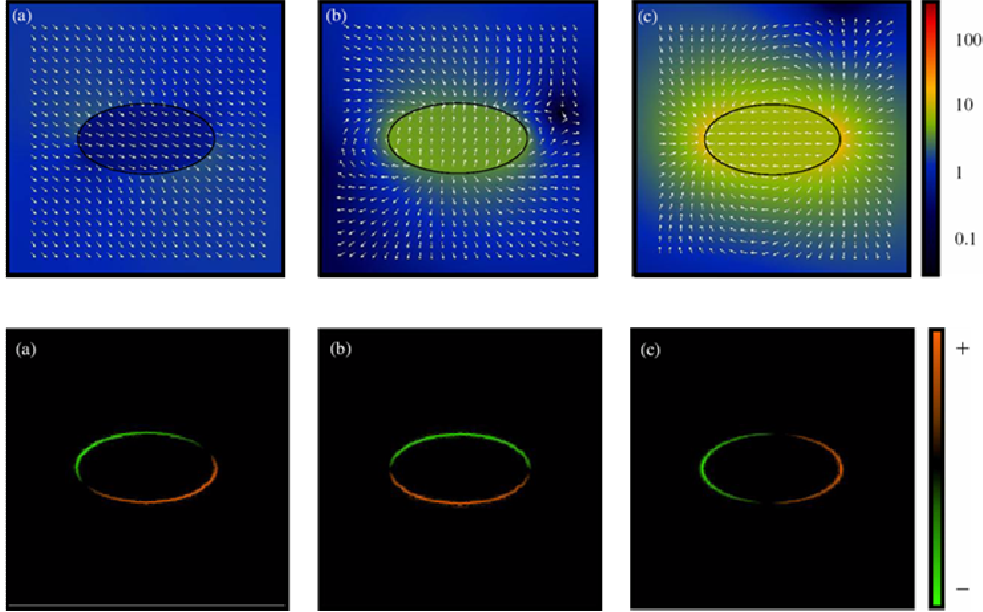


FIG. 1.21: Distribution de l'amplitude du champ électrique (images du haut) et de la polarisation des charges (images du bas) pour une ellipse : (a) hors de la résonance, $\lambda = 300nm$; (b) à la résonance à $\lambda = 331nm$; (c) à la résonance à $\lambda = 358nm$. Le champ électrique incident est polarisé suivant la direction $(\vec{1} \ 1)$ (Kottmann 2000b).

1.3.3.3 Couplage à l'émission

L'effet du couplage à l'émission est décrit par le terme Z de l'équation 1.16. Pour un système nanoparticule - fluorophore donné, Z est défini par la relation $Z = Q(d)/Q_0$ où $Q(d)$ et Q_0 sont les valeurs respectives prises par le rendement quantique de fluorescence de la molécule à la distance d de la nanoparticule et en l'absence de la particule. Dans un environnement de référence, *e.g.*, en solution ou sur un substrat inerte, les processus de désexcitations radiative et non-radiative du fluorophore sont caractérisés par les taux de transition k_r et k_{nr} . La présence d'une nanoparticule métallique dans l'environnement proche du fluorophore offre de nouvelles voies de désexcitations radiative et non-radiative, caractérisées par les taux $\Gamma_r(d)$ et $\Gamma_{nr}(d)$. D'où l'expression de $Q(d)$ et Q_0 :

$$Q_0 = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad ; \quad Q(d) = \frac{k_r + \Gamma_r(d)}{k_r + \Gamma_r(d) + k_{nr} + \Gamma_{nr}(d)} \quad (1.17)$$

La grande majorité des molécules fluorescentes peuvent être considérées comme des dipôles ponctuels. Une molécule placée à proximité d'une nanoparticule métallique bénéficie à l'excitation de l'amplification du champ électrique local, sans modifier significativement le champ émis par la particule. En général, on ne peut pas traiter de manière similaire le problème inverse, *i.e.*, l'interaction de la particule avec le champ émis par la molécule. En effet, une nanoparticule métallique ne se comporte pas comme un dipôle ponctuel lorsqu'elle est proche d'une source ponctuelle (le fluorophore), même

si c'est le cas lorsqu'elle répond à un champ électrique uniforme (voir le régime de Rayleigh). Dans cette configuration, la particule interagit avec le champ proche de la molécule, lequel est inhomogène à l'échelle de la particule. Cette interaction permet l'excitation de modes dipolaires et multipolaires d'ordre supérieur. L'énergie utilisée pour l'excitation des modes dipolaires est réémise radiativement : on dit alors que la particule diffuse le champ proche de la molécule. D'un point de vue quantique, on peut également considérer que la présence de la nanoparticule métallique accroît localement la densité de modes photoniques (PMD), et par conséquent le taux d'émission spontanée de la molécule. Cette exaltation des processus d'émission radiative est d'autant plus efficace que la fréquence d'émission de la molécule $\omega_{fluo}/(2\pi)$ est proche de la résonance plasmon de la particule. Le taux d'émission radiative $k_r + \Gamma_r(d)$ de la molécule varie comme l'intensité du champ électrique émis par la particule $|L(\omega_{fluo})|^2$ (Gersten 1981, Kümmerlen 1993).

Par contre, l'énergie utilisée pour l'excitation des modes multipolaires d'ordre supérieur est dissipée non-radiativement (*e.g.*, par effet Joules). Les composantes multipolaires d'ordre supérieur du couplage nanoparticule - fluorophore contribuent donc à l'atténuation du signal de fluorescence (*quenching*), non à son exaltation. Or, plus la distance d séparant la molécule de la particule est courte, plus le champ est inhomogène et le *quenching* domine sur l'exaltation de la fluorescence. Les positions les plus favorables à l'exaltation des processus d'excitation (contact direct avec le métal) sont donc les plus défavorables à l'émission radiative.

Il existe donc une distance finie qui offre un compromis entre exaltation à l'excitation et exaltation à l'émission, et qui donne une valeur maximale du rendement quantique apparent. Cette distance est de l'ordre de 10 nm (Kümmerlen 1993), et dépend d'un certain nombre de paramètres parmi lesquels l'indice optique du milieu autour et entre la molécule et la particule.

Il existe également une fréquence d'excitation optimale, proche du maximum d'extinction de la molécule et de la résonance plasmon de la nanoparticule métallique, pour laquelle le rendement quantique apparent est le plus grand. Notez que la distance optimale peut varier en fonction de la fréquence d'excitation, la distribution du champ électrique autour de la particule dépendant de celle-ci.

Par ailleurs, nous avons vu dans le paragraphe 1.2.2 (p.16) que la position et la largeur spectrale de la résonance plasmon dépend de la taille, la forme et la composition des particules. Il est donc possible d'adapter la résonance plasmon aux bandes d'absorption et d'émission de la molécule, pour optimiser le couplage nanoparticule - fluorophore.

Enfin, puisque les fréquences d'excitation et d'émission doivent toutes deux coïncider au mieux avec la résonance plasmon de la particule, il apparaît que les molécules présentant un grand déplacement de Stokes sont peu adaptées au type de couplage présenté dans ce paragraphe. Toutefois, un désaccord entre les fréquences d'émission monophotonique et de résonance plasmon est potentiellement favorable à l'exaltation de processus non-linéaires tels que la fluorescence biphotonique (Gryczynski 2002), si

ces processus sont associés à une fréquence d'émission plus proche de la résonance plasmon.

1.3.3.4 Films de nanoparticules métalliques

Différentes techniques de synthèse permettent d'obtenir des nanoparticules métalliques en solution colloïdale ou déposées sur un substrat solide plan. Dans ce dernier cas, on parle de *film de nanoparticules* ou de *nanoparticules supportées*. Cette géométrie peut être utilisée pour étudier l'interaction d'un grand nombre de molécules avec un grand nombre de nanoparticules métalliques tout en contrôlant la distance minimale séparant molécules et particules, *e.g.*, en couvrant le dépôt métallique d'un matériau diélectrique. Un autre intérêt de cette géométrie est de pouvoir contrôler la largeur de la résonance globale d'une assemblée de nanoparticules métalliques en agissant sur la distribution en taille des particules.

Un certain nombre de propriétés optiques nouvelles apparaissent lorsque les particules s'agrègent, *i.e.*, lorsque la distance séparant les centres de deux particules voisines est inférieure à leur diamètre moyen (Drachev 2002).

La première de ces propriétés nouvelles est l'apparition d'une deuxième distance optimale métal - fluorophore maximisant le rendement quantique apparent des molécules (Aussenegg 1987, Kümmerlen 1993) (voir Fig. 1.22a). Un premier maximum d'exaltation de fluorescence, intervenant à courte distance (5-10 nm), résulte de la compétition entre l'exaltation du champ d'excitation proche des particules et les processus de *quenching* par transfert d'énergie non-radiatif au métal. Ce phénomène est similaire à ce qui est observé pour l'interaction d'un fluorophore avec une nanoparticule unique (voir les parties précédentes du paragraphe 1.3.3). Un second maximum d'exaltation de fluorescence, mesuré pour des distances de l'ordre de $\lambda_{fluo}/4$, est dû à l'augmentation du rendement quantique du fluorophore induite par la présence du film métallique, combinée au phénomène d'excitation résonante associé à la réponse collective des nanoparticules. En champ lointain, le film de nanoparticules métalliques cumule les propriétés de résonance des nanoparticules individuelles et le comportement de miroir d'un film métallique continu (Kümmerlen 1993). Les facteurs contribuant à l'exaltation du rendement quantique apparent, dans ce dernier cas, sont représentés dans la Figure 1.23.

Lorsque les nanoparticules métalliques forment des agrégats, ou coalescent pour former des *îlots*, on observe un élargissement de leur spectre d'absorption. Nous avons vu précédemment que la résonance plasmon d'une nanoparticule métallique est associée à un pic d'extinction, et qu'à la résonance plasmon uniquement se forme un champ évanescent très intense autour de la particule. Lorsque que deux nanoparticules de grande polarisabilité (*e.g.*, des particules d'or ou d'argent) forment un dimère, elles interagissent fortement *via* des couplages multipolaires, généralement d'ordre supérieur au dipôle. Cette interaction modifie significativement les propriétés optiques du milieu (Kreibig 1996). Dans le cas simple du dimère de particules, la résonance plasmon se sépare en deux résonances d'énergies différentes, chacune correspondant à l'excitation

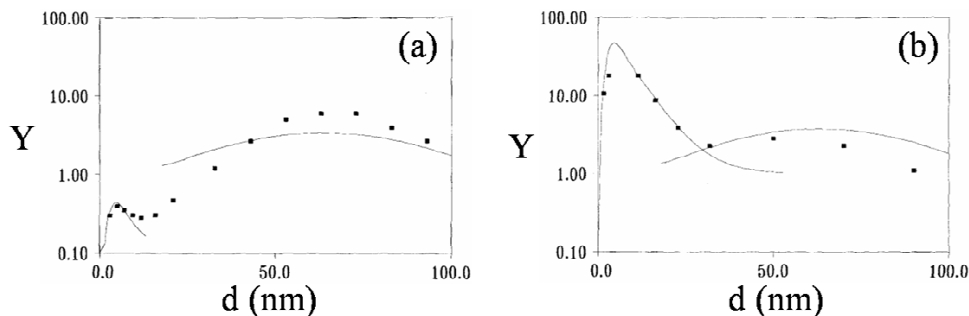


FIG. 1.22: Exaltation du rendement quantique de luminescence de la Rhodamine 6G en présence d'un film d'îlots d'argent, mesurée en fonction de la distance fluorophore/métal (Kümmerlen 1993). Le colorant est excité à $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; les intensités d'émission sont déterminées au maximum de fluorescence à $\lambda_{fluo} = 555 \text{ nm}$. Le colorant est séparé du film d'îlots métalliques par une couche de quartz d'épaisseur variable. (—) Exaltation théorique. Densité surfacique de fluorophores : (a) 10^{-3} monocouche, (b) 10^{-2} monocouche.

du plasmon suivant un axe différent du dimère (parallèle ou normal à l'axe formé par la paire de particules). Le dimère de particule forme alors un système anisotrope, dont l'excitation est sensible à la polarisation du champ incident. Dans le cas le plus général, *i.e.*, pour une assemblée de dimères de particules caractérisés par une certaine distribution de distances interparticulaires, cette interaction se traduit par un élargissement de la résonance plasmon globale (Drachev 2002). Par analogie avec le système simple du dimère de particules, on peut considérer cette large résonance comme la superposition d'un grand nombre de résonances locales, chacune caractérisée par une énergie et un axe préférentiel d'excitation. L'interaction d'un rayonnement incident avec un film d'agrégats métalliques mène à la formation de champs électriques évanescents et intenses, localisés en des régions du film qui varient suivant la fréquence d'oscillation et la polarisation du champ incident. Ces "sources" de champs locaux intenses sont nommés points chauds (*hot spots*), et ont été mises en évidence expérimentalement par microscopie optique de champ proche (*Scanning Near-field Optical Microscopy*, SNOM) (Grésillon 1999, Ducourtieux 2001, Williame-Mahieu 2005). Il s'avère que plus les particules s'agrègent, plus les points chauds sont intenses et confinés dans des zones d'aire réduite. La limite du processus de coalescence des particules (seuil de *percolation*) est associée aux plus intenses exaltations de champ local. Le comportement optique du film d'agrégats métalliques est alors comparable à celui d'une structure métallique fractale (Drachev 2001).

1.3.3.5 Transition optique au seuil de percolation

Une transition est observée dans la réponse optique des films de nanoparticules métalliques lorsque les particules augmentent en taille et coalescent progressivement pour former un film d'îlots métalliques percolé (Murray 2004). L'existence de cette transition optique contraste avec la continuité de l'évolution morphologique du film. Au seuil de percolation, le réseau de particules métalliques acquiert la propriété de

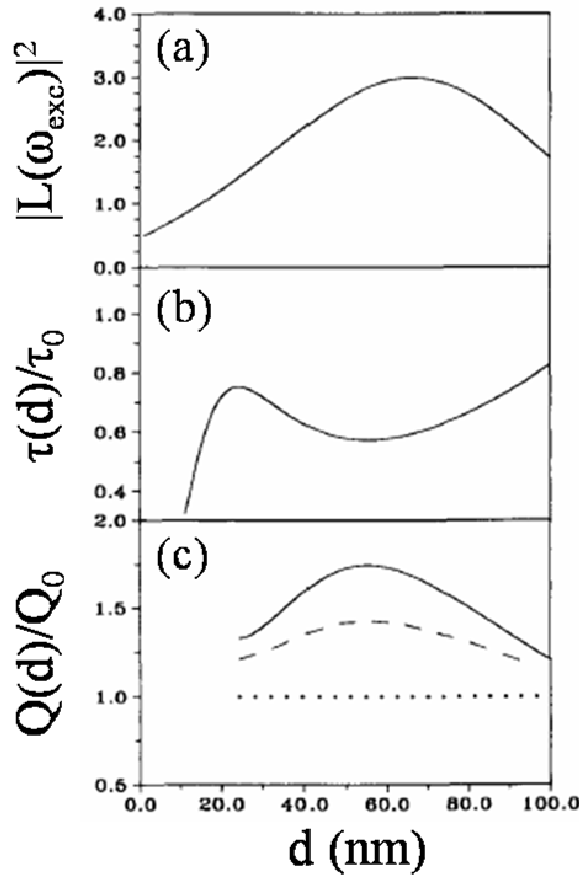


FIG. 1.23: Facteurs contribuant à l'exaltation du rendement quantique apparent aux grandes distances de séparation fluorophore/métal (Kümmerlen 1993). (a) Facteur d'exaltation $|L(\omega_{exc})|^2$ de l'intensité d'excitation. (b) Modification de la durée de vie $\tau(d)$ par rapport à celle du fluorophore dans l'espace libre τ_0 . (c) Accroissement relatif du rendement quantique de fluorescence $Z = Q(d)/Q_0$, pour un fluorophore de très faible rendement quantique $Q_0 = 10^{-4}$ (—), un cas intermédiaire $Q_0 = 0,5$ (- -) et le cas idéal $Q_0 = 1$ (. . .).

conductivité électrique. Dès que le seuil est franchi, une onde électromagnétique de surface peut se propager d'un bout à l'autre du réseau, d'où le passage brutal d'un confinement à 3D (nanoparticules) à un confinement à 1D (film continu) des plasmons de surface.

1.3.3.6 Processus non-linéaires

Les champs intenses apparaissant à la résonance plasmon favorisent en particulier les processus optiques non-linéaires tels que la diffusion Raman exaltée de surface (*Surface-Enhanced Raman Scattering*, SERS). Les facteurs d'exaltation en présence de nanoparticules métalliques sont bien plus grands pour le SERS que pour la fluorescence, notamment parce que le nombre de photons émis ne dépend pas linéairement du nombre de photons absorbés, mais quadratiquement. Un facteur d'exaltation propor-

tionnel à $|L(\omega_{exc})|^4$ est prévu, pouvant atteindre 10^6 (Moskovits 1985). Wang & Kerker (Wang 1981) ont calculé le facteur d'amplification du signal SERS pour des molécules adsorbées sur des particules d'or, d'argent et de cuivre, de forme sphéroïde prolate. Leur approche est basée sur le calcul de la polarisabilité des particules, et fait le lien entre extinction optique et exaltation du champ local.

1.4 Enjeux de l'exaltation des processus optiques en Biologie

L'imagerie cellulaire et tissulaire (§ 1.4.1, p. 43), et les puces à ADN (§ 1.4.2, p. 46) sont deux applications majeures de la fluorescence. Nous détaillons dans cette section les principales limites et les besoins actuels de ces applications, et discutons des réponses que peut apporter l'amplification des processus optiques à ces problèmes technologiques.

1.4.1 Imagerie cellulaire et tissulaire

1.4.1.1 Brilliance, contraste, et maintien du signal de fluorescence

Quand les niveaux d'intensité enregistrés pour les structures subcellulaires sont très proches du fond, il devient difficile de dessiner le contour des cellules ou de distinguer avec précision des structures telles que l'extrémité des microtubules. Des algorithmes génériques de traitement d'image ont été proposés (Altinok 2006), en outre des techniques de microscopie de déconvolution particulièrement intéressantes ont été récemment utilisées (Sibarita 2005), mais ces solutions restent toutefois très limitées dans le cas de faibles ouvertures numériques.

Outre la faiblesse du signal, un sérieux handicap de l'imagerie de fluorescence est la baisse progressive de l'intensité du signal au cours du temps d'exposition à la source d'excitation, due au processus de photoblanchiment (voir § 1.1.1.3, p.5). Même si des agents *antifading* (limitant les réactions d'oxydation) peuvent retarder cette baisse de signal, ce phénomène est un désavantage majeur pour les études dynamiques, en particulier en vidéomicroscopie à intervalles de temps (*time-lapse microscopy*). Cette technique d'imagerie consiste à acquérir des images à basse cadence afin de suivre des processus (*e.g.*, de développement cellulaire) qui se déroulent sur des périodes de temps étendues. Les intensités de signal peuvent alors difficilement être normalisées. Réduire la puissance d'excitation limite les effets du photoblanchiment et retarde la baisse du signal, mais mène à une baisse de l'émission de fluorescence.

La faiblesse du signal et la photoréactivité ont été partiellement résolues grâce aux récents progrès faits dans l'utilisation des nanocristaux de semi-conducteurs, communément appelés quantum dots (QDs) en biologie (Dubertret 2002, Jaiswal 2003, Michalet 2005). Les QDs émettent un signal plus intense et ont l'avantage, sur les fluorophores

moléculaires, de ne pas souffrir de photodestruction. Cependant, ils introduisent de nouveaux problèmes tels que le clignotement du signal d'émission et une faible biocompatibilité qui restreint le champ des applications *in vivo* possibles.

1.4.1.2 Photodégradation des échantillons biologiques

Un autre domaine d'application de cette technique peut être l'imagerie de cellules vivantes. Au cours de la décennie passée, la vidéomicroscopie est devenue un outil très répandu pour suivre un événement dynamique à l'intérieur du volume d'une cellule. Alors que l'ingénierie des protéines a permis de significatifs progrès dans le domaine des marqueurs fluorescents génétiquement encodés, il subsiste le problème de la sensibilité des échantillons vivants à l'irradiation par la lumière. Un exemple en est la susceptibilité des cellules à l'irradiation UV, spécialement lorsqu'elles entrent en mitose (Rieder 1998). La solution courante est de diminuer la puissance de la source d'excitation, ce qui mène à une baisse inévitable de l'intensité du signal détecté. Dans une telle situation, l'utilisation de substrats miroirs pourrait être, dans le futur, une bonne alternative pour rediriger le champ d'excitation qui traverse l'échantillon et aider à la collection de la lumière émise, tout en conservant le même niveau d'irradiation.

1.4.1.3 Champ d'observation et profondeur de champ

En biologie cellulaire, différentes échelles d'observation fournissent des informations complémentaires : l'observateur peut avoir besoin d'une vue de l'architecture globale d'un tissu, tout en souhaitant avoir accès à des détails plus fins. Alors qu'un faible grossissement donne un large champ d'observation, le biologiste peut être limité par la faible quantité de lumière collectée par les objectifs de microscope de faible ouverture numérique (généralement associée au faible grossissement). Même en faisant appel à des systèmes d'amplification tels que pour l'immunofluorescence indirecte d'échantillons fixés, il peut être difficile d'extraire une information valable d'échantillons marqués avec une faible quantité de fluorophores.

L'ouverture numérique de l'objectif est définie par le cône de lumière entre le foyer et la lentille. Sa valeur est fonction de l'indice de réfraction n et de l'angle d'ouverture de l'objectif θ , et est donnée par la relation 1.18.

$$O.N. = n \sin(\theta) \tag{1.18}$$

L'ouverture numérique élevée des objectifs à immersion à huile ($n = 1,51$) permet de multiplier l'efficacité de collection par un facteur ~ 3 , par rapport aux meilleurs objectifs à air. Cependant, les objectifs à immersion à huile sont uniquement disponibles en fort grossissement (typiquement supérieur à $\times 40$). Ce type d'objectif est donc bien adapté à l'imagerie des structures sub-cellulaires mais ne permet pas de visualiser, dans le même champ d'observation, la structure tissulaire dans laquelle la cellule est intégrée. Le lien entre les informations obtenues par l'examen de la structure interne des

cellules et celui de l'architecture du tissu ne peut être fait qu'en alternant faible et fort grossissements. Cette opération, répétée plusieurs fois tout en balayant l'échantillon, se révèle vite être compliquée, à cause de la présence de l'huile d'immersion, et source de perte de temps. Elle est donc un handicap pour toute application clinique. L'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique est d'autant plus inadaptée que la résolution latérale qu'ils apportent est bien souvent inutile.

Un autre paramètre crucial pour l'imagerie cellulaire et tissulaire est la profondeur de champ d_{tot} (ou résolution axiale), laquelle correspond à l'épaisseur de l'objet qui donne de l'information dans l'image résultante. d_{tot} est donné par la relation 1.19.

$$d_{tot} = \frac{\lambda_0 n}{O.N.^2} + \frac{n e}{M O.N.} \quad (1.19)$$

où λ_0 est la longueur d'onde d'excitation et M est le grossissement de l'objectif. Le premier terme de l'expression de d_{tot} dépend uniquement de la géométrie optique de collection, tandis que le second est associé à la résolution e de l'appareil de détection (caméra, film photographique, œil...). Augmenter l'ouverture numérique ou le grossissement d'un objectif a pour conséquence de réduire la profondeur de champ (Perlman 1971). Par exemple, la profondeur de champ associée à un objectif $100\times$ d'ouverture numérique 1,4 ($d_{tot} \approx 0,6 \mu m$) est 10 fois plus faible que celle d'un objectif $20\times$ d'ouverture numérique 0,4 ($d_{tot} \approx 5 \mu m$).

L'étendue, suivant l'axe optique de l'objectif, d'un échantillon biologique tel qu'une cellule ou une coupe de tissu est généralement très supérieure à la profondeur de champ des objectifs de grande ouverture numérique. Les parties de l'échantillon qui se situent en dehors du plan objet de l'objectif forment une image floue dans le plan d'observation, rendant inaccessible une partie de l'information recherchée. En utilisant des objectifs de grande ouverture numérique (et donc de faible profondeur de champ), l'observateur devra donc continuellement déplacer le plan de focalisation entre la base et le sommet de l'échantillon afin de sonder la totalité d'un échantillon épais. Ceci est un inconvénient certain, *e.g.*, pour des applications au diagnostic médical qui nécessitent efficacité et rapidité d'exécution. De plus, cela complique et ralentit l'automatisation de telles observations, et est donc peu compatible avec des applications biomédicales impliquant un traitement rapide (*haut-débit*) de l'information. Ce type d'applications, généralement désigné par les termes *high-throughput analysis*, *high-throughput screening* (Liu 2004) ou *high content screening* (Abraham 2004), permet de conduire un grand nombre de test biomédicaux, génétiques ou pharmacologiques, en un temps très court. Ces méthodes mettent en œuvre des systèmes d'optique automatisés ainsi que des supports d'échantillons adaptés au traitement parallèle, tels que les *tissue microarrays* (Battifora 1986, Kononen 1998, Moch 2001), et sont de plus en plus répandues dans les laboratoires cliniques et de recherche.

Il y a donc une demande importante pour tout type de technologie permettant de compenser les faiblesses des objectifs de microscope à faible grossissement, afin de pouvoir réaliser toutes les mesures nécessaires à l'analyse d'un échantillon biologique avec un seul objectif. L'utilisation de substrats miroirs constitue l'une de ces technologies.

1.4.2 Puces à ADN

1.4.2.1 Principe et intérêt

Nature et fonction de l'ADN

L'ADN (ou *acide désoxyribonucléique*) est le matériel où sont stockés l'information génétique et l'ensemble des caractères héréditaires d'une cellule. Sa structure moléculaire consiste en une double hélice constituée de deux simple-brins liés (voir Fig. 1.24a), chacun étant constitué d'une chaîne de *nucléotides*. Les quatre nucléotides, sous-unités de l'ADN, contiennent les bases azotées *adénine* (A), *guanine* (G), *cytosine* (C) et *thymine* (T). Les bases s'assemblent selon une complémentarité exclusive : A s'apparie uniquement avec T, et G avec C (voir Fig. 1.24b). Le matériel génétique de l'ADN peut servir à être reproduit à l'identique (lors de la *réplication*) ou traité en vue d'élaborer de nouvelles molécules nécessaires au métabolisme des cellules (durant les opérations de *transcription* et de *traduction*).

Développement des puces à ADN

Ces dernières années, le développement des puces à ADN a suscité un intérêt considérable parmi les biologistes (Persidis 1998). Cette technologie est conçue pour l'analyse parallèle d'acides nucléiques et permet d'identifier différentes séquences d'ADN présentes dans un échantillon. Notamment, elle permet le décryptage d'un génome entier sur une puce unique, de telle sorte que les chercheurs peuvent avoir une vision complète et simultanée des interactions parmi des milliers de gènes (Lipshutz 1999, Brown 1999).

Pour apprécier l'intérêt des puces à ADN, rappelons que le génome humain comprend approximativement 30 000 gènes. L'enjeu est de suivre simultanément leur niveau d'expression dans différentes cellules et sous différentes conditions, ainsi que d'étudier le rôle de million de *polymorphismes* observés sur les nucléotides. Cette méthode d'analyse massivement parallèle est nécessaire pour atteindre ces objectifs. Depuis que leur invention a été rendue publique, la production de puces à ADN est devenue une industrie et

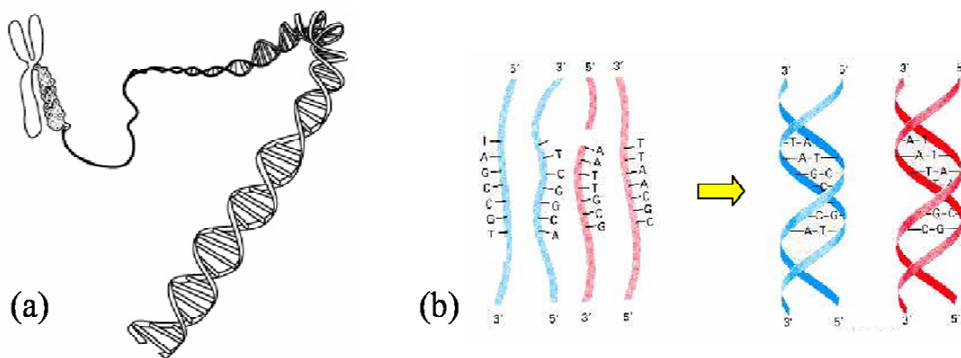


FIG. 1.24: "Empaquetage" de l'ADN dans un chromosome (a), et hybridation de deux paires de monobrin d'ADN suivant la règle de complémentarité des bases azotées (b).

leur utilisation dans la recherche biomédicale s'est généralisée. Avec la généralisation du marquage fluorescent de l'ADN et le développement de systèmes de lecture rapide des puces, la puce à ADN est appelée à devenir un outil omniprésent pour les professionnels de la santé. Dans un futur proche, cette technologie permettra, par exemple, de réaliser un diagnostic médical (*e.g.*, sur les prédispositions d'un patient à développer une maladie génétique) ou un test sur l'environnement (*e.g.*, présence de micro-organismes dans l'eau), de manière systématique, rapide et à moindre coût (Shi 2002).

Principe des puces à ADN

Le substrat de la puce à ADN est généralement une surface plane (*e.g.*, de verre ou de nylon) ou portant un réseau de réservoirs microscopiques appelés *micro-puits*. Cette surface présente un grand nombre de "zones actives", appelées *spots*. En ces spots, un grand nombre d'*oligonucléotides*² d'une séquence connue sont greffés sur la surface par une liaison chimique. Ces brins fixés à la surface jouent le rôle de *sondes*. La puce est ensuite mise en contact avec une mixture d'acides nucléiques extraits d'un échantillon à analyser et conjugués à des marqueurs permettant leur détection. Ces acides nucléiques jouent le rôle de *cibles*. Chaque cible se lie préférentiellement à une sonde complémentaire, pour former une double hélice (*hybridation*, voir Fig. 1.24b). La composition de la mixture est déduite de la concentration de cibles hybridées en chaque spot (Souteyrand 2000, Pirrung 2002). Pour obtenir cette information, la puce est rincée pour éliminer les cibles non-hybridées, puis la présence de cibles hybridées est détectée et quantifiée par grâce aux signaux émis par les marqueurs.

La méthode de détection des cibles hybridées dépend du type de marqueurs utilisés, les plus communs étant les fluorophores moléculaires, les isotopes radioactifs et les enzymes³. Les marqueurs fluorescents sont généralement détectés dans des systèmes automatisés d'imagerie à balayage laser (*scanners*). Dans le cas du marquage radioactif, les isotopes radioactifs (*e.g.*, ³²P et ³³P) peuvent être localisés par impression des rayons X qu'ils émettent sur un film radiographique, ou par imagerie sur un écran radiosensible au phosphore (autoradiographie). Plusieurs méthodes de détection électrochimiques et optiques utilisent le marquage enzymatique : la *chronoampérométrie* met en jeu la mesure de variations de potentiel électrique induites par réaction entre les marqueurs et le substrat, tandis que la *colorimétrie* est basée sur l'observation de modifications du spectre d'absorption produites lors de l'hybridation (Campàs 2004).

Un des principaux inconvénients de ces méthodes est l'instabilité des marqueurs. C'est pourquoi ont été développées des techniques qui ne nécessitent pas l'utilisation de marqueurs, tels que la *transduction piézoélectrique* (PzT) ou l'*excitation résonante du plasmon de surface* (SPR). La détection des cibles hybridées par PzT est basée sur le même principe que les microbalances à quartz (voir § 2.1.1.4, p.57) : le substrat est un

²Les *oligonucléotides* sont de courtes séquences de nucléotides (ARN ou ADN), simple-brin et longs de quelques dizaines de bases. Ils sont en général obtenus par synthèse chimique.

³Principales entreprises impliquées dans le développement et la commercialisation de ces systèmes : Affimetrix et Incyte Pharmaceuticals (marquage fluorescent) ; Clontech (marquage radioactif) ; Display Systems Biotech et Genzyme (marquage enzymatique).

cristal de quartz qui vibre à une fréquence qui dépend de sa masse et se déplace lorsque les cibles se lient à sa surface (Zhou 2001). La technique SPR implique l'utilisation d'un substrat métallisé dans la configuration de Kretschmann vue précédemment (voir § 1.2.4.2, p.22). Le coefficient de réflexion de la lumière sur la face interne du substrat métallisé, en fonction de l'angle d'incidence, dépend de l'indice optique du milieu à la surface du substrat (Homola 1999). Le suivi de la variation locale de cet indice, induite par la présence des cibles, permet de suivre l'hybridation au cours du temps. Couplée à un système d'imagerie, cette technique permet de lire l'ensemble de la puce simultanément (Lecaruyer 2006).

Les approches "sans marqueurs" sont associées à des temps d'analyse plus court et des protocoles opératoires plus simples. Toutefois, le coût de l'instrumentation nécessaire étant généralement plus élevé, les techniques de marquage fluorescent et électrochimique sont les plus répandues. Actuellement, la plupart des puces à ADN utilisent des méthodes de détection de fluorescence (Campàs 2004).

1.4.2.2 Limites et besoins

Petits bijoux de technologie combinant le savoir-faire de la biochimie, de l'électronique et de l'informatique, les puces à ADN actuelles ne sont pourtant pas parfaites. Le rendement de l'hybridation restant faible, une quantité relativement grande de matériel génétique est nécessaire pour obtenir des mesures valides. Ce problème provient, d'une part, de propriétés chimiques. L'encombrement autour des brins d'oligonucléotides, dû à leur arrangement sur la surface de la puce, réduit l'accessibilité des sondes. La fixation non-spécifique de cibles sur la surface, *i.e.*, sans qu'il y ait hybridation avec une sonde complémentaire, dégrade également le rapport signal-à-bruit lors de la lecture de la puce. Par conséquent, l'utilisation des puces à ADN nécessitent généralement une pré-amplification biochimique, par répllication *in vitro* du matériel génétique (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Cette étape est longue et coûteuse, et il est difficile de pouvoir obtenir un résultat autre que qualitatif, ou semi-quantitatif, après amplification du matériel initial.

Dans le cas du marquage fluorescent, la faible efficacité de détection du signal optique est également un facteur limitant la fiabilité de l'analyse de la puce. Un besoin primordial est la localisation précise des marqueurs fluorescents pour accroître le rapport signal-à-bruit (*e.g.*, afin de pouvoir discriminer les brins d'ADN hybridés de ceux qui ne le sont pas) et pour développer des puces à ADN de haute densité. Ensuite, la détection de très faibles concentrations moléculaires est indispensable pour des applications où la quantité de matériel biologique est limitée (*e.g.*, diagnostic génétique en embryologie).

1.4.2.3 Solutions actuelles

Différentes stratégies peuvent être adoptées pour améliorer la sensibilité à la détection de la fluorescence dans les puces à ADN (Bras 2004).

Réactivité de surface

Une première classe de solutions consiste à accroître la densité et la spécificité des événements d'hybridation à la surface de la puce. Cela peut être réalisé en augmentant la surface spécifique de la puce, par l'utilisation de supports poreux (Yershov 1996, Proudnikov 1998), ou en augmentant la densité de sondes, par l'utilisation de structures dendrimériques (Le Berre 2003).

La majorité des efforts se sont jusqu'ici portés sur le développement de surfaces spécifiquement conçues pour l'accrochage covalent d'oligonucléotides (Dugas 2004). Des polymères ont été développés pour assurer une fixation forte des brins d'ADN tout en leur laissant une mobilité suffisante afin qu'ils restent accessibles pour l'hybridation. En outre, l'inactivation des groupements fonctionnels permet de rendre la surface la moins réactive possible aux matériaux en solution. Ces traitements de chimie de surface ont pour but d'accroître le rendement d'hybridation spécifique, en favorisant les interactions sonde/cible et en limitant la fixation non-spécifique de cibles sur la puce.

Configurations optiques alternatives

La sensibilité à la détection des fluorophores peut également être améliorée par l'utilisation de configurations optiques alternatives. Des mesures très sensibles peuvent notamment être réalisées par excitation des fluorophores en ondes évanescentes. Budach *et al.* (Budach 1999) ont développé des substrats *guides d'ondes*, dont la surface est recouverte d'une fine couche d'oxyde métallique qui est utilisée pour "piéger" la lumière et former localement d'intenses champs optiques. Récemment, le même groupe (Neuschäfer 2003) a proposé un système de guide d'onde structuré périodiquement comme un réseau optique (*Evanescent Resonator Chip*). Pour un angle d'incidence bien précis, le couplage de la lumière avec le guide d'onde est résonant et une amplification du signal d'un facteur 170 est observée.

Knoll *et al.* (Liebermann 2000, Kambhampati 2001) ont démontré l'intérêt, pour la détection ultrasensible des événements d'hybridation sur une puce à ADN, de coupler la détection de fluorescence au type d'excitation utilisé pour la technique SPR. L'utilisation d'un substrat couvert d'un film métallique plat ou structuré périodiquement, et d'une configuration d'illumination de type Kretschmann (voir § 1.2.4.2, p.22), permet d'amplifier le champ d'excitation évanescent à la surface du substrat grâce au couplage résonant de la lumière incidente avec les plasmons de surface. Cette technique est généralement nommée *spectroscopie de fluorescence exaltée par le champ du plasmon de surface*. Les auteurs ont mesuré un gain d'un facteur 16 en terme d'efficacité de détection des fluorophores, sur un film d'or, et prévoit un facteur théorique compris entre 50 et 80 pour un film d'argent (Liebermann 2000).

Les principaux inconvénients de ces "puces à ondes évanescentes" sont la relative complexité de leur procédé technique de fabrication et la nécessité d'utiliser un équipement spécifique, ces deux points impliquant un coût élevé.

Substrats miroirs

Une solution plus simple consiste à traiter la surface des substrats pour accroître leur réflectivité. Nous avons vu précédemment (voir § 1.3.1, p.25) que les taux d'excitation et d'émission des fluorophores peuvent être amplifiés en présence d'une surface réfléchissante, pourvu que les fluorophores soient positionnés à une distance appropriée de la surface (Drexhage 1974). Cette technique est déjà utilisée pour les substrats de puces à ADN commercialisés par *TeleChem International, Inc.*⁴. Ces substrats miroirs sont des supports standard couverts d'un film métallique (*e.g.*, d'aluminium) et d'une couche séparatrice (*e.g.*, d'oxyde de silicium) (Kain 1999). Pour une puce à ADN réalisée sur un substrat miroir, le fournisseur annonce une amplification du rapport signal-à-bruit d'un facteur 2 à 10, par rapport à un substrat standard.

Plus récemment, Chatelain *et al.*⁵ (Barritault 2004, Fouqué 2005) ont proposé de remplacer le miroir métallique par un miroir diélectrique (*miroir de Bragg*), constitué d'un empilement alternée de couches "quart-d'onde" d'oxyde de silicium (SiO_2) et de nitrure de silicium (Si_3N_4). Les auteurs ont mesuré un facteur d'amplification du signal de fluorescence d'environ 20, pour un empilement de sept paires de couches diélectriques. Ce type de substrat est aujourd'hui commercialisé par l'entreprise *Genewave* (Choumane 2005) (voir Fig. 1.25). Par rapport au miroir métallique, le miroir de Bragg présente l'avantage de n'induire ni pertes optiques ni autofluorescence, mais son efficacité et sa reproductibilité demande une maîtrise extrêmement précise du dépôt des couches et un contrôle *a posteriori* de leur épaisseur.

Bras *et al.* (Bras 2004) ont montré que des substrats de silicium monocristallins oxydés (Si/SiO_2), d'usage courant en microélectronique, peuvent servir de substrat réfléchissant pour l'amplification de la fluorescence. La couche de SiO_2 d'épaisseur contrôlée joue le rôle de couche séparatrice. Les auteurs ont mesuré un facteur d'amplification du signal de l'ordre de 10, pour la Cyanine 3. Cette technique simple et reproductible est cependant limitée par le fait que le substrat n'est pas totalement réfléchissant (coefficient de réflectivité : 35-40% pour $\lambda \in [500; 700]$ nm).

Un des inconvénients des substrats miroirs, par rapport aux techniques d'excitation en ondes évanescentes, est que l'épaisseur optimale de la couche séparatrice dépend de la longueur d'onde d'excitation (elle doit être telle que les fluorophores se trouvent dans un ventre de champ), ce qui limite leur efficacité dans les applications impliquant plusieurs fluorophores différents. Toutefois, Choumane *et al.* (Choumane 2005) montrent, pour le couple de fluorophores le plus utilisé dans les puces à ADN (Cyanine 3 et Cyanine 5), qu'une amplification d'un facteur moyen ~ 16 est obtenue pour une couche séparatrice d'épaisseur intermédiaire.

⁴TeleChem International, Inc., *ArrayIt*[®] *Microarray Technology*, <http://www.arrayit.com>.

⁵Laboratoire Biopuces du CEA Grenoble.

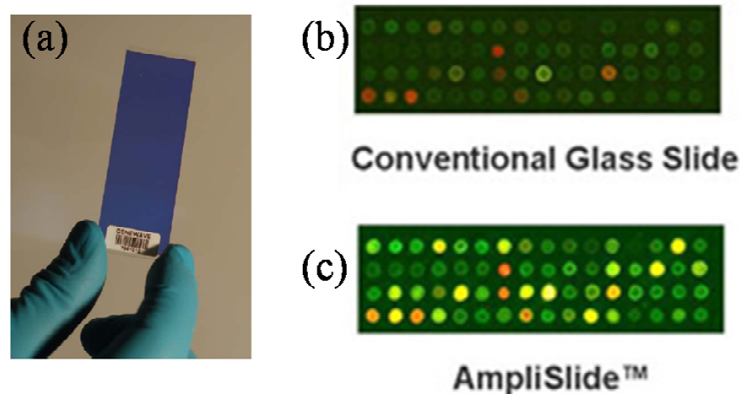


FIG. 1.25: Lame réfléchissante pour les biopuces. (a) Photographie d'un support *Amplislide™* commercialisé par l'entreprise *Genewave*. (b,c) Images de fluorescence de puces à ADN réalisée sur une lame standard (b) et une lame réfléchissante *Amplislide™* (c). *Genewave* annonce une amplification moyenne d'un facteur ~ 16 pour les sondes fluorescentes *Cy3™* et *Cy5™* (Choumane 2005).

Résonance plasmon localisée

Lakowicz *et al.* (Malicka 2003, Sabanayagam 2007) ont développé une approche différente, basée sur l'exaltation de la fluorescence sur des films d'îlots d'argent (*Silver Island Films*, SIF). Le principe repose sur l'amplification des champs optiques observée lorsque les plasmons localisés des nanostructures métalliques sont excités à la résonance (voir § 1.3.3, p.35). En déposant ce type de film sur le substrat d'une puce à ADN, et en greffant les sondes sur le métal, les auteurs ont mesuré une amplification d'un facteur ~ 12 du signal de fluorescence émis par les cibles hybridées. Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients, par rapport aux substrats miroirs. Comme nous l'avons vu précédemment (voir § 1.3.3, p.35), une condition *sine qua non*, à l'amplification du taux d'excitation des fluorophores, est que la résonance plasmon des îlots métalliques s'accorde à la longueur d'onde d'excitation et à la bande d'absorption des fluorophores. Ce type de substrat est donc peu adapté à l'utilisation de plusieurs fluorophores différents sur une même puce. D'autre part, l'amplification des taux d'excitation et d'émission dépend fortement de la distance au métal, et le signal de fluorescence est donc susceptible de varier suivant l'arrangement des brins d'ADN sur les îlots d'argent. Une plus faible reproductibilité est entendue dans les mesures, par rapport à un substrat miroir.

Chapitre 2

Méthodes expérimentales et de simulation

Nous avons présenté, dans le Chapitre 1, le contexte de ce travail de thèse. Les principes fondamentaux de la fluorescence et les limites de la détection de fluorescence comme technique d'analyse et d'imagerie ont été détaillés. Nous avons présenté l'état de l'art du contrôle électromagnétique des processus optiques, ainsi que les principaux besoins pour les applications de la détection de fluorescence en biologie. Pour répondre à ces besoins, nous proposons l'utilisation de substrats métallisés qui fournissent un gain de signal à la détection des fluorophores.

Dans la première section du Chapitre 2 (§ 2.1, p.53), nous décrivons les méthodes d'élaboration et de caractérisation de ces substrats métallisés. L'intérêt d'utiliser ces substrats à la place des lames de verre standard a été démontrée pour plusieurs applications biomédicales. Le principe de ces applications et les méthodes de préparation des échantillons biologiques sont présentés dans la seconde section du Chapitre 2 (§ 2.2, p.67). La troisième section porte sur les méthodes optiques, d'imagerie et d'analyse spectrale de fluorescence, mises en œuvre dans cette étude (§ 2.3, p.75). La quatrième et dernière section est consacrée aux techniques de modélisation développées pour calculer la réponse théorique des fluorophores en présence d'un substrat (§ 2.4, p.80).

2.1 Préparation des substrats métallisés

2.1.1 Fabrication

2.1.1.1 La base des substrats

Les substrats métallisés sont développés à partir de lamelles couvre-objets de dimension 20×20 mm et d'épaisseur 0,13 - 0,17 mm (*micro cover glass*, Erie Scientific Co.). Des lames de microscopes de taille standard 3×1 pouces et d'épaisseur 0,97 - 1,05 mm

(*Gold Seal slide*, Erie Scientific Co.) ont également été taillées au format 20×20 mm, à l'aide d'une pointe de diamant, afin d'obtenir des substrats plus rigides. Ces lames et lamelles de verre float sont d'usage courant en microscopie, notamment pour toutes les études biologiques. Avant tout dépôt, les lames sont soumises à un traitement de surface afin d'éliminer toute impureté et assurer ainsi la formation de couches métalliques régulières. Sur les lames non traitées, la teinte du verre métallisé présente des variations qui traduisent l'inhomogénéité du film formé.

Différents protocoles ont été employés pour améliorer la qualité de surface des lames. Une première méthode basée sur une action chimique a été expérimentée. Un bain chimique d'une heure dans une solution d'acide nitrique / acide chlorhydrique (1 : 1, v/v), suivi de nombreux rinçages à l'eau distillée, permet de nettoyer les deux faces des lames. Toutefois, cette méthode a été abandonnée car elle nécessite une hotte aspirante et des mesures de protection contraignantes. La méthode retenue consiste à nettoyer les lames avec un produit contenant des tensioactifs (un produit vaisselle par exemple), les rincer à l'eau filtrée *milli-Q* puis à les soumettre durant 5 minutes à l'action des ultrasons dans un bain d'éthanol absolu (éthanol 99,7% - 100% v/v, *AnalaR*, BDH Laboratory Supplies). Cette étape permet de séparer de la surface les éclats de silice créés par la coupe du verre, ou initialement présents sur les lames. Après séchage sous un flux d'azote, les traces d'impuretés organiques susceptibles de polluer la surface sont éliminées par l'action d'un gaz d'oxygène ionisé dans un four à plasma radio-fréquence (Polaron PT7160), durant 3 minutes sous une pression d'oxygène d'environ 10 Pa.

2.1.1.2 Le bâti ultravide

Les dépôts de métal et de matériau diélectrique sont réalisés sous vide (pression : 10^{-8} torr), dans un bâti (Fig. 2.1) constitué d'une chambre principale et d'un sas d'introduction qui communiquent par un conduit (diam. 0,025 m). Une canne de transfert, dirigée manuellement grâce à un anneau magnétique et orientée à l'aide d'un plateau à trois vis, permet d'acheminer un *molyblock* (pièce métallique supportant la lame de verre) du sas jusqu'au porte-échantillon et de le retirer après le traitement. Une vanne à tiroir permet d'isoler la chambre principale et le sas. Ainsi, les échantillons peuvent être introduits dans le bâti (et retirés du bâti) sans dégrader la qualité du vide dans la chambre principale.

Chacune des deux enceintes est équipée de jauges de pression et est reliée à des systèmes de pompage indépendants. La chambre principale est reliée à une pompe turbomoléculaire (vide secondaire), elle-même reliée à une pompe à palettes lubrifiées (vide primaire). Une vanne à vis permet d'ouvrir le sas sur une pompe à palettes qui permet d'atteindre un vide primaire après ouverture du sas. Une vanne à tiroir permet ensuite d'ouvrir le sas sur une pompe turbomoléculaire.

Le porte-échantillon possède deux positions sur lesquelles le *molyblock* peut-être fixé (voir Fig. 2.2). Toutes deux sont équipées d'un thermocouple. Une des deux positions dispose d'une résistance chauffante ($T_{max} = 700^\circ\text{C}$) qui permet de contrôler la température du substrat pendant le dépôt, de réaliser des recuits après dépôt, ou

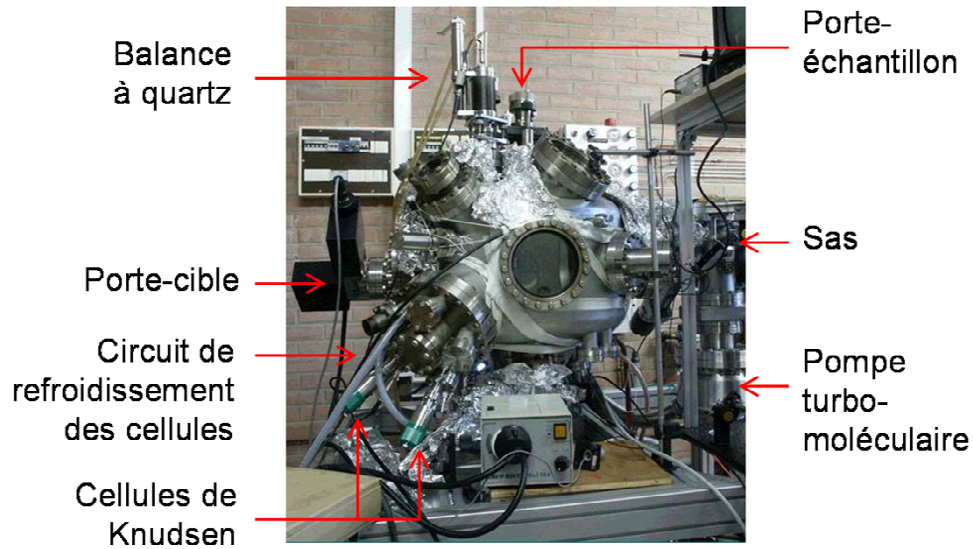


FIG. 2.1: Vue extérieure du bâti d'expérience.

d'évaporer un solide organique (un colorant par exemple) déposé dans un *molyblock* en forme de coupelle. Un système d'asservissement en température permet de programmer différentes phases de traitement thermique (montée en température, plateau...). Le porte-échantillon possède quatre degrés de liberté : rotation, déplacement vertical, déplacement de l'axe de rotation dans les deux directions du plan horizontal. Ainsi, l'échantillon est dirigé vers les différentes sources de dépôt (ablation laser / évaporation thermique) et une série de plusieurs dépôts successifs peut être réalisée sans sortir l'échantillon du bâti.

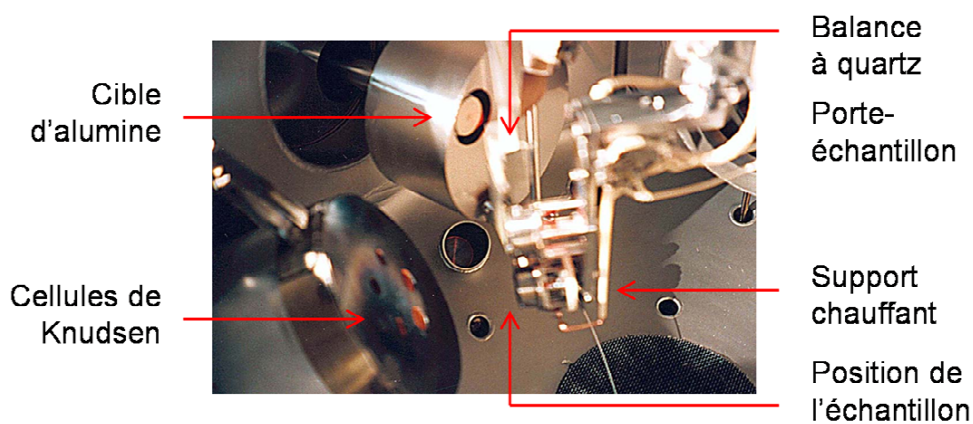


FIG. 2.2: Vue intérieure du bâti de dépôt ultra-vide.

2.1.1.3 Techniques de dépôt

Après la procédure de nettoyage décrite précédemment (§ 2.1.1.1), les lames de verre sont couvertes d'une couche de métal (or ou argent). Le dispositif expérimental fournit deux méthodes différentes pour réaliser des films métalliques : l'évaporation thermique et l'ablation laser. La morphologie des films varie sensiblement d'une méthode à l'autre. Pour certaines applications, un film de chrome est déposé par ablation laser, avant dépôt de l'or ou de l'argent.

La majorité des films métalliques a été réalisée par évaporation thermique, en utilisant une *cellule de Knudsen* (Knudsen 1950). Un lingot de métal de grande pureté (GoodFellow, 99,99%) est placé dans un creuset d'alumine ou de carbone, chauffé par une résistance électrique, et l'ensemble de la cellule est refroidi grâce à un système de circulation d'eau. La température est mesurée au niveau du creuset par un thermocouple et réglée par le contrôle du courant traversant la résistance. Le flux de matière, en sortie de l'ouverture de la cellule, varie en cosinus de l'angle par rapport à l'axe de la cellule (loi de Lambert). L'échantillon est situé à une distance de la cellule suffisamment grande pour pouvoir considérer que le flux d'atomes est homogène sur toute la surface de l'échantillon.

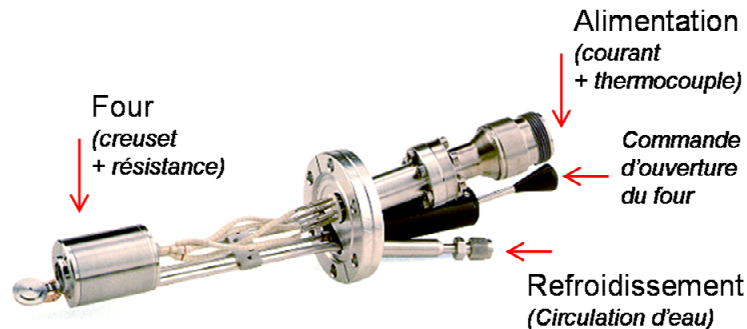


FIG. 2.3: Cellule de Knudsen.

Le film métallique peut ensuite être recouvert d'une couche d'alumine amorphe (Al_2O_3) permettant de contrôler la distance séparant les fluorophores de la surface conductrice. Cette couche est suffisamment dense pour empêcher la diffusion des molécules fluorescentes à travers l'alumine. Une meilleure homogénéité du dépôt métallique a été constatée pour les substrats ayant reçu au préalable une sous-couche d'alumine. Ce dépôt préparatoire ainsi que la couche de séparation sont réalisés par ablation laser (*Pulsed Laser Deposition*, PLD). Cette technique permet d'arracher de la matière d'une cible de métal ou d'un matériau diélectrique par impulsions laser de grande puissance. La source est un laser excimer au KrF ($\lambda = 248$ nm) qui émet des impulsions laser de 15 ns, d'énergie comprise entre 100 et 300 mJ, à des cadences comprises entre 1 et 20 Hz. Le faisceau laser est dirigé et focalisé sur la cible par un jeu de miroirs et de lentilles. Le dépôt d'alumine n'aurait pas pu être réalisé par évaporation thermique, car les cellules de Knudsen ne permettent pas d'atteindre des températures suffisamment élevées.

L'échantillon est placé à 5 cm d'une cible d'alumine. Un système automatisé de miroirs mobiles et de cible en mouvement de rotation permet de répartir les impacts du laser sur l'ensemble de la surface de la pastille d'alumine afin d'en préserver l'état le plus longtemps possible. L'utilisation de cibles de silice a été abandonnée en raison de leur transparence à la longueur d'onde d'émission du laser d'ablation. Le dépôt d'alumine est homogène, amorphe et supposé non poreux.

2.1.1.4 Étalonnage des méthodes de dépôt

Le flux atomique dépend principalement de la température du creuset pour l'évaporation thermique, et de la puissance de l'impulsion laser pour l'ablation laser. L'étalonnage de la source de matière est réalisé grâce à deux *microbalances à cristal de quartz* qui viennent se placer à la position de l'échantillon et mesurer le taux de dépôt. La microbalance à quartz permet de mesurer des masses très faibles. Son principe est le suivant : un cristal de quartz piézo-électrique vibre sous l'action d'un signal électrique sinusoïdal. La fréquence de résonance du cristal est corrélée à sa masse. Tout ajout ou retrait de matière provoque un déplacement de la fréquence de résonance. Pour un cristal de quartz donné, deux paramètres (densité et impédance acoustique) intrinsèques au matériau déposé suffisent à relier le déplacement de la résonance à la variation d'épaisseur du film formé. Typiquement, les taux d'évaporation d'or et d'argent utilisés lors de l'élaboration des substrats métallisés sont de l'ordre de 1 nm / min ; les taux d'ablation de l'ordre de 1 nm d'alumine par cycle de 100 tirs et quelques dixièmes de nanomètres de chrome par cycle de 1000 tirs, à une cadence de 10 Hz.

2.1.1.5 Échantillons multi-zones

Nous avons développé une méthode permettant d'étudier, sur un même échantillon, plusieurs types de dépôts simultanément en faisant varier un à deux paramètres (*e.g.*, épaisseurs du film métallique et de la couche séparatrice). Le principe est de découvrir progressivement la surface de la lame pendant le dépôt de métal et d'alumine. Pour cela, deux caches fixés sur des tiges *push-pull* graduées – une translation horizontale pour l'évaporation thermique et une translation verticale pour l'ablation laser, sont déplacés de manière à former un quadrillage, *e.g.*, de 20×20 zones sur un substrat de 20×20 mm. Ce type de substrats présente l'avantage de garantir une grande reproductibilité dans l'expérience, puisqu'un seul échantillon fluorescent est préparé pour l'étude d'un grand nombre (*e.g.*, $20 \times 20 = 400$) de configurations expérimentales.

2.1.2 Caractérisation optique et morphologique du film métallique

La nature du métal et la morphologie du film sont les deux paramètres-clés dont dépendent les propriétés optiques des substrats. La structuration à l'échelle nanométrique

de la surface métallique modifie profondément ses propriétés d'absorption, réflexion et transmission.

Il est essentiel d'identifier les paramètres pertinents pour caractériser la morphologie des dépôts et son influence sur les propriétés optiques afin de pouvoir optimiser l'efficacité des substrats et les fabriquer de manière reproductible. Les caractéristiques du film métallique sont contrôlées précisément en modifiant les conditions expérimentales du dépôt, notamment la température du substrat et le flux atomique. De cette façon, il est possible d'obtenir une grande variété de morphologies différentes, chacune possédant des propriétés optiques différentes. Préalablement à toutes investigations sur les applications potentielles de ces différents types de films métalliques, il est nécessaire d'étudier les relations liant leur comportement optique à leur morphologie.

Différentes techniques d'observation ont été utilisées pour mesurer les paramètres morphologiques des films métalliques, parmi lesquelles la microscopie électronique en transmission (*Transmission Electronic Microscopy*, TEM) et la microscopie de force atomique (*Atomic Force Microscopy*, AFM). Les propriétés optiques des films métalliques ont été étudiées par spectroscopie d'absorption optique (*Differential Optical Absorption Spectroscopy*, DOAS).

2.1.2.1 Microscopie électronique en transmission (TEM)

Des faibles quantités de métal et/ou le dépôt sur une lame chauffée donnent des films de nanoparticules isolées de taille et de forme bien définies. A mesure que le taux de couverture de la lame augmente, le rapport de forme des particules change (les sphères s'aplatissent), elles prennent la forme d'îlots qui coalescent (fusionnent) jusqu'à ce que le film métallique soit conducteur d'un bout à l'autre de la lame (seuil de percolation). Pour déterminer à quelle phase de croissance se trouve le film métallique, nous avons réalisé des études de microscopie électronique en transmission (TEM).

