



HAL
open science

Modes de vibration de nano-objets : des nanoparticules métalliques aux virus biologiques

Bruno Stephanidis

► **To cite this version:**

Bruno Stephanidis. Modes de vibration de nano-objets : des nanoparticules métalliques aux virus biologiques. Physique [physics]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT : . tel-00294763

HAL Id: tel-00294763

<https://theses.hal.science/tel-00294763>

Submitted on 10 Jul 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

**Modes de vibration de nano-objets :
des nanoparticules métalliques aux virus biologiques**

Présentée devant
l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1

pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité :
PHYSIQUE

par
Bruno Stephanidis

Thèse soutenue le 22 janvier 2008 devant la Commission d'examen

Jury

M. ALAIN POLIAN	Directeur de Recherche	Rapporteurs
M. LUCIEN SAVIOT	Chargé de Recherche	
M. PATRICE GOUET	Professeur	Examineurs
MME MARIE-FRANCE JOUBERT	Directeur de Recherche	
MME VÉRONIQUE BOUTOU	Chargé de Recherche	
M. ALAIN MERMET	Maître de Conférence	Directeur de thèse
M. BERNARD CHAMPAGNON	Professeur	Membre Invité

LPCML - UMR CNRS 5620 - Université Claude Bernard
10 rue A.M. Ampère, 69622 Villeurbanne Cedex (FRANCE)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

*« It's difficult to find a black cat in a dark room, especially if there's no
cat. »*

Proverbe chinois

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Je tiens à remercier Christian Pédrini et Marie-France Joubert qui se sont succédés à la tête du laboratoire pour m'avoir accueilli au sein de leur unité.

Je souhaiterais également remercier chaleureusement Bernard Champagnon pour son accueil au sein de l'équipe Verres, Nanostructures et Géomatériaux, pour sa disponibilité, ses bons conseils et sa grande gentillesse. Je le remercie aussi pour sa participation à mon jury de thèse.

Ce travail de recherche n'aurait pu aboutir sans Alain Mermet, qui a été le directeur de thèse parfait à tous les points de vue. Alain a su m'encadrer à la fois avec compétence, disponibilité et gentillesse, sa grande expérience lui permettant de me guider au travers des écueils d'un sujet novateur à l'origine duquel il se trouve. Un très grand merci à lui, cela a été un grand plaisir de travailler avec lui.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Alain Polian tout d'abord pour avoir accepté de rapporter ce travail et également pour nous avoir permis de mener un certain nombre d'expériences Brillouin dans son laboratoire ; je le remercie aussi pour ses conseils avisés.

Un grand merci également à Lucien Saviot qui a bien voulu rapporter ce manuscrit. Je le remercie aussi de nous avoir permis d'utiliser ses programmes de calcul des fréquences de modes de vibration des nanoparticules et ses animations très pédagogiques qui permettent d'appréhender la nature des modes de vibration.

Je tiens à remercier chaleureusement Patrice Gouet pour ses conseils, sa très grande disponibilité et sa gentillesse. Sans son aide, il nous aurait été impossible de faire croître des cristaux de virus. Je le remercie aussi d'avoir bien voulu se joindre à mon jury de thèse.

Merci également à Véronique Boutou et Marie-France Joubert pour leur participation à mon jury de thèse et pour leur relecture attentive de mon manuscrit.

Il y a un certain nombre de personnes auxquelles je voudrais exprimer ma reconnaissance puisque ces dernières ont rendu ce travail possible. Un grand merci tout d'abord à Sergei Adichtchev (Sergei Senior) qui s'est joint à nous pendant un peu plus d'un an et a apporté sa contribution sur les expériences, le traitement des (très nombreuses) données, et les discussions qui en ont résulté : ce travail est en grande partie le sien. C'est également un grand sage qui m'a appris à relativiser (voir l'exergue).

Merci à Eugène Duval qui m'a fait profiter de sa grande expérience et de sa

compétence, et qui n'est jamais à court d'idées, notamment à propos de la levée de dégénérescence du mode quadrupolaire des nanoparticules métalliques.

Merci à Sergey-avec-un-y Sirotkin (Junior) Raz, dva, tri Zenitushka, davi! avec qui c'est un grand plaisir de travailler depuis maintenant presque un an.

Merci également à Serge Etienne et Sylvie Migot (Ecole des Mines de Nancy) avec qui nous avons eu une collaboration fructueuse sur les verres Saint-Louis.

Merci aussi à Serge Orival pour les améliorations apportées au dispositif expérimental.

Je voudrais également dire ma reconnaissance à Alexander McPherson de l'Université de Californie (STMV), Laure Franqueville, Pierre Boulanger, du Laboratoire de Virologie de l'université Lyon 1 (Adénovirus), Eric Larquet, Nicolas Boisset, de l'IMPMC, Paris VI (BMV, TBSV), James Van Etten, de Université de Nebraska-Lincoln (PBCV-1). Merci à Claudine Garapon du LPCML pour la couche de BSA.

Merci aussi à Claudio Masciovecchio, Alessandro Gessini et Silvia Di Fonzo pour les expériences sur le synchrotron ELETTRA à Trieste. Merci à Juliette Tuillon-Combes du LPMCN, Lyon 1 pour les expériences sur les agrégats et à Stéphane Roux, du LPCML, pour pas mal de choses, des nanoparticules d'or sur virus en passant par la diffusion élastique de lumière. Un grand merci à Armel Descamps du CLAMS (INSA Lyon) pour les très nombreuses observations AFM.

Un grand merci aussi aux membres du laboratoire et en particulier à tous les membres de l'équipe Verres et Nanostructures qui ont contribué à la bonne ambiance de travail et qui m'ont souvent aidé à surmonter les moments difficiles (comment oublier Françoise et ses Chocobons!). Mille mercis aux copains du labo, Léna avec qui j'ai partagé un bureau pendant trois ans, Julien *aka* Narn Moon *aka* Lapin, frangin de thèse et l'un des tout meilleurs au *finish* de gâteaux (avec un peu d'aide il est vrai...), Camille *aka* Cam(omille) *aka* Bricole Girl, grande arbitre internationale du *finish* de gâteaux, agent de la DCRI (anciennement RG) en infiltration au labo et accessoirement responsable des ventes de CD d'Untchak vers le Puy (ça aide pour la couverture), Laure, également grande arbitre internationale du *finish* de gâteaux et accessoirement responsable des ventes de CD d'Untchak en Avignon (meilleure employée du mois, plus de 20 CD à ce jour, j'attends vos commandes les autres), Arnaud *aka* Frisette *aka* Nono et Thierry, qui n'ont jamais refusé l'entrée de leur bureau à des thésards affamés (donc dangereux) pour un petit pot, Clément, Guillaume *aka* Bubu *aka* Bub *aka* Kao, Val (oui cheffe!), grand Boubou et petit Boubou, Philippe, Vincent, Théo, Romain.

Merci aux copains de Paris, de La Toute Folle, Sophie, Jérémie, d'Untchak Attak, Julien, Déborah et Rose, Thomas, Hicham, Sylvie et Diya, Nico et Mathis.

Merci à mes parents et à Anne.

Table des matières

Table des matières	i
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	xi
Introduction	1
1 Dynamique de nano-objets	3
1.1 Modes propres d'une sphère	3
1.1.1 Quelques rappels sur la théorie de l'élasticité	4
1.1.2 Sphère élastique homogène libre	5
1.1.3 Calcul des modes propres de vibration	11
1.1.4 Lien avec les virus	12
1.2 Les virus	13
1.2.1 Définition	14
1.2.2 Structure des virus	16
1.2.3 Similitudes et différences par rapport à d'autres objets nano- métriques	19
1.2.4 Les méthodes d'étude structurale des virus	21
1.2.5 Apports d'une étude dynamique	24
2 Les diffusions inélastiques de lumière	29
2.1 Principes de la diffusion inélastique de lumière	30
2.1.1 Description du phénomène	30
2.1.2 Origine de la diffusion inélastique	33
2.1.3 Diffusion Brillouin	35
2.1.4 Diffusion Raman	38
2.2 Outils spectroscopiques	41
2.2.1 L'interféromètre Fabry-Pérot multipassage	41
2.2.2 Quintuple monochromateur	47
2.2.3 Applications aux nano-objets et comparaison des deux appareils	48

3	Etude de nanoparticules métalliques	51
3.1	Échantillons	52
3.2	Les mesures d'absorption	53
3.2.1	Origine physique du plasmon de surface	54
3.2.2	Résultats	55
3.2.3	Influence du recuit sur la position de la résonance	58
3.2.4	Influence du recuit sur la largeur de la résonance	59
3.3	Microscopie électronique en transmission	63
3.4	Raman résonnant	63
3.4.1	Mesures Raman basse résolution	65
3.4.2	Mesures Raman haute résolution	67
4	Expériences sur les virus	77
4.1	Les virus étudiés	77
4.1.1	Les phytovirus	78
4.1.2	Un virus humain : l'adénovirus	81
4.2	Calcul des modes de vibration	82
4.3	Solutions	84
4.4	Comment exalter le signal du virus ?	85
4.4.1	Par effet S.E.R.S.	85
4.4.2	Diffusion inélastique d'UV	86
4.5	Couches bidimensionnelles	91
4.5.1	Elaboration des couches	92
4.5.2	Caractérisation des couches 2D par MET et AFM	93
4.5.3	Expériences de diffusion de lumière	95
4.6	Cristaux de virus	101
4.6.1	Elaboration des cristaux	101
4.6.2	Caractérisation des cristaux	103
4.6.3	Expériences de diffusion de lumière	106
4.7	Retour sur les solutions : PBCV-1	113
	Conclusion	117
	A Quasi-équivalence	121
	B Géométries de diffusion utilisées	127
	C La ligne IUVS	131
	D Abréviations utilisées	133
	Bibliographie	135

Liste des figures

1	Observation par microscopie optique de cristaux de virus encapsulant des nanoparticules d'or. La teinte brune des cristaux est caractéristique de la résonance plasmon de surface des nanoparticules d'or [1].	2
1.1	Illustration des déplacements de différents types de modes propres de vibration d'une sphère élastique pour différentes valeurs de l [2]. A gauche sont représentés des modes torsionnels, à droite, des modes sphéroïdaux.	10
1.2	Panorama et classification du monde viral en 2005.	15
1.3	Symétries de l'icosaèdre	17
1.4	Méthode de découpage d'un réseau hexagonal pour former un icosaèdre : par pliage, tous les sommets d'ordre 6 deviennent des sommets d'ordre 5.	18
1.5	Disposition de sous-unités équivalentes dans un réseau hexagonal. Chaque triangle contient trois sous-unités interagissant par l'intermédiaire d'axes 6 (chiffres 1-5), d'axes 3 (chiffres 2-3) et d'axes 2 (4-4).	18
1.6	Structure hélicoïdale du TMV (d'après [3]).	20
1.7	A gauche : Image par MET du virus de la mosaïque du brome (BMV). A droite : Résultats de mesures SAXS sur une solution de BMV [4]. Le trait noir représente le facteur de forme du BMV ; le trait rouge correspond au facteur de forme simulé d'une sphère creuse.	21
1.8	Observation du TMV par AFM. Image à deux dimensions (à gauche) et profil tridimensionnel (à droite). On distingue sur ces images les tubes de TMV orientés pour certains parallèlement au plan du substrat et pour les autres quasiment perpendiculairement.	23
1.9	Modélisation de la transition compact/gonflé du TBSV [5].	25
1.10	Représentation de quelques modes du poliovirus calculés par NMA [6] : en haut, des modes sphéroïdaux similaires — à gauche — à un mode radial et — à droite — au mode quadrupolaire ; en bas sont représentés des modes torsionnels.	26
1.11	Amplitude et direction du mouvement pour le CCMV (a) obtenues en calculant la différence entre les coordonnées de la forme compacte et celle de la forme gonflée (b) pour le mode de respiration [7].	27

2.1	Schéma d'un spectre de diffusion inélastique de lumière.	31
2.2	Diagrammes représentant la conservation du moment au cours de la diffusion inélastique d'un photon : (a) processus Stokes, (b) processus anti-Stokes, (c) cas particulier où l'indice de réfraction n est isotrope et où $\omega \ll \omega_0$	32
2.3	Diagramme montrant la relation entre \vec{r} , \vec{R} , le vecteur d'onde incident \vec{k}_0 , le vecteur d'onde diffusé \vec{k} et l'angle de diffusion θ	34
2.4	Diagramme décrivant le processus de diffusion inélastique de la lumière d'un point de vue quantique : (a) Emission d'un phonon (processus Stokes); (b) absorption d'un phonon (processus anti-Stokes).	37
2.5	Schéma de la première zone de Brillouin pour une chaîne linéaire diatomique montrant la relation de dispersion pour les phonons acoustiques et optiques (le paramètre de maille est égal à a). Seule la moitié de la zone de Brillouin est représentée, l'autre moitié pouvant être déduite de la première par symétrie par rapport à l'axe des ordonnées.	39
2.6	Spectre de transmission d'une cavité Fabry-Pérot.	42
2.7	Fonction de transmission I_t du spectromètre tandem Fabry-Pérot (3+3 passages) d'après [8].	44
2.8	Montage expérimental.	46
2.9	Schéma du quintuple monochromateur Z40 [2].	48
2.10	Spectres Brillouin (ou Raman basse fréquence) d'opales formées de billes de polystyrène [9]. Images (vue du dessus) par microscopie à balayage des opales déshydratées (a) et hydratées (b). Le diamètre des particules est de 256 nm et la barre d'échelle est égale 200 nm . (c) Spectre Brillouin des opales déshydratées. Les différents pics correspondent aux modes de vibration des billes de polystyrène. (d) Spectres Brillouin et fits à deux lorentziennes pour les opales hydratées à différents vecteurs d'onde q (de bas en haut, valeurs de q croissantes comprises entre $1.44 \cdot 10^{-2} \text{ nm}$ et $1.60 \cdot 10^{-2} \text{ nm}$).	49
2.11	Spectres Raman basse fréquence d'un échantillon de verre Saint-Louis dopé à l'or. En bleu, spectre enregistré avec le tandem Fabry-Pérot ($\lambda = 532 \text{ nm}$); en rouge, spectre enregistré avec le quintuple monochromateur Z40 ($\lambda = 514.5 \text{ nm}$). Les lignes pointillées figurent la position du pied de la raie élastique.	50
3.1	Echantillons de verre dopé à l'or (de haut en bas, du moins recuit au plus recuit).	53
3.2	Spectres d'absorption des verres Saint-Louis dopés à l'or (recuits à 455°C) pour des durées de recuit s'échelonnant entre $2h$ et $64h$. L'encart montre l'évolution de la position du maximum d'absorption avec la durée du recuit.	56
3.3	Spectres d'absorption des verres Saint-Louis dopés à l'or (recuits à 470°C) pour des durées de recuit s'échelonnant entre $1h$ et $64h$. L'encart montre l'évolution de la position du maximum d'absorption avec la durée du recuit.	57

3.4	Spectres d'absorption des verres Saint-Louis dopés à l'or (recuits à 490°C) pour des durées de recuit s'échelonnant entre 1h et 64h. L'encart montre l'évolution de la position du maximum d'absorption avec la durée du recuit.	57
3.5	Spectre d'absorption de l'échantillon recuit pendant 64 h à 470 °C (○). Les (△) représentent le spectre d'absorption d'une particule d'or unique d'environ 100 nm de diamètre [10]. En traits pleins le spectre calculé dans l'approximation dipolaire. Dans l'encart d'après la référence [2], les spectres d'absorption d'un échantillon de nanoparticules d'or dans une matrice de silice recuit à 800 °C (traits pleins) et à 1000 °C (pointillés).	58
3.6	Parties réelle (ϵ_1^{Au}) et imaginaire (ϵ_2^{Au}) de la fonction diélectrique de l'or massif. Les (○) sont les données de la référence [11]. Les <i>fits</i> sont en traits pleins [12].	61
3.7	Spectre d'absorption de l'échantillon recuit pendant 64 h à 470 °C (○) et son <i>fit</i> (traits pleins).	62
3.8	Diagramme représentant les différentes valeurs prises par Γ en fonction de $1/R$. Les valeurs de R sont déduites des mesures Raman basse fréquence. Les (●) sont les valeurs données par les fits des spectres d'absorption (série à 470 °C). La droite représente le meilleur fit linéaire de ces données.	62
3.9	Echantillon de verre Saint-Louis non recuit.	64
3.10	Echantillon recuit : les flèches indiquent les nanoparticules.	64
3.11	Echantillon recuit (observé à plus fort grandissement).	64
3.12	Spectres Raman « basse résolution » des échantillons Saint-Louis dopés à l'or (série à 470 °C). On rappelle que $1\text{ cm}^{-1} \equiv 30\text{ GHz}$. En encart, les dimensions des nanoparticules telles que déduites de (○) la fréquence du mode quadrupolaire et (●) de la fréquence du mode sphérique.	66
3.13	Spectres Raman basse fréquence des échantillons de verre Saint-Louis recuits à 455 °C.	68
3.14	Spectres Raman basse fréquence des échantillons de verre Saint-Louis recuits à 470 °C.	69
3.15	Spectres Raman basse fréquence des échantillons de verre Saint-Louis recuits à 490 °C.	69
3.16	Fit à quatre lorentziennes (traits pleins) du spectre de l'échantillon (○) recuit pendant 68 h à 470 °C.	70
3.17	Rapports entre les fréquences des modes sphérique et quadrupolaire pour les différentes températures de recuit.	71
3.18	(a) Cliché (MET) d'une nanoparticule d'or dans la matrice vitreuse (échantillon Saint-Louis recuit pendant 68 h à 470 °C). (b) Représentation d'un cuboctaèdre tronqué inscrit dans un cube d'arête a dont les faces sont confondues avec ses faces octogonales.	71

3.19	Comparaison entre les données expérimentales (symboles) tirées des fits des spectres pour la série d'échantillons recuits à $470^{\circ}C$ et les valeurs théoriques (traits pleins) des rapports de fréquence entre les modes ($l = 0$), T_{2g} , E_g et le mode ($l = 2$) en fonction de la durée du recuit. L'échelle supérieure donne les valeurs du diamètre moyen \bar{D} calculées à partir de ν_{quad}	74
3.20	Evolution de la taille des nanoparticules calculées à partir de la relation (3.13) en fonction de la durée de recuit et pour les trois températures de recuit.	75
4.1	Profil de densité radiale du STMV (d'après [13]). En encart la reconstruction tridimensionnelle du STMV.	78
4.2	Reconstructions tridimensionnelles du TBSV (à gauche) et du BMV (à droite)[14].	80
4.3	(A) Reconstruction tridimensionnelle de PBCV-1. (B) En haut : section à partir de (A) selon la ligne continue avec la représentation des axes de symétrie 2, 3 et 5 de la capsid. Les flèches blanches indiquent la membrane lipidique qui apparaît comme une bande diffuse qui suit le contour de la capsid. En bas : section selon la ligne pointillée en (A). On observe une structure fibrillaire pointant en dehors de la capsid (flèche noire). A part la membrane lipidique on ne distingue pas le matériel génétique à l'intérieur du virion. L'invisibilité du matériel génétique indique que celui-ci ne possède pas les symétries de l'icosaèdre et non pas qu'il est absent. D'après la référence [15].	81
4.4	Schéma de l'adénovirus.	82
4.5	Spectres Brillouin de solutions d'adénovirus. (a) En suspension dans une solution aqueuse. (b) En suspension dans une solution de glycérol (symboles noirs : témoin ; symboles rouges : virus).	85
4.6	Observations par microscopie électronique de virions (adénovirus) sur lesquels sont greffés des nanoparticules d'or par l'intermédiaire d'un anticorps (d'après [16]). A la plupart des virions (au contraste clair) sont fixées une ou deux nanoparticules (au contraste sombre). L'échelle est donnée par les particules d'or (10 nm de diamètre).	86
4.7	Spectre d'absorption d'une solution de TBSV.	87
4.8	Diagramme énergie/moment d'après [17]. Les domaines d'investigation des différentes techniques de diffusion inélastique sont schématiquement représentés. BLS : Brillouin Light Scattering ; IUVS : Inelastic UV Scattering ; IXS : Inelastic X-ray Scattering ; INS : Inelastic Neutron Scattering. $1\text{ meV} = 8\text{ cm}^{-1} = 240\text{ GHz}$	89
4.9	Spectres d'une solution de TBSV à 5.1 eV (en noir) et 5.6 eV (en bleu). En encart, un spectre de l'eau.	90
4.10	Spectres IUVS d'une solution de sulfate d'ammonium (traits pleins) et d'un cristal de STMV (pointillés). Les flèches indiquent les pics Brillouin de la solution de sulfate d'ammonium (à basse fréquence) et ceux du liquide d'indice (à plus haute fréquence).	91

4.11 Cliché MET d'un réseau 2D de BMV. Le cliché montre un réseau hexagonal très compact et bien organisé de virus. Les variations de contraste sont dues à une répartition inhomogène du colorant. L'échelle est donnée par le diamètre d'un virus $D = 28 \text{ nm}$	94
4.12 Clichés AFM de réseaux 2D de TBSV formés sur des lamelles de mica (voir texte).	96
4.13 Cliché AFM d'un réseau de BMV réalisé à partir d'une solution dégradée de virus.	97
4.14 Spectres Brillouin d'une lame de mica avec (pointillés) et sans virus (trait plein) en rétrodiffusion à $\lambda = 514.5 \text{ nm}$	98
4.15 Influence de la variation de l'angle ϕ sur la position des pics du mica et de la couche de virus. En encart : description de ϕ	98
4.16 Spectre Brillouin d'un dépôt de TBSV sur une lame de silice en rétrodiffusion à $\lambda = 532 \text{ nm}$. A $\nu \sim 19.0 \text{ GHz}$, pic du dépôt de virus ; à $\nu \sim 32.5 \text{ GHz}$, pic du substrat.	100
4.17 Spectre Brillouin d'un film de protéine (BSA) en rétrodiffusion à $\lambda = 532 \text{ nm}$. A $\nu \sim 19.2 \text{ GHz}$, pic du film de protéine ; à $\nu \sim 32.5 \text{ GHz}$, pic du substrat.	101
4.18 (a) Puits de cristallisation. (b) Diagramme de phase d'un virus ou d'une protéine. Le trait représente l'évolution du système dans le puits de cristallisation.	103
4.19 Cristaux de virus (STMV) dans un capillaire (a) ou collé sur une pointe (b). En (c) et (d) on peut voir à petit et plus fort grandissement un cristal entre deux lamelles de verre. Les cristaux font entre 200 et 300 μm de long.	104
4.20 Observation par AFM d'un cristal de STMV sec.	105
4.21 Spectres Brillouin polarisés verticalement (VV) d'un cristal de STMV hydraté (traits pleins) et d'un cristal de lysozyme hydraté (pointillés).	107
4.22 Spectres polarisé (trait plein) et dépolarisé (pointillés) d'un cristal de STMV hydraté (côté anti-Stokes uniquement). Le pic à 30 GHz est le signal du capillaire contenant le cristal.	110
4.23 Spectres polarisé (trait plein) et dépolarisé (pointillés) d'un cristal de STMV sec (côté anti-Stokes).	111
4.24 Spectres polarisé (●) et dépolarisé (trait plein) d'une solution de PBCV-1 diluée 20 fois. Le spectre dépolarisé est le résultat d'une acquisition très longue (plus de 12 h) ; le spectre polarisé a été pris en moins de 2 minutes.	114

4.25	En haut : spectres Brillouin dépolarisés de la solution de PBCV-1 diluée 20 fois pour différentes valeurs de qD avec leurs ajustements à deux lorentziennes. En bas sont représentés les points correspondants dans la relation de dispersion. (●) : signal de la solution ; (★) : signal du virus. La droite passant par l'origine (pointillés) est le meilleur fit des (●). La première flèche pointe sur un point de la courbe qui est litigieux du fait de la mauvaise statistique du spectre correspondant : sa position demande à être confirmée par des mesures supplémentaires. L'autre flèche indique la valeur maximale de qD accessible au laboratoire. La taille des barres d'erreur est de l'ordre de la taille des symboles utilisés.	115
4.26	Spectres Raman basse fréquence d'un verre Saint-Louis pour différentes durées de recuit à 490°C. Les lignes pointillées sont des guides.	118
4.27	Image par microscopie électronique en transmission de nano-bâtonnets d'argent (un échantillon de Polarcor 600, Corning).	118
4.28	Synthèse de réseaux tridimensionnels de nanoparticules d'or : I. Encapsulation des particules d'or fonctionnalisées dans le virus de la mosaïque du brome [1].	119
4.29	Synthèse de réseaux tridimensionnels de nanoparticules d'or : II. par auto-organisation du virus de la mosaïque du brome [1].	120
A.1	Construction par découpage d'un réseau hexagonal d'icosaèdres $T = 1$ (a), 3 (b), 4 (c) et 7 (d). Les découpages du tétraèdre (T) et de l'octaèdre (O) sont également indiqués (d'après [3]).	122
A.2	Arrangement des sous-unités asymétriques — schématisées par les virgules — sur des sphères de réseau icosaédrique $T = 1$ (a) et $T = 3$ (b) [18].	123
A.3	Agencement des unités morphologiques pour deux virus de $T = 3$, par dimères pour le TBSV (à gauche) et par pentamères/hexamères pour le BMV (à droite)[14].	124
A.4	Exemples de virus isométriques (voir aussi planche suivante) : reconstructions tridimensionnelles à partir de clichés de cryomicroscopie électronique.	125
A.5	Exemples de virus isométriques (suite).A titre de comparaison, le monomère d'une protéine, la bactériorhodopsine est représenté [19].	126
B.1	Différentes géométries de diffusion.(a) 90°, (b) rétrodiffusion, (c) 90°A, (d) 90°R. V volume diffusant ; Ech échantillon ; \vec{k}_0 et \vec{k} vecteurs d'onde incident et diffusé ; \vec{q} moment transmis à l'échantillon.	128
B.2	Spectres Brillouin de l'échantillon Saint-Louis recuit à 490 °C pendant 1 h pris à 90° (symboles verts) et 90° A (symboles bleus). Les traits pleins représentent les ajustements du pic longitudinal dans les deux géométries.	130

C.1 Schéma de la ligne de diffusion inélastique d'UV à ELETTRA. En
encart, la fonction de résolution du monochromateur. 132

Liste des tableaux

1.1	Valeurs des fréquences de quelques modes de vibration sphéroïdaux d'une nanoparticule d'or de 6 nm de diamètre. Les trois premiers modes ($n = 1 \dots 3$) du mode radial $l = 0$ et des modes $l = 1$ et $l = 2$ sont répertoriés. Entre parenthèses, les valeurs avec la matrice.	12
2.1	Ordres de grandeur de certaines énergies de vibration (en cm^{-1}).	30
2.2	Paramètres expérimentaux du montage utilisant le tandem Fabry-Pérot.	47
2.3	Paramètres du spectromètre Z40.	48
3.1	Composition massique du verre Saint-Louis.	53
3.2	Valeurs de la masse effective de l'électron m_e (normalisée par la masse de l'électron libre m_0), de la densité électronique n_e , de la vitesse de Fermi v_F , du libre parcours moyen des électrons l_∞ , de l'énergie du plasmon de volume $\hbar\omega_p$, du seuil des transitions interbandes et du plasmon de surface $\hbar\omega_{ps}$ dans le vide pour deux métaux nobles l'or et l'argent, et un alcalin, le sodium (d'après [20]).	55
3.3	Valeurs de la masse volumique et des modules élastiques de l'or et de l'argent à température ambiante.	67
4.1	Fréquences en GHz des modes de vibration de différents virus calculées avec le modèle de la sphère libre. $v_L = 1920\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la sphère « hydratée » ; $v_L = 3430\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la sphère « déshydratée » sauf pour le BMV ($v_L = 3800\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) et le TBSV ($v_L = 3300\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$).	83
4.2	Valeurs de $qD = 4\pi nD/\lambda_0$ pour quelques virus à différentes longueurs d'onde. $n = 1.55$ [21].	88

Introduction

Qu'y a-t-il de commun entre des nanoparticules solides¹ et des virus ? A première vue, peu de choses si ce n'est leur appartenance, du fait de leurs dimensions caractéristiques, à une même classe d'objets, celle des nano-objets. Les premières sont étudiées de manière intensive pour leur propriétés optiques [22] et/ou vibrationnelles [9] remarquables. Les seconds sont des machines biologiques complexes, les plus petites capables de se répliquer de manière autonome, à la frontière entre le vivant et l'inerte. Ces entités sont l'objet de recherches dans des domaines *a priori* opposés. Cependant ces dernières années, sous l'impulsion des sciences des matériaux, ont vu émerger des objets hybrides comme par exemple des cristaux colorés de virus encapsulant des nanoparticules d'or fonctionnalisées (figure 1). Ce type d'expériences met à profit d'une part la capacité à s'auto-assembler des virus et de l'autre les propriétés optiques des nanoparticules métalliques.

Un autre aspect, peut-être moins anecdotique, qui relie nanoparticules solides et virus est le critère de forme : les nanoparticules solides partagent avec (certains) virus la particularité d'avoir une morphologie sphérique, ce qui implique un certain nombre de choses du point de vue de leur dynamique collective. Tout corps est en effet le siège de modes de vibration d'ensemble résultant de la superposition des ondes acoustiques. En particulier les corps « aux dimensions bien fixées sont susceptibles de se comporter comme des résonateurs acoustiques pour des fréquences discrètes »[23].

Comparée à leur structure généralement très bien caractérisée, la dynamique collective des nano-objets est assez mal connue. En une vingtaine d'années, la diffusion inélastique de lumière est devenue un outil puissant dans l'étude de la dynamique des nano-objets solides. Cette technique facile à mettre en œuvre et non destructive permet de mettre en évidence les propriétés dynamiques des nano-objets, d'étudier le couplage entre phonons et plasmon par exemple ou l'influence de la matrice. Ce travail traite de la transposition de cette technique habituellement appliquée à l'étude des modes propres de vibration de nanoparticules solides à la recherche de modes similaires chez les virus.

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres. Le chapitre 1 est consacré à une description rapide des modes de vibration d'une sphère élastique et à leurs calculs. Après avoir fait le lien avec les virus, nous faisons ensuite une brève introduction sur les virus pour les comparer ensuite aux nanoparticules solides. Le chapitre 2

1. comme par exemple les agrégats métalliques nanométriques ou les billes de silice submicrométriques.

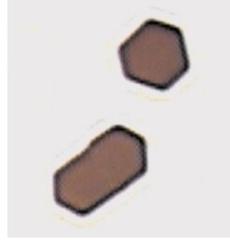


FIGURE 1 – Observation par microscopie optique de cristaux de virus encapsulant des nanoparticules d’or. La teinte brune des cristaux est caractéristique de la résonance plasmon de surface des nanoparticules d’or [1].

revient sur quelques éléments de théorie de la diffusion inélastique de lumière et est l’occasion de présenter dans le détail l’appareil de mesure utilisé, l’interféromètre Fabry-Pérot.

Le chapitre 3 sert en quelque sorte d’introduction à l’utilisation de l’interféromètre Fabry-Pérot et présente les résultats obtenus sur des nanoparticules métalliques enchâssées dans une matrice vitreuse. Le chapitre 3 est aussi l’occasion de discuter de l’apport de la haute résolution par l’interféromètre Fabry-Pérot qui est à l’origine de la détection des levées de dégénérescence associées à l’anisotropie des paramètres élastiques des nanoparticules d’or facettées. Le chapitre 4 a pour objet notre recherche des modes de vibration d’ensemble de virus à morphologie sphérique. Ce dernier chapitre relate chronologiquement notre démarche expérimentale : de l’échantillon le moins concentré à l’échantillon le plus concentré en virus.

Chapitre 1

Dynamique vibrationnelle de nano-objets

Les travaux présentés dans cette thèse sont consacrés à la recherche des modes de vibration de nano-objets « physiques » (dans le sens d'objets comme les agrégats métalliques ou les nanosphères de silice qui sont des sujets d'observations habituels des physiciens) et biologiques. Ce type de modes implique la vibration des objets dans leur ensemble, à la différence des modes de vibration localisés à l'échelle de la liaison moléculaire.

Ce chapitre est consacré dans un premier temps à une courte description et au calcul par la mécanique des milieux continus des modes de vibrations d'un objet de forme sphérique. Nous discutons également de l'applicabilité d'un modèle de type nanosphère pour les virus. Dans un second temps nous faisons une présentation générale sur les virus et dressons une sorte de comparatif entre virus et nanoparticules solides. Nous terminons ce chapitre introductif sur l'intérêt que peut susciter l'étude de la dynamique des virus.

1.1 Modes propres de vibration d'une sphère élastique

L'objectif de cette section est la résolution du problème des modes propres de vibration d'une (nano)sphère élastique. Nous exposons ici uniquement les grandes étapes de la résolution. Pour le calcul détaillé, on pourra se reporter aux références [24, 2] ainsi qu'aux références [25, 26] qui présentent une méthode de résolution un peu différente. L'approche envisagée repose sur plusieurs hypothèses :

- celle du milieu continu qui est valide pour des longueurs d'onde de vibrations grandes devant les distances interatomiques,
- celle d'un milieu isotrope,
- celle des faibles déformations, ce qui implique que les relations entre grandeurs caractérisant les vibrations comme les contraintes et les déformations sont considérées comme linéaires.

1.1.1 Quelques rappels sur la théorie de l'élasticité

Dans ce paragraphe nous présentons très succinctement quelques notions relatives à la théorie de l'élasticité. On pourra se reporter à la référence [27] pour une description de la théorie de l'élasticité.

Définissons dans un premier temps le vecteur déplacement (ou déformation) par

$$\vec{u} = \vec{r}' - \vec{r}, \quad (1.1)$$

avec \vec{r} et \vec{r}' les positions d'un point quelconque dans le solide avant et après la déformation sous l'effet des forces appliquées.

Le tenseur déformation est défini dans un système de coordonnées cartésiennes (x_1, x_2, x_3) par

$$e_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} \right) = \frac{1}{2} (\epsilon_{ik} + \epsilon_{ki}). \quad (1.2)$$

La contrainte est définie comme la force exercée sur une unité de surface du solide. σ_{ik} représente par exemple la force appliquée selon la direction x_i sur une surface unité normale à la direction x_k . (σ_{ik}) désigne le tenseur des contraintes. La divergence de (σ_{ik}) est égale à la force exercée sur un volume unité.

Dans le cas de déformations infinitésimales, la loi de Hooke relie linéairement les composantes du tenseur des contraintes à celles du tenseur des déformations. Dans le cas général, l'expression de la loi de Hooke est la suivante :

$$\sigma_{ij} = C_{ijkl} \frac{\partial u_k}{\partial x_l}, \quad (1.3)$$

les C_{ijkl} étant les modules d'élasticité¹ ayant la dimension d'une contrainte.

L'hypothèse du milieu isotrope réduit le nombre de coefficients indépendants à deux. La loi de Hooke s'exprime dans ce cas-là par

$$\sigma_{ij} = \lambda \delta_{ij} e_{kk} + 2\mu e_{ij}, \quad (1.4)$$

avec λ et μ les coefficients de Lamé.

Les valeurs de ces coefficients sont spécifiques à un matériau donné. Elles peuvent être déduites des valeurs du module d'Young E (homogène à une contrainte) et du coefficient de Poisson ν (sans unité) qui sont directement mesurées par des méthodes rhéologiques. A l'inverse, on peut accéder directement aux modules d'élasticité par des expériences de diffusion de neutrons ou de diffusion inélastique de lumière [28, 29, 30, 31, 32, 33] et remonter après coup au module d'Young et au coefficient de Poisson. E et ν sont reliés aux coefficients de Lamé par les expressions :

$$\lambda = \frac{E\nu}{(1-2\nu)(1+\nu)} \text{ et } \mu = \frac{E}{2(1+\nu)}. \quad (1.5)$$

E correspond à la rigidité du matériau et varie par exemple entre quelques gigapascals pour le caoutchouc et plus de 1000 gigapascals pour des nanotubes de

1. La convention de sommation sur les indices répétés est adoptée.

carbone. ν rend compte de son incompressibilité et varie usuellement entre 0.25 et 0.5 (une valeur de 0.5 correspond au cas d'un matériau parfaitement incompressible). Signalons également que le rapport v_T/v_L dépend uniquement de ν :

$$\frac{v_T}{v_L} = \sqrt{\frac{1-2\nu}{2-2\nu}} \quad (1.6)$$

Comme la divergence du tenseur des contraintes (σ_{ik}) est égale à la force exercée sur un volume unité, l'équation du mouvement est égale, en vertu du principe fondamental de la dynamique et d'après (1.4) à

$$\rho \ddot{\vec{u}} = \vec{\nabla} \cdot \sigma_{ij} = (\lambda + 2\mu) \vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot \vec{u}) - \mu \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{u}). \quad (1.7)$$

Cette équation, appelée équation de Navier, peut se réécrire en fonction de $v_L = \sqrt{\lambda + 2\mu/\rho}$ et $v_T = \sqrt{\mu/\rho}$ les vitesses longitudinale et transverse :

$$\ddot{\vec{u}} = v_L^2 \vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot \vec{u}) - v_T^2 \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{u}). \quad (1.8)$$

Les solutions intéressantes de l'équation de Navier sont les solutions périodiques dans le temps, telles que

$$\vec{u}(\vec{r}, t) = \vec{u}(\vec{r}) \exp -i\omega t \quad (1.9)$$

d'où

$$-\omega^2 \vec{u} = v_L^2 \vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot \vec{u}) - v_T^2 \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{u}). \quad (1.10)$$

1.1.2 Sphère élastique homogène libre

Les modes de vibration d'une sphère sont les analogues à trois dimensions des modes de vibration d'une corde ou d'une chaîne d'atomes linéaire. Ces modes de vibrations quasi-optiques sont des ondes stationnaires résultant de la superposition d'ondes acoustiques propagatives.

À une dimension, pour une chaîne de longueur L , l'équation de Navier (1.10) se résume à

$$-\omega^2 u = v^2 \frac{d^2 u}{dx^2}. \quad (1.11)$$

où v est la vitesse du son le long de la chaîne.

Les solutions dépendent des conditions aux limites. Pour une chaîne fixée à ses deux extrémités, les solutions de (1.11) et les fréquences propres correspondantes sont de la forme :

$$u_n(x) = \sqrt{\frac{2}{L}} \sin(k_n x) \text{ et } \nu_n = \frac{nv}{2L} \quad (1.12)$$

avec $k_n = n\pi/L$ et n un entier supérieur à 0.

Les fréquences des modes de vibrations sont des multiples entiers de la fréquence du mode de vibration fondamental de fréquence $\nu = v/2L$.

Le problème se complique pour les modes de vibration d'objets à deux dimensions (voir par exemple le problème des plaques vibrantes de Chladni [34]) et devient très complexe à trois dimensions. En particulier les fréquences des modes de vibrations ne sont pas des multiples entiers de la fréquence d'un mode fondamental. Mais au même titre qu'à une dimension, les modes de vibration localisés d'objets tridimensionnels résultent de la superposition de modes acoustiques propagatifs.

Horace Lamb fut le premier en 1882 à résoudre le problème général pour une sphère élastique libre [35]. Le problème est extrêmement compliqué pour un objet de forme quelconque mais se simplifie quelque peu pour un objet de forme sphérique du fait de sa haute symétrie. Les objets très symétriques présentent de plus des modes de vibration marqués : ils « se comportent comme un résonateur acoustique pour certaines fréquences discrètes » [23].

À l'époque, la résolution de ce problème était essentiellement perçue comme un moyen d'étudier les modes de vibration de très gros objets comme les planètes, mais les solutions du problème de la sphère élastique sont universelles et sont en général applicables à des objets sphériques de toutes tailles et en particulier à des nanosphères². Le facteur entre la fréquence du mode « ballon » de la Terre³ (environ 0.001 Hz c'est-à-dire plus de 20 mn) et celle de son équivalent pour une nanosphère de moins d'une dizaine de nanomètres (de l'ordre de 0.1 THz) est gigantesque, mais les déplacements associés à ces modes de vibration sont semblables.

Résolution de l'équation de Navier

Les seuls paramètres nécessaires à la résolution de l'équation de Navier dans le cas de la sphère élastique isotrope et libre sont le rayon R , la densité ρ et les vitesses du son v_L et v_T de la sphère. Pour des nanoparticules métalliques par exemple, les trois derniers paramètres sont déduits de ceux du matériau massif puisqu'on peut considérer que la structure des nanoparticules est très proche de celle du matériau massif. Pour des nano-objets biologiques comme les virus, la détermination de ces paramètres et en particulier des vitesses du son peut poser problème (voir section 4.6.3).

Pour résoudre l'équation de Navier, on choisit de se placer dans un système de coordonnées sphériques $(\vec{e}_r, \vec{e}_\theta, \vec{e}_\varphi)$. Il est toujours possible d'exprimer \vec{u} sous la forme de la somme de trois termes, un premier terme à rotationnel nul et deux termes à divergence nulle (décomposition de Helmholtz) :

$$\vec{u} = \vec{\nabla}\phi + \vec{\nabla} \times (\psi\vec{r}) + \vec{\nabla} \times \vec{\nabla} \times (\zeta\vec{r}), \quad (1.13)$$

où ϕ , ψ et ζ sont les potentiels de Helmholtz.

2. Cette universalité est spécifique au modèle de la sphère libre : voir par exemple l'influence de la gravité ou de la force de Coriolis [36] sur les modes de vibration de la Terre ou celle de la viscosité sur les modes de nanosphères plongées dans un liquide [37].

3. voir par exemple le cours sur les oscillations libres de la Terre de M. Van Camp sur le web <http://homepage.oma.be/mvc/>.

On peut montrer (voir [24]) que l'équation (1.13) n'est vérifiée que si et seulement si ϕ , ψ et ζ sont solutions des équations d'onde suivantes :

$$\begin{cases} \ddot{\phi} = v_L^2 \vec{\nabla}^2 \phi \\ \ddot{\psi} = v_T^2 \vec{\nabla}^2 \psi \\ \ddot{\zeta} = v_T^2 \vec{\nabla}^2 \zeta. \end{cases} \quad (1.14)$$

On se ramène ainsi à l'étude de trois équations découplées dont les solutions sont connues et s'expriment à partir des harmoniques sphériques $Y_l^m(\theta, \varphi)$ et des fonctions de Bessel sphériques z_l . l et m sont respectivement le moment angulaire et la projection du moment angulaire selon l'axe z et sont tels que $l \geq 0$ et $-l \leq m \leq l$. Les solutions des équations (1.14) sont de la forme :

$$\begin{cases} \phi(\vec{r}, t) \propto z_l(qr) Y_l^m(\theta, \varphi) \exp(-i\omega t) \\ \psi(\vec{r}, t) \propto z_l(Qr) Y_l^m(\theta, \varphi) \exp(-i\omega t) \\ \zeta(\vec{r}, t) \propto z_l(Qr) Y_l^m(\theta, \varphi) \exp(-i\omega t) \end{cases} \quad (1.15)$$

avec q et Q définis par

$$q = \frac{\omega}{v_L} \text{ et } Q = \frac{\omega}{v_T}. \quad (1.16)$$

Dans la suite les résultats sont exprimés dans un système de coordonnées $(\vec{e}_1, \vec{e}_2, \vec{e}_3)$ dépendant des harmoniques sphériques ce qui simplifie de manière significative les équations [2, 38]. Le nouveau système de coordonnées est défini de la manière suivante :

$$\begin{cases} \vec{e}_1 = Y_l^m(\theta, \phi) \vec{e}_r \\ \vec{e}_2 = \frac{\partial Y_l^m(\theta, \phi)}{\partial \theta} \vec{e}_\theta + \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial Y_l^m(\theta, \phi)}{\partial \phi} \vec{e}_\phi \\ \vec{e}_3 = \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial Y_l^m(\theta, \phi)}{\partial \phi} \vec{e}_\theta - \frac{\partial Y_l^m(\theta, \phi)}{\partial \theta} \vec{e}_\phi \end{cases} \quad (1.17)$$

En particulier, quand $l = 0$, \vec{e}_2 et \vec{e}_3 s'annulent.

D'après (1.10) et (1.13), les composantes du vecteur déplacement dans la nouvelle base sont :

$$\begin{cases} u_1 = \frac{1}{r} [\mathcal{A}_l^m(lz_l(qr) - qrz_{l+1}(qr)) + \mathcal{C}_l^m(l(l+1)z_l(Qr))] \exp(-i\omega t) \\ u_2 = \frac{1}{r} [\mathcal{A}_l^m z_l(qr) + \mathcal{C}_l^m((l+1)z_l(Qr) - Qr z_{l+1}(Qr))] \exp(-i\omega t) \\ u_3 = \mathcal{B}_l^m z_l(Qr) \exp(-i\omega t) \end{cases} \quad (1.18)$$

où \mathcal{A}_l^m , \mathcal{B}_l^m et \mathcal{C}_l^m sont des coefficients dont la valeur dépend de celle du couple (l, m) .

On peut déduire de (1.18) et à partir de la loi de Hooke (1.4) les expressions des différentes composantes du tenseur des contraintes et en particulier de celles

qui nous intéressent pour le calcul des fréquences des modes propres de vibration d'une sphère libre, σ_{1r} , σ_{2r} et σ_{3r} , qui sont les contraintes s'exerçant selon les trois directions de l'espace sur la surface normale au vecteur radial :

$$\left\{ \begin{array}{l} \sigma_{1r} = \frac{2\mu}{r^2} (\mathcal{A}_l^m ((l^2 - l - \frac{Q^2 r^2}{2}) z_l(qr) + 2qr z_{l+1}(qr)) \\ \quad + \mathcal{C}_l^m l(l+1) ((l-1) z_l(Qr) - Qr z_{l+1}(Qr))) \exp(-i\omega t) \\ \sigma_{2r} = \frac{2\mu}{r^2} (\mathcal{A}_l^m ((l-1) z_l(qr) - qr z_{l+1}(qr)) \\ \quad + \mathcal{C}_l^m ((l^2 - 1 - \frac{Q^2 r^2}{2}) z_l(Qr) + Qr z_{l+1}(Qr))) \exp(-i\omega t) \\ \sigma_{3r} = \mathcal{B}_l^m \frac{\mu}{r} ((l-1) z_l(Qr) - Qr z_{l+1}(Qr)) \exp(-i\omega t). \end{array} \right. \quad (1.19)$$

Conditions aux limites : sphère libre

Dans ce cas la sphère élastique est libre de tout mouvement comme si elle était isolée. Cela revient à dire qu'aucune contrainte ne s'exerce sur la sphère soit parce qu'il n'y a pas de contact mécanique entre la sphère et la matrice, soit parce que le contact a peu ou pas d'influence sur les vibrations de la particule (si l'impédance acoustique de la matrice est petite devant celle de la nanoparticule). A l'hypothèse de la sphère libre correspondent les conditions aux limites suivantes :

$$\sigma_{1r} = \sigma_{2r} = \sigma_{3r} = 0 \text{ autrement dit } \vec{\sigma} \cdot \vec{r} = 0. \quad (1.20)$$

L'application de ces trois conditions aux limites permet, en résolvant un système de trois équations à trois inconnues, de calculer les valeurs des paramètres \mathcal{A}_l^m , \mathcal{B}_l^m et \mathcal{C}_l^m introduits plus haut puis de déterminer les fréquences des modes propres de vibration de la sphère élastique libre.

Cas ($l = 0$) Le cas ($l = 0$) est un cas particulier (\vec{e}_2 et \vec{e}_3 sont nuls) pour lequel les fréquences des modes de vibration de la sphère sont données par les racines de l'équation suivante :

$$\frac{\tan(qR)}{qR} = \frac{1}{1 - \frac{1}{4} \left(\frac{v_L}{v_T} \right)^2 (qR)^2} \quad (1.21)$$

avec $q = \omega/v_L$.

Le mode ($l = 0$) est appelé mode *radial*, *sphérique* ou encore mode de respiration. Il correspond à un mouvement purement radial de la sphère. Le déplacement $\vec{u}(\vec{r})$ dérive uniquement du potentiel ϕ dans l'expression (1.13) : autrement dit le déplacement est irrotationnel. Ce type de mode est à caractère purement longitudinal.

$$\begin{aligned}
 \vec{u}(\vec{r}, t) &\propto \vec{\nabla} \phi(\vec{r}, t) \\
 &\propto \vec{\nabla} (j_0(qr) Y_0^0(\theta, \varphi) \exp(-i\omega t)) \\
 &\propto j_1(qr) \exp(-i\omega t) \vec{e}_r
 \end{aligned} \tag{1.22}$$

où $z_0 = j_0$ les j_l étant les fonctions de Bessel sphériques de première espèce (solutions non divergentes à l'origine $r = 0$). Nous avons utilisé la relation $j_1 = -j_0'$ et le fait que Y_0^0 était une constante. Les valeurs de $q = \frac{\omega}{v_L}$ et de ω sont celles déduites de la relation (1.21).