L'étude en TEM a été réalisée à l'ESPCI, sur un microscope JEOL 100C. Les observations en TEM nécessitent de réaliser les dépôts métalliques sur des grilles de microscopie électronique (maillage en cuivre couvert d'une couche de carbone amorphe). Celles-ci sont préalablement couvertes d'une fine couche d'alumine (typiquement 3 nm) amorphe pour les doter de propriétés de surface similaires à celles des lames de verre.

Pour les faibles taux de couverture, l'analyse des clichés de TEM permet de réaliser une étude statistique sur la taille et le rapport de forme latéral des nanoparticules, ainsi que la distance interparticulaire. La distribution de ces trois paramètres est obtenue grâce à un logiciel de traitement des images TEM, qui détecte la frontière des nanoparticules métalliques. L'image TEM est une projection à 2 dimensions de l'objet : elle fournit une information sur la forme et le taux de couverture du métal. Une coupe de l'échantillon normale au substrat serait nécessaire pour obtenir l'information sur le rapport de forme transversal.

Au-delà du seuil de percolation, les films métalliques tendent rapidement à être continus. La microscopie électronique en transmission est alors inadaptée à l'étude de

leur morphologie. Elle permet néanmoins de mesurer le taux de couverture du métal sur le substrat. Par contre, l'information sur la topographie des films continus ou quasi-continus est obtenue par des techniques de microscopie de sonde locale.

2.1.2.2 Microscopie de force atomique (AFM)

Nous avons mis en œuvre des méthodes de mesures directes de la topographie de surface, *i.e.*, des techniques de microscopie de sonde locale, également nommée microscopie à balayage de sonde (*Scanning Probe Microscopy*, SPM). Elles permettent d'imager des surfaces à l'échelle nanométrique. Elles consistent à sonder une surface en approchant une pointe très fine. Le balayage régulier d'une zone avec la pointe permet d'en réaliser la cartographie. La grandeur physique mesurée (forces atomiques, densité électronique, aimantation...) dépend de la nature de la pointe.

Principe

Pour l'étude des substrats nanostructurés, nous avons choisi la microscopie de force atomique (*Atomic Force Microscopy*, AFM), dont un schéma de principe est présenté en Figure 2.4. La pointe du microscope AFM est sensible aux *forces de van der Waals* : ce sont des forces de faibles amplitude et extension qui participent à l'équilibre entre deux atomes ou molécules non-chargés, et qui sont responsables de la cohésion des cristaux non-ioniques. La position relative de la pointe par rapport à la surface est contrôlée par une céramique piézo-électrique, mesurée par un système de quatre photodiodes détectant un faisceau laser réfléchi par le levier (*cantilever*) portant la pointe, et constamment ajustée par un circuit d'asservissement afin de garder constante l'intensité de l'interaction. La cartographie de la position de la pointe donne précisément la topographie de la surface sondée. La résolution latérale, fixée par le rayon de courbure de l'extrémité de la pointe, est de l'ordre de la dizaine de nanomètres ; la résolution verticale est de l'ordre de l'angström : on peut aisément visualiser des marches atomiques sur une surface propre. La surface visualisable dépend de la céramique piézo-électrique, et peut aller de la centaine de nanomètres à environ 150 micromètres. L'AFM est adapté à tout type de surface, y compris les surfaces isolantes (*e.g.*, la surface d'un substrat couvert d'une couche d'alumine). L'AFM offre également la possibilité de parcourir la surface sans la toucher (mode *non-contact*), ou par contact intermittent (mode *tapping*), afin de limiter la détérioration éventuelle d'une couche fragile.

Informations obtenues en mode contact

Les images d'AFM présentées dans le Chapitre 5 ont été réalisées à l'UMR «Bio-adhésion et Hygiène des Matériaux» (INRA/ENSIA, Massy), en collaboration avec Jean-Marie Herry. L'AFM, utilisé en mode *contact*, permet d'accéder à trois types d'information. L'image de *topographie* contient l'information sur la position du support de la pointe. Elle est obtenue par mesure du courant traversant la céramique piézo-électrique et renseigne sur "l'altitude" de la surface à la position de la pointe.

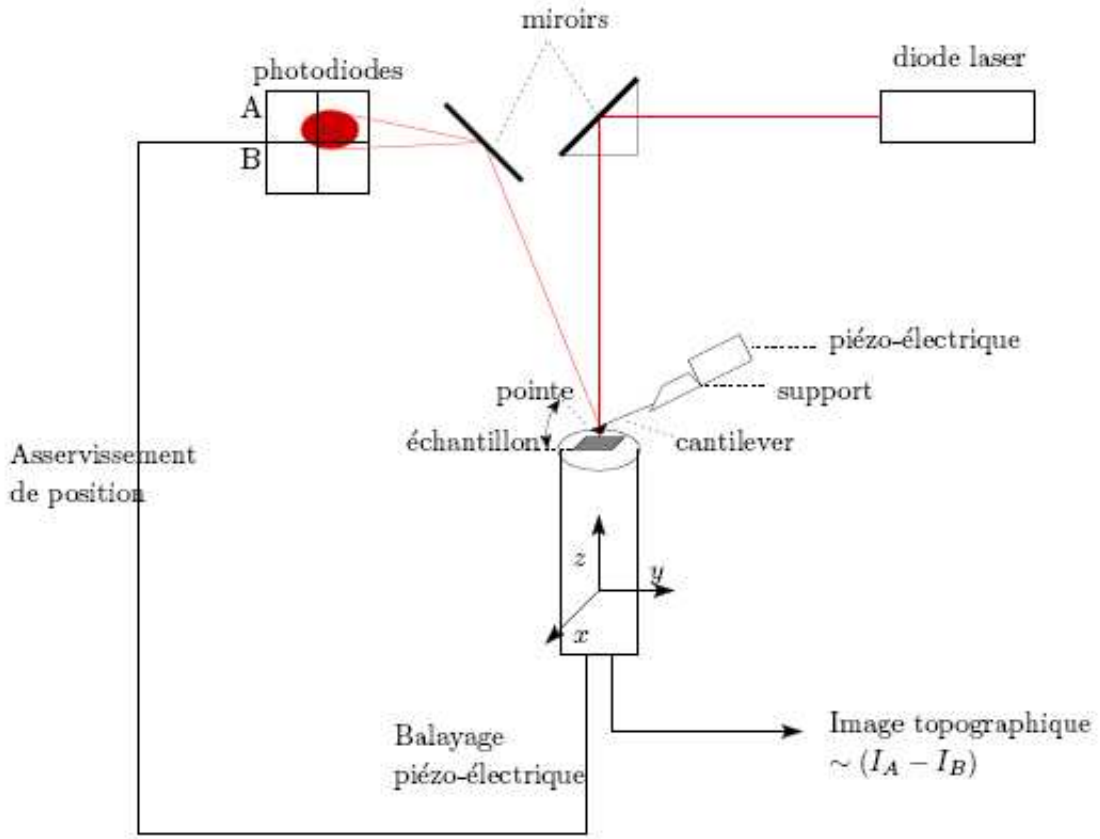


FIG. 2.4: Schéma de principe de l'AFM.

En mode contact, la résolution de cette image est limitée par la déformation du cantilever due aux forces verticales et latérales que la surface exercent sur la pointe. Les variations des signaux mesurés par les quatre photodiodes du système d'asservissement permettent d'évaluer l'amplitude des flexions et des torsions du cantilever. Ces informations supplémentaires permettent de réaliser une image de *déflexion* et une image de *friction*, contenant l'information sur la position verticale et horizontale de la pointe par rapport au support. L'image de *déflexion* donne une cartographie des variations locales de la topographie, avec une résolution améliorée. Elle renseigne qualitativement sur la rugosité locale de la surface, mais l'information n'est pas normalisée par rapport à l'altitude de la surface.

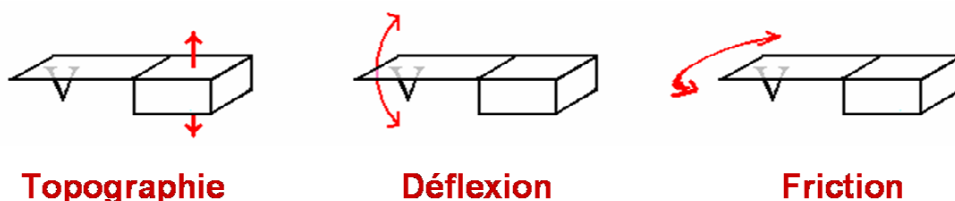


FIG. 2.5: Trois types d'imagerie en AFM mode contact. Schéma représentant la pointe fixée sous le cantilever, lui-même porté par le support. Image de topographie : position du support. Image de déflexion : position verticale relative de la pointe. Image de friction : position horizontale relative de la pointe.

Caractérisation de la rugosité de surface

Il existe un grand nombre de paramètres permettant de caractériser le profil d'une surface, *i.e.*, la déviation de son altitude z , en fonction des deux autres coordonnées d'espace x et y . Pour simplifier, si l'on imagine la surface rugueuse comme une succession de creux et de bosses, on peut regrouper ces paramètres en un premier groupe décrivant la hauteur des bosses (déviations du profil de la surface), et un second décrivant la disposition des bosses sur la surface (distribution de fréquences spatiales). Un paramètre de chacun des deux groupes est nécessaire pour prévoir l'interaction de la lumière avec la surface.

Déviations du profil de la surface

La Figure 2.6 présente un profil à une dimension $z(x)$, et trois manières de caractériser la déviation de ce profil. Cet exemple simple permet de définir les paramètres de rugosité utilisés ensuite pour décrire la topographie d'un profil bidimensionnel (surface). La moyenne arithmétique R_a (Fig. 2.6a, Eq. 2.1) est l'aire située entre le profil et la ligne d'altitude moyenne \bar{z} , divisée par la distance L sur laquelle elle est évaluée. L'amplitude pic-à-pic (*maximum peak-to-valley*) R_{p-v} (Fig. 2.6b, Eq. 2.2) est l'écart entre l'altitude maximale z_{max} et l'altitude minimale z_{min} . R_{p-v} est sensible aux défauts de la surface et peut, sur une surface irrégulière, ne pas être représentatif de la rugosité de l'ensemble de la surface. La moyenne quadratique R_q (Fig. 2.6c, Eq. 2.3) est calculée à partir de la fonction de distribution de la variable z . Cette fonction donne la probabilité que l'altitude de la surface en un point soit comprise entre z et $z + dz$

où dz est une variation élémentaire de z . R_q est la déviation standard (écart-type, *root mean square*) de cette fonction. R_q est plus directement relié à la qualité optique de la surface que R_a . Nous avons donc retenu le paramètre R_q pour caractériser la déviation du profil de la surface. Les définitions des paramètres R_a (Eq. 2.1) et R_q (Eq. 2.3) sont données pour un profil unidimensionnel. Pour un profil bidimensionnel, on intégrera sur les deux coordonnées d'espace x et y du plan de la surface, et on remplacera le préfacteur $\frac{1}{L}$ par $\frac{1}{L^2}$.

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L (z(x) - \bar{z}) dx \quad (2.1)$$

$$R_{p-v} = z_{max} - z_{min} \quad (2.2)$$

$$R_q = \left[\frac{1}{L} \int_0^L (z(x) - \bar{z})^2 dx \right]^{1/2} \quad (2.3)$$

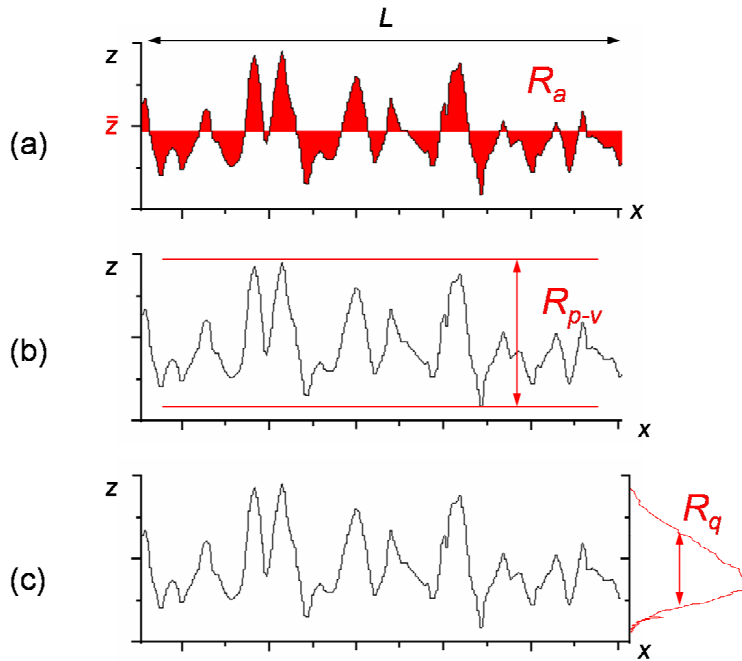


FIG. 2.6: Définition de trois paramètres permettant de caractériser la déviation d'un profil unidimensionnel. (a) R_a : moyenne arithmétique; (b) R_{p-v} : amplitude pic-à-pic; (c) R_q : moyenne quadratique (*root mean square*).

Plus R_q est grand, plus la diffusion de la lumière est forte et plus le comportement optique de la surface s'éloigne de celui d'une surface parfaitement plane. Toutefois, ce paramètre n'est pas suffisant pour caractériser la morphologie de la surface et prévoir son interaction avec la lumière. Nous avons vu, dans le cas des réseaux métalliques, que le couplage avec la lumière dépend des fréquences spatiales de la topographie de la

surface (*i.e.*, de la période du réseau) car de ces fréquences spatiales dépend l'accord des vecteurs d'onde des photons et des plasmons de surface (voir § 1.2.4, p.20). De manière similaire, il est possible de prévoir les composantes spectrales et spatiales de la lumière qui se coupleront fortement à la surface rugueuse, en calculant le spectre des fréquences spatiales.

Distribution de fréquences spatiales

La distribution des fréquences spatiales de la surface métallique (ou "spectre de k ") est obtenue par analyse de l'image AFM. La fonction d'auto-corrélation R_{zz} de la variable d'altitude z est calculée en fonction des coordonnées d'espace x et y . La transformée de Fourier $\widehat{S}(k_x, k_y)$ de R_{zz} donne les fréquences spatiales de l'image dans toutes les directions du plan (x, y) . Ensuite, $\widehat{S}(k_x, k_y)$ est exprimé en coordonnées polaires, *i.e.*, en fonction des variables $k = \sqrt{k_x^2 + k_y^2}$ et $\phi_k = \arctan(k_y/k_x)$. Le "spectre de k " $\widehat{S}(k)$ est obtenu par intégration de $\widehat{S}(k, \phi_k)$ par rapport à la variable ϕ_k . Le "spectre de k " présente un maximum pour une fréquence spatiale $k/(2\pi) = 1/\sigma$. La période spatiale σ est le paramètre choisi pour décrire la distribution de fréquences spatiales des films métalliques nanorugueux et prévoir leurs propriétés optiques.

Reproductibilité

Les images AFM ont été réalisées en choisissant des champs d'observation de différentes tailles. Lorsque la dimension du champ est très grande (5-10 μm de côté) devant le paramètre σ , alors la mesure de ces paramètres est reproductible d'une fenêtre à l'autre (la morphologie du dépôt est homogène sur toute sa surface). Ces mesures seront alors représentatives de la rugosité de l'échantillon. Pour des champs plus réduits (1 μm), des variations importantes sont observées d'une fenêtre à l'autre. Le spectre mesuré n'est alors plus en accord avec la rugosité de l'échantillon (les faibles fréquences spatiales sont filtrées).

2.1.2.3 Spectroscopie d'absorption optique (DOAS)

Pour les films non-continus, les mesures de TEM ont été complétées par des mesures de spectroscopie optique qui renseignent sur la résonance plasmon moyenne de ces arrangements de nanoparticules et d'îlots métalliques. Ces mesures sont indispensables pour étudier les relations entre la morphologie des films métalliques et leurs propriétés optiques.

L'étude de spectroscopie d'absorption optique a été menée au Laboratoire de Minéralogie Cristallographie de Paris (Campus Jussieu), au moyen d'un spectromètre UV-visible *CARY 500* (Varian Inc.). Ces mesures¹ peuvent être faites directement sur les lames de verre. La densité optique DO (ou "extinction") est calculée à partir de la mesure du coefficient de transmission T du film ($DO = -\log T$). La mesure différentielle de l'extinction (*Differential Optical Absorption Spectroscopy*, DOAS) permet de

¹Ces mesures ont été réalisées suivant une méthode similaire à celle décrite pour le calibrage des films de colorants (§ 2.1.3.3, p.66).

retrancher automatiquement la contribution du substrat de verre, mais ne permet pas de mesurer l'extinction du film métallique dans le domaine du spectre où le verre n'est pas transparent ($\lambda < 350$ nm).

Le spectre d'extinction d'une sphère parfaite d'or ou d'argent, de diamètre très petit devant la longueur d'onde d'excitation, est un pic dont la position dépend de son diamètre et dont la largeur, définie principalement par des processus internes d'amortissement, est de quelques dizaines de nanomètres. L'élargissement du spectre d'extinction, lorsqu'il est réalisé sur un grand nombre de particules, dépend donc de leur distribution de taille. D'autre part, l'aplatissement des sphères métalliques induit également un déplacement et un élargissement spectral. L'information sur la distribution de taille des particules est donc complexe à interpréter. Par contre, les spectres d'extinction renseignent sur le "comportement optique" des agrégats supportés, en particulier sur le domaine spectral d'activité (*e.g.*, là où l'on peut attendre de fortes exaltations de la fluorescence). Enfin, le spectre d'extinction est un indicateur du seuil de percolation. L'apparition d'un plateau pour les grandes longueurs d'onde traduit la coalescence des îlots (voir § 3.1, p.90).

2.1.3 Dépôt des fluorophores

L'étude systématique des propriétés optiques des substrats nanostructurés nécessite de les couvrir d'un dépôt de colorant de faible densité (une fraction de monocouche). Cette technique permet de sonder précisément l'interaction entre les fluorophores et le métal en fonction de la distance les séparant.

2.1.3.1 Préparation et titrage des solutions

Les colorants sont fournis sous forme de poudre. Une solution mère est réalisée par dilution dans un solvant puis une série de solutions de différentes concentrations est obtenue par dilutions successives. La concentration d'une des solutions est déterminée par mesure d'absorption (voir Fig. 2.7), à l'aide d'un spectromètre d'absorption différentielle, et permet l'étalonnage de la série.

La *loi de Beer-Lambert* (voir Eq. 2.4) donne l'absorption A du colorant en solution en fonction du rapport des intensités mesurées I et I_{ref} . Elle permet de calculer la concentration C de la solution de colorant en fonction de la mesure différentielle d'absorption optique A , l'extinction du colorant ϵ et la distance l parcourue dans le milieu absorbant (voir Eq. 2.5).

$$\frac{I}{I_{ref}} = e^{-\epsilon.C.l} \quad (2.4)$$

$$A = -\ln\left(\frac{I}{I_{ref}}\right) = \epsilon.C.l \quad (2.5)$$

Le choix du solvant se porte sur l'éthanol en raison de ses propriétés de mouillage sur le verre et l'alumine. L'eau distillée ne laisse pas, après évaporation, un film régulier à la surface des échantillons.

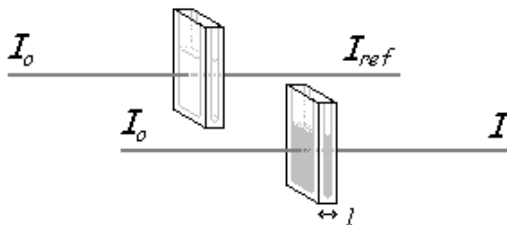


FIG. 2.7: Schéma de principe de la mesure différentielle d'absorption optique (*Differential Optical Absorption Spectroscopy, DOAS*).

2.1.3.2 Méthodes de dépôt

Un des problèmes inhérents aux expériences d'interaction de surface est de trouver une méthode appropriée pour couvrir les échantillons d'un film de colorant de concentration bien définie. Pour cela, le dépôt doit être homogène et reproductible. L'homogénéité est recherchée particulièrement pour l'étude des échantillons présentant plusieurs zones. Dans ce cas, il est souhaité que les irrégularités de surface liées aux différences d'épaisseur des dépôts ne concentrent pas le colorant en certaines zones de l'échantillon.

La manière la plus simple de déposer le colorant consiste à utiliser une pipette et à laisser se répartir quelques gouttes de solution sur la surface sèche ou préalablement mouillée de solvant. Les films de colorant réalisés de cette façon sont denses, inhomogènes et peu reproductibles.

Une méthode plus élaborée, le *spin-coating*, consiste à centrifuger l'échantillon après avoir déposé quelques gouttes de solution sur sa surface à l'aide d'une pipette (voir Fig. 2.8a). Cette technique permet de réaliser, avec une grande reproductibilité, des dépôts de densité homogène et bien contrôlée (densité surfacique allant du millième de monocouche jusqu'à la monocouche). Théoriquement, la densité du dépôt de colorant formé par *spin-coating* est proportionnelle à la concentration de la solution (voir Fig. 2.8b). D'autres paramètres tels que la vitesse et la durée de centrifugation, permettent de contrôler la densité du film formé. Lorsque la concentration de la solution est le seul paramètre modifié, la reproductibilité du dépôt de colorants par *spin-coating* est remarquable.

Le *spin-coating* est une méthode simple et polyvalente : elle permet également de déposer des microsphères de latex, des nanocristaux, des films de polymères, *etc.* Toutefois, cette méthode possède trois inconvénients majeurs. Tout d'abord, l'homogénéité du dépôt est conditionnée par la planéité et la propreté de la surface : les défauts et impuretés, ainsi que la rugosité de la surface, introduisent des variations locales de

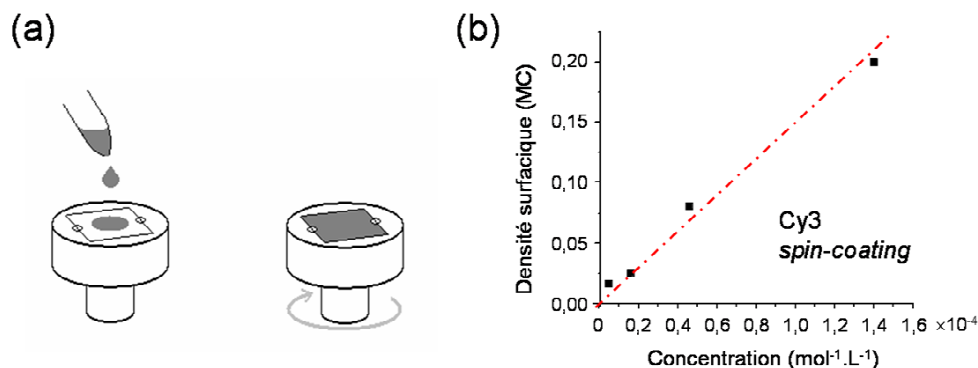


FIG. 2.8: Principe (a) et étalonnage (b) de la technique du dépôt par *spin-coating*. Densité surfacique d'un film de colorant Cyanine 3 réalisé par *spin-coating* (en monocouches, $1 MC = 10^{14} cm^{-2}$) en fonction de la concentration de la solution de colorant.

densité du colorant. D'autre part, l'adsorption des molécules en solution dépend fortement de l'état de charge de la surface (car il conditionne le mouillage du solvant sur la surface). Enfin, il n'est pas possible de réaliser deux dépôts successifs sur la même surface car le premier film déposé est rincé par le solvant lors du second dépôt.

Pour toutes les applications qui se heurtent à ces limites, nous avons réalisé le film de colorant par évaporation thermique sous vide. Pour cela, un *molyblock* est spécialement conçu pour pouvoir recevoir en son centre un faible volume de colorant en solution. Une fois le solvant évaporé, le *molyblock* est introduit dans le bâti ultravide et placé sur la position chaude du porte-échantillon. Un second *molyblock* portant le substrat est fixé à la place d'une cible d'ablation, en vis à vis (à 5 cm), et soumis à un mouvement de rotation pour homogénéiser le dépôt. Une montée progressive en température permet d'évaporer la totalité du colorant, de manière relativement homogène. Cette technique, alternative à l'évaporation thermique d'un composé solide contenu dans un creuset, ne permet toutefois pas de contrôler la densité du film formé avec une aussi bonne précision. Cette technique permet de réaliser successivement plusieurs couches, dans des conditions limitant la contamination.

2.1.3.3 Étalonnage des méthodes de dépôt

Un étalonnage est nécessaire pour déterminer la quantité de colorant déposée en fonction de la concentration (pour le *spin-coating*) et la quantité (pour l'évaporation thermique) de solution utilisée. La calibration est réalisée à partir de mesures d'absorption sur des lamelles de verre standard. On admet que la quantité déposée sur nos substrats argent/alumine est identique à celle déposée sur des supports vierges, dans les mêmes conditions. La quantité de colorant déposée est exprimée en termes de densité surfacique (molécules/cm²) et d'épaisseur équivalente (1 monocouche = $1 MC \approx 10^{14}$ molécules/cm²). La densité surfacique est calculée à partir des relations suivantes :

$$A = \epsilon.C.l = \epsilon.\frac{n}{V}.l = \epsilon.\frac{n}{S} \quad (2.6)$$

$$\rho = \frac{N}{S} = \frac{n.\mathcal{N}_A}{S} = \frac{A.\mathcal{N}_A}{\epsilon} \quad (2.7)$$

où N et n sont la quantité de molécules participant à l'absorption du faisceau, exprimée respectivement en nombre de molécules et en moles ; S est la section du faisceau, exprimée en cm^2 ; ϵ est l'extinction maximale du colorant, exprimée en $\text{mol}^{-1}\text{cm}^2$ (ou plus communément en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: $[\text{mol}^{-1}\text{cm}^2] = 1000 [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$) ; \mathcal{N}_A est le *nombre d'Avogadro*. Il suffit ensuite de tracer la caractéristique de la densité surfacique du dépôt en fonction de la concentration de la solution utilisée (Fig. 2.8b). Ce principe d'étalonnage est valable quelle que soit la technique de dépôt.

2.2 Techniques mises en œuvre pour les applications biologiques

2.2.1 Puces à ADN

Nous avons développé, en collaboration avec l'entreprise Genescore, des puces à ADN sur des substrats métallisés. La fabrication et l'analyse des puces à ADN ont été menées au Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire de l'ESPCI, lieu d'implantation initial de la start-up Genescore.

2.2.1.1 Principe

Les puces à ADN sont généralement fabriquées à partir de lames de verre, et requièrent des systèmes automatisés de production et d'imagerie spécifiques (Shi 2002). L'identification des échantillons d'ADN implique une *sonde* qui peut être un acide nucléique de séquence connue, fixé à la puce, et une *cible* qui est l'échantillon d'acide nucléique, libre, dont l'identité ou l'abondance est recherchée (Lander 1999).

Il y a deux sortes d'application majeures pour la technologie des puces à ADN (Ekins 1999) : (i) l'identification d'une séquence (gène ou mutation d'un gène) ; (ii) la détermination du niveau d'expression (l'abondance) des gènes.

Les puces développées sur nos substrats sont du second type. La Figure 2.9 présente le principe de ce type de puce à ADN.

Une série de sondes est synthétisée *ex situ* et greffée à la surface de la puce. Chaque sonde porte une séquence d'ADN correspondant à un gène ou à une partie d'un gène. Ensuite, l'*ARN messenger* (ARNm) est extrait de cellules issues de deux échantillons à comparer (*e.g.*, un tissu sain et un tissu mutant). Dans la cellule, l'ARN messenger est

formé par transcription de l'ADN dont il est la copie, et son rôle consiste à transporter l'information génétique recueillie du noyau vers le cytoplasme où elle sera traduite en protéines. L'ARNm est transcrit en monobrans d'ADN complémentaire (ADNc), lesquels sont ensuite marqués avec des molécules fluorescentes (deux types de fluorophores différents pour pouvoir reconnaître l'ADNc issu des deux échantillons). Les brins d'ADNc marqués constituent les cibles. La puce couverte de sondes est exposée à la solution contenant les cibles, dans des conditions permettant l'hybridation spécifique des cibles avec les sondes, puis l'abondance des séquences complémentaires est déterminée par excitation et collection de la fluorescence. Historiquement, cette méthode nommée *DNA chips* a été développée par *Affimetrix, Inc.*

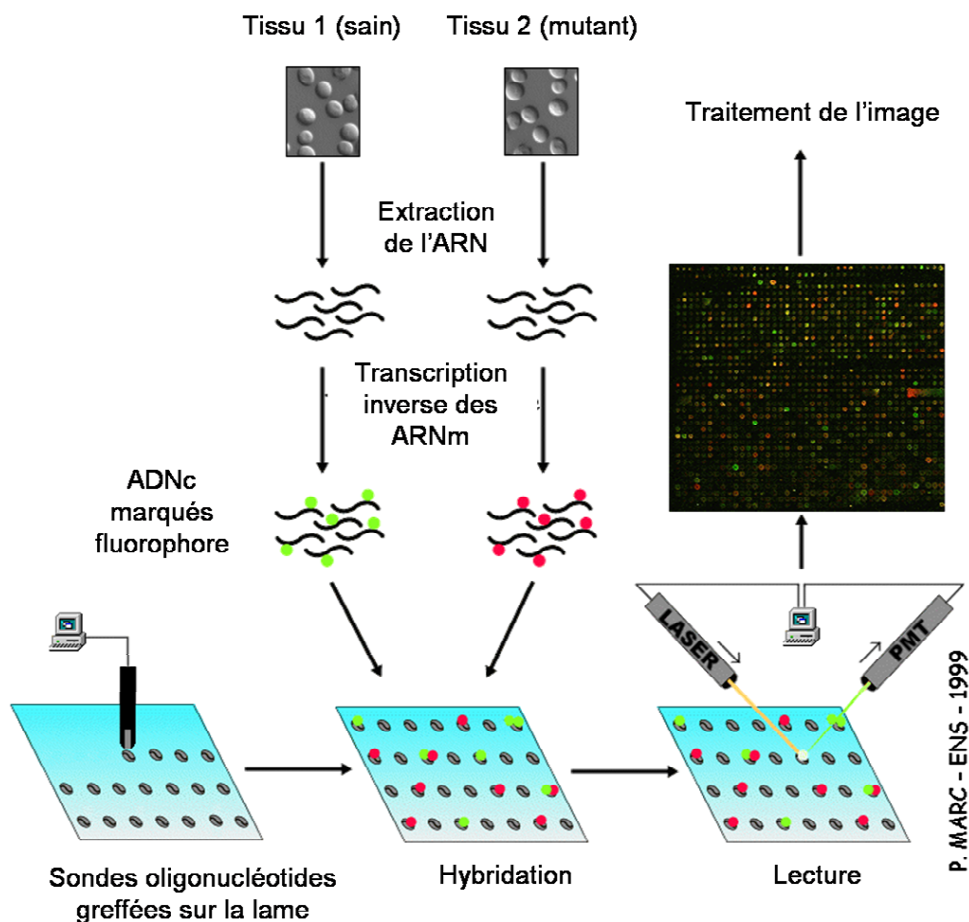


FIG. 2.9: Principe de la puce à ADN.

2.2.1.2 Fonctionnalisation des lames et greffage des sondes

Le greffage des sondes sur la puce est automatisé. L'opération est réalisée par un *spotter*, qui dépose une série de microgouttes de solutions contenant les sondes, par contact sur la lame d'un réseau de pointes préalablement trempées dans une batterie

de microéprouvettes (Fig. 2.10a-b). Chaque microgoutte déposée forme un *spot* : une zone circulaire de quelques centaines de microns de diamètre, à l'intérieur de laquelle est greffé un très grand nombre de sondes.

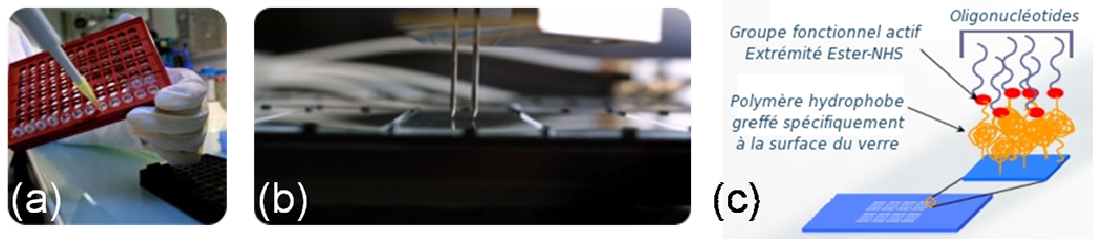


FIG. 2.10: (a) : Sélection des sondes synthétisées *ex situ*. (b) : Greffage automatisé des sondes sur la puce. (c) : Schéma illustrant le rôle de la fonctionnalisation chimique de surface dans le greffage des sondes.

Afin de favoriser la liaison entre les sondes et les cibles, la réactivité chimique de la surface de la lame doit être défavorable à l'adsorption des cibles. Dans ce but, la lame est recouverte d'une couche d'un polymère hydrophobe (*polyéthylène glycol*, PEG) et les sondes sont greffées sur ce polymère (Fig. 2.10c).

Pour former la couche de polymère, la surface de la lame de verre est d'abord fonctionnalisée : des molécules réactives présentant un groupement *silane* $-Si(OH)_3$ et une fonction *thiol* $-SH$ servent d'agent de liaison entre la lame et le polymère. Ces molécules réactives se fixent à la lame par réaction du groupement silane avec les fonctions *silanol* $-SiOH$ présentes à la surface du verre. Les liaisons *siloxanes* $Si-O-Si$ obtenues sont très stables, thermiquement et chimiquement très difficiles à hydrolyser. La fonction thiol permet ensuite de former une liaison avec une molécule de polymère.

Les molécules actives servant de liaison entre la lame et le polymère sont obtenues à partir de molécules de (*3-mercaptopropyl*)-*triméthoxysilane*, par hydrolyse des groupements méthoxy $-OCH_3$ qui protègent le silane. Le protocole de fonctionnalisation de surface ("silanisation") consiste à immerger les lames de verre dans un bain dont la composition est (pour 30 lames) : 500 ml de méthanol ; 4,25 ml d'acide acétique ; 21,25 ml d'eau filtrée milli-Q ; 10,625 ml de (*3-mercaptopropyl*)-*triméthoxysilane* (fort excès en silane). Un bain de 2 heures dans cette solution, sous agitation douce (sur une balancelle), est suivi de plusieurs rinçages dans le méthanol, d'un séchage sous azote, et d'un traitement thermique en étuve à $90^\circ C$ pendant 30 min. Les lames traitées, stockées dans des boîtes propres, peuvent être utilisées plusieurs jours après.

Les lames de verre nues et les lames métallisées peuvent être traitées de manière similaire, pourvu que le métal soit couvert d'une couche d'alumine. En effet, le silane se lie à une surface d'alumine comme à une surface de silice. Nous avons vérifié que les conditions de pH et de température nécessaires au protocole de silanisation n'altèrent pas les qualités du film métallique.

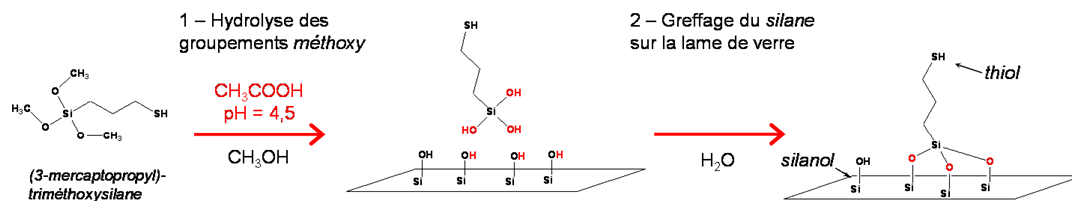


FIG. 2.11: Fonctionnalisation de la surface des lames de verre.

2.2.1.3 Hybridation de l'ADN et lecture de la puce

L'hybridation de l'ADN se fait dans des conditions de *stringence* particulières, *i.e.*, des conditions expérimentales de température, de pH et de force ionique permettant l'hybridation moléculaire. La stringence est proportionnelle à la température et à l'inverse de la concentration en cations monovalents (Na^+ par exemple). Des conditions très stringentes (température élevée, faible concentration en ions Na^+) rendent l'hybridation moléculaire plus difficile mais permettent une hybridation spécifique tandis que des conditions peu stringentes (température plus faible, concentration en ions Na^+ plus élevée) permettent une hybridation moins spécifique.

La Figure 2.12a montre l'hybridation d'une sonde greffée à la surface de la puce et d'une cible marquée par un fluorophore (schématisé par un rond vert). Au niveau de chaque spot, des cibles marquées de deux fluorophores différents (rond vert et rond bleu) peuvent s'hybrider (Fig. 2.12b). Une fois la puce rincée, seules les cibles hybridées restent sur la lame. Au niveau de chaque spot, les densités respectives des deux fluorophores sont directement liées au niveau d'expression d'un gène, dans chacun des deux échantillons.

La lecture de cette information se fait par excitation de la fluorescence des marqueurs par une source laser et détection du signal pour un photomultiplicateur (PM). L'ensemble est automatisé dans un appareil d'imagerie point-par-point, dans lequel le dispositif d'excitation/détection (sources, objectif, PM) est fixe et la lame mobile (*scanner de lecture*). Les deux types de fluorophores sont excités séparément, puis les deux images de fluorescence monochromes sont superposées pour obtenir une image en trois couleurs (Fig. 2.12c). Le traitement informatisé de l'image permet d'extraire une information quantitative sur l'expression des gènes, *i.e.*, le transcriptome.

Pour l'étude présentée dans ce mémoire, nous avons utilisé un lecteur de puce *ScanArray Lite* (Perkin Elmer Life Sciences) à optique confocale, dans lequel le signal de fluorescence est collecté par un objectif à air, et détecté par un photomultiplicateur. Le lecteur est équipé de deux sources d'excitation et des filtres optiques adaptés à la détection des sondes fluorescentes Cyanine 3 ($\lambda_{em} = 570$ nm) et Cyanine 5 ($\lambda_{em} = 670$ nm). Un laser Gre Ne émettant à $\lambda_{exc} = 543$ nm excite la Cyanine 3 ($\lambda_{abs} = 550$ nm, $\lambda_{fluo} = 570$ nm) et un laser He Ne émettant à $\lambda_{exc} = 633$ nm excite la Cyanine 5 ($\lambda_{abs} = 649$ nm, $\lambda_{fluo} = 670$ nm). Sur une puce standard, la sensibilité à la détection est de l'ordre de 0,05 fluorophores/ μm^2 . L'acquisition point-par-point de l'image est réalisée à une cadence de 20 lignes par seconde avec une résolution spatiale de 5 μm .

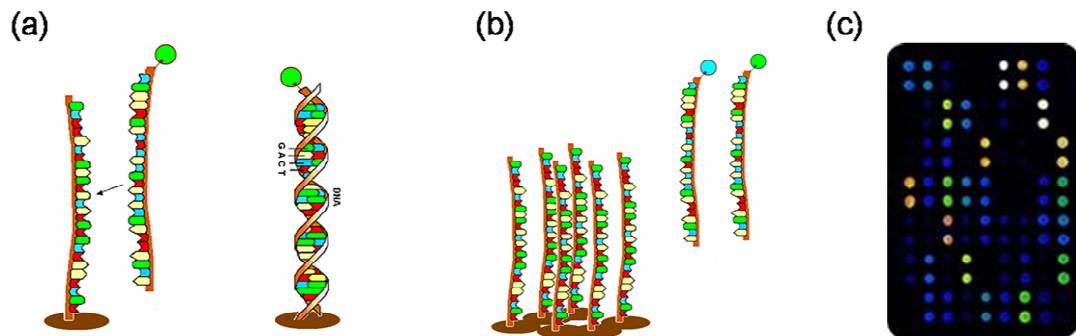


FIG. 2.12: (a) : Hybridation de deux monobrins d'ADN complémentaires : une sonde greffée sur la surface de la puce et une cible en solution, marquée par une molécule fluorescente. (b) : Hybridation sélective, au niveau d'un spot de la puce, de cibles marquées avec deux fluorophores différents (rond vert et rond bleu). (c) : Lecture de la puce (image de fluorescence). La couleur de chaque spot indique l'expression du gène correspondant dans l'une ou l'autre des cellules (vert ou bleu), ou dans les deux (vert + bleu = jaune).

2.2.2 Préparation des échantillons biologiques pour l'imagerie cellulaire et tissulaire

2.2.2.1 Principe de l'immunofluorescence

L'*immunofluorescence* est le marquage des anticorps et des antigènes avec des colorants fluorescents. Cette technique emploie généralement deux jeux d'anticorps. Un *anticorps primaire* est utilisé contre l'antigène d'intérêt, puis reconnu par un *anticorps secondaire* marqué avec un fluorophore. De cette façon, on peut créer un grand nombre d'anticorps primaires reconnaissant de nombreux gènes, mais qui ont une région constante en commun et peuvent être reconnus par un unique anticorps secondaire couplé à un fluorophore. Typiquement, cela peut être réalisé en utilisant des anticorps d'espèces animales différentes. Par exemple, on peut créer chez la souris des anticorps qui reconnaissent un grand nombre d'antigènes, puis employer des anticorps humains (marqués avec des fluorophores) qui reconnaîtront la région constante des anticorps de la souris (région nommée *Mouse Anti-Human*). Cela permet de réutiliser, pour de multiples expériences différentes, les anticorps couplés à des fluorophores, qui sont relativement difficiles à former.

En biologie cellulaire, l'immunofluorescence est mise en œuvre avec des anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine constituante d'un organe de la cellule. Par exemple, l'anticorps *anti-GMAP-210* polyclonal humain reconnaît une protéine constituante de l'appareil de Golgi (*Golgi-Microtubule-Associated Protein*, GMAP). Cette technique permet alors de marquer puis d'imager spécifiquement cet organe cellulaire en microscopie de fluorescence.

2.2.2.2 Principe du marquage génétique

L'*ADN recombinant* (ADNr) est une séquence d'ADN artificielle obtenue par combinaison de deux séquences d'ADN issues d'organismes différents (ou reproduites par synthèse chimique) et utilisée pour produire des organismes génétiquement modifiés (OGM). Une fois l'ADNr introduit dans le génome, l'OGM est susceptible de pouvoir produire une *protéine recombinante*, qui n'existe généralement pas à l'état naturel.

Le marquage génétique en biologie consiste à modifier génétiquement l'organisme à étudier pour qu'il produise artificiellement des protéines photoluminescentes qu'un autre organisme produit naturellement. Historiquement, cet organisme naturel est la méduse *Aequorea victoria* et la protéine photoluminescente est la GFP (*Green Fluorescent Protein*). La GFP native émet dans le vert ($\lambda_{fluo} = 509$ nm) lorsqu'elle est excitée dans le violet ($\lambda_{exc} = 395$ nm) ou le bleu ($\lambda_{exc} = 470$ nm) (Chalfie 1994). Il existe aujourd'hui plusieurs mutants de la GFP, tels que la eGFP (*enhanced-GFP*) dont le pic d'absorption est décalé vers des énergies plus basses ($\lambda_{exc} = 488$ nm) (Heim 1995), ou la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) qui émet dans le jaune ($\lambda_{fluo} = 527$ nm) lorsqu'elle est éclairée dans le vert ($\lambda_{exc} = 514$ nm). L'utilisation de ces mutants de la GFP permet de réaliser un marquage génétique multicolore (Lippincott-Schwartz 2003).

Suivant le choix de la protéine recombinante, le marquage sera spécifique d'un organe de la cellule. Par exemple, la protéine *eGFP- α -tubuline* est une version génétiquement modifiée et fluorescente de la protéine tubuline- α constituant les microtubules de la cellule. Elle sera spécifiquement détectée au niveau des microtubules, ce qui permettra de les imager en microscopie de fluorescence.

2.2.2.3 Gestion de la photoréactivité des marqueurs fluorescents

Comme pour la plupart des techniques de fluorescence, une limite majeure des méthodes qui viennent d'être présentées est le photoblanchiment des marqueurs fluorescents. Un moyen de retarder la photodestruction des fluorophores est d'entourer l'échantillon biologique d'une matrice (*mounting medium*) contenant un agent chimique (*antifading reagent*) inactivant les espèces réactives (*e.g.*, les radicaux d'oxygène).

Un des agents *antifading* les plus utilisés en biologie est le *1,4-diazabicyclo-(2,2,2)octane* (DABCO). Il permet de prolonger l'émission de fluorescence pour les colorants les plus communs (fluorescéine, rhodamine, coumarine et leur dérivés) (Florijn 1995).

2.2.2.4 Protocole de préparation des cellules de rein de chien

Les échantillons cellulaires ont été préparés en collaboration avec Fabrice Cordelières, à l'Institut Curie d'Orsay. Le marquage des cellules a été réalisé par des techniques d'immunofluorescence et de marquage génétique.

Les cellules de rein de chien de la lignée MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells*) sont fréquemment utilisées comme un modèle générique de cellules

épithéliales. La présente étude a nécessité la croissance de cellules MDCK exprimant de manière stable l'eGFP- α -tubuline (généreux don du Docteur J. P. Dompierre) sur les substrats appropriés (lames de verre nues et miroirs métalliques) pendant 48 heures avant d'être fixées.

Les cellules sont lysées durant 2 min dans une solution à 0,5% de surfactant non-ionique *Triton X-100* puis fixées dans une solution tampon *PHEM* à 3% de paraformaldéhyde, suivant la méthode décrite par Coquelle *et al.* (Coquelle 2002). Les cellules sont lavées trois fois 5 min dans une *solution saline tamponnée phosphate* (PBS) puis perméabilisées par un bain de 25 min dans une solution de PBS à 0,1% de Triton X-100. Le fixatif est réduit dans une solution de PBS à 50 mM de NaH₄Cl pendant 10 min, lavé trois fois 5 min dans un bain de PBS, bloqué dans une solution de PBS à 0,1% de *sérum albuminé* (BSA), et marqué avec un anticorps anti-GMAP-210 polyclonal humain (Infante 1999) et une sonde mitochondriale Mitotracker Red CMXRos (Molecular Probes) pendant une heure à 37°C. Après rinçage dans un bain de PBS/BSA, les cellules sont incubées durant 45 min avec les anticorps secondaires marqués avec des molécules de colorant Alexa 633 (Molecular Probes). Les cellules sont post-fixées dans un bain de PBS à 4% de formaldéhyde durant 16 min et traitées par une solution de PBS à 50 mM de NaH₄Cl pendant 10 min. Lorsque cela est indiqué, l'ADN est marqué avec du DAPI (Sigma) pendant 5 min.²

L'échantillon est monté entre lame et contre-lamelle en utilisant un mélange 1 :1 de PBS et de glycérol, contenant 100 mg/ml de DABCO (Sigma).

Les longueurs d'onde des pics d'absorption et d'émission de fluorescence sont rassemblées dans le Tableau 2.2 (p.75) pour chaque marqueur.

2.2.2.5 Protocole de préparation des section de tissus

Les échantillons tissulaires ont été préparés en collaboration avec Hideyuki Murata, au Laboratoire de Pathologie de l'Hôpital Saint-Louis, sous la direction du Professeur Anne Janin. La structure tissulaire a été étudiée en immunofluorescence, tandis que l'étude cytogénétique des échantillons a été réalisée par hybridation *in situ* en fluorescence (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH). Il s'agit d'une technique de marquage fluorescent permettant de localiser des séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des chromosomes intacts, dans des cellules eucaryotes ou des bactéries. Les sondes de FISH sont des acides nucléiques couplés à des molécules fluorescentes. Lorsqu'elle est appliquée à une coupe histologique (section de tissu), la technique FISH apporte des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés.

Une section de tissu d'épaisseur 5 μm est obtenue par coupe d'un échantillon fixé dans la *formaline* (solution fixative de formaldéhyde dilué dans l'eau) et pris dans la

²Le DAPI, ou 4',6-diamidino-2-phenylindole, est un colorant fluorescent qui se lie fortement à l'ADN. Comme le DAPI peut passer à travers la membrane d'une cellule, il peut être utilisé pour le marquage de cellules vivantes et fixées.

paraffine. La coupe est réalisée au moyen d'un *microtome* électrique (système mécanique constitué d'une lame tranchante en acier). La section de tissu est déposée sur une lame de microscope puis traitée suivant le protocole qui suit :

- i) traitement thermique de 15 min dans 0,2 M de HCl ;
- ii) traitement enzymatique de 15 min dans une solution tampon de SSC 2% à 80°C ;
- iii) digestion, Protéinase K (100 g/ml) dans une solution tampon de *TEN*³ à 37°C pour 15 min (dénaturation), puis à 90°C durant 20 min sur une plaque chauffante (hybridation) et enfin à 42°C pendant 16 heures dans une chambre humide.

Les sondes ADN utilisées pour la technique FISH sont pour le chromosome X : CEP X, et pour le chromosome Y : CEP Y (*dual-color FISH*). Les caractéristiques spectrales de ces sondes et des filtres optiques utilisés pour les détecter sont données dans le Tableau 2.1.

Sonde fluorescente			Filtres optiques			
Nom	Exc.	Ém.	Cube	Exc.	Dichr.	Ém.
CEP X	500	530	Olympus U-MWIB	460-490	505	515
CEP Y	560	590	Olympus U-MWIG	520-550	565	580

TAB. 2.1: Sondes fluorescentes et filtres optiques utilisés pour l'analyse cytogénétique (technique FISH). *Exc./Ém.* : longueurs d'onde d'excitation / émission maximale ; *Dichr.* : longueur d'onde de coupure du miroir dichroïque. Les longueurs d'onde sont données en nanomètres.

Le tissu est ensuite marqué en immunofluorescence. Les cellules endothéliales sont identifiées par utilisation d'anticorps *Mouse Anti-Human CD34*, et marquées par réaction *Peroxidase/diaminobenzidine (DAB)*.

Après traitement, l'échantillon tissulaire est monté entre lame et contre-lamelle, dans une matrice (*mounting medium*) contenant un agent antifading.

³*TEN* : mélange en concentration variable d'un agent de stabilisation des anti-corps : Tris (hydroxyméthyle)-aminométhane (Tris), d'un agent complexant pour limiter la précipitation des ions : l'acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA), et d'un sel : NaCl.

2.3 Méthodes optiques

2.3.1 Microscopie de fluorescence monophotonique

Le principe général de la microscopie de fluorescence est présenté en détails dans le Chapitre 1 (§ 1.1.2.3, p. 11).

L'étude de l'exaltation de la fluorescence pour l'imagerie cellulaire a été menée à la Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire de l'Institut Curie d'Orsay en collaboration avec Fabrice Cordelières.

Les images des cellules fixées sont collectées en utilisant un système d'imagerie de déconvolution 3D décrit antérieurement par Savino *et al.* (Savino 2001, Sibarita 2002). Outre la microscopie de fluorescence standard à 2D, ce système permet de réaliser une microscopie de fluorescence 3D large champ en coupes optiques. Contrairement à la microscopie confocale, qui permet également de réaliser des coupes optiques, l'image d'un plan est ici acquise en une seule fois. Le temps entre deux images n'est limité que par la cadence de la caméra, par opposition à l'imagerie point-par-point où il est défini par le temps d'acquisition pour chaque point et le nombre de points nécessaires à former une image.

Brièvement, le montage comprend un microscope inversé Leica DM RXA, équipé d'un objectif Plan APO $\times 100$ à immersion à huile, d'ouverture numérique $O.N. = 1,4$, monté sur un support de translation en céramique piézo-électrique *PIFOC* (Physik Instrumente). En plus, deux objectifs à air ($\times 40$ $O.N. = 0,55$ et $\times 20$ $O.N. = 0,4$) sont utilisés dans le but de démontrer l'amélioration de l'efficacité de collection sur les substrats métallisés. Une caméra CCD 5 MHz Micromax 1300Y à interlignes (Roper Instruments) est utilisée pour acquérir des piles d'images de fluorescence, en déplaçant le plan de focalisation de l'objectif $\times 100$ par pas de $0,2 \mu\text{m}$, le système dans sa globalité est contrôlé par l'intermédiaire du logiciel *Metamorph* (Molecular Devices). Un jeu de cubes de filtres spécifiques a été utilisé pour détecter séparément chaque marqueur fluorescent (voir Tab. 2.2).

Marqueur fluorescent			Filtres optiques			
Nom	Abs.	Fluo.	Cube	Exc.	Dichr.	Ém.
eGFP	489	508	Leica L5	BP 480/40	505	BP 527/30
Mitotracker	579	599	Leica N3	BP 546/12	565	BP 600/40
Alexa 633	632	647	Leica Y5	BP 620/60	660	BP 700/75

TAB. 2.2: Filtres optiques pour l'imagerie cellulaire. *Abs/Fluo/Exc./Ém.* : longueurs d'onde d'absorption / fluorescence / excitation / émission maximale; *Dichr.* : longueur d'onde de coupure du miroir dichroïque; *BP* : filtre passe-bande. Les longueurs d'onde sont données en nanomètres.

2.3.2 Microscopie de fluorescence biphotonique résolue en temps

2.3.2.1 Principe de la microscopie de fluorescence multiphotonique

La microscopie de fluorescence multiphotonique est une technique d'imagerie relativement récente en biologie (Denk 1990). Son principe est basé sur l'absorption quasi-simultanée de plusieurs photons (de même énergie ou d'énergie différente) par une molécule. La probabilité de la molécule ainsi excitée de relaxer vers l'état fondamental par émission d'un photon de fluorescence est la même que suite à une excitation par absorption monophotonique. En effet, la fluorescence étant un processus optique non cohérent, l'émission est décorrélée de l'excitation. L'énergie du photon de fluorescence émis est inférieure à la somme des énergies des photons absorbés, en raison des processus de relaxation vibrationnelle (dissipation interne, voir § 1.1.1, p. 2).

Le processus d'absorption multiphotonique nécessite une très haute densité photonique ($0,1 - 10 \text{ MW.cm}^{-2}$) et des impulsions lumineuses très courtes (1 ps - 1 fs)⁴. En effet, l'absorption virtuelle d'un photon d'énergie non-résonante (i.e., très différente de la différence d'énergie entre les états excité et fondamental) ne dure qu'un temps très court ($10^{-15}\text{s} - 10^{-18}\text{s}$). Durant cet intervalle de temps, un second photon doit être absorbé pour atteindre l'état excité.

L'absorption biphotonique (*Two-Photon Absorption*, 2PA) a été prédite en 1930 (Göppert-Mayer 1931) et mise en évidence expérimentalement dans les années 1960 avec des sources laser continues. La microscopie de fluorescence biphotonique (*Two-Photon Fluorescence Microscopy*, 2PFM) en biologie cellulaire utilise des sources laser pulsées (impulsion de largeur temporelle comprise entre 20 fs et 5 ps, généralement ~ 100 fs) à des taux de répétition élevés (10 - 100 MHz).

Le nombre de photons absorbés (n_a) en 2PFM est donné par l'équation suivante :

$$n_a = \frac{\sigma_{2PA} P_0^2 \pi^2 (O.N.)^4}{t_i f_i^2 h^2 c^2 \lambda^2} \quad (2.8)$$

où σ_{2PA} est la section efficace d'absorption biphotonique, P_0 est la puissance moyenne du champ d'excitation, $(O.N.)$ est l'ouverture numérique de l'objectif du microscope au moyen duquel l'impulsion lumineuse est focalisée, t_i est la largeur temporelle de l'impulsion, f_i le taux de répétition, c la vitesse de la lumière, h la constante de Planck, et λ la longueur d'onde d'excitation. Les différences les plus importantes, par rapport à l'absorption monophotonique (*One-Photon Absorption*, 1PA) sont la dépendance quadratique de n_a en fonction de P_0 (dépendance linéaire pour 1PA) et sa dépendance en puissance 4 de $(O.N.)$ (dépendance quadratique pour 1PA).

Les sections efficaces σ_{2PA} n'ont pas la dimension d'une section géométrique. Elles sont le produit de trois termes : la section efficace d'absorption virtuelle d'un photon d'énergie non-résonante ($\sigma_a \sim 10^{-18} \text{ cm}^{-2}$) ; la section efficace d'absorption d'un photon par la molécule dans l'état virtuel ($\sigma_s \sim 10^{-16} \text{ cm}^{-2}$) ; et la durée de vie de l'état virtuel ($\Delta t \sim 10^{-15} \text{ s}$).

⁴Picoseconde : 1 ps = 10^{-12}s ; femtoseconde : 1 fs = 10^{-15}s .

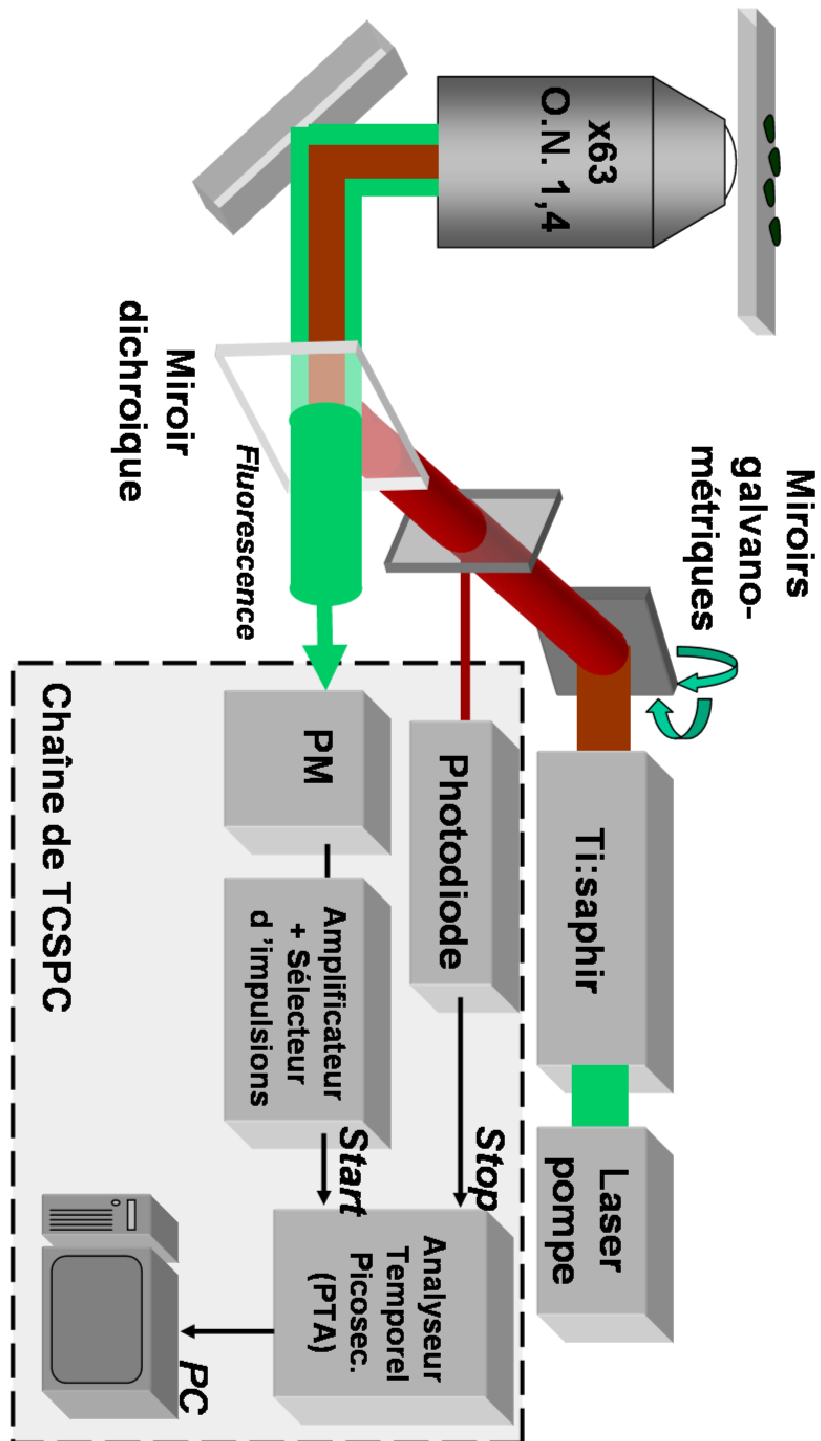


FIG. 2.13: Disposition expérimentale de microscopie de fluorescence biphotonique résolue en temps. *TCSPC* : *Time-Correlated Single Photon Counting*.