Cas ($l \geq 1$) Dans tous les autres cas, les fréquences des modes de vibration de la sphère libre sont données par les racines des deux équations suivantes qui définissent deux types de modes :

$$(l-1)j_l(QR) - QRj_{l+1}(QR) = 0 \tag{1.23}$$

et

$$\begin{aligned}
 &-\frac{(QR)^2}{2}(2l^2 - l - 1 - \frac{(QR)^2}{2})j_l(qR)j_l(QR) \\
 &+ qR(l^3 + 2l^2 - 2l - (QR)^2)j_{l+1}(qR)j_l(QR) \\
 &+ QR(l^3 + l^2 - 2l - \frac{(QR)^2}{2})j_l(qR)j_{l+1}(QR) \\
 &+ qQR^2(2 - l^2 - l)j_{l+1}(qR)j_{l+1}(QR) = 0.
 \end{aligned} \tag{1.24}$$

Les zéros de l'équation (1.23) donnent les fréquences des modes *torsionnels* auxquels correspondent des mouvements de torsion dans la sphère mais sans mouvements de respiration, autrement dit sans changement de forme de la sphère (les modes sont à divergence nulle). Le déplacement $\vec{u}(\vec{r})$ dérive dans ce cas uniquement du potentiel ζ dans (1.13). Les modes torsionnels ont donc un caractère purement transverse.

L'équation (1.24) est associée aux modes *sphéroïdaux* qui mélangent mouvements de torsion et de respiration. Le vecteur déplacement dérive alors des deux potentiels ϕ et ψ : la divergence et le rotationnel du déplacement sont tous deux non nuls. Ces modes propres de vibration de la sphère ont un caractère mixte, à la fois longitudinal et transverse. La proportion « longitudinal/transverse » est variable d'un mode sphéroïdal à l'autre et constitue un critère de classification supplémentaire entre modes majoritairement longitudinaux et modes principalement transverses [39]. Un mode principalement transverse aura ainsi un déplacement radial très faible.

La figure 1.1⁴ représente schématiquement différents types de modes de vibration d'une sphère libre.

On verra dans la suite que seuls les modes de type radial ($l = 0$) et les modes sphéroïdaux ($l = 2$) sont détectables par diffusion inélastique de lumière (voir paragraphe sur les règles de sélection 2.1.4).

4. voir également les animations sur la page web de Lucien Saviot, <http://icb.u-bourgogne.fr/Nano/MANAPI/saviot/deform/index.html>.

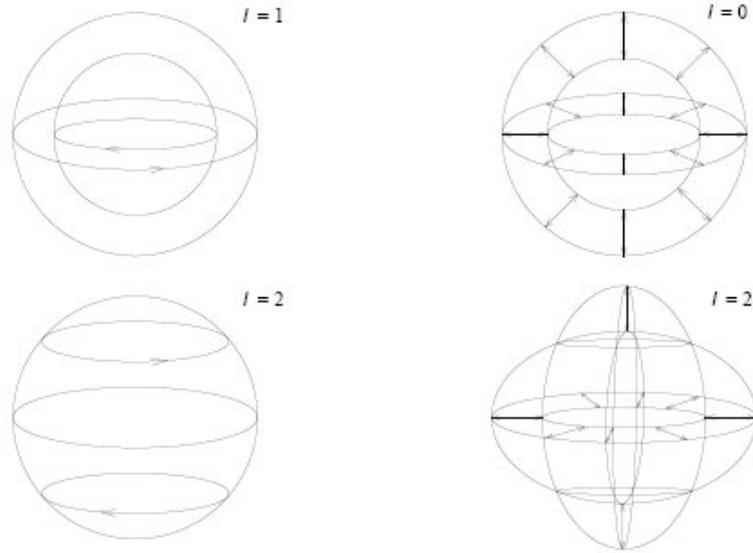


FIGURE 1.1 – Illustration des déplacements de différents types de modes propres de vibration d’une sphère élastique pour différentes valeurs de l [2]. À gauche sont représentés des modes torsionnels, à droite, des modes sphéroïdaux.

Indexation des modes de vibration de la sphère

Une première classification des modes de vibration de la sphère a été donnée précédemment en fonction de leur caractère torsionnel ou sphéroïdal (le mode radial étant un cas particulier parmi les modes sphéroïdaux). Cette distinction est illustrée par la figure 1.1.

La fréquence des modes de vibration pour une valeur de l donnée ne dépend pas de m . Chaque mode de vibration (l, m) de la sphère est $(2l + 1)$ fois dégénéré. Dans certains cas, il peut y avoir une levée de dégénérescence (voir chap. 3), mais m n’indexe pas les modes de vibration. Le nombre n permet d’indexer des modes de même type pour une valeur de l donnée. n est incrémenté de 1 quand la fréquence augmente. $\nu_{l,n=1}$ est donc la fréquence du mode fondamental ($l, n = 1$) et $\nu_{l,n=2,3,4\dots}$ sont les fréquences des modes harmoniques. A la différence du cas de la chaîne d’atomes unidimensionnelle les fréquences des modes harmoniques ne sont pas simplement des multiples entiers de la fréquence du mode fondamental.

Remarques sur le choix des conditions aux limites Nous avons présenté jusqu’à présent un modèle « simplifié », celui de la sphère libre. La situation où l’objet dont on étudie les modes de vibration n’est pas enchâssé dans une matrice est rare, néanmoins ce modèle permet de calculer les fréquences des modes de vibration d’objets sphériques dans le cas où l’influence de la matrice ou l’interface entre la matrice et l’objet par exemple sont mal connues. Le modèle de la sphère libre rend aussi compte de manière réaliste des modes de vibration de nanoparticules métalliques

dans une matrice vitreuse car en général l'impédance acoustique de la matrice est beaucoup plus faible que celle des nanoparticules [40].

Le cas de la sphère bloquée (voir les références [26, 41]) est exactement à l'opposé de celui de la sphère libre. Ce modèle peut s'appliquer dans le cas où l'impédance de la matrice est plus grande que celle de la sphère. En pratique, on se trouve souvent dans une situation intermédiaire entre le modèle de la sphère libre et celui de la sphère bloquée.

Pour aborder le calcul des modes de vibration de la sphère dans une matrice homogène, isotrope et infinie (il n'y a pas d'interaction entre sphères), il faut avoir recours à la méthode des fréquences complexes. A l'interface entre la sphère et la matrice la condition de continuité des grandeurs \vec{u} et $\vec{\sigma} \cdot \vec{r}$ est appliquée.

Elle implique que ν est un nombre complexe ce qui traduit le fait que les vibrations sont amorties : la partie réelle de ν correspond à la fréquence de la vibration et sa partie imaginaire à l'amortissement du mode.

La présence de la matrice conduit à un déplacement des énergies de vibration et un amortissement des modes de vibration (voir tableau 1.1).

1.1.3 Calcul des modes propres de vibration

Pour une sphère de rayon R la fréquence d'un mode de vibration (l, n) est inversement proportionnelle au rayon de la sphère. Elle est donnée, en hertz⁵, par l'expression suivante :

$$\nu_{l,n} = \frac{S_{l,n}v}{2R} \quad (1.25)$$

Pour calculer les fréquences des modes de vibration d'une sphère nous avons utilisé les programmes C écrits par Lucien Saviot du Laboratoire de Recherche sur la Réactivité des Solides (UMR 5613 CNRS) (Université de Bourgogne, Dijon)⁶. Ces programmes permettent de calculer les fréquences des modes propres de vibration de différents systèmes à symétrie sphérique : sphère pleine uniforme, système cœur-coquille (à une seule coquille ou à plusieurs coquilles), système coquille vide. En prenant en compte l'influence d'une matrice, il est également possible de calculer les fréquences et les amortissements des modes de vibration. En pratique l'utilisateur définit la densité, la vitesse longitudinale et transverse pour la sphère (et éventuellement la coquille, la matrice etc...), le domaine d'énergie dans lequel les solutions sont recherchées et le nombre d'itérations dans ce domaine d'énergie. La recherche des solutions correspond à la détermination des zéros d'un certain déterminant (dont la forme dépend du système étudié). Le programme parcourt l'axe des fréquences selon un pas défini par le domaine d'énergie et le nombre d'itérations choisis par l'utilisateur et repère les changements de signe du déterminant. Quand le déterminant

5. en divisant par c (vitesse de la lumière) et en prenant R en cm on obtient la valeur de la fréquence en cm^{-1}

6. voir aussi <http://www-gpi.physik.uni-karlsruhe.de/pub/widmer/Modes/modes.html>, pour les modes de vibration de la Terre, d'après un modèle 1D de cette dernière.

$\nu_{l,n}$ (GHz)	$n = 1$	$n = 2$	$n = 3$
$l = 0$	518 (534)	1090 (1096)	1649 (1652)
$l = 1$	245 (223)	484 (301)	770 (507)
$l = 2$	174 (216)	348 (396)	576 (444)

TABLE 1.1 – Valeurs des fréquences de quelques modes de vibration sphéroïdaux d’une nanoparticule d’or de 6 nm de diamètre. Les trois premiers modes ($n = 1 \dots 3$) du mode radial $l = 0$ et des modes $l = 1$ et $l = 2$ sont répertoriés. Entre parenthèses, les valeurs avec la matrice.

change de signe, une recherche plus précise permet de trouver le zéro du déterminant. Si le domaine d’énergie ou le nombre d’itérations est trop petit, des solutions seront donc omises.

Dans le tableau 1.1 sont répertoriées à titre d’exemple quelques valeurs des fréquences de modes de vibration sphéroïdaux d’une nanoparticule d’or libre et dans une matrice. Les valeurs des différents paramètres sont celles du verre Saint-Louis dopé à l’or (voir chapitre 3). Le diamètre D de la nanoparticule d’or est égal à 6 nm , la densité d à 19.28. Les valeurs des vitesses longitudinale et transverse sont des valeurs moyennées sur toutes les directions cristallographiques de la nanoparticule d’or : l’anisotropie des paramètres élastiques de l’or n’est donc pas prise en compte. $\langle v_L \rangle = 3314\text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ et $\langle v_T \rangle = 1236\text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Pour le verre Saint-Louis (voir chapitre 3), $d_{\text{verre}} = 2.97$, $v_L^{\text{verre}} = 5020\text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ et $v_T^{\text{verre}} = 3020\text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

Sans faire un examen approfondi du tableau 1.1, certains points méritent toutefois d’être soulignés. Première constatation : le mode $l = 0$ est celui qui a la fréquence la plus élevée. Deuxièmement, on vérifie bien que les fréquences des harmoniques ne sont pas des multiples de la fréquence du fondamental. Enfin, la matrice influe différemment sur la position des modes selon le mode considéré : elle a peu d’influence sur celle du mode $l = 0$ alors qu’elle provoque un déplacement important de la position des modes $l = 1$ et $l = 2$.

1.1.4 Lien avec les virus

La validité des travaux théoriques de Lamb [35] (1881) dans le cas particulier des sphères de taille nanométrique a été confirmée un siècle plus tard au cours des années 80 par l’étude expérimentale par diffusion inélastique de lumière de nanocristaux de spinelle enchâssés dans des vitrocéramiques [42]. La diffusion inélastique de lumière (aussi appelée diffusion Raman basse fréquence) par les modes de vibration de ces nanoparticules a permis de vérifier expérimentalement la relation (1.25) qui relie proportionnellement la fréquence d’un mode à l’inverse de la taille de la nanoparticule. En une vingtaine d’années, cette technique s’est révélée être un outil extrêmement performant dans la caractérisation de la dynamique vibrationnelle de nanoparticules de natures très diverses.

Les nanoparticules de semiconducteurs, métalliques ou de diélectriques (nanobilles de silice, nanosphères de polymères...) sont autant de systèmes à avoir été étudiés à ce jour par diffusion Raman basse fréquence (voir le chapitre 3 consacré

aux expériences sur des nanoparticules métalliques). Ces systèmes ont des réponses Raman très différentes, du fait des conditions d'excitation (Raman résonnant ou non-résonnant, taille des particules vis-à-vis de la longueur d'onde excitatrice...) ou bien du fait de leurs caractéristiques propres (distributions en taille et en forme des nanoparticules, couplage avec la matrice hôte). Néanmoins la diffusion Raman basse fréquence constitue une méthode de caractérisation de nano-objets puissante car non destructive, facile à mettre en œuvre et peu onéreuse. La grande sensibilité de cette méthode de caractérisation vibrationnelle permet de plus de mettre en lumière des aspects dynamiques difficiles à étudier par les méthodes de caractérisation structurale.

L'apport aujourd'hui avéré de la diffusion Raman basse fréquence dans l'étude de la dynamique vibrationnelle de nano-objets va de pair avec les avancées théoriques dans la description toujours plus réaliste de ces propriétés vibrationnelles, ce qui incite à étendre le champ d'investigation de la technique à des nanoparticules autres que solides. Une grande partie de ce travail de thèse est ainsi consacrée à l'étude des virus qui sont de véritables « nanoparticules biologiques ». D'un point de vue physique, les virus sont en effet les seules entités biologiques dont la compacité et la morphologie souvent quasisphérique (ou en tout cas de haute symétrie) justifient *a priori* une description de type « nanosphère » (et l'appellation « nanoparticule biologique ») telle que celle utilisée précédemment pour le calcul des modes de vibration. Ce critère morphologique a été pour la première fois repris par de Gennes et Papoular en 1969 [23] pour leur calcul des fréquences des modes de vibration. Ces travaux novateurs s'inscrivent dans le cadre théorique décrit plus haut, mais n'ont été repris à notre connaissance que depuis environ cinq ans par d'autres auteurs [43, 44, 45, 46]. Parallèlement des méthodes de modélisation telles que la NMA (Normal Mode Analysis, analyse par modes normaux) ont été développées afin de rendre compte des propriétés vibrationnelles des virus sphériques [7, 47, 6]. Ces travaux mettent bien évidence l'utilité de la caractérisation vibrationnelle dans la compréhension des changements de conformation de grande envergure observés au cours du cycle reproductif des virus.

Peu d'outils permettent de confronter les résultats des réflexions des théoriciens sur les propriétés vibrationnelles des virus avec l'expérience. La diffusion Raman basse fréquence apparaît en tout cas sur le principe comme une technique adaptée à la « chasse » aux modes de vibrations de virus.

1.2 Les virus

Les virus sont des entités biologiques uniques, les plus petites ayant la propriété de se répliquer de manière autonome. Dans leur forme la plus simple, les virus sont constitués d'un petit segment d'acide nucléique enfermé dans une coque protéique. N'ayant pas de métabolisme propre ce sont des parasites intracellulaires obligatoires qui envahissent les cellules dont ils détournent à leur profit la machinerie subcellulaire.

Malgré cette simplicité apparente, les virus infectent des organismes dans quasi-

ment tous les règnes du vivant. Il existe des virus de bactéries, de plantes, des virus fongiques, des virus d'invertébrés ou de vertébrés. Cette omniprésence se manifeste par une diversité stupéfiante de structures et de modes de fonctionnement.

Dans cette section, nous décrirons dans un premier temps brièvement ce que sont les virus. Nous verrons ensuite en quoi les virus peuvent être considérés comme des nanoparticules biologiques. Enfin, après avoir exposé succinctement quelles sont les techniques d'analyse structurale courantes des virus, nous terminerons par une discussion sur les intérêts que présente l'étude de la dynamique des virus.

Les ouvrages de référence utilisés pour la rédaction de cette section sont : Fields' Virology[48] et la Virologie Moléculaire de Girard *et al.*[3].

1.2.1 Définition

Un virus peut sommairement se définir comme un fragment d'acide nucléique, son génome, protégé par une enveloppe protéique, la capsid. L'ensemble forme une particule virale ou virion.

Les virus existent sous des formes et des tailles très différentes. L'un des virus que nous avons étudiés par exemple, le virus satellite de la mosaïque du tabac[49, 50, 51] (Satellite Tobacco Mosaic Virus (STMV)) est l'un des plus petits virus connus : il a l'aspect d'une sphère de 17 nm de diamètre, alors que le virus de la mosaïque du tabac [52] (Tobacco Mosaic Virus (TMV)) est un cylindre de 300 nm de long et de 18 nm de diamètre.

Les virus peuvent différer non seulement par la morphologie et la taille, mais aussi par la nature du matériel génétique, par la structure ou par la symétrie de la capsid. Par rapport aux virus dits nus, les virus enveloppés possèdent ainsi en plus de la coque protéique une bicouche lipidique, cette couche supplémentaire entourant la première. L'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses⁷) s'occupe de la difficile tâche de la classification des virus. Cet organisme recense en 2003 environ 3000 espèces de virus mais dans le même temps estime à environ 30000 le nombre de souches différentes [53]. La figure 1.2⁸ donne un aperçu de l'extrême complexité du monde viral tel qu'on le conçoit en 2005. Sur cette figure sont représentées les principales familles virales connues avec pour chaque famille un schéma de l'espèce-type. Les critères de classification sont la nature du génome (acide désoxyribonucléique (ADN) ou acide ribonucléique (ARN)), son caractère mono- ou bicaténaire (ssDNA, single-stranded DNA ou dsDNA, double-stranded DNA), sa polarité (ssRNA+, ARN simple brin à polarité positive comme l'ARN messager des cellules, ou ssRNA-), et si le génome est rétrotranscrit (ssRNA-RT ou dsRNA-RT). Ces familles sont ensuite regroupées par type d'hôtes infectés (Vertébrés, Invertébrés, Plantes ou Amibes) et classées par ordre de taille.

Dans leur très grande diversité, les virus peuvent cependant être définis par ces caractéristiques communes :

- Chaque particule virale complète ou virion, l'unité structurale d'un virus, ne contient en général qu'un seul type de matériel génétique, ARN ou ADN,

7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>

8. <http://www.danforthcenter.org/iltab/ictvnet/>



FIGURE 1.2 – Panorama et classification du monde viral en 2005.

- simple brin ou double brin, qui constitue le génome viral.
- Le virion se reproduit à partir de son génome.
- Il est incapable de croître et de subir des divisions. Il ne se divise pas par fission binaire comme les bactéries et ne subit pas non plus de phénomène de mitose comme les cellules eucaryotes. Il se multiplie à l'intérieur de son hôte : le génome viral programme la synthèse d'un très grand nombre de copies des macromolécules qui s'assemblent pour former les particules virales.
- Il est un parasite intracellulaire obligatoire. Il ne possède ni organites tels que la mitochondrie⁹ ni enzymes du métabolisme énergétique, ni ribosomes, indispensables à la réplication virale.

1.2.2 Structure des virus

Virus à symétrie icosaédrique

Dans cette section sont présentés quelques principes régissant la structure et l'assemblage des virus simples. Nous avons essentiellement étudié des virus de forme sphérique ou *isométriques* dont la capsid est à symétrie icosaédrique.

Ce sont les découvreurs de l'ADN, James Crick et Francis Watson [54, 55] qui firent les premiers l'hypothèse que la capsid des virus était un objet très symétrique. Ils avancèrent que du fait de sa petite taille, le génome viral ne peut coder que pour un nombre restreint de protéines. Pour Crick et Watson, la capsid est donc vraisemblablement constituée de l'assemblage de sous-unités protéiques identiques.

L'auto-assemblage spontané de certains virus comme le TMV *in vitro* [56] à partir de leurs constituants les conduisit ensuite à faire l'hypothèse que les interactions entre ces sous-unités sont spécifiques et bien définies, en d'autres termes que chaque sous-unité a le même environnement. L'assemblage de ces sous-unités doit posséder une symétrie élevée, ce qui est possible à condition que ces sous-unités soient reliées entre elles par des éléments de symétrie.

Une coque protéique fermée élaborée à partir de sous-unités identiques interagissant toutes de la même façon entre elles et de forme plus ou moins sphérique ne peut avoir que l'une des symétries suivantes : tétraédrique, cubique (ou octaédrique) ou icosaédrique, comportant respectivement 12, 24 et 60 sous-unités. La symétrie icosaédrique est la plus efficace puisque à taille de capsid équivalente, c'est elle qui implique le plus grand nombre de sous-unités, donc les plus petites, c'est-à-dire les plus économiques à synthétiser en termes d'information génétique.

De manière générale, le mode d'assemblage par sous-unités identiques présente plusieurs autres avantages. Une erreur de traduction¹⁰ du génome viral a peu de conséquences puisqu'elle ne porte que sur une petite partie de l'ensemble, alors que si le génome viral codait pour une seule protéine (hypothétique) de capsid géante, cette erreur pourrait compromettre l'élaboration de la capsid. L'absence de système correcteur est compensée par la redondance : les virus font ainsi une économie très importante d'information génétique et une grande partie de l'acide nucléique peut

9. qui permet la production d'énergie dans la cellule.

10. étape de l'interprétation du code génétique du virus en acides aminés, constituants des protéines.

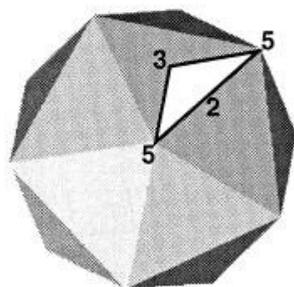


FIGURE 1.3 – Symétries de l'icosaèdre

éventuellement coder d'autres fonctions que sa propre encapsidation. De plus, l'assemblage de la capsid ne doit pas nécessairement se faire sous contrôle de la cellule-hôte, mais peut très bien être le résultat de l'interaction des sous-unités entre elles du fait des propriétés qui leur sont conférées par leur structure tridimensionnelle (cf. l'auto-assemblage *in vitro* du TMV) : l'assemblage peut s'effectuer spontanément si il correspond à un état d'énergie libre minimale [57].

L'icosaèdre est un polyèdre régulier dont les 20 faces sont des triangles équilatéraux, caractérisé par les symétries d'ordres 2, 3 et 5 (figure 1.3). Il possède 6 axes d'ordre 5, 10 d'ordre 3 et 15 d'ordre 2. On peut le construire simplement par découpage et pliage d'un réseau hexagonal plan (figure 1.4). Le pavage de l'icosaèdre par des éléments asymétriques utilise 60 de ces éléments, puisque sur chaque face triangulaire de l'icosaèdre on peut disposer trois sous-unités asymétriques identiques reliées entre elles par un axe d'ordre 3 (figure 1.5). De manière équivalente, si on place une seule sous-unité asymétrique n'importe où sur l'icosaèdre, en-dehors des axes de symétrie, les opérations de symétrie de l'icosaèdre vont générer 59 autres sous-unités identiques qui recouvrent totalement l'icosaèdre. Cette sous-unité protéique unique à partir de laquelle il est possible de construire la totalité de la capsid est l'*unité asymétrique*.

L'exemple du STMV déjà introduit plus haut, illustre parfaitement le raisonnement de Crick et Watson. Le STMV est un virus de 17 nm de diamètre dont la capsid est constituée de 60 copies d'une protéine de 159 acides aminés qui ménagent une cavité d'environ 12 à 13 nm de diamètre contenant un ARN de 1059 bases, dont un peu moins de la moitié code donc pour la protéine de structure¹¹. D'autres virus comme les parvovirus¹², petits virus de 20 à 25 nm de diamètre sont construits de la même façon. Les picornavirus (famille des poliovirus, rhinovirus) élaborent une capsid un peu plus grande qui accommode dans une cavité d'environ 20 nm de diamètre un génome de 8000 bases. L'unité asymétrique de ces virus est plus grande : elle est constituée de trois protéines différentes de taille comparable (230 à 300 résidus) et d'un petit peptide interne. Cette stratégie fait qu'à-peu-près un tiers du génome de ces virus code pour les protéines constitutives de la capsid.

Ces principes d'architecture virale qui s'appliquent très bien à de petits virus

11. rappelons que 3 bases codent pour un seul acide aminé.