2.3.2.2 Dispositif expérimental

Les expériences de 2PFM ont été réalisées au Laboratoire de Photophysique Moléculaire (CNRS, Orsay). La Figure 2.13 présente le dispositif expérimental. Il est construit autour d'un microscope inversé et inclut une source laser impulsionnelle *Ti :saphir*. Brièvement, il s'agit d'une laser à blocage de modes qui émet des impulsions de largeur temporelle 100 - 150 fs, à des taux de répétitions d'environ 75 MHz. Le milieu amplificateur (cristal de saphir dopé avec des ions Titane) est pompé par une source laser continue Nd :YAG (*Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet*) doublée à $\lambda = 532 \text{ nm}$ (puissance du laser-pompe : 5 W). L'émission du laser *Ti :saphir* couvre théoriquement le domaine spectral 650 - 1100 nm, et est le plus souvent utilisée dans l'intervalle 750 - 900 nm (puissance optimale : 700 mW à $\lambda \sim 800 \text{ nm}$). Les colorants les plus communs absorbant dans le proche ultraviolet et le visible, le domaine spectral d'émission du laser *Ti :saphir* est bien adapté à la 2PFM.

Le faisceau laser est focalisé sur l'échantillon au moyen d'un objectif à immersion à huile (typiquement un objectif $\times 63$, O.N.=1,4). L'échantillon est placé sur une platine de translation automatisée. La fluorescence émise est collectée par le même objectif de microscope et passe par le même cube contenant un miroir dichroïque, un filtre à l'excitation et un filtre à l'émission. La fluorescence transmise par le miroir dichroïque est détectée par un photomultiplicateur (PM) à galettes de microcanaux. L'image de fluorescence biphotonique est réalisée point-par-point, en balayant l'échantillon avec le faisceau laser (sur une aire de $(50 \times 50) \mu\text{m}^2$), grâce à deux miroirs galvanométriques pilotés par un logiciel.

2.3.2.3 Mesures de fluorescence résolues en temps

Un avantage supplémentaire de l'excitation par impulsions femto/pico-secondes, à des taux de répétition MHz, est la possibilité de réaliser une imagerie de durée de vie de fluorescence (*Fluorescence Lifetime Imaging*, FLIM). La durée de vie de fluorescence est obtenue par mesure répétitive de l'intervalle de temps séparant l'impulsion d'excitation et la détection d'un photon de fluorescence (*Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC) (Demas 1983, O'Connor 1984, Eaton 1990, Birch 1991). Chaque pixel de l'image contient une information sur la durée de vie et l'intensité de fluorescence. Cette technique d'imagerie suscite un intérêt croissant pour la recherche en biologie et en biophysique (Lee 2001, Suhling 2002).

Chaque impulsion émise par le photomultiplicateur (PM) suite à la détection d'un photon de fluorescence sert de signal de départ (*start*) pour le convertisseur temps-amplitude (*Picosecond Time Analyzer*, PTA); le train d'impulsion du laser sert de signal d'arrêt (*stop*). Le décalage temporel entre l'impulsion laser et l'arrivée d'un photon est déterminé grâce à la rampe de tension générée par le convertisseur temps-amplitude. Le déclin de fluorescence est construit, après plusieurs mesures, sous forme d'histogramme.

Les acquisitions de déclin de fluorescence par cette méthode requièrent l'utilisation de détecteurs ultra-rapides dont la résolution temporelle est généralement inférieure à 100 ps. Mais certains des colorants que l'on utilise ont des durées de vie de fluorescence du même ordre de grandeur que cette résolution (Cyanine 3 : $\tau \approx 100 - 200$ ps). Dans ce cas, le déclin de fluorescence est "noyé" dans la fonction d'appareil du détecteur et la durée de vie de fluorescence ne peut pas être déterminée précisément.

2.3.3 Spectroscopie de fluorescence monophotonique

L'étude des propriétés optiques des dépôts métalliques de type agrégats supportés a été principalement menée au Laboratoire de Minéralogie Cristallographie de Paris (Campus Jussieu). Nous nous sommes intéressés à l'influence de la proximité de particules métalliques sur l'émission de fluorescence. Un intérêt particulier a également été porté à la dépendance spectrale de l'exaltation de fluorescence. En effet, la position de la fréquence d'excitation, par rapport aux fréquences de résonance plasmon des nanoparticules et d'absorption maximale des fluorophores, a une importance capitale. De même, les modifications du spectre d'émission de fluorescence en fonction de la fréquence d'excitation et de la distance fluorophore-métal renseignent sur la force du couplage fluorophore-métal. Les spectres d'émission de fluorescence sont systématiquement comparés aux spectres d'absorption optique réalisés sur les mêmes échantillons, afin d'élucider les mécanismes de l'exaltation.

Afin de réaliser cette étude spectroscopique et mesurer les facteurs d'exaltation de fluorescence, nous avons mis au point un dispositif de fluorimétrie dont le schéma est présenté en Figure 2.14. Les sources d'excitation dont nous disposons sont un laser Nd :YAG doublé à 532 nm et un laser à Argon dont les raies spectrales les plus intenses sont aux longueurs d'onde 476 nm, 488 nm, 497 nm et 514 nm. Un montage optique (densités optiques, filtres, miroirs, lentilles, cube séparateur, fibre optique) permet de diriger le faisceau incident, focalisé ou non, sur une zone de l'échantillon, de collecter la fluorescence et de l'acheminer jusqu'à l'ouverture d'un spectromètre. Un logiciel pilote le spectromètre et permet l'acquisition des spectres de fluorescence.

Deux configurations du dispositif sont exploitées. La première (Fig. 2.14a), dans laquelle le faisceau laser est en incidence normale sur l'échantillon, permet de s'affranchir des effets de polarisation liés à la forme des particules dans le cas d'agrégats supportés. La collection de la lumière de fluorescence se fait également dans la direction normale à la surface, quelle que soit la configuration adoptée pour l'excitation, afin de recueillir le plus de lumière possible. Par conséquent, la configuration d'excitation normale à la surface a pour désavantage de collecter la réflexion très intense du laser, en plus de la lumière de fluorescence (Fig. 2.14a). Elle nécessite l'utilisation de filtres et proscrit l'usage de longueurs d'onde d'excitation trop proches de celle d'émission.

La seconde configuration privilégie une incidence oblique (Fig. 2.14b) et permet ainsi de s'affranchir en grande partie de la réflexion parasite du faisceau laser. Les processus de photoblanchiment du dépôt sont réduits du fait de la non focalisation du faisceau laser.

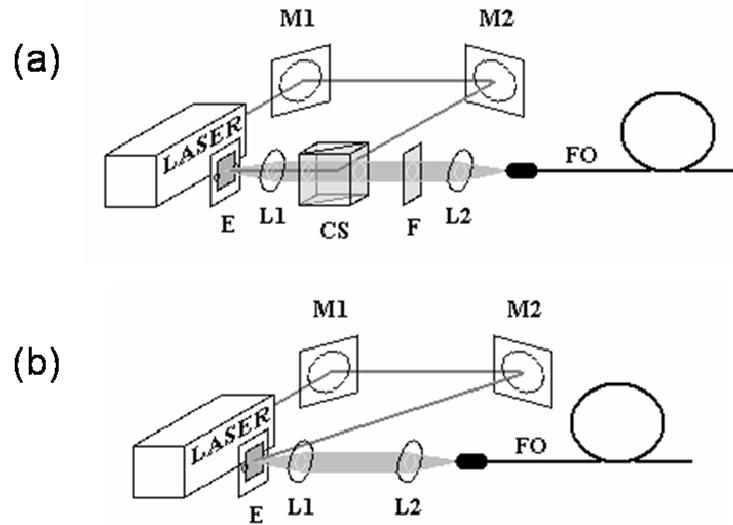


FIG. 2.14: Deux configurations d'excitation pour la spectroscopie de fluorescence : en incidence normale (a), en incidence oblique (b). E : échantillon ; L1, L2 : lentilles convergentes ; M1, M2 : miroirs orientables ; CS : cube séparateur ; F : filtre ; FO : fibre optique reliée à l'entrée du spectromètre.

Grâce aux deux lasers, nous disposons de plusieurs longueurs d'onde pour l'excitation. Dans les deux configurations présentées, le faisceau laser atteint la face de l'échantillon sur laquelle se trouve le dépôt. Des mesures ont également été réalisées en tournant l'échantillon dans l'autre sens.

2.4 Modélisation de l'interaction fluorophore/substrat

2.4.1 Géométrie des systèmes modélisés

Nous avons développé un modèle basé sur l'approximation dipolaire, dans le but de simuler le comportement optique d'un fluorophore à proximité de surfaces planes de différentes natures. Les systèmes modélisés sont schématisés en Figures 2.15a et 2.15b. Pour le modèle, les substrats ont été assimilés à des lames d'épaisseur infinie (espaces semi infinis, une interface seulement). Cette simplification implique notamment que les seules pertes d'énergie, lorsque la lumière est réfléchie à la surface du métal, sont dues à l'absorption, et non à la transmission à travers le film métallique. Un émetteur dipolaire ponctuel est supposé être dans l'air (modélisé comme un milieu idéal d'indice de réfraction égal à 1) et en contact direct avec la surface du substrat. La distance au métal est contrôlée par une couche d'alumine, modélisée comme un milieu diélectrique non dispersif (d'indice de réfraction égal à 1,65) d'épaisseur finie d . Nous n'avons pas pris en compte les possibles interactions avec d'autres émetteurs situés dans le voisinage proche du dipôle.

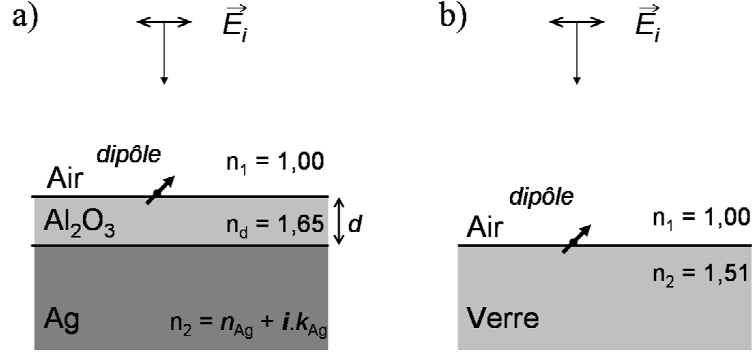


FIG. 2.15: Géométrie des systèmes modélisés; a) dipôle à l'interface air/alumine au-dessus d'un substrat d'argent semi-infini et b) dipôle à l'interface air/verre au-dessus d'un substrat de verre semi-infini; l'illumination en onde plane est réalisée en incidence normale.

2.4.2 Modèle de l'oscillateur dipolaire (théorie CPS)

L'interaction molécule-substrat est modélisée grâce à une description purement classique dont la théorie fut initialement développée par Chance, Prock et Silbey (CPS) (Chance 1974). Brièvement, l'émetteur répond à une partie de son propre rayonnement qui est réfléchi par la surface. A ce titre, l'émetteur est considéré comme un oscillateur dipolaire amorti forcé. Le taux d'amortissement du dipôle varie en fonction de la distance à la surface (Amos 1997). En se servant de la fonction complexe de permittivité diélectrique du métal, la théorie CPS décrit la réponse globale de la surface (réflexion du champ propagatif et transfert d'énergie au métal). Dans la présente étude, nous avons pris la permittivité diélectrique de l'argent telle qu'elle fut mesurée par Johnson *et al.* (Johnson 1972).

L'équation dynamique du moment dipolaire s'écrit alors de la manière suivante (en considérant les oscillations harmoniques d'une charge liée) :

$$\ddot{p} + \Gamma_0 \dot{p} + \omega_0^2 p = \frac{e^2}{m} E_R \quad (2.9)$$

où ω_0 est la fréquence d'oscillation du dipôle en l'absence de tout amortissement, m est la masse effective du dipôle, E_R est le champ électrique réfléchi au niveau du dipôle, et Γ_0 est le taux d'amortissement (inverse de la durée de vie du dipôle excité τ_0) en l'absence de la surface réfléchissante. L'amortissement peut être décomposé en une contribution radiative (rayonnement) Γ_r et une contribution non-radiative Γ_{nr} . En l'absence de surface réfléchissante, le rendement de fluorescence (efficacité radiative) de l'émetteur est alors donné par l'équation 2.10. Notez que dans le cas réel d'une molécule fluorescente, le taux d'amortissement total inclue également l'ensemble des processus moléculaires qui permettent à la molécule excitée de relaxer sans que son dipôle d'émission ne se couple à un mode électromagnétique.

$$Q_0 = \frac{\Gamma_r}{\Gamma_0} \quad (2.10)$$

Le moment dipolaire est défini de la façon suivante :

$$p = p_0 \exp(-i\Omega t) = p_0 \exp(-i\omega t) \exp\left(-\frac{\Gamma(d)}{2}t\right) \quad (2.11)$$

où $\Omega = \omega - i\frac{\Gamma(d)}{2}$ est la fréquence complexe d'oscillation et $\Gamma(d)$ est le taux d'amortissement (inverse de la durée de vie du dipôle excité $\tau(d)$) en présence de la surface réfléchissante. Puisque E_R et p oscillent à la même fréquence Ω , on peut écrire $E_R = E_0 \exp(-i\Omega t)$. En remplaçant p et E_R par leurs expressions et en résolvant l'équation 2.9, on obtient l'équation suivante :

$$\Omega^2 - \omega_0^2 - i\Gamma_0\Omega = -\frac{e^2}{p_0 m} E_0 \quad (2.12)$$

L'une des solutions (celle pour laquelle $\Omega = \omega$ en l'absence de surface réfléchissante) de l'équation du second degré 2.12 s'écrit :

$$\Omega = -i\frac{\Gamma_0}{2} + \omega_0 \sqrt{1 - \frac{\Gamma_0^2}{4\omega_0^2} - \frac{e^2}{p_0 m \omega_0^2} E_0} \quad (2.13)$$

Pour des distances relativement grandes (couplage faible entre l'émetteur et la surface), les termes Γ_0^2 et $\frac{e^2}{p_0 m} E_0$ sont très petits devant ω_0^2 . Un développement limité de la racine, dans l'équation 2.13, permet d'obtenir une expression approchée de Ω . La variation de la fréquence d'oscillation (sa valeur réelle) du dipôle $\Delta\omega$ s'écrit alors

$$\Delta\omega \equiv \omega - \omega_0 = \frac{\Gamma_0^2}{8\omega_0} - \frac{e^2}{2p_0 m \omega_0} \Re(E_0) \quad (2.14)$$

$$\Gamma(d) \equiv \tau(d)^{-1} = \Gamma_0 + \frac{e^2}{p_0 m \omega_0} \Im(E_0) \quad (2.15)$$

En introduisant l'expression classique du taux de désexcitation radiative Γ_r (Kuhn 1970),

$$\Gamma_r = \frac{2e^2\omega^2 n_1}{3c^3 m} \quad (2.16)$$

il est possible d'exprimer la variation relative du taux d'émission $\Gamma(d)$ (éq. 2.15), ainsi que la durée de vie de l'état excité, en fonction du rendement quantique initial de l'émetteur Q_0 (éq. 2.10).

$$\frac{\Gamma(d)}{\Gamma_0} \equiv \left(\frac{\tau(d)}{\tau_0} \right)^{-1} = 1 + \frac{3c^3 Q_0}{2p_0 \omega^3 n_1} \Im m(E_0) \quad (2.17)$$

où τ_0 est la durée de vie de l'état excité en l'absence de surface réfléchissante et n_1 est l'indice de réfraction du milieu dans lequel se trouve l'émetteur.

Le problème du taux d'émission revient à calculer le champ réfléchi au niveau du dipôle. L'interaction dipole/surface dépend de la distance de séparation et de l'orientation relative du dipôle. Des dipôles orientés orthogonalement et parallèlement à l'interface réfléchissante auront des taux d'amortissement $\Gamma(d)^\perp$ et $\Gamma(d)^\parallel$ différents, respectivement définis par les équations 2.18 et 2.19 (Chance 1975b, Chance 1976). Dans ces deux équations, R^\parallel et R^\perp désignent les coefficients de réflexion à l'interface, pour des faisceaux polarisés parallèlement (polarisation p) et orthogonalement (polarisation s) au plan d'incidence. l_1 est défini par la relation $l_1 = -i(1 - u^2)$; d' est égal au produit $d \cdot k_1$ où d est la distance séparant le dipôle de la surface réfléchissante; u est la composante tangentielle du vecteur d'onde normalisé.

$$\frac{\Gamma^\perp(d)}{\Gamma_0} = 1 + \frac{3}{2} Q_0 \int_0^\infty R^\parallel \exp(-2l_1 d') \frac{u^3}{l_1} du \quad (2.18)$$

$$\frac{\Gamma^\parallel(d)}{\Gamma_0} = 1 + \frac{3}{4} Q_0 \int_0^\infty [(1 - u^2)R^\parallel + R^\perp] \exp(-2l_1 d') \frac{u}{l_1} du \quad (2.19)$$

Dans les équations 2.18 et 2.19, le champ réfléchi au niveau du dipôle est calculé par intégration sur toutes les composantes d'émission du dipôle. Les composantes d'émission qui appartiennent au domaine $u \in [0; 1]$ correspondent à l'émission radiative du dipôle (rayonnement), tandis que celles qui appartiennent au domaine $u \in]1; \infty[$ sont associées à l'émission non radiative, *i.e.*, le transfert d'énergie sans émission de photons.

2.4.3 Figures spatiales de rayonnement

Les équations 2.18 et 2.19 définissent des taux d'amortissement totaux, *i.e.*, intégrés sur toutes les composantes d'émission u du dipôle. Cependant, toutes les composantes d'émission du dipôle ne sont pas modifiées de la même façon par la présence de la surface miroir. L'intensité et la phase du champ réfléchi au niveau du dipôle dépendent en effet du vecteur d'onde, *i.e.*, de la direction dans laquelle la lumière est émise. Par conséquent, la présence de la surface miroir modifie la forme du lobe d'émission. L'intégrande, dans les équations 2.18 et 2.19, contient l'information sur la distribution angulaire de l'émission du dipôle. Les composantes d'émission qui appartiennent au domaine $u \in [0; 1]$ correspondent à l'émission radiative du dipôle. Dans ce domaine, u est égal au sinus de l'angle polaire d'émission θ , et la figure spatiale de radiation du dipôle peut être obtenue à partir de l'intégrande des équations 2.18 et 2.19.

2.4.4 Normalisation par rapport au taux d'excitation

Un autre paramètre susceptible d'être modifié par la présence de la surface miroir est le taux d'excitation du dipôle. Dans le modèle présenté ici, l'excitation au travers de la lentille d'un objectif est assimilée à une onde plane, arrivant sur la surface du substrat en incidence normale. Nous n'avons donc pas considéré la focalisation de la lumière sur la surface. La validité d'une telle approximation est limitée aux objectifs de faible ouverture numérique (NA). L'intensité et la phase du champ réfléchi doivent être prises en compte pour calculer le champ d'excitation au niveau du dipôle. Nous avons appliqué les lois de Fresnel aux interfaces des systèmes air/verre et air/alumine/argent (Arnoldus 2004). A partir de maintenant, nous nous référerons au système de coordonnées décrit en Figure 2.16.

D'après la loi de Malus, l'efficacité avec laquelle l'onde électromagnétique incidente excite le dipôle varie avec le cosinus carré de l'angle formé par les vecteurs du moment dipolaire et du champ électrique. L'orientation relative du dipôle, par rapport au plan (xy) de la surface du substrat, est définie par l'angle polaire θ et l'angle azimutal φ . En supposant une incidence normale, le champ d'excitation possède uniquement une composante orthogonale au plan d'incidence, d'où une efficacité d'excitation égale à $\cos^2(\frac{\pi}{2} - \theta)$. Nous considérons maintenant une assemblée de dipôles orientés aléatoirement. Le moment de chaque dipôle peut être décomposé en une composante parallèle et une composante orthogonale à l'interface réfléchissante. La puissance totale P , rayonnée par une assemblée de N dipôles orientés aléatoirement, peut être donnée comme la somme pondérée des puissances rayonnées par un dipôle parallèle (P_{\parallel}) et un dipôle orthogonal (P_{\perp}) excités idéalement (avec une efficacité égale à 1). L'efficacité d'excitation et les composantes d'émission dépendent de l'orientation du dipôle, les deux devant être intégrées sur l'ensemble des orientations possibles du dipôle, d'où l'expression de P donnée par l'équation 2.20. La somme pondérée discutée plus haut est obtenue en développant l'équation 2.20, comme présenté dans l'équation 2.21.

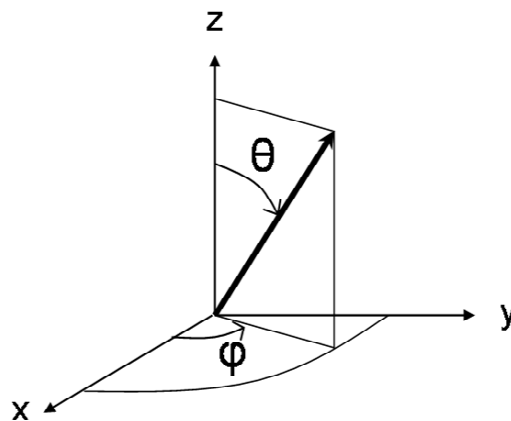


FIG. 2.16: Système de coordonnées pour la description de l'orientation relative du dipôle par rapport au plan (xy) de la surface du substrat ; θ et φ désignent respectivement l'angle polaire et l'angle azimutal.

$$\begin{aligned}
P &= N \int_0^{2\pi} \left(\int_0^{\pi/2} (P_{\parallel} \sin^2(\theta) + P_{\perp} \cos^2(\theta)) \cos^2\left(\frac{\pi}{2} - \theta\right) \frac{\sin(\theta)}{4\pi} d\theta \right) d\varphi \quad (2.20) \\
&= NP_{\parallel} \int_0^{\pi/2} \sin^5(\theta) d\theta + NP_{\perp} \int_0^{\pi/2} \sin^3(\theta) \cos^2(\theta) d\theta \\
&= \frac{8}{15} NP_{\parallel} + \frac{2}{15} NP_{\perp} \quad (2.21)
\end{aligned}$$

Le problème complexe d'une assemblée de dipôles orientés aléatoirement se résume donc à un problème bien plus simple. Le premier problème aurait nécessité la simulation d'un grand nombre de dipôles, chacun d'eux présentant des propriétés d'excitation et d'émission différentes, dépendant de leur orientation, alors que le second problème se résume à la simulation d'un dipôle parallèle et d'un dipôle orthogonal, en considérant idéale leur excitation.

2.4.5 Modélisation des échantillons d'épaisseur micrométrique

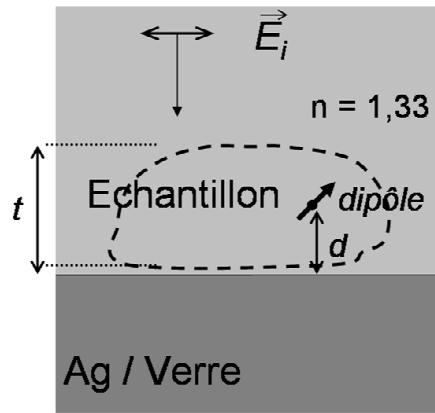


FIG. 2.17: Géométrie du système modélisé ; un échantillon fluorescent est supposé homogène et en contact avec la surface du substrat ; l'indice de réfraction de l'échantillon et de son milieu environnant est supposé égal à celui de l'eau ($n = 1,33$) ; t désigne l'épaisseur de l'échantillon.

Afin d'évaluer l'efficacité des substrats miroirs pour l'étude d'échantillons d'épaisseur micrométrique (*e.g.*, des cellules biologiques), nous avons adapté le modèle décrit précédemment à un nouveau système, lequel est décrit en Figure 2.17. Nous avons considéré un échantillon biologique directement posé sur la surface du substrat, immergé dans un milieu aqueux, et marqué de manière parfaitement homogène avec des fluorophores. Les indices de réfraction de l'échantillon et du milieu environnant sont supposés identiques et égaux à celui de l'eau ($n = 1,33$). De nouveau, les substrats sont assimilés à des espaces semi-finis. Seule une interface est prise en compte, à savoir une

interface verre/eau ou métal/eau. Toutes les fonctions dépendantes de d calculées précédemment (taux d'excitation, rendement quantique de fluorescence, figure spatiale de rayonnement, *etc.*) ont été intégrées sur un domaine donné de distance, correspondant à l'épaisseur t de l'échantillon, en supposant une distribution uniforme de distances fluorophore - substrat.

2.4.6 Modélisation de la perte de stigmatisme

Le modèle présenté jusqu'ici est bien adapté pour décrire la variation du signal détecté. Il suffit en effet, pour déterminer la puissance lumineuse collectée par l'objectif du microscope, de calculer la distribution angulaire de la puissance émise par les fluorophores. Ce modèle permet d'évaluer un gain de sensibilité à la détection des fluorophores, en supposant que cette sensibilité dépend d'un unique paramètre : l'intensité du signal détecté. Or ce n'est pas toujours le cas. En imagerie plein-champ, le deuxième critère déterminant la sensibilité à la détection des fluorophores est leur localisation. Toute la lumière émise par un fluorophore et détectée par l'objectif de microscope doit être associée à un point de l'image : en d'autres termes, le système doit être *stigmatique*.

2.4.6.1 Stigmatisme apparent d'un dispositif de détection

En optique géométrique, le *stigmatisme* est la propriété qu'a un système optique de former une image ponctuelle d'un objet ponctuel. Pour une lentille, on parle de *stigmatisme approché* car on peut considérer que cette propriété est vérifiée sous certaines conditions (les *conditions de Gauss*). En réalité, le stigmatisme de tout système optique est limité par la diffraction de la lumière, qui impose que l'image d'un objet ponctuel soit une tache (*tache d'Airy*) dont la taille est de l'ordre de $\lambda/2$. Cette limite fixe la résolution optimale d'un appareil optique. En outre, dans un dispositif incluant un système optique (*e.g.*, un objectif de microscope) et un dispositif de détection (*e.g.*, une caméra CCD), la résolution peut également être limitée par les performances de ce dernier (*e.g.*, la taille des pixels de la caméra CCD). On parle alors de *stigmatisme apparent*, si l'image d'un objet ponctuel est une tache de diamètre inférieur ou égal à la résolution du dispositif de détection. Bien entendu, la taille de cette tache augmente lorsque l'objet sort du plan de focalisation de l'objectif. Or, en présence d'un miroir, une partie des rayons lumineux collectés est virtuellement issue d'un point (l'image de l'objet dans le miroir) qui ne se trouve pas dans le plan de focalisation de l'objectif. Le résultat est donc un élargissement de la tache qui se forme dans le plan image de l'objectif. Or plus l'ouverture numérique de l'objectif est grande, plus cette tache est large. Tant que la taille de la tache est inférieure à la résolution du dispositif de détection, toute la lumière collectée après réflexion par le miroir contribue à amplifier le signal détecté. Lorsqu'elle devient supérieure, une partie de cette lumière contribue à accroître le bruit (baisse du contraste de l'image) et à dégrader la résolution latérale.

La Figure 2.18a représente très schématiquement la configuration du système étudié. Un émetteur ponctuel E est placé devant une surface miroir et dans le plan de

focalisation d'un objectif de microscope (plan visualisé par une ligne horizontale en pointillés). La résolution latérale, limitée par la résolution du dispositif de détection (*e.g.*, par la taille des pixels de la caméra CCD), est indiquée par un segment horizontal R tracé en trait gras dans le plan de focalisation de l'objectif. Les flèches partant de E représentent les rayons de lumière émis aux angles maximaux de collection de l'objectif, pour deux ouvertures numériques (O.N.) différentes. Les rayons réfléchis par la surface miroir sont virtuellement issus d'un point E' (l'image-miroir de l'émetteur) qui se trouve hors du plan de focalisation de l'objectif. Pour la plus faible ouverture numérique, toute la lumière collectée après avoir été réfléchi par le miroir est associée à l'émetteur ponctuel (*e.g.*, est détecté par un même pixel de la caméra).

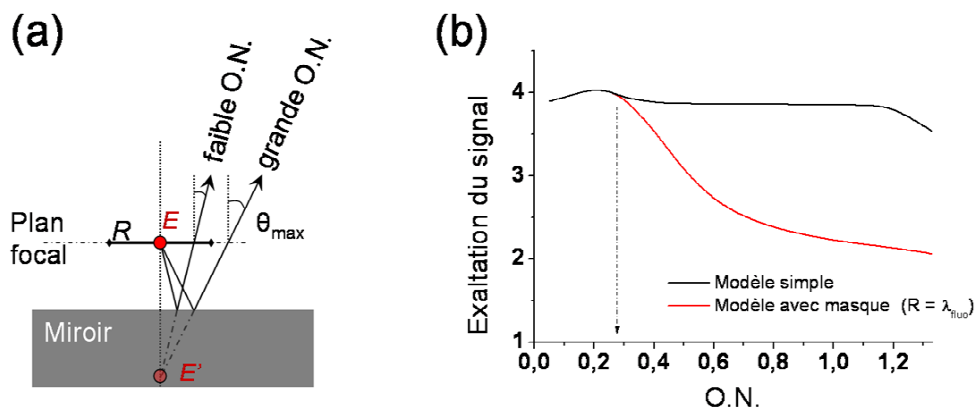


FIG. 2.18: (a) Représentation schématique d'un émetteur ponctuel placé devant une surface miroir et dans le plan de focalisation d'un objectif de microscope. E : émetteur ponctuel; E' : image-miroir de E ; R : résolution latérale du système de détection; \rightarrow : rayons de lumière issus de E et réfléchis par le miroir; θ_{max} : angle maximal de collection de l'objectif. (b) Facteur d'exaltation du signal de fluorescence calculé en fonction de l'ouverture numérique pour un fluorophore aux caractéristiques similaires à la eGFP, sans tenir compte (ligne noire, courbe du haut) et en tenant compte (ligne rouge, courbe du bas) de la perte de résolution latérale (avec $R = \lambda_{fluo}$).

2.4.6.2 Modification du modèle : sélection angulaire des faisceaux lumineux

Pour simuler l'exaltation du signal de fluorescence telle qu'elle apparaît effectivement en imagerie plein-champ, il est nécessaire de tenir compte du fait que toute la lumière collectée ne contribue pas à améliorer le contraste de l'image. Pour cela, nous avons modifié le modèle, afin de ne sélectionner que les rayons lumineux détectés conservant la résolution spatiale du système. Les autres rayons ne sont pas comptés dans le calcul du facteur d'exaltation. Sur la Figure 2.18a, le critère de sélection est de ne conserver, parmi les rayons réfléchis, que ceux qui passent dans le plan de l'émetteur par une zone centrée sur l'émetteur et de diamètre égal à la résolution latérale R de l'image. Techniquement, cela revient à placer un "masque" sur la distribution angulaire de la puissance émise, pour ne garder que le domaine angulaire $[0; \theta_{max}]$ où θ_{max} est

défini par la relation $2d \tan \theta_{max} = \frac{R}{2}$. Le domaine angulaire sélectionné évolue donc en fonction de la distance au miroir : un fluorophore directement adsorbé sur le miroir et un fluorophore positionné à $5 \mu\text{m}$ du miroir ne contribuent pas similairement au contraste de l'image.

La Figure 2.18b montre la variation théorique du facteur d'exaltation du signal de fluorescence, calculée pour une distribution homogène de fluorophores dans un échantillon d'épaisseur $t = 5 \mu\text{m}$. Lorsque la perte de stigmatisme n'est pas prise en compte (ligne noire), l'ouverture numérique de l'objectif a peu d'influence sur l'amplification du signal. Par contre, lorsqu'elle est prise en compte (ligne rouge), une baisse significative du facteur d'exaltation est observée aux grandes ouvertures numériques. En prenant pour résolution latérale la valeur arbitraire $R = \lambda_{fluo}$, on constate une dégradation de l'efficacité du substrat à partir de $O.N. \sim 0,3$, et une baisse du facteur d'exaltation d'un facteur ~ 2 pour $O.N. \sim 1,3$.

Chapitre 3

Fluorescence moléculaire sur un film métallique nanostructuré

Le processus de fluorescence, dont nous avons décrit les mécanismes dans le Chapitre 1 (§ 1.1.1, p.2), peut être modifié en changeant les conditions aux limites du champ électromagnétique. Un moyen d'y parvenir est de placer le fluorophore à proximité d'une structure métallique telle qu'une nanoparticule (§ 1.3.3, p.35), un ensemble de particules agrégées ou en interaction (§ 1.3.3.4, p.40), ou un film d'îlots percolés (§ 1.3.3.5, p.41). Ces trente dernières années, le couplage métal-fluorophore a fait l'objet d'un grand nombre d'études théoriques et expérimentales, dont les principales sont recensées dans le Chapitre 1.

Dans le Chapitre 3, nous présentons les résultats de l'étude expérimentale du couplage métal-fluorophore, sur des films métalliques *nanostructurés*. Ce terme général est utilisé ici pour désigner l'ensemble des films métalliques non-continus (taux de couverture inférieur à 1). Il inclut des structures de morphologies très diverses, allant du film de nanoparticules de taille et de forme bien définies, au film semi-continu de géométrie quasi-aléatoire. Les films métalliques nanostructurés ont en commun des propriétés particulières d'interaction avec la lumière, liées au confinement spatial des plasmons de surface. Pour les métaux nobles en particulier (or, argent, cuivre), l'excitation résonante de ces modes localisés induit une intense extinction optique (absorption et diffusion du champ électromagnétique) et modifie de manière complexe la distribution locale du champ électrique.

En conjuguant des mesures de spectroscopie optique en transmission et des observations en microscopie électronique, nous avons étudié la possibilité d'ajuster la position spectrale de ces "résonances optiques" en contrôlant la morphologie des films nanostructurés (§ 3.1, p.90). L'enjeu est la maîtrise du couplage métal-fluorophore et le contrôle des processus de fluorescence. Les mécanismes de ce couplage et leur influence sur la réponse optique des fluorophores ont été étudiés par spectroscopie de fluorescence (§ 3.2, p.92).

La position spectrale des résonances optiques du film nanostructuré et la distance séparant les fluorophores du métal sont deux paramètres fondamentaux du couplage

métal-fluorophore. Nous avons déterminé les configurations optimales qui favorisent les processus d'émission radiative, et fournissent les amplifications les plus intenses pour la fluorescence monophotonique et biphotonique.

3.1 Résonance plasmon accordable

Dans une nanoparticule métallique, la résonance plasmon est accompagnée d'un pic d'extinction et d'une amplification locale du champ (voir Fig. 1.21, p.38). A la résonance plasmon, un fluorophore placé à quelques nanomètres de la particule voit son taux d'excitation exalté d'un à deux ordres de grandeur. Ce phénomène n'est pas observé en dehors de la résonance plasmon. Il est donc intéressant de pouvoir accorder la résonance plasmon à la bande d'absorption de chaque fluorophore.

Le spectre d'extinction d'un film de particules métalliques dépend de leur nature et de leur morphologie (voir Chap. 1, § 1.2.2, p.16). Il est donc possible, en jouant sur ces paramètres, de contrôler la position de la résonance plasmon (Lévêque-Fort 2004).

Nous avons étudié le spectre d'extinction (densité optique) de films d'argent à différents stades de leur croissance. Les clichés de microscopie électronique présentés en Figure 3.1a révèlent la morphologie de ces films nanostructurés, pour différentes épaisseurs nominales e_{Ag} ¹. Aux premiers stades de sa croissance ($e_{Ag} \sim 6\text{\AA}$), le film est constitué de nanoparticules quasi sphériques. Puis, au cours de la croissance du film, des particules plus grosses et plus aplaties se forment, par coalescence des premières nanoparticules. La Figure 3.1b est l'image en couleurs réelles d'un film d'argent nanostructuré déposé sur une lame de verre, éclairé en lumière blanche et observé en transmission. L'épaisseur nominale du film varie de 2 à 14 nm par pas de 2 nm (gradient d'épaisseur croissant de la gauche vers la droite sur l'image). La couleur du film d'argent évolue du jaune au rouge sombre lorsque son épaisseur nominale augmente, signe que la morphologie joue un rôle important dans les propriétés spectrales des films métalliques nanostructurés.

La Figure 3.2 présente les spectres d'extinction mesurés sur des films d'argent nanostructurés, déposés sur une lame de verre, nus (a) ou couverts d'une couche d'alumine d'épaisseur 2 nm (b). La Figure 3.3 montre l'évolution de la position spectrale du maximum d'extinction de ces films, en fonction de leur épaisseur nominale, mesurée d'après la Figure 3.2a (ligne noire) et d'après la Figure 3.2b (ligne rouge).

L'augmentation de la taille moyenne et du rapport d'aspect d'une nanoparticule métallique se traduit par un déplacement vers le rouge et un élargissement spectral de sa résonance plasmon (Kelly 2003). Ces effets sont visibles dans les spectres d'extinction du film (Fig. 3.2a,b), lesquels donnent la réponse moyenne d'un grand nombre de nanoparticules ou îlots métalliques (la largeur du spectre mesuré n'est pas comparable à celle d'une nanoparticule unique). La coalescence des particules accroît également

¹L'épaisseur *nominale* d'un film non plan (*e.g.*, film rugueux, film discontinu, agrégats) est l'épaisseur équivalente d'une couche continue plane formée de la même quantité de matière.

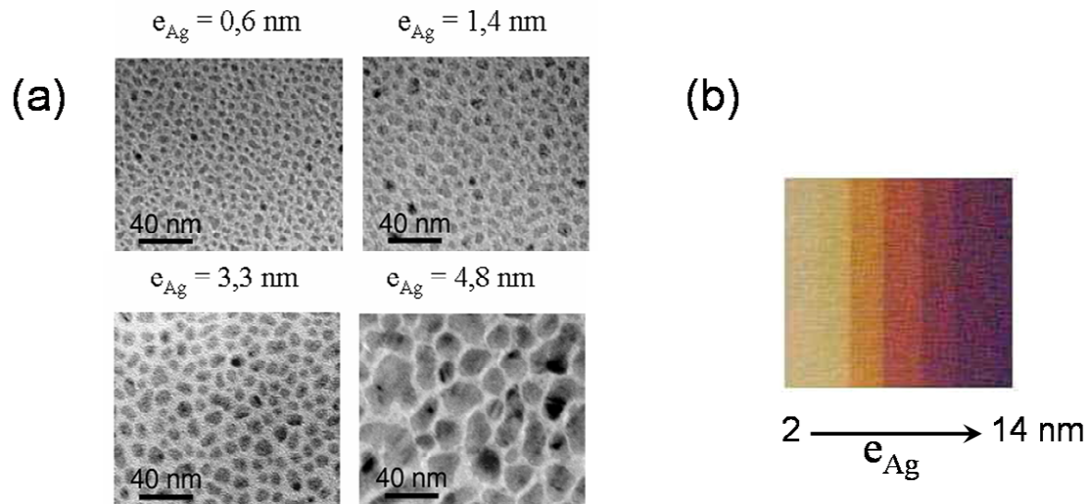


FIG. 3.1: (a) Images TEM de films d'argent d'épaisseur nominale 6, 14, 33 et 48 Å. Schémas montrant le changement de rapport d'aspect des particules métalliques au cours de la croissance du film. (b) Image d'une lame de verre couverte d'un film d'argent d'épaisseur nominale variant de 2 à 14 nm par pas de 2 nm, éclairée par une source de lumière blanche et observée en transmission. La flèche indique le sens croissant du gradient d'épaisseur.

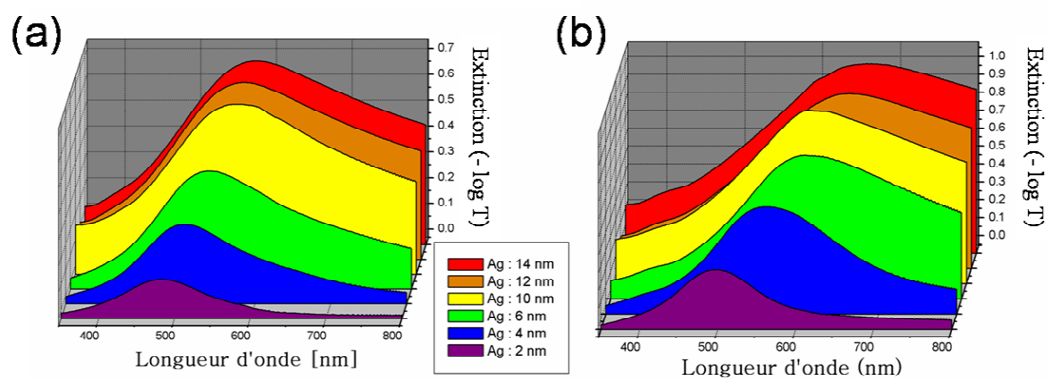


FIG. 3.2: Spectres d'extinction de films d'argent nanostructurés déposés sur une lame de verre et d'épaisseur nominale variant de 2 à 14 nm par pas de 2 nm. Films nus (a) ; Films couverts d'une couche de 2 nm d'alumine (b).

la polydispersité de taille de particules (voir Fig. 3.1a), ce qui élargit davantage le pic d'extinction du film. On observe, dans le spectre d'extinction (Fig. 3.2a-b), l'apparition d'un plateau aux grandes longueurs d'onde pour les épaisseurs nominales supérieures à 10-12 nm. Cette épaisseur correspond au seuil de percolation du film, et ce plateau est similaire à celui observé pour des films métalliques continus qui ne transmettent que les ondes de fréquences plus élevées que la fréquence plasmon ω_p (voir Chap. 1, § 1.2.1, p.15).

En maîtrisant la morphologie du film (d'une assemblée de particules sphériques à un film semi-continu) par le contrôle de la quantité de métal déposé, il est possible

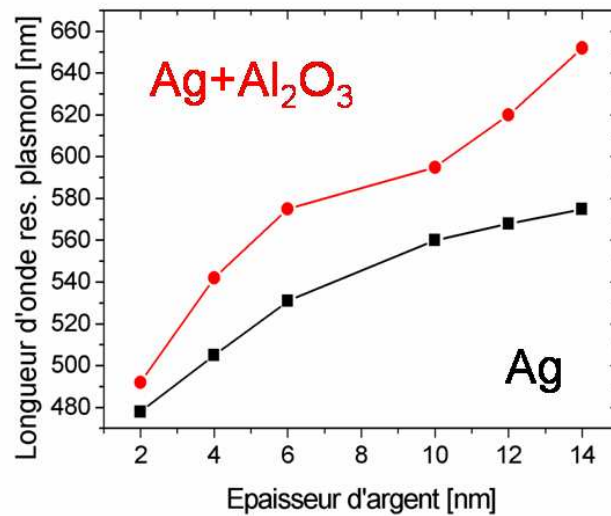


FIG. 3.3: Position spectrale du maximum d'extinction du film d'argent en fonction de son épaisseur nominale (■ : film nu, • : film couvert d'une couche de 2 nm d'alumine).

d'accorder la résonance plasmon sur une large gamme spectrale. Comme le montre la Figure 3.3, le pic d'extinction d'un film de 14 nm d'argent ($\lambda \sim 570$ nm) présente un déplacement spectral $\Delta\lambda \sim +90$ nm par rapport à un film de 2 nm ($\lambda \sim 480$ nm). Ce déplacement peut être amplifié en augmentant l'indice optique du milieu entourant les particules métalliques : avec une sur-couche de 2 nm d'alumine ($n \sim 1,67$), $\Delta\lambda \sim +160$ nm. $\Delta\lambda$ augmente avec l'épaisseur de la couche d'alumine, jusqu'à ce que celle-ci soit supérieure à l'extension des champs électriques évanescents qui se forment autour des nanoparticules à la résonance plasmon. Par exemple, couvrir un film de 14 nm d'argent d'une couche de 14 nm d'alumine déplace son pic d'extinction de $\lambda \sim 570$ nm à $\lambda \sim 800$ nm ($\Delta\lambda \sim +230$ nm). Notez que plusieurs autres paramètres expérimentaux (*e.g.*, la température du substrat) influent sur la morphologie des îlots métalliques et peuvent être utilisés pour contrôler la position et la largeur de leur résonance plasmon et du pic d'extinction du film. Notamment, le dépôt d'argent sur un substrat chauffé forme un film de nanoparticules plus grosses et plus sphériques. La température favorise en effet la diffusion et la coalescence des petites particules sur le substrat, et élève le seuil de percolation.

3.2 Mise en évidence des couplages métal-fluorophore

La proximité d'un film métallique nanostructuré est susceptible d'affecter les processus d'excitation et d'émission d'un fluorophore, en particulier quand les plasmons de surface du film sont excités à la résonance. Afin de mettre en évidence les couplages métal-fluorophore à l'excitation et à l'émission, nous avons déposé des films de colorant sur des films d'argent de différentes épaisseurs nominales, et étudié leur réponse optique (Lévêque-Fort 2003, Lévêque-Fort 2004).

3.2.1 Couplage à l'excitation

3.2.1.1 Extinction du système métal-fluorophore

Nous avons réalisé des films nanostructurés en déposant, à température ambiante, de faibles quantités d'argent (2 nm, 4 nm et 6 nm d'épaisseur nominale) sur des lames de verre. La morphologie de ces films est de type "film de nanoparticules", car leur épaisseur est nettement inférieure au seuil de percolation (typiquement 10 - 15 nm à température ambiante). Nous avons ensuite évaporé un colorant (Rhodamine B) à la surface de ces films. La Figure 3.4 présente les spectres d'extinction de ces films d'argent, avant (- - -) et après (—) le dépôt de colorant. La Figure 3.4 montre également le spectre du colorant déposé sur une lame de verre nue (- · -).

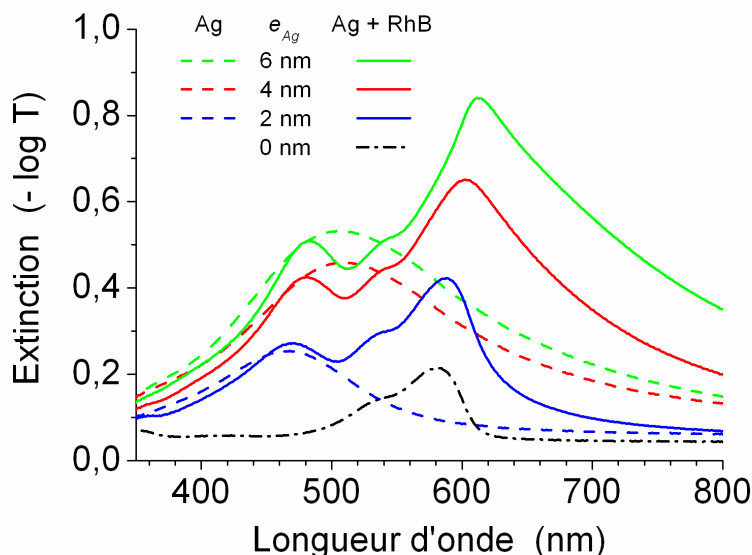


FIG. 3.4: Spectres d'extinction de films d'argent d'épaisseurs nominales 2 nm (courbes bleues), 4 nm (courbes rouges) et 6 nm (courbes vertes), formés sur une lame de verre (- - -) et couvert d'un dépôt de Rhodamine B (—). La courbe noire (- · -) correspond au spectre d'extinction du colorant sur une lame de verre nue.

Le spectre du système couplé *métal - fluorophore* n'est pas simplement une superposition ni une addition des spectres d'extinction du film d'argent et du colorant. Il présente, en effet, deux pics principaux qui ne coïncident ni avec celui du film métallique, ni avec celui du colorant seul. Pour des épaisseurs d'argent croissantes, on constate un déplacement spectral du pic d'absorption du colorant vers le rouge ($\Delta\lambda_{abs} \sim +30$ nm pour le film de 6 nm d'argent).

De plus, la présence du colorant modifie la forme de la bande d'absorption des particules métalliques. Pour le film de 6 nm d'argent, on observe un pic plus étroit (à $\lambda_{abs} \sim 480$ nm) et décalé vers le bleu ($\Delta\lambda_{abs} \sim -25$ nm) comparé au substrat sans argent. Enfin, en présence du colorant, un creux apparaît dans la bande d'absorption des particules métalliques (à $\lambda_{abs} \sim 510$ nm pour le film de 6 nm d'argent). La modifi-

cation du spectre d'absorption des nanoparticules métalliques peut être interprétée en considérant qu'elles sont entourées d'un milieu avec des pertes (les fluorophores).

En présence de particules métalliques, les fluorophores présentent un coefficient d'extinction apparent globalement plus grand et qui varie proportionnellement à l'amplification de l'intensité du champ local. On constate sur la Figure 3.4 une augmentation de l'aire comprise entre les courbes des spectres du film métallique avec et sans colorant (lignes continues et lignes en pointillés).

3.2.1.2 Amplification locale du champ d'excitation

Tout d'abord, considérons le cas d'un film de colorant déposé directement sur un film métallique, sans couche séparatrice d'alumine. L'influence de la distance séparant les fluorophores du film métallique sera discutée dans la sous-section 3.2.2.3 (p.99). La Figure 3.5 présente la variation du facteur d'exaltation de fluorescence mesuré pour un film de 0,01 MC d'Éosine ($\lambda_{fluo} \sim 535$ nm), déposé sur un film d'argent d'épaisseur variant de 2 à 40 nm, par rapport à une lame de verre nue, pour une excitation à $\lambda_{exc,1PA} = 488$ nm (*One Photon Absorption 1PA*).

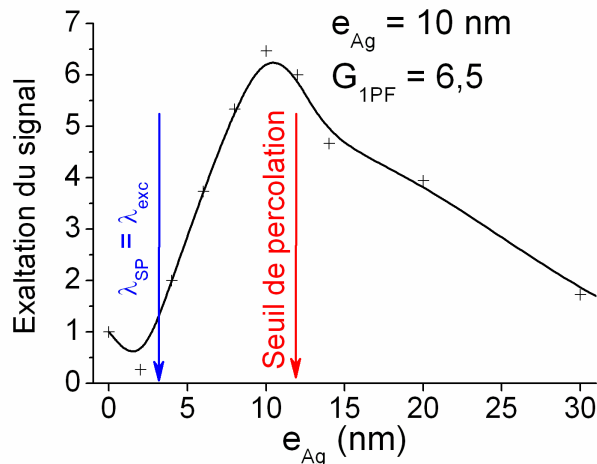


FIG. 3.5: Fluorescence monophotonique exaltée sur un film métallique, sans couche séparatrice. Facteur d'exaltation mesuré pour un dépôt d'Éosine (0,01 MC, $\lambda_{fluo} \sim 535$ nm) sur un film d'argent d'épaisseur nominale variant de 2 à 40 nm, sous excitation monophotonique à $\lambda_{exc,1PA} = 488$ nm.

D'après la Figure 3.3 (p.92), un film d'argent d'épaisseur nominale e_{Ag} comprise entre 2 et 4 nm présente un pic d'extinction proche de la longueur d'onde d'excitation $\lambda_{exc,1PA} = 488$ nm. Pourtant, le maximum d'exaltation n'est pas atteint pour cette valeur de e_{Ag} (voir flèche bleue dans Fig. 3.5). Au contraire, on mesure une baisse du signal à $e_{Ag} = 2$ nm. Si le maximum d'extinction se déplace vers les grandes longueurs d'onde lorsque e_{Ag} augmente, le coefficient d'extinction ne cesse pour autant de croître sur l'ensemble du spectre (voir Fig. 3.2, p.91). Par conséquent, dans ce cas, la position de la résonance plasmon ne détermine pas totalement l'épaisseur optimale du film (*i.e.*, celle qui maximise l'exaltation).

L'interaction entre les particules métalliques joue un rôle déterminant dans l'exaltation de fluorescence. Lorsque le film métallique est suffisamment dense, des champs très intenses se forment localement entre les particules (modes de gap), et exaltent la fluorescence des molécules situées entre ces particules. L'importance de cet effet croît avec l'épaisseur du film métallique, jusqu'au seuil de percolation, au-delà duquel la délocalisation des plasmons de surface réduit l'intensité de ces champs (voir § 1.3.3.5, p.41). Par une étude en microscopie électronique, on situe le seuil de percolation d'un film d'argent, formé à température ambiante, à $e_{Ag} \sim 10-12$ nm. D'après la Figure 3.5, l'épaisseur optimale pour maximiser le facteur d'exaltation de fluorescence est celle à laquelle le film atteint le seuil de percolation (voir flèche rouge dans Fig. 3.5). Une amplification maximale d'un facteur $G_{1PF} = 6,5$ est mesurée pour un film d'argent nanostructuré d'épaisseur $e_{Ag} = 10$ nm. Au-delà, le facteur d'exaltation diminue.

Il faut noter que l'effet d'exaltation ne concerne pas toutes les molécules, ou du moins pas toutes de la même façon. En effet, cet effet dépend de la distance de séparation et de l'orientation relative des fluorophores et des nanoparticules. D'autre part, les molécules en contact direct avec le métal n'émettent pas de fluorescence, à cause du transfert de charge qui annule totalement le processus de fluorescence (voir § 1.3.1.4, p.31). On peut donc en déduire que le facteur d'exaltation de la fluorescence des molécules qui sont adsorbées sur le verre, entre les nanoparticules, est supérieur au facteur moyen mesuré expérimentalement.

Sur la Figure 3.5, on remarque qu'à $e_{Ag} = 30$ nm, le facteur d'exaltation est toujours supérieur à 1 ($G_{1PF} = 1,7$). Puisque le contact direct avec le métal induit l'extinction totale de la fluorescence, cela signifie que le taux de couverture de l'argent sur le verre n'est pas encore de 1 à $e_{Ag} = 30$ nm, et que l'exaltation du signal n'est due qu'à une minorité de molécules situées dans les trous du film nanostructuré.

3.2.1.3 Exaltation des processus non-linéaires

L'amplification du champ local est particulièrement favorable à l'exaltation des processus non-linéaires tels que la fluorescence induite par absorption biphotonique (*Two-Photon Absorption*, 2PA). Le taux d'excitation à deux photons varie comme le carré de l'intensité du champ local (voir § 2.3.2, p.76). Des facteurs d'exaltation plus grands que sous excitation à un photon sont donc attendus (Lévêque-Fort 2003).

La Figure 3.6 présente la variation du facteur d'exaltation de fluorescence mesuré pour un film de 0,01 MC d'Éosine, déposé sur un film d'or d'épaisseur variant de 5 à 35 nm, par rapport à une lame de verre nue, pour une excitation à $\lambda_{exc,2PA} = 833$ nm. Pour cette application, l'or a été choisi plutôt que l'argent car les plasmons de surface dans les nanostructures d'or présentent des résonances pour des longueurs d'onde plus grandes. Pour un film d'or au seuil de percolation, l'amplification du champ local est maximale pour une excitation dans le proche infra-rouge (Grésillon 1999), *i.e.*, proche de la longueur d'onde d'excitation $\lambda_{exc,2PA}$.

Le facteur maximal d'exaltation de la fluorescence biphotonique G_{2PF} est de l'ordre de 100, soit un ordre de grandeur de plus que pour la fluorescence monophotonique

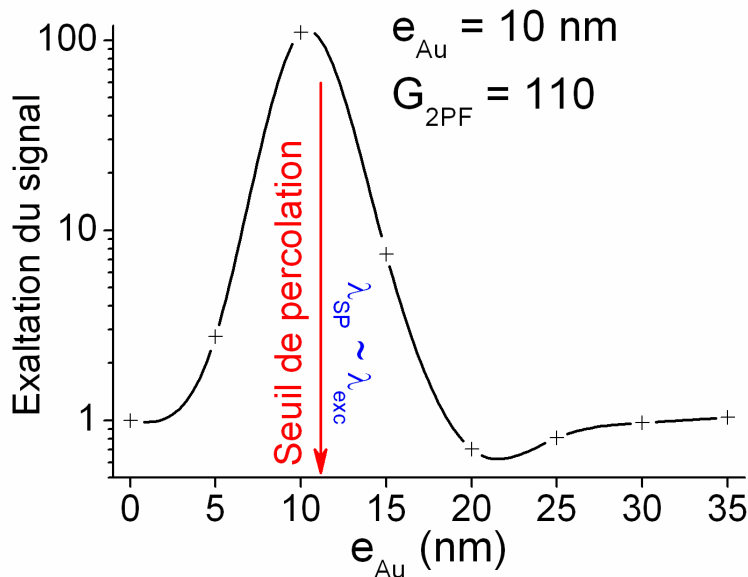


FIG. 3.6: Fluorescence biphotonique exaltée sur un film métallique nanostructuré, sans couche séparatrice. Facteur d'exaltation mesuré pour un dépôt d'Éosine (0,01 MC, $\lambda_{fluo} \sim 535$ nm) sur un film d'or d'épaisseur nominale variant de 5 à 35 nm, sous excitation biphotonique à $\lambda_{exc,2PA} = 833$ nm. En ordonnée, le facteur d'exaltation est représenté en échelle *log*.

(G_{1PF}). Les deux types de fluorescence ne diffèrent que par le processus d'excitation des fluorophores. Le fait que G_{2PF} soit grand devant G_{1PF} démontre le rôle déterminant joué par le couplage à l'excitation dans l'exaltation de fluorescence.

3.2.2 Couplage à l'émission

3.2.2.1 Modification des processus de désexcitation

Le couplage des fluorophores à une structure métallique joue également un rôle crucial à l'émission. Cela est mis en évidence par des mesures de fluorescence résolues en temps.

La Figure 3.7 montre les déclins de fluorescence d'un dépôt de colorant (0,01 MC de Rhodamine B) déposé sur une lame de verre dont la moitié est couverte d'un film de 6 nm d'argent et d'une couche de 10 nm d'alumine. La couche séparatrice d'alumine est nécessaire pour l'étude des déclins de fluorescence. En l'absence de séparation, les durées de vie sont trop courtes pour être mesurées, en raison de la force du couplage métal-fluorophore qui dépend fortement de la distance. D'autre part, la densité surfacique de colorants doit être suffisamment faible pour que les durées de vie ne soient pas modifiées par les couplages intermoléculaires. En raison de la distribution de distances intermoléculaires sur la surface du substrat, ces couplages rendent multiexponentiels les déclins de fluorescence. Notez qu'ici la fluorescence est induite par absorption biphotonique ($\lambda_{exc} = 837$ nm, $\lambda_{fluo} \sim 570$ nm), afin de filtrer très efficacement la lumière

d'excitation (mal filtrée, l'impulsion du laser apparaît comme un pic dans le déclin de fluorescence), mais cela n'affecte théoriquement pas les processus de désexcitation des molécules.

Sur la partie vierge de la lame de verre, le déclin de fluorescence est monoexponentiel, associé à une durée de vie $\tau \sim 2,6$ ns. La nature monoexponentielle du déclin vérifie que la densité de colorants est suffisamment faible pour pouvoir négliger les couplages intermoléculaires. En présence du film d'argent nanostructuré, le déclin est visiblement plus rapide, signe d'une augmentation du taux de désexcitation. En outre, l'intensité du signal à l'origine est amplifiée d'un ordre de grandeur, ce qui peut traduire une augmentation du rendement quantique des fluorophores, mais également une hausse du taux d'excitation. L'analyse de la Figure 3.7 révèle un déclin multiexponentiel. Une fonction biexponentielle s'adapte correctement au déclin expérimental, avec les composantes de durée de vie $\tau_1 \sim 1,3$ ns (68%) et $\tau_2 \sim 0,48$ ns (32%). La durée de vie moyenne $\bar{\tau} = 0,68\tau_1 + 0,32\tau_2 \sim 1,0$ ns est 2 à 3 fois plus courte qu'en l'absence du métal.

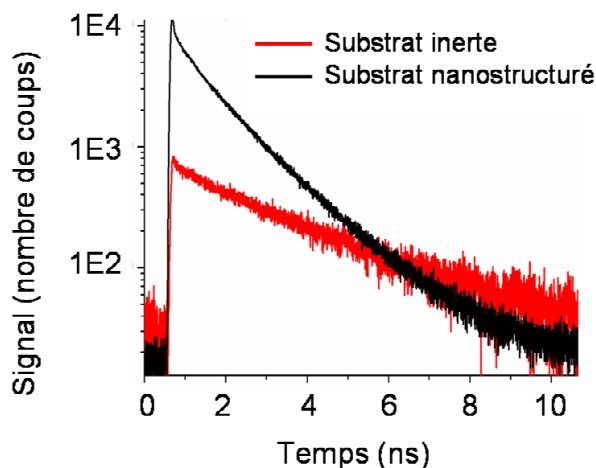


FIG. 3.7: Déclin de fluorescence d'une film de 0,01 MC de Rhodamine B ($\lambda_{flu} \sim 570$ nm) déposé sur une lame de verre nue (ligne noire) et sur un film de 6 nm d'argent couvert d'une couche séparatrice de 10 nm d'alumine. Excitation biphotonique à $\lambda_{exc} = 837$ nm.

Ici, la modification des processus de désexcitation n'est pas le résultat d'interférences comme c'est le cas pour un film continu plan, car le film d'argent est trop fin (par rapport au seuil de percolation) pour se comporter comme un miroir, et les fluorophores sont trop proches pour ressentir une réponse collective des particules ($d = 10$ nm est de l'ordre de la taille des particules et est petit devant $\lambda/4$). Il s'agit d'un couplage avec les plasmons de surface localisés du film nanostructuré. Le fait que le déclin ne soit pas monoexponentiel indique que toutes les molécules ne sont pas couplées au métal avec la même force. En effet, l'efficacité du couplage dépend de l'orientation relative de chaque molécule par rapport au substrat, et des distances séparant chaque molécule des particules (ou îlots) métalliques les plus proches.

3.2.2.2 Déplacement spectral de l'émission

Le couplage à l'émission se traduit aussi par une modification du spectre d'émission. On observe un déplacement spectral vers les grandes longueurs d'onde qui augmente avec l'épaisseur d'argent. La Figure 3.8 présente les spectres de fluorescence mesurés pour un dépôt de colorant (0,2 MC de Cyanine 3) sur des films d'argent nanostructurés d'épaisseurs nominales 2 nm (ligne rouge), 4 nm (ligne verte) et 6 nm (ligne bleue), et sur une lame de verre sans métal (ligne noire). Les fluorophores sont déposés sur une couche d'alumine d'épaisseur 4 nm qui recouvre l'argent et le verre. L'amplitude des spectres est normalisée à 1.

D'après les mesures d'extinction réalisées sur les films d'argent, lorsque ceux-ci sont couverts d'une couche d'alumine d'épaisseur 4 nm, la résonance plasmon est centrée sur $\lambda_{Ag} \sim 497$ nm à $e_{Ag} = 2$ nm, $\lambda_{Ag} \sim 556$ nm à $e_{Ag} = 4$ nm, et $\lambda_{Ag} \sim 596$ nm à $e_{Ag} = 6$ nm. Une première hypothèse est que les composantes spectrales de l'émission du colorant les plus proches de la résonance plasmon des particules métalliques sont les plus exaltées. Cela modifierait la forme du spectre d'émission et déplacerait son pic vers la résonance plasmon.

Le pic d'émission du colorant ($\lambda_{Cy3} \sim 580$ nm pour $e_{Ag} = 0$), en présence d'un film métallique dont la résonance plasmon est centrée sur une longueur d'onde plus courte ($\lambda_{Ag} \sim 556$ nm à $e_{Ag} = 4$ nm), devrait dans cette hypothèse être déplacé vers le bleu. Or on trouve expérimentalement un déplacement spectral $\Delta\lambda_{Cy3} \sim +8$ nm vers le rouge, ce qui ne valide pas cette première hypothèse.

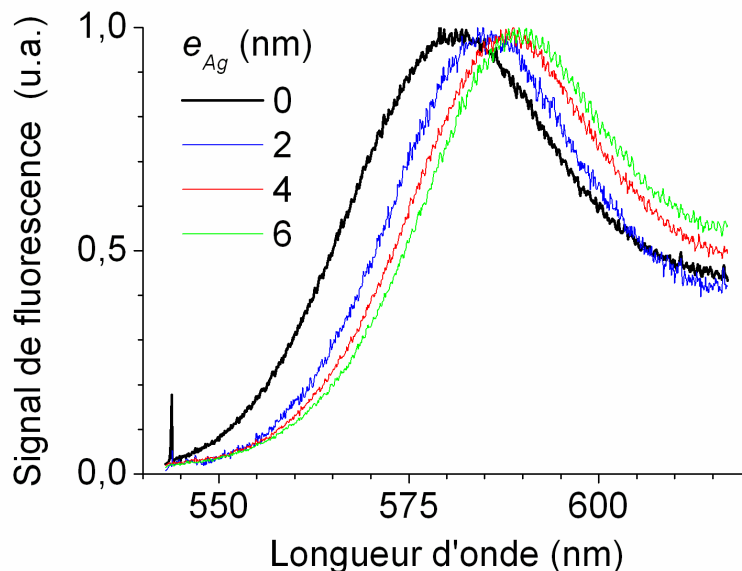


FIG. 3.8: Spectres de fluorescence d'un film de 0,2 MC de Cyanine 3 ($\lambda_{exc} = 488$ nm) déposé sur une lame de verre nue (ligne noire en gras) et sur des films d'argent d'épaisseurs nominales 2 nm (ligne rouge), 4 nm (ligne verte) et 6 nm (ligne bleue), avec une couche séparatrice de 4 nm d'alumine. *u.a.* : unités arbitraires.

Une seconde hypothèse s'appuie sur le modèle de l'oscillateur dipolaire amorti et forcé (voir Chap. 1, § 2.4.2, p.81). Près du film métallique, les fluorophores participent à l'excitation des particules métalliques. Par conséquent, le dipôle d'émission de chaque fluorophore répond à une partie de son propre champ d'émission diffusé par les particules (\mathbf{E}_R). Le modèle dipolaire prévoit un déplacement de la fréquence d'oscillation du dipôle vers les basses fréquences (*i.e.*, un déplacement de l'émission vers le rouge) proportionnel à l'amplitude du champ \mathbf{E}_R (voir 2.14, p.82). Or plus l'émission du fluorophore est proche de la résonance plasmon ($\lambda_{Ag} \rightarrow \lambda_{Cy3}$), plus l'amplitude du champ \mathbf{E}_R est grande. Cela explique pourquoi un déplacement spectral maximal ($\Delta\lambda_{Cy3} \sim +10$ nm) est observé pour $e_{Ag} = 6$ nm ($\lambda_{Ag} \sim 596$ nm proche de $\lambda_{Cy3} \sim 580$ nm).

3.2.2.3 Influence de la distance fluorophore-métal

Comme le montre la Figure 3.5 (p.94), le maximum d'exaltation de la fluorescence sur un film métallique nanostructuré est observé lorsque le film atteint le seuil de percolation. Toutefois, le facteur d'exaltation maximal est plutôt modeste ($G_{1PF} = 6,5$), compte tenu des intenses exaltations du champ local ($|E|^2/|E_0|^2 \sim 10^2$, voir Chap. 1, § 1.3.3.2, p.36). Cela est dû au couplage à l'émission, qui peut ne pas être favorable à la désexcitation radiative des fluorophores lorsqu'ils sont trop près du métal.

L'excitation résonante des plasmons de surface, dans les nanostructures métalliques, induit la formation d'intenses champs électriques évanescents. L'intensité du champ local décroît exponentiellement en fonction de la distance au métal. La position du fluorophore garantissant l'excitation la plus efficace est donc le contact direct avec le métal. Mais plus les molécules sont proches du métal, plus le transfert d'énergie non-radiatif au métal est efficace et éteint la fluorescence (*quenching*). Il existe donc une distance optimale assurant un compromis entre ces deux processus en compétition. Cette distance optimale dépend de la morphologie du film métallique. Dans nos expériences, nous avons utilisé une couche d'alumine amorphe ($n \sim 1,67$) comme couche séparatrice. L'effet de cette couche sur l'exaltation totale est difficile à prévoir *a priori* car elle modifie la distance métal/fluorophore mais aussi la position de la résonance plasmon des nanostructures métalliques, puisqu'elle change localement l'indice optique. Typiquement, cette distance est $d = (4 \pm 2)$ nm pour les faibles dépôts d'or et d'argent ($e_{Ag,Au} = 2 - 6$ nm), et $d = (10 \pm 2)$ nm pour les films proches du seuil de percolation ($e_{Ag,Au} = 10 - 16$ nm).

D'autre part, il faut noter qu'en l'absence de couche séparatrice, seules les molécules adsorbées sur le verre, entre les particules, contribuent à la fluorescence. Les fluorophores en contact direct avec le métal sont totalement "éteints", à cause du transfert de charges au métal (voir Chap. 1, § 1.3.1.4, p.31). Au cours de la croissance du film, le taux de couverture du métal sur le verre augmente, et la proportion de molécules contribuant au signal de fluorescence diminue.

La Figure 3.9 montre la variation du facteur d'exaltation de la fluorescence monophotonique d'un dépôt de colorant (Rhodamine B), sur un film d'argent nanostructuré,

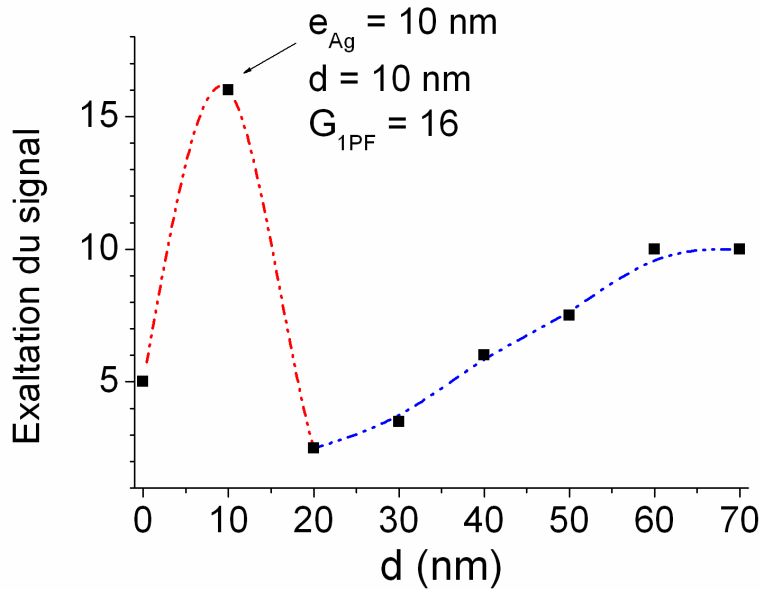


FIG. 3.9: Facteur d'exaltation mesuré pour un dépôt de Rhodamine B sur un film d'argent d'épaisseur nominale 10 nm, sous excitation monophotonique à $\lambda_{exc,1PA} = 543$ nm, en fonction de l'épaisseur d de la couche d'alumine séparant les fluorophores du métal. Les lignes en pointillés rouges et bleus soulignent les tendances de la variation du facteur d'exaltation.

en fonction de l'épaisseur de la couche d'alumine séparant les fluorophores du métal. Le film d'argent a une épaisseur nominale de 10 nm. Cette épaisseur, qui correspond au seuil de percolation, est optimale pour l'amplification de la fluorescence (voir Fig. 3.5, p. 94). En l'absence de couche séparatrice, le signal de fluorescence de la Rhodamine B est amplifié d'un facteur $G_{1PF} = 5$, proche du facteur mesuré précédemment pour l'Éosine ($G_{1PF} = 6,5$, voir Fig 3.5, p.94). Une amplification plus grande ($G_{1PF} = 16$) est observée lorsque les fluorophores sont séparés du film nanostructuré par une couche d'alumine d'épaisseur optimale $d = 10$ nm. Cette observation confirme l'idée que l'exaltation de fluorescence est le résultat de la compétition entre deux processus dépendant de la distance : l'amplification du champ local induite par excitation résonante des plasmons de surface, et le couplage du champ proche de l'émetteur aux plasmons de surface. L'effet de ces deux mécanismes d'exaltation décroît rapidement avec la distance, puisqu'ils mettent en jeu des champs évanescents. Le facteur d'amplification du signal devrait donc décroître continûment au-delà de $d = 10$ nm. Or ce n'est pas ce qui est observé.

Pour les couches séparatrices d'épaisseur supérieure à $d = 20$ nm, l'amplification du signal augmente progressivement avec la distance au film métallique, et il semble exister une seconde distance optimale pour l'exaltation à $d \sim 70$ nm. Ce résultat est en accord avec les observations de Kümmerlen *et al.* (Kümmerlen 1993) (voir Fig. 1.22, p.41). A cette distance du film métallique ($d \sim \frac{\lambda}{4}$), les fluorophores sont sensibles à la réponse collective des nanostructures. Le film au seuil de percolation se comporte, en champ lointain, comme un miroir semi-réfléchissant. Le maximum d'amplification

observé à $d = 70$ nm ($G_{1PF} = 10$) est le résultat d'un effet miroir (voir Chap. 4, p.103), qui met en jeu l'interférence des champs propagatifs, alors que le maximum d'amplification observé à $d = 10$ nm ($G_{1PF} = 16$) implique le couplage aux champs évanescents.

La Figure 3.10 représente simultanément, pour le même dépôt de Rhodamine B, la dépendance de G_{1PF} en e_{Ag} et en d . Il apparaît que la contribution de cet effet miroir, à $d \sim \frac{\lambda}{4}$, grandit jusqu'à ce que le film d'argent soit suffisamment épais pour être continu et totalement réfléchissant ($e_{Ag} \sim 60$ nm). L'effet miroir est analysé en détails dans le Chapitre 4 (p.103).

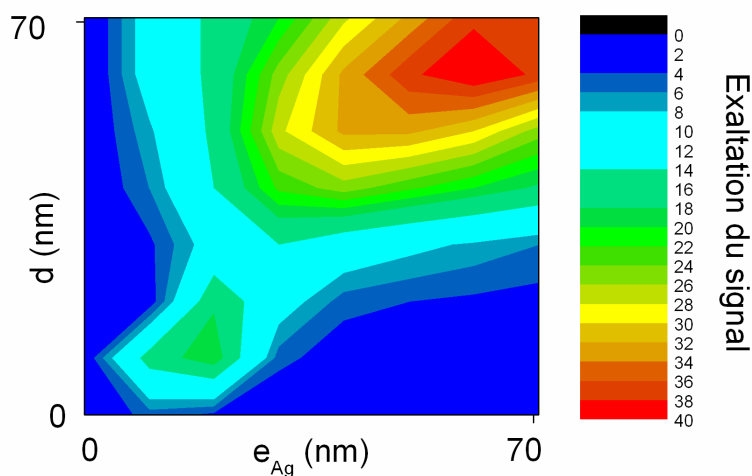


FIG. 3.10: Facteur d'exaltation mesuré pour un dépôt de Rhodamine B sur un film d'argent nanostructuré, sous excitation monophotonique à $\lambda_{exc,1PA} = 543$ nm, en fonction de l'épaisseur nominale du film (e_{Ag} en abscisses) et de l'épaisseur (d en ordonnées) de la couche d'alumine séparant les fluorophores du métal.

3.3 Conclusion du Chapitre 3

L'étude des films métalliques nanostructurés permet d'appréhender les propriétés particulières résultant du confinement spatial des plasmons de surface. Le contrôle des paramètres morphologiques des films métalliques nanostructurés permet de "modéliser" leurs propriétés optiques, et de les optimiser pour un fluorophore donné ou une application particulière.

Nous avons montré expérimentalement que la présence d'un film nanostructuré permet d'amplifier le signal de fluorescence, et que cette amplification est le résultat de la modification des processus d'excitation et d'émission des fluorophores.

L'excitation résonante des plasmons de surface localisés dans les nanostructures du film métallique induit une amplification locale du champ d'excitation. Elle permet d'accroître le taux d'excitation des fluorophores, et peut être interprétée comme une

augmentation apparente du coefficient d'extinction des fluorophores. Quatre conditions doivent nécessairement être vérifiées pour que cet effet contribue significativement à l'exaltation de la fluorescence :

- (i) les plasmons de surface doivent être fortement résonants (c'est le cas pour les films nanostructurés d'or et d'argent, en particulier au seuil de percolation) ;
- (ii) le spectre du champ incident doit être adapté à l'excitation résonante des plasmons de surface (hors de la résonance, l'amplification du champ local est négligeable) ;
- (iii) la fréquence de résonance plasmon doit être accordée avec la bande d'absorption des fluorophores ;
- (iv) les fluorophores doivent être suffisamment près des nanostructures métalliques pour bénéficier de l'amplification du champ local (en raison de la nature évanescence des champs électriques induits par l'excitation résonante des plasmons de surface).

L'amplification du champ local est particulièrement intéressante pour les processus d'excitation non-linéaire, tel que l'absorption biphotonique. Nous avons mesuré une amplification d'un facteur 100 du signal de fluorescence biphotonique de molécules d'Éosine directement déposées sur un film nanostructuré d'or au seuil de percolation. Ce type de substrat est particulièrement efficace pour la fluorescence biphotonique (les quatre conditions exposées au paragraphe précédent sont ici vérifiées). Au seuil de percolation, les résonances plasmons des films nanostructurés d'or coïncident en effet avec la bande d'absorption biphotonique des fluorophores émettant dans le visible.

D'autre part, en présence de nanostructures métalliques, le champ proche des fluorophores peut se coupler avec les plasmons de surface, offrant ainsi de nouvelles voies de désexcitation. Ce couplage à l'émission modifie le déclin de fluorescence (déclin multiexponentiel et durée de vie moyenne plus courte). Nous avons également mis en évidence un déplacement spectral de l'émission des fluorophores vers les faibles énergies, induit par la présence du film nanostructuré. Ce déplacement est maximal (typiquement $\Delta\lambda_{fluo} = +10$ nm) lorsque la résonance plasmon est accordée au pic d'émission. Ce phénomène est bien décrit par le modèle de l'oscillateur dipolaire forcé.

L'amplification totale de la fluorescence dépend fortement de la distance séparant les fluorophores du métal. Ce paramètre détermine l'intensité du champ local au niveau des fluorophores (contribution à l'excitation) et contrôle la compétition entre les processus d'émission radiatifs et non-radiatifs. La distance de séparation optimale réalise le meilleur compromis entre l'amplification du champ local et les couplages non-radiatifs avec le métal. Pour un film d'argent proche du seuil de percolation, cette distance optimale est d'environ 10 nm.

La géométrie des films métalliques au seuil de percolation (géométrie de type "fractales") les dote de propriétés électromagnétiques très intéressantes pour l'exaltation des processus optiques. Cela nécessite cependant un couplage efficace des plasmons de surface du film et du champ proche des émetteurs. En champ lointain, la réponse collective des nanostructures du film est semblable à celle d'un miroir semi-réfléchissant.

Chapitre 4

Fluorescence et couplage intermoléculaire sur un film métallique plan

Nous avons utilisé un modèle dipolaire purement classique, basé sur la théorie de Chance *et al.* (Chance 1975a), pour calculer le comportement optique d'un fluorophore face à un miroir métallique plan (§ 2.4, p.80). Par ailleurs, les effets du couplage fluorophore/métal ont été étudiés expérimentalement, en mesurant l'intensité et le déclin de fluorescence de colorants déposés sur des lames miroirs d'argent (voir les méthodes détaillées dans le Chapitre 2). Les résultats de ces travaux théoriques et expérimentaux sont présentés et comparés dans la première section du Chapitre 4 (§ 4.1, p.104).

En particulier, nous avons fait varier la distance séparant les fluorophores du métal et examiné l'influence de ce paramètre sur l'excitation (§ 4.1.1, p.104) et l'émission de fluorescence (§ 4.1.2 et § 4.1.3, p.105 et p.108). Le gain théorique en sensibilité de détection de la fluorescence, lorsque les lames miroirs sont utilisées comme substrat, est évalué et comparé aux mesures expérimentales (§ 4.1.4, p.111). Enfin, nous examinons la façon particulière dont les lames miroirs modifient les processus optiques non-linéaires, en considérant le cas de la fluorescence induite par absorption biphotonique (§ 4.1.5, p.114).

Le modèle a ensuite été adapté au cas d'un échantillon d'épaisseur micrométrique présentant une distribution homogène de fluorophores (§ 4.2, p.119). Les résultats pour ce nouveau système sont comparés à ceux obtenus dans la section 4.1.

Le couplage fluorophore-métal change également la photostabilité des fluorophores et, par conséquent, le nombre de photons émis avant photodestruction (§ 4.3, p.124). En outre, la présence d'un substrat métallique modifie l'efficacité des couplages intermoléculaires tels que l'auto-extinction de la photoluminescence (§ 4.4.1, p.127) et le transfert d'énergie résonant de Förster (§ 4.4.2, p.130).

4.1 Modifications des processus optiques : modélisation et expérience

Le modèle dipolaire décrit précédemment est utilisé pour simuler le comportement optique d'un émetteur ponctuel placé devant un substrat miroir. Afin de simplifier la compréhension, l'exaltation de fluorescence est décomposée en trois principaux effets, respectivement liés à l'excitation, l'émission et la collection de la fluorescence. Le facteur d'amplification gagné grâce à chacun de ces effets est calculé pour des dipôles parallèles et orthogonaux, en fonction de la distance les séparant de la surface du miroir. Les deux orientations dipolaires sont traitées séparément parce que l'émission d'un dipôle d'orientation quelconque peut être exprimée comme la somme pondérée de l'émission d'un dipôle parallèle et de celle d'un dipôle orthogonal (base de vecteurs orthogonaux). Pour la modélisation, nous avons utilisé comme paramètres les caractéristiques de deux colorants d'utilisation courante en biologie : la Cyanine 3 ($\lambda_{fluo} = 570$ nm et $Q_0 = 0, 1$) et la Rhodamine B ($\lambda_{fluo} = 565$ nm et $Q_0 = 0, 5$) (Lindsey 2004). Lorsque cela n'est pas précisé, on considère une illumination monochromatique en ondes planes et en incidence normale au plan de la surface miroir.

4.1.1 Exaltation à l'excitation

Les lames de verre couvertes de films métalliques continus et non-rugueux se comportent comme des surfaces miroirs. L'interférence entre les champs électromagnétiques incident \mathbf{E}_0 et réfléchi \mathbf{E}_R mène à la formation d'un champ stationnaire \mathbf{E} près de la surface. Par conséquent, l'intensité du champ d'excitation $|E|^2$ oscille en fonction de la distance au miroir, alternant des positions de phase $|E|^2/|E_0|^2 = 4$, et des positions en opposition de phase où $|E|^2/|E_0|^2 = 0$. En d'autres termes, lorsqu'un fluorophore est placé à une distance appropriée d'un miroir, son coefficient d'extinction apparent peut être jusqu'à quatre fois plus élevé qu'en l'absence de miroir.

Dans le contexte de la présente étude, la référence à considérer pour évaluer les facteurs d'exaltation n'est pas un dipôle dans l'espace libre, mais un dipôle en contact direct avec un substrat de verre. Notre intention est en effet d'évaluer le gain de signal apporté par les substrats métallisés lorsqu'ils sont utilisés à la place de lames de verre nues. Un dipôle en contact direct avec une surface de verre ressent un champ d'excitation \mathbf{E}_{verre} d'intensité plus faible que celui ressenti par un dipôle dans l'espace libre, en raison de l'interaction destructive entre les champs incident et réfléchi. Par conséquent, on peut attendre des facteurs d'exaltation à l'excitation $|E|^2/|E_{verre}|^2$ supérieurs à 4.

L'intensité du champ d'excitation a été calculée à la surface du verre ($|E_{verre}|^2$) et à la position d'un émetteur séparé d'un miroir d'argent par une couche d'alumine d'épaisseur d ($|E(d)|^2$), en supposant une illumination monochromatique à 543 nm. La Figure 4.1 représente la variation de l'intensité relative d'excitation $|E(d)|^2/|E_{verre}|^2$ en fonction de l'épaisseur de la couche d'alumine d .

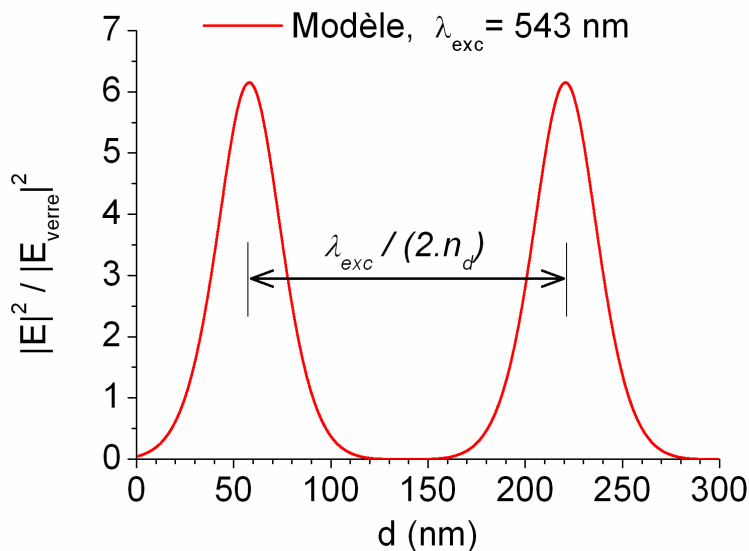


FIG. 4.1: Intensité relative d'excitation. Calcul théorique de l'intensité du champ d'excitation au niveau du dipôle, en fonction de l'épaisseur de la couche séparatrice d , normalisée par rapport à celle d'un dipôle directement adsorbé sur un substrat de verre. La source d'excitation est monochromatique, avec $\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm.

La Figure 4.1 montre deux maxima d'intensité, à $d_1 = 58$ nm et $d_2 = 220$ nm. La distance séparant les deux maxima d'intensité est égale (à 2% près) à la moitié de la longueur d'onde d'excitation dans le milieu diélectrique ($\Delta d \sim 165$ nm pour $\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm et $n_d = 1,65$). Ceci est en accord avec la position théorique des ventres de champ d'une onde stationnaire ($d_j = (2j - 1) \frac{\lambda_{\text{exc}}}{4n_d}$). Le premier maximum d'intensité est trouvé à une distance d_1 plus courte que $\frac{\lambda_{\text{exc}}}{4n_d}$, en raison de la pénétration du champ électrique dans le métal. Pour l'argent, la profondeur de pénétration à $\lambda = 543$ nm est d'environ 30 nm.

Un facteur 6,2 à l'excitation est obtenu pour les distances optimales (*e.g.*, $d_1 = 58$ nm et $d_2 = 220$ nm). En raison de la faible ouverture numérique de l'objectif de microscope (0,4) et de la courte distance séparant le plan de focalisation de celui du miroir, on suppose dans le modèle que le champ incident peut être assimilé à une onde plane. Par conséquent, des facteurs d'exaltation identiques sont obtenus pour les distances optimales plus grandes ($d_3 = 382$ nm, $d_4 = 543$ nm, $d_5 = 705$ nm, *etc.*). Cependant, en considérant le profil réel du faisceau d'excitation, on s'attend à ce que les oscillations de l'intensité du champ s'amortissent avec la distance.

4.1.2 Exaltation à l'émission

Proche d'une surface réfléchissante, un fluorophore peut être considéré comme un oscillateur dipolaire répondant à son propre champ réfléchi par le miroir, *i.e.*, un oscillateur forcé. Suivant son retard, le champ réfléchi sera en phase ou hors de phase, accroissant ou diminuant le taux d'émission radiative du dipôle (Amos 1997). Le taux

d'émission oscille avec la distance au miroir, en fonction de la variation de la phase du champ réfléchi au niveau du dipôle, alternant les positions de *super-radiance* et de *sub-radiance*. Ce phénomène est analogue à l'effet Purcell observé dans un *micro-résonateur* (Purcell 1946). Le miroir est une demi-cavité qui possède des modes optiques résonants dans lesquels l'émetteur a une probabilité plus grande d'émettre et qui, tel un micro-résonateur, sélectionne ces modes en modifiant la distribution de l'énergie émise par l'émetteur (Yablonovitch 1987, Worthing 1999).

4.1.2.1 Variation relative du rendement quantique

La Figure 4.2 présente la variation relative du rendement quantique $Q(d)/Q_{\text{verre}}$, dont dépend l'amplification de la puissance émise en présence du miroir d'argent. $Q(d)/Q_{\text{verre}}$ est calculé pour un dipôle orthogonal (ligne fine rouge) et un dipôle parallèle (ligne épaisse bleue), pour un rendement quantique initial $Q_0 = 0,1$.

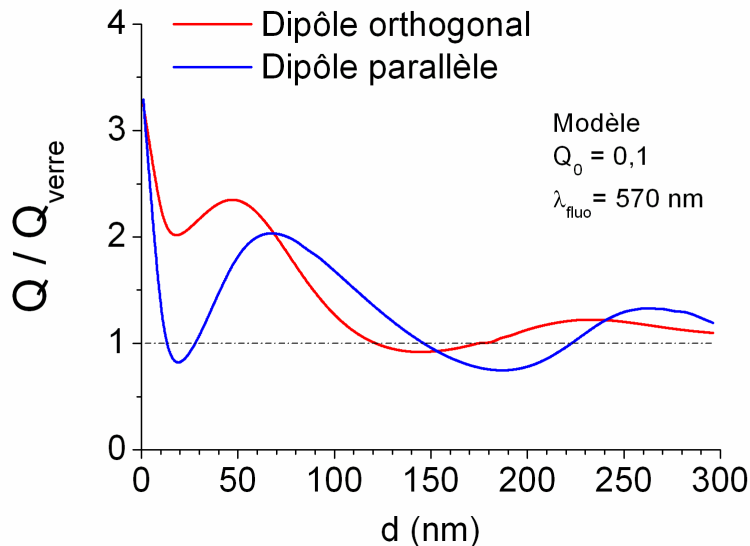


FIG. 4.2: Variation relative théorique du rendement quantique ($Q(d)/Q_{\text{verre}}$) calculée pour un dipôle orthogonal (ligne fine rouge) et un dipôle parallèle (ligne épaisse bleue) séparés d'un substrat miroir d'argent par une couche d'alumine d'épaisseur d .

Le rendement quantique Q , ou rendement d'émission électromagnétique, est la proportion de processus de désexcitation du fluorophore par couplage aux modes électromagnétiques de son environnement (*e.g.*, modes photoniques, plasmons de surface, ondes de perte). $Q(d)/Q_{\text{verre}}$ fluctue surtout dans les 150 premiers nanomètres de distance au substrat, en raison du couplage du champ proche des fluorophores avec les plasmons de surface (émission non-radiative). $Q(d)/Q_{\text{verre}}$ augmente brutalement dans les 20 premiers nanomètres, lorsque d tend vers 0, à cause de transferts d'énergie importants au substrat. Les oscillations de $Q(d)/Q_{\text{verre}}$ s'amortissent au-delà de $d = 150 \text{ nm}$. Notez que $Q(d)$ ne suit pas des lois identiques pour les deux orientations dipolaires, à cause du déphasage introduit par la réflexion du champ dans le miroir. D'autre part,

l'orientation orthogonale est plus favorable au couplage aux plasmons de surface que l'orientation parallèle, d'où un comportement différent aux courtes distances. En outre, les minima et maxima de $Q(d)$ ne sont pas atteints aux mêmes distances d .

4.1.2.2 Influence du rendement quantique initial

La Figure 4.3 montre que la variation relative du rendement quantique dépend du rendement quantique initial de l'émetteur. Nous avons calculé $Q(d)/Q_{verre}$ pour $Q_0 = 0,001$ (molécule très faiblement fluorescente), $Q_0 = 0,5$ (fluorophore standard) et $Q_0 = 0,999$ (émetteur quasiment idéal). On note que plus le rendement quantique initial est bas, plus sa variation peut être grande. À l'inverse, aucune exaltation à l'émission n'est attendue pour un fluorophore idéal, *i.e.*, présentant un rendement quantique initial de 1. En fonction de sa position par rapport au miroir, sa durée de vie varie mais pas son rendement quantique. Ce raisonnement doit cependant être nuancé lorsque l'on sort du régime linéaire d'excitation des fluorophores.

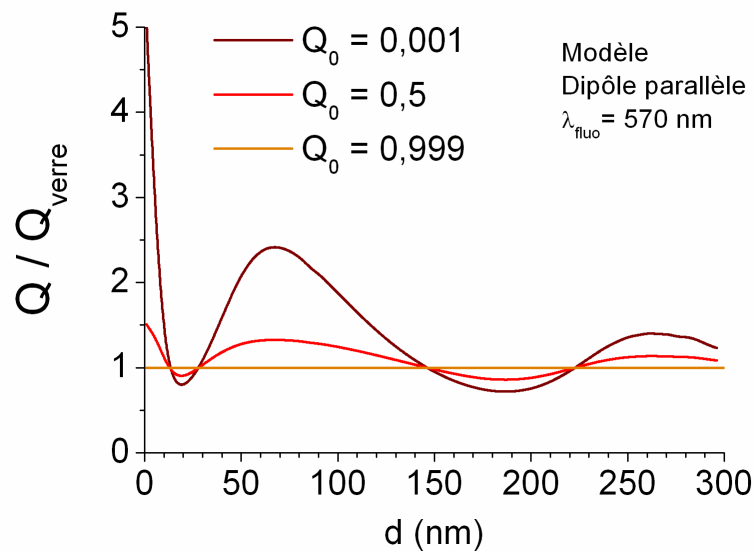


FIG. 4.3: Variation relative du rendement quantique d'un dipôle parallèle en fonction de d , pour différentes valeurs du rendement quantique initial : $Q_0 = 0,01$, $Q_0 = 0,5$, $Q_0 = 0,99$.

Lorsque le flux de photons incidents dans la section efficace d'absorption du fluorophore est de l'ordre du taux de relaxation du fluorophore, alors est atteint le seuil de saturation. À l'approche de ce seuil, le flux de photons émis ne dépend plus linéairement du flux de photons incidents. Ce phénomène peut être interprété comme une baisse apparente du coefficient d'extinction du fluorophore. La diminution de la durée de vie, observée sur une surface miroir, élève le seuil de saturation du fluorophore (puisqu'il retourne plus rapidement à l'état fondamental). Dans le régime de saturation, cela se traduit par une amplification du signal de fluorescence, même pour un fluorophore de rendement quantique de 1.

Dans cette étude, toutes les mesures expérimentales ont été réalisées hors du régime de saturation.

4.1.3 Amélioration de la collection

Hormis l'exaltation à l'excitation et à l'émission, une autre contribution à l'amplification du signal détecté est l'amélioration de l'efficacité de collection de la lumière émise.

Lorsque le substrat est une lame de verre standard, la fluorescence des molécules adsorbées est principalement émise dans le substrat, car l'indice de réfraction est significativement plus élevé dans le verre que dans l'air (Enderlein 1999). Par conséquent, l'efficacité de collection est relativement faible lorsque l'excitation et la collection sont réalisées du côté air de l'échantillon, ce qui est le cas dans de nombreux systèmes de détection tels que les lecteurs de puces à ADN. La proximité d'une surface métallique modifie la distribution angulaire de l'émission de fluorescence. Lorsque le substrat (la lame de verre) est couvert d'un film d'argent plan, le lobe d'émission est "redirigé" vers la lentille de l'objectif, permettant ainsi une collection plus efficace (Le Moal 2005).

L'efficacité de collection du signal de fluorescence est déterminée par la distribution angulaire de la puissance émise (*i.e.*, la forme du lobe d'émission) et l'ouverture numérique de l'objectif de collection (*i.e.*, la part de ce lobe qui est effectivement détectée). Si le rendement quantique des fluorophores est directement lié au nombre de photons émis, il est nécessaire de tenir compte de l'efficacité de collection pour obtenir le nombre de photons détectés.

4.1.3.1 Distribution angulaire de la puissance émise

La Figure 4.4 montre la distribution angulaire de l'émission de fluorescence, calculée pour un ensemble de dipôles orientés aléatoirement déposés sur une lame de verre nue (ligne rouge) ou un film d'argent plan (ligne noire). Sur le substrat métallique, les fluorophores sont séparés de la surface du métal par une couche d'alumine d'épaisseur $d_1 = 60$ nm (ligne continue) et $d_2 = 225$ nm (ligne en pointillés). La puissance rayonnée a été intégrée sur tout le domaine de variation de l'angle azimutal $\phi \in [0; 2\pi]$. Afin de prendre en compte l'orientation aléatoire des dipôles, nous avons calculé la distribution angulaire de la puissance émise pour un dipôle parallèle et un dipôle orthogonal. Nous avons ensuite sommé les deux figures, pondérées par les composantes d'émission dipolaires (voir Eq. 2.21, p.85).

En présence d'un substrat réfléchissant (film d'argent plan) ou partiellement réfléchissant (lame de verre), les fluorophores émettent préférentiellement dans les directions de l'espace pour lesquelles les ondes directes et réfléchies sont en phase (voir Fig. 1.15, p. 27). La figure d'interférence entre les ondes directes et réfléchies dépend de la distance au substrat réfléchissant (Drexhage 1970, Kuhn 1970). D'après la Figure 4.4, la distribution de l'émission sur le film métallique est centrée en des angles plus faibles

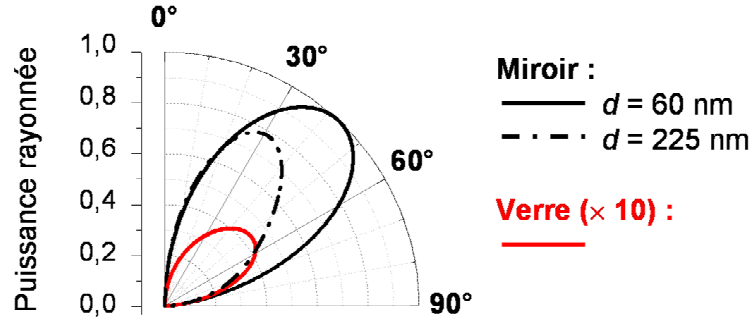


FIG. 4.4: Puissance rayonnée (unités arbitraires) en fonction de l'angle polaire θ (la puissance rayonnée est intégrée sur le domaine $[0; 2\pi]$ de l'angle azimutal ϕ) calculée pour une assemblée de dipôles orientés aléatoirement situés à $d_1 = 60$ nm (ligne noire continue) et $d_2 = 225$ nm (ligne noire en pointillés) de la surface d'argent et une assemblée similaire de dipôles directement adsorbés sur un substrat de verre (ligne rouge). Notez que ces dernières données sont multipliées par un facteur 10 dans le but de rendre la comparaison plus aisée.

($\theta_1 \sim 42^\circ$ pour $d_1 = 60$ nm et $\theta_2 \sim 31^\circ$ pour $d_2 = 225$ nm) que sur le verre ($\theta_1 \sim 52^\circ$). Cette modification est favorable à la collection aux petits angles (*i.e.*, avec un objectif de faible ouverture numérique), en particulier pour $d_2 = 225$ nm. L'efficacité de collection, pour une ouverture numérique (O.N.) donnée, est calculée par intégration de la distribution angulaire de la puissance émise entre $\theta_{min} = 0$ et $\theta_{max} = \arcsin(O.N.)$.

4.1.3.2 Efficacité de collection

La variation relative de l'efficacité de collection $\xi(d)/\xi_{verre}$ (sur le film d'argent plan par rapport à une lame de verre nue) est calculée en fonction de l'épaisseur de la couche séparatrice d , pour un objectif d'ouverture numérique $O.N. = 0,4$ (valeur typique pour un objectif à air standard de grossissement $\times 40$). La Figure 4.5 présente le résultat du calcul pour un dipôle orthogonal (ligne fine rouge) et un dipôle parallèle (ligne épaisse bleue).

Les oscillations de l'efficacité de collection vérifient l'observation faite précédemment quant à la modification de la distribution angulaire d'émission. Lorsque varie d , l'angle d'émission maximale change et le lobe entre et sort (partiellement ou entièrement) du cône de collection limité par l'angle $\theta_{max} = \arcsin(O.N.)$. De fait, plus l'ouverture numérique est faible, plus $\xi(d)/\xi_{verre}$ est sensible à la distance d .

Sur la Figure 4.5 sont indiquées les positions des maxima du rendement quantique des dipôles orthogonaux (flèches rouges) et parallèles (flèches bleues), déterminées d'après la Figure 4.2 (p.106). Pour l'orientation parallèle, les maxima des fonctions $\xi(d)/\xi_{verre}$ et $Q(d)/Q_{verre}$ coïncident quasiment. Il existe des distances optimales (*e.g.*, $d_1 = 67$ nm et $d_2 = 264$ nm) pour lesquelles l'émission du dipôle parallèle est amplifiée ($Q(d_1)/Q_{verre} = 2,04$ et $Q(d_2)/Q_{verre} = 1,33$) et l'efficacité de collection améliorée ($\xi(d_1)/\xi_{verre} = 2,52$ et $\xi(d_2)/\xi_{verre} = 2,59$). Dans le domaine étudié

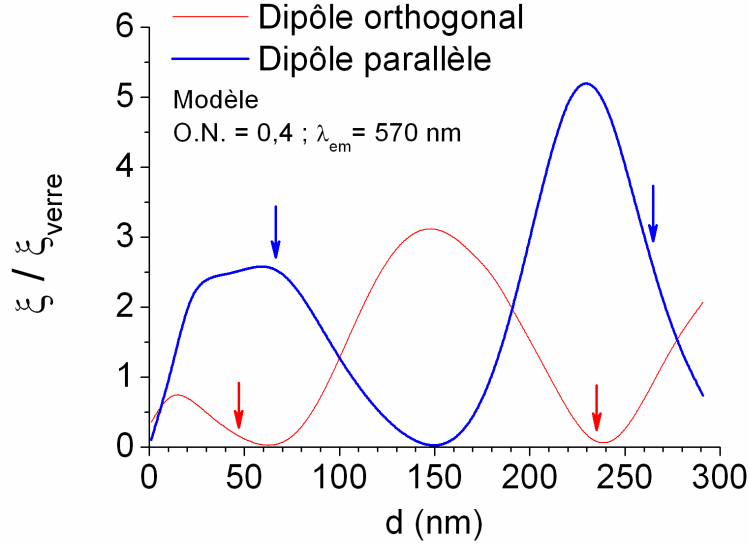


FIG. 4.5: Variation relative théorique de l'efficacité de collection ($\xi(d)/\xi_{\text{verre}}$) calculée pour un dipôle orthogonal (ligne fine rouge) et un dipôle parallèle (ligne épaisse bleue) séparés d'un substrat miroir d'argent par une couche d'alumine d'épaisseur d . La lumière émise est collectée au moyen d'un objectif d'ouverture numérique $O.N. = 0,4$. Les flèches indiquent les positions des maxima de rendement quantique du dipôle orthogonal (flèches rouges) et du dipôle parallèle (flèches bleues), déterminées d'après la Figure 4.2.

($d \in [0; 300]$ nm), ce n'est pas le cas pour l'orientation orthogonale. Aux distances ($d_1 = 47$ nm et $d_2 = 234$ nm) pour lesquelles l'émission du dipôle orthogonale est maximale ($Q(d_1)/Q_{\text{verre}} = 2,35$ et $Q(d_2)/Q_{\text{verre}} = 1,23$), l'efficacité de collection est diminuée ($\xi(d_1)/\xi_{\text{verre}} = 0,17$ et $\xi(d_2)/\xi_{\text{verre}} = 0,10$). La présence d'un film métallique plan est donc nettement plus favorable à la détection des dipôles parallèles qu'à celle des dipôles orthogonaux (dans le domaine étudié $d \in [0; 300]$ nm).

On a donc intérêt, par la suite, à choisir une configuration d'illumination qui excite efficacement les dipôles dont l'émission est favorisée (*i.e.*, les dipôles parallèles). La configuration optimale est donc l'illumination en incidence normale. Les films métalliques plans sont donc particulièrement bien adaptés à l'exaltation du signal en épi-fluorescence pour de faibles angles d'incidence, *i.e.*, avec des objectifs de faible ouverture numérique.

4.1.3.3 Rendement quantique apparent

La sensibilité à la détection des fluorophores est liée au rapport du nombre de photons détectés (*i.e.*, émis dans le cône de collection de l'objectif) et du nombre de photons absorbés par les fluorophores. Ce rapport dépend à la fois des efficacités d'émission radiative et de collection, et correspond à un *rendement quantique apparent* γ . Nous avons calculé le rendement quantique apparent $\gamma(d)$ d'un dipôle (fluorophore de type Cyanine 3) situé près d'un substrat d'argent, en supposant que la lumière était collectée à travers un objectif d'ouverture numérique $O.N. = 0,4$. Puis nous

l'avons normalisé par rapport au rendement quantique apparent γ_{verre} d'un dipôle adsorbé directement sur un substrat de verre. Les orientations parallèle et orthogonale du dipôle ont été traitées séparément. La Figure 4.6 présente les résultats de ce calcul en fonction de l'épaisseur de la couche séparatrice d'alumine d .

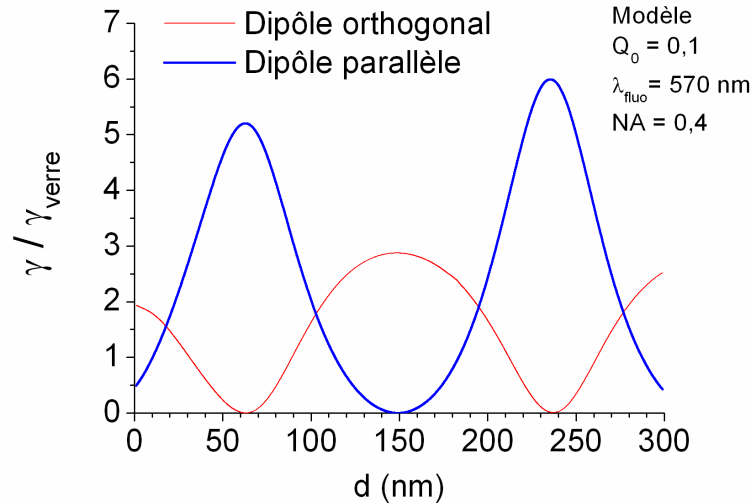


FIG. 4.6: Variation relative du rendement quantique apparent. Calcul théorique du rendement quantique apparent d'un dipôle séparé d'un substrat miroir d'argent par une couche séparatrice d'épaisseur d , normalisé par rapport à celui d'un dipôle directement adsorbé sur un substrat de verre. On considère que la lumière émise est collectée au moyen d'un objectif d'ouverture numérique 0,4. La ligne fine rouge et la ligne épaisse bleue correspondent respectivement aux dipôles d'orientation orthogonale et parallèle, par rapport au plan de la surface du substrat.

Conformément à ce que les Figures 4.2 et 4.5 permettaient de prévoir, les rendements quantiques apparents des dipôles parallèles (ligne bleue en trait gras) et orthogonaux (ligne rouge en trait fin) varient "en opposition de phase". D'après la Figure 4.1 (p.105), dans le domaine étudié $d \in [0; 300]$ nm, les maxima du rendement quantique apparent sont proches des ventres du champ d'excitation pour les dipôles parallèles, et proches des nœuds du champ d'excitation pour les dipôles orthogonaux. Cette particularité a peu d'influence sur l'efficacité des substrats miroirs tant que l'efficacité d'excitation du dipôle parallèle est beaucoup plus grande que celle du dipôle orthogonal, ce qui est le cas en incidence normale (voir Eq. 2.21, p.85).

4.1.4 Amplification du signal

4.1.4.1 Facteur d'exaltation : comparaison modèle/expérience

Nous avons mené une étude expérimentale sur l'effet de l'exaltation de fluorescence pour des molécules de colorant Cyanine 3, en fonction de la distance au miroir. Pour ce faire, nous avons évaporé ce colorant sur des lames de microscope préalablement couvertes d'un film d'argent plan, d'épaisseur 60 nm. Une couche séparatrice d'alumine,

d'épaisseur croissante, a été préparée comme décrit précédemment dans le Chapitre 2 (voir 2.1, p.53). Des observations optiques ont été menées sur les substrats miroirs et sur les lames de verre nues, afin d'estimer l'amplification du signal. La Figure 4.7 représente le facteur d'exaltation en fonction de l'épaisseur de la couche d'alumine, calculé à partir du modèle et mesuré expérimentalement, et les résultats de l'analyse de ce graphe sont résumés dans le Tableau 4.1. Expérimentalement, nous avons relevé un facteur d'exaltation maximal $G = 26,7$ pour une distance optimale $d_1 = 59$ nm (premier pic dans le graphe de la Fig. 4.7), et $G = 28,3$ pour $d_2 = 225$ nm (second pic). Sur le domaine de distance sondé ($d \in [0; 300]$ nm), nous avons trouvé un bon accord entre l'expérience et le modèle, avec notamment des différences relatives (*diff. rel.*) inférieures ou égales à 12% sur les maxima d'exaltation. En outre, les calculs théoriques ont fourni une estimation très juste des distances optimales (*diff. rel.* $\leq 2\%$). La largeur à mi-hauteur (FWHM) a été calculée pour les pics d'exaltation expérimentaux et théoriques (voir Tab. 4.1). Tel que l'on peut le voir sur la Figure 4.7, les pics expérimentaux sont plus larges que les pics théoriques (*diff. rel.* $\leq 25\%$). Cependant, cette différence était prévisible étant donné que le modèle simule une émission de fluorescence monochromatique alors que le spectre de fluorescence possède en réalité une largeur finie (c'est une bande spectrale, pas une raie).

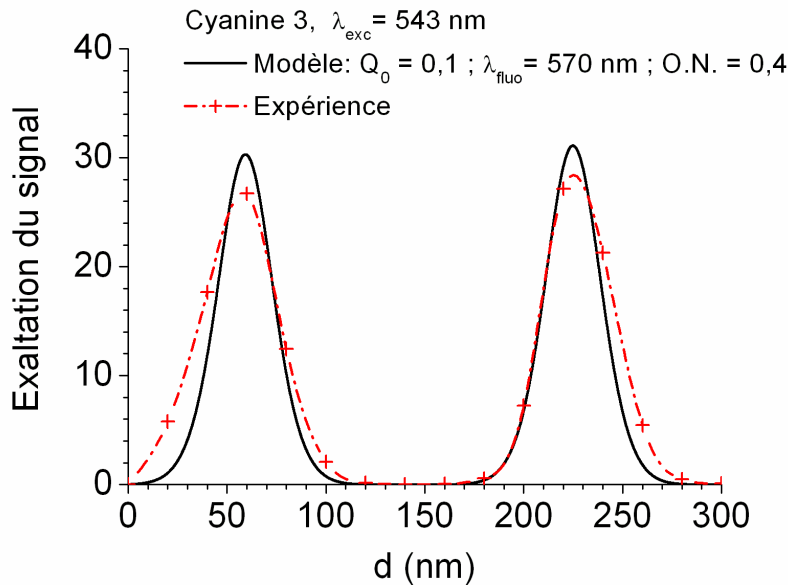


FIG. 4.7: Facteur d'exaltation théorique et expérimental. Signal de fluorescence calculé pour une assemblée de dipôles orientés aléatoirement, situés à une distance d de la surface d'argent. La collection est réalisée au moyen d'un objectif de microscope d'ouverture numérique 0,4. Le signal de fluorescence est normalisé par rapport à celui d'une assemblée de dipôles similaire directement adsorbés sur un substrat de verre. Les calculs théoriques (ligne continue noire) sont comparés aux mesures expérimentales (croix rouges et ligne en pointillés) lesquelles ont été obtenues pour un film de Cyanine 3 évaporé sur un substrat miroir.

La différence observée entre les valeurs expérimentales et théoriques des facteurs d'exaltation peut provenir de l'erreur sur la mesure expérimentale du signal de fluores-

	1 ^{er} pic			2 nd pic		
	Expérience	Modèle	Diff. rel.	Expérience	Modèle	Diff. rel.
d_j (nm)	58	59	0,02	225	225	<0,01
G	26,7	30,2	0,12	28,3	31,0	0,09
FWHM (nm)	43,6	32,9	0,25	39,4	33,0	0,16

TAB. 4.1: Analyse du graphe (Fig. 4.7) représentant le facteur d'exaltation G en fonction de l'épaisseur de la couche séparatrice ($d_{j=1,2}$: deux premières distances optimales). *FWHM* : largeur à mi-hauteur du pic d'exaltation. *Diff. rel.* : différence relative entre les valeurs expérimentale et théorique.

cence de référence I_{verre}^{fluo} . En effet, sur le verre, le signal de fluorescence est relativement faible. La différence peut également être due à une erreur sur l'estimation du rendement quantique initial Q_0 . Les valeurs de Q_0 utilisées pour la simulation sont issues de la littérature (Lindsey 2004), et ont été mesurées pour le colorant en solution dans l'éthanol. Les processus d'interactions moléculaires dans le solvant réduisent le rendement quantique des fluorophores, et il est probable que Q_0 soit supérieur dans l'air. Un accord optimal entre expérience et théorie est obtenu pour le premier pic en prenant $Q_0 = 0,2$ ($G^{th}(d_1) = 26,7$), mais l'accord pour le second pic est alors moins bon ($G^{th}(d_1) = 31,1$). Si l'on suppose que l'on fait également une erreur sur I_{verre}^{fluo} et que l'on se réfère au rapport d'amplitude des deux pics d'exaltation plutôt qu'à l'amplitude du premier pic pour ajuster Q_0 , alors on peut estimer que le rendement quantique de la Cyanine 3 dans l'air est $Q_0 = 0,14$.

4.1.4.2 Influence de l'ouverture numérique de collection

Du fait que les lobes d'émission présentent des formes différentes pour les deux types de substrats, l'amélioration de la sensibilité à la détection dépend de la partie du lobe qui est prise en compte, *i.e.*, de l'ouverture numérique de l'objectif au moyen duquel la lumière est collectée. Dans la Figure 4.8, l'exaltation totale du signal de fluorescence, résultant des trois contributions décrites précédemment (excitation, émission, collection), a été calculée pour les distances optimales $d_1 = 60$ nm et $d_2 = 225$ nm, et représentée en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif de collection. Ce facteur d'exaltation correspond au rapport entre les courbes noire et rouge de la Figure 4.4 (p.109), intégrées sur un domaine donné de l'angle polaire θ . Ce domaine angulaire est borné par l'angle polaire maximal de collection θ_{max} .

On constate que le facteur d'exaltation décroît lorsque l'ouverture numérique augmente. A $d = 60$ nm, on obtient une exaltation d'un facteur $G = 30,2$ pour $O.N. = 0,4$, et $G = 24,7$ pour $O.N. = 0,9$ (soit une baisse de 18%). Pour $d = 225$ nm, on obtient une exaltation d'un facteur $G = 30,5$ à $O.N. = 0,4$, et $G = 18,4$ à $O.N. = 0,9$ (soit une baisse de 40%). Ces résultats confirment ce que nous avons montré dans la sous-section 4.1.3.1. Les différences observées entre la variation du facteur d'exaltation

en fonction de l'ouverture numérique à $d_1 = 60$ nm et à $d_2 = 225$ nm sont dues à la différence de forme des lobes d'émission. En effet, nous avons vu que la distribution angulaire de la puissance émise à $d_2 = 225$ nm est centrée sur un angle plus petit qu'à $d_1 = 60$ nm (voir § 4.1.3.1, p.108).

Conformément à ce que nous avons démontré dans la sous-section 4.1.3 (p.108), les films d'argent plans se révèlent être d'un intérêt particulier pour l'amélioration de la sensibilité à la détection avec des objectifs de faibles ouvertures numériques.

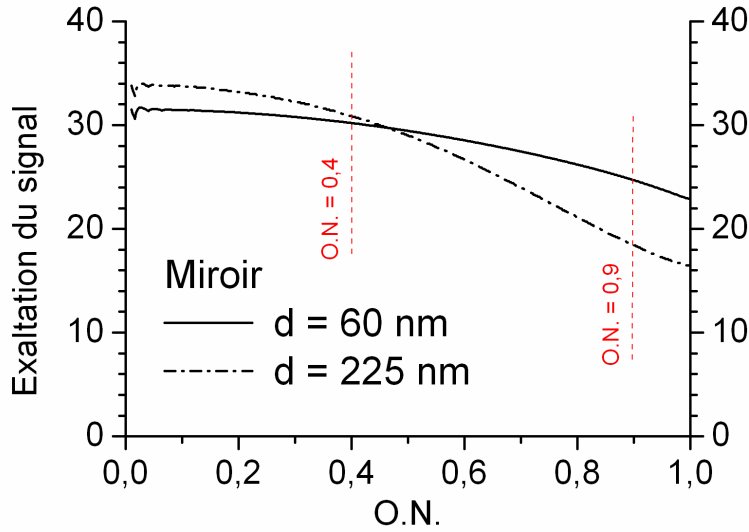


FIG. 4.8: Facteur d'amplification théorique du signal de fluorescence $G = (|E|^2/|E_{verre}|^2) (\gamma/\gamma_{verre})$ en fonction de l'ouverture numérique $O.N.$ de l'objectif de collection.

4.1.5 Exaltation de la fluorescence biphotonique

Dans la sous-section précédente (§ 4.1.4), nous avons considéré le processus linéaire de fluorescence monophotonique (*i.e.*, l'émission d'un photon de fluorescence après absorption d'un photon d'énergie supérieure) et étudié comment la présence d'un film métallique plan peut le modifier. De manière générale, la modification locale du champ électromagnétique est susceptible d'influencer tous les processus optiques. Nous montrons, en étudiant le cas de la fluorescence biphotonique, que ces effets sont particulièrement intéressants pour l'exaltation des processus optiques non-linéaires.

Pour l'étude expérimentale de la fluorescence biphotonique, nous avons utilisé la Rhodamine B afin de pouvoir réaliser des mesures de durées de vie de fluorescence. La Rhodamine B possède en effet une durée de vie ($\tau_0 \sim 3$ ns) plus longue que celle de la Cyanine 3 ($\tau_0 \sim 0,3$ ns). La durée de vie de la Cyanine 3 est trop proche de la résolution temporelle de notre dispositif de mesure ($\delta_\tau \sim 55$ ps) pour pouvoir analyser les modifications du déclin de fluorescence.

4.1.5.1 Mécanismes de l'exaltation

La fluorescence biphotonique est l'émission d'un photon de fluorescence suite à l'absorption simultanée de deux photons d'énergie plus faible (absorption biphotonique). Le flux de photons émis par fluorescence biphotonique dépend quadratiquement du flux de photons incident (processus non-linéaire). L'amplification du champ d'excitation joue donc un rôle crucial dans l'exaltation de la fluorescence biphotonique.

Afin d'évaluer cette contribution à l'excitation, nous avons étudié la variation du champ électrique en présence d'une interface réfléchissante air/argent, en considérant un système identique à celui utilisé pour modéliser l'excitation monophotonique (voir § 4.1.1, p.104). La Figure 4.9 présente la variation relative de l'intensité au carré du champ d'excitation $|E(d)|^4/|E_{verre}|^4$, calculée à la surface de la couche d'alumine en fonction de son épaisseur d (ligne noire, axe vertical de gauche), pour une excitation monochromatique à $\lambda_{exc} = 859$ nm. La variation relative du taux d'excitation des fluorophores est directement reliée à $|E|^4/|E_{verre}|^4$. L'augmentation du taux d'excitation est maximale à $d_{1,exc} = 106$ nm ($|E|^4/|E_{verre}|^4 = 39,2$), et est 6,3 fois plus grande que dans le cas de l'excitation monophotonique ($|E|^2/|E_{verre}|^2 = 6,2$ à $\lambda_{exc} = 543$ nm).