12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/50000000.htm>

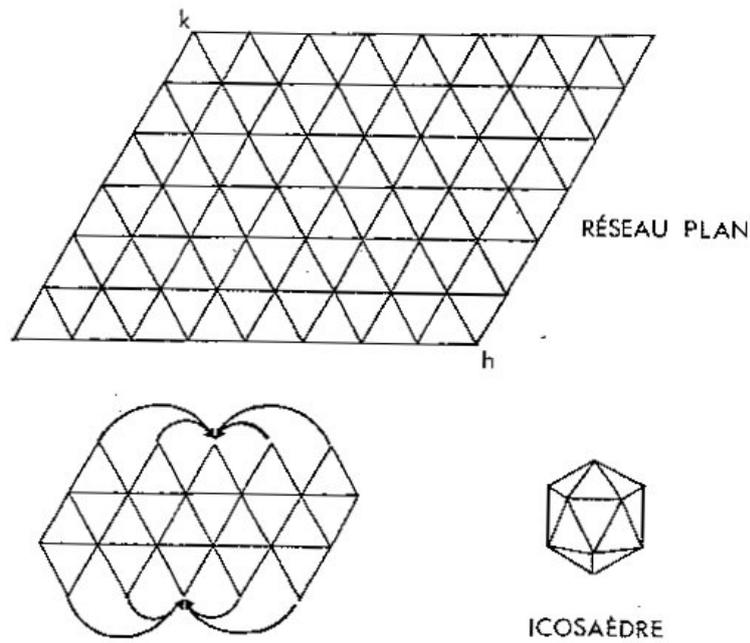


FIGURE 1.4 – Méthode de découpage d'un réseau hexagonal pour former un icosaèdre : par pliage, tous les sommets d'ordre 6 deviennent des sommets d'ordre 5.

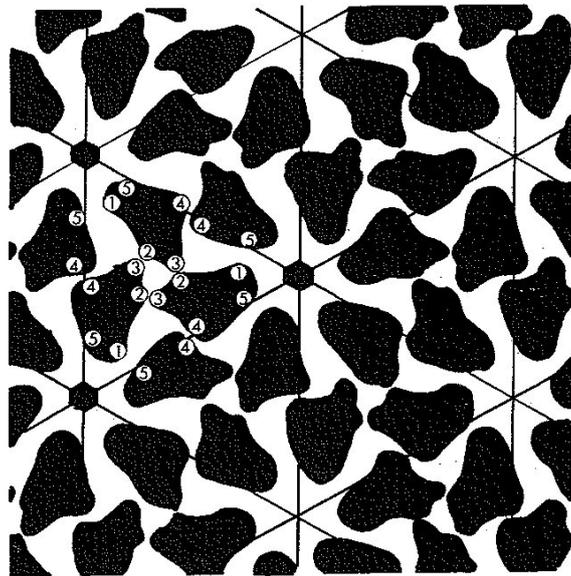


FIGURE 1.5 – Disposition de sous-unités équivalentes dans un réseau hexagonal. Chaque triangle contient trois sous-unités interagissant par l'intermédiaire d'axes 6 (chiffres 1-5), d'axes 3 (chiffres 2-3) et d'axes 2 (4-4).

sphériques peuvent être adaptés au cas de virus de forme sphérique de plus grande taille. C'est le concept de *quasi-équivalence* (voir l'annexe A).

Le génome

Pour les virus dits simples, comme ceux présentés jusqu'à présent, la coque protéique s'assemble autour du génome et l'assemblage est souvent déclenché par une séquence spécifique, le *signal d'assemblage*. Dans les virus à ARN positif, le génome n'a pas une structure extrêmement bien définie. Il doit cependant tenir à l'intérieur de la capsid, ce qui implique qu'il est généralement très densément empaqueté, sous forme de brins parallèles de bases appariées deux par deux. Pour certains virus comme le STMV, des segments ordonnés d'ARN apparaissent alors (et sont donc visibles par diffraction des rayons X, voir 1.2.4). Presque 60% du génome du STMV est ainsi ordonné tangentiellement aux axes 2 de la capsid et interagit précisément avec les dimères de la capsid [50]. Il n'y a cependant pas d'interactions spécifiques des bases avec les sous-unités de la capsid : elles interagissent avec les sucres et les phosphates de l'acide nucléique, ces contacts sont donc bien non-spécifiques de la séquence de l'acide nucléique.

La symétrie hélicoïdale

Tous les virus ne sont pas des virus à capsid à symétrie icosaédrique (figure 1.2), même si ces derniers sont les plus fréquents. Il existe (entre autres morphologies) des virus à morphologie hélicoïdale ou filamenteuse comme le TMV [52] ou le phage M13 [58]. Nous décrivons ici très brièvement la structure du TMV (figure 1.6). Le TMV est organisé autour d'un axe hélicoïdal autour duquel s'enroulent des sous-unités protéiques. Le nombre d'unités par tour et le pas de l'hélice suffisent à caractériser cette structure : il y a 16.33 sous-unités par tour et le pas de l'hélice est de 23 Å. L'hélice protéique incorpore très précisément [3] le matériel génétique dans un sillon interne à raison d'exactly trois nucléotides d'ARN simple brin par sous-unité.

1.2.3 Similitudes et différences par rapport à d'autres objets nanométriques

Parmi les objets nanométriques que le physicien a l'habitude de manipuler, les nanoparticules métalliques sont très différentes des virus et cependant présentent certaines similitudes avec ces derniers.

La *taille* de ces différents objets est nanométrique : de 2 à 10 nm pour les nanoparticules d'or que nous avons étudiées (cf. chapitre 3), de 17 nm à plusieurs dizaines voire centaines de nanomètres pour les virus. La *forme* des virus isométriques est très bien définie, comme peut l'être celle de nanoparticules métalliques, ou bien celle de billes de silice (dans les opales par exemple, voir figure 2.10), comme le montrent les images de virus obtenues par microscopie électronique en transmission (MET). En plus de ces observations classiques, le facteur de forme des virus déterminé par

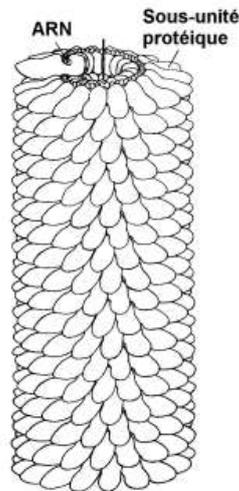


FIGURE 1.6 – Structure hélicoïdale du TMV (d'après [3]).

des mesures de diffusion X aux petits angles (SAXS) présente de grandes similitudes avec celui de nanosphères (figure 1.7). Ajoutons que la distribution en taille d'une assemblée de virus (dans le cas des virus simples) est extrêmement étroite puisque ces objets sont, à de rares exceptions près, identiques, alors qu'il est assez délicat d'obtenir des nanoparticules d'or (par exemple) qui soient toutes exactement de la même taille, quelle que soit la voie de synthèse utilisée (*bottom up* ou *top down*).

Les constituants de base d'une nanoparticule solide sont les atomes, reliés entre eux de manière covalente (ou par des liaisons métalliques s'il s'agit de nanoparticules métalliques). L'équivalent du constituant de base pour un virus est la sous-unité protéique, composée d'un grand nombre d'atomes différents. La capsid des virus isométriques est formée par auto-assemblage non-covalent d'un grand nombre de ces sous-unités identiques. Ce mode d'assemblage de la capsid permet la libération très rapide du génome viral dans les cellules infectées, en même temps que l'encapsidation, étape nécessaire à la protection du matériel génétique néosynthétisé. La capsid est stabilisée par un grand nombre d'interactions différentes. Prenons à nouveau l'exemple du STMV [50] : les interactions entre dimères de sous-unités par exemple sont dominées par l'interaction hydrophobe mais il existe également de nombreuses liaisons hydrogène (en tout 70 par dimère) entre acides aminés et avec les molécules d'eau liées. D'autres interactions, comme l'interaction de Van der Waals ou moins souvent les ponts salins interviennent également. Les interactions entre l'ARN et les sous-unités par liaison hydrogène sont également très nombreuses et participent plus ou moins à la stabilisation de la capsid. En résumé, les nanoparticules métalliques sont un assemblage covalent d'un seul type d'atomes (ou d'un petit nombre d'atomes différents cf. « core-shell »), alors que les virus isométriques sont le résultat de l'assemblage non-covalent de sous-unités identiques empaquetant le génome.

La question de la compacité de ces objets, au moins qualitativement, peut également se poser. Malgré l'assemblage spécifique de ces constituants, un virus est

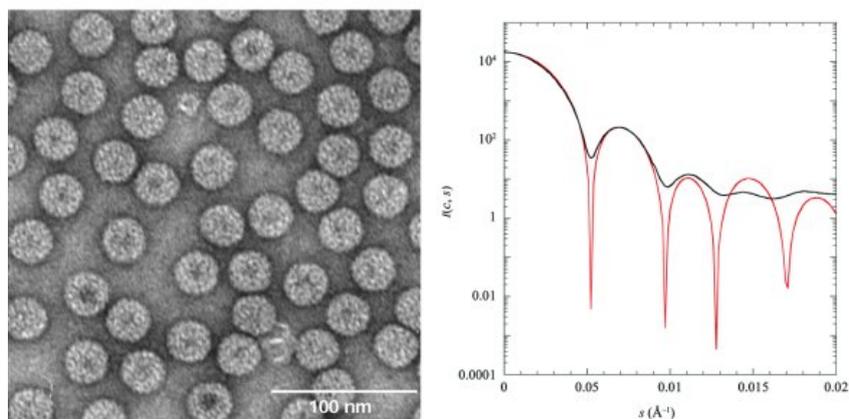


FIGURE 1.7 – A gauche : Image par MET du virus de la mosaïque du brome (BMV). A droite : Résultats de mesures SAXS sur une solution de BMV [4]. Le trait noir représente le facteur de forme du BMV ; le trait rouge correspond au facteur de forme simulé d'une sphère creuse.

évidemment moins compact qu'une nanoparticule métallique. Mais comparés aux protéines, les virus sont très compacts.

Dans des conditions normales (c'est-à-dire pas au point isoélectrique), la distribution des charges électriques dans les virus et dans leur voisinage est à l'origine de l'existence d'un potentiel électrostatique. Dans le cas du STMV par exemple la charge négative de l'ARN n'est pas entièrement neutralisée par la charge positive. L'excès de charges négatives est neutralisé par les contre-ions dans la solution.

1.2.4 Les méthodes d'étude structurale des virus

La structure virale est caractérisée de nos jours par deux techniques essentiellement : la diffraction des rayons X et les techniques microscopiques.

La cristallographie par rayons X

Les premières études par diffraction des rayons X (DRX) de cristaux de virus végétaux comme le TBSV remontent à la fin des années 30. Depuis la fin des années 80 et la première structure à haute résolution [59], les progrès de l'informatique et des méthodes de traitement des données ont fait que des dizaines de structures de virus végétaux, animaux et d'insectes ont été élucidées avec une résolution quasi-atomique [50]. Mais seules les structures de forme très régulière peuvent former des monocristaux, et l'étude de gros virus ou de virus plus complexes n'est possible que par le biais de substructures de ces virus. La détermination de la structure d'un virus repose non seulement sur l'existence des symétries du cristal mais aussi sur les symétries du virus. Les parties non ordonnées des virus comme certains segments du matériel génétique par exemple ou les parties de la capsid interagissant avec le matériel génétique sont invisibles par cristallographie X.

Les techniques microscopiques

La microscopie électronique en transmission La microscopie électronique est un outil formidable pour l'étude de la structure des virus, et encore plus depuis l'avènement de la cryomicroscopie électronique (cryo-EM) [60, 19]. La méthode traditionnelle de coloration négative par des métaux lourds denses aux électrons¹³ (acétate d'uranyle, phosphotungstate de potassium) limite la résolution à environ 50 Å, du fait des inhomogénéités de coloration, de la déshydratation et de l'aplatissement des virus, et des dommages radiatifs causés par les électrons. Néanmoins cette résolution est suffisante pour avoir une idée précise de la morphologie d'un virus.

La cryomicroscopie électronique améliore grandement les possibilités d'observation de virus et d'autres complexes supramoléculaires. Les échantillons sont congelés rapidement dans une couche de glace (vitreuse). L'utilisation de petites doses d'électrons à une température proche de celle de l'azote liquide combinée au développement de programmes efficaces de traitement d'images permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de la dizaine d'ångströms et en-deçà. Les figures A.4, A.5 et A.3 montrent quelques exemples de reconstructions tridimensionnelles de virus isométriques faites à partir de clichés de cryo-EM.

La cryomicroscopie électronique ne peut pour l'instant pas rivaliser avec la diffraction des rayons X (DRX) dont la résolution est quasi-atomique (1.8 Å pour le STMV par exemple [50]). Elle peut cependant dans bien des cas compléter les données de la DRX d'une part (et même les remplacer dans le cas de structures difficiles ou impossibles à cristalliser) et d'autre part permettre l'étude d'échantillons hétérogènes. Il est possible d'observer par cryo-EM, l'effet d'un changement de pH par exemple, qui a un effet connu sur la structure d'un virus mais ne provoque pas une transition nette de toute la population virale vers un état défini [61]. La cryo-EM constitue donc un outil précieux pour l'observation des changements structuraux à grande échelle dans les virus.

La microscopie à force atomique Depuis une dizaine d'année, une technique d'imagerie supplémentaire a commencé à révéler son utilité dans l'observation et la caractérisation mécanique des structures virales. Inventée par G. Binnig en 1982 [62], la microscopie à force atomique (AFM) est depuis peu utilisée sur des échantillons biologiques et de manière encore plus récente sur des virus [63, 64, 65, 66]. Le principe de l'AFM peut se résumer de la manière suivante : une pointe extrêmement fine typiquement de Si ou SiN ($\sim 1\text{ nm}$) montée sur un levier balaye la surface de l'échantillon. A proximité de l'échantillon les forces qui s'exercent entre la pointe et la surface provoquent la déflexion du levier, en général mesurée par réflexion d'un spot laser sur le levier vers un réseau de photodiodes. En pratique, une boucle de rétroaction ajuste la distance de la pointe à l'échantillon pour que la force entre les deux soit constante, ce qui évite que la pointe n'entre en collision avec la surface. On obtient ainsi une image de la topographie de l'échantillon.

L'un des grands avantages de l'AFM par rapport à d'autres techniques est qu'elle

13. utilisée à cause du manque de contraste de la matière organique.

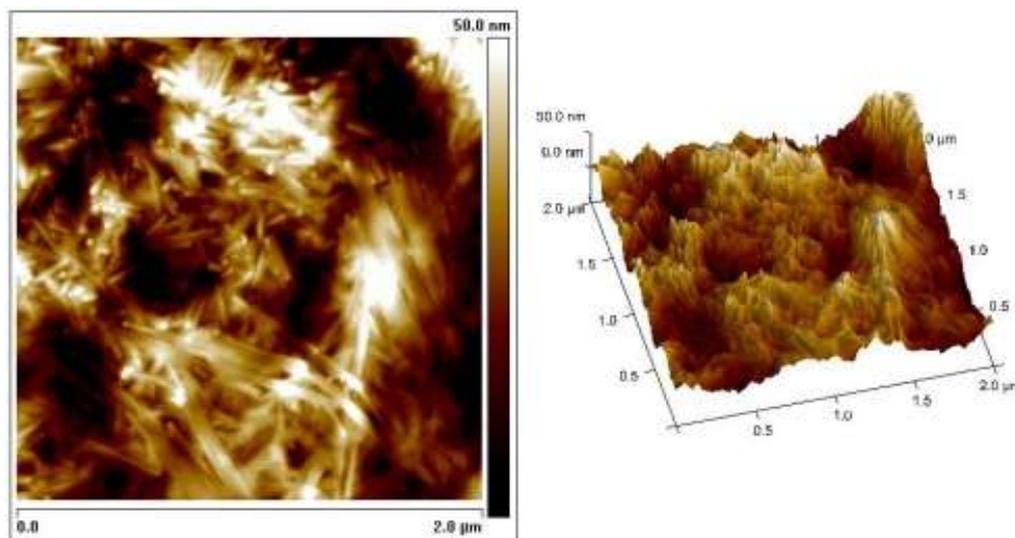


FIGURE 1.8 – Observation du TMV par AFM. Image à deux dimensions (à gauche) et profil tridimensionnel (à droite). On distingue sur ces images les tubes de TMV orientés pour certains parallèlement au plan du substrat et pour les autres quasiment perpendiculairement.

peut se faire en phase liquide et en particulier dans des conditions physiologiques, sans perturber l'échantillon. L'AFM permet aussi d'observer individuellement une particule virale avec ses éventuels défauts structuraux, il n'y a pas d'effet de moyenne sur l'échantillon comme pour les reconstructions tridimensionnelles de virus à partir de la cryo-EM ou comme les données issues de la diffraction des cristaux. A la différence du TEM pour laquelle les images obtenues résultent de la projection d'une particule sur un plan, l'AFM donne en outre des images tridimensionnelles de la surface, avec une très bonne résolution en hauteur, qui peut être meilleure que $0,1\text{ nm}$ ($0,5\text{ nm}$ pour les matériaux biologiques). Du fait de la taille finie de la pointe, la taille latérale d'objets isolés peut cependant être légèrement surestimée. Mais si ces objets forment un assemblage compact, leur dimension latérale peut être calculée en prenant les distances de centre à centre.

Nous avons utilisé l'AFM pour caractériser nos échantillons (figure 1.8). Cela constituait pour nous une solution permettant d'économiser la mise en forme assez longue des échantillons pour les observations en MET.

Une extension de la technique AFM à la nanoindentation a une application intéressante sur la détermination des paramètres élastiques de capsides virales [67, 68]. Ce type de mesure a été réalisé récemment sur la capsid virale du bactériophage $\phi 29$ (virus de bactéries à la morphologie ovoïde complexe) et d'un phytovirus isométrique (CCMV, Cowpea Chlorotic Mottle Virus, $D = 28\text{ nm}$). Elles ont permis d'évaluer la rigidité des parois virales correspondantes (à des endroits précis dans le cas du phage), à travers la mesure du module d'Young. Le premier résultat de ces travaux est que les capsides virales sont caractérisées par une grande élasticité et la description de ces objets en termes de coque élastique relativement épaisse se révèle

être adaptée. La comparaison entre le CCMV et le bactériophage $\phi 29$ révèle que les modules d'Young de ces deux coques virales diffèrent d'un ordre de grandeur, en accord avec les différentes pressions internes exercées par le contenu viral (environ 60 atm dans le cas du phage). Un autre aspect remarquable révélé par ces mesures est que la stabilité mécanique des capsides peut être significativement accrue par une modification ponctuelle d'un constituant capsidique (mutation). Bien que nous n'ayons pas étudié les mêmes virus, nous verrons dans le chapitre IV que nos mesures Brillouin sur un cristal de STMV donnent des résultats cohérents avec ces mesures AFM.

1.2.5 Apports d'une étude dynamique

Les méthodes d'analyse décrites ci-dessus constituent aujourd'hui des outils de routine (en particulier la diffraction de rayons X et la cryomicroscopie électronique) qui donnent des informations sur la structure à la fois fine et globale des virions. Ces caractérisations, bien qu'essentielles à la compréhension des mécanismes des virus restent malgré tout d'ordre statique et éludent l'aspect de la dynamique collective dans les structures virales. L'application classique de la diffusion Raman aux virus est certes répandue mais fournit principalement des informations à l'échelle moléculaire. Au même titre que la dynamique de nanoparticules solides s'associe à des propriétés spécifiques non révélées par les techniques d'analyse structurale (couplage élastique matrice/particule ou particule/particule, couplage plasmon/phonon dans le cas de nanoparticules métalliques, gap acoustique pour des opales de matériaux diélectriques...), considérer les virus comme des structures dynamiques revient à envisager la possibilité que le fonctionnement et le comportement d'un virus ne sont pas uniquement le fait de mécanismes moléculaires localisés (interaction avec telle ou telle unité protéique par exemple) mais aussi de propriétés physiques collectives. A travers la description de quelques aspects simples de la dynamique collective des nano-morphologies virales, nous voyons dans la suite en quoi l'étude expérimentale des modes de vibration de virus mérite, à nos yeux, d'être entreprise.

La compréhension de la dynamique des virus peut déboucher sur de nombreuses applications et alimenter en particulier des spéculations plus ou moins fantaisistes comme la lyse des virus par résonance avec leurs modes de vibration au moyen d'une source THz ou sub- THz (ultrasons, microondes) [69]. Une autre application plus sérieuse signalée initialement dans le cadre d'une conférence de l'armée américaine sur le bioterrorisme [70] consiste à mettre à profit la diffusion Raman dans l'identification des particules virales par l'intermédiaire de leur taille. Cette idée repose sur le fait que la détermination expérimentale de la fréquence d'un mode de vibration d'une particule virale donne accès à sa taille en vertu de la relation (1.25). Cela peut éventuellement constituer une méthode de discrimination rapide d'un virus inconnu en permettant de le classer parmi les plus petits virus ($D < 50 \text{ nm}$), les virus de taille intermédiaire (de 50 à 100 nm) ou les gros virus (plus de 100 nm). Le virus de la variole par exemple fait partie de cette dernière catégorie.

Les études par diffraction de rayons X ou microscopie électronique, sur de nombreuses espèces de virus, ont montré depuis longtemps que la taille d'un virus pou-

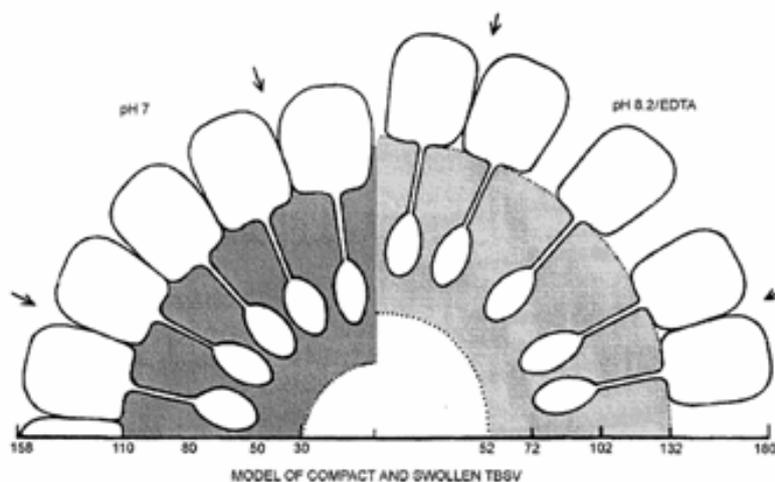


FIGURE 1.9 – Modélisation de la transition compact/gonflé du TBSV [5].

vait changer de manière significative (de quelques % à une dizaine de % pour le TBSV [61] ou le CCMV [7] et jusqu'à 20% pour le poliovirus [5]). Ces changements de taille, généralement réversibles, sont observés pour des conditions de pH ou de force ionique précises et peuvent être déclenchés par la présence de certaines espèces chimiques (Ca^{2+} pour le CCMV et le TBSV par exemple). Ils sont associés à des transitions conformationnelles concertées de la capsid virale, de la forme dite « compacte » (forme native) à la forme dite « gonflée », sans nécessiter pour autant une réorganisation complète de la structure du virion. Dans certains cas, comme celui du poliovirus, cette transition s'accompagne de l'inactivation du virus. Witz et Brown [5] furent parmi les premiers à souligner l'importance de ces transitions conformationnelles, notamment en remarquant que la disposition des unités protéiques dans la forme gonflée permettait une « externalisation » du contenu viral (figure 1.9).

Cette externalisation peut ne pas être anodine dans l'interaction du virus avec son environnement (il a été postulé que le gonflement constitue une première étape dans l'expulsion du génome au cours de l'infection) et incite de fait à mieux connaître les mécanismes sous-jacents de ces transitions de grande échelle.