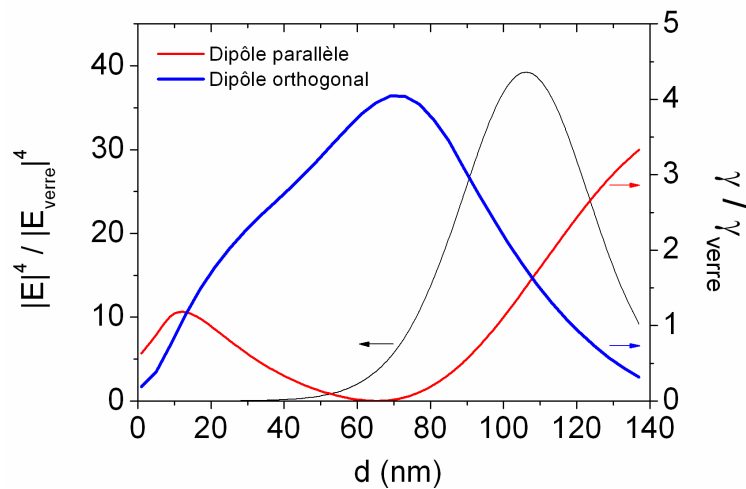


FIG. 4.9: Variation relative de l'intensité au carré du champ d'excitation ($|E|^4/|E_{verre}|^4$), calculée au niveau du dipôle, en fonction de l'épaisseur de la couche séparatrice d (ligne noire, axe vertical de gauche), en considérant une excitation monochromatique à $\lambda_{exc} = 859$ nm. Variation relative du rendement quantique apparent (γ/γ_{verre}), calculée pour un dipôle orthogonal (ligne fine rouge, axe vertical de droite) et un dipôle parallèle (ligne épaisse bleue, axe vertical de droite) en fonction de l'épaisseur de la couche séparatrice d (émetteurs type Rhodamine B : $Q_0 = 0,5$; $\lambda_{fluo} = 565$ nm).

La Figure 4.9 montre également la variation relative du rendement quantique apparent $\gamma(d)/\gamma_{verre}$ (axe vertical de droite), calculée pour des fluorophores de type Rhodamine B, pour l'orientation orthogonale (ligne fine rouge) et parallèle (ligne épaisse bleue) du dipôle d'émission. Les différences observées dans les oscillations de $\gamma(d)/\gamma_{verre}$ entre la Figure 4.9 et la Figure 4.6 (p.111) proviennent de la différence de rendement

quantique initial entre les deux colorants étudiés (Rhodamine B : $Q_0 = 0,5$; Cyanine 3 : $Q_0 = 0,1$). L'émission de fluorescence est modélisée de manière totalement indépendante du mode d'excitation. Pour les dipôles les plus efficacement excités (dipôles parallèles), le rendement quantique apparent atteint un maximum $\gamma/\gamma_{verre} = 4,04$ à $d_{1,em} = 71$ nm. Les positions $d_{1,exc}$ et $d_{1,em}$ qui maximisent respectivement les contributions à l'excitation et à l'émission sont donc relativement distantes l'une de l'autre.

Dans le cas de la fluorescence biphotonique, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission diffèrent quasiment d'un facteur deux ($\lambda_{exc} \lesssim 2\lambda_{fluo}$). D'un point de vue spectral, la situation est semblable à celle d'une molécule de très grand déplacement de Stokes. La variation du facteur d'exaltation, en fonction de la distance à la surface métallique, est donc moins simple que dans le cas de la fluorescence monophotonique étudié précédemment.

Comme le montre la Figure 4.9, à la position optimale d'excitation des fluorophores ($d_{1,exc} = 106$ nm, $|E|^4/|E_{verre}|^4 = 39,2$), l'émission et la collection de la fluorescence ne sont pas optimales mais sont néanmoins amplifiées ($\gamma/\gamma_{verre} = 1,76$). A la position optimale d'émission et de collection de la fluorescence ($d_{1,em} = 71$ nm, $\gamma/\gamma_{verre} = 4,04$), l'exaltation à l'excitation des fluorophores est comparable à celle observée dans le cas de l'excitation monophotonique ($|E|^4/|E_{verre}|^4 = 6,4$). Le domaine de distance étudié ($d \in [0; 140]$ nm) n'est donc probablement pas le plus adapté à l'exaltation de la fluorescence biphotonique.

4.1.5.2 Comparaison expérience/théorie

Nous avons entrepris l'étude expérimentale des mécanismes d'exaltation, à l'excitation et à l'émission, de la fluorescence biphotonique. Pour cela, nous avons réalisé des mesures de d'intensité et de durée de vie de fluorescence, grâce à un dispositif de microscopie multiphotonique résolue en temps décrit dans le Chapitre 2 (§ 2.3.2, p.76). Comme pour les expériences précédentes (voir 4.1.4, p.111), nous avons évaporé un colorant (ici la Rhodamine B) sur des lames de microscope préalablement couvertes d'un film d'argent plan, d'épaisseur 60 nm. Une couche séparatrice d'alumine permet de contrôler la distance fluorophore/métal. Les fluorophores sont excités à $\lambda_{exc} = 859$ nm.

La fluorescence étant un processus d'émission spontanée, les variations du taux d'excitation des fluorophores n'affectent pas la durée de vie de leur état excité. Par conséquent, les mesures de durées de vie de fluorescence permettent de sonder spécifiquement les processus de couplage à l'émission, tandis que les mesures d'intensité renseignent sur la somme des contributions à l'exaltation.

La Figure 4.10a présente la variation expérimentale du signal de fluorescence (ligne en pointillés rouge, axe vertical de droite) comparée au facteur théorique d'amplification du signal (ligne continue noire, axe vertical de gauche) calculé d'après le modèle. La Figure 4.10b montre les durées de vie de fluorescence mesurées expérimentalement (croix rouges, axe vertical de droite) ainsi que la variation relative théorique de la durée de vie (ligne continue noire, axe vertical de gauche).

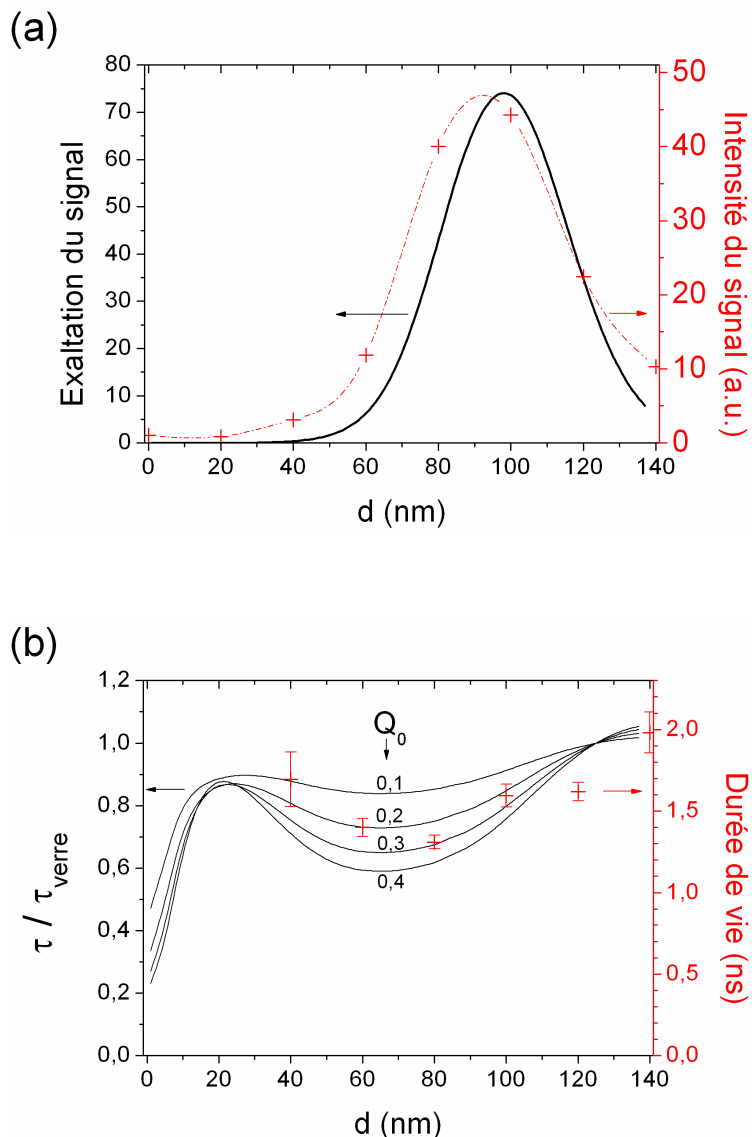


FIG. 4.10: Intensité (a) et durée de vie (b) de fluorescence biphotonique d'un film de colorant (Rhodamine B) déposé sur un film de 50 nm d'argent et séparé de la surface du métal par une couche d'alumine d'épaisseur variant de 0 à 140 nm par pas de 20 nm. La fluorescence du colorant est induite par absorption biphotonique ($\lambda_{exc} = 859$ nm, $\lambda_{fluor} = 565$ nm). Les données expérimentales (croix et ligne en pointillés rouges) sont comparées aux données théoriques (ligne continue noire) calculées à l'aide du modèle dipolaire : facteur d'exaltation théorique $G_{2PF}(d)$ (a) et variation relative théorique de la durée de vie des fluorophores $\tau(d)/\tau_{verre}$ (b). $\tau(d)/\tau_{verre}$ est calculé pour différentes valeurs du rendement quantique initial ($Q_0 = 0, 1/0, 2/0, 3/0, 5$).

D'après le modèle, le signal de fluorescence détecté est amplifié d'un facteur maximal $G_{2PF} = 78$ à $d_1 = 98$ nm (Fig. 4.10a). On trouve expérimentalement une distance optimale $d_1 = 92$ nm en accord avec le modèle (à 6% près). Comme pour la Figure 4.7 (comparaison expérience/théorie pour l'exaltation de fluorescence monophotonique, p.112), le pic de la courbe $G_{2PF}(d)$ mesuré expérimentalement est plus large que celui de la courbe théorique, en raison de la largeur finie de la bande spectrale d'émission du fluorophore.

Les variations expérimentales de la durée de vie suivent les mêmes tendances que la simulation. Toutefois, l'amplitude de ces variations, qui dépend du rendement quantique initial Q_0 de la Rhodamine B, est relativement faible par rapport à ce que prévoit le modèle pour $Q_0 = 0,5$ (Fig. 4.10b). Rappelons que cette valeur de Q_0 , utilisée pour les simulations, est donnée dans la littérature pour le colorant en solution dans l'éthanol (Lindsey 2004) et est susceptible de changer lorsque les molécules sont adsorbées sur une lame de verre ou une couche d'alumine. Nous avons calculé $\tau(d)/\tau_{verre}$ pour différentes valeurs de Q_0 ($Q_0 = 0,1/0,2/0,3/0,5$ en Fig. 4.10b). Les données expérimentales tendent à montrer que dans les conditions de l'expérience, les fluorophores ont un rendement quantique initial inférieur à 0,5 ($0,1 < Q_0 < 0,5$). Des mesures supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette observation.

Très près du métal ($d \leq 20$ nm), la durée de vie est fortement réduite, en raison du fort couplage aux plasmons de surface. Lorsque d tend vers 0, la chute simultanée du signal et de la durée de vie révèlent l'augmentation du transfert d'énergie vers le métal. D'après la théorie de Chance *et al.* (Chance 1975b, Chance 1975c, Chance 1976), la durée de vie est nulle en $d = 0$ (contact direct avec le métal), ce que ne montre pas la simulation présentée en Figure 4.10b. En effet, dans le modèle, la distribution de l'énergie émise par le dipôle n'est pas intégrée sur toutes les composantes tangentielles du vecteur d'onde, mais "uniquement" de $u = 0$ à $u = 20$ (voir § 1.3.1.3, p.28). La quasi-totalité de l'énergie émise est comprise dans cet intervalle, sauf lorsque le dipôle se couple avec des modes non-radiatifs de très large vecteur d'onde : les *ondes de perte* (Whitmore 1982). On retrouve bien une durée de vie quasi-nulle si l'on étend, dans le modèle, le domaine d'intégration de l'énergie émise par le dipôle.

Entre $d = 40$ nm et $d = 80$ nm, la hausse du signal conjuguée à la baisse de la durée de vie traduit l'augmentation du taux d'émission radiative (Chance 1974). On mesure un minimum local de durée de vie $\tau_{min} = (1,31 \pm 0,04)$ ns à $d_{\tau_{min}} = 80$ nm, ce qui est proche de la position théorique $d_{em} = 71$ nm à laquelle l'interaction avec le dipôle-image est la plus favorable à l'émission du dipôle parallèle, *i.e.*, là où le rendement quantique apparent est maximal.

La distance théorique d_{exc} à laquelle le champ d'excitation est localement le plus intense ($d_{exc} \sim 106$ nm) ne coïncide pas avec d_{em} . Expérimentalement, le signal de fluorescence atteint un maximum pour $d_1 \sim 92$ nm ($d_1 \sim 98$ nm d'après le modèle), soit une distance comprise entre d_{em} et d_{exc} . Cela confirme l'action complémentaire des mécanismes d'exaltation à l'excitation et à l'émission, dans l'amplification du signal de fluorescence biphotonique.

4.2 Effet miroir pour les échantillons fluorescents d'épaisseur micrométrique

Dans la section 4.1, nous avons étudié les propriétés de fluorescence de molécules positionnées à une distance donnée d'un miroir métallique. Pour cela, nous avons couvert un film d'argent plan d'une couche séparatrice d'épaisseur homogène et réalisé un dépôt de colorant de faible densité surfacique, *i.e.*, un échantillon fluorescent d'épaisseur "infiniment fine". Dans la section 4.2, nous traitons le cas des échantillons fluorescents d'épaisseur finie, *i.e.*, présentant une distribution de distance fluorophore-métal (Le Moal 2007a, Le Moal 2007b). En particulier, nous considérons des échantillons aux dimensions typiques des échantillons biologiques (cellules, sections tissulaires, *etc.*). Les applications biomédicales présentées au Chapitre 7 (p.161) mettent en jeu des cellules épithéliales dont l'épaisseur est d'environ 15 à 20 μm , et des sections de tissu d'épaisseur 5 μm . De manière générale, la taille des cellules biologiques est comprise entre 1 et 10 μm pour les cellules procaryotes; 10 et 100 μm pour les cellules eucaryotes. En clinique, les *microtomes* électriques servant à préparer les sections de tissu biologique permettent typiquement de réaliser des coupes de 2 à 25 μm d'épaisseur. Pour les calculs théoriques présentés dans la section 4.2, nous avons choisi de modéliser un échantillon fluorescent d'épaisseur 5 μm .

4.2.1 Particularités des échantillons d'épaisseur micrométrique

Nous avons vu précédemment que le taux d'émission d'un fluorophore oscille lorsque sa distance par rapport au miroir varie (voir § 4.1.2, p.105). Cependant, l'amplitude de ces oscillations décroît avec la distance, en raison de la portée limitée de l'interaction du dipôle avec son image dans le miroir. Par conséquent, l'exaltation à l'émission joue surtout un rôle pour les échantillons de faible épaisseur (petite devant la longueur d'onde d'émission). L'amélioration de la sensibilité à la détection, pour les échantillons épais, est principalement liée à l'augmentation du taux d'excitation des fluorophores et de l'efficacité de collection de la fluorescence.

Dans le cas d'une onde plane arrivant en incidence normale sur un miroir plan parfait, l'intensité du champ local (somme des champs incident et réfléchi) a pour expression $|E|^2 = 4|E_0|^2 \sin^2(2\pi d/\lambda)$ où λ et d sont respectivement la longueur d'onde du champ et la distance au miroir (voir § 4.1.1, p.104). Lorsque la distance au miroir est telle que les champs incident et réfléchi sont en phase au niveau du fluorophore, alors son taux d'excitation est quatre fois plus grand qu'en l'absence du miroir ($|E|^2/|E_0|^2 = 4$). Dans le cas d'un échantillon épais, il faut intégrer l'intensité du champ local sur le domaine de distance $d \in [0; t]$ où t est l'épaisseur de l'échantillon. Si t est grand devant λ , alors l'intensité moyenne du champ local est deux fois plus grande que l'intensité du champ incident ($\int_0^t |E|^2 dd \simeq 2|E_0|^2$). En supposant une distribution homogène de fluorophores dans le volume de l'échantillon, le taux d'excitation moyen des fluorophores est alors deux fois plus élevé que dans l'espace libre. Si l'on considère que le coefficient

de réflexion d'une lame de verre n'est pas totalement nul (de l'ordre de 4% dans le visible en incidence normale), alors on peut s'attendre à ce que le gain à l'excitation sur une lame miroir par rapport à une lame de verre nue, $\int_0^t |E|^2 / |E_{\text{verre}}|^2 dd$, soit inférieur à 2. Le calcul donne une augmentation moyenne du taux d'excitation des fluorophores, en présence du miroir, d'un facteur 1,97.

Le gain sur l'efficacité de collection dû à la présence du miroir est également moindre pour les fluorophores situés loin de la surface du substrat. Nous avons montré précédemment que la présence d'une surface réfléchissante redirige la lumière émise par les fluorophores vers la lentille de l'objectif, améliorant ainsi l'efficacité de collection (voir § 4.1.3, p.108). La contribution de ce phénomène à l'exaltation du signal dépend de la distance séparant les fluorophores de la lame. Lorsqu'une molécule est déposée sur une lame de microscope standard, 68% à 77% de sa fluorescence est émise dans la lame de verre, en raison du couplage de son champ proche avec le substrat (Enderlein 1999). La portée de cette interaction est limitée à des distances typiquement inférieures à 100 nm. Une efficacité de collection multipliée par un facteur ~ 4 est attendue lorsque la distance fluorophore-substrat est de cet ordre. Pour des distances plus grandes, l'émission est isotrope en moyenne. La redirection de la lumière émise apporte une amélioration plus modeste de l'efficacité de collection, typiquement d'un facteur ~ 2 .

Il s'agit maintenant de savoir si (et dans quelle mesure) l'utilisation de lames miroirs améliore la sensibilité à la détection lorsque cette méthode est appliquée aux échantillons d'épaisseur micrométrique, tels que des cellules biologiques. Pour apporter une première réponse à cette question, nous avons adapté le modèle utilisé précédemment pour les dépôts de colorant (d'épaisseur "infinitement fine") à un nouveau système, d'épaisseur finie. Les détails du modèle sont fournis dans le Chapitre 2 (voir § 2.4.5, p.85).

4.2.2 Amplification moyenne du signal

La Figure 4.11 présente l'amplification moyenne du signal, calculée en fonction de l'épaisseur t de l'échantillon. Deux ouvertures numériques différentes ont été considérées, à savoir 0,4 (ligne noire) et 0,55 (ligne rouge). Une amplification moyenne d'un facteur $\sim 3,9$ a été obtenue pour $t = 5 \mu\text{m}$, avec pour paramètres une excitation monochromatique à $\lambda_{exc} = 489 \text{ nm}$ et des fluorophores aux caractéristiques similaires à celles du biomarqueur $eGFP^1$ ($Q=0,6$, $\lambda_{exc} = 508 \text{ nm}$). Typiquement, pour des valeurs de t supérieures à quatre longueurs d'onde dans le milieu de l'échantillon ($t \gtrsim 1,5 \mu\text{m}$ pour $n_d = 1,65$), l'amplification du signal moyen de fluorescence varie peu avec l'épaisseur de l'échantillon. Une variation relative de $\pm 5\%$ est observée sur l'intervalle $t \in [1, 5; 5] \mu\text{m}$. Lorsque l'épaisseur de l'échantillon varie, la distribution angulaire évolue, modifiant alors l'efficacité de collection. Cette variation est moins importante lorsque la lumière est collectée au moyen d'un objectif de plus grande ouverture numérique (variation relative de $\pm 3\%$ pour une ouverture numérique de 0,55). On peut donc attendre un

¹ $eGFP$: enhanced Green Fluorescent Protein.

facteur d'exaltation relativement constant pour un échantillon dont l'épaisseur varie d'une région à l'autre, ce qui est le cas généralement dans les applications d'imagerie cellulaire. En outre, le modèle donne des résultats similaires lorsque l'on remplace les caractéristiques de la eGFP par celles du biomarqueur *Mitotracker Red CMXRos* ($\lambda_{exc} = 579$ nm et $\lambda_{em} = 599$ nm) et du marqueur *Alexa 633* ($\lambda_{exc} = 632$ nm et $\lambda_{em} = 647$ nm), notamment des facteurs d'exaltation de $\sim 3,9$ (Mitotracker) et $\sim 3,8$ (Alexa 633).

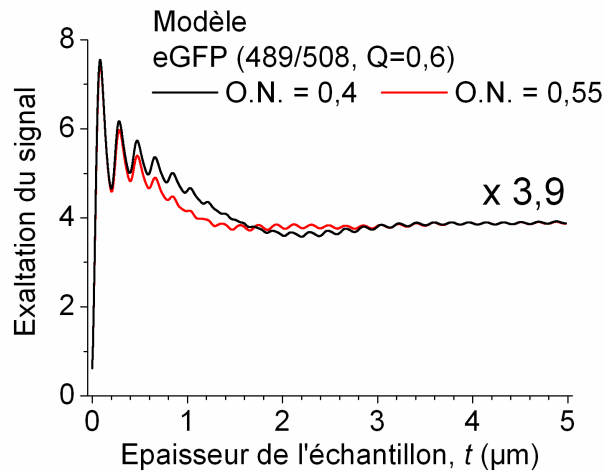


FIG. 4.11: Exaltation théorique du signal de fluorescence, calculée en moyennant le facteur d'exaltation de fluorescence sur l'épaisseur de l'échantillon t . La distribution des fluorophores dans le volume de l'échantillon est supposée homogène. Les caractéristiques des fluorophores sont similaires à celles des marqueurs eGFP. La lumière émise est collectée au moyen d'un objectif d'ouverture numérique 0,4 (ligne noire) / 0,55 (ligne rouge). Une amplification moyenne d'un facteur $\sim 3,9$ est prévue par le modèle pour un échantillon d'épaisseur $t = 5 \mu\text{m}$.

4.2.3 Distribution angulaire de l'émission de fluorescence

Un autre point important, pour l'application de cette méthode à l'imagerie cellulaire, est son efficacité avec des objectifs de faible grossissement. Dans le cas des dépôts de colorant, nous avons démontré l'intérêt particulier des substrats miroirs d'argent pour l'amélioration de la sensibilité à la détection avec des objectifs de faible ouverture numérique. Des recherches similaires ont été menées sur l'exaltation de fluorescence appliquée aux échantillons épais.

4.2.3.1 Lobes d'émission

La Figure 4.12 est un graphe représentant la distribution angulaire de la puissance rayonnée (figure spatiale de rayonnement intégrée sur l'angle azimutal), calculée pour un échantillon d'épaisseur $5 \mu\text{m}$, marqué de manière homogène avec des fluorophores. Le calcul a été fait pour deux substrats différents, à savoir un miroir d'argent (ligne

noire) et une surface de verre (ligne rouge). Les graphes présentés dans les Figures 4.4 (p.109) et 4.12 ont été construits de manière comparable. Les paramètres du modèle sont une illumination en incidence normale, à $\lambda_{exc} = 489$ nm, et des fluorophores de type eGFP.

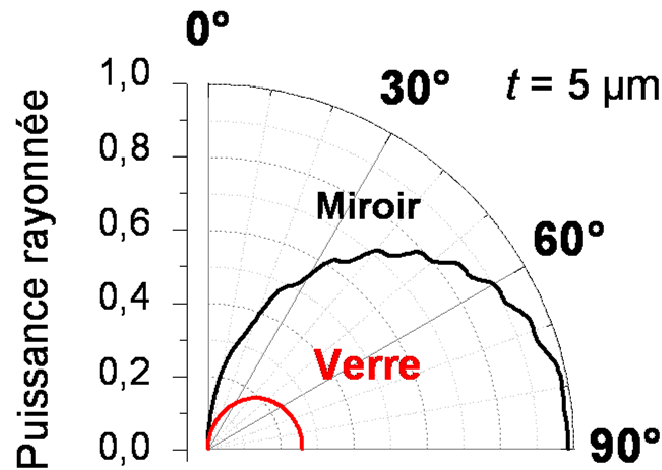


FIG. 4.12: Puissance rayonnée (en unités arbitraires) en fonction de l'angle polaire (la puissance rayonnée est intégrée sur le domaine $[0; 2\pi]$ de l'angle azimutal φ) calculée pour un échantillon d'épaisseur $t = 5 \mu m$ déposé sur un substrat d'argent (ligne noire) et un substrat de verre (ligne rouge). La distribution des fluorophores dans le volume de l'échantillon est supposée homogène.

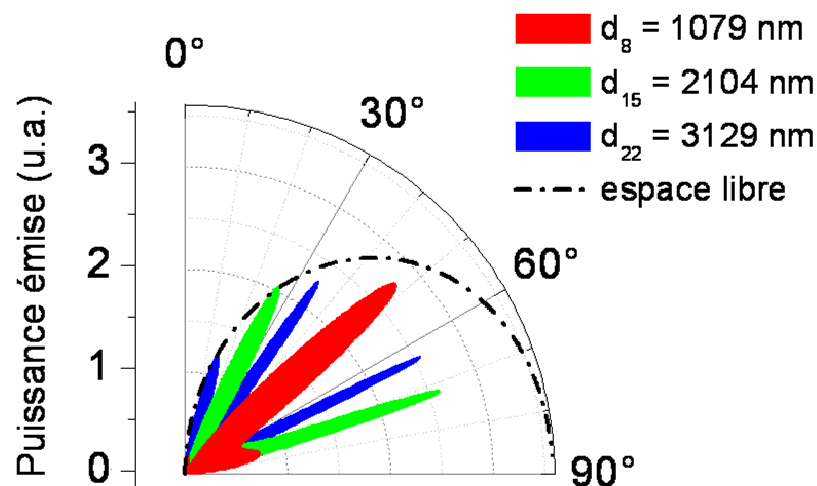


FIG. 4.13: Distribution de la puissance émise par rayonnement dans le demi-espace supérieur pour des fluorophores de type eGFP, en présence d'un miroir d'argent et d'une couche séparatrice d'alumine d'épaisseur 1079 nm (lobe rouge), 2104 nm (lobe vert) et 3129 nm (lobe bleu), et dans l'espace libre (pointillés noirs, puissance $\times 10$). *u.a.* : unités arbitraires.

Rappelons que le graphe de la Figure 4.4 (p.109) a été calculé en considérant une assemblée de fluorophores tous positionnés à la même distance ($d_1 = 60$ nm) d'une surface miroir d'argent. Dans le cas de fluorophores homogènement distribués dans un échantillon d'épaisseur micrométrique (Fig. 4.12), l'émission de fluorescence n'est pas distribuée de manière similaire. En particulier, elle est beaucoup moins directionnelle.

La Figure 4.13 montre la distribution angulaire de la puissance émise par des fluorophores placés à des distances micrométriques d'un miroir d'argent. Ces distances ($d_8 = 1079$ nm, $d_{15} = 2104$ nm et $d_{22} = 3129$ nm) correspondent respectivement aux huitième, quinzième, et vingt-deuxième maxima d'exaltation rencontrés lorsque l'on éloigne les émetteurs du miroir ($d_j \simeq (2j - 1)\frac{\lambda}{4n_d}$). Ces distributions d'émission sont à comparer à celle d'un dipôle orienté aléatoirement dans l'espace libre (ligne en pointillés noirs, données multipliées par un facteur 10). En présence d'un miroir, les fluorophores émettent préférentiellement dans les directions où l'interférence entre les ondes directes et réfléchies par le miroir est constructive (Drexhage 1970, Kuhn 1970). C'est pourquoi l'émission est beaucoup plus directionnelle que celle d'un dipôle dans l'espace libre. Le lobe d'émission du dipôle est "modulé" par une fonction qui dépend de la distance au miroir. Par conséquent, lorsque l'on intègre la distribution angulaire d'émission sur toutes les distances au miroir (Fig. 4.12), on recrée l'enveloppe du lobe d'émission du dipôle en l'absence de miroir. C'est pourquoi, une fois intégrée, la distribution angulaire d'émission dans le demi-espace supérieur est relativement similaire, que le substrat soit transparent ou réfléchissant.

4.2.3.2 Efficacité de collection

Dans le cas de l'échantillon épais, la puissance émise aux grands angles est plus importante que dans le cas du film de colorant. L'efficacité de collection est donc limitée lorsque la lumière est collectée au moyen d'un objectif de faible ouverture numérique. Cependant, l'utilisation d'une surface réfléchissante améliore la sensibilité à la détection, même avec un objectif de faible ouverture numérique, tel que cela est illustré par la Figure 4.14. L'exaltation du signal de fluorescence en fonction de l'ouverture numérique (O.N.) de collection, représentée en Figure 4.14, a été calculée de la même manière que pour la Figure 4.8. Contrairement au résultat qui avait été obtenu pour les dépôts de colorant (voir Fig. 4.8, p.114), l'exaltation du signal reste ici relativement constante en fonction de l'O.N. de l'objectif (variation relative de $\pm 1\%$ pour $0,3 < O.N. < 1,0$).

Toutefois, on remarque une sensible variation pour $0,05 < O.N. < 0,3$ (variation relative de l'ordre de 3%), due soit au fait que le coefficient de réflexion de la lame de verre varie en fonction de l'angle (alors que celui du miroir est théoriquement constant), soit au fait que la distribution angulaire d'émission n'est pas intégrée sur toutes les distances au miroir mais "uniquement" de 0 à 5 μm . Ce dernier point peut également expliquer qu'il subsiste une légère modulation du lobe d'émission (voir Fig. 4.12).

Pour conclure, on s'attend à ce que l'utilisation de substrats miroir d'argent, à la place des lames de verre standard, améliore la sensibilité à la détection du signal de

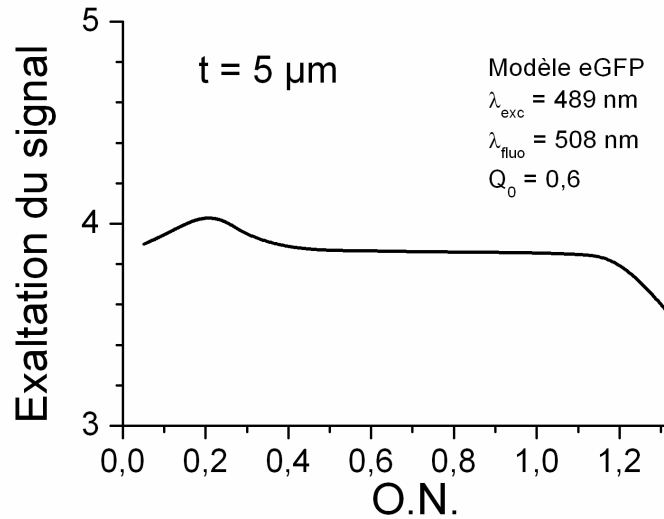


FIG. 4.14: Facteur d'exaltation théorique du signal de fluorescence en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif de collection (paramètres du modèle : *idem* Fig. 4.12).

fluorescence d'un facteur $\sim 3,9$, même lorsque la lumière est collectée au moyen d'un objectif de faible ouverture numérique.

4.3 Photostabilisation des fluorophores

Précédemment, nous avons montré que la présence d'une surface métallique influence les processus d'émission radiative d'un fluorophore (voir § 4.1.2, p.105). Les changements de la durée de vie de l'état excité modifient également la photostabilité du fluorophore. L'étude expérimentale de ce phénomène est présentée dans la section qui suit.

4.3.1 Effets électromagnétiques

Lorsque une molécule est dans l'état excité, elle a une certaine "probabilité" de participer à une réaction chimique qui entraîne la perte de ses propriétés de fluorescence. Cette probabilité dépend de propriétés intrinsèques à la molécule, ainsi que des espèces chimiques présentes dans son environnement proche (Beer 1972, Dubois 1996). Il est possible d'accroître la *durée de photostabilité* de la molécule (*i.e.*, de diminuer le taux de photoblanchiment Γ_{bl}) en réduisant la puissance d'excitation, mais le nombre moyen de photons émis par la molécule avant photodestruction reste alors inchangé. En effet, ce nombre total de cycles de fluorescence est proportionnel à la durée de vie de l'état excité, laquelle est indépendante du taux d'excitation. Par contre, la durée de vie de l'état excité est sensible aux interactions électromagnétiques qui agissent sur les processus d'émission de la molécule.

4.3.2 Mesure expérimentale de la photostabilité des fluorophores

Nous avons étudié l'influence d'une surface métallique plane sur le photoblanchiment des fluorophores. Pour cela, nous avons mesuré l'atténuation progressive du signal de fluorescence d'un dépôt de colorant (Rhodamine B), déposé sur une lame de verre et sur un film plan de 70 nm d'argent couvert d'une couche séparatrice d'alumine, et excité par une source laser continue ($\lambda_{exc} = 532$ nm). Une série d'acquisitions est réalisée dans le temps, à partir de l'instant où une zone de l'échantillon est exposée à la lumière du laser. Les déclin temporels obtenus sont ensuite analysés par ajustement de fonctions bi-exponentielles $y(t) = A_1 \exp(-t/T_1) + A_2 \exp(-t/T_2)$, où T_1 et T_2 sont les durées de photostabilité (voir Fig. 4.15). On définit ensuite une durée moyenne de photostabilité $\mathcal{T} = (A_1 T_1 + A_2 T_2)/(A_1 + A_2)$ qui correspond au temps moyen durant lequel la molécule émet avant d'être photodétruite. La valeur à l'origine $I_{inst} = y(0) = A_1 + A_2$ et l'intégrale du déclin $I_{integ} = \int_0^\infty y(t) dt = A_1 T_1 + A_2 T_2$ donnent respectivement l'intensité instantanée et un terme proportionnel au nombre total de photons de fluorescence émis par les molécules avant photoblanchiment. Les rapports $\gamma_{inst} = (I_{inst}/I_{inst,0})$ et $\gamma_{integ} = (I_{integ}/I_{integ,0})$, où l'indice "0" renvoie aux mesures faites sur la lame de verre, correspondent respectivement au facteur d'exaltation instantané (*i.e.*, le facteur calculé précédemment pour un fluorophore idéal de photostabilité infinie) et l'augmentation du nombre total de photons détectés. Les résultats de cette étude sont résumés dans le Tableau 4.2. Les incertitudes correspondent aux marges de confiance du fit exponentiel.

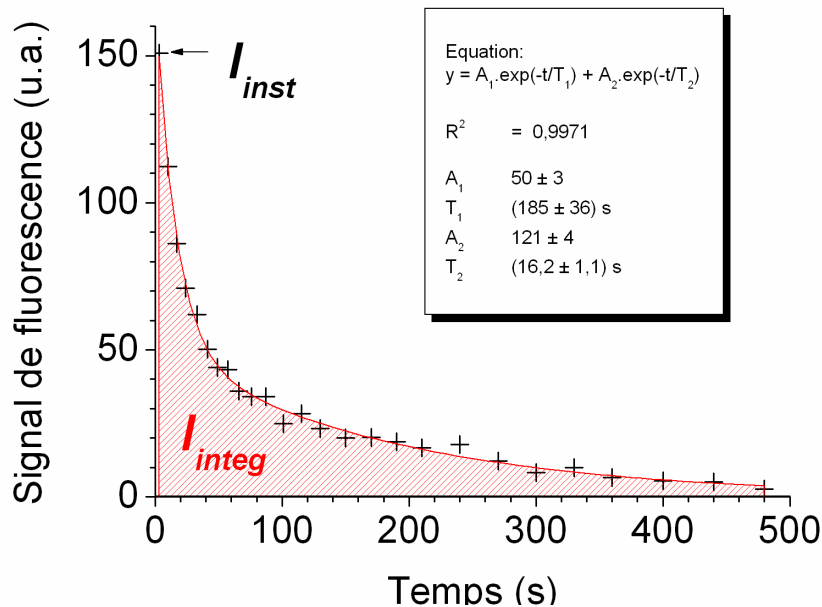


FIG. 4.15: Effet du photoblanchiment sur l'émission de fluorescence. Variation de l'intensité du signal de fluorescence au cours du temps, mesurée pour un film de colorant (Rhodamine B) déposé sur une lame de verre, sous excitation laser continue ($\lambda_{exc} = 532$ nm, incidence normale). Mesures expérimentales (+) et fonction biexponentielle (—). I_{inst} : intensité du signal à $t = 0$. I_{integ} : aire sous la courbe. *u.a.* : unités arbitraires.

Pour un flux de photons incidents identique (*i.e.*, une même puissance laser), la durée moyenne de photostabilité des fluorophores est plus courte sur le substrat métallique que sur la lame de verre (*e.g.*, à $\theta_{exc} = 0^\circ$, $\mathcal{T}_0 = 66 \pm 14$ s et $\mathcal{T} = 31,5 \pm 2,0$ s). On observe, sous excitation en incidence normale ($\theta_{exc} = 0^\circ$), une exaltation d'un facteur $\gamma_{inst} \sim 20$ et une durée de photostabilité deux fois plus petite ($\mathcal{T}/\mathcal{T}_0 \sim 0,5$). Dans cette configuration, le nombre de photons détectés avant photodestruction du fluorophore est environ dix fois plus grand que sur une lame standard ($\gamma_{integ} \sim 10$).

Il est possible, en remplaçant la lame de verre par un substrat métallisé, d'obtenir un signal de fluorescence de même intensité, tout en diminuant par ~ 20 la puissance d'excitation et en multipliant par ~ 10 la durée moyenne de photostabilité du colorant. Ceci est d'un grand intérêt, notamment pour les applications biomédicales où l'utilisation d'un produit *anti-fading* était jusqu'ici nécessaire pour lire un grand nombre de fois une lame.

θ_{exc}	\mathcal{T}_0 (s)	\mathcal{T} (s)	γ_{inst}	γ_{integ}
0°	66 ± 14	$31,5 \pm 2,0$	$20,6 \pm 1,4$	$9,9 \pm 2,9$
45°	$44,6 \pm 7,2$	$30,2 \pm 2,2$	$21,4 \pm 1,8$	$14,5 \pm 3,9$

TAB. 4.2: Mesure expérimentale de la photostabilité des fluorophores.

4.3.3 Influence de la configuration d'excitation

Le Tableau 4.2 montre qu'un facteur γ_{integ} encore plus grand ($\gamma_{integ} \sim 15$) est obtenu lorsque que l'excitation est en incidence oblique (*e.g.*, $\theta_{exc} = 45^\circ$). Un des éléments pouvant expliquer cette différence est que l'incidence oblique est plus favorable à l'excitation des dipôles orthogonaux que l'incidence normale. Les molécules dont le dipôle d'excitation/émission est orienté perpendiculairement à la surface se couplent plus efficacement aux plasmons de surface que celles dont le dipôle est parallèle. Les durées de vie de fluorescence de ces molécules sont donc théoriquement plus courtes, et le nombre de cycles d'absorption/émission effectués avant photodestruction plus élevé. Toutefois, si le couplage aux plasmons de surface favorise la photostabilisation des fluorophores, il est également source de pertes d'énergie (transfert d'énergie non-radiatif au substrat) et limite ainsi l'efficacité de détection des fluorophores (voir § 4.1.2, p.105). Une baisse de durée de vie n'est donc pas systématiquement associée à une augmentation du nombre de photons émis avant photodestruction : seule l'amplification des processus radiatifs permet d'accroître ce nombre.

Dans la présente étude, nous avons considéré que le nombre moyen de photons émis par la molécule avant photodestruction est indépendant de la puissance d'excitation.

Les mesures ont donc été réalisées à une puissance d'excitation donnée. Cependant, la réactivité de la molécule excitée dépend également de la température (Galvan-Gonzalez 1999). Des effets thermiques, liés à la durée et à l'intensité de l'excitation, peuvent donc induire une modification de la photostabilité des fluorophores. Par conséquent, une étude en fonction de la puissance d'excitation est nécessaire pour pouvoir généraliser les observations faites.

4.4 Modification des couplages intermoléculaires

4.4.1 Auto-extinction de la photoluminescence

La baisse de l'intensité du signal, lorsque la densité de fluorophores augmente, est couramment observée en spectroscopie de fluorescence. Ce phénomène, nommé *auto-extinction de la photoluminescence* (ou *self-quenching*), est dû au transfert d'énergie incohérent entre des molécules distribuées aléatoirement (Knoester 1987). L'auto-extinction intervient dans un système de molécules photoluminescentes identiques, lorsque deux molécules proches l'une de l'autre agissent comme un piège pour l'énergie d'excitation (Beddard 1976, Penzkofer 1986). Pour une distribution bidimensionnelle aléatoire de molécules (*e.g.*, un film de fluorophores évaporé sur un substrat plan), le taux de transfert d'énergie non-radiatif est inversement proportionnel à la puissance quatre de la distance intermoléculaire. Un modèle simple pour décrire l'auto-extinction, en fonction de la densité moléculaire, est de supposer que deux molécules forment un piège d'énergie d'excitation lorsque la distance les séparant est inférieure à un rayon critique R_s . Cette vision extrêmement simplifiée permet néanmoins de prévoir les modifications des propriétés optiques d'une distribution aléatoire de molécules photoluminescentes, induites par la formation de dimères ou d'excimères de ces molécules. En particulier, de fortes baisses du rendement quantique sont prévues lorsque la distance intermoléculaire est inférieure à R_s (Knoester 1987).

Il est possible de limiter cette baisse de signal, en modifiant l'environnement électromagnétique des molécules. En effet, la réduction de la durée de vie de l'état excité, induite par la présence d'une surface métallique, permet de favoriser la relaxation des molécules par couplage aux modes électromagnétiques (photons, plasmons de surface), et de réduire les effets de l'auto-extinction (Philpott 1975).

Nous avons étudié la fluorescence de films de colorants (Fuchsine basique et Cyanine 3) de différentes densités, déposés sur une lame de verre et un substrat métallisé, et comparé les facteurs d'exaltation de fluorescence (mesurés à la distance optimale $d_1 \sim 60$ nm). Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 4.16a.

Pour les deux colorants étudiés, on observe une hausse du facteur d'exaltation lorsque la densité surfacique ρ_S de fluorophores augmente et la distance intermoléculaire moyenne $\bar{r} \sim (\rho_S)^{-1/2}$ diminue. Pour la Cyanine 3, on mesure une exaltation d'un facteur ~ 19 pour $\rho_S = 2,1 \cdot 10^{-4}$ MC ($\bar{r} \sim 70$ nm) et ~ 35 pour $\rho_S = 0,12$ MC ($\bar{r} \sim 3$ nm). Ce phénomène est lié à la variation du rendement quantique des fluorophores. La

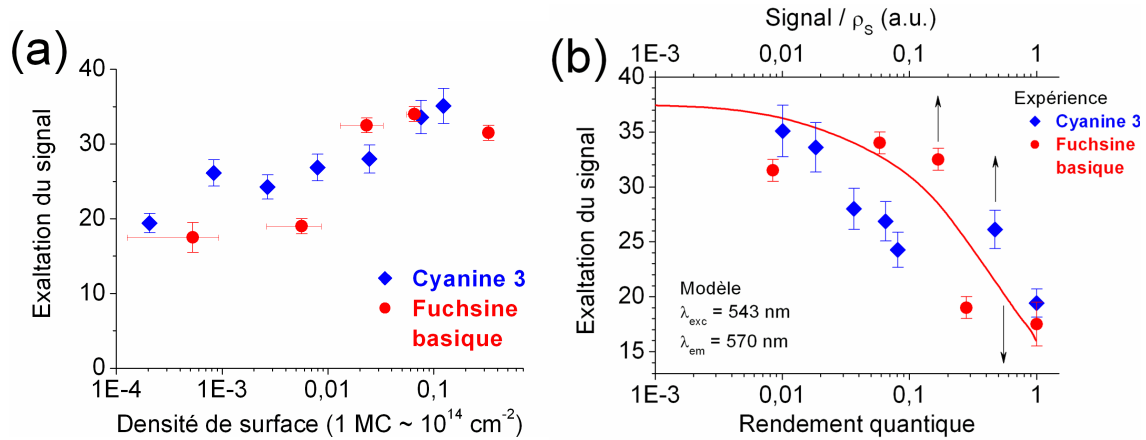


FIG. 4.16: Auto-extinction des fluorophores. (a) Facteur d'exaltation de fluorescence d'un film de colorant (Cyanine 3 et Fuchsine basique) déposé sur un substrat métallisé (Ag 50 nm + Al_2O_3 60 nm) pour différentes densités surfaciques de fluorophores. Les densités surfaciques sont déterminées par mesure optique de l'extinction, et sont ici exprimées en monocouches (MC) en supposant $1 \text{ MC} = 10^{14} \text{ cm}^{-2}$. (b) Facteur d'exaltation de fluorescence théorique, calculé pour un fluorophore ($\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{flu} = 570 \text{ nm}$) séparé d'un substrat d'argent par une couche d'alumine d'épaisseur optimale ($d_1 \sim 60 \text{ nm}$), en fonction du rendement quantique initial. Les données expérimentales de la Figure 4.16b sont représentées en fonction du rendement quantique évalué comme le rapport du signal de référence (fluorescence sur le verre) sur la densité surfacique de molécules ($Signal/\rho_S$).

formation de pièges de l'énergie d'excitation, par interaction entre les molécules, limite les possibilités de couplage aux modes électromagnétiques et réduit ainsi leur rendement quantique. Étant donné la distribution statistique de distances intermoléculaires, un faible nombre de molécules est impliqué dans la formation de pièges (Knoester 1987), et la baisse du signal détecté traduit la variation du "rendement quantique moyen".

La Figure 4.16b présente la variation du facteur d'exaltation en fonction du rendement quantique des fluorophores, calculée avec le modèle dipolaire pour la Cyanine 3. Plus le rendement quantique initial Q_0 est bas, plus l'exaltation peut être importante. La comparaison des facteurs d'exaltation expérimentaux (Fig. 4.16a) et de la variation théorique du facteur d'exaltation en fonction du rendement quantique (Fig. 4.16b) permet d'évaluer le rendement quantique moyen des fluorophores en fonction de la densité du dépôt de colorant. D'après le modèle, le film de Cyanine 3 le plus dense ($\rho_S = 0,12 \text{ MC}$) correspondrait à une valeur de Q_0 comprise entre 0,01 et 0,1 tandis que le film le moins dense ($\rho_S = 2,1 \cdot 10^{-4} \text{ MC}$) correspondrait à une valeur de Q_0 proche de 0,5.

Cette méthode indirecte est peu précise. Afin de vérifier ces estimations, nous avons évalué expérimentalement la variation relative du rendement quantique des fluorophores. Pour cela, le signal de fluorescence est mesuré sur le verre puis divisé par la densité surfacique de fluorophores. A un facteur multiplicatif près, ce rapport est égal au rendement quantique moyen des fluorophores. Les résultats sont comparés au modèle, dans la Figure 4.16b. Des variations comparables sont constatées, avec toutefois

des différences relatives de $\pm 25\%$ entre le modèle et l'expérience.

Nous avons vu précédemment que les réductions de durée de vie peuvent modifier le seuil de saturation des fluorophores, ce qui peut induire une hausse du signal de fluorescence. Afin de vérifier si la variation apparente du rendement quantique des fluorophores est ici lié au déplacement de leur seuil de saturation, nous avons mesuré le facteur d'exaltation de la fluorescence d'un dépôt de colorant (Fuchsine basique) de densité relativement élevée ($\rho_S = 0,33$ MC soit $\bar{r} \sim 2$ nm), en fonction de la puissance d'illumination (de 0,03 mW et 2 mW). Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 4.17. Le facteur d'exaltation ($G = 32 \pm 3$) est constant (à 8% près) en fonction du flux de photons incident, et prend des valeurs aléatoirement distribuées autour de la valeur moyenne $G = 32$. Ces observations vérifient que les mesures sont réalisées dans le régime d'excitation linéaire des fluorophores (*i.e.*, loin du seuil de saturation). L'influence de la surface métallique sur l'auto-extinction n'est donc pas liée à la saturation des fluorophores, mais uniquement à la compétition entre les processus d'émission électromagnétique (par couplage aux modes photoniques et plasmoniques) et les processus intermoléculaires de transfert d'énergie incohérent.

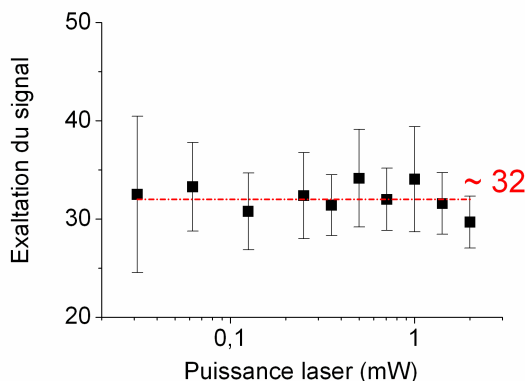


FIG. 4.17: Facteur d'exaltation de fluorescence d'un film de colorant (Fuchsine basique) de densité 0,33 MC déposé sur un substrat métallisé (*idem*) pour différentes puissances d'excitation (Source : laser Gre Ne à 543 nm, puissance comprise entre 0,03 mW et 2 mW).

On note que l'effet de l'auto-extinction, sur un substrat métallique, intervient pour des distances intermoléculaires moyennes \bar{r} de l'ordre de 10^{-7} m. Les interactions entre molécules, impliquées dans l'auto-extinction, sont généralement efficaces pour des distances intermoléculaires de l'ordre de 10^{-9} m. Toutefois, la distance \bar{r} est une moyenne et la distribution de distances intermoléculaires est large. En effet, la position des fluorophores sur la surface est aléatoire lorsque le dépôt est réalisé par évaporation thermique du colorant. D'autre part, l'efficacité globale des couplages intermoléculaires varie en $1/r^4$. Il est donc probable que l'augmentation moyenne du facteur d'exaltation, observée pour les dépôts de colorant de densité croissante, soit due à une faible proportion de fluorophores ayant un ou plusieurs très proches voisins, à des distances intermoléculaires de l'ordre du nanomètre. Il est difficile, dans ces conditions, d'étudier expérimentalement l'effet d'un substrat métallique sur les processus de l'auto-extinction entre deux

molécules. Par contre, nous pouvons conclure à un effet global de réduction apparente de l'auto-extinction, en présence du film d'argent plan.

4.4.2 Transfert résonant d'énergie de Förster

La présence d'une interface réfléchissante est susceptible de modifier les processus d'émission, quels que soient les modes électromagnétiques auxquels se couple la molécule excitée pour émettre. Nous avons étudié précédemment l'effet d'un substrat miroir sur l'émission par couplage aux modes photoniques (fluorescence) et aux plasmons de surface (transfert d'énergie au substrat). La modification de l'émission des fluorophores influence également les interactions résonantes telles que le transfert résonant d'énergie de Förster (FRET) (Agarwal 1998) (voir § 1.3.1.5, p.31).

4.4.2.1 Approche expérimentale

Nous avons étudié le FRET pour un couple de fluorophores moléculaires d'usage courant en biologie (Berney 2003, Jares-Erijman 2003) : Cyanine 3 (donneur) et Cyanine 5 (accepteur). Ces deux colorants ont été déposés sur un miroir d'argent (film continu plan) et séparés de l'interface réfléchissante par une couche d'alumine d'épaisseur contrôlée. Le substrat miroir forme ainsi une demi-cavité optique (Andrew 2000).

Le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur se recouvrent partiellement, et présentent respectivement un maximum aux longueurs d'onde $\lambda = 570$ nm et $\lambda = 649$ nm. Une source laser émettant à $\lambda = 488$ nm permet d'exciter efficacement le donneur tout en limitant l'excitation directe de l'accepteur. Les extinctions molaires du donneur et de l'accepteur à $\lambda = 488$ nm sont respectivement $3,6 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ et $4,0 \cdot 10^2 M^{-1}cm^{-1}$ (soit deux ordres de grandeur de différence). En pratique, on vérifie que le signal de fluorescence de l'accepteur en l'absence de donneur est négligeable.

Deux approches expérimentales différentes ont été suivies pour évaluer l'efficacité de FRET et l'influence du film métallique sur ce processus. Les résultats et la fiabilité de ces deux méthodes sont discutés. Nous n'avons pas étudié les durées de vie de fluorescence, car celles des fluorophores Cyanine 3 et Cyanine 5 sont trop courtes pour pouvoir mesurer avec précision leur variation pour toutes les distances au substrat. Dans un premier temps, nous avons examiné la variation relative de l'amplitude des pics d'émission du donneur (I_D) et de l'accepteur (I_A). I_A est proportionnel au taux d'excitation de l'accepteur (*i.e.*, le taux de FRET) Γ_{FRET} et à son rendement quantique apparent γ_A , lequel prend en compte le rendement d'émission du fluorophore ainsi que l'efficacité de détection de la fluorescence émise (voir § 4.1.3.3, p.110). Plus γ_A est élevé, plus l'énergie transférée est efficacement convertie en photons de fluorescence et détectée. Le rapport I_A/I_D dépend en outre du taux d'émission du donneur Γ_{DA} et de l'efficacité avec laquelle cette émission est détectée, en présence de l'accepteur,

$$\xi_{DA} = \xi_D(\Gamma_D/\Gamma_{DA}).$$

$$\frac{I_A}{I_D} \propto \frac{\gamma_A \Gamma_{FRET}}{\xi_D (\Gamma_{DA} - \Gamma_{FRET})} \quad (4.1)$$

Le rapport I_A/I_D ne donne donc pas directement l'efficacité de FRET η_{FRET} , définie comme le rapport $\Gamma_{FRET}/\Gamma_{DA}$, mais renseigne sur la modification apparente du FRET.

4.4.2.2 Modification apparente du FRET

La Figure 4.18a présente les spectres de fluorescence du film de colorants Cyanine 3/Cyanine 5, sous excitation à $\lambda = 488$ nm, sur une lame de verre (*Ref.*) et le substrat miroir. Les spectres ont été mesurés dans les mêmes conditions d'excitation et de détection, de telle sorte qu'ils puissent être comparés entre eux (notez que le spectre mesuré sur le verre est multiplié par un facteur 10 pour faciliter la lecture de la figure). Les intensités de fluorescence I_A et I_D et le rapport I_A/I_D sont reportés dans les Figures 4.18b et 4.18c, en fonction de la distance au métal d .

L'examen de la Figure 4.18a révèle que le processus de FRET est modifié, en apparence, par la présence du film d'argent, et que cette influence dépend de la distance au métal. Pour certaines distances (*e.g.*, à $d = 160$ nm et $d = 300$ nm) seul le pic d'émission de l'accepteur est visible dans le spectre de fluorescence.

Le taux de FRET ne dépend pas uniquement du taux d'émission du donneur, mais également du recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. Comme nous l'avons vu précédemment (voir Eq. 2.13, p.82), le modèle de l'oscillateur dipolaire forcé prévoit des déplacements de la fréquence d'oscillation en fonction du champ local. Le taux de FRET est donc susceptible d'être modifié par ce déplacement. D'autre part, on observe sur la Figure 4.18a des changements dans le spectre d'émission de l'accepteur mesuré expérimentalement. On constate un déplacement spectral du pic d'émission de +20 nm vers le rouge à $d = 160$ nm, par rapport à son émission sur le verre (*Ref.*). Cette observation ne peut pas être simplement expliquée par l'interaction des fluorophores avec leur image dans le miroir, car la théorie dipolaire prévoit un tel déplacement de l'émission lorsque cette interaction est constructive, ce qui n'est pas le cas à $d = 160$ nm. L'hypothèse la plus probable est que cette modification apparente soit liée à la variation du rendement quantique apparent des fluorophores, qui dépend à la fois de la distance au miroir et de la longueur d'onde. En effet, la distribution angulaire de l'émission et, par conséquent, l'efficacité de collection sont différentes pour chacune des composantes spectrales de l'émission.

Comme le montre la Figure 4.18b, le signal de fluorescence du donneur présente deux maxima d'exaltation aux distances $d_1 = 50$ nm et $d_2 = 220$ nm. Ces positions sont proches des maxima de l'amplification théorique du signal ($d_1^{th} = 50$ nm et $d_2^{th} = 205$ nm) prévus par le modèle pour la Cyanine 3 à $\lambda_{exc} = 488$ nm et $\lambda_{flu} = 570$ nm. Pour le signal de fluorescence de l'accepteur, on observe deux maxima principaux à $d_1 \sim 65$ nm et $d_2 \sim 225$ nm, et deux maxima secondaires à $d'_1 \sim 160$ nm et $d'_2 \gtrsim 300$ nm. La variation du rapport d'intensité I_A/I_D , observée dans la Figure 4.18c, n'est

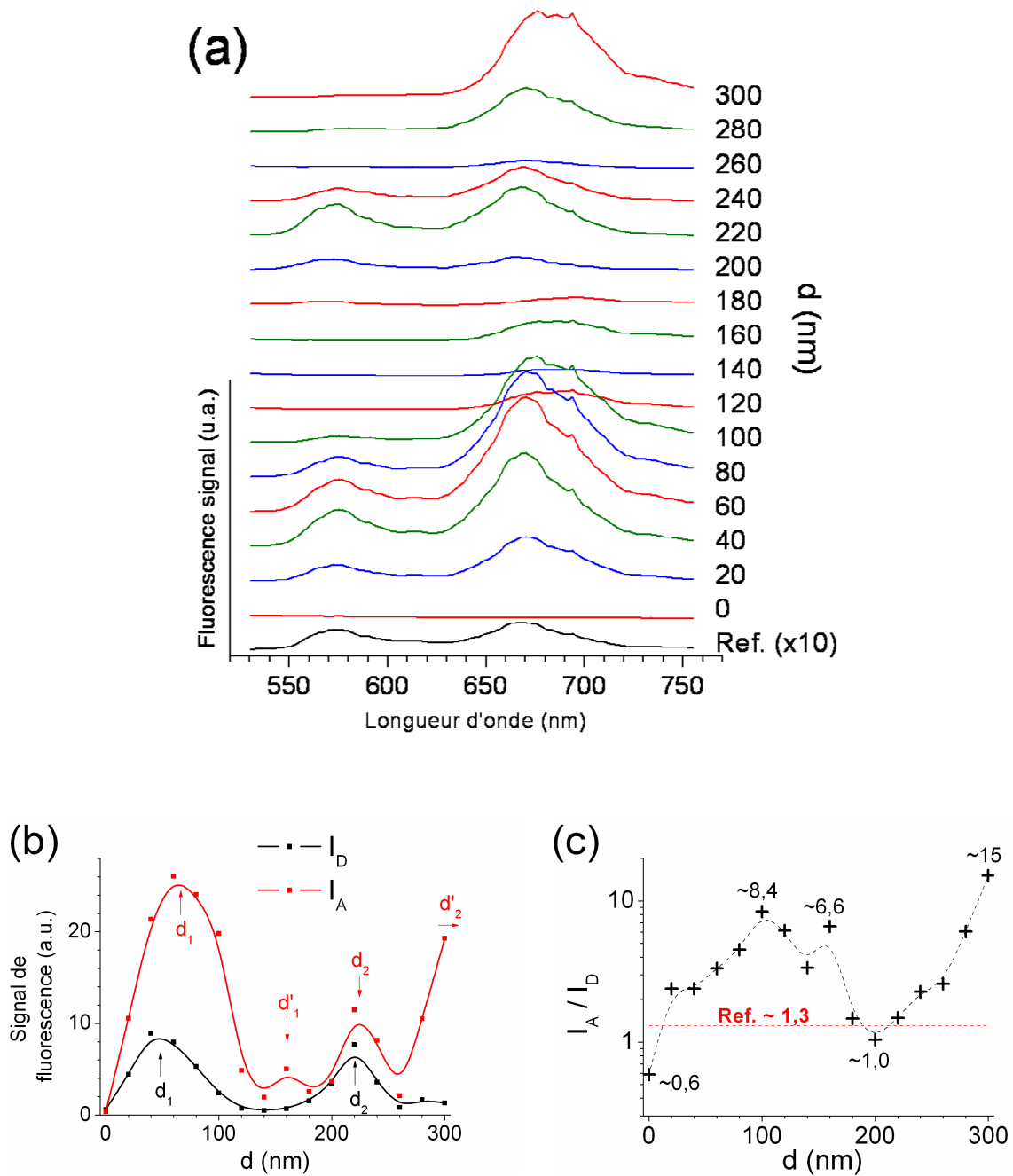


FIG. 4.18: (a) Spectres de fluorescence d'un film de colorants (Cyanine 3 + Cyanine 5) déposé sur une lame de verre (*Ref.*) et sur un miroir d'argent couvert d'une couche d'alumine de différentes d'épaisseurs d (de 0 à 300 nm par pas de 20 nm), sous excitation laser à $\lambda \sim 488$ nm. (b) Intensité des pics d'émission de la Cyanine 5 (I_A) et de la Cyanine 3 (I_D). (c) Rapport d'intensité I_A/I_D . *u.a.* : unités arbitraires.