Les approches numériques telles que l'Analyse en Modes Normaux (NMA) apportent à cet égard des éléments intéressants. Cette méthode, initialement employée pour calculer les modes de très basse fréquence impliqués dans les changements conformationnels de protéines, consiste à calculer les modes normaux de vibration à partir d'un potentiel d'interaction choisi (type oscillateur harmonique) et moyennant une représentation simplifiée de la structure virale. Typiquement, ne sont modélisées dans ces travaux que les capsides virales, en ne considérant que l'interaction entre des carbones C_α des unités protéiques. Les modes normaux ainsi calculés montrent que la mosaïcité des capsomères dans les capsides n'empêche pas le développement de modes propres identiques à ceux d'une coquille élastique homogène ou bien ceux d'une nanosphère. À titre d'illustration, la figure 1.10 représente quelques uns de ces

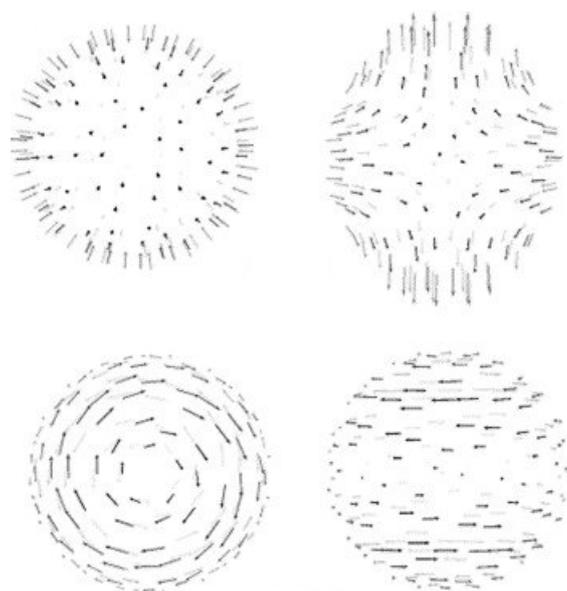


FIGURE 1.10 – Représentation de quelques modes du poliovirus calculés par NMA [6] : en haut, des modes sphéroïdaux similaires — à gauche — à un mode radial et — à droite — au mode quadrupolaire ; en bas sont représentés des modes torsionnels.

modes pour la capsid du poliovirus .

En évaluant la projection des modes normaux ainsi calculés sur le vecteur de déplacement associé à la transition compact/gonflé, il a été démontré dans le cas du CCMV par exemple, que le mode de respiration rend compte à plus de 95% de la transition (figure 1.11).

Ce résultat, certes issu d'hypothèses simplificatrices (notamment concernant l'harmonicité des modes), suggère donc que la transition entre la forme compacte et la forme gonflée puisse être assistée par la dynamique vibrationnelle propre à la morphologie globale du virion. Vue sous cet angle, la caractérisation expérimentale des modes de vibration de virus peut déboucher sur des informations nouvelles susceptibles d'éclairer les spécificités de certains mécanismes intimement liés à des propriétés collectives. Ce faisant, elle peut aussi permettre de quantifier la cohésion globale et la flexibilité d'une particule virale, paramètres déterminant dans la stabilité des structures virales [71].

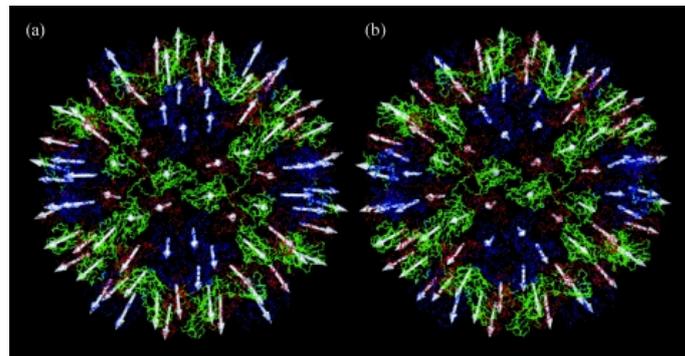


FIGURE 1.11 – Amplitude et direction du mouvement pour le CCMV (a) obtenues en calculant la différence entre les coordonnées de la forme compacte et celle de la forme gonflée (b) pour le mode de respiration [7].

Chapitre 2

Les diffusions inélastiques de lumière

La diffusion inélastique de lumière conventionnelle (spectroscopie Raman) opère habituellement dans un domaine de fréquence¹ $\nu \geq 100 \text{ cm}^{-1}$. La spectroscopie Raman permet de caractériser et d'identifier les groupements chimiques par leur signature vibrationnelle spécifique au sein d'une molécule, d'une macromolécule ou même dans des assemblages moléculaires encore plus gros comme les virus [72]. C'est une technique extrêmement sensible surtout depuis l'avènement de la spectroscopie Raman Résonnant et du SERS [73].

Ces signatures sont des *modes de vibration* dont la longueur d'onde est de l'ordre de grandeur de la longueur de liaison entre atomes ($\sim 1/10 \text{ nm}$). La spectroscopie Raman est donc une sonde très locale de la matière. Si l'on s'intéresse aux modes de vibrations non plus de la liaison atomique mais à l'échelle de l'objet tout entier (macromolécule, édifice supramoléculaire ou agrégat métallique par exemple), donc à des vibrations de beaucoup plus basse fréquence (cf. tab. 2.1), on est rapidement confronté à une difficulté expérimentale de taille : le fait que la fréquence de ces modes soit très proche de la raie élastique extrêmement intense. Ce problème peut être résolu par l'utilisation d'appareils au *contraste* et à la *résolution* très élevés. Il existe deux appareils de ce type au laboratoire : un quintuple monochromateur et un interféromètre Fabry-Pérot multipassage récemment acquis par le laboratoire. A l'origine principalement utilisé en physique de la matière condensée pour l'étude des modes acoustiques dans les matériaux, les ondes de spin etc... l'interféromètre est devenu il y a peu un outil de choix pour l'étude de particules de grande taille (colloïdes [74] ou opales, qui sont des assemblages de sphères de silice [75, 76]).

Cette partie donne dans un premier temps un aperçu de la théorie de la diffusion inélastique de la lumière. Elle est consacrée dans un second temps à la description des dispositifs expérimentaux utilisés. Nous insistons particulièrement sur le fonctionnement et les caractéristiques du tandem Fabry-Pérot (ou interféromètre Fabry-Pérot).

1. L'unité usuelle est le cm^{-1} pour la spectroscopie Raman et le gigahertz (GHz) pour la spectroscopie Brillouin. $1000 \text{ GHz} \equiv 33.36 \text{ cm}^{-1} \equiv 4.1357 \text{ meV}$.

Modes de vibration intramoléculaires	
Liaison Si-O-Si	450 – 550
Liaison C-H	2800 – 3300
Liaison O-H	3200 – 3700
Modes de vibration de particules	
Nanoparticules d'or $D \sim 5 \text{ nm}$	3 – 10
Opales $D \sim 200 \text{ nm}$	0.3 – 1
Modes acoustiques (longitudinaux à $q \sim 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$)	
Silice	~ 1
Eau	~ 0.14

TABLE 2.1 – Ordres de grandeur de certaines énergies de vibration (en cm^{-1}).

2.1 Quelques principes de la diffusion inélastique de lumière

Nous présentons brièvement dans cette section quelques aspects de la théorie de la diffusion inélastique de lumière, aspects développés plus longuement dans les références [77, 78, 79].

2.1.1 Description du phénomène

Dans une expérience-type de diffusion de lumière, un faisceau parallèle de lumière provenant d'un laser illumine un échantillon de volume V dans un matériau quelconque. La lumière est diffusée dans toutes les directions et un détecteur analyse l'intensité de la lumière diffusée dans une direction particulière, à un angle θ par rapport à la direction du faisceau incident.

Alors que le faisceau laser incident est monochromatique, l'intensité diffusée présente des contributions de fréquences différentes (cf. fig. 2.1). La raie centrale correspond au processus au cours duquel les photons incidents sont diffusés élastiquement (diffusion *Rayleigh*), c'est-à-dire sans changement de fréquence. Les autres composantes du spectre sont dues aux processus de diffusion inélastique *Brillouin* et *Raman*. La diffusion Brillouin provient en général de la diffusion par les ondes acoustiques propagatives et donne des pics à très basse fréquence. Les déplacements Brillouin par rapport à la fréquence de la radiation incidente sont de l'ordre du $\text{cm}^{-1} \sim 30 \text{ GHz}$ et en deçà. Les pics Raman, résultant de la diffusion par des vibrations internes aux molécules ou des modes optiques dans les cristaux, ont des déplacements beaucoup plus élevés, de l'ordre de $100 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.

On peut faire une distinction supplémentaire entre les raies aux fréquences inférieures à la fréquence ν_0 de la radiation incidente (raies Stokes ν_S) et les raies dont les fréquences sont supérieures à ν_0 (raies anti-Stokes ν_{AS}). Un photon diffusé lors d'un processus Stokes correspond à la situation où l'échantillon a gagné l'énergie $h\nu$. Donc, du fait de la conservation de l'énergie, on a

$$h\nu = \nu_0 - \nu_S. \quad (2.1)$$

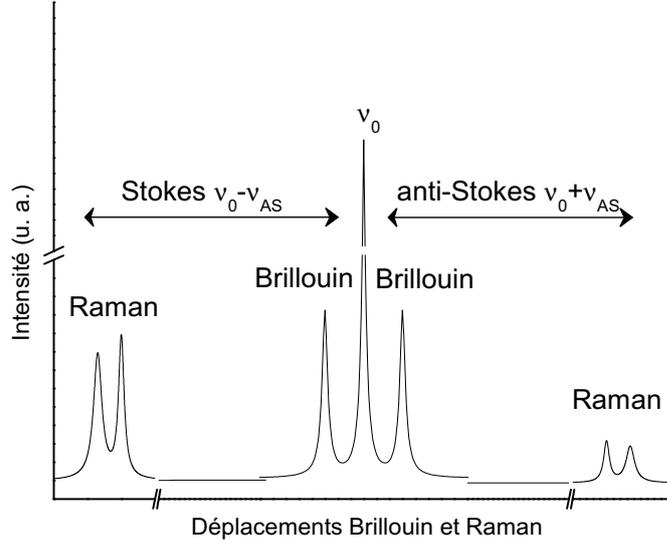


FIGURE 2.1 – Schéma d'un spectre de diffusion inélastique de lumière.

Inversement, l'échantillon perd l'énergie $h\nu$ pour un photon diffusé lors d'un processus anti-Stokes. Dans ce cas,

$$h\nu = \nu_{AS} - \nu_0. \quad (2.2)$$

Le phénomène de diffusion inélastique conserve également le moment.

Soit \vec{k}_0 , \vec{k}_S et \vec{k}_{AS} , les vecteurs d'onde, respectivement, d'un photon incident, d'un photon Stokes et d'un photon anti-Stokes. La conservation du moment implique que l'échantillon perd (processus anti-Stokes) ou gagne (processus Stokes) un moment $\hbar\vec{q}$ tel que

$$\vec{q} = \begin{cases} \vec{k}_0 - \vec{k}_S & \text{pour un processus Stokes,} \\ \vec{k}_{AS} - \vec{k}_0 & \text{pour un processus anti-Stokes.} \end{cases} \quad (2.3)$$

La figure 2.2 illustre la conservation du moment au cours d'un processus de diffusion inélastique. D'après (2.3), on a alors (pour le cas Stokes)

$$q^2 = k_0^2 + k_S^2 - 2k_0k_S \cos \theta.$$

Dans le cas particulier où l'indice de réfraction du milieu traversé par le photon incident est le même que celui du milieu traversé par le photon diffusé, $k_0c = n\omega_0$ et $k_Sc = n\omega_S^2$ (ce qui peut très bien ne pas être le cas pour un milieu biréfringent par exemple, selon la géométrie de l'expérience.). D'après (2.1), la relation précédente s'écrit

2. avec $\omega \equiv 2\pi\nu$.

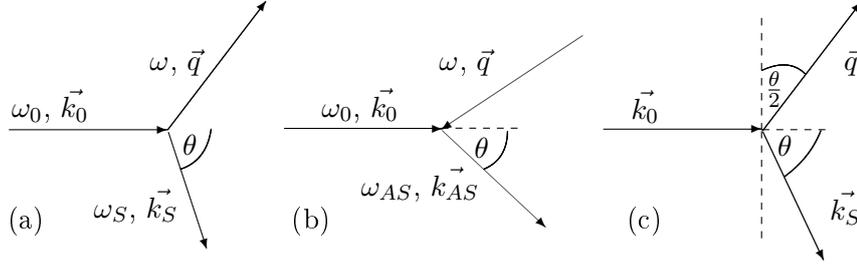


FIGURE 2.2 – Diagrammes représentant la conservation du moment au cours de la diffusion inélastique d'un photon : (a) processus Stokes, (b) processus anti-Stokes, (c) cas particulier où l'indice de réfraction n est isotrope et où $\omega \ll \omega_0$.

$$c^2 q^2 = n^2 \omega_0^2 + n^2 (\omega_0 - \omega)^2 - 2n^2 \omega_0 (\omega_0 - \omega) \cos \theta.$$

Finalement, et en dérivant de manière semblable la relation pour un processus anti-Stokes, on obtient

$$\frac{c^2 q^2}{n^2 \omega_0^2} = \frac{\omega^2}{\omega_0^2} + 4 \left(1 \mp \frac{\omega}{\omega_0} \right) \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad \text{signe - Stokes, + anti-Stokes.} \quad (2.4)$$

En particulier, si $\omega \ll \omega_0$, alors

$$\frac{cq}{n\omega_0} = 2 \sin \frac{\theta}{2} \quad \text{pour les deux processus Stokes et anti-Stokes.} \quad (2.5)$$

D'où

$$q = 2k_0 \sin \frac{\theta}{2} = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}. \quad (2.6)$$

Dans la plupart des expériences de diffusion inélastique de la lumière, on utilise une longueur d'onde d'excitation du domaine du visible (éventuellement l'UV, cf. 4.4.2). Typiquement cela correspond à une fréquence

$$\frac{\omega_0}{2\pi} \sim 5 \cdot 10^{14} \text{ Hz}. \quad (2.7)$$

En général les déplacements Raman sont dans le domaine de fréquence défini par $3 \cdot 10^{11} \text{ Hz} < \omega < 10^{14} \text{ Hz}$, et les déplacements Brillouin dans le domaine $10^8 \text{ Hz} < \omega < 10^{10} \text{ Hz}$.

Dans la plupart des expériences la condition $\omega \ll \omega_0$ est satisfaite et q est défini par la relation (2.6). On remarque que dans ce cas précis seulement, les vecteurs d'onde Stokes et anti-Stokes sont égaux.

Examinons maintenant le domaine de vecteur d'onde accessible par une expérience de diffusion de lumière. Si l'on suppose par exemple que l'indice de réfraction est de l'ordre de 1,5 on obtient, en tenant compte de (2.7),

$$k_0 \sim 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}, \quad (2.8)$$

donc

$$q_{min} \sim 0 < q < q_{max} = 3 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}. \quad (2.9)$$

On peut ici souligner deux choses. Premièrement, q_{min} n'est pas tout à fait égal à zéro. Quand l'angle θ est très petit, $\sin^2 \theta/2$ devient équivalent à ω/ω_0 et la relation simplifiée (2.5) n'est plus valide, il faudrait en toute rigueur appliquer dans ce cas précis la relation complète (2.4).

Deuxièmement, si on prend l'exemple d'un matériau cristallin, le vecteur d'onde maximum pour une excitation dans la première zone de Brillouin est de l'ordre de

$$\frac{\pi}{a} \sim 30 \text{ nm}^{-1}, \quad \text{avec } a \text{ le paramètre de maille du réseau cristallin.} \quad (2.10)$$

Les vecteurs d'onde sondés dans un matériau cristallin seront par conséquent très proches du centre de la zone de Brillouin (mais bien au-delà du domaine d'investigation des ondes ultrasonores).

2.1.2 Origine de la diffusion inélastique

Dans cette section, nous présentons quelques principes permettant d'expliquer l'origine physique de la diffusion inélastique de lumière.

On peut faire comme hypothèse de départ celle du *milieu continu*. En effet, dans le matériau irradié par la radiation λ_0 , un cube de λ_0 de côté contient environ 10^9 atomes, ce qui signifie qu'à cette échelle le matériau se comporte bien comme un milieu continu. On peut donc faire une description macroscopique du phénomène de diffusion dans le matériau.

Une onde électromagnétique traversant un tel matériau produit en chaque point \vec{r} , par couplage avec l'ensemble des électrons, un moment dipolaire oscillant ou polarisation par unité de volume $\vec{P}(\vec{r}, t)$. Pour une onde électromagnétique peu intense, la polarisation par unité de volume est proportionnelle au champ électrique $\vec{E}(\vec{r}, t)$ et est égale à

$$\vec{P}(\vec{r}, t) = \epsilon_0 \chi(\vec{r}, t) \vec{E}(\vec{r}, t), \quad (2.11)$$

où la susceptibilité diélectrique χ caractérise la réponse du matériau à l'excitation \vec{E} .

Les oscillations de la polarisation induites par l'onde électromagnétique incidente au point \vec{r} produisent à leur tour un rayonnement diffusé dans toutes les directions. Le champ électrique $d\vec{E}'(\vec{R}, t)$ diffusé en un point \vec{R} par ces variations de polarisation dans un volume d^3r centré sur \vec{r} , et tel que $d^3r \ll \lambda^3$, est donné par (voir par exemple le détail du calcul à partir des équations de Maxwell dans [78])

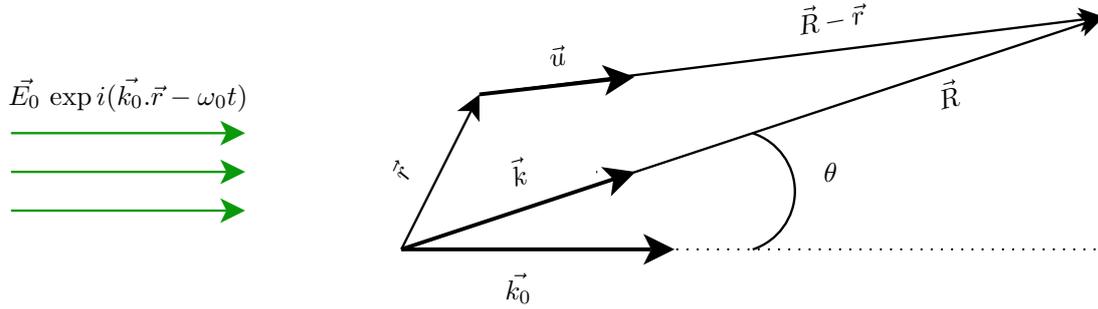


FIGURE 2.3 – Diagramme montrant la relation entre \vec{r} , \vec{R} , le vecteur d'onde incident \vec{k}_0 , le vecteur d'onde diffusé \vec{k} et l'angle de diffusion θ .

$$d\vec{E}'(\vec{R}, t) = \left[\frac{1}{4\pi\epsilon_0 c^2 \|\vec{R} - \vec{r}\|} \vec{u} \times \left(\vec{u} \times \frac{\partial^2 \vec{P}(\vec{r}, t')}{\partial t'^2} \right) d^3 r \right]_{t'=t-\|\vec{R}-\vec{r}\|/c_m} . \quad (2.12)$$

Les différents vecteurs décrivant le processus sont définis dans le diagramme 2.3.

\vec{u} est le vecteur unitaire porté par $\vec{R} - \vec{r}$. Il est aussi colinéaire à \vec{k} , le vecteur d'onde diffusé, quand $\vec{R} \gg \vec{r}$. Le temps retardé t' exprime le fait que le champ \vec{E} se propage à la vitesse $c_m = c/n$ dans le matériau.

Le calcul de l'expression (2.12) revient à déterminer la contribution de la dérivée seconde par rapport au temps de la polarisation par unité de volume. La relation (2.11) montre que la dépendance par rapport au temps de $\vec{P}(\vec{r}, t)$ a deux causes distinctes. Elle provient d'une part des oscillations du champ électrique et d'autre part des fluctuations de $\chi(\vec{r}, t)$, qu'il est dès lors commode d'écrire sous la forme de la somme d'une partie constante et d'une partie variable,

$$\chi(\vec{r}, t) = \chi_0 + \delta\chi(\vec{r}, t). \quad (2.13)$$

On décrit par ailleurs le champ électrique de l'onde incidente dans le matériau comme une onde plane,

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 \exp i(\vec{k}_0 \cdot \vec{r} - \omega_0 t), \quad (2.14)$$

avec $k_0 = n\omega_0/c$, le vecteur d'onde incident.

D'où

$$\vec{P}(\vec{r}, t) = \epsilon_0(\chi_0 + \delta\chi(\vec{r}, t))\vec{E}_0 \cdot \exp i(\vec{k}_0 \cdot \vec{r} - \omega_0 t). \quad (2.15)$$

Le terme des fluctuations de susceptibilité est dominé par les fluctuations thermiques dont les fréquences typiques sont petites ($\sim 10^{12} \text{ Hz}$) devant celles de la lumière visible ($\omega_0 \sim 5 \cdot 10^{14} \text{ Hz}$). On peut donc considérer que χ dépend très peu de t et écrire que

$$\frac{\partial^2 \vec{P}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \cong -\omega_0^2 \vec{P}(\vec{r}, t). \quad (2.16)$$

En substituant les relations (2.14), (2.15) et (2.16) dans (2.12) et en intégrant au temps retardé t' sur le volume V d'échantillon illuminé, on obtient dans la limite où $\vec{R} \gg \vec{r}$, et en remarquant que $\frac{n\omega_0}{c} \|\vec{R} - \vec{r}\| = \frac{n\omega_0}{c} \vec{u} \cdot (\vec{R} - \vec{r}) = \vec{k} \cdot (\vec{R} - \vec{r})$

$$\begin{aligned} \vec{E}'(\vec{R}, t) \propto & - \left(\frac{\omega_0}{c} \right)^2 \frac{\exp i(\vec{k} \cdot \vec{R} - \omega_0 t)}{R} \vec{u} \\ & \times \left[\vec{u} \times \int_V (\chi_0 + \delta\chi(\vec{r}, t')) \cdot \vec{E}_0 \exp i((\vec{k}_0 - \vec{k}) \cdot \vec{r}) d^3\vec{r} \right] \end{aligned} \quad (2.17)$$

L'intégrale dans (2.17) représente la superposition en \vec{R} des ondes diffusées par chaque point \vec{r} illuminé dans le matériau. Si les fluctuations $\delta\chi$ sont nulles, la résultante de la superposition des ondes diffusées est nulle, sauf dans la même direction que celle de la lumière incidente³.

Le champ diffusé dans des directions autres que celle de l'onde incidente trouve donc son origine dans les fluctuations $\delta\chi$ de la susceptibilité diélectrique. Il existe plusieurs types de diffusion de lumière selon la nature de ces fluctuations :

- les fluctuations statiques telles que $\delta\chi(\vec{r}, t') = \delta\chi(\vec{r})$ génèrent dans toutes les directions de l'espace un champ diffusé de fréquence identique à celle de l'onde incidente. C'est le terme de diffusion élastique ou diffusion Rayleigh, une composante généralement très intense dans un spectre de diffusion de lumière.
- dans le cas où les fluctuations sont provoquées par des oscillations périodiques dans le temps et l'espace, tels que les modes de vibration du matériau, la diffusion de lumière est inélastique. On peut alors faire une distinction supplémentaire entre modes *propagatifs* (diffusion Brillouin) et modes *non-propagatifs* (diffusion Raman).

2.1.3 Diffusion Brillouin

Les fluctuations périodiques dues aux modes acoustiques propagatifs peuvent être décrites par leur transformée de Fourier spatiale [28] :

$$\delta\chi(\vec{r}, t') \propto \int d^3q \delta\chi(\vec{q}) \cdot \exp i(\vec{q} \cdot \vec{r} \mp \omega(\vec{q})t'). \quad (2.18)$$

Dans (2.18), $2\pi/q$ est la longueur d'onde de la fluctuation et $\omega(\vec{q})/2\pi$ est la fréquence correspondant à cette longueur d'onde. Le signe \pm devant $\omega(\vec{q})$ rend compte de la dégénérescence dans la relation de dispersion due aux ondes progressive et régressive.

En substituant (2.18) dans (2.17), on obtient alors

3. dans ce cas-là, on vérifie simplement que $\int_V \chi_0 \cdot \vec{E}_0 \exp i((\vec{k}_0 - \vec{k}) \cdot \vec{r}) \propto \delta_{\vec{k}_0 - \vec{k}}$, c'est-à-dire dans la direction $\vec{k} = \vec{k}_0$.

$$\begin{aligned}
 \vec{E}'(\vec{R}, t) \propto & - \left(\frac{\omega_0 \pm \omega}{c} \right)^2 \vec{u} \\
 & \times \left[\vec{u} \times \int d^3q \delta\chi(\vec{q}) \cdot \vec{E}_0 \exp i(\vec{k} \cdot \vec{R} - (\omega_0 \pm \omega(\vec{q}))t) \right] \\
 & \cdot \left[\int_V d^3r \exp i((\vec{k}_0 - \vec{k} + \vec{q}) \cdot \vec{r}) \right],
 \end{aligned} \tag{2.19}$$

avec $\vec{k} = (n/c)(\omega_0 - \omega(\vec{q})) \vec{u}$.