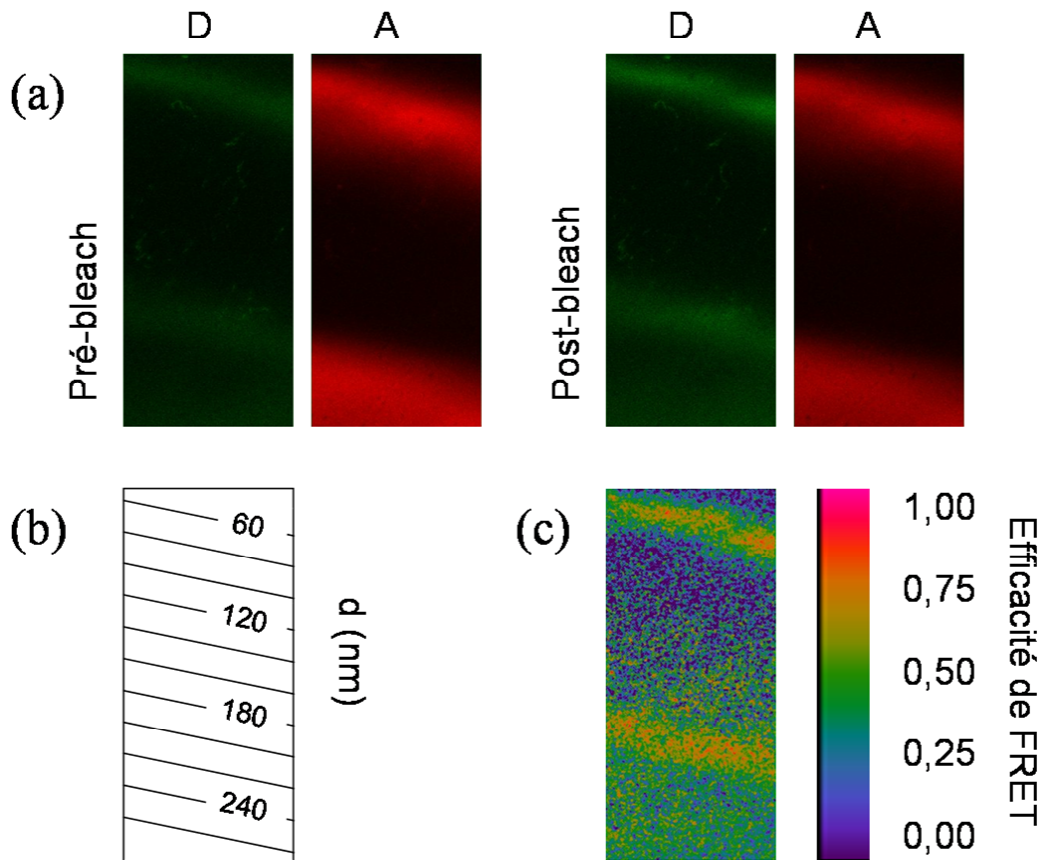


FIG. 4.19: Mesure expérimentale de l'efficacité de FRET. (a) Images de fluorescence d'un film de colorants (Cyanine 3 + Cyanine 5) déposé sur un miroir d'argent couvert d'une couche d'alumine. Émission du donneur Cyanine 3 excité à $\lambda = 488$ nm (image verte) et de l'accepteur Cyanine 5 excité à $\lambda = 633$ nm (image rouge) avant et après photoblanchiment partiel de l'accepteur (*pré-* et *post-bleach*) (b) Cartographie du gradient d'épaisseur de la couche d'alumine. (c) Image de l'efficacité de FRET.

pas en accord avec celle du taux d'émission du donneur calculée avec le modèle de l'oscillateur dipolaire. On mesure expérimentalement une valeur maximale de I_A/I_D pour $d = 100$ nm, alors que théoriquement, pour une orientation dipolaire parallèle, Γ_D est maximal à $d_1^{th} \sim 65$ nm et $d_2^{th} \sim 225$ nm.

Le rapport d'intensité I_A/I_D (Fig. 4.18c) permet de décrire globalement la modification apparente du FRET, mais il ne donne pas directement accès à l'information sur la variation de l'efficacité de FRET, notamment parce que ce rapport dépend d'autres grandeurs (γ_A et ξ_D) qui varient en fonction de la distance d .

4.4.2.3 Retour de fluorescence après photoblanchiment de l'accepteur

Une seconde approche expérimentale, pour l'étude du FRET, consiste à mesurer le retour de la fluorescence du donneur après photoblanchiment de l'accepteur. La méthode consiste à éclairer (sans exciter directement l'accepteur) une zone de l'échantillon avec une puissance suffisamment élevée et durant une période suffisamment longue pour photodétruire une partie significative des fluorophores, puis à comparer les changements d'intensité de fluorescence du donneur et de l'accepteur induits par cette action. Plus le FRET est efficace, plus le taux d'excitation de l'accepteur est élevé et sa durée de photostabilité est courte. Au fur et à mesure de la photodestruction des accepteurs, la densité d'accepteurs autour de chaque donneur diminue et le rendement de FRET baisse. Cela se traduit par une hausse du signal de fluorescence du donneur. L'efficacité de FRET est évaluée en calculant le rapport $(I_D^{post} - I_D^{pre})/I_D^{post}$ où I_D^{pre} et I_D^{post} sont les intensités de fluorescence du donneur mesurées avant et après la photodestruction partielle des accepteurs. Lorsque la proportion d'accepteurs photodétruits tend vers 1, ce rapport d'intensité tend théoriquement vers η_{FRET} . Par cette approche, la mesure de l'efficacité de FRET est indépendante de γ_A , puisque l'on ne mesure pas la fluorescence de l'accepteur. Les résultats de cette étude sont présentés en Figure 4.19.

La fluorescence (Fig. 4.19a) est détectée aux longueurs d'onde d'émission du donneur (image verte) et de l'accepteur (image rouge), avant (*pré-bleach*) et après (*post-bleach*) la phase d'illumination à forte puissance. Le film de colorant (Cyanine 3 : 0,05 MC + Cyanine 5 : 0,05 MC) est séparé de la surface métallique par une couche d'alumine dont l'épaisseur varie de 40 nm à 280 nm, du coin droit en haut vers le coin gauche en bas de l'image de fluorescence (voir Fig. 4.19b). La cartographie de l'efficacité de FRET (Fig. 4.19c) est réalisée en calculant $(I_D^{post} - I_D^{pre})/I_D^{post}$.

Sur le verre, on mesure (pour cette densité de fluorophores) $\eta_{FRET,0} \sim 0,23$. Sur le miroir d'argent, η_{FRET} varie en fonction de la distance à la surface métallique. On observe deux maxima, à $d_1 \sim 60$ nm et $d_2 \sim 200$ nm, où $\eta_{FRET,max} \sim 0,75$, et un minimum local à $d \sim 90$ nm où $\eta_{FRET,min} \sim 0,13$.

4.4.2.4 Bilan

Les variations de l'efficacité de FRET mesurées par cette seconde méthode ne sont pas en accord avec les modifications apparentes observées par la première méthode. Par

exemple, le second maximum de η_{FRET} (à $d_2 \sim 200$ nm) correspond à un minimum du rapport I_A/I_D . D'autre part, les maxima de η_{FRET} ne coïncident pas avec les maxima du taux d'émission du donneur. Cette observation tend à montrer que cette seconde approche ne fournit pas directement la variation de l'efficacité de FRET. Une raison probable de cette erreur est liée au fait que cette seconde méthode est, à l'origine, développée pour des applications biologiques, dans lesquelles donneurs et accepteurs sont localisés en des zones bien définies de l'échantillon, et non distribués sur l'ensemble du substrat. Étant donnée la large distribution de distances donneur-accepteur, l'excitation prolongée des donneurs provoquent la photodestruction des accepteurs les plus proches et, de fait, modifie cette distribution. Plus les donneurs sont excités et les proches accepteurs photodétruits, plus la distance moyenne donneur-accepteur après illumination est augmentée. Par conséquent, les régions de l'échantillon où la hausse du signal des donneurs est la plus importante correspondent aux régions où les donneurs sont les plus excités, *i.e.*, là où l'épaisseur de la couche d'alumine est telle que les fluorophores sont dans un ventre de champ d'excitation (d'après le modèle, $d_1^{th} = 50$ nm et $d_2^{th} = 195$ nm à $\lambda_{exc} = 488$ nm). On trouve effectivement les maxima de η_{FRET} proches des positions optimales d'excitation du donneur prévues par le modèle.

Aucune des deux approches ne permet donc d'accéder directement au taux de FRET entre le donneur et l'accepteur. La première méthode permet toutefois de caractériser l'amplification apparente du FRET. Cette approche est intéressante pour une application biophysique. Elle n'est cependant pas suffisante pour comprendre l'influence d'une surface métallique sur le processus de FRET. Cette influence est certainement complexe, puisque la présence du film d'argent modifie non seulement les durées de vie des donneurs, mais également les rendements quantiques des deux fluorophores, ainsi que leurs spectres d'émission.

4.5 Conclusion du Chapitre 4

On peut identifier trois mécanismes contribuant à l'exaltation du signal de fluorescence détecté en présence d'un substrat métallique plan : (i) l'exaltation à l'excitation qui, par l'interférence constructive des champs incident et réfléchi, accroît le taux d'excitation des fluorophores ; (ii) l'exaltation à l'émission, résultat de l'interaction entre le dipôle d'émission et son image dans le miroir, qui élève le taux d'émission radiative ; (iii) la redirection de la lumière émise vers le demi-espace supérieur qui apporte un gain d'efficacité de collection. Nous avons montré que la distance séparant le fluorophore de la surface miroir et l'orientation relative du dipôle d'émission sont deux paramètres cruciaux pour ces trois mécanismes. Nous avons mesuré expérimentalement une exaltation du signal de fluorescence d'un facteur 20 à 30 (pour un fluorophore standard type Cyanine), en présence d'un substrat métallique plan.

En outre, la présence d'un substrat métallique plan influe également sur la photostabilité du fluorophore, ceci est une conséquence de la modification de la durée de vie de l'état excité. L'étude expérimentale de ce phénomène, également sensible à la dis-

tance de séparation et à l'orientation du dipôle d'émission, révèle une baisse apparente du rendement de photoblanchiment d'un facteur ~ 10 .

L'utilisation d'un substrat métallisé permet de modifier, dans une certaine mesure, les interactions entre fluorophores, ou leurs effets apparents. Il est intéressant de pouvoir les réduire lorsque ceux-ci sont à l'origine de l'atténuation (ou de l'extinction totale) du signal de fluorescence (*e.g.*, pour l'auto-extinction de la photoluminescence) ou, au contraire, de les amplifier lorsque la détection est justement basée sur l'interaction entre les molécules (*e.g.*, pour le FRET). En apparence, on raccourcit ou on allonge la portée de l'interaction. Dans le cas du FRET, le couplage au plasmon de surface peut jouer le rôle déterminant de médiateur de l'interaction, en propageant l'énergie sur des distances grandes devant le rayon de Förster, sans émission de photon. Malgré les récentes découvertes réalisées dans le domaine de la *plasmonique* (Ditlbacher 2002b), le potentiel de l'utilisation des plasmons de surface comme vecteur du couplage intermoléculaire est encore largement sous-exploité.

De nouvelles études (notamment des mesures résolues en temps avec des fluorophores aux durées de vie plus longues) sont nécessaires à la compréhension des processus de couplage intermoléculaire en présence d'une surface métallique. Il reste à concevoir un modèle théorique pour calculer le taux de FRET en présence d'un film métallique.

Dans la section du Chapitre 4 qui est consacrée à l'amplification du signal de fluorescence (§ 4.1, p.104), nous avons traité les films métalliques plans comme de simples miroirs. Cependant, nous avons vu dans le Chapitre 1 que le champ proche d'un émetteur dipolaire peut se coupler aux plasmons de surface et transférer une partie de son énergie à ces modes non-radiatifs (voir § 1.3.1.3, p.28). Dans le Chapitre 5, nous montrons comment tirer profit de ce couplage en convertissant en photons l'énergie donnée aux plasmons de surface. Le contrôle de la rugosité de surface permet en effet de maîtriser la diffusion des plasmons de surface hors du plan du film métallique, et d'accroître encore davantage l'émission de fluorescence.

Chapitre 5

Effet plasmonique sur un film métallique nanorugueux

Lorsqu'elle est placée près d'un substrat métallique, à une distance petite devant la longueur d'onde d'émission, une molécule excitée transfère une partie significative de son énergie au substrat, sans émettre de photon. Ce processus non-radiatif est lié au couplage du champ proche de la molécule avec les plasmons de surface et est, *a priori*, défavorable à la détection de la molécule, en raison de la nature non-radiative des plasmons de surface (voir § 1.3.1.3, p.28). La proportion d'énergie transmise au substrat peut être modifiée en changeant la position et l'orientation relative de la molécule mais, si le substrat métallique est parfaitement plan, cette énergie est invariablement dissipée sous forme de chaleur dans le métal.

La maîtrise de la conversion radiative des plasmons de surface est donc un enjeu majeur de l'exaltation de fluorescence. Cela implique notamment de pouvoir contrôler les processus de diffusion des plasmons de surface hors du plan du substrat, ce qui peut être accompli en rendant rugueuse la surface métallique à l'échelle nanométrique. Les composantes de Bragg, associées aux fréquences spatiales de la surface métallique, peuvent s'ajouter au vecteur d'onde du plasmon de surface, pour réaliser l'accord de phase avec les vecteurs d'onde des modes photoniques.

Dans la première section du Chapitre 5, nous présentons l'élaboration de films d'argent nanorugueux (§ 5.1.1, p.138). La topographie des films nanorugueux a été mesurée par microscopie à force atomique (AFM), et leur rugosité a été caractérisée par analyse de ces images (§ 5.1.2, p.138). Dans la seconde section du Chapitre 5, nous examinons le rôle joué par la rugosité de surface dans l'interaction entre des fluorophores et un film métallique nanorugueux. Le lien entre morphologie de surface et propriétés optiques (§ 5.2.1, p.143), ainsi que l'influence de la distance séparant les fluorophores de la surface du métal (§ 5.2.2, p.144), sont étudiés expérimentalement.

5.1 Élaboration et caractérisation des films nanorugueux

5.1.1 Structuration du film métallique

La rugosité d'un film métallique déposé sur une lame de verre peut être maîtrisée en contrôlant les paramètres expérimentaux du dépôt, notamment le flux atomique et la température du substrat durant le dépôt. Le flux atomique a une influence sur le nombre de sites de germination formés sur la surface. Toutefois, la gamme de morphologies différentes accessibles en faisant varier ce paramètre est relativement restreinte. L'élévation de la température du substrat permet d'activer la coalescence des nanoparticules, et d'accroître la rugosité du film. Cependant, elle repousse le seuil de percolation, ce qui rend plus difficile la formation d'un film continu. Il est donc nécessaire de procéder en deux étapes pour contrôler la rugosité des films métalliques et le taux de couverture du métal sur le substrat.

Nous avons développé une méthode qui consiste à superposer deux films métalliques. Un premier dépôt est réalisé sur un substrat chauffé, afin de former un film d'îlots de métal. Puis un second dépôt est réalisé, après que le substrat a été refroidi à température ambiante, pour recouvrir les îlots d'un film métallique continu. Le film nanorugueux ainsi formé présente des variations topographiques dont l'amplitude est proche de la taille des îlots, mais présente un taux de couverture plus grand. Cette méthode permet d'obtenir un film quasi-continu d'une rugosité grande devant celle pouvant être obtenue par la formation d'un film métallique en une seule étape.

5.1.2 Étude topographique des films nanostructurés

Nous avons étudié, par microscopie de force atomique (AFM), la topographie de surface d'une lame de verre couverte de films d'argent formés sous différentes conditions expérimentales : dépôt sur substrat chauffé ($T_{ech} = 300^\circ\text{C}$, épaisseur nominale $e_{Ag} = 20, 40$ et 60 nm); dépôt à température ambiante ($T_{ech} = T_{amb}$, $e_{Ag} = 60$ nm); dépôt en deux étapes ($e_{Ag} = 20, 40$ et 60 nm à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$, puis $e_{Ag} = 60$ nm à $T_{ech} = T_{amb}$). La Figure 5.1a (p.140) résume la méthode d'élaboration des films nanorugueux. Les sept types de films métalliques, ainsi que la zone référence de verre nu, sont réalisés sur une seule et unique lame de verre, en découvrant graduellement la surface de la lame durant le dépôt à l'aide de caches (voir § 2.1.1.5, p.57). Cette façon de procéder assure une grande reproductibilité des mesures. Les Figures 5.1b-f sont les images AFM obtenues dans les zones de l'échantillon définies dans le schéma de la Figure 5.1a.

5.1.2.1 Paramètres de rugosité

Le Tableau 5.1 présente les paramètres de rugosité, calculés à partir des images AFM suivant une méthode décrite dans le Chapitre 2 (voir § 2.1.2.2, p.59). Rappelons

que R_q et R_{p-v} sont respectivement la moyenne quadratique et l'amplitude pic-à-pic de la déviation du profil de la surface. σ est la période spatiale caractéristique de cette déviation, obtenue par analyse spectrale des images AFM. Les paramètres R_q et σ permettent de caractériser la rugosité de surface dans l'espace direct (R_q) et l'espace de Fourier (σ). Ils renseignent notamment sur les composantes spectrales et spatiales de la lumière qui pourront se coupler fortement aux plasmons de surface du film nanorugueux. Le paramètre R_{p-v} est donné ici à titre indicatif, mais n'apporte pas d'information supplémentaire sur les propriétés optiques de la surface métallique.

Ref. Fig. 5.1	Dépôt d'argent		Rugosité		
	$T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ (nm)	$T_{ech} = T_{amb}$ (nm)	R_q (nm)	R_{p-v} (nm)	σ (nm)
(b)	20	0	5,5	46	55
(c)	40	0	12,5	90	93
(d)	60	0	16	110	110
(e)	0	60	3,5	27	47
(f)	20	60	6,5	49	59
(g)	40	60	11,5	80	85
(h)	60	60	16	118	110

TAB. 5.1: Paramètres de rugosité de films d'argent réalisés, sur une lame de verre, en deux étapes (dépôt à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ puis dépôt à $T_{ech} = T_{amb}$), en fonction de la quantité de métal déposée à chacune des deux étapes.

L'examen de la topographie des films d'argent déposés à chaud (Fig. 5.1b-d) révèle une augmentation en taille verticale et latérale (notez les différences d'échelle verticale entre les images AFM) et en distance inter-îlots, avec la quantité de métal déposée. Cette évolution morphologique se traduit par une augmentation des deux paramètres de rugosité R_q et σ . Pour le film d'épaisseur 20 nm (Ref. Fig. 5.1b), on mesure $R_q = 5,5$ nm et $\sigma = 55$ nm. Pour le film d'épaisseur 60 nm (Ref. Fig. 5.1d), on mesure une rugosité de déviation quadratique 3 fois plus grande ($R_q = 16$ nm) et de période spatiale caractéristique 2 fois plus longue ($\sigma = 110$ nm).

La comparaison des images AFM (e-h) de la Figure 5.1 met en évidence une modification importante de la morphologie du film d'argent lorsque celui-ci est déposé sur des îlots d'argent (Fig. 5.1f-h) plutôt que directement sur la lame de verre (Fig. 5.1e). Cette modification est décrite en terme de variation relative des paramètres de rugosité R_q et σ , dans le Tableau 5.2 (p.141). Le dépôt préliminaire d'un film d'îlots d'argent d'épaisseur 60 nm permet de quadrupler la déviation quadratique ($R_q \times 4,6$) et de doubler la période spatiale caractéristique ($\sigma \times 2,3$) de la rugosité de surface. L'augmentation progressive de la rugosité du film nanorugueux, avec la quantité de métal préalablement déposé à chaud sur le substrat, démontre la possibilité de contrôler la rugosité par cette technique de dépôt en deux étapes.

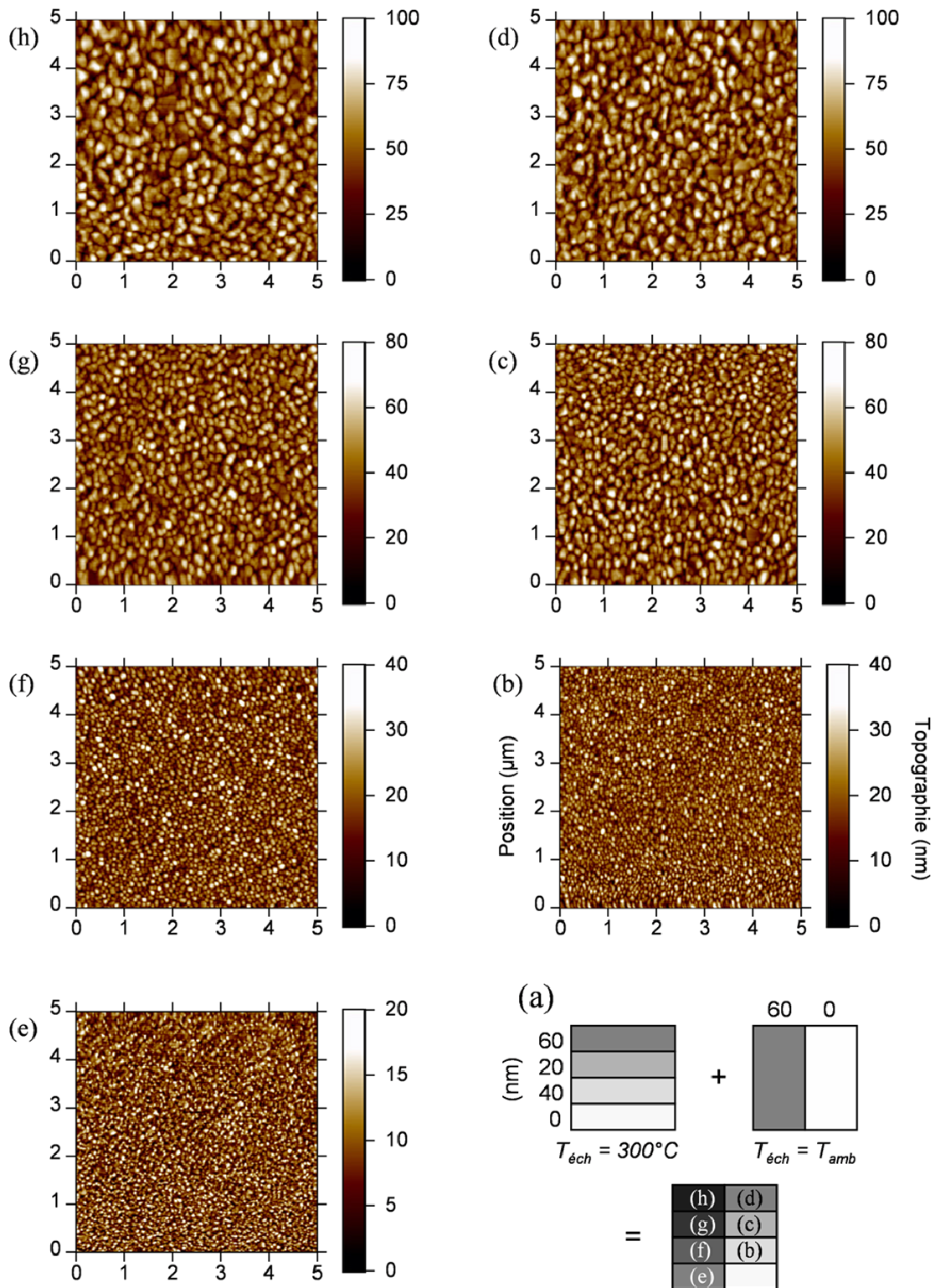


FIG. 5.1: Films d'argent nanorugueux formés sur une lame de verre. (a) Schéma de fabrication. (b-h) Topographie de surface (images AFM) sur une zone de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$.

D'après les images AFM, la topographie des films d'îlots d'argent formés à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$, avant (Fig. 5.1b-d) et après (Fig. 5.1f-h) dépôt de métal à $T_{ech} = T_{amb}$, est visiblement semblable. Cela est confirmé par la comparaison des paramètres de rugosité. Une fois le film d'îlots d'épaisseur 20 nm (Ref. Fig. 5.1b) recouvert de 60 nm d'argent (Ref. Fig. 5.1f), R_q et σ n'ont respectivement varié que de 18% et 7% ($R_q = 6,5$ nm et $\sigma = 59$ nm). Pour le film d'îlots d'épaisseur 60 nm (Ref. Fig. 5.1d), des paramètres R_q et σ identiques sont mesurés après recouvrement par 60 nm d'argent (Ref. Fig. 5.1h, $R_q = 16$ nm et $\sigma = 110$ nm). Dans ce dernier cas, cela ne permet pas d'affirmer que le film d'îlots (Ref. Fig. 5.1d) et le film nanorugueux (Ref. Fig. 5.1h) auront des propriétés optiques strictement similaires, puisque nous n'avons pas l'information sur la continuité du film. En effet, sur les images AFM, les films d'îlots métalliques ne peuvent pas être distingués des films continus, car cette technique d'imagerie n'est pas sensible à la nature du substrat et ne permet pas de reconnaître le verre ou le métal. Le taux de couverture Θ_{Ag} du métal sur le verre est évalué par une étude en microscopie électronique en transmission (TEM).

Ref. Fig. 5.1	Dépôt d'argent		Rugosité	
	$T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ (nm)	$T_{ech} = T_{amb}$ (nm)	R_q/R_q^{ref}	σ/σ^{ref}
(e)	0	60	1	1
(f)	20	60	1,9	1,3
(g)	40	60	3,3	1,8
(h)	60	60	4,6	2,3

TAB. 5.2: Variation relative des paramètres de rugosité des films d'argent nanorugueux formés par dépôt d'un film continu sur un film d'îlots métalliques, en fonction de l'épaisseur nominale du film d'îlots, par rapport aux paramètres d'un film d'argent directement déposé sur une lame de verre à la température ambiante.

Nous avons réalisé, sur des grilles de microscopie couvertes d'une sous-couche d'alumine, des films d'argent dans les mêmes conditions expérimentales que pour l'étude en AFM. L'analyse des clichés de TEM confirme qu'un film d'argent d'épaisseur 60 nm, formé à $T_{ech} = T_{amb}$, est parfaitement continu ($\Theta_{Ag} = 1$). Lorsqu'il est formé à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$, le dépôt présente une morphologie de film d'îlots en-dessous du seuil de percolation ($\Theta_{Ag} = 0,82$). Une fois recouvert de 60 nm d'argent déposés à $T_{ech} = T_{amb}$, la continuité du film d'îlots est modifiée. Le taux de couverture est augmenté ($\Theta_{Ag} = 0,94$) et le film est totalement percolé (voir Fig. 5.2).

Les similitudes observées dans les images AFM et les paramètres de rugosité, et la variation du taux de couverture observée en TEM après recouvrement des films d'îlots d'argent, montrent que la méthode de formation des films nanorugueux en deux étapes permet de contrôler de manière relativement indépendante la rugosité et la continuité des films.

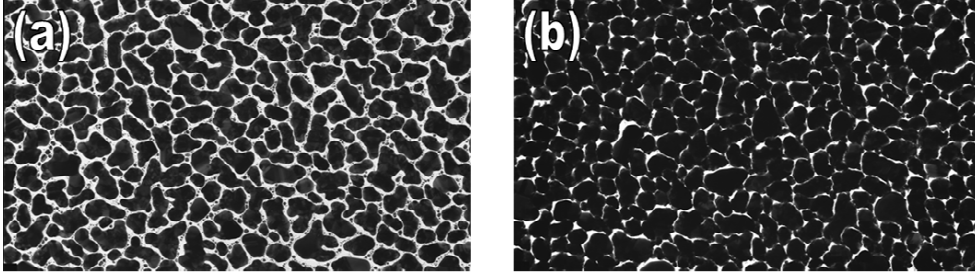


FIG. 5.2: Images TEM (grossissement $\times 160000$) de films métalliques réalisés par dépôt de 60 nm d'argent à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ (a), et par dépôts successifs de 60 nm d'argent à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ et de 60 nm d'argent à $T_{ech} = T_{amb}$ (b). Stade de croissance : (a) film d'îlots ; (b) film percolé. Taux de couverture : (a) $\Theta_{Ag} = 0,82$; (b) $\Theta_{Ag} = 0,94$.

5.1.2.2 Distribution de fréquences spatiales

La distribution de fréquences spatiales, ou "spectre de k ", renseigne sur les possibilités de couplage entre la lumière et les plasmons de surface, permises par la rugosité de la surface métallique. Les vecteurs de Bragg, associés à la périodicité de la surface, peuvent en effet permettre l'accord de phase entre les vecteurs d'ondes de la lumière et des plasmons de surface. Cette condition est nécessaire à l'excitation cohérente des plasmons de surface par la lumière, et à la diffusion des plasmons hors du plan de la surface.

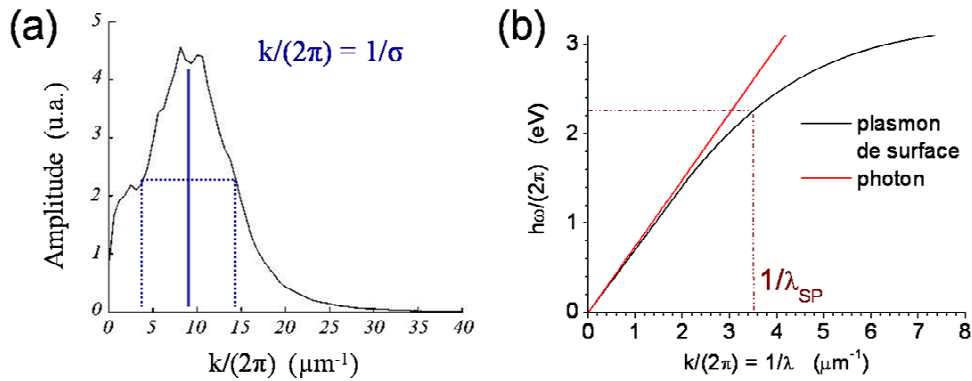


FIG. 5.3: (a) : Distribution de fréquences spatiales de la surface d'un film d'argent nanorugueux. La fréquence spatiale $k/(2\pi) = 1/\sigma$ correspond au maximum de la distribution. La ligne bleue permet de visualiser la largeur à mi-hauteur de cette distribution. (b) : Courbes de dispersion de la lumière (ligne rouge) et des plasmons de surface (ligne noire) à l'interface argent/alumine. Les traits en pointillés rouges indique l'énergie d'un photon de longueur d'onde $\lambda_0 = 550$ nm dans l'espace libre ($hc/\lambda_0 = 2,25$ eV).

Le "spectre de k " est obtenu en calculant la transformée de Fourier de la fonction d'auto-corrélation de l'image AFM, puis en l'intégrant radialement (voir § 2.1.2.2, p.59). La Figure 5.3a est le "spectre de k " calculé pour le film nanorugueux réalisé par dépôt successif de deux films de 60 nm d'argent, à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ puis $T_{ech} = T_{amb}$ (image AFM Fig. 5.1h). Cette distribution présente un maximum pour la fréquence

spatiale $k/(2\pi) = 1/\sigma = 9,1 \mu\text{m}^{-1}$. La largeur à mi-hauteur de la distribution est de $10,4 \mu\text{m}^{-1}$. Afin de décrire davantage cette distribution, nous avons utilisé la largeur à mi-hauteur pour diviser la distribution en trois domaines de fréquence spatiale (voir pointillés bleus en Fig. 5.3a). 71% de la distribution est contenue dans l'intervalle centré sur la fréquence $1/\sigma$ ($[3, 8; 14, 2] \mu\text{m}^{-1}$). Les domaines des basses et hautes fréquences spatiales ($[0; 3, 8] \mu\text{m}^{-1}$ et $[14, 2; 40] \mu\text{m}^{-1}$) correspondent respectivement aux 13% et 16% restants. La Figure 5.3b présente les courbes de dispersion de la lumière et des plasmons de surface à l'interface argent/alumine. D'après la Figure 5.3b, le domaine d'énergie correspondant aux maxima d'absorption et d'émission des fluorophores étudiés ($hc/\lambda_0 = 2,1 - 2,3 \text{ eV}$) est associé à des plasmons de surface de fréquences spatiales $k_{SP}/(2\pi) = 3,2 - 3,6 \mu\text{m}^{-1}$. Ceci correspond au domaine des basses fréquences spatiales du spectre de la surface nanorugueuse. Toutefois, l'amplitude de la distribution à $k_{SP}/(2\pi) = 3,2 \mu\text{m}^{-1}$ est seulement deux fois plus faible qu'à $k_{SP}/(2\pi) = 1/\sigma$. On attend donc un couplage relativement fort entre la lumière incidente et les plasmons de surface, et une diffusion des plasmons de surface hors du plan relativement efficace grâce à la rugosité du film métallique.

Le Tableau 5.1 montre que le film d'argent formé en une seule étape, par dépôt d'argent sur une lame verre à température ambiante, ne présente pas une rugosité nulle ($R_q = 3,5 \text{ nm}$), mais les fréquences spatiales de sa surface ($1/\sigma = 21 \mu\text{m}^{-1}$) sont trop élevées pour permettre une diffusion efficace des plasmons de surface.

5.2 Couplage avec les fluorophores

5.2.1 Influence de la morphologie du film métallique

Afin d'étudier les propriétés optiques des films d'argent nanorugueux, nous avons couvert les échantillons présentés en Figure 5.1 d'une couche d'alumine d'épaisseur 60 nm et d'un film de colorant (Rhodamine B). Cette épaisseur d'alumine correspond à la distance optimale sur un substrat miroir. Le facteur d'exaltation est calculé en comparant les signaux de fluorescence mesurés sur un substrat métallique et une lame de verre. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 5.3.

Pour les échantillons étudiés, les résultats obtenus montrent une augmentation du facteur d'exaltation de la fluorescence avec la rugosité du film métallique. D'autre part, ces résultats révèlent l'importance de la continuité du film métallique. Considérons le support couvert d'un film d'îlots d'argent de 40 nm d'épaisseur : l'ajout d'un film continu d'argent ne modifie pas significativement ses paramètres de rugosité (variation relative $< 10\%$), mais double quasiment le facteur d'exaltation de fluorescence ($\times 1,8$). Ce phénomène est encore plus prononcé pour le film d'îlots d'argent de 20 nm d'épaisseur (exaltation $\times 2,1$), mais disparaît pour celui de 60 nm d'épaisseur. En effet, la réponse optique d'un film d'îlots tend vers celle d'un film continu au fur et à mesure que la taille et la densité d'îlots croissent, la transition entre les deux types de comportement optique étant associée au seuil de percolation (voir Chap. 1, § 1.3.3.4, p.40).

Ref. Fig. 5.1	Dépôt d'argent		Exaltation	
	$T_{ech} = 300^\circ$ (nm)	$T_{ech} = T_{amb}$ (nm)	G	G/G^{ref}
(b)	20	0	17	
(c)	40	0	27	
(d)	60	0	50	
(e)	0	60	28	1
(f)	20	60	35	1,3
(g)	40	60	48	1,7
(h)	60	60	52	1,9

TAB. 5.3: Facteurs d'exaltation de fluorescence G sur des films d'îlots d'argent et des films d'argent nanorugueux formés par dépôts d'argent en deux étapes successives (dépôt à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ puis dépôt à $T_{ech} = T_{amb}$), en fonction de la quantité de métal déposée à chacune des deux étapes. G/G_{ref} : augmentation relative du facteur d'exaltation pour les films d'argent rugueux, par rapport au film d'argent plan.

Notez qu'ici (à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$) le seuil de percolation est atteint pour une épaisseur de métal plus grande que lorsque le film métallique est formé à température ambiante, car l'élévation de température favorise la formation de particules plus sphériques et moins aplaties.

5.2.2 Influence de la distance sur le couplage métal-fluorophore

Après avoir étudié l'amplification du signal de fluorescence sur les films d'argent nanorugueux en fonction de leur morphologie, nous présentons l'influence d'un autre paramètre jouant un rôle crucial dans le couplage métal-fluorophore : la distance de séparation. L'exaltation de la fluorescence sur un substrat miroir plan peut être décrit simplement en termes d'interférences, tandis qu'un substrat métallique rugueux conjugue effets d'interférences et réémission de l'énergie donnée aux plasmons de surface. Le facteur d'exaltation est donc susceptible de suivre des lois, en fonction de la distance, différentes sur les deux types de substrats.

La Figure 5.4 présente l'image de fluorescence d'un dépôt de colorant (Cyanine 3) évaporé sur un film d'argent plan (moitié basse de l'image) et un film d'argent nanorugueux (moitié haute de l'image). Le film nanorugueux a été formé par dépôts successifs d'un film de 50 nm d'argent à $T_{ech} = 200^\circ\text{C}$ et d'un film de 50 nm d'argent à $T_{ech} = T_{amb}$. Les fluorophores sont séparés du métal par un gradient d'épaisseur d'alumine (de 0 à 300 nm par pas de 20 nm). La Figure 5.5 présente la variation du facteur d'amplification, calculée à partir de la Figure 5.4, pour le premier pic d'exaltation.

Les deux premiers maxima d'exaltation sont observés pour $d_1 \sim 60$ nm et $d_2 \sim 200$ nm sur le film d'argent plan, et pour $d_1 \sim 52$ nm et $d_2 \sim 205$ nm sur le film

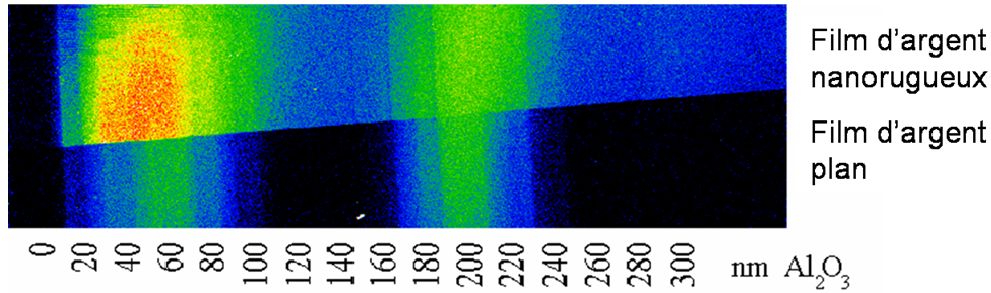


FIG. 5.4: Image de fluorescence d'un film de colorant (Cyanine 3) évaporé sur un film d'argent plan (moitié basse de l'image) et sur un film d'argent nanorugueux (moitié haute de l'image) préalablement recouverts d'une couche d'alumine d'épaisseur variant de 0 à 300 nm par pas de 20 nm. Le film nanorugueux est préparé par dépôts successifs d'un film de 50 nm d'argent à $T_{ech} = 200^\circ\text{C}$ et d'un film de 50 nm d'argent à $T_{ech} = T_{amb}$.

d'argent nanorugueux (voir Fig. 5.4). L'émission de fluorescence est modulée par l'interférence des champs d'excitation incident et réfléchi par la surface. Cependant, sur le substrat rugueux, la fluorescence n'est pas totalement éteinte aux positions d'interférences destructives. Par exemple, à $d \sim 140$ nm, le signal de fluorescence est multiplié par un facteur $\sim 6,5$ sur le film rugueux, par rapport à une lame de verre, et par un facteur $\sim 0,06$ sur le film plan. Cette différence est due à la diffusion du champ d'excitation par les anfractuosités de la surface rugueuse et, probablement, à la plus large distribution de distances fluorophore-métal. Un des avantages du substrat rugueux, par rapport au miroir plan, est qu'il n'y a plus de distance pour laquelle le champ d'excitation s'annule, et à laquelle les fluorophores ne pourraient être détectés.

L'exaltation de fluorescence est moins sélective spatialement sur le film nanorugueux que sur le film plan. Cette sélectivité en fonction de la distance au film métallique est évaluée en mesurant la largeur à mi-hauteur (FWHM) du pic d'exaltation (Fig. 5.5). On constate que le pic d'exaltation est environ 40% plus large sur le film nanorugueux. Cette particularité constitue un avantage lorsqu'il s'agit de détecter, sur un même substrat métallisé, deux fluorophores dont les longueurs d'onde d'excitation diffèrent de plusieurs dizaines de nanomètres (*e.g.*, pour les colorants Cyanine 3 et Cyanine 5 couramment utilisés ensemble comme marqueurs dans les puces à ADN).

Au premier pic d'exaltation ($d = d_1$), le signal est amplifié d'un facteur $G_1 \sim 26$ sur le film d'argent plan et $G_1 \sim 45$ sur le film d'argent nanorugueux, soit un gain d'exaltation de $\frac{45}{26} \sim 1,7$ apporté par la rugosité de surface. Cette contribution supplémentaire à l'amplification du signal est le résultat de l'amplification locale du champ d'excitation, et de la conversion radiative de l'énergie des plasmons de surface (voir Chap. 1, § 1.3.3, p.35).

Au second pic d'exaltation ($d = d_2$), le gain apporté par la rugosité est plus faible ($\times 1,3$) qu'au premier pic d'exaltation ($\times 1,7$). Le couplage aux plasmons de surface décroît exponentiellement avec la distance à la surface métallique. L'extension des champs associés aux plasmons de surface est, dans le diélectrique d'indice n_d , de l'ordre de $\frac{\lambda}{2n_d}$ (Raether 1988) (voir Chap. 1, § 1.2.3, p.16). Cela explique que ce couplage joue

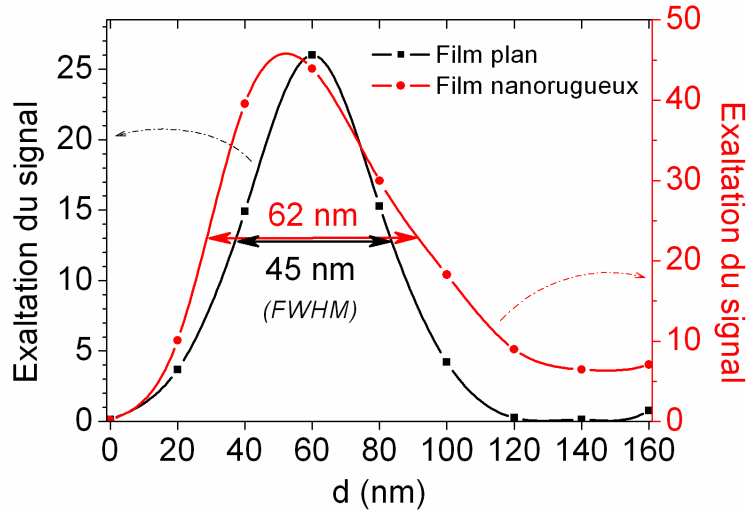


FIG. 5.5: Facteur d'exaltation de fluorescence calculé à partir de la Figure 5.5, en fonction de l'épaisseur de la couche séparatrice, sur le film d'argent plan et le film d'argent nanorugueux. Les deux courbes sont représentées avec des échelles verticales différentes afin de pouvoir comparer la largeur à mi-hauteur (FWHM) du premier pic d'exaltation. La largeur du pic à mi-hauteur est indiquée par une double flèche et sa valeur en nanomètres.

un rôle majeur à $d = d_1 \sim \frac{\lambda}{4n_d}$ et relativement mineur à $d = d_2 \sim \frac{3\lambda}{4n_d}$.

Enfin, on note que la température du substrat, pendant le premier dépôt d'argent, a une influence sur l'efficacité d'exaltation des films nanorugueux formés par la technique de dépôt en deux étapes. Des amplifications sensiblement plus grandes ont été mesurées dans le cas où $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ ($G = 52$) que dans le cas où $T_{ech} = 200^\circ\text{C}$ ($G = 45$). Une température plus élevée permet de former sur le substrat des particules plus grosses et moins aplaties, qui donnent vraisemblablement un relief plus important au film nanorugueux. Une étude en AFM des paramètres de rugosité des films nanorugueux, en fonction de la température de formation du film d'îlots, est nécessaire pour déterminer une température optimale, qui rendrait cette technique d'élaboration la plus efficace possible.

5.3 Conclusion du Chapitre 5

La structuration du film métallique, à l'échelle nanométrique, est d'un grand intérêt car elle fait du couplage aux plasmons de surface (processus *a priori* défavorable à la fluorescence car non-radiatif) un facteur d'exaltation du signal. En particulier, la formation d'une rugosité quasi-aléatoire permet un couplage lumière/plasmon optimal et parfaitement adapté aux applications d'imagerie en biologie, puisqu'elle est compatible avec les dispositifs de microscopie standard. Les films métalliques nanorugueux combinent les avantages des films plans (effet miroir) et des films d'agrégats métalliques (effet plasmonique), tout en étant plus polyvalents que les réseaux métalliques

périodiques.

Nous avons proposé une technique d'élaboration de films nanostructurés en deux étapes de dépôt successifs, respectivement à température élevée puis à température ambiante. Nous avons étudié en AFM la topographie des films nanorugueux formés de cette façon, et avons caractérisé leur rugosité de surface au moyen de deux paramètres choisis pour leur lien avec les propriétés optiques des surfaces métalliques. Ces deux paramètres sont la moyenne quadratique R_q du profil de la surface et sa période spatiale caractéristique σ . Nous avons montré que cette technique d'élaboration permet, en adaptant la quantité de métal déposée, de contrôler la rugosité du film formé, et d'ajuster le paramètre σ pour que la périodicité de la surface métallique soit favorable au couplage entre la lumière et les plasmons de surface. Pour cela, le vecteur de Bragg doit être de l'ordre du vecteur d'onde des plasmons de surface, *i.e.*, $\frac{1}{\sigma} \sim \frac{k_{SP}}{2\pi} \sim 1 - 10 \mu\text{m}^{-1}$. Nous montrons qu'un film nanorugueux, formé par dépôt de 60 nm d'argent à $T_{ech} = 300^\circ\text{C}$ puis de 60 nm d'argent à température ambiante, présente des paramètres de rugosité $R_q = 16$ nm et $\sigma = 110$ nm ($\frac{1}{\sigma} = 9,1 \mu\text{m}^{-1}$), et fournit une amplification du signal de fluorescence d'un facteur 52, soit un gain d'un facteur 1,9 par rapport à un film d'argent plan (pour la Rhodamine B et une couche d'alumine séparatrice de 60 nm). Ce gain est dû à l'excitation résonante des plasmons de surface par la lumière incidente, et à la diffusion des plasmons hors du plan de la surface métallique (conversion radiative de l'énergie des plasmons) (Le Moal 2006).

L'exaltation de fluorescence sur les films métalliques nanorugueux présente également l'avantage d'être moins sélective en fonction de la distance fluorophore/métal, ce qui est un atout considérable pour l'amplification, sur un même substrat, de plusieurs fluorophores s'excitant ou émettant à des longueurs d'onde différentes.

Nous avons testé plusieurs autres méthodes pour accroître la rugosité d'un film métallique, notamment la structuration du substrat de verre avant dépôt d'un film métallique continu. L'action chimique (attaque à l'acide fluorhydrique), physique (gravure par faisceau d'électrons) et mécanique (microabrasion par jet de microbilles d'alumine), sont des options pour la structuration du verre. Ces méthodes se sont révélées inefficaces car elles ne permettent pas de structurer la surface à des fréquences spatiales suffisamment élevées. La rugosité obtenue par attaque chimique est conditionnée par la démixion du verre, et la rugosité obtenue par microabrasion dépend fortement de la taille des microbilles utilisées. Celles-ci sont généralement beaucoup trop grosses (plusieurs dizaines de micromètres) comparées aux nanostructures que l'on souhaite former à la surface du substrat.

On peut également envisager de couvrir la surface du substrat avec des nanoobjets dont la taille correspond à la rugosité souhaitée pour le film métallique (*e.g.*, en déposant des nanobilles de silice par *spin-coating* sur une lame de verre).

L'étude expérimentale présentée dans la Chapitre 5 a permis de valider la technique d'élaboration des films rugueux. Le perfectionnement de cette technique nécessite de nouvelles études systématiques, notamment sur l'influence de la température de dépôt et du taux de couverture.

Chapitre 6

Applications aux puces à ADN

La détection de fluorescence est devenue la méthode de choix pour une majorité d'applications aux sciences de la vie. Nous décrivons ici le développement et l'utilisation de substrats métallisés qui exaltent significativement le signal de fluorescence, pour des applications biomédicales.

Comme nous l'avons montré dans le Chapitre 4, la présence d'une surface métallique plane modifie le comportement optique des fluorophores (voir § 4.1, p.104). Les effets d'exaltation à l'excitation et à l'émission sont particulièrement avantageux pour des études de processus biologiques se déroulant relativement près de la surface ou, du moins, à une distance bien définie (voir § 4.1.4, p.111). De tels processus peuvent être la reconnaissance d'entités à la surface d'un biocapteur ou l'hybridation d'un brin d'ADN à la surface d'une puce. D'autre part, la structuration de la surface métallique à l'échelle nanométrique permet d'accroître l'efficacité de l'exaltation de fluorescence ainsi que son confinement spatial (voir Chap. 5, p.137). Nous présentons dans le Chapitre 6 l'application des surfaces métalliques planes et nanostructurées aux puces à ADN. Cette étude a été menée en collaboration avec l'entreprise *Genescore*.

6.1 Préparation des puces à ADN

6.1.1 Démonstration de principe

Nous avons fait une démonstration de principe, en appliquant nos substrats à la détection d'une séquence unique d'ADN, en l'absence d'autres séquences différentes. Pour cela, nous avons utilisé des oligonucléotides *sens* et *anti-sens*. Dans ce cas, toutes les *sondes* sont identiques, toutes les *cibles* sont également identiques, et les *cibles* et les *sondes* sont des séquences de bases parfaitement complémentaires (Foy 2001).

Les oligonucléotides cibles sont marqués avec des fluorophores et l'hybridation des cibles avec les sondes fixées sur la lame est détectée par excitation de la fluorescence

de ces fluorophores. Sur les puces à ADN, deux fluorophores différents sont généralement utilisés, pour comparer l'expression des gènes dans deux échantillons différents. Avec notre méthode d'hybridation non-spécifique, les deux fluorophores sont détectés en concentrations égales au niveau de chacun des spots de la puce. Pour mener une étude rigoureuse de l'exaltation de fluorescence et éliminer les phénomènes de *crosstalk* (détection parasite due aux limites du filtrage spectral), nous avons souhaité réaliser deux séries de spots différentes – respectivement marquées Cyanine 3 et Cyanine 5 – sur une même puce. Pour cela, nous avons marqué les sondes plutôt que les cibles, et réalisé l'hybridation avec des oligonucléotides cibles non-marqués. Pour les expériences n'impliquant qu'un seul fluorophore, nous avons appliqué la méthode décrite précédemment.

6.1.2 Mesure de l'épaisseur de la couche de polymère

Lorsqu'on utilise des lames miroirs pour amplifier le signal de fluorescence, il est nécessaire d'ajuster la distance séparant les fluorophores de la surface réfléchissante. En effet, l'intensité de la fluorescence dépend de la position des fluorophores par rapport aux ventres et nœuds du champ local d'excitation (voir § 4.1.1, p.104). Dans notre étude, cette distance est contrôlée par une couche d'alumine. Dans les puces à ADN développées par Genescore, les oligonucléotides-sondes sont greffés sur une couche de polymère (*polyéthylène glycol*, PEG) préalablement déposée sur les substrats de verre (voir § 2.2.1.2, p.68). La présence de cette couche de polymère est à prendre en compte pour déterminer l'épaisseur optimale de la couche d'alumine permettant de maximiser l'amplification du signal de fluorescence. Il est nécessaire d'évaluer l'épaisseur équivalente d'alumine correspondant à la couche de PEG (e_{PEG}).

Pour ce faire, nous avons déposé une couche de PEG sur la moitié d'un substrat de type miroir plan. Le substrat est une lame de verre couverte d'un film d'argent (60 nm) et d'un gradient d'épaisseur d'alumine (de 0 à 95 nm par pas de 5 nm). Un colorant (Rhodamine B, 0,1 MC) est ensuite évaporé sur la totalité de la surface.

La Figure 6.1 montre l'image de fluorescence (a) de cet échantillon, réalisée au moyen du lecteur de puces à ADN, et les profils d'intensité (b) mesurés en fonction de l'épaisseur de la couche d'alumine, dans la zone du substrat couverte (ligne rouge) du polymère et dans celle qui ne l'est pas (ligne noire). Les deux courbes obtenues sont décalées l'une par rapport à l'autre, d'un intervalle directement relié à l'épaisseur de la couche de polymère. L'épaisseur équivalente e_{PEG} est évaluée en ajustant aux profils d'intensité la courbe théorique calculée au moyen du modèle présenté dans le Chapitre 4, en entrant comme paramètres les caractéristiques de la Rhodamine B.

La courbe théorique obtenue avec le modèle s'ajuste bien à la variation du signal de fluorescence mesurée expérimentalement dans la zone "sans PEG" (les deux courbes sont centrées en $d_1 = 58$ nm). Un bon ajustement avec la variation du signal mesurée dans la zone "avec PEG" est obtenu en décalant la courbe théorique d'un intervalle $\Delta d = (8,5 \pm 0,5)$ nm vers l'origine. La méthode décrite donne e_{PEG} avec une précision nanométrique : $e_{PEG} = \Delta d = (8,5 \pm 0,5)$ nm. L'incertitude sur e_{PEG} est liée à

la nature du gradient d'alumine. Notre dispositif expérimental nous permet de réaliser uniquement un gradient en marches (l'épaisseur varie par palier). La précision de cette méthode peut être améliorée en réalisant un gradient continu et en contrôlant *a posteriori* l'épaisseur de la couche d'alumine.

Cette méthode est basée sur le même principe que la microscopie à contraste d'interférences en fluorescence (*Fluorescence Interference-Contrast microscopy*, FLIC). La technique FLIC a été développée par Fromherz *et al.* pour mesurer l'épaisseur de cellules biologiques (Iwanaga 2001, Kiessling 2003, Lambacher 2004). Elle utilise comme substrat réfléchissant une puce de silicium (Si/SiO₂). En utilisant une lame miroir d'argent plutôt qu'une puce de silicium, nous avons bénéficié des effets de l'exaltation de fluorescence.

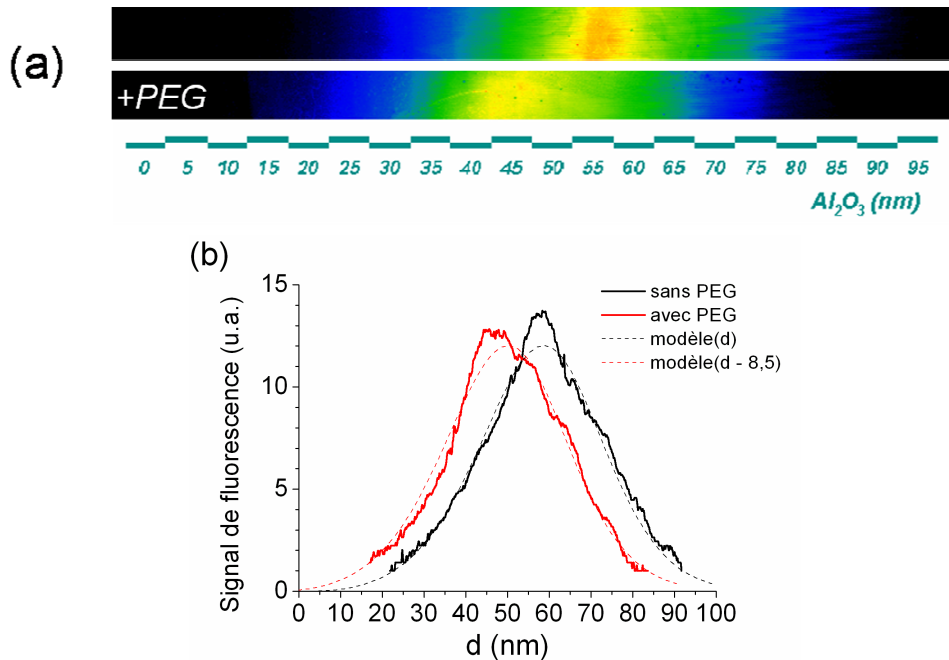


FIG. 6.1: Évaluation de l'épaisseur équivalente e_{PEG} d'une couche de polyéthylène glycol (PEG), par imagerie à contraste d'interférences en fluorescence. (a) Image de fluorescence. (b) Profils d'intensité (en unités arbitraires) mesurés dans la zone sans PEG (ligne noire) et dans la zone avec PEG (ligne rouge), et variation théorique du signal de fluorescence en fonction de l'épaisseur de la couche d'alumine d (ligne en pointillés noirs) et décalée d'un intervalle $\Delta d = 8,5$ nm vers l'origine (ligne en pointillés rouges).

6.2 Amplification du signal de fluorescence

Deux techniques d'amplification du signal sur les puces à ADN, basées sur des substrats métallisés, sont présentées dans cette étude. La première (§ 6.2.1), qui utilise des lames miroirs, tire profit de phénomènes d'interférence pour accroître les taux d'excitation et d'émission des sondes fluorescentes, et de la redirection de la lumière

émise pour améliorer l'efficacité de collection. La seconde (§ 6.2.2), qui utilise des lames métallisées nanorugueuses, trouve un bénéfice supplémentaire dans le couplage aux plasmons de surface.

6.2.1 Sur un film métallique plan

Nous présentons ici la première méthode. Nous avons réalisé une puce à ADN sur une lame de verre dont la moitié a été préalablement recouverte d'un film d'argent d'épaisseur 50 nm et d'une couche d'alumine avec un gradient d'épaisseur allant de 0 à 130 nm par pas de 10 nm. Des oligonucléotides tous identiques (les *sondes*) sont greffés en grand nombre en des zones définies de la puce (les *spots*). Quatre séries de quatre rangées de spots sont formées sur la lame : deux séries sur la partie métallisée et deux autres sur la partie inerte. Dans une des séries de chaque partie de la lame, les oligonucléotides sont marqués avec des fluorophores Cyanine 3 ; dans l'autre, ils sont marqués avec des fluorophores Cyanine 5. La Figure 6.2a présente schématiquement l'emplacement des séries de spots sur les zones métallisées et non-métallisées de la lame, et indique le sens croissant du gradient d'épaisseur de la couche d'alumine.

L'image de fluorescence de la puce est réalisée dans le scanner de lecture. Les Figures 6.2b et 6.2c correspondent respectivement à la détection de la Cyanine 3 et de la Cyanine 5. Les images (d-g) sont les détails de l'image de fluorescence : marquage Cyanine 3 sur miroir plan (d) et sur verre nu (e) ; marquage Cyanine 5 sur miroir plan (f) et sur verre nu (g). Le signal étant très faible sur le verre, la puissance d'excitation été multipliée par 16 pour l'acquisition des images (e) et (g).

On observe que la présence du film d'argent permet soit d'exalter, soit d'atténuer le signal de fluorescence, suivant l'épaisseur de la couche séparatrice d'alumine. Il existe une épaisseur optimale qui maximise le facteur d'exaltation. On mesure, pour la Cyanine 3 comme pour la Cyanine 5, un facteur d'exaltation maximal $G_{Cy3} \sim G_{Cy5} \sim 24$, proche de la valeur théorique calculée avec le modèle présenté dans le Chapitre 4 ($G_{Cy3}^{th} \sim 28,4$ ¹ et $G_{Cy5}^{th} \sim 28,6$).

Comme nous l'avons montré dans le Chapitre 4 (voir § 4.1, p.104), cette exaltation de fluorescence est due à l'action conjuguée de trois mécanismes : l'interférence des champs incident et réfléchi (exaltation à l'excitation) ; l'interaction du dipôle d'émission avec son image dans le miroir (exaltation à l'émission) ; la redirection du lobe d'émission vers l'entrée de l'objectif du scanner (amélioration de l'efficacité de collection).

Conformément au modèle, l'épaisseur d'alumine optimale est plus grande pour la Cyanine 5 ($d_{Cy5}^{th} \sim 74$ nm) que pour la Cyanine 3 ($d_{Cy3}^{th} \sim 59$ nm). *A priori*, ce décalage est un handicap puisque, sur une puce, il faut pouvoir détecter la présence des deux fluorophores au niveau de chacun des spots. Cependant, d'après le modèle, il existe une épaisseur optimale ($d_{Cy3,Cy5}^{th} \sim 66$ nm) permettant d'assurer simultanément,

¹Le gain théorique $G_{Cy3}^{th} \sim 28,4$ a été calculé en considérant la valeur du rendement quantique initial de la Cyanine 3 ($Q_0 = 0,14$) obtenue précédemment (voir § 4.1.4.1, p.111) par ajustement du modèle aux données expérimentales.

pour les deux fluorophores, un facteur d'exaltation égal à $\sim 89\%$ du facteur maximal obtenu pour chaque type de fluorophore séparément. En considérant le facteur d'exaltation mesuré expérimentalement, on peut prévoir dans ce cas un signal exalté d'un facteur $G_{Cy3,Cy5}^{th} \sim 0,89 \times 24 \sim 21$ sur l'ensemble de la puce, pour les deux marqueurs fluorescents.

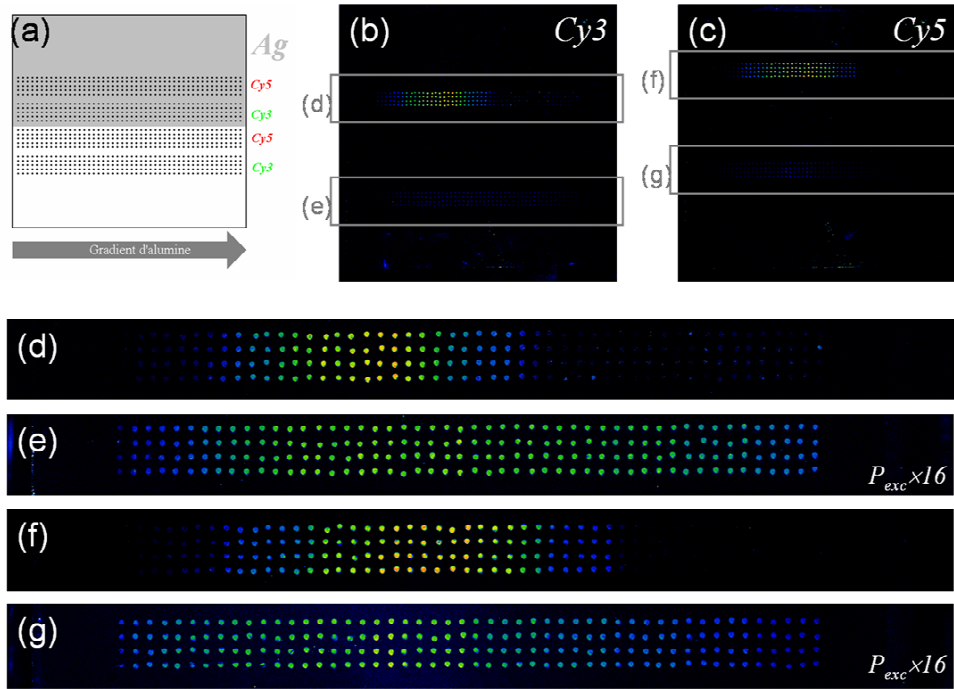


FIG. 6.2: Puce à ADN réalisée sur un substrat miroir, constitué d'une lame de verre couverte d'un film d'argent plan et d'une couche séparatrice d'alumine. (a) Schéma de la puce indiquant l'emplacement des spots marqués Cyanine 3 et Cyanine 5, la partition entre les zones métallisées et non-métallisées du substrat, et le sens croissant du gradient d'épaisseur de la couche d'alumine. (b-g) Images de fluorescence réalisées dans un lecteur de puces à ADN de type scanner. (b-c) Images de fluorescence de la puce à ADN : détection de la Cyanine 3 (b) et de la Cyanine 5 (c). (d-g) Détails de la puce à ADN : spots marqués Cyanine 3 sur le miroir (d) et sur le verre nu (e) ; spots marqués Cyanine 5 sur le miroir (f) et sur le verre nu (g). Pour les images (e) et (g), la puissance d'excitation a été augmentée d'un facteur 16.

6.2.2 Sur un film métallique nanostructuré

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 5 pour les dépôts de colorants (voir § 5.2.2, p.144), le contrôle de la rugosité de la surface métallique donne la possibilité d'amplifier davantage le signal de fluorescence, en faisant du couplage aux plasmons de surface une source d'exaltation plutôt que d'atténuation de l'émission radiative. Nous comparons ici l'efficacité des films métalliques plans et nanostructurés comme substrats amplifiant le signal de fluorescence pour les puces à ADN.

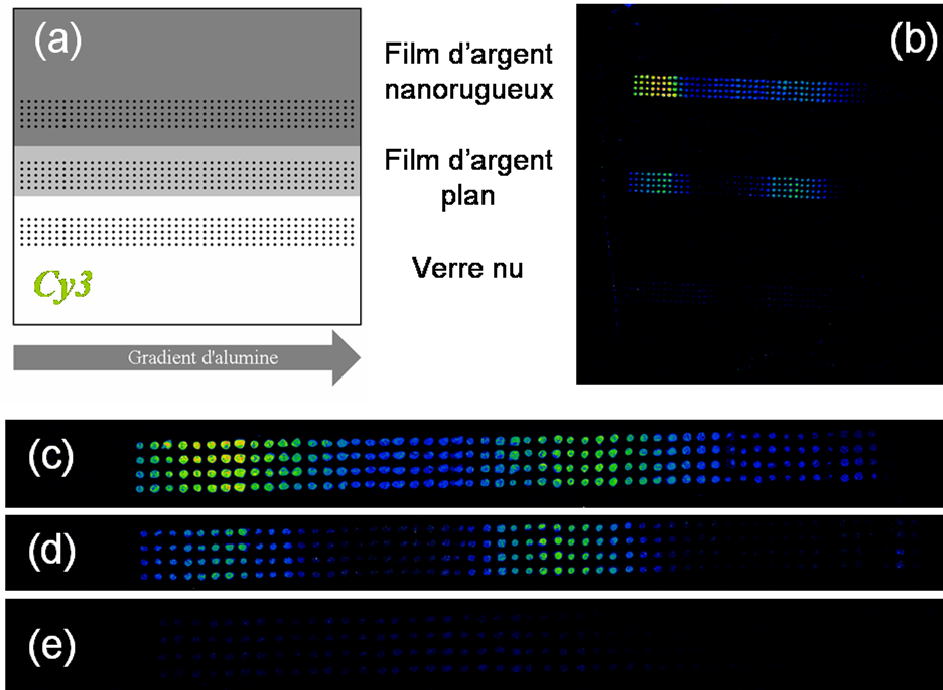


FIG. 6.3: Puce à ADN réalisée sur un substrat métallisé, constitué d'une lame de verre couverte d'un film d'argent nanorugueux et d'une couche séparatrice d'alumine. (a) Schéma de la puce indiquant l'emplacement des spots marqués Cyanine 3, la partition entre les zones métallisées (film plan et film nanorugueux) et non-métallisées du substrat, et le sens croissant du gradient d'épaisseur de la couche d'alumine. (b) Image de fluorescence de la puce à ADN. (c-e) Détails de la puce à ADN : sur le film d'argent nanorugueux (c), le film d'argent plan (d), le verre nu (e). Les conditions d'observation sont identiques pour les images (c-e).

Nous avons réalisé une puce à ADN sur une lame de verre présentant trois zones différentes (voir Fig. 6.3a) : une zone de verre nu ; une zone couverte d'un film d'argent plan ; une zone couverte d'un film d'argent rugueux réalisé suivant la méthode décrite dans le Chapitre 5 (§ 5.1.1, p.138). Les régions métallisées de la lame sont couvertes d'une couche d'alumine avec un gradient d'épaisseur allant de 0 à 300 nm par pas de 20 nm.

L'image de fluorescence de la puce (marquage Cyanine 3 uniquement) est réalisée dans le scanner de lecture, sous excitation à $\lambda_{exc} = 543$ nm (Fig. 6.3b). Pour les trois zones de la puce, un détail de l'image de fluorescence est présenté (Fig. 6.3c-e). Notez que les conditions d'excitation et de détection sont les mêmes pour ces trois images. Ici, le gradient d'épaisseur d'alumine va jusqu'à 300 nm, ce qui permet de voir les deux premiers pics d'exaltation de fluorescence en fonction de la distance d .

L'augmentation de la rugosité du film d'argent permet d'accroître le facteur d'exaltation de fluorescence. Cet effet est dû au couplage de la lumière incidente avec les plasmons de surface (effet plasmonique à l'excitation) et à la conversion radiative de l'énergie transférée par les fluorophores au film métallique (effet plasmonique à l'émission).

sion).

Similairement à ce qui a été observé pour les films de colorants (voir Chap. 5, § 5.2.2, p.144), le signal est amplifié pour toutes les distances comprises entre 0 et 300 nm. Un maximum d'exaltation $G_1 \sim 42$ est mesuré pour le premier pic d'exaltation, soit un facteur $\sim 1,7$ fois plus grand que sur un film d'argent plan. Ce coefficient supplémentaire gagné grâce à la rugosité est semblable à celui mesuré avec les films de colorant ($\sim 1,7$). Comme pour les films de colorant, l'effet de la rugosité est plus modeste pour le second pic d'exaltation : le facteur d'exaltation est alors $\sim 1,1$ fois plus grand que sur un film d'argent plan ($\sim 1,3$ pour les films de colorant).

6.2.3 Dispersion du signal de fluorescence

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 5 (p.137), les processus qui permettent le couplage du champ incident avec les plasmons de surface, et la conversion radiative de l'énergie qui leur est transmise, sont multiples et complexes. Notamment, la rugosité perturbe la propagation des plasmons à la surface du film. La localisation des plasmons de surface dans les anfractuosités du film métallique fait apparaître de fortes résonances à l'excitation, lesquelles sont associées à d'intenses champs électriques évanescents (les points chauds). Il est nécessaire, pour toutes les applications en imagerie, que l'amplification du signal de fluorescence soit homogène. Dans le cas des puces à ADN, en particulier, il est essentiel que les études quantitatives (*e.g.*, mesure de l'expression d'un gène) puissent être réalisées indifféremment sur un substrat standard et une lame métallisée. Pour le vérifier, nous avons comparé les distributions des signaux de fluorescence mesurés pour des spots identiques sur trois types de substrats différents : une lame de verre, une lame miroir, et une lame métallisée nanorugueuse.

La Figure 6.4 montre les résultats de cette étude. Pour chacun des substrats, une région de (2×2) mm², contenant neuf spots, est sélectionnée (Fig. 6.4a,c,e). Pour les lames métallisées, la couche d'alumine recouvrant le film d'argent est d'épaisseur optimale (50 nm) pour assurer le maximum d'exaltation. En outre, la puissance d'excitation est réduite pour obtenir un signal d'émission comparable à celui mesuré sur la lame de verre. La distribution du signal est calculée dans la région sélectionnée², à l'aide de la fonction *Histogram* du logiciel *ImageJ*³ (Fig. 6.4b,d,f). Les données expérimentales (ligne noire) sont analysées par ajustement d'une fonction de distribution gaussienne (ligne rouge). La dispersion du signal est évaluée par le paramètre σ/I_{moy} où σ et I_{moy} sont respectivement l'écart-type et la valeur moyenne de la distribution gaussienne.

Les images de fluorescence (Fig. 6.4a,c,e) ont été réalisées avec le scanner de lecture des puces à ADN, en choisissant la résolution latérale maximale de l'appareil : 1 pixel = (5×5) μm^2 . Sur la lame de verre (Fig. 6.4a), les variations du signal observées au

²L'analyse statistique du signal est réalisée sur une zone de (2×2) mm² de la puce, soit $(400 \times 400) = 160000$ pixels (résolution de l'image : 1 pixel = $5 \mu\text{m}$).

³Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006.

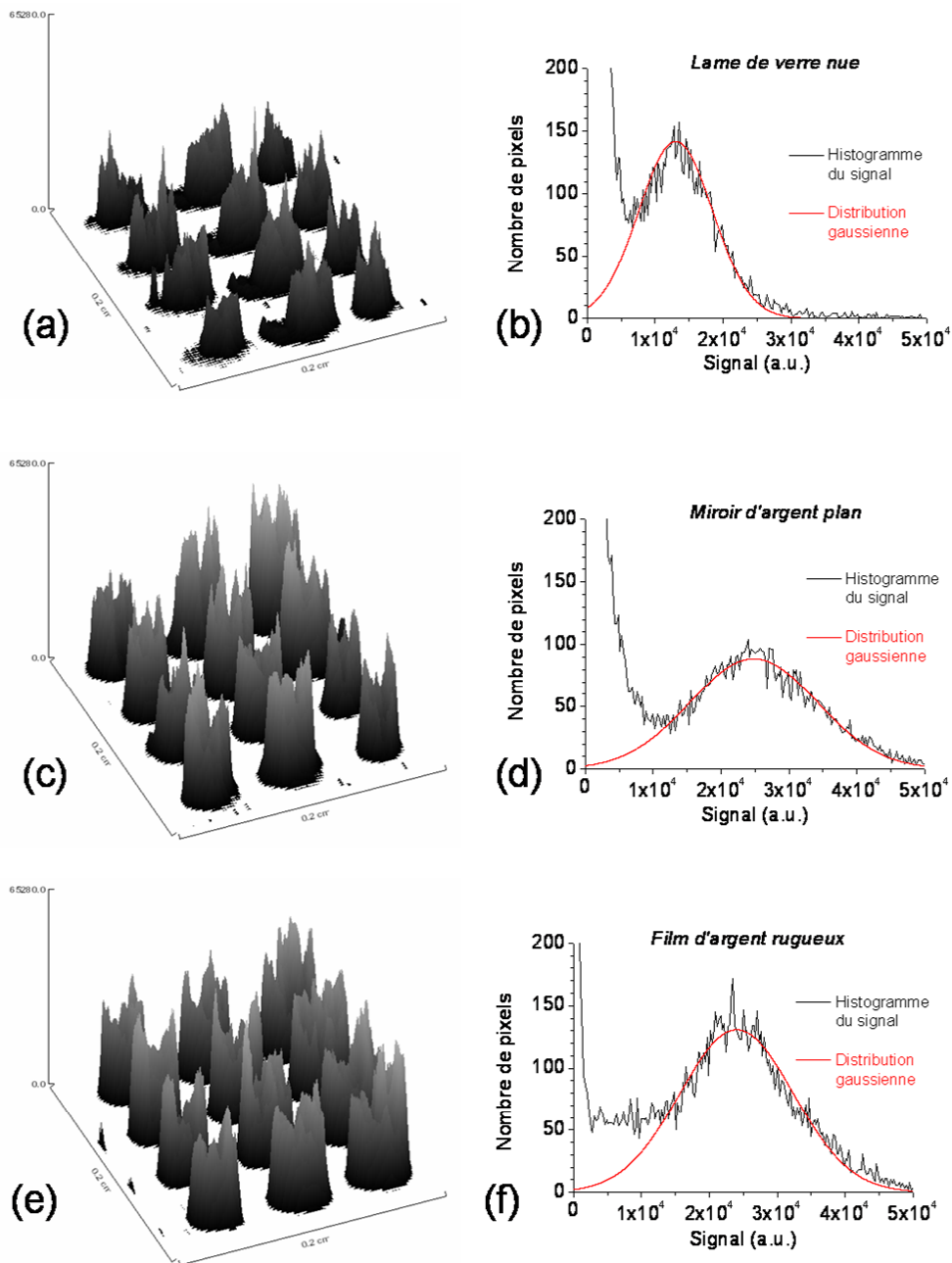


FIG. 6.4: Dispersion du signal de fluorescence sur une puce à ADN. (a,c,e) Détails d'images de fluorescence de puces à ADN réalisées sur (a) une lame de verre standard, (c) une lame miroir d'argent, (e) un film d'argent rugueux (dans les conditions maximisant l'exaltation de fluorescence). La résolution des images est de $5 \mu\text{m}$ (1 pixel = $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$). L'intensité du signal est représentée en ordonnées (axe vertical) et codée en niveaux de gris. Afin de mettre en évidence le contour des spots, le niveau de signal le plus bas est codé en blanc. Les zones de la puce représentées en (a), (c) et (e), correspondent chacune à une aire de 4 mm^2 , soit 160000 pixels, et présentent une sélection de 9 spots identiques. (b,d,f) Histogrammes de l'intensité des signaux de fluorescence détectés sur ces trois types de puces, réalisés par analyse statistique des images (a), (c) et (e). Les histogrammes sont étudiés par ajustement d'une distribution gaussienne. Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 6.1.

niveau des spots sont dues à une densité inhomogène de sondes greffées à la surface du substrat. Cette inhomogénéité se traduit par une large distribution du signal de fluorescence (Fig. 6.4b). Le pic centré sur l'origine de la distribution est associé au bruit de fond détecté entre les spots. L'analyse des distributions est indispensable pour déterminer si les variations de signal observées sur les deux autres images de fluorescence (Fig. 6.4c,e) sont uniquement dues à la densité hétérogène de sondes, ou si elles sont induites par la présence du film métallique. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le Tableau 6.1.

Substrat	R^2	σ/I_{moy}
Verre nu	0,998	$0,42 \pm 0,02$
Film plan (Ag)	0,963	$0,38 \pm 0,01$
Film nanorugueux (Ag)	0,965	$0,35 \pm 0,01$

TAB. 6.1: Analyse des distributions en intensité du signal de fluorescence mesuré sur une puce à ADN, avec pour substrat une lame de verre nue, un film d'argent plan, et un film d'argent nanorugueux (Fig. 6.4). R^2 : coefficient de détermination pour l'ajustement d'une fonction de distribution gaussienne. σ/I_{moy} : dispersion relative de l'intensité du signal.

Tout d'abord, le coefficient de détermination R^2 , qui renseigne sur l'accord entre le modèle de distribution gaussienne et les données expérimentales, est proche de 1 et diffère peu d'un substrat à l'autre. Cela indique que la distribution du signal est effectivement de type gaussien, sur un substrat standard comme sur une lame métallisée. Le taux d'excitation est donc suffisamment faible pour que la distribution du signal ne soit pas modifiée par la saturation des fluorophores. Dans ces conditions, l'exaltation de fluorescence est parfaitement linéaire.

D'autre part, la dispersion du signal est relativement constante. Le calcul donne $\sigma/I_{moy} = (0,42 \pm 0,02)$ sur la lame de verre, $\sigma/I_{moy} = (0,38 \pm 0,01)$ sur la lame miroir, et $\sigma/I_{moy} = (0,35 \pm 0,01)$ sur la lame métallisée nanorugueuse. La présence du film métallique n'induit pas d'élargissement de la distribution du signal. On peut conclure que les variations de signal observées sur les images de fluorescence (Fig. 6.4c,e) sont uniquement dues à l'inhomogénéité de la densité de sondes.

L'existence des points chauds implique que l'exaltation de fluorescence est hétérogène à l'échelle des structures de surface du film nanorugueux (typiquement 10 – 100 nm). Mais à l'échelle de la résolution maximale des scanners de lecture de biopuce (typiquement quelques micromètres), ces variations locales sont moyennées et l'amplification du signal détecté est homogène. De plus, la distance séparant les fluorophores du film métallique (50 à 60 nm) est un facteur supplémentaire d'amortissement des variations locales du champ d'excitation.

6.3 Conclusion du Chapitre 6

Dans ce chapitre, nous avons fait une démonstration de principe de l'intérêt d'utiliser des lames métallisées comme substrats pour les puces à ADN. Nous avons mesuré expérimentalement une amplification du signal d'un facteur $G = 24$ sur un film d'argent plan (pour les marqueurs Cyanine 3 et Cyanine 5) et d'un facteur $G = 42$ sur un film d'argent nanorugueux (pour le marqueur Cyanine 3). Ces valeurs de gains vérifient les résultats présentés dans les Chapitres 4 et 5, obtenus pour des films de colorants. Notez que le facteur d'exaltation obtenu pour la Cyanine 3, sur un film d'argent nanorugueux, est plus de deux fois supérieur à celui obtenu sur les lames *AmplislideTM* de *Genewave* ($G_{Cy3} = 20$, voir Fig. 1.25, p.51).

Les positions optimales des sondes par rapport au métal sont différentes pour les marqueurs Cyanine 3 et Cyanine 5, car elles dépendent des longueurs d'onde d'excitation. Grâce au modèle dipolaire, nous avons montré qu'une position intermédiaire permet d'amplifier la fluorescence des deux marqueurs sur une même puce, d'un même facteur $G^{th} \sim 21$, ce qui est utile pour le marquage bicolore *Cy3/Cy5* couramment utilisé sur les puces à ADN. Sur un film d'argent nanorugueux, cette condition sur la distance optimale est moins stricte, en raison de la distribution de distances fluorophore-métal (voir Fig. 5.5, p.146), ce qui est un avantage pour le marquage bicolore. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus en utilisant un dispositif commercial standard (lecteur de puces à ADN *ScanArray Lite*, Perkin Elmer Life Sciences). C'est un avantage considérable par rapport aux systèmes d'excitation en ondes évanescentes (Budach 1999, Neuschäfer 2003) qui nécessitent un dispositif spécifique et coûteux.

Nous avons montré que la présence du substrat métallique ne modifie ni la nature gaussienne de la distribution du signal (liée à l'hétérogénéité de la densité de sondes au niveau des spots), ni sa dispersion. Le caractère linéaire de l'exaltation de fluorescence permet de réaliser des mesures quantitatives reproductibles sur une lame métallisée comme sur une lame de verre nue.

La photostabilisation des fluorophores en présence d'un substrat (voir § 4.3, p.124) est également un avantage pour l'application des substrats métallisés aux puces à ADN. En raison du photoblanchiment des fluorophores, le signal de fluorescence baisse en intensité à chaque lecture de la puce, ce qui limite les multiples lectures et les mesures quantitatives. En particulier, si la puce n'est pas lue en entier mais qu'une région d'intérêt est analysée un plus grand nombre de fois (ou avec une puissance d'excitation plus grande), alors il n'est plus possible de quantifier de manière fiable l'expression des gènes sur l'ensemble de la puce. Une réduction significative de l'effet du photoblanchiment, sur les lames métallisées, est donc un gain de fiabilité pour les mesures quantitatives.

Sur un substrat métallisé, la sensibilité à la détection du signal de fluorescence est grandement améliorée, permettant ainsi de réaliser des mesures quantitatives plus fiables et de suivre l'évolution de l'expression des gènes avec plus de précision. En outre, de plus faibles quantités de matériel génétique sont alors nécessaires pour le diagnostic médical tout au long d'une cure pour évaluer l'efficacité d'un traitement

génique. Ce point est également d'un grand intérêt pour des applications en embryologie. Des biopsies anténatales de plus petites tailles seront nécessaires, réduisant la perturbation et la mise en danger du développement futur du fœtus. Enfin, pour des rapports signal-à-bruit comparables, une amplification du signal de fluorescence offre la possibilité de réduire la puissance de la source d'excitation, réduisant ainsi les effets de photoblanchiment. Une puce à ADN peut alors être lue plusieurs fois avec des résultats reproductibles. Dans un futur proche, les substrats actifs pourraient également contribuer à l'amélioration des puces basées sur la microfluidique ou les systèmes "labo-sur-puces" (*lab-on-a-chip*), pour des applications dans le diagnostic de maladies, la découverte de médicaments ou la recherche toxicologique (Shi 2002).

Chapitre 7

Application à l'imagerie cellulaire et tissulaire

Dans le Chapitre 6, nous avons démontré l'intérêt technologique et pratique de l'utilisation de surfaces métalliques planes et nanostructurées comme substrats pour les puces à ADN.

Jusqu'à maintenant, l'utilisation de substrats métallisés exaltant la fluorescence était limitée aux *biocapteurs* et aux *biopuces* (Stranik 2005, Sabanayagam 2007). Ces substrats (en général des films d'îlots d'argent), disponibles dans le commerce, sont conçus pour exalter le signal émis par les fluorophores situés très près de la surface. L'effet d'exaltation est en effet confiné dans la zone des quelques dix premiers nanomètres (Mayer 2001). Par conséquent, ces substrats ne sont pas destinés à être utilisés avec des échantillons biologiques d'épaisseur micrométrique. Pour de tels échantillons, de simples lames de microscopes traitées pour réfléchir la lumière (dépôt d'un film métallique continu et plan) fournissent d'efficaces substrats exaltant la fluorescence.

La distribution de distance fluorophore-miroir est beaucoup plus large lorsque l'échantillon fluorescent est une cellule biologique de taille micrométrique. L'exaltation de la fluorescence, moyennée sur l'épaisseur de l'échantillon, est alors principalement due à l'amélioration de l'efficacité de collection (Mattheyses 2005), en particulier avec des objectifs de microscope à air de faible grossissement (§ 4.2, p.119). L'utilisation de lames miroirs apporte un gain suffisant pour réaliser une imagerie de haute sensibilité tout en conservant un large champ d'observation et une grande profondeur de champ, deux avancées majeures pour les analyses de routine et à haut débit (application à l'examen diagnostique). Nous avons appliqué cette technique à l'imagerie de cellules épithéliales pour la cancérologie (§ 7.1, p.162), et à l'imagerie de sections tissulaires et l'analyse cytogénétique pour le diagnostic médical (§ 7.2, p.169).

Ces lames miroirs fournissent une exaltation significative du signal pour l'imagerie d'échantillons biologiques d'épaisseur micrométrique, avec des objectifs de microscope standard à air. Un champ d'observation plus large et une profondeur de champ plus grande peuvent ainsi être conservés, ce qui est d'un grand intérêt pour l'imagerie cellulaire et tissulaire, pour l'analyse biologique et le diagnostic médical.

7.1 Imagerie de cellules épithéliales pour la cancérologie

Nous avons appliqué notre méthode à l'imagerie de fluorescence de cellules de rein de chien, lesquelles sont des sujets modèles pour l'étude des structures intracellulaires dans les cellules épithéliales, tout particulièrement dans le contexte de la recherche contre le cancer (Vasiliev 2004, Kim 2005, Burgess 2005). Des études statistiques, menées sur des cellules épithéliales, permettent d'évaluer la proportion de cellules présentant une structure interne anormale, en fonction de perturbations externes ou de l'action de médicaments. De telles études nécessitent à la fois un large champ d'observation (faible grossissement) pour disposer d'une population statistique représentative, et d'un fort contraste (signal et rapport signal-à-bruit élevés) pour réaliser un diagnostic précis. Nous avons mené des travaux théoriques et expérimentaux afin de démontrer l'intérêt des substrats miroirs pour l'amélioration de la brillance et du contraste de l'image de fluorescence (Le Moal 2007a).

7.1.1 Images de fluorescence

Nous avons fait croître une monocouche de cellules de rein de chien sur une *lame miroir*, à savoir une lame de microscope préalablement couverte d'un film d'argent plan d'épaisseur 60 nm (voir méthodes § 2.2.2, p.71). Les cellules ont été marquées avec des sondes fluorescentes suivant la technique d'immunofluorescence décrite précédemment. Les *microtubules* des cellules ont été marqués avec la eGFP ; les *appareils de Golgi* avec l'Alexa 633 ; les *mitochondries* avec le Mitotracker Red CMXRos.

La Figure 7.1 est une superposition (en fausses couleurs) de trois images de fluorescence obtenues avec trois jeux de filtres différents (voir Tab. 2.2, p.75), chaque image correspondant à la détection de l'un des trois biomarqueurs utilisés dans le marquage des cellules (rouge pour la eGFP, vert pour l'Alexa 633, et bleu pour le Mitotracker). Le signal de fluorescence a été collecté au moyen d'un objectif $\times 20$ à air, d'ouverture numérique 0,4, en configuration d'épifluorescence. Dans la Figure 7.1, le film d'argent a été partiellement arraché de telle sorte qu'une fine bande est dépourvue de métal et laisse apparaître le verre nu (région sombre en bas de l'image). Le signal provenant des cellules situées dans cette bande sans métal sert de référence pour évaluer le facteur d'exaltation. Une autre région du substrat (zone uniforme et sombre dans en haut à droite de l'image) est dépourvue de cellules. Cette région est utilisée pour mesurer le niveau moyen de bruit directement sur la surface de métal. L'observation de la Figure 7.1 révèle une augmentation significative de l'intensité du signal et du contraste de l'image. En examinant la région dépourvue de cellules, on constate que la présence du film métallique produit un fond lumineux relativement bas comparé au bruit de fond enregistré dans la région sans métal. Ces premières observations plaident pour une amélioration du rapport signal-à-bruit sur le miroir métallique.

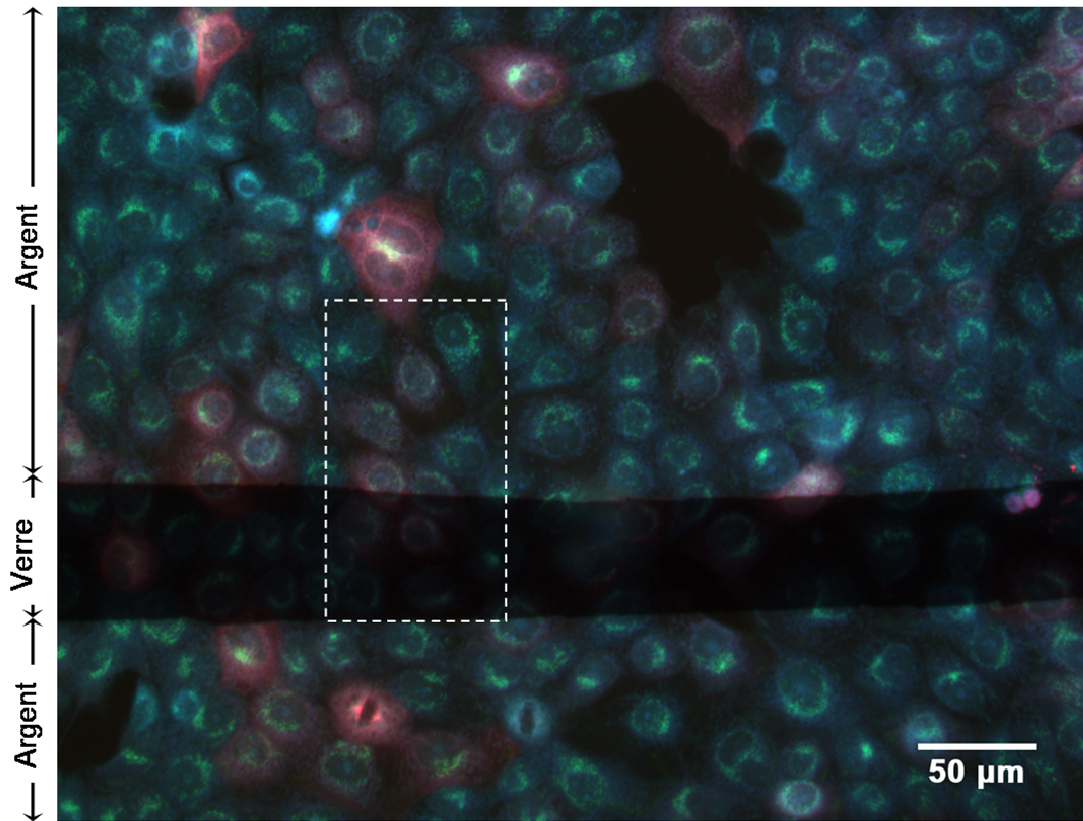


FIG. 7.1: Image de fluorescence plein-champ, en fausses couleurs, de cellules de rein de chien sur une lame miroir (lame de verre couverte d'un film d'argent plan). Les signaux de fluorescence des trois canaux de l'image tricolore sont associés aux microtubules (rouge), aux appareils de Golgi (vert) et aux mitochondries (bleu). La fluorescence émise est collectée au moyen d'un objectif de microscope $\times 20$ d'ouverture numérique 0,4. Une région du substrat est dépourvue d'argent (bande horizontale sombre) de telle sorte que l'échantillon est en contact direct avec la surface de verre nue. Les mesures réalisées dans cette région sont utilisées comme référence pour le calcul des facteurs d'exaltation. L'image représente une zone de dimensions $436 \mu\text{m} \times 345 \mu\text{m}$. Une zone d'intérêt délimitée en pointillés blancs est agrandie dans la Figure 7.2.

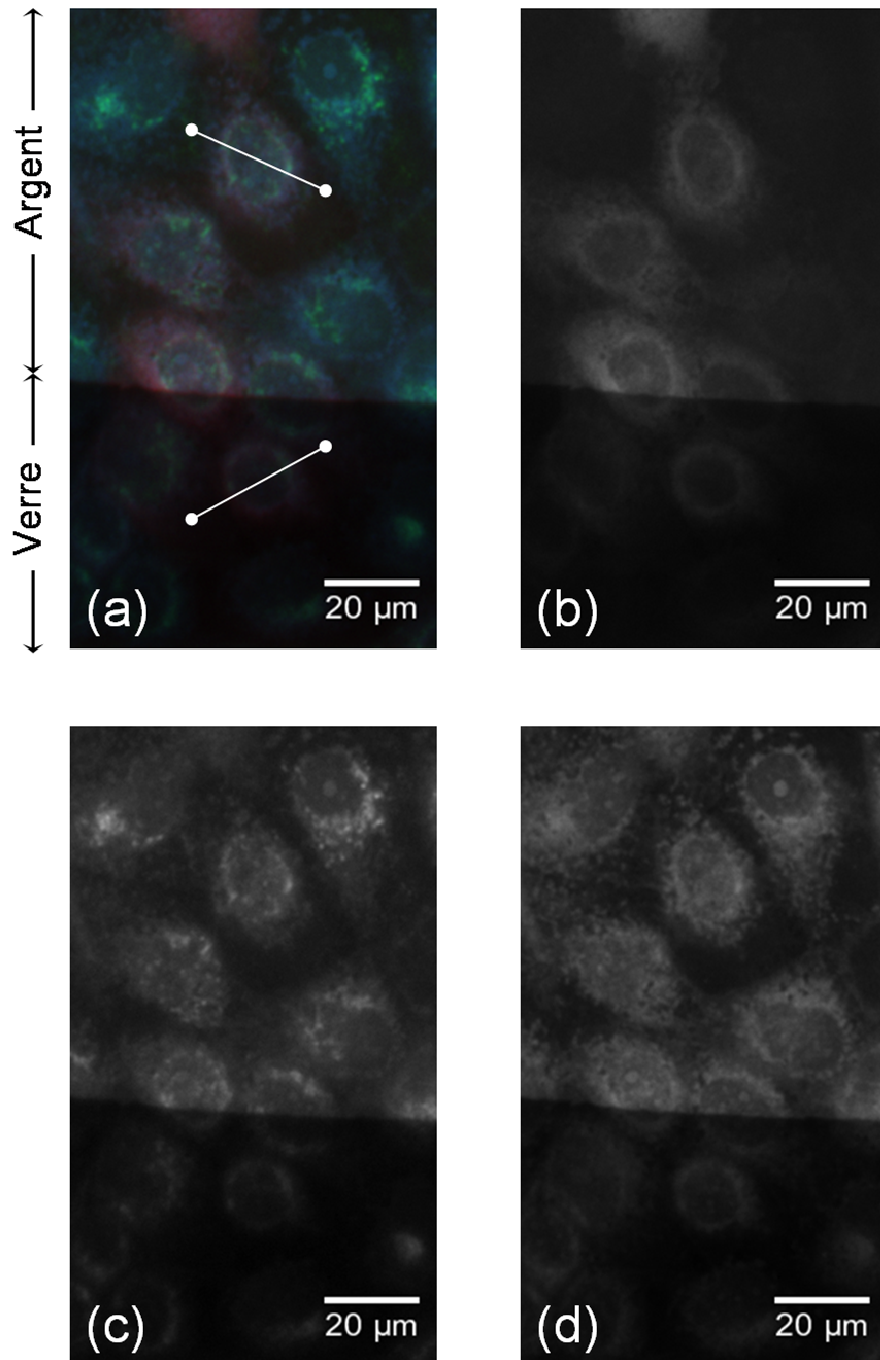


FIG. 7.2: Agrandissement d'une région d'intérêt extraite de la Figure 7.1 (cadre blanc) présentant à la fois une partie métallisée (moitié haute) et une partie nue (moitié basse). (a) Image de fluorescence en fausses couleurs (rouge, vert, bleu). (b-d) Images correspondant au signal de fluorescence associé aux différents organites des cellules : (b) microtubules (marquage eGFP, canal rouge) ; (c) appareil de Golgi (marquage Alexa 633, canal vert) ; (d) mitochondries (marquage Mitotracker, canal bleu). La zone représentée a pour dimensions $76 \mu\text{m} \times 33 \mu\text{m}$. Les profils d'intensité du signal, mesurés sur les deux segments indiqués en Figure 7.2a, sont présentés en Figure 7.3.

Cette amélioration aurait probablement pu être obtenue en changeant uniquement l'objectif du microscope par un objectif de plus grande ouverture numérique et de plus fort grossissement, mais le champ de vision aurait été réduit. Ici, l'intensité et le contraste de l'image de fluorescence sont amplifiés, tout en conservant une vision large-champ permettant l'observation simultanée d'environ 200 cellules, ce qui est un avantage considérable pour les études statistiques en cytologie.

La Figure 7.2 est un agrandissement d'une région d'intérêt, extraite de la Figure 7.1, qui comprend une zone métallisée (partie haute de l'image) et une zone non-métallisée (partie basse de l'image). Les images de fluorescence (en niveaux de gris) correspondant à chacun des canaux de l'image en fausses couleurs (Fig. 7.2a) sont présentées en Figures 7.2b-d. Les signaux de fluorescence des marqueurs eGFP (Fig. 7.2b), Alexa 633 (Fig. 7.2c) et Mitotracker (Fig. 7.2d), détectés sur la partie métallisée de la lame miroir, sont visiblement amplifiés par rapport à la partie non-métallisée. L'amplification du signal permet de distinguer davantage de détails de la structure interne de la cellule. Une localisation plus précise des mitochondries (Fig. 7.2d) et des appareils de Golgi (Fig. 7.2c) est rendue possible par le gain de contraste de l'image. Alors qu'il est relativement difficile, sur le verre, de déterminer où "s'arrêtent" les cellules, l'extrémité des microtubules (Fig. 7.2b) apparaît lisiblement sur la partie métallisée de la lame.

Un profil d'intensité du signal a été mesuré pour une cellule de chacune des deux zones de la lame, de façon à mettre en évidence l'amplification du signal. Les lignes noires et rouges en Figure 7.3 représentent le signal mesuré (le long des segments blancs) respectivement dans les zones métallisées et non-métallisées de la Figure 7.2a. Une amplification d'un facteur 3 à 4 est estimée à partir de la Figure 7.3. Cette méthode est directe mais peu précise : elle ne permet ni de calculer le facteur d'exaltation moyen, ni de vérifier l'homogénéité de l'exaltation sur l'ensemble de l'échantillon. Pour cela, il est nécessaire de procéder à une étude statistique des variations du signal.

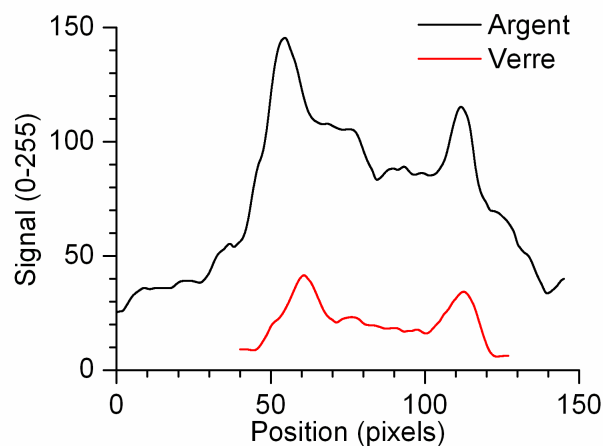


FIG. 7.3: Profils d'intensité du signal de fluorescence mesurés le long d'une ligne traversant deux cellules, l'une dans la zone métallisée (ligne noire), l'autre dans la zone non-métallisée (ligne rouge) de la Figure 7.2a.

7.1.2 Étude statistique de l'exaltation du signal

Nous avons étudié la distribution du signal de fluorescence, sur de larges zones du substrat, en prenant en compte plus d'une centaine de cellules. La distribution en intensité des pixels de l'image a été calculée dans des régions du substrat avec et sans métal, à l'aide de la fonction *Histogram* du logiciel *ImageJ*¹.

L'intensité moyenne de fluorescence et sa déviation standard ont été obtenues en ajustant aux données expérimentales une fonction de distribution gaussienne. La Figure 7.4 présente la distribution du signal des sondes mitochondriales (Mitotracker Red CMXRos) obtenue par analyse de la Figure 7.1 ; les résultats de cette étude sont résumés dans le Tableau 7.1. Les niveaux moyens de bruit sont mesurés dans les régions du substrat dépourvues de cellules, afin de pouvoir déterminer les rapports signal-à-bruit.

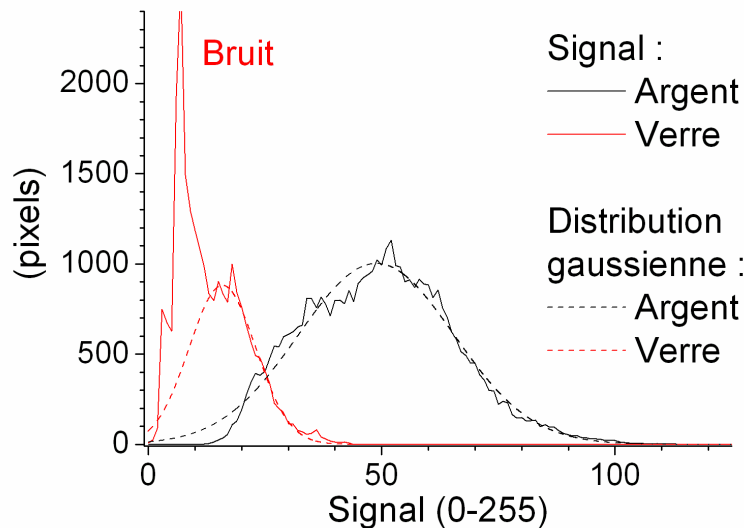


FIG. 7.4: Distribution du signal de fluorescence des sondes mitochondriales (Mitotracker Red CMXRos) mesurée dans les régions métallisée (lignes noires) et non-métallisée (lignes rouges) de la Figure 7.1. Les données expérimentales (lignes continues) sont analysées par ajustement de fonctions de distribution gaussiennes (lignes en pointillés).

Une amplification du signal moyen d'un facteur 3,1 est calculée par cette méthode statistique. Ce facteur d'exaltation est en bon accord ($\sim 20\%$ d'erreur relative) avec la valeur donnée par le modèle dipolaire dans le Chapitre 4 : soit un facteur théorique 3,9 pour le Mitotracker Red CMXRos et une ouverture numérique de 0,4 (voir § 4.2, p.119). L'analyse statistique de l'image de fluorescence révèle également une amélioration du rapport signal-à-bruit d'un facteur 1,5. L'augmentation conjointe de l'intensité du signal et du rapport signal-à-bruit est favorable à la détection, sur la lame miroir, de détails de la structure de l'échantillon biologique indiscernables sur la lame de verre nue (*e.g.*, les terminaisons des microtubules).

¹Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006.

	Bruit	Signal moyen	S/B moyen	Déviatiion std. rel.
Verre	6,9	15,9	2,3	0,22
Miroir	14,4	48,9	3,4	0,17
Exaltation	2,1	3,1	1,5	0,8

TAB. 7.1: Analyse de la distribution du signal de fluorescence des sondes mitochondriales (voir Fig. 7.4). *S/B moyen* : rapport signal-à-bruit moyen ; *Déviatiion std. rel.* : déviation standard relative = demi-largeur à mi-hauteur (HWHM) de la distribution gaussienne divisée par son amplitude.

Des déviations standard comparables ont été trouvées pour les deux régions du substrat, ce qui plaide pour une exaltation homogène de l'émission de fluorescence, le signal étant amplifié indépendamment de son intensité. Les images de fluorescence correspondant au marquage Alexa 633 ont été traitées de manière similaire, et nous avons trouvé une amplification du signal moyen d'un facteur 4,5, ce qui de nouveau est proche du résultat théorique (erreur relative < 15%).

Les résultats obtenus pour les biomarqueurs Mitotracker Red CMXRos et Alexa 633 (mis en œuvre pour le marquage des mitochondries et de l'appareil de Golgi) sont en bon accord avec le modèle, alors que des facteurs d'exaltation plus faibles ($\sim 2,5$) sont obtenus pour les biomarqueurs eGFP (utilisés pour marquer les microtubules). Cette différence peut avoir plusieurs origines. D'une part, la eGFP possède un rendement quantique élevé ($Q \sim 0,6$) et peut donc avoir bénéficié d'une exaltation à l'émission plus faible que les deux autres biomarqueurs. Cependant, nous avons montré que, dans le cas d'un échantillon d'épaisseur micrométrique, le facteur d'exaltation ne varie pas significativement avec le rendement quantique des fluorophores (voir § 4.2, p.119). D'autre part, la distribution des fluorophores dans le volume de l'échantillon n'est pas homogène, contrairement à ce qui a été supposé dans le modèle. Dans la cellule, les biomarqueurs sont localisés au niveau des organelles marquées, lesquelles sont plus ou moins proches de la surface du substrat, bénéficiant ainsi d'un effet d'exaltation plus ou moins important. Une simulation plus réaliste devrait intégrer cette distribution hétérogène des fluorophores.

7.1.3 Influence de l'ouverture numérique à la collection

Le même type d'étude a été réalisé sur des images de fluorescence obtenues avec un objectif à air $\times 40$ et un objectif à huile $\times 100$, d'ouvertures numériques respectives 0,55 et 1,4. Alors que l'efficacité d'exaltation des substrats miroirs a été confirmée par les mesures faites avec l'objectif d'ouverture numérique 0,55, des résultats relativement faibles ont été obtenus avec l'objectif de plus grande ouverture numérique. Une amplification d'un facteur $\sim 1,6$ seulement a été constatée pour le signal collecté avec ce dernier objectif.

En outre, l'utilisation d'une surface miroir avec un objectif de grande ouverture numérique induit une perte de contraste. Le niveau moyen de bruit reste relativement bas sur les parties du substrat métallisées et dépourvues de cellules, mais le contour des cellules apparaît moins net sur la partie réfléchissante. Ce phénomène est principalement dû à une dégradation de la résolution spatiale de l'image (voir § 2.4.6, p.86).

La Figure 7.5 présente la variation du facteur d'exaltation du signal, calculée en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope, avec le modèle modifié pour tenir compte de la perte de résolution de l'image. Cela correspond au facteur d'exaltation apparent, qui peut directement être comparé avec le facteur d'amplification mesuré expérimentalement sur les images de fluorescence. Les valeurs expérimentales sont reportées sur le graphe de la Figure 7.5, pour les trois marqueurs fluorescents et trois ouvertures numériques différentes.

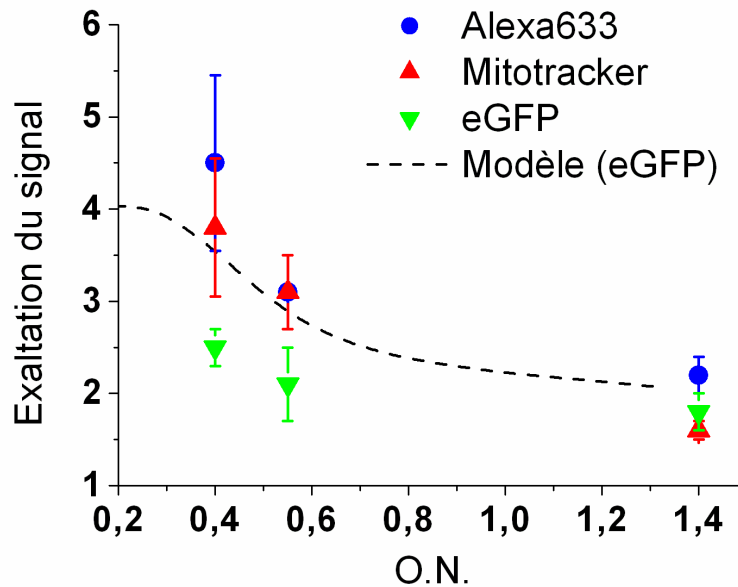


FIG. 7.5: Facteurs d'exaltation du signal de fluorescence mesurés expérimentalement pour les trois biomarqueurs, avec trois objectifs de microscope d'ouvertures numériques différentes, et calculé en fonction de l'ouverture numérique pour un fluorophore aux caractéristiques similaires à la eGFP, en tenant compte de la perte de résolution latérale (avec $R = \lambda_{flu0}$).

7.1.4 Limites du modèle

Nous l'avons montré, une des faiblesses du modèle utilisé est de ne pas tenir compte de la distribution hétérogène de fluorophores dans le volume de l'échantillon biologique. Une autre source d'erreur vient de la modélisation du système.

Le modèle proposé pour les échantillons épais considère un système à deux phases : le milieu de l'échantillon et le métal (ou le verre, sur les lames standard). Il traite

le miroir d'argent comme un demi-espace infini, *i.e.*, une couche d'argent d'épaisseur infinie. Le modèle tient compte des pertes par absorption dans le métal, mais pas de celles dues à la transmission. Or nous réalisons des films métalliques de coefficient de transmission non nul, pour permettre l'imagerie des cellules en transmission. Les gains théoriques à l'excitation et à l'émission sont donc légèrement surestimés (de quelques pourcents).

Le milieu de l'échantillon est également traité comme un demi-espace infini. Lorsque la fluorescence est collectée au moyen d'un objectif à air, la distribution angulaire de l'émission de fluorescence est corrigée en tenant compte de la réfraction à l'interface entre le milieu de l'échantillon et l'air (lois de Snell-Descartes). Mais le modèle ne tient pas compte de la réflexion au niveau de cette interface, laquelle peut modifier significativement l'efficacité de collection, en particulier aux grands angles.

Il serait nécessaire, pour corriger le modèle de ces deux effets, de considérer un système à quatre phases : le substrat de verre (demi-espace infini), un film d'argent d'épaisseur finie, une couche d'épaisseur finie modélisant l'échantillon, et l'air (demi-espace infini). Les coefficients de Fresnel seraient calculés aux niveaux de trois interfaces : verre/argent, argent/eau, et eau/air. Ce modèle plus complexe permettrait de simuler de manière plus juste l'effet miroir dans le cas des échantillons épais.

D'autre part, on ne tient pas compte de l'atténuation de la lumière après propagation à travers l'échantillon. La densité de fluorophores est suffisamment faible pour pouvoir négliger leur absorption, mais la structure des échantillons biologiques peut localement absorber la lumière de manière significative (c'est d'ailleurs ce qui permet de réaliser en transmission une image de contraste d'absorption des cellules). Les pertes liées à ce phénomène dépendent de l'épaisseur de l'échantillon et de ses propriétés optiques. Pour intégrer dans le modèle l'absorption de l'échantillon et sa dépendance spectrale, nous proposons de le modéliser comme un milieu homogène d'indice complexe.

7.2 Imagerie de sections tissulaires et analyse cytogénétique pour le diagnostic médical

Nous avons appliqué les lames miroirs à l'imagerie histologique et l'analyse cytogénétique pour le diagnostic médical (Le Moal 2007b). L'étude présentée porte sur le suivi de la réparation des microvaisseaux dans des greffes d'un donneur humain à un receveur humain de sexe différent. Cette étude a été menée en collaboration avec le Laboratoire de Pathologie de l'Hôpital Saint-Louis, sous la direction du Professeur Anne Janin.

7.2.1 Contexte biomédical, limites et besoins

Au cours de la période qui suit une greffe d'organe, l'évolution de la réparation des microvaisseaux est un indicateur du rejet ou de la survie du greffon dans l'organisme receveur. Dans une série de biopsies, issues de greffons de poumon d'un donneur femme transplantés chez un receveur homme, une analyse du génotype est réalisée sur des cellules endothéliales impliquées dans la réparation des microvaisseaux, afin de déterminer leur origine (donneur ou receveur). En combinant la détection par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) au marquage immunohistochimique (réactions anti-corps / anti-gène sur tissu biologique), les cellules endothéliales et leur génotype ont été caractérisés sur la même section de tissu (Meignin 2004). De cette façon, un lien de corrélation entre la présence de cellules endothéliales provenant du receveur et le rejet de la greffe a été établi.

Lorsque l'imagerie de fluorescence est appliquée à l'examen diagnostique des cellules et des tissus, le dispositif doit répondre à deux besoins technologiques majeurs. D'une part, une imagerie plein champ, avec une large fenêtre d'observation, est nécessaire au diagnostic histologique, car celui-ci implique l'examen de l'architecture biologique globale du tissu. D'autre part, une efficacité de collection élevée est souhaitée pour l'analyse cytogénétique, celle-ci étant basée sur la détection de signaux de faible intensité émis par les marqueurs fluorescents liés aux chromosomes X et Y. Afin d'établir un diagnostic précis et complet, l'observateur (généralement le clinicien) est contraint de passer plusieurs fois d'un objectif à air de faible grossissement, à un objectif à immersion à huile de fort grossissement. Cette tâche n'est pas aisée, à cause de la présence de l'huile d'immersion, et est source de perte de temps. Ce dernier point est un inconvénient majeur, puisque la faible photostabilité des fluorophores moléculaires entraîne une atténuation progressive du signal durant la période d'illumination.

Nous montrons ici que l'utilisation de lames miroirs est une élégante solution aux problèmes du champ d'observation et de la profondeur de champ. Elle répond aux besoins de sensibilité à la détection des sondes fluorescentes, tout en permettant l'utilisation d'objectifs à air de faible grossissement, lesquels sont mieux adaptés au traitement automatisé des échantillons pour l'analyse haut-débit.

7.2.2 Conditions expérimentales

L'étude est réalisée sur des sections de tissus d'épaisseur micrométrique, coupées dans un échantillon pris dans la paraffine. Le marquage fluorescent de l'échantillon biologique est réalisé après que celui-ci a été fixé sur le substrat. Ce qui signifie que le substrat est soumis aux conditions de température, de pH et de concentration en sels, nécessaires au traitement biochimique de l'échantillon.

Ces conditions favorisent la réaction de l'argent et de l'alumine avec les ions contenus dans la solution. Comme pour l'application des substrats métallisés aux puces à ADN, le protocole de préparation des échantillons détériore la lame miroir qui perd alors ces propriétés optiques.

Après plusieurs essais, nous avons pu montrer qu'une lame de microscope couverte d'une sous-couche de 2 nm de chrome et d'un film d'or de 70 nm d'épaisseur résiste parfaitement au protocole chimique décrit plus haut. En outre, nous avons vérifié que ce type de surface permet une adhérence de l'échantillon biologique, sur le substrat, équivalente à celle rencontrée sur une lame de verre nue. Sur chaque substrat, nous avons pris soin de conserver une zone de référence sans métal, afin de pouvoir discuter le gain apporté par l'utilisation des lames miroirs.

7.2.3 Imagerie et analyse des échantillons

7.2.3.1 Images de fluorescence

Les Figures 7.6a et 7.6b présentent les images de fluorescence réalisées sur deux régions de la même section de tissu, sur la même lame de microscope, dans une zone sans métal (Fig. 7.6a) et une zone métallisée (Fig. 7.6b). Pour ces deux images, les conditions d'excitation et de détection sont identiques. Les images en transmission (Fig. 7.6c-d) ont été réalisées dans les mêmes zones que les images de fluorescence (Fig. 7.6a-b) et permettent, grâce au marquage de contraste, de visualiser la structure du tissu (paroi des microvaisseaux, organisation des cellules). Les images (Fig. 7.6a-d) ont été obtenues au moyen d'un microscope équipé d'un objectif $\times 40$ à air, d'ouverture numérique 0,4 (grossissement de l'image : 400 fois).

La comparaison des Figures 7.6a et 7.6b révèle une exaltation du signal de fluorescence qui permet notamment de mieux discerner les frontières du tissu à l'intérieur des microvaisseaux. Cette exaltation, sur la zone métallisée de la lame, est due à l'augmentation du taux d'excitation moyen des sondes fluorescentes et à la redirection de la lumière émise.

Dans la zone sans métal, le contraste est trop faible pour pouvoir discerner le marquage génétique, et il est donc impossible d'établir l'origine des cellules (donneur XX ou receveur XY). On est contraint d'utiliser un objectif à immersion à huile, de fort grossissement ($\times 100$) et d'ouverture numérique élevée (1,4), pour augmenter l'efficacité de collection et pouvoir détecter le signal de fluorescence des sondes génétiques. Ce type d'objectif a pour inconvénients de fournir un champ de vision étroit et une faible profondeur de champ (voir Chap. 1, § 1.4.1.3, p.44). Dans la zone métallisée, le signal et le contraste de l'image sont exaltés, ce qui permet de détecter les sondes génétiques avec un objectif à air, de faible grossissement et faible ouverture numérique. L'information cytogénétique (origine de la cellule déterminée par la nature des chromosomes sexuels) et l'information histologique (cartographie du tissu) sont ainsi accessibles simultanément. Cela rend instantanément apparentes les corrélations, nécessaires pour le diagnostic, entre les deux niveaux d'analyse. En outre, la grande profondeur de champ de l'objectif de faible ouverture numérique permet de sonder simultanément toute l'épaisseur (5 μm) de la section de tissu.