Moyennant le fait que le volume illuminé est grand devant λ^3 , la dernière intégrale dans (2.19) est une fonction de Dirac⁴ égale à $(2\pi)^3 \delta[\vec{q} - (\vec{k}(\vec{q}) - \vec{k}_0)]$.

Les seules excitations diffusant de la lumière dans la direction \vec{u} sont donc les excitations dont le vecteur d'onde vérifie

$$\vec{q} = \vec{k}(\vec{q}) - \vec{k}_0, \tag{2.20}$$

qui est une relation équivalente à (2.3).

Physiquement, (2.20) peut être interprétée de deux façons équivalentes.

D'un point de vue *quantique*, c'est la conservation du moment entre le photon incident \vec{k}_0 , le photon diffusé \vec{k} et le moment \vec{q} du phonon créé ou annihilé au cours de ce processus (cf. 2.1.1).

D'un point de vue *classique*, (2.20) traduit le fait qu'une fluctuation spatiale entraîne la modulation de la susceptibilité χ (cf. (2.18)) et donc celle de la phase des ondes diffusées par chaque point \vec{r} du volume V . Cette modulation compense exactement le facteur de phase $\exp(i(\vec{k}_0 - \vec{k}) \cdot \vec{r})$ qui est le résultat d'une part de la variation dans l'espace de l'onde incidente et du temps retardé d'autre part (cf. (2.17)). Du fait de cette compensation, les ondes interfèrent de manière constructive en \vec{R} . Autrement dit, du point de vue *classique*, la relation (2.20) correspond à la réflexion de Bragg des ondes lumineuses sur un réseau formé par les fronts d'onde des fluctuations.

D'après (2.19), la fréquence $\omega_d/2\pi$ de l'onde diffusée est déplacée par rapport à celle de l'onde incidente de la quantité $\pm\omega(\vec{q})/2\pi$:

$$\omega_d = \omega_0 - \omega(\vec{q}). \tag{2.21}$$

Le spectre de la lumière diffusée contient donc des doublets de pics symétriquement espacés de part et d'autre de la fréquence de la lumière incidente.

Du point de vue de la mécanique *quantique*, ces doublets représentent l'échange d'un quantum d'énergie $\pm\hbar\omega(\vec{q})$ entre le photon incident et la fluctuation. Cela correspond à l'émission ou à l'absorption d'un phonon (cf. fig. 2.4).

Dans la vision *classique* du phénomène il faut tenir compte du fait que les fronts d'onde de la fluctuation se déplacent à la vitesse de phase $v = \pm\omega(\vec{q})/q$. Le décalage

4. il arrive qu'une dimension du volume illuminé ne soit plus grande devant λ (dans un matériau opaque ou dans un film mince par exemple), la relation (2.20) n'est alors plus valable.

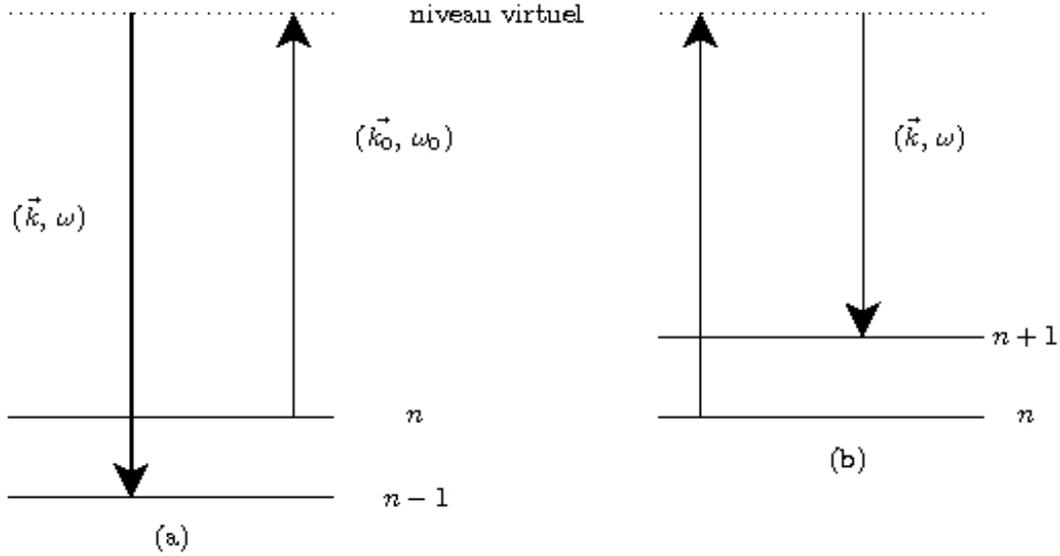


FIGURE 2.4 – Diagramme décrivant le processus de diffusion inélastique de la lumière d'un point de vue quantique : (a) Emission d'un phonon (processus Stokes) ; (b) absorption d'un phonon (processus anti-Stokes).

en fréquence a donc pour origine l'effet Doppler subi par l'onde incidente lors de la réflexion de Bragg sur le réseau formé par les fronts d'onde de la fluctuation.

Dans le paragraphe suivant nous présentons le cas particulier de la diffusion Brillouin par un solide transparent et isotrope.

Diffusion Brillouin par un solide transparent isotrope

Cet exemple permet d'introduire quelques caractéristiques de la diffusion Brillouin dans un cas simple, celui de la diffusion par un solide transparent et isotrope, en évaluant l'intensité Brillouin diffusée.

Dans un tel matériau il y a deux vitesses de propagation des déformations élastiques, la vitesse longitudinale v_s et la vitesse transverse v_t . La variation de la susceptibilité diélectrique peut alors être reliée au tenseur des déformations u par la formule suivante :

$$\delta\chi_{ik} \propto a_1 u_{ik} + a_2 u_{ll} \delta_{ik}, \quad (2.22)$$

où les indices i , k et l correspondent aux coordonnées cartésiennes. La relation (2.22) traduit l'influence des déformations élastiques sur les propriétés optiques du matériau. Dans le cas général, χ est un tenseur.

Le tenseur des déformations dépend du vecteur déplacement \vec{e} défini par :

$$\vec{e} = \vec{e}_0 \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}), \quad (2.23)$$

d'où

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} \right) = \frac{1}{2} i (e_{0i} q_k + e_{0k} q_i) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}). \quad (2.24)$$

Pour le calcul détaillé de l'intensité diffusée, on pourra se reporter aux références [78] et [79].

D'après [78] elle est obtenue en calculant le carré moyen de l'amplitude du déplacement e_0^2 qu'on peut remplacer par l'expression (en considérant que l'énergie cinétique d'un mode q est égale à $k_B T$) :

$$e_0^2 = \frac{4k_B T}{V \rho v^2 q^2}. \quad (2.25)$$

De ces calculs, il ressort un certain nombre de résultats relatifs aux matériaux isotropes :

- La lumière diffusée par des phonons transverses est complètement dépolarisée ;
 - les phonons transverses polarisés dans le plan de diffusion ne diffusent pas de lumière ;
 - en rétrodiffusion, l'intensité diffusée par les phonons transverses est nulle ;
 - la lumière diffusée par les phonons longitudinaux est complètement polarisée.
- A titre d'illustration, nous reproduisons également les résultats de ces calculs.

L'intensité diffusée par les phonons transverses tels que $\vec{e} \parallel (\vec{k}_0 \times \vec{k})$ est

$$\frac{1}{I_0} \left(\frac{dI}{d\Omega} \right) \propto \frac{a_1^2}{4\lambda_0^4 \rho v_l^2} \cdot k_B T \cdot \cos^2 \frac{\theta}{2}. \quad (2.26)$$

L'intensité diffusée par des phonons longitudinaux c'est-à-dire tels que $\vec{e} \perp (\vec{k}_0 \times \vec{k})$ est donnée, dans le cas où \vec{E} et $\vec{E}' \perp (\vec{k}_0 \times \vec{k})$, par

$$\frac{1}{I_0} \left(\frac{dI}{d\Omega} \right) \propto \frac{a_2^2}{\lambda_0^4 \rho v_l^2} \cdot k_B T; \quad (2.27)$$

dans le cas où \vec{E} et $\vec{E}' \parallel (\vec{k}_0 \times \vec{k})$, alors

$$\frac{1}{I_0} \left(\frac{dI}{d\Omega} \right) \propto \frac{a_1^2 \cos^2 \frac{\theta}{2} + a_2^2 \cos^2 \theta}{\lambda_0^4 \rho v_l^2} \cdot k_B T. \quad (2.28)$$

2.1.4 Diffusion Raman

Différences avec la diffusion Brillouin

Nous avons choisi de présenter les bases théoriques de la diffusion inélastique de la lumière à travers le cas particulier de la diffusion Brillouin, et nous avons montré que ce sont les fluctuations de susceptibilité induites par les vibrations qui sont à l'origine du processus de diffusion. Sans prolonger les considérations théoriques, il est important de préciser la différence conceptuelle entre la diffusion Brillouin et la diffusion Raman, ce que l'expérience ne permet pas toujours d'apprécier (*a fortiori*

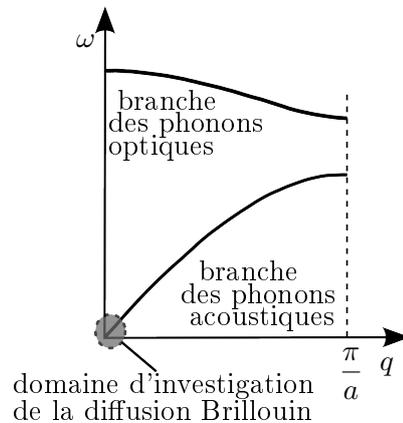


FIGURE 2.5 – Schéma de la première zone de Brillouin pour une chaîne linéaire diatomique montrant la relation de dispersion pour les phonons acoustiques et optiques (le paramètre de maille est égal à a). Seule la moitié de la zone de Brillouin est représentée, l'autre moitié pouvant être déduite de la première par symétrie par rapport à l'axe des ordonnées.

quand il s'agit de diffusion Raman dite « basse fréquence » car il y a chevauchement possible des signaux Brillouin et Raman).

Comme nous l'avons déjà évoqué, la diffusion Brillouin et la diffusion Raman sont des techniques parentes car elles consistent toutes les deux en une diffusion inélastique de la lumière visible (au moins dans leur conception classique) par des modes de vibration. Sur le plan expérimental, elles se distinguent essentiellement par le pouvoir de résolution des spectromètres utilisés, très élevé dans le cas de la diffusion Brillouin⁵ (les échanges relatifs d'énergie photon/phonon détectés sont de l'ordre de 10^{-6}) et beaucoup moins élevé dans le cas de la diffusion Raman ($\Delta E/E \sim 10^{-2} - 10^{-3}$). A la limite, diffusion Raman et diffusion Brillouin peuvent être réalisées continûment avec un même spectromètre dispersif et une détection monocanale, comme il est possible de le faire au laboratoire avec le quintuple monochromateur Z40 (voir 2.2.2).

Au-delà de ces différences techniques, les deux types de diffusion se distinguent surtout par la nature des modes de vibration sondés. Comme nous l'avons vu (2.1.1), le vecteur d'onde q transféré lors du processus de diffusion inélastique de photons appartenant au domaine visible est « quasi-nul », ou en tout cas très petit devant l'étendue de la première zone de Brillouin (fig. 2.5). Le fait qu'il ne soit pas strictement nul est à l'origine de la diffusion Brillouin à très basse énergie. Faire varier la norme de q (en changeant la géométrie de l'expérience par exemple) permet de sonder, certes sur une gamme très restreinte avec les photons du domaine visible, la grande dispersion des modes acoustiques du système étudié. En première approximation, l'énergie des modes varie linéairement avec q .

Les modes de vibration sondés par la diffusion Raman sont caractérisés par des énergies qui, *habituellement* (cette nuance nécessite d'être soulignée pour le cas

5. à noter que les expériences de diffusion Brillouin requièrent l'utilisation d'un laser monomode.

précis de nos études), sont d'un facteur 100 à 1000 fois plus élevé que celles des modes sondés par diffusion Brillouin (voir le tableau 2.1). Dans un solide ce domaine d'énergie correspond à celui des modes optiques. Ces derniers se différencient des modes acoustiques par le fait qu'ils possèdent une énergie non nulle à $q = 0$ et que cette énergie dépend généralement peu, par rapport aux modes acoustiques, de q : ce sont des modes peu dispersifs (voir fig. 2.5). Pour mieux saisir la nature des modes optiques, il est intéressant de remarquer que lors du passage d'un cristal de molécules à la molécule isolée, ces modes « survivent » avec relativement peu de changements. A titre d'exemple, considérons le cas bien connu des spectres Raman de l'eau solide (glace hexagonale), de l'eau liquide et de la vapeur d'eau, dans le domaine d'énergie correspondant au mode d'élongation de la liaison OH (vibration localisée à l'échelle de la liaison OH de la molécule d'eau). A part une modification de la position et de la largeur du pic Raman, on constate que le mode de vibration d'élongation OH, qualifié de mode *optique* dans l'eau et la glace, apparaît toujours dans une même gamme de fréquence ($3200 - 3700 \text{ cm}^{-1}$).

Ce mode dépend essentiellement de la liaison OH et est peu tributaire (au premier ordre) de l'existence de voisins. Cette comparaison très schématique (nous ne faisons pas état, à ce stade, des règles de sélection, voir plus bas) permet de comprendre que les modes optiques sont de nature localisée à l'inverse des modes acoustiques dont l'existence est conditionnée par la corrélation à longue distance (supramoléculaire) entre déplacements vibratoires des atomes. Dans le cas des modes optiques, l'énergie de vibration est *localisée* au niveau de la molécule, alors que les modes acoustiques contribuent à la propagation de l'énergie.

Le terme de diffusion Raman est donc habituellement associé à une diffusion par des modes localisés, alors que la diffusion Brillouin concerne plutôt la diffusion par les modes propagatifs. Cette nuance a son importance dans le cas particulier de la diffusion inélastique par les modes de nanoparticules qui constitue le principal sujet de ce travail. Nous avons en effet montré dans le chapitre 1 que les modes propres d'une nanosphère (modes sphéroïdaux et modes torsionnels) dépendent des paramètres élastiques de la sphère, à partir desquels sont définies les vitesses acoustiques longitudinale et transverse. Pour autant, la diffusion inélastique de la lumière par les modes de nanoparticules s'apparente à une diffusion Raman et non à une diffusion Brillouin. Bien que dépendant des vitesses acoustiques, les modes de nanoparticules revêtent avant tout un caractère localisé ou « quasi-optique » du fait du confinement des vibrations. Le confinement provoque la redistribution des modes acoustiques et génère dans la gamme d'énergie propre à ces modes, des modes aux caractéristiques proches de celles des modes optiques. Ces modes quasi-optiques sont analogues aux ondes stationnaires dans une corde résultant de la superposition de deux ondes planes progressives de vecteurs d'onde identiques et opposés.

Règles de sélection

Dans l'exemple de la vibration OH de la molécule d'eau, nous avons sciemment omis de commenter la variation d'intensité du pic Raman avec les différentes transitions de phase. Comme exprimé par les relations (2.19) ou (2.26) l'intensité Raman

est proportionnelle au carré de la fluctuation de polarisabilité engendré par le mode de vibration. Il ne suffit pourtant pas pour qu'un mode soit observable qu'il soit associé à une fluctuation non nulle de polarisabilité, il faut aussi qu'il soit *actif* en spectroscopie Raman. La diffusion Raman répond en effet à des règles de sélection liées à la parité des fonctions d'onde vibrationnelles. L'analyse des modes de vibration par la théorie des groupes permet de prévoir l'activité Raman (ou infrarouge) d'un mode de vibration donné. L'examen des règles de sélection pour les différents modes de nanoparticules sphériques libres, dans l'hypothèse où leur taille est inférieure à la longueur d'onde de la lumière ($\lambda \gg D$), conduit aux résultats suivants [80] :

- les modes torsionnels ne sont pas actifs en Raman,
- parmi les modes sphéroïdaux, seuls les modes $l = 0$ (sphérique) et $l = 2$ (quadrupolaire) sont actifs en Raman.

Toutes les études expérimentales Raman réalisées à ce jour confirment la validité de ces règles de sélection. Les études récentes menées sur des nanoparticules de plus grande taille (de l'ordre de quelques centaines de nanomètres) semblent indiquer que dans ce régime, les restrictions citées plus haut ne sont plus applicables.

2.2 Outils spectroscopiques

2.2.1 L'interféromètre Fabry-Pérot multipassage

Les expériences de diffusion Brillouin (et de Raman très basse fréquence) ont été réalisées avec un interféromètre Fabry-Pérot multipassage (Tandem FP) [81, 82, 83, 84], appareil développé par J. R. Sandercock. C'est un équipement dont le laboratoire a fait l'acquisition au mois de juin 2005, au début de ce travail de thèse, aussi le décrivons-nous relativement en détail dans cette partie.

Le fonctionnement du spectromètre Sandercock repose sur le principe de la cavité Fabry-Pérot [85, 86].

La cavité Fabry-Pérot

Un interféromètre Fabry-Pérot ou Fabry-Pérot (FP) est constitué de deux miroirs plans parallèles, espacés d'une distance d *variable*. Les faces internes des miroirs sont recouvertes d'un revêtement de très haute réflectivité. Les miroirs eux-mêmes sont légèrement prismatiques afin d'éviter les réflexions parasites sur leur faces externe. Le FP est le lieu d'interférences à N ondes et ne transmet que les longueurs d'onde λ qui interfèrent de manière constructive. Il s'agit des longueurs d'onde respectant la condition :

$$2d = p\lambda \quad \text{avec } p \text{ un entier positif.} \quad (2.29)$$

D'après (2.29), la cavité Fabry-Pérot transmet aussi la longueur d'onde λ' telle que $2d = (p + 1)\lambda'$.

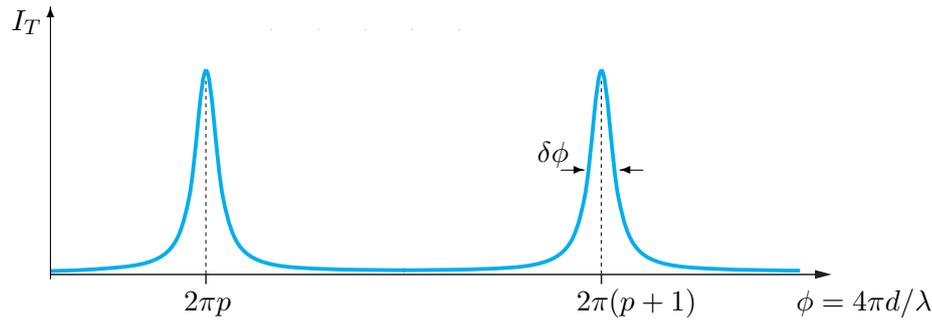


FIGURE 2.6 – Spectre de transmission d’une cavité Fabry-Pérot.

En faisant varier l’espacement d entre les miroirs il est par ailleurs possible de balayer un certain intervalle de longueur d’onde ou de fréquence. Pour deux espacements différents d_1 et d_2 par exemple, on peut écrire ces deux relations : $2d_1 = p_1\lambda_1$ et $2d_2 = p_2\lambda_2$. Mais rien n’empêche que $\lambda_1 = \lambda_2$ à condition que $\frac{d_1}{d_2} = \frac{p_1}{p_2}$. C’est le problème du recouvrement des ordres pour un FP unique. Il rend difficile l’identification à coup sûr d’une raie.

La fonction de transmission du FP est une fonction d’Airy, calculée en prenant en compte la contribution de la réflexion et la transmission pour chacune des N ondes, et est égale à

$$I_T = \frac{I_{max}}{1 + M \sin^2(\varphi/2)}, \quad (2.30)$$

avec $I_{max} = I_0 \cdot T^2/(1 - R^2)$, T et R respectivement la transmittivité et la réflectivité des miroirs, et I_0 l’intensité de l’onde incidente,

avec $M = 4R/(1 - R^2)$,

et avec $\varphi = 4\pi d/\lambda$, φ étant le déphasage après un aller-retour dans la cavité pour une onde incidente se propageant selon la normale de l’axe du FP.

La figure 2.6 représente le spectre de transmission d’un FP en fonction du déphasage. Deux grandeurs caractérisent ce spectre :

- $\delta\varphi$ est la largeur à mi-hauteur d’une frange et correspond à la résolution.
- $\Delta\nu$ est l’intervalle spectral libre (ISL). C’est l’intervalle en fréquence séparant deux ordres de transmission successifs.

D’après (2.29), $2d = p\lambda = pc/\nu$.

Donc $\Delta\nu = \Delta p \cdot c/2d$ avec $\Delta p = 1$. D’où

$$\Delta\nu = \frac{c}{2d}. \quad (2.31)$$

Ces deux grandeurs nous permettent d’introduire à leur tour deux paramètres décrivant les performances d’un FP : la *finesse* et le *contraste* .

La finesse est le rapport de la séparation de deux franges adjacentes sur la résolution : $F = 2\pi/\delta\varphi$.

Il est assez facile de calculer $\delta\varphi$, la largeur à mi-hauteur d’une frange. Pour une frange d’ordre p , les points où l’intensité est égale à la moitié de l’intensité maximum vérifient :

$$\varphi = 2p\pi \pm \frac{\delta\varphi}{2}. \quad (2.32)$$

Et d'après (2.30), et pour M suffisamment grand

$$I_T = \frac{I_{max}}{2} \Rightarrow M \sin^2 \frac{\delta\varphi}{4} = 1 \Rightarrow \sin \frac{\delta\varphi}{4} = \frac{1-R}{2\sqrt{R}} \sim \frac{\delta\varphi}{4}$$

Donc

$$F = \frac{2\pi}{\delta\varphi} = \frac{\pi\sqrt{R}}{1-R} = \frac{\pi\sqrt{M}}{2}. \quad (2.33)$$

La finesse dépend donc uniquement de la qualité des miroirs du FP. Plus la finesse est grande, plus les franges sont *finés*. Ce paramètre traduit aussi le fait qu'il est possible d'augmenter l'intervalle spectral libre, mais au détriment de la résolution.

En effet, d'après (2.31), $\varphi = 4\pi d/\lambda = 2\pi\nu/\Delta\nu$ donc $\delta\varphi = 2\pi\delta\nu/\Delta\nu$ avec $\delta\nu$ la résolution en termes de fréquence. Finalement, on peut écrire la finesse F sous la forme : $F = \Delta\nu/\delta\nu$.

Le contraste C est le rapport de l'intensité maximum transmise sur l'intensité minimum transmise.

$$C = \frac{I_{max}}{I_{min}} = \left(\frac{(1+R)}{(1-R)} \right)^2 = 1 + \frac{4F^2}{\pi^2}. \quad (2.34)$$

Principe du Tandem Fabry-Pérot

Le problème de la superposition des ordres supérieurs pour un Fabry-Pérot (FP) unique fait que l'interprétation sans ambiguïté d'un spectre est difficile. De plus, un FP unique ne permet pas de faire des mesures avec un contraste suffisant pour observer les signaux Brillouin très peu intenses au voisinage de la raie élastique en revanche très lumineuse. Ces problèmes peuvent être résolus par l'utilisation de deux FP en tandem. Dans ce dispositif, FP1 et FP2 sont couplés de manière à ce que la variation Δd de l'espacement des miroirs d_1 et d_2 dans chacune des cavités obéisse à chaque instant à la relation :

$$\frac{\Delta d_1}{\Delta d_2} = \frac{d_1}{d_2} = p_1/p_2. \quad (2.35)$$

La fonction de transmission totale I_t résultant du passage successif de la lumière dans FP1 et FP2 est égale à $I_t = I_1.I_2$ le produit des fonctions de transmission de FP1 et FP2. Il y a coïncidence des deux cavités pour la longueur d'onde $\lambda = 2d_1/p_1 = 2d_2/p_2$; en revanche les ordres voisins s'ils ne disparaissent pas complètement (la fonction de transmission d'un interféromètre n'étant jamais rigoureusement nulle), ne subsistent qu'à l'état de signaux très peu intenses, les *ghosts*. Les fonctions de transmission de FP1 et FP2 ne coïncident à nouveau que pour plusieurs

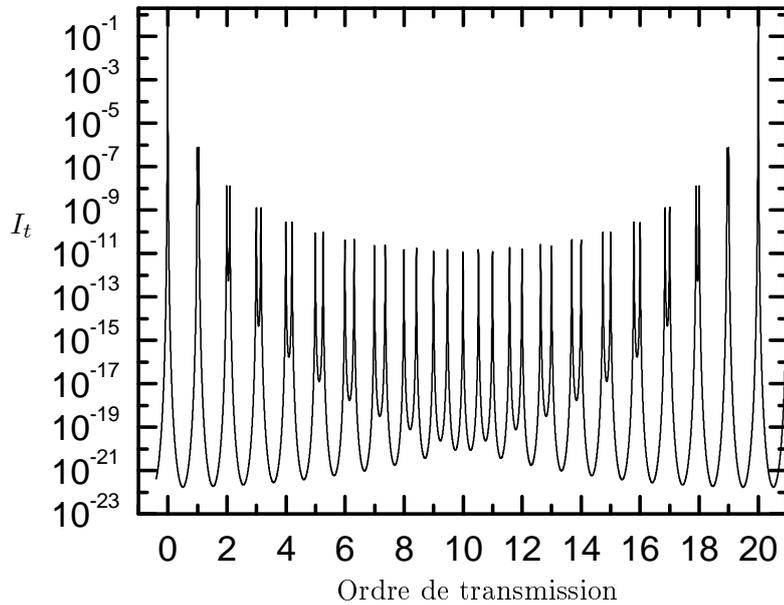


FIGURE 2.7 – Fonction de transmission I_t du spectromètre tandem Fabry-Pérot (3 + 3 passages) d'après [8].

fois l'intervalle spectral libre (ISL) de FP1 : l'ISL du tandem est donc beaucoup plus grand que celui d'un interféromètre unique, pour une résolution $\delta\lambda$ identique. En pratique, on se limite à 2 ou 3 fois l'ISL d'un FP unique [87].