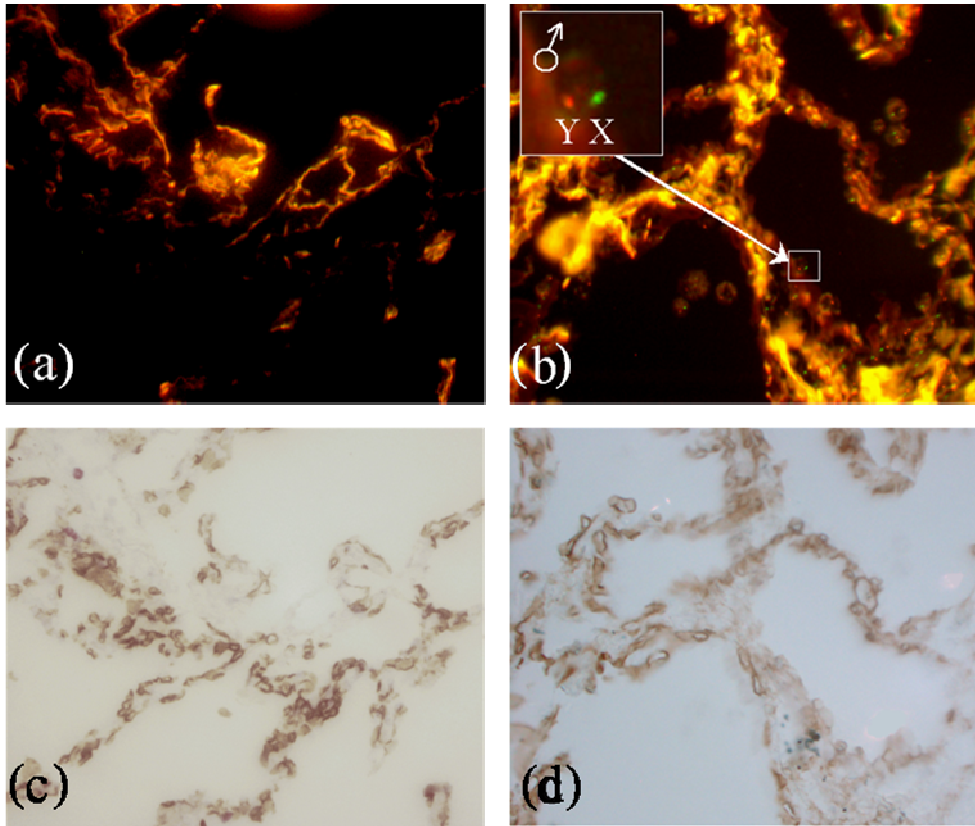


FIG. 7.6: Images de fluorescence (a-b) et de contraste d'absorption (c-d) réalisées sur une section de tissu (épaisseur $5 \mu\text{m}$) déposée sur une lame de verre nue (a,c) et une lame miroir (Cr 2 nm + Au 70 nm) (b,d), avec un microscope équipé d'un objectif $\times 40$ à air, d'ouverture numérique 0,4 (grossissement de l'image : 400 fois). Les signaux de fluorescence correspondant aux sondes ADN, utilisées pour la technique FISH (voir Tab. 2.1, p.74), sont superposés en fausses couleurs (vert : chromosome X ; rouge : chromosome Y). Détail agrandi de l'image (b) : la présence des sondes génétiques des deux chromosomes sexuels indique l'origine (XY : accepteur) de la cellule épithéliale observée.

7.2.3.2 Images en transmission

Il est intéressant de noter qu'il est toujours possible d'examiner l'échantillon biologique en transmission (voir Fig. 7.6d) comme sur une lame standard (Fig. 7.6c), grâce à la finesse du film métallique. En utilisant la théorie de Fresnel et les données de permittivité de l'or mesuré par Johnson *et al.* (Johnson 1972), nous avons calculé le coefficient de transmission T d'un film d'or de 70 nm d'épaisseur, pris entre un milieu d'indice $n = 1,33$ (l'échantillon) et un milieu d'indice $n = 1,51$ (la lame de verre), pour un faisceau en incidence normale. Nous avons obtenu $T \sim 29\%$ à $\lambda = 530 \text{ nm}$ ($n_{\text{Au}} = 0,56 + 2,2i$) et $T \sim 16\%$ à $\lambda = 590 \text{ nm}$ ($n_{\text{Au}} = 0,27 + 3,0i$).

Cette technique permet de comparer les informations fournies par les marquages immunohistochimique et cytogénétique, sur une même section de tissu, avec un unique objectif de microscope à air et de faible grossissement. De cette manière, une ana-

lyse diagnostique haut-débit peut être réalisée, ce qui est d'un grand intérêt dans un contexte clinique.

7.3 Conclusion du Chapitre 7

7.3.1 Avantages pour l'imagerie biomédicale en laboratoire et en clinique

En résumé, les lames miroirs constituent un moyen efficace d'exalter le signal de fluorescence pour des échantillons d'épaisseur micrométrique. Elles permettent d'atteindre suffisamment de sensibilité à la détection pour utiliser des objectifs de microscope à air, de faible grossissement et de faible ouverture numérique, pour des applications qui mettent en jeu des signaux d'intensité relativement faible. D'une part, une large fenêtre d'observation peut être imagée avec une grande profondeur de champ, ce qui est essentiel pour des échantillons épais tels que les cellules ou les tissus biologiques. Cela permet d'examiner l'architecture d'un tissu sans avoir à déplacer latéralement l'échantillon, et de sonder toute son épaisseur sans avoir à modifier continuellement la focalisation du microscope. D'autre part, un même objectif à air peut être utilisé pour détecter de faibles concentrations de marqueurs fluorescents, ce qui évite les changements répétitifs d'objectifs et permet de conserver les avantages pratiques liés à l'absence de liquide d'immersion. L'utilisation de lames miroirs est donc d'un grand intérêt pour simplifier les applications de routine en milieu clinique, ainsi que le traitement automatisé des lames, lorsque l'examen diagnostique est basé sur des informations obtenues à différentes échelles (*e.g.*, structure interne des cellules et architecture globale du tissu).

Les lames miroirs restent un outil très polyvalent puisque leur propriétés sont bien contrôlées et peuvent être adaptées suivant le type d'application. Leur fabrication est simple et de faible coût, et leur utilisation ne nécessite pas de matériel spécifique. Elles peuvent en effet être utilisées avec les dispositifs standard de microscopie de fluorescence.

7.3.2 Améliorations potentielles de la méthode

7.3.2.1 Stabilité chimique et photochimique

La réactivité chimique de surface du substrat est d'une importance majeure, notamment pour la croissance cellulaire. Dans la plupart des applications biologiques, le choix du métal pour les traitements métalliques se porte vers l'or, en raison de sa biocompatibilité élevée. En outre, couvrir les substrats avec de l'or plutôt que de l'argent prévient des inconvénients de l'oxydation. En effet, le film fin d'oxyde d'argent qui peut se former à la surface du métal modifie ses propriétés optiques. Une fois photoactivé, l'oxyde d'argent est réputé devenir photoluminescent, avec de larges spectres

d'excitation et d'émission (Peyser 2001, Boyd 1986). Ce phénomène introduit du bruit additionnel, lequel peut difficilement être filtré et, malgré sa faible amplitude, altère le rapport signal-à-bruit. La surface du substrat peut également être protégée en la couvrant d'une fine couche d'un matériau isolant et transparent agissant comme une barrière à l'oxydation. Quoi qu'il en soit, la réactivité chimique de ce matériau isolant doit être compatible avec la croissance cellulaire.

7.3.2.2 Domaine spectral d'efficacité

Le principe de l'exaltation de fluorescence sur des substrats miroirs est basé sur leur pouvoir de réfléchir la lumière illuminant l'échantillon, ainsi que la lumière émise par les fluorophores. Leur efficacité est donc soumise à une condition simple : le film de métal couvrant leur surface doit agir comme un miroir parfait, aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Typiquement, le coefficient de réflexion à l'interface métal/eau chute pour les longueurs d'onde plus courtes que 340 nm (pour l'argent) et 580 nm (pour l'or). A titre d'exemple, un très faible effet d'exaltation est attendu pour un échantillon marqué au DAPI ($\lambda_{exc} = 365$ nm, $\lambda_{fluo} = 420$ nm) et placé sur un substrat couvert d'un film d'or. D'autres métaux, tel que l'aluminium ou le platine, peuvent être mis en œuvre pour étendre la réflectivité du substrat au domaine du proche ultra violet.

Chapitre 8

Conclusion générale

La détection de fluorescence est devenue une technique de référence pour l'analyse et l'imagerie en biologie. Une large gamme de sondes fluorescentes, possédant des propriétés spectrales diverses, est maintenant disponible. Les propriétés particulières de chaque fluorophore sont obtenues par modification des structures chimiques. Cependant, les techniques de fluorescence ont bénéficié d'un nouvel essor depuis que l'on sait modifier et contrôler les propriétés des fluorophores en agissant physiquement sur leur proche environnement. Une véritable ingénierie des processus d'excitation et d'émission s'est développée, utilisant une large gamme d'"outils" (surfaces miroirs, films nanostructurés, nanoparticules métalliques, *etc.*).

Dans ce travail, nous avons démontré l'efficacité des substrats métallisés comme moyen d'amplifier le signal de fluorescence. Nous avons mis en évidence la pertinence de leur utilisation pour améliorer la sensibilité à la détection, dans un contexte biomédical, comme application aux puces à ADN et à l'imagerie des cellules et des tissus.

Films métalliques nanostructurés

Nous avons montré expérimentalement que la présence d'un film métallique nanostructuré modifie les processus d'excitation et d'émission des fluorophores. L'excitation résonante des plasmons de surface localisés dans les nanostructures du film induit une amplification du champ local, qui élève le taux d'excitation des fluorophores. Le contrôle des paramètres morphologiques des films nanostructurés permet d'accorder leur résonance plasmon aux bandes d'absorption des fluorophores, pour intensifier le couplage à l'excitation.

L'amplification du champ local joue un rôle majeur dans l'exaltation des processus d'excitation multiphotonique. Une amplification d'un facteur 100 est mesurée expérimentalement pour la fluorescence sous excitation biphotonique de l'Éosine déposée sur un film d'or au seuil de percolation. Ce type de film nanostructuré est particulièrement intéressant car sa résonance plasmon est dans le domaine d'excitation biphotonique des colorants absorbant dans le visible (proche infra-rouge).

Le couplage fluorophore/métal induit également un déplacement spectral du pic d'émission et une réduction des durées de vie de fluorescence. Nous montrons que l'amplification totale de la fluorescence dépend fortement de la distance séparant les fluorophores du métal, en raison de la compétition entre l'amplification du champ local et le transfert d'énergie non-radiatif au métal. Pour un film d'argent proche du seuil de percolation, cette distance optimale est d'environ 10 nm.

Films métalliques plans

Par la suite, nous avons étudié la modification de la fluorescence de colorants déposés sur des films d'argent plans, en contrôlant la distance fluorophore/métal grâce à une couche séparatrice d'alumine. Nous avons modélisé les fluorophores comme des oscillateurs dipolaires et simulé leur émission, en prenant en compte les transferts d'énergie non-radiatifs au métal (théorie de Chance, Prock et Silbey). Le modèle que nous avons développé intègre les variations locales du champ d'excitation et simule la collection de la lumière émise au moyen d'un objectif de microscope, afin d'évaluer le facteur d'amplification du signal détecté.

La distance et l'orientation relative des fluorophores par rapport au substrat sont des paramètres-clés de l'interaction fluorophore/substrat. Aux distances optimales, la présence du substrat élève le taux d'émission radiative et redirige la lumière émise vers l'objectif. Nous avons montré, par l'expérience et le modèle, que les substrats miroirs permettent d'amplifier le signal de fluorescence d'un colorant standard (Cyanine 3) d'un facteur ~ 30 , grâce à l'augmentation du taux d'excitation ($\times 6$), du rendement quantique ($\times 2$) et de l'efficacité de collection ($\times 2,5$).

En modifiant la durée de vie des fluorophores, *i.e.*, le temps qu'ils passent dans l'état excité, la présence du substrat change l'efficacité des processus de photoblanchiment et de transfert résonant d'énergie d'excitation entre les molécules. Une augmentation du nombre de photons émis avant photodestruction, d'un facteur 10 pour la Rhodamine B, est mesuré sur un substrat miroir. En outre, l'augmentation du rendement quantique permet de compenser partiellement l'auto-extinction des fluorophores observée lorsque la densité moléculaire devient grande.

Par la suite, nous avons adapté le modèle dans le but de modéliser l'effet des substrats métallisés sur le comportement optique d'échantillons de type cellule biologique. Nous avons assimilé l'échantillon biologique à une couche d'eau contenant des molécules fluorescentes distribuées de manière homogène. Une amplification du signal moyen d'un facteur théorique ~ 4 est obtenue, pour des échantillons d'épaisseur micrométrique.

Films métalliques nanorugueux

Nous avons vu qu'un substrat métallique nanorugueux présente un certain nombre d'avantages sur les autres types de substrats métalliques utilisés en optique. Le substrat nanorugueux conjugue l'effet miroir des surfaces métalliques planes et l'effet de résonance plasmon propre aux agrégats métalliques, et produit ainsi une exaltation de

fluorescence plus importante que ces deux types de systèmes. Nous avons mesuré une amplification de fluorescence d'un facteur 52 sur un film d'argent nanorugueux.

Puces à ADN

Nous avons démontré l'intérêt d'utiliser des lames métallisées comme substrats pour les puces à ADN. Nous avons mesuré expérimentalement, pour les marqueurs standard Cyanine 3 et Cyanine 5, une amplification du signal d'un facteur 24 sur un film d'argent plan, et d'un facteur 42 sur un film d'argent nanorugueux. Nous avons démontré le caractère linéaire de l'exaltation de fluorescence sur ces substrats métallisés, condition nécessaire à la reproductibilité des mesures quantitatives de l'expression de gènes.

Imagerie cellulaire et tissulaire

Nous avons mené des mesures expérimentales sur des cellules de rein de chien marquées avec des fluorophores, avec des objectifs de faible ouverture numérique. Les lames miroirs permettent d'accroître le signal et le contraste en imagerie cellulaire, grâce au gain d'efficacité de collection, tout en conservant un large champ d'observation et une grande profondeur de champ. Ces mesures ont vérifié avec succès les résultats théoriques. Enfin, nous avons présenté un exemple concret d'application au diagnostic médical, pour lequel l'utilisation de substrats métallisés apporte une amélioration significative de la sensibilité à la détection.

Perspectives

Les premiers travaux que nous avons menés sur la modification du FRET, sur un film métallique plan, ont révélé la grande complexité de cette interaction. En effet, la présence du substrat modifie à la fois le rendement quantique, la durée de vie, et les spectres d'émission et d'absorption des fluorophores donneur et accepteur, qui sont autant de paramètres dont dépend l'efficacité de FRET. D'autre part, le couplage aux plasmons de surface est susceptible d'accroître les distances d'interaction entre fluorophores (Philpott 1975, Andrew 2004). C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude du FRET entre un donneur localisé (*e.g.*, un quantum dot) et une distribution d'accepteurs (un dépôt de colorant). Notre objectif est d'étudier, en imagerie de fluorescence et de durée de vie de fluorescence (FLIM), la distribution spatiale du transfert d'énergie autour du donneur, et de mettre en évidence l'augmentation de la portée du FRET en présence du film métallique.

Sur les films non-continus de structure quasi-aléatoire, de fortes résonances optiques, localisées à l'échelle nanométrique, sont prévues par la théorie (Drachev 2001) et ont été observées expérimentalement (Grésillon 1999, Ducourtieux 2001, Williams-Mahieu 2005). Cette inhomogénéité du champ local contribue à l'exaltation des processus optiques. Il serait intéressant de sonder la distribution du champ local, en microscopie optique en champ proche (SNOM), sur les films métalliques nanostructurés et nanorugueux, en fonction de la distance au métal et des propriétés du milieu diélectrique. Une des motivations de ce projet est d'étudier, à l'échelle nanométrique,

la distribution de l'exaltation de fluorescence à la surface des substrats nanorugueux étudiés dans le Chapitre 5.

D'autre part, la réactivité chimique des substrats, leur résistance et leur passivité, ainsi que les possibilités de fonctionnalisation de leur surface, sont autant de paramètres essentiels pour leur utilisation en biologie. Ce travail de développement des substrats est nécessaire avant qu'ils puissent être utilisés pour des applications routinières en laboratoire ou en clinique. Nous prévoyons de perfectionner l'élaboration des substrats miroirs, en collaboration avec nos collègues biologistes. Une des premières étapes de ce programme est le développement de couches séparatrices et protectrices de polymères (*e.g.*, Téflon). Un de nos objectifs est de pouvoir, à terme, utiliser les substrats métallisés dans les conditions de stringence nécessaires à l'hybridation de l'ADN dans les applications de détection hétérogène de l'ADN.

Enfin, la proximité d'une surface métallique modifie également la réponse optique d'émetteurs non-fluorescents tels que les nanoparticules métalliques (NPs), qui sont détectées grâce aux intenses signaux de diffusion optique qu'elles émettent lorsqu'elles sont excitées à la résonance plasmon (Bohren 1983). L'étude de l'exaltation de la diffusion optique sur les substrats métallisés, initiée au cours de la présente thèse, fait l'objet d'une nouvelle thèse de doctorat dans l'équipe MN₂P, débutée en 2005 par Yannick Goulam-Houssen. Les premiers travaux ont mis en évidence, sur les substrats miroirs, une amplification du signal des NPs d'un facteur 5, en microscopie en champ sombre. Cette approche originale est simple d'utilisation et applicable à un large domaine d'études biologiques, puisqu'elle ne nécessite pas d'équipement spécifique autre qu'un modèle standard de microscope optique en champ sombre. Son application dans le suivi de NPs uniques est prometteur car la taille des sondes, et leur faible ou instable signal émis, étaient jusqu'ici une véritable limite technique. En outre, nous avons mis en évidence la haute sensibilité du spectre de diffusion de la lumière des NPs, à la distance les séparant du miroir. Le marquage aux NPs, couplé avec soit la spectroscopie de NPs uniques, soit l'imagerie champ sombre avec une caméra vidéo couleur, est potentiellement un outil puissant pour la détection d'événements biologiques uniques (changement de conformation d'une biomolécule, hybridation de l'ADN). Nous sommes en train d'évaluer ces nouvelles approches sur plusieurs applications biomédicales : imagerie cellulaire, marquage alternative et imagerie pour les puces à ADN, *etc.*

Références

- Abraham, V. C., D. L. Taylor et J. R. Haskins. 2004. High content screening applied to large-scale cell biology. *Trends Biotechnol.* **22**, 1, 15-22.
- Abramowitz, A. et M. W. Davidson. 2000 - 2006. Specialized Microscopy Techniques – Fluorescence Microscopy. In *Introduction to Optical Microscopy, Digital Imaging, and Photomicrography*. Olympus America Inc. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>.
- Abramowitz, A. et M. W. Davidson. 2000 - 2006. The Physics of Light and Color – Fluorescence. In *Introduction to Optical Microscopy, Digital Imaging, and Photomicrography*. Olympus America Inc. <http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/fluorescencehome.html>.
- Agarwal, G. S. et S. D. Gupta. 1998. Microcavity-induced modification of the dipole-dipole interaction. *Phys. Rev. A* **57**, 1, 667-670.
- Agassi, D. 1986. Light scattering from a dipole near a rough metallic surface. *Phys. Rev. B* **33**, 6, 3873-3884.
- Altinok, A., *et al.* 2006. Reducing incidental fluorescence in live cell imaging. Technical Report. ECE, UCSB. <http://www.bioimage.ucsb.edu/publications>
- Amos, R. M. et W. L. Barnes. 1997. Modification of the spontaneous emission rate of Eu^{3+} ions close to a thin metal mirror. *Phys. Rev. B* **55**, 11, 7249-7254.
- Amos, R. M. et W. L. Barnes. 1999. Modification of spontaneous emission lifetimes in the presence of corrugated metallic surfaces. *Phys. Rev. B* **59**, 11, 7708-7714.
- Anderson, D. J., *et al.* 1997. Clinical Chemistry. *Anal. Chem.* **69**, 12, 165-230.
- Andrew, P. et W. L. Barnes. 2000. Forster Energy Transfer in an Optical Microcavity. *Science* **290**, 5492, 785-788.
- Andrew, P. et W. L. Barnes. 2001. Molecular fluorescence above metallic gratings. *Phys. Rev. B* **64**, 12, 125405-15.
- Andrew, P. et W. L. Barnes. 2004. Energy Transfer Across a Metal Film Mediated by Surface Plasmon Polaritons. *Science* **306**, 5698, 1002-1005.
- Anger, P., P. Bharadwaj et L. Novotny. 2006. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **96**, 11, 113002-4.
- Aravind, P. K., E. Hood et H. Metiu. 1981. Angular resonances in the emission from a dipole located near a grating. *Surf. Sci.* **109**, 1, 95-108.
- Arias, J., P. K. Aravind et H. Metiu. 1982. The fluorescence lifetime of a molecule emitting near a surface with small, random roughness. *Chem. Phys. Lett.* **85**, 4, 404-408.
- Arnoldus, H. F. 2004. Power emitted by a multipole near an interface. *Surf. Sci.* **571**, 1-3, 173-186.
- Aslan, K., J. R. Lakowicz et C. D. Geddes. 2005. Plasmon light scattering in biology and medicine : new sensing approaches, visions and perspectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 5, 538-544.
- Aslan, K., *et al.* 2005. Metal-enhanced fluorescence : an emerging tool in biotechnology. *Curr. Opin. Biotech.* **16**, 1, 55-62.

- Aussenegg, F. R., *et al.* 1987. Novel aspects of fluorescence lifetime for molecules positioned close to metal surfaces. *Surf. Sci.* **189-190**, 935-945.
- Barnes, W. L. 1998. Fluorescence near interfaces : the role of photonic mode density. *J. Mod. Opt.* **45**, 4, 661-699.
- Barnes, W. L., A. Dereux et T. W. Ebbesen. 2003. Surface plasmon subwavelength optics. *Nature* **424**, 6950, 824-830.
- Barritault, P., *et al.* 2004. Optical thin films serving biotechnology : fluorescence enhancement of DNA-chip. In : C. Amra, N. K., H. A. Macleod (Eds), Advances in Optical Thin Films. *Proc. SPIE* **5250**, 12-20.
- Battifora, H. 1986. The multitumor (sausage) tissue block : novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab. Invest.* **55**, 2, 244-248.
- Beddard, G. S. et G. Porter. 1976. Concentration quenching in chlorophyll. *Nature* **260**, 5549, 366-367.
- Beer, D. et J. Weber. 1972. Photobleaching of organic laser dyes. *Opt. Comm.* **5**, 4, 307-309.
- Benner, R. E., R. Dornhaus et R. K. Chang. 1979. Angular emission profiles of dye molecules excited by surface plasmon waves at a metal surface. *Opt. Comm.* **30**, 2, 145-149.
- Berney, C. et G. Danuser. 2003. FRET or No FRET : A Quantitative Comparison. *Biophys. J.* **84**, 6, 3992-4010.
- Birch, D. J. S. et R. E. Imhof. 1991. Time-domain fluorescence spectroscopy using time-correlated single-photon counting. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol.1, Techniques, pp.1-95, New York : Plenum Press.
- Biteen, J. S., *et al.* 2005. Enhanced Radiative Emission Rate and Quantum Efficiency in Coupled Silicon Nanocrystal-Nanostructured Gold Emitters. *Nano Lett.* **5**, 9, 1768-1773.
- Blacke, W. L. et P. T. Leung. 1997. Molecular fluorescence at a rough surface : The orientation effects. *Phys. Rev. B* **56**, 19, 12625-12631.
- Bohren, C. F. et D. R. Huffman. 1983. Absorption and scattering of light by small particles. New York : J. Wiley and Sons.
- Bouhelier, A., M. R. Beversluis et L. Novotny. 2003. Characterization of nanoplasmonic structures by locally excited photoluminescence. *Appl. Phys. Lett.* **83**, 24, 5041-5043.
- Boyd, G. T., Z. H. Yu et Y. R. Shen. 1986. Photoinduced luminescence from the noble metals and its enhancement on roughened surfaces. *Phys. Rev. B* **33**, 12, 7923-7936.
- Bozhevolnyi, S. I., V. S. Volkov et K. Leosson. 2002. Localization and Waveguiding of Surface Plasmon Polaritons in Random Nanostructures. *Phys. Rev. Lett.* **89**, 18, 186801-4.
- Bras, M., *et al.* 2004. Optimisation of a silicon/silicon dioxide substrate for a fluorescence DNA microarray. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 4, 797-806.
- Brown, P. O. et D. Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet. Suppl.* **21**, 1s, 33-37.
- Budach, W., *et al.* 1999. Planar Waveguides as High-Performance Sensing Platforms for Fluorescence-Based Multiplexed Oligonucleotide Hybridization Assays. *Anal. Chem.* **71**, 16, 3347-3355.
- Burgess, D. R. et F. Chang. 2005. Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. *Trends Cell Biol.* **15**, 3, 156-162.
- Campàs, M. et I. Katakis. 2004. DNA biochip arraying, detection and amplification strategies. *Trends Anal. Chem.* **23**, 1, 49-62.
- Campion, A. et D. K. Kambhampati. 1998. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **27**, 241-250.

- Chalfie, M., *et al.* 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 5148, 802-805.
- Chance, R. R., A. Prock et R. Silbey. 1974. Lifetime of an emitting molecule near a partially reflecting surface. *J. Chem. Phys.* **60**, 2744-2748.
- Chance, R. R., A. Prock et R. Silbey. 1975. Frequency shifts of an electric-dipole transition near a partially reflecting surface. *Phys. Rev. A* **12**, 4, 1448-1452.
- Chance, R. R., A. Prock et R. Silbey. 1975. Comments on the classical theory of energy transfer. *J. Chem. Phys.* **62**, 6, 2245-2253.
- Chance, R. R., *et al.* 1975. Luminescent lifetimes near multiple interfaces : A quantitative comparison of theory and experiment. *Chem. Phys. Lett.* **33**, 3, 590-592.
- Chance, R. R., A. Prock et R. Silbey. 1976. Comments on the classical theory of energy transfer. II. Extension to higher multipoles and anisotropic media. *J. Chem. Phys.* **65**, 7, 2527-2531.
- Chance, R. R., A. Prock et R. Silbey. 1977. Erratum : Comments on the classical theory of energy transfer. II. Extension to higher multipoles and anisotropic media. *J. Chem. Phys.* **66**, 4, 1765.
- Chen, C. J. et R. M. Osgood. 1983. Direct Observation of the Local-Field-Enhanced Surface Photochemical Reactions. *Phys. Rev. Lett.* **50**, 21, 1705-1708.
- Choumane, H., *et al.* 2005. Double interference fluorescence enhancement from reflective slides : Application to bicolor microarrays. *Appl. Phys. Lett.* **87**, 031102-5.
- Conchello, J.-A. et J. W. Lichtman. 2005. Optical sectioning microscopy. *Nat. Meth.* **2**, 12, 920-931.
- Coquelle, F. M., *et al.* 2002. LIS1, CLIP-170's Key to the Dynein/Dynactin Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 9, 3089-3102.
- Demas, J. N. 1983. *Excited State Lifetime Measurements*. New York : Academic Press.
- Denk, W., J. H. Strickler et W. W. Webb. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 4951, 73-76.
- Ditlbacher, H., *et al.* 2002. Fluorescence imaging of surface plasmon fields. *Appl. Phys. Lett.* **80**, 3, 404-406.
- Ditlbacher, H., *et al.* 2002. Two-dimensional optics with surface plasmon polaritons. *Appl. Phys. Lett.* **81**, 10, 1762-1764.
- Ditlbacher, H., *et al.* 2003. Efficiency of local light-plasmon coupling. *Appl. Phys. Lett.* **83**, 18, 3665-3668.
- Drachev, V. P., *et al.* 2001. Large local optical activity in fractal aggregates of nanoparticles. *J. Opt. Soc. Am. B* **18**, 12, 1896-1903.
- Drachev, V. P., *et al.* 2002. Nonlinear Optical Effects and Selective Photomodification of Colloidal Silver Aggregates. In *Optical Properties of Nanostructured Random Media*, Vol.82, pp.113-148, Heidelberg : Springer Berlin.
- Drexhage, K. H., *et al.* 1966. *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.* **70**, 1179.
- Drexhage, K. H., H. Kuhn et F. P. Schäfer. 1968. Variation of the fluorescence decay time of a molecule in front of a mirror. *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.* **72**, 2, 329.
- Drexhage, K. H. 1970. Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time. *J. Luminescence* **1-2**, 693-701.
- Drexhage, K. H. 1974. *Progress in Optics*, Vol.XII, pp.163-232, Amsterdam : North-Holland.
- Dubertret, B., *et al.* 2002. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science* **298**, 5599, 1759-1762.
- Dubois, A., *et al.* 1996. Photostability of dye molecules trapped in solid matrices. *Appl. Opt.* **35**, 18, 3193-3199.

- Ducourtieux, S., *et al.* 2001. Near-field optical studies of semicontinuous metal films. *Phys. Rev. B.*, **64**, 165403-16.
- Dugas, V., *et al.* 2004. Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization : covalent binding or adsorption? *Sens. Actuator. B Chem.* **101**, 1-2, 112-121.
- Eagen, C. F. et W. H. Weber. 1979. Modulated surface-plasmon resonance for adsorption studies. *Phys. Rev. B* **19**, 10, 5068-5082.
- Eaton, D. F. 1990. Recommended methods for fluorescence decay analysis. *Pure Appl. Chem.* **62**, 8, 1631-1648.
- Ekins, R. et F. W. Chu. 1999. Microarrays : their origins and applications. *Trends Biotechnol.* **17**, 6, 217-218.
- Enderlein, J. 1999. Single-molecule fluorescence near a metal layer. *Chem. Phys.* **247**, 1, 1-9.
- Fermi, E. 1932. Quantum theory of radiation. *Rev. Mod. Phys.* **4**, 87.
- Finlayson, C. E., D. S. Ginger et N. C. Greenham. 2001. Enhanced Forster energy transfer in organic/inorganic bilayer optical microcavities. *Chem. Phys. Lett.* **338**, 2-3, 83-87.
- Florijn, R. J., *et al.* 1995. Analysis of antifading reagents for fluorescence microscopy. *Cytometry* **19**, 2, 177-182.
- Ford, G. W. et W. H. Weber. 1981. Electromagnetic effects on a molecule at a metal surface : I. Effects of nonlocality and finite molecular size. *Surf. Sci.* **109**, 2, 451-481.
- Ford, G. W. et W. H. Weber. 1984. Electromagnetic interactions of molecules with metal surfaces. *Phys. Rep.* **113**, 4, 195-287.
- Förster, T. 1948. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Physik (Leipzig)* **2**, 55-75.
- Fouqué, B., *et al.* 2005. Multiple wavelength fluorescence enhancement on glass substrates for biochip and cell analyses. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 11, 2335-2340.
- Foy, C. A. et H. C. Parkes. 2001. Emerging Homogeneous DNA-based Technologies in the Clinical Laboratory. *Clin. Chem.* **47**, 6, 990-1000.
- Franzke, D. et A. Wokaun. 1992. Photochemistry of azo compounds on silver island films studied by surface enhanced Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **96**, 15, 6377-6381.
- Galvan-Gonzalez, A., *et al.* 1999. Effect of temperature and atmospheric environment on the photo-degradation of some Disperse Red 1 type polymers. *Opt. Lett.* **24**, 23, 1741-1743.
- Gebauer, W., *et al.* 2004. Luminescence quenching of ordered π -conjugated molecules near a metal surface : Quaterthiophene and PTCDA on Ag(111). *Phys. Rev. B* **69**, 15, 155431-8.
- Gersten, J. I. et A. Nitzan. 1980. Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces. *J. Chem. Phys.* **73**, 7, 3023-3037.
- Gersten, J. I. et A. Nitzan. 1981. Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. *J. Chem. Phys.* **75**, 3, 1139-1152.
- Göppert-Mayer, M. 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Physik (Leipzig)* **9**, 273-294. [Elementary processes with two quantum transitions.]
- Grésillon, S. 1999. *Microscopie optique en champ proche en transmission avec une sonde métallique : exaltation de champ et spectroscopie de nanoparticules*. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie – Paris VI.
- Gryczynski, I., *et al.* 2002. Multiphoton Excitation of Fluorescence near Metallic Particles : Enhanced and Localized Excitation. *J. Phys. Chem. B* **106**, 9, 2191-2195.

- Haugland, R. P. 1996. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 6^{eme} édition. Eugene (USA) : Molecular Probes.
- Heim, R., A. B. Cubitt et R. Y. Tsien. 1995. Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 6516, 663-664.
- Hellen, E. H. et D. Axelrod. 1987. Fluorescence emission at dielectric and metal-film interfaces. *J. Opt. Soc. Am. B* **4**, 3, 337-350.
- Holland, W. R. et D. G. Hall. 1984. Frequency Shifts of an Electric-Dipole Resonance near a Conducting Surface. *Phys. Rev. Lett.* **52**, 12, 1041-1044.
- Homola, J., S. S. Yee et G. Gauglitz. 1999. Surface plasmon resonance sensors : review. *Sens. Actuator. B Chem.* **54**, 1-2, 3-15.
- Hopmeier, M., et al. 1999. Enhanced Dipole-Dipole Interaction in a Polymer Microcavity. *Phys. Rev. Lett.* **82**, 20, 4118-4121.
- Ichinose, N., et al (Eds.). 1987. Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry. *Chemical Analysis*, Vol.109, New York : John Wiley & Sons. p. 225.
- Infante, C., et al. 1999. GMAP-210, A Cis-Golgi Network-associated Protein, Is a Minus End Microtubule-binding Protein. *J. Cell Biol.* **145**, 1, 83-98.
- Iwanaga, Y., D. Braun et P. Fromherz. 2001. No correlation of focal contacts and close adhesion by comparing GFP-vinculin and fluorescence interference of DiI. *Euro. Biophys. J.* **30**, 1, 17-26.
- Jaiswal, J. K., et al. 2003. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat. Biotech.* **21**, 1, 47-51.
- Jares-Erijman, E. A. et T. M. Jovin. 2003. FRET imaging. *Nat. Biotech.* **21**, 11, 1387-1395.
- Johnson, P. B. et R. W. Christy. 1972. Optical Constants of the Noble Metals. *Phys. Rev. B* **6**, 12, 4370-4379.
- Kain, R. C., E. G. Marason et R. F. Johnston. 1999. Optical substrate for enhanced detectability of fluorescence. US patent no. 6,008,892.
- Kambhampati, D. K., P. E. Nielsen et W. Knoll. 2001. Investigating the kinetics of DNA-DNA and PNA-DNA interactions using surface plasmon resonance-enhanced fluorescence spectroscopy. *Bio-sens. Bioelectron.* **16**, 9-12, 1109-1118.
- Kelly, K. L., et al. 2003. The Optical Properties of Metal Nanoparticles : The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 3, 668-677.
- Kiessling, V. et L. K. Tamm. 2003. Measuring Distances in Supported Bilayers by Fluorescence Interference-Contrast Microscopy : Polymer Supports and SNARE Proteins. *Biophys. J.* **84**, 1, 408-418.
- Kim, K.-A., et al. 2005. Mitogenic Influence of Human R-Spondin1 on the Intestinal Epithelium. *Science* **309**, 5738, 1256-1259.
- Kitson, S. C., W. L. Barnes et J. R. Sambles. 1996. Photoluminescence from dye molecules on silver gratings. *Opt. Comm.* **122**, 4-6, 147-154.
- Knoester, J. et J. E. Van Himbergen. 1987. On the theory of concentration self-quenching by statistical traps. *J. Chem. Phys.* **86**, 6, 3571-3576.
- Knudsen, M. 1950. Theory of Gases : some modern aspects. In *Third Edition of Kinetic Theory of Gases*, London : Methuen, New York : Wiley.
- Kononen, J., et al. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* **4**, 7, 844-847.
- Kottmann, J. P. et O. J. F. Martin. 2000. Accurate solution of the volume integral equation for high-permittivity scatterers. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation* **48**, 11, 1719-1726.

- Kottmann, J. P., *et al.* 2000. Spectral response of plasmon resonant nanoparticles with a non-regular shape. *Opt. Express* **6**, 11, 213-219.
- Kottmann, J. P., *et al.* 2000. Field polarization and polarization charge distributions in plasmon resonant nanoparticles. *New J. Phys.* **2**, 27-27.
- Kreibig, U. et M. Vollmer. 1996. *Optical Properties of Metal Clusters*. Berlin : Springer-Verlag.
- Kreiter, M., *et al.* 2001. Fluorescent dyes as a probe for the localized field of coupled surface plasmon-related resonances. *Phys. Rev. B* **64**, 7, 075406-16.
- Kretschmann, E. 1971. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **241**, 4, 313-324. [Détermination des constantes optiques des métaux par excitation des oscillations du plasmon de surface]
- Kuhn, H. 1970. Classical Aspects of Energy Transfer in Molecular Systems. *J. Chem. Phys.* **53**, 1, 101-108.
- Kuhn, H., D. Möbius et H. Bücher. 1972. Physical Methods of Chemistry Part 3B. In *Techniques of Chemistry*, Vol.1, pp.577-703, New York : Wiley-Interscience.
- Kümmerlen, J., *et al.* 1993. Enhanced dye fluorescence over silver island films : analysis of the distance dependence. *Mol. Phys.* **80**, 5, 1031-1046.
- Lakowicz, J. R. 1994. Probe Design and Chemical Sensing. In J. R. Lakowicz (Ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol.4, New York : Plenum Press. p. 501.
- Lakowicz, J. R. 1999. Introduction to fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp.1-21, New York : Plenum.
- Lakowicz, J. R. 2001. Radiative Decay Engineering : Biophysical and Biomedical Applications. *Anal. Biochem.* **298**, 1, 1-24.
- Lakowicz, J. R., *et al.* 2001. Intrinsic Fluorescence from DNA Can Be Enhanced by Metallic Particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 5, 875-879.
- Lakowicz, J. R., *et al.* 2003. Radiative decay engineering : the role of photonic mode density in biotechnology. *J. Phys. D : Appl. Phys.* **36**, 14, R240-R249.
- Lahmani, M., C. Dupas et P. Houdy. 2004. *Les nanosciences – Nanotechnologies et nanophysique*. Coll. Echelles, Paris : Belin. pp.142-151.
- Lambacher, A. et P. Fromherz. 2004. Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Appl. Phys. A* **63**, 3, 207-216.
- Lander, E. S. 1999. Array of hope. *Nat. Genet.* **21**, 3-4.
- Lander, E. S., *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Le Berre, V., *et al.* 2003. Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nucl. Acids Res.* **31**, 16, e88.
- Le Moal, E., *et al.* 2005. Active substrates improving sensitivity in biomedical fluorescence microscopy. In : T. Wilson (Ed.), *Confocal, Multiphoton, and Nonlinear Microscopic Imaging II*. *Proc. SPIE* **5860**, 58600G-10.
- Le Moal, E., *et al.* 2006. Fluorescence detection device. World patent no. WO 2006/092735 A1.
- Le Moal, E., *et al.* 2007. Enhanced fluorescence cell imaging with metal-coated slides. *Biophys. J.* **92**, 6, 2150-2161.
- Le Moal, E., *et al.* 2007. Mirror Slides for high-sensitivity cell and tissue fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **12**, 2. A paraître.
- Lecaruyer, P., *et al.* 2006. Surface plasmon resonance imaging as a multidimensional surface characterization instrument – Application to biochip genotyping. *Anal. Chim. Acta* **573-574**, 333-340.

- Lee, K. C. B., *et al.* 2001. Application of the Stretched Exponential Function to Fluorescence Lifetime Imaging. *Biophys. J.* **81**, 3, 1265-1274.
- Lévêque-Fort, S., *et al.* 2003. Fluorescence enhancement near metallic nanoparticles under two photon excitation. In : T. Wilson (Ed.), Confocal, Multiphoton, and Nonlinear Microscopic Imaging. *Proc. SPIE* **5139**, 20-26.
- Lévêque-Fort, S., *et al.* 2004. Nanostructured thin films for fluorescence enhancement. In : T. Vo-Dinh, Z. Gryczynski, J. R. Lakowicz (Eds.), Plasmonics in Biology and Medicine. *Proc. SPIE* **5327**, 29-36.
- Liaw, J.-W. 2006. Simulation of
- Lichtman, J. W. et J.-A. Conchello. 2005. Fluorescence microscopy. *Nat. Meth.* **2**, 12, 910-919.
- Liebermann, T. et W. Knoll. 2000. Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Colloids Surf. A : Physicochem. Eng. Asp.* **171**, 1-3, 115-130.
- Lindsey, J. 2004. PhotochemCAD Spectra by Category. Oregon Medical Laser Center. <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD>
- Lippincott-Schwartz, J. et G. H. Patterson. 2003. Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells. *Science* **300**, 5616, 87-91.
- Lipshutz, R. J., *et al.* 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet. Suppl.* **21**, 1s, 20-24.
- Liu, B., S. Li et J. Hu. 2004. Technological Advances in High-Throughput Screening. *Am. J. Pharmacogenomics* **4**, 263-276.
- Liz-Marzán, L. M. 2004. Nanometals : Formation and color. *Mater. Tod.* **7**, 2, 26-31.
- Lukosz, W. et R. E. Kunz. 1977. Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane interface. I. Total radiated power. *J. Opt. Soc. Am.* **67**, 12, 1607-1615.
- Lukosz, W. et R. E. Kunz. 1977. Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface. II. Radiation patterns of perpendicular oriented dipoles. *J. Opt. Soc. Am.* **67**, 12, 1615-1619.
- Malicka, J., I. Gryczynski et J. R. Lakowicz. 2003. DNA hybridization assays using metal-enhanced fluorescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 1, 213-218.
- Maniv, T. et H. Metiu. 1980. Electron gas effects in the spectroscopy of molecules chemisorbed at a metal surface. I. Theory. *J. Chem. Phys.* **72**, 3, 1996-2006.
- Mattheyses, A. L. et D. Axelrod. 2005. Fluorescence emission patterns near glass and metal-coated surfaces investigated with back focal plane imaging. *J. Biomed. Opt.* **10**, 5, 054007-6.
- Mayer, C., *et al.* 2001. Slide-format proteomic biochips based on surface-enhanced nanocluster-resonance. *Fresen. J. Anal. Chem.* **371**, 2, 238-245.
- Meignin, V., *et al.* 2004. Little evidence of donor-derived epithelial cells in early digestive acute graft-versus-host disease. *Blood* **103**, 1, 360-362.
- Michalet, X., *et al.* 2005. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* **307**, 5709, 538-544.
- Moch, H., *et al.* 2001. Tissue Microarrays : What Will They Bring to Molecular and Anatomic Pathology? *Adv. Anat. Pathol.* **8**, 1, 14-20.
- Mock, J. J., *et al.* 2002. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.* **116**, 15, 6755-6759.
- Morawitz, H. 1969. Self-Coupling of a Two-Level System by a Mirror. *Phys. Rev.* **187**, 5, 1792-1796.
- Morawitz, H. et M. R. Philpott. 1974. Coupling of an excited molecule to surface plasmons. *Phys. Rev. B* **10**, 12, 4863-4868.

- Moreno, E., *et al.* 2002. Multiple multipole method with automatic multipole setting applied to the simulation of surface plasmons in metallic nanostructures. *J. Opt. Soc. Am. A* **19**, 1, 101-111.
- Moskovits, M. 1985. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **57**, 3, 783-826.
- Murray, W. A., S. Astilean et W. L. Barnes. 2004. Transition from localized surface plasmon resonance to extended surface plasmon-polariton as metallic nanoparticles merge to form a periodic hole array. *Phys. Rev. B.* **69**, 16, 165407-7.
- Nakamura, T., *et al.* 2005. Modification of energy transfer from Si nanocrystals to Er³⁺ near a Au thin film. *Phys. Rev. B.* **72**, 23, 235412-6.
- Nakamura, T., *et al.* 2006. Enhancement and suppression of energy transfer from Si nanocrystals to Er ions through a control of the photonic mode density. *Phys. Rev. B.* **74**, 4, 045302-6.
- Neuschäfer, D., *et al.* 2003. Evanescent resonator chips : a universal platform with superior sensitivity for fluorescence-based microarrays. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 4, 489-497.
- Nitzan, A. et L. E. Brus. 1981. Can photochemistry be enhanced on rough surfaces? *J. Chem. Phys.* **74**, 9, 5321-5322.
- Nitzan, A. et L. E. Brus. 1981. Theoretical model for enhanced photochemistry on rough surfaces. *J. Chem. Phys.* **75**, 5, 2205-2214.
- O'Connor, D. V. et D. Phillips. 1984. *Time-Correlated Single Photon Counting*. New York : Academic Press.
- Okamoto, T. et I. Yamaguchi. 2003. Optical Absorption Study of the Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles Immobilized onto a Gold Substrate by Self-Assembly Technique. *J. Phys. Chem. B* **107**, 38, 10321-10324.
- Otto, A. 1968. Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **216**, 4, 398-410.
- Pennisi, E. 2001. The Human Genome. *Science* **291**, 5507, 1177-1180.
- Penzkofer, A. et Y. Lu. 1986. Fluorescence quenching of rhodamine 6G in methanol at high concentration. *Chem. Phys.* **103**, 2-3, 399-405.
- Perlman, P. 1971. *Basic Microscope Techniques, Chap. I*, pp.24-25, New York : Chemical Publishing Company.
- Persidis, A. 1998. Biochips. *Nat. Biotech.* **16**, 10, 981-983.
- Persson, B. N. J. et S. Andersson. 1984. Dynamical processes at surfaces : Excitation of electron-hole pairs. *Phys. Rev. B* **29**, 8, 4382-4394.
- Peysner, L. A., *et al.* 2001. Photoactivated Fluorescence from Individual Silver Nanoclusters. *Science* **291**, 5501, 103-106.
- Philpott, M. R. 1975. Effect of surface plasmons on transitions in molecules. *J. Chem. Phys.* **62**, 5, 1812-1817.
- Pirrung, M. C. 2002. How to Make a DNA Chip. *Angew. Chem. Int.* **41**, 8, 1276-1289.
- Pockrand, I., A. Brillante et D. Mobius. 1980. Nonradiative decay of excited molecules near a metal surface. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 3, 499-504.
- Powell, C. J. et J. B. Swan. 1960. Effect of Oxidation on the Characteristic Loss Spectra of Aluminum and Magnesium. *Phys. Rev.* **118**, 640-643.
- Prober, J. M., *et al.* 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**, 4825, 336-341.
- Proudnikov, D., E. Timofeev et A. Mirzabekov. 1998. Immobilization of DNA in Polyacrylamide Gel for the Manufacture of DNA and DNA-Oligonucleotide Microchips. *Anal. Biochem.* **259**, 1, 34-41.

- Purcell, E. M. 1946. Spontaneous emission probabilities at radio frequencies. *Phys. Rev.* **69**, 681.
- Raether, H. 1980. *Excitations of plasmons and interband transitions by electrons*. Springer tracts in modern physics, Vol.88, New York : Springer-Verlag.
- Raether, H. 1988. *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*. Springer tracts in modern physics, Vol.111, Berlin Heidelberg New York : Springer-Verlag.
- Rahmani, A. et F. De Dornel. 2000. *Emission Photonique en Espace Confiné*. Collection Scientifique et Technique des Télécommunications, Paris : Eyrolles.
- Rieder, C. L. et R. W. Cole. 1998. Entry into Mitosis in Vertebrate Somatic Cells Is Guarded by a Chromosome Damage Checkpoint That Reverses the Cell Cycle When Triggered during Early but Not Late Prophase. *J. Cell Biol.* **142**, 4, 1013-1022.
- Ritchie, R. H. 1957. Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films *Phys. Rev.* **106**, 874-881.
- Ritchie, R. H. 1973. Surface plasmons in solids. *Surf. Sci.* **34**, 1, 1-19.
- Sabanayagam, C. R. et J. R. Lakowicz. 2007. Increasing the sensitivity of DNA microarrays by metal-enhanced fluorescence using surface-bound silver nanoparticles. *Nucl. Acids Res.* **35**, 2, e13.
- Savino, T. M., et al. 2001. Nucleolar Assembly of the rRNA Processing Machinery in Living Cells. *J. Cell Biol.* **153**, 5, 1097-1110.
- Schleyer, P. v. R. 2001. Introduction : Aromaticity. *Chem. Rev.* **101**, 5, 1115 -1118.
- Schleyer, P. v. R. 2005. Introduction : Delocalization- π and σ . *Chem. Rev.* **105**, 10, 3433-3435.
- Seydack, M. 2005. Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 12, 2454-2469.
- Shi, L. 2002. DNA Microarray (Genome Chip). <http://www.gene-chips.com/>
- Sibarita, J.-B., H. Magnin et J. De Mey. 2002. Ultra-fast 4D microscopy and high throughput distributed deconvolution. *Proc. IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging* 769-772.
- Sibarita, J.-B. 2005. Deconvolution microscopy. *Microscopy Techniques*, Vol.95, pp.201-243, Heidelberg : Springer Verlag.
- Smith, L. M., et al. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 6071, 674-679.
- Soller, B. J. et H. D. G. 2002. Dynamic modifications to the plasmon resonance of a metallic nanoparticle coupled to a planar waveguide : beyond the point-dipole limit. *J. Opt. Soc. Am. B* **19**, 5, 1195-1203.
- Sönnichsen, C. 2001. *Plasmons in metal nanostructures*. Thèse de doctorat de l'université Ludwig-Maximilians de Munich.
- Souteyrand, E., et al. 2000. Use of microtechnology for DNA chips implementation. *Appl. Surf. Sci.* **164**, 1-4, 246-251.
- Stranik, O., et al. 2005. Plasmonic enhancement of fluorescence for sensor applications. *Sens. Actuator. B Chem.* **107**, 1, 148-153.
- Stuart, H. R. et D. G. Hall. 1998. Enhanced Dipole-Dipole Interaction between Elementary Radiators Near a Surface. *Phys. Rev. Lett.* **80**, 25, 5663-5666.
- Suhling, K., et al. 2002. Imaging the Environment of Green Fluorescent Protein. *Biophys. J.* **83**, 6, 3589-3595.
- Sullivan, K. G., et al. 1994. Directional, enhanced fluorescence from molecules near a periodic surface. *Appl. Opt.* **33**, 13, 2447-2454.

- Tews, K. H., O. Inacker et H. Kuhn. 1970. Variation of the Luminescence Lifetime of a Molecule near an Interface between Differently Polarizable Dielectrics. *Nature* **228**, 5268, 276-278.
- Tews, K. H. 1974. On the variation of luminescence lifetimes. The approximations of the approximative methods. *J. Luminescence* **9**, 3, 223-239.
- Vasilev, K., *et al.* 2004. Reduced photobleaching of chromophores close to a metal surface. *J. Chem. Phys.* **120**, 14, 6701-6704.
- Vasiliev, J. M., *et al.* 2004. From the Cover : Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets : A link to the mechanism of cancer dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 34, 12526-12530.
- Wang, D. S. et M. Kerker. 1981. Enhanced Raman scattering by molecules adsorbed at the surface of colloidal spheroids. *Phys. Rev. B* **24**, 4, 1777-1790.
- Weber, W. H. et C. F. Eagen. 1979. Energy transfer from an excited dye molecule to the surface plasmons of an adjacent metal. *Opt. Lett.* **4**, 236.
- Weitz, D. A., *et al.* 1983. The enhancement of Raman scattering, resonance Raman scattering, and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface. *J. Chem. Phys.* **78**, 9, 5324-5338.
- Whitmore, P. M., H. J. Robota et C. B. Harris. 1982. Mechanisms for electronic energy transfer between molecules and metal surfaces : A comparison of silver and nickel. *J. Chem. Phys.* **77**, 3, 1560-1568.
- Williame-Mahieu, L. 2005. *Étude expérimentale d'effets linéaires et non-linéaires sur des nanostructures par microscopie optique en champ proche*. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie – Paris VI.
- Wokaun, A., *et al.* 1983. Energy transfer in surface enhanced luminescence. *J. Chem. Phys.* **79**, 1, 509-514.
- Wokaun, A. 1985. Surface enhancement of optical fields. Mechanism and applications. *Mol. Phys.* **56**, 1, 1-33.
- Worthing, P. T. et W. L. Barnes. 1999. Spontaneous emission within metal-clad microcavities. *J. Opt. A : Pure Appl. Opt.* **1**, 4, 501-506.
- Yablonovitch, E. 1987. Inhibited Spontaneous Emission in Solid-State Physics and Electronics. *Phys. Rev. Lett.* **58**, 20, 2059-2062.
- Yershov, G., *et al.* 1996. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10, 4913-4918.
- Zhou, X. C., L. Q. Huang et S. F. Y. Li. 2001. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance : comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 1-2, 85-95.

Table des figures

1.1	Diagramme de Jabłonski.	4
1.2	Modification des taux de transition	7
1.3	Exaltation de la fluorescence intrinsèque de l'ADN	9
1.4	$Cy3^{TM}$, $Cy5^{TM}$, $Cy7^{TM}$: spectres d'absorption et formules développées	12
1.5	Principe de la détection de fluorescence	13
1.6	Schéma du microscope de fluorescence	13
1.7	Effet de la taille sur la couleur des NPs d'or	16
1.8	Excitation du plasmon dans une nanoparticule métallique	17
1.9	Dispersion des plasmons à l'interface argent/air	18
1.10	Couplage aux plasmons de surface sur une surface métallique plane	21
1.11	Configuration d'Otto et de Kretschmann	22
1.12	Kretschmann : accord des vecteurs d'onde	23
1.13	Diffusion des plasmons de surface sur un réseau de Bragg	24
1.14	Effet d'un miroir sur les durées de vie de fluorescence	26
1.15	Effet d'un miroir sur les lobes d'émission	27
1.16	Distribution de l'énergie émise par le dipôle	28
1.17	Couplage du champ dipolaire avec une surface métallique	29
1.18	Fraction d'énergie dissipée radiativement et non-radiativement	30
1.19	Émission d'un fluorophore couplé à un réseau métallique	34
1.20	Image de fluorescence exaltée autour d'une nanoparticule	37
1.21	Exaltation du champ local autour d'une nanoparticule	38
1.22	Exaltation de Rh6G sur un film d'îlots d'argent	41
1.23	Contributions à l'exaltation du rendement quantique apparent	42
1.24	ADN et chromosome	46

1.25	<i>AmplislideTM</i> de <i>Genewave</i>	51
2.1	Vue extérieure du bâti d'expérience	55
2.2	Vue intérieure du bâti de dépôt ultra-vide	55
2.3	Cellule de Knudsen	56
2.4	Schéma de principe de l'AFM	60
2.5	Trois types d'imagerie en AFM mode contact	61
2.6	Caractérisation de la déviation d'un profil unidimensionnel	62
2.7	Principe de la mesure différentielle d'absorption optique	65
2.8	Technique du dépôt par <i>spin-coating</i>	66
2.9	Principe de la puce à ADN	68
2.10	Greffage des sondes sur la puce à ADN	69
2.11	Réaction de silanisation	70
2.12	Hybridation sur une puce à ADN	71
2.13	Disposition de microscopie de fluorescence biphotonique	77
2.14	Configurations de spectroscopie de fluorescence	80
2.15	Interaction émetteur/surface : géométrie des systèmes modélisés.	81
2.16	Orientation relative du dipôle : système de coordonnées (θ, ϕ)	84
2.17	Exaltation pour un échantillon biologique : système modélisé.	85
2.18	Perte du stigmatisme de l'objectif devant un miroir	87
3.1	Morphologie et couleur de films d'argent nanostructurés	91
3.2	Spectres d'extinction de films d'argent nanostructurés	91
3.3	Accordabilité de la résonance plasmon d'îlots d'argent	92
3.4	Couplage nanoparticule/fluorophore à l'excitation	93
3.5	Fluorescence monophotonique exaltée sur un film nanostructuré	94
3.6	Fluorescence mono- et bi-photonique exaltée sur un film métallique	96
3.7	Déclin de fluorescence sur un film nanostructuré	97
3.8	Déplacement spectral de l'émission sur un film nanostructuré	98
3.9	Influence de la distance de séparation métal/fluorophore	100
3.10	Facteur d'exaltation $G = f(e_{Ag}, d)$	101
4.1	Intensité relative d'excitation	105

4.2	Variation relative du rendement quantique	106
4.3	Influence du rendement quantique initial	107
4.4	Distribution angulaire de la puissance rayonnée	109
4.5	Variation relative de l'efficacité de collection	110
4.6	Rendement quantique apparent (calcul théorique).	111
4.7	Facteur d'exaltation théorique et expérimental	112
4.8	Exaltation en fonction de l'O.N. de collection	114
4.9	Fluorescence biphotonique : exaltation à l'excitation et à l'émission	115
4.10	Intensité et durée de vie de fluorescence (à 2 photons)	117
4.11	Exaltation théorique en fonction de l'épaisseur de l'échantillon.	121
4.12	Échantillon épais sur lame miroir : lobes d'émission	122
4.13	Enveloppe de la somme des lobes d'émission de tous les fluorophores	122
4.14	Échantillon épais : influence de l'O.N. de collection	124
4.15	Effet du photoblanchiment sur l'émission de fluorescence	125
4.16	Self-quenching des fluorophores	128
4.17	Saturation des fluorophores	129
4.18	Rapport d'intensité de fluorescence <i>Accepteur/Donneur</i>	132
4.19	Efficacité de FRET	133
5.1	Topographie de films d'argent nanorugueux (images AFM)	140
5.2	Images TEM de films d'argent nanorugueux	142
5.3	Distribution de fréquences spatiales	142
5.4	Exaltation sur un film nanorugueux en fonction de la distance	145
5.5	Exaltation comparée sur des films d'argent nanorugueux et plan	146
6.1	Mesure de l'épaisseur équivalente d'une couche de polymère	151
6.2	Puce à ADN sur un miroir plan	153
6.3	Puce à ADN sur un film rugueux	154
6.4	Puce à ADN : dispersion du signal	156
7.1	Imagerie cellulaire plein-champ sur une lame miroir	163
7.2	Images de fluorescence correspondant aux trois biomarqueurs	164
7.3	Profils d'intensité du signal à travers deux cellules	165

7.4	Distribution du signal de fluorescence des biomarqueurs	166
7.5	Influence de l'O.N. sur l'exaltation du signal en imagerie plein-champ .	168
7.6	Imagerie histologique et analyse cytogénétique sur une lame miroir . . .	172

Liste des tableaux

2.1	Sondes fluorescentes et filtres optiques pour l'analyse cytogénétique . . .	74
2.2	Filtres optiques pour l'imagerie cellulaire	75
4.1	Exaltation de la fluorescence : comparaison modèle/expérience	113
4.2	Mesure expérimentale de la photostabilité des fluorophores.	126
5.1	Paramètres de rugosité des films d'argent nanorugueux	139
5.2	Variation relative de la rugosité des films d'argent	141
5.3	Exaltation de fluorescence sur des films d'argent nanorugueux	144
6.1	Dispersion du signal sur une puce à ADN	157
7.1	Distribution du signal des sondes mitochondriales (voir Fig. 7.4)	167

Résumé :

La fluorescence d'une molécule est sensible à son environnement électromagnétique. La présence d'une structure métallique modifie l'excitation et l'émission des fluorophores, par le jeu d'interférences et de couplages avec les plasmons de surface. Nous avons élaboré et caractérisé des films métalliques de différentes morphologies (films de nanoparticules, percolés, continus, plans, rugueux. . .). Leur influence sur la réponse optique des fluorophores a été étudiée par la modélisation puis l'expérience, en fonction de la distance fluorophore-métal et de l'orientation moléculaire. Une amplification d'un à deux ordres de grandeur du signal détecté est observée, ainsi qu'une photostabilisation des fluorophores et une modification des transferts d'énergie intermoléculaires. Nous démontrons l'intérêt de cette technologie pour améliorer la sensibilité dans les puces à ADN et pour l'imagerie des cellules et des tissus.

Mots-clés : exaltation de fluorescence ; substrat miroir ; film métallique nanostructuré ; plasmon de surface ; puces à ADN ; imagerie cellulaire.

Abstract :

Molecule fluorescence is subject to the influence of its electromagnetic environment. Excitation and emission processes can be modified by the presence of a metallic structure, due to interference phenomena and coupling to surface plasmons. We elaborated and characterized metal films ranging in morphology from nanoparticles to percolated, continuous, plane and rough films. Their influence on fluorophore optical behavior was investigated by experiment and theoretical model, as a function of fluorophore-to-metal distance and molecular orientation. The detected signal is found to be amplified by one to two orders of magnitude. We moreover report fluorophore photostabilization and the modification of intermolecular energy transfer processes. We demonstrate the interest in this technology for sensitivity improvement of DNA chip and for application in cell and tissue imaging.

Keywords : fluorescence enhancement ; mirror substrate ; nanostructured metal film ; surface plasmon ; DNA-chip ; cell imaging.