Pour que l'intensité des *ghosts* ne soit pas trop grande, le rapport d_2/d_1 doit être tel que la finesse F pour un interféromètre obéisse à la relation : $F > d_1/(d_1 - d_2)$. D'après l'équation (2.33), et sachant que $R = 0.97$ pour un FP, $F \approx 80$. Une valeur adaptée du rapport d_2/d_1 est 0.95.

Dans le tandem Fabry-Pérot la lumière analysée fait en tout 3 passages dans chaque cavité. La fonction de transmission totale de l'appareil est donc théoriquement égale à $I_t = I_1^3 \cdot I_2^3$. La figure 2.7 montre que les ordres successifs de transmission de l'appareil sont fortement atténués (d'un facteur compris entre 10^{-6} et 10^{-11}) jusqu'au 20ième ordre qui a une amplitude comparable à celle de l'ordre 0.

Description du Tandem Fabry-Pérot

Les axes des deux FP disposés en série sont inclinés d'un angle ϑ l'un par rapport à l'autre. Deux des miroirs de chaque FP sont montés sur la même plate-forme. Cette plate-forme repose sur un parallélogramme déformable lui-même fixé sur une platine de translation. Un des deux miroirs de chaque FP est fixé sur trois céramiques piézoélectriques qui contrôlent le parallélisme de chaque FP. En appliquant une tension à chacune de ces céramiques piézoélectriques, il est possible de régler l'orientation des miroirs par rapport à leurs axes verticaux et horizontaux afin d'avoir un parallélisme entre les miroirs meilleur que $\lambda/100$. En appliquant une tension constante d'offset aux céramiques de FP2, on peut faire varier son espacement de quelques

longueurs d'onde. On peut ainsi synchroniser les deux FP pour qu'ils soient en résonance à la même fréquence. Au cours d'une mesure, un boîtier électronique asservit les céramiques piézoélectriques et permet de réguler par une boucle de rétroaction l'orientation et l'écart relatif des deux FP.

Entraîné par une vis micrométrique, la platine de translation est utilisée pour les déplacements de grande amplitude et permet de régler l'espacement entre les miroirs.

Le balayage (ou *scan*) est effectué en déformant de manière périodique le parallélogramme par l'intermédiaire d'une céramique piézoélectrique. Un détecteur capacitif qui mesure l'espacement entre les miroirs permet de contrôler dynamiquement cette céramique. Ce système garantit à la fois l'excellent maintien de l'espacement des miroirs au cours d'un *scan*, mais aussi la linéarité du *scan* et la bonne indépendance du système tout entier vis-à-vis des variations de température puisque les deux FP partagent le même environnement. A tout moment au cours d'un *scan*, la relation (2.35) est bien vérifiée avec $d_1/d_2 = 1/\cos\vartheta$ où ϑ est tel que $\cos\vartheta = 0.95$ i.e. $\vartheta \approx 18^\circ$.

Le contraste d'un seul FP ($\sim 10^3$) ne permet pas d'observer les signaux inélastiques dont l'amplitude est très faible. Le gros avantage du Tandem FP tient au fait que la lumière effectue trois allers-retours à travers le tandem donc $(3+3)$ passages en tout. Si C_1 est le contraste d'un seul FP, le contraste C de l'appareil est égal à C_1^6 . Théoriquement (cf. relation (2.34)), le contraste est donc supérieur à 10^{18} . La détermination expérimentale [88] du contraste effectif du dispositif montre que $C > 10^{10}$. De plus, en élevant à la puissance sixième la fonction de transmission d'un seul interféromètre⁶, on rend la fonction de transmission de l'appareil extrêmement fine. Le contraste et la résolution très élevés du Tandem FP en font donc un appareil très adapté à la mesure d'excitations de faible intensité très près de la raie élastique.

Le système complet multipassage comporte un nombre minimum d'éléments optiques : miroirs, prismes, lentilles etc... afin d'avoir l'appareil le plus lumineux possible (cf. fig. 2.8).

Le Tandem FP doit en plus être isolé des vibrations extérieures. Les vibrations dans les constructions, dont la fréquence est de l'ordre de la dizaine de GHz, peuvent être à l'origine de distorsions dans l'interféromètre rendant impossible son utilisation. Le dispositif comprenant les deux interféromètres couplés est monté sur un module anti-vibration dynamique qui l'isole complètement de ces vibrations. Une boîte isole le Tandem FP des ondes acoustiques à plus hautes fréquences qui peuvent aussi perturber le fonctionnement de l'appareil. L'ensemble, comprenant le Tandem FP et le montage optique qui permet l'illumination de l'échantillon et la collection de la lumière diffusée, est à son tour fixé sur table optique.

Le Montage expérimental

La figure 2.8 décrit le montage expérimental comprenant une source laser, l'optique d'illumination et de collection de la lumière, l'interféromètre Fabry-Pérot

6. Théoriquement, $I_t = (I_1 \cdot I_3)^3$.

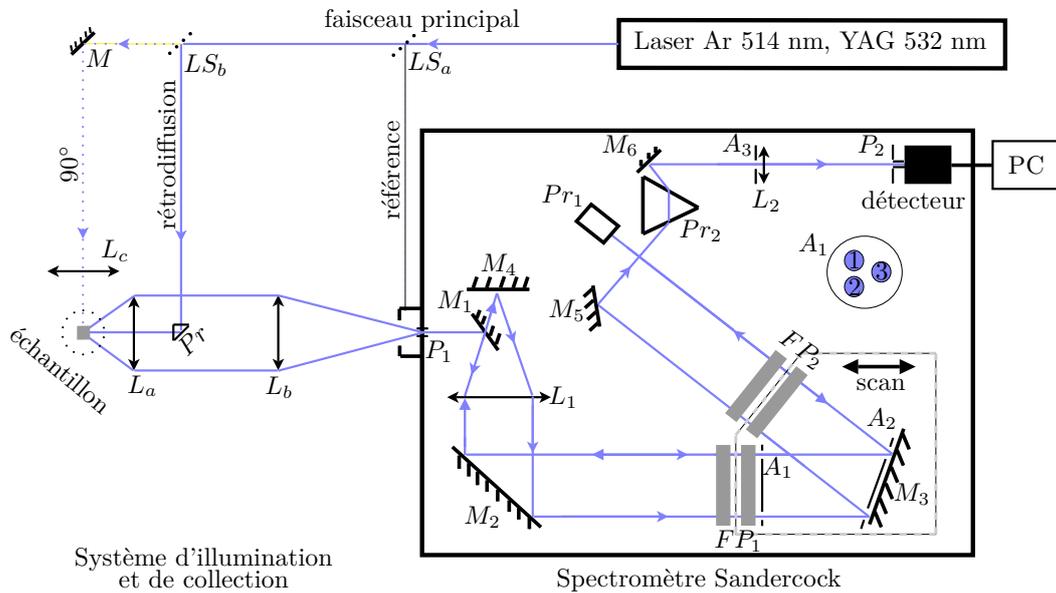


FIGURE 2.8 – Montage expérimental.

multipassage (Tandem FP) et la chaîne d'acquisition.

Les sources laser sont de deux types :

- un laser à gaz (Argon) accordable principalement utilisé avec la radiation verte à 514.5 nm et plus rarement avec les radiations bleues à 488 nm et 476.5 nm . Ce laser à gaz est équipé d'un étalon Fabry-Pérot permettant la sélection d'un seul mode du laser ;
- un laser YAG à 532 nm .

La source laser forme un faisceau monochromatique dont une petite partie (quelques %) est prélevée par une lame transparente (LS_a) et constitue le faisceau de référence. L'objectif L_a focalise le faisceau principal sur l'échantillon. Une lame séparatrice (LS_b) permet de passer simplement de la configuration « standard » en rétrodiffusion (configuration la plus utilisée) à la configuration à 90° .

En rétrodiffusion, c'est ce même objectif photo qui collecte la lumière diffusée par l'échantillon et forme avec une deuxième lentille (L_b) un doublet afocal. L_b focalise la lumière diffusée sur le trou d'entrée P_1 du Tandem FP. Un système de deux miroirs permet de compenser toute différence de hauteur et/ou de direction entre le faisceau entrant et le trou d'entrée de l'appareil.

A l'intérieur de l'appareil, après réflexion sur le miroir M_1 , la lentille L_1 transforme la lumière focalisée sur le trou d'entrée du Tandem FP en un faisceau parallèle qui passe trois fois (grâce au jeu de miroirs M_2 , M_3 , M_4 et M_5 et au prisme Pr_1) à travers les deux FP en tandem. La lumière est filtrée spatialement par plusieurs diaphragmes (A_1 , A_2 et A_3). Le schéma de A_1 montre les différents passages (1, 2 et 3) du faisceau. Le prisme Pr_2 dévie ensuite la lumière qui est focalisée par le système (M_6 , L_2) sur le trou de sortie P_2 et le détecteur. Les diamètres des trous d'entrée et

de sortie du spectromètre sont ajustables (respectivement de 150 à 1000 μm et de 200 à 1300 μm). De cette manière, on peut s'assurer de l'adéquation entre les diamètres des trous d'entrée et de sortie et la résolution du tandem dictée par l'espacement des cavités. Le détecteur est une photodiode Si à avalanche (SPCM-AQR, Perkin Elmer) très sensible dont le domaine de détection est compris entre 400 nm à 1060 nm . La température du détecteur est contrôlée et régulée par thermoélectricité. Le bruit (que nous avons mesuré) est inférieur à 1 *cps/s/canal*. Le détecteur est relié à un ordinateur faisant office d'analyseur multicanal par le biais du programme *Ghost* qui permet l'acquisition et la visualisation des spectres.

Le tableau 2.2 résume les caractéristiques du montage expérimental.

Longueurs d'onde utilisées	
Ar	514.5 nm , 488 nm
YAG	532 nm
Puissance laser sur l'échantillon	$\sim 1 mW$ à plus de 100 mW
Finesse	> 100
Contraste	$> 10^{10}$
Domaine de ν	$< 1 GHz$ à 600 GHz jusqu'à 2 THz [88]
Domaine de q ($n = 1,55$, cristal de STMV)	
YAG à 90°	$2,6 \cdot 10^{-2} nm^{-1}$
Ar en rétrodiffusion	$4 \cdot 10^{-2} nm^{-1}$

TABLE 2.2 – Paramètres expérimentaux du montage utilisant le tandem Fabry-Pérot.

2.2.2 Quintuple monochromateur

Le quintuple monochromateur Z40 est un prototype élaboré par Dilor pour l'observation des signaux très basses fréquences proches de la raie élastique. Il utilise le principe de dispersion de la lumière par un réseau. Le coeur du dispositif est donc le système *dispersif* constitué de cinq réseaux (les monochromateurs) de 1800 traits/mm placés sur un même axe de rotation. Des fentes d'entrée et de sortie, ainsi que des fentes intermédiaires entre chaque réseau, filtrent la lumière parasite (due aux réflexions multiples et aux ordres supérieurs) et déterminent la résolution de l'appareil. Des miroirs paraboliques de focale 80 cm disposés entre chaque réseau permettent le passage et la réflexion de la lumière diffusée sur chacun des réseaux (figure 2.9). La lumière diffusée est enfin collectée par un photomultiplicateur (PM) refroidi par effet Peltier. La rotation pas à pas des réseaux est commandée par un ordinateur qui permet en outre l'affichage des spectres en temps réel par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition.

Les caractéristiques du quintuple monochromateur sont résumées dans le tableau 2.3.

Il est plus simple de juger des performances respectives des deux appareils (quintuple monochromateur et tandem Fabry-Pérot) en comparant des spectres faits sur un même échantillon.

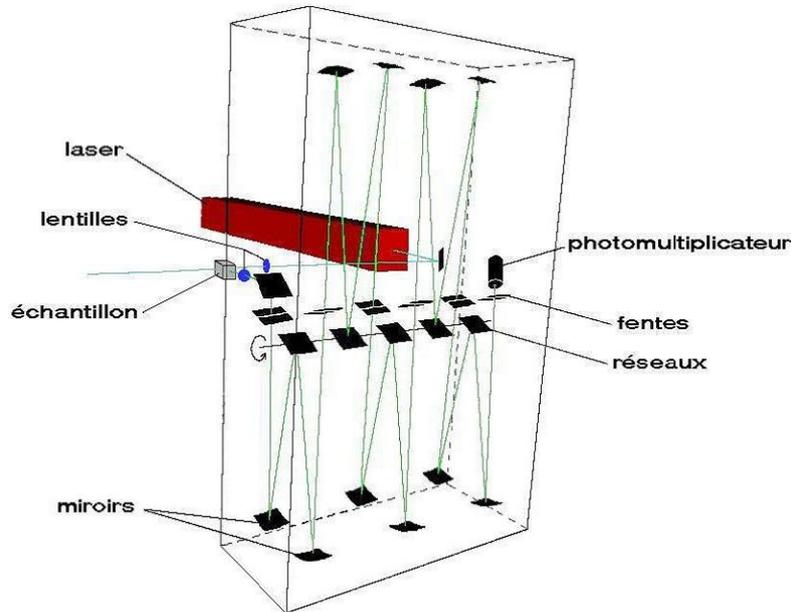


FIGURE 2.9 – Schéma du quintuple monochromateur Z40 [2].

Pouvoir de résolution	$8.1 \cdot 10^5$
Dispersion	0.14 nm/mm
Pas le plus petit	0.1 cm^{-1} en mode séquentiel $< 0.1 \text{ cm}^{-1}$ en mode continu

TABLE 2.3 – Paramètres du spectromètre Z40.

2.2.3 Applications aux nano-objets et comparaison des deux appareils

Depuis plusieurs années le spectromètre Fabry-Pérot est détourné de sa fonction première qui est d'observer les modes acoustiques dans les matériaux [29, 30] et est utilisé afin d'étudier l'interaction de la lumière avec les ondes acoustiques dans des milieux inhomogènes : dans des suspensions de colloïdes « durs » (billes de PMMA (polyméthylméthacrylate) [89], billes de PMMA et sphères de silice [74]), « mous » (micelles de polymères [90]), dans des systèmes lamellaires de polymères [91], dans des opales synthétiques (assemblées de sphères de silice [75, 76], de billes de polystyrène [92, 9]), des cristaux colloïdaux binaires [93] et même sur une nanosphère de silice isolée [94]. La figure 2.10 montre l'exemple des spectres Brillouin d'opales.

Pour notre part nous avons utilisé le tandem Fabry-Pérot pour caractériser des échantillons de verres contenant des nanoparticules d'or (voir à ce sujet le chapitre suivant). Ce type de mesures était auparavant effectué au laboratoire (et continue à l'être) avec le spectromètre Z40. A titre comparatif, la figure 2.11 présente deux spectres effectués sur le même échantillon dans les mêmes conditions avec le quintuple monochromateur et le tandem Fabry-Pérot.

Le tandem Fabry-Pérot se distingue du quintuple monochromateur Z40 par :

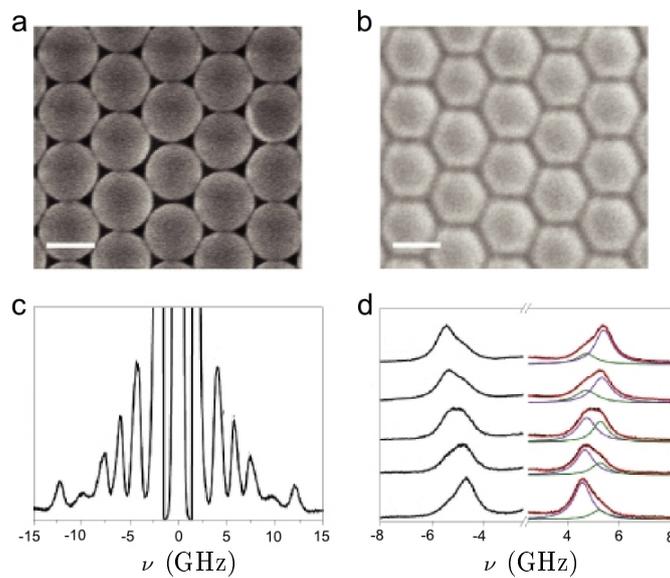


FIGURE 2.10 – Spectres Brillouin (ou Raman basse fréquence) d’opales formées de billes de polystyrène [9]. Images (vue du dessus) par microscopie à balayage des opales déshydratées (a) et hydratées (b). Le diamètre des particules est de 256 nm et la barre d’échelle est égale 200 nm . (c) Spectre Brillouin des opales déshydratées. Les différents pics correspondent aux modes de vibration des billes de polystyrène. (d) Spectres Brillouin et fits à deux lorentziennes pour les opales hydratées à différents vecteurs d’onde q (de bas en haut, valeurs de q croissantes comprises entre $1.44 \cdot 10^{-2} \text{ nm}$ et $1.60 \cdot 10^{-2} \text{ nm}$).

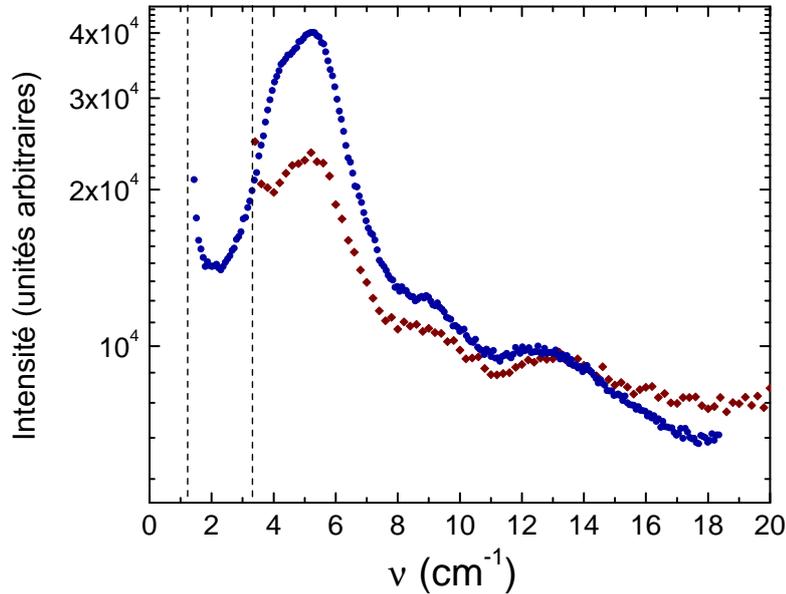


FIGURE 2.11 – Spectres Raman basse fréquence d’un échantillon de verre Saint-Louis dopé à l’or. En bleu, spectre enregistré avec le tandem Fabry-Pérot ($\lambda = 532 \text{ nm}$); en rouge, spectre enregistré avec le quintuple monochromateur Z40 ($\lambda = 514.5 \text{ nm}$). Les lignes pointillées figurent la position du pied de la raie élastique.

- une meilleure résolution ;
- un taux de réjection de la raie élastique plus élevé permettant de faire des mesures extrêmement près de la raie élastique.

Le quintuple monochromateur présente les avantages suivants :

- un domaine d’investigation en fréquence beaucoup plus grand, des très basses fréquences aux fréquences Raman usuelles ;
- la possibilité d’utiliser une gamme de longueurs d’onde excitatrices plus étendue (tout le domaine visible), celle-ci étant limitée par la réponse des réseaux et du détecteur. Ce domaine se limite à des longueurs d’onde comprises entre le bleu et le vert avec le tandem Fabry-Pérot ⁷.

7. Au-delà, il faudrait changer les miroirs des cavités Fabry-Pérot dont le revêtement est adapté à une gamme restreinte de longueurs d’onde.

Chapitre 3

Application à l'étude de nanoparticules métalliques

Dans cette partie sont décrites les expériences que nous avons effectuées sur des verres dopés par des poudres métalliques (verres de la cristallerie Saint-Louis en Alsace). Au départ incolores, ces verres prennent une coloration caractéristique du métal incorporé lorsqu'ils sont recuits. Cette technique de coloration des verres, connue depuis l'époque de l'Empire Romain est encore employée de nos jours, pas seulement dans un but décoratif ou dans la fabrication de bijoux, mais également dans des domaines aussi pointus que la nanophotonique. Le recuit provoque en effet la formation de nanoparticules métalliques dans la matrice vitreuse. L'absorption à l'origine de la coloration est due à l'excitation du *plasmon de surface* des nanoparticules, qui est une oscillation collective des électrons de conduction de la nanoparticule. Ce phénomène est une conséquence du confinement. La fréquence de la résonance du plasmon de surface dépend évidemment de la nature du métal, mais également de la forme, la taille et la nature de la matrice des nanoparticules (notamment à travers l'indice optique). La maîtrise de ces paramètres ouvre donc la voie à la synthèse de matériaux aux propriétés optiques remarquables.

L'objectif principal de ce chapitre est de montrer la contribution non négligeable du tandem Fabry-Pérot (cf. 2.2.1) dans l'étude des modes de vibrations basse fréquence de nanoparticules métalliques, en particulier par l'apport d'une meilleure résolution dans les mesures. Leur observation est grandement facilitée par l'existence d'un couplage entre les modes de vibration et le plasmon de surface (Raman Résonnant), qui conduit à une exaltation de la lumière diffusée par ces modes de vibrations.

Les premières observations de modes propres de nano-objets ont été effectuées par Duval *et al.* sur des échantillons présentant des similitudes avec les échantillons que nous étudions : des microcristallites de spinelle dans une matrice de verre dont la nucléation et la croissance avaient été au préalable induites par un traitement thermique [42]. Ces premières observations ont confirmé la prédiction théorique selon laquelle les fréquences des modes propres de vibration d'une sphère de rayon R suivent une loi en $1/R$ [35]. Les modes propres de vibration ont été par la suite

détectés dans des systèmes très différents :

- des nanoparticules métalliques (argent, or [95, 96, 97, 98, 2, 99]) et bimétalliques (or-argent [100], nickel-argent [38], cuivre-argent [101]) dans des matrices diverses (silice, alumine poreuse etc...);
- des nanoparticules de semi-conducteurs Cd(S,Se) [102, 26, 41, 103];
- des nanoparticules d'oxydes (TiO₂) [104];
- des supra-cristaux de nanoparticules d'argent [105, 106];
- des suspensions de colloïdes « durs » (billes de PMMA, polyméthylméthacrylate [89], billes de PMMA et sphères de silice [74]), « mous » (micelles de polymères [90]) et une nanosphère de silice isolée [94];
- des opales synthétiques (assemblées de sphères de silice [75, 76], de billes de polystyrène [92]);
- des aérogels [107] etc...

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre notre équipe et Serge Etienne du Laboratoire de Physique de Matériaux (UMR CNRS 7556) de l'Ecole des Mines de Nancy.

3.1 Échantillons

Les échantillons étudiés sont des verres de silice et de plomb dont la composition est donnée pour mémoire dans le tableau 3.1. Ils se présentent sous la forme de lames carrées de verre d'environ 1 *cm* de côté et quelques *mm* d'épaisseur. Nous avons principalement étudié des verres dopés à l'or mais des expériences sur des verres dopés à l'or et l'argent sont également en cours.

L'incorporation de l'or dans le verre se fait schématiquement de la manière suivante : des feuilles d'or sont dissoutes dans l'eau régale (2 – 3 volumes d'acide chlorhydrique pour un volume d'acide nitrique). L'or forme avec le chlore un sel, AuCl₄⁻, dans lequel il se trouve sous forme oxydée. Le sel d'or est ensuite mélangé (en quantités infimes, cf. tab. 3.1) à du sable. A ce mélange homogène sont ajoutés les autres constituants du verre (potasse, soude, antimoine etc...). Le tout est ensuite fondu et le verre obtenu est incolore. Dans le mélange fondu, la réaction de réduction de l'or par l'étain a lieu : $2\text{Au}_3^+ + 3\text{Sn}_2^+ \rightleftharpoons 2\text{Au} + 3\text{Sn}_4^+$. Dans le verre incolore de départ, il y a donc déjà avant tout processus de recuit de l'or sous forme atomique.

	% massique
SiO ₂	53.000
PbO	30.000
K ₂ O	12.000
Na ₂ O	2.000
Sb ₂ O ₅	1.800
As ₂ O ₃	1.000
SnO ₂	0.200
TiO ₂	0.100
Al ₂ O ₃	0.020
Cl	0.006
Fe ₂ O ₃	0.005
CaO	0.003
Au	0.033

TABLE 3.1 – Composition massique du verre Saint-Louis.



FIGURE 3.1 – Echantillons de verre dopé à l'or (de haut en bas, du moins recuit au plus recuit).

Les échantillons subissent ensuite des traitements thermiques de durées croissantes (1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64h) à trois températures différentes, 455 °C, 470 °C et 490 °C, c'est-à-dire en-dessous, légèrement au-dessus et franchement au-dessus de la température de transition vitreuse (T_g). Après le recuit, et malgré le pourcentage massique très faible en or, les échantillons prennent une teinte rouge rubis caractéristique de l'absorption du plasmon de surface des nanoparticules d'or.

La coloration est plus ou moins prononcée selon la durée du traitement thermique (cf. fig. 3.1). Une caractérisation préalable des échantillons a donc consisté à mesurer leur absorption. Les mesures d'absorption¹ permettent de caractériser les nanoparticules à travers les propriétés du plasmon de surface : la position, l'intensité et la largeur. Des observations par microscopie électronique en transmission ont également été effectuées. Elles complètent la caractérisation optique en donnant accès dans une certaine mesure à la morphologie des nanoparticules, leur qualité cristalline et leur distribution en taille.

3.2 Les mesures d'absorption

Avant de présenter les résultats des mesures, nous décrivons brièvement les principes physiques régissant l'absorption de la lumière par les nanoparticules métalliques.

1. en toute rigueur, il s'agit de mesures d'extinction résultant de l'absorption et de la diffusion par les nanoparticules, mais le terme de diffusion est négligeable dans le cas de très petites particules.

3.2.1 Origine physique du plasmon de surface

Le modèle de Drude décrit la réponse optique d'un métal comme étant due à ses électrons de conduction [108]. Schématiquement, ce modèle assimile le métal à un réseau d'ions baigné par un nuage d'électrons de conduction libres (modèle du *jellium*). Dans ce cas, la fonction diélectrique du métal est égale à

$$\epsilon^{massif}(\omega) = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\Gamma_\infty}, \quad (3.1)$$

avec

- ω_p la pulsation plasma du métal, $\omega_p = \sqrt{\frac{n_e e^2}{m_e \epsilon_0}}$, n_e la densité des électrons de conduction dans le métal, m_e leur masse effective (cf. tab. 3.2),
- Γ_∞ un terme de relaxation (ou fréquence de relaxation) dû — dans le métal massif — aux interactions électrons-phonons, électrons-électrons, aux interactions des électrons avec des défauts...

Γ_∞ s'interprète comme l'inverse du temps de relaxation τ , qui est le temps moyen entre deux collisions.

$$\tau = \frac{l_\infty}{v_F} \text{ donc } \Gamma_\infty = \frac{v_F}{l_\infty} \quad (3.2)$$

où l_∞ est le libre parcours moyen des électrons dans le métal et v_F la vitesse de Fermi (en gros, la vitesse des électrons de conduction, cf. tab. 3.2).

Dans le cadre de la théorie de Mie sur l'interaction de sphères métalliques [108] avec la lumière et plus précisément dans le cadre plus restreint de l'approximation dipolaire (ou quasistatique), c'est-à-dire dans le cas où le diamètre D des nanoparticules est très petit devant la longueur d'onde d'excitation λ , on peut d'une part négliger les effets du retard temporel et d'autre part considérer que le champ électrique est uniforme dans la sphère. L'absorption due aux nanoparticules peut être formulée de la manière suivante, à partir de la fonction diélectrique complexe des nanoparticules $\epsilon = \epsilon_1 + i\epsilon_2$ et de ϵ_m la fonction diélectrique² de la matrice vitreuse [22] :

$$\mathcal{A} = Ce \frac{18\pi n_m^3}{\lambda} \frac{\epsilon_2}{(\epsilon_1 + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_2^2}, \quad (3.3)$$

avec e , l'épaisseur de l'échantillon et C une constante.

D'après l'équation (3.3) le spectre d'absorption possède une résonance marquée pour $\epsilon_1 = -2\epsilon_m$ (à condition que ϵ_2 soit faible) à la pulsation plasmon de surface ω_{ps} . Dans le cadre du modèle de Drude,

$$\omega_{ps} = \frac{\omega_p}{\sqrt{2\epsilon_m + 1}} \quad (3.4)$$

2. $\epsilon_m = n_m^2$, dans la mesure où on peut négliger la partie imaginaire ϵ_m , n_m étant l'indice de réfraction de la matrice de la vitreuse.

	m_e/m_0	n_e ($10^{28} m^{-3}$)	v_F ($10^6 m.s^{-1}$)	l_∞ (nm)	$\hbar\omega_p$ (eV)	$\hbar\omega_{ib}$ (eV)	$\hbar\omega_{ps}$ (eV)
Na	1	2.65	1.07	34	5.95	–	3.23
Au	1.01	5.90	1.40	42	9.01	2.3	2.45
Ag	1.03	5.86	1.39	55	8.98	3.9	3.50

TABLE 3.2 – Valeurs de la masse effective de l'électron m_e (normalisée par la masse de l'électron libre m_0), de la densité électronique n_e , de la vitesse de Fermi v_F , du libre parcours moyen des électrons l_∞ , de l'énergie du plasmon de volume $\hbar\omega_p$, du seuil des transitions interbandes et du plasmon de surface $\hbar\omega_{ps}$ dans le vide pour deux métaux nobles l'or et l'argent, et un alcalin, le sodium (d'après [20]).

Le modèle de Drude se révèle insuffisant pour décrire les propriétés optiques des métaux nobles³ (or, argent, platine, cuivre...). La première bande de valence (bande des électrons d) des métaux nobles est située juste en dessous de la bande de conduction et des transitions interbandes entre ces niveaux de cœur peu profonds et des niveaux de la bande de conduction, assistées par l'absorption de photons du domaine visible (transitions optiques), sont donc possibles. Il existe une énergie seuil $\hbar\omega_{ib}$ pour ces transitions. On tient compte de la contribution des électrons de cœur en ajoutant un terme à l'expression de la fonction diélectrique de l'or donnée par le modèle de Drude. La pulsation plasmon de surface est alors égale à

$$\omega_{ps} = \frac{\omega_p}{\sqrt{2\epsilon_m + \epsilon_{1d}}} \quad (3.5)$$

où ϵ_{1d} est la partie réelle de la composante interbande de la fonction diélectrique.

3.2.2 Résultats

Les expériences de spectrophotométrie d'absorption ont été effectuées à température ambiante avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 900 à double faisceau, dans un domaine de longueurs d'onde s'étalant du visible à l'UV proche.

Le spectrophotomètre a été utilisé en mode transmission. Dans ce mode de fonctionnement, l'appareil compare l'intensité de l'onde incidente $I_0(\lambda)$ à l'intensité de l'onde transmise $I(\lambda)$. A partir de la source de lumière polychromatique un monochromateur sélectionne la longueur d'onde λ qui est envoyée sur l'échantillon et sert en même temps de référence (d'où le double faisceau). Les spectres effectués ont pour référence l'air.

La grandeur directement mesurée est l'absorbance \mathcal{A} , ou densité optique (DO) (cf. (3.3)) définie par

$$\mathcal{A} = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = -\log(T(\lambda)), \quad (3.6)$$

3. mais explique très bien le comportement des alcalins comme le sodium par exemple.

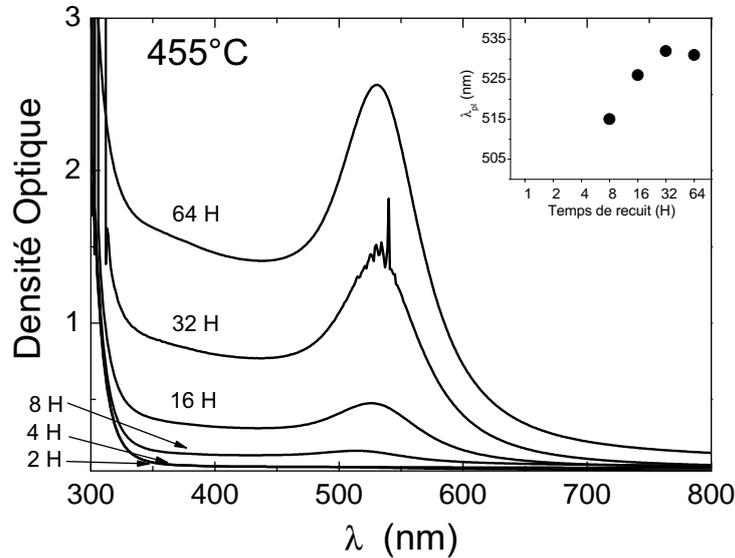


FIGURE 3.2 – Spectres d’absorption des verres Saint-Louis dopés à l’or (recuits à 455 °C) pour des durées de recuit s’échelonnant entre 2h et 64h. L’encart montre l’évolution de la position du maximum d’absorption avec la durée du recuit.

avec $T(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)}$, la transmittance.

Les figures 3.2, 3.3 et 3.4 représentent les spectres obtenus pour les différentes séries à 455 °C, 470 °C et 490 °C. La couleur rouge des échantillons est due à la présence d’une bande d’absorption très intense dans le vert (autour de 510–530 nm), correspondant à la résonance plasmon de surface.

Une des particularités des échantillons étudiés est, comme le montrent les figures 3.2, 3.3 et 3.4, la faible largeur de la résonance par rapport à des systèmes similaires (nanoparticules de taille semblable synthétisées par d’autres méthodes [98, 2]). La figure 3.5 permet de comparer les spectres d’absorption de différents échantillons :

- celui de notre échantillon recuit pendant 64 h à 470 °C
- celui d’un échantillon de nanoparticules d’or dans une matrice de silice [2]
- celui d’une particule unique d’environ 100 nm de diamètre
- le spectre d’absorption calculé à partir de l’expression (3.3) (les paramètres utilisés sont obtenus à partir du modèle de Drude corrigé par le terme des transitions interbandes).

On voit donc que la largeur de la résonance est comparable à celle d’une particule unique et se rapproche même de celle prévue par la théorie. Une telle finesse suggère que la distribution en taille des nanoparticules d’or dans les verres Saint-Louis est étroite (voir figure 3.8).

Les spectres d’absorption montrent également l’influence du recuit sur la position de cette bande d’absorption. Pour toutes les températures de recuit, on observe la

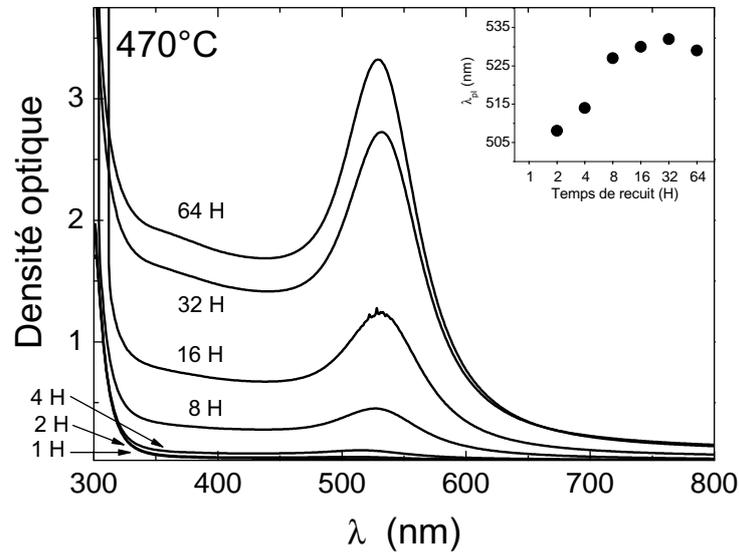


FIGURE 3.3 – Spectres d'absorption des verres Saint-Louis dopés à l'or (recuits à 470°C) pour des durées de recuit s'échelonnant entre 1h et 64h. L'encart montre l'évolution de la position du maximum d'absorption avec la durée du recuit.

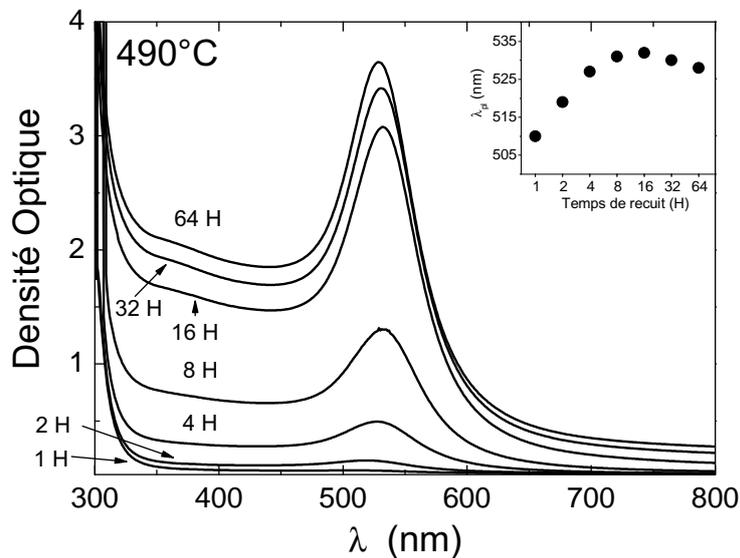


FIGURE 3.4 – Spectres d'absorption des verres Saint-Louis dopés à l'or (recuits à 490°C) pour des durées de recuit s'échelonnant entre 1h et 64h. L'encart montre l'évolution de la position du maximum d'absorption avec la durée du recuit.

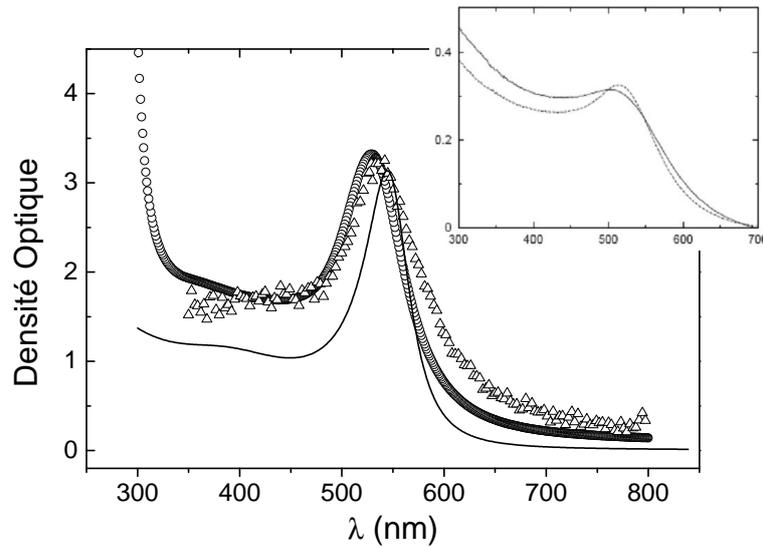


FIGURE 3.5 – Spectre d’absorption de l’échantillon recuit pendant $64 h$ à $470\text{ }^{\circ}\text{C}$ (\circ). Les (Δ) représentent le spectre d’absorption d’une particule d’or unique d’environ 100 nm de diamètre [10]. En traits pleins le spectre calculé dans l’approximation dipolaire. Dans l’encart d’après la référence [2], les spectres d’absorption d’un échantillon de nanoparticules d’or dans une matrice de silice recuit à $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ (traits pleins) et à $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pointillés).

même tendance, c’est-à-dire dans un premier temps un déplacement vers les grandes longueurs d’ondes (*red-shift*) du maximum de la bande d’absorption. Les valeurs de ces déplacements sont comparables pour les trois séries d’échantillons : environ 20 nm , de 510 à 530 nm . Dans un deuxième temps, pour des durées plus longues de recuit, d’autant plus longues que la température de recuit est faible, le maximum de la bande d’absorption se déplace très légèrement en sens inverse.

L’influence du recuit ne se limite pas au déplacement du maximum de la bande d’absorption. Avec le recuit, la largeur de la bande d’absorption diminue et de manière concomitante la DO augmente fortement autour du maximum de la bande d’absorption.

On verra dans la suite (mesures Raman) que le recuit s’accompagne d’une augmentation de taille des nanoparticules. Peut-on corréliser les modifications de position et de largeur de la résonance plasmon de surface avec l’évolution de taille des nanoparticules ?

3.2.3 Influence du recuit sur la position de la résonance

Il est assez délicat d’expliquer le déplacement du maximum de la bande d’absorption. Il est le résultat d’effets très différents qui jouent souvent en sens contraire, et éventuellement s’annulent mutuellement [22]. Néanmoins deux effets peuvent expliquer la tendance observée :

- la modification de la constante diélectrique de la matrice localement au voisinage de la nanoparticule consécutivement au recuit,

– l'augmentation de taille des nanoparticules.

Le recuit s'accompagne d'un réarrangement structural à l'interface de la nanoparticule et de la matrice, contribuant à résorber les lacunes pouvant exister entre les deux. Très schématiquement, cela peut s'interpréter de la façon suivante : supposons qu'avant le recuit, la nanoparticule ne soit pas solidaire de la matrice mais soit plutôt dans une petite poche de vide (lacune). Le recuit provoque, par l'augmentation concomitante de la taille de la nanoparticule, la disparition de cette lacune et la nanoparticule se retrouve attachée solidairement à la matrice. L'indice de réfraction vu par la particule (ou plus précisément la constante diélectrique locale) passe donc de 1 (dans le vide) à n_m (~ 1.59). L'indice de réfraction de la matrice est au dénominateur dans l'expression de la résonance plasmon de surface (cf. les équations (3.4) et (3.5)). L'augmentation de n_m va dans le sens de la diminution de l'énergie de la résonance plasmon de surface et induit donc un déplacement vers le rouge.

L'évolution de taille des nanoparticules peut aussi être invoquée pour rendre compte du déplacement vers le rouge de la résonance. L'idée générale (validée par des calculs semi-quantiques [109, 110]) repose sur le fait que les fonctions d'onde des électrons d (électrons de cœur) sont beaucoup plus localisées que celles des électrons s (électrons de conduction participant au plasmon). En général, les électrons de cœur écrantent les interactions entre les électrons de conduction et le fond positif continu (ou *jellium*), sauf aux bords de la nanoparticule, créant juste sous la surface une « peau » où la polarisabilité est réduite. Cela se traduit par un déplacement vers le bleu (vers les hautes énergies) de la résonance plasmon de surface. Ce déplacement augmente lorsque la taille de la particule diminue, ce qui s'explique bien si l'on considère que, l'épaisseur de la « peau » restant constante, sa contribution est plus importante quand la particule est plus petite.

Parmi les effets à l'origine cette fois d'un déplacement en sens inverse, c'est-à-dire vers les basses énergies (vers le rouge) de la résonance quand la taille diminue, on peut citer l'effet de « spill-out » qui correspond à l'« épanchement » du nuage électronique en dehors du *jellium*.

Tous les effets cités (ainsi que d'autres non mentionnés) sont en compétition et rendent difficile à expliquer le déplacement de la résonance. Cette compétition explique d'ailleurs peut-être l'inversion de tendance que l'on observe pour les longues durées de recuit (petit déplacement vers le bleu). Néanmoins, la tendance générale (déplacement vers le rouge avec les durées croissantes de recuit) est en adéquation avec ce qui est observé dans les références [109, 110] et nous conforte dans l'idée que l'effet de taille ainsi que l'effet de la matrice sont prépondérants.

3.2.4 Influence du recuit sur la largeur de la résonance

La finesse de la bande d'absorption semble indiquer que la distribution en taille des nanoparticules est étroite. On peut donc chercher à évaluer l'influence d'autres paramètres⁴ sur la largeur de la résonance, comme l'évolution de la taille des nanoparticules dont on vient de voir l'effet sur la position de la résonance.

4. qui serait masquée par l'effet de la distribution en taille si celle-ci n'était pas étroite (largeur inhomogène).

Dans le modèle de Drude, un terme de relaxation Γ_∞ a été introduit pour rendre compte de la relaxation due aux interactions des électrons avec les phonons, les défauts etc...

Pour des particules suffisamment petites, c'est-à-dire lorsque la taille de la particule devient comparable au libre parcours moyen des électrons l_∞ , les effets de la taille sur le phénomène de relaxation deviennent importants et s'ajoutent aux autres effets décrits plus haut. Le terme de relaxation pour une particule s'écrit de la manière suivante

$$\Gamma(R) = \Gamma_\infty + \frac{Av_F}{R} = \frac{v_F}{l_\infty} + \frac{Av_F}{R}, \quad (3.7)$$

avec A une constante.

L'équation (3.7) prend en compte l'influence des effets de surface quand le rayon de la particule est plus faible que l_∞ en introduisant un terme proportionnel à la fréquence de collision des électrons avec la surface v_F/R . La dépendance en $1/R$ de la relaxation peut aussi se comprendre simplement comme le rapport entre la probabilité de collision sur la surface (proportionnelle à $4\pi R^2$) et le nombre d'électrons (proportionnel au volume $(4/3)\pi R^3$) [22].

La relaxation Γ correspond sur les spectres d'absorption à la demi-largeur à mi-hauteur de la bande d'absorption. Pour quantifier l'évolution de la largeur de la bande d'absorption en fonction du recuit, on peut donc chercher à la relier à l'évolution de taille des nanoparticules. Les effets de taille sont introduits dans une fonction diélectrique $\epsilon(\omega, R)$ dépendante du rayon R [22, 111, 112] :

$$\epsilon_1(\omega, R) = \epsilon_1^{massif} + \omega_p^2 \left(\frac{1}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} - \frac{1}{\omega^2 + \Gamma(R)^2} \right) \quad (3.8)$$

et

$$\epsilon_2(\omega, R) = \epsilon_2^{massif} + \frac{\omega_p^2}{\nu} \left(\frac{\Gamma(R)}{\omega^2 + \Gamma(R)^2} - \frac{\Gamma_\infty}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} \right). \quad (3.9)$$

Il peut être plus commode d'utiliser dans la suite les équations (3.8) et (3.9) écrites en fonction de λ . En prenant $\lambda = 2\pi c/\omega$, $\lambda_p = 2\pi c/\omega_p$, $\gamma = 2\pi c/\Gamma$ et $\gamma_\infty = 2\pi c/\Gamma_\infty$ on obtient

$$\epsilon_1(\lambda, R) = \epsilon_1^{massif} + \frac{1}{\lambda_p^2} \left(\frac{1}{1/\lambda^2 + 1/\gamma_\infty^2} - \frac{1}{1/\lambda^2 + 1/\gamma^2} \right) \quad (3.10)$$

et

$$\epsilon_2(\lambda, R) = \epsilon_2^{massif} + \frac{\lambda}{\lambda_p^2} \left(\frac{1/\gamma}{1/\lambda^2 + 1/\gamma^2} - \frac{1/\gamma_\infty}{1/\lambda^2 + 1/\gamma_\infty^2} \right). \quad (3.11)$$

Les valeurs des termes ϵ_1^{massif} et ϵ_2^{massif} dans les équations (3.10) et (3.11) sont habituellement issues des mesures expérimentales. Afin d'ajuster les courbes d'absorption, nous avons recours au modèle de la fonction diélectrique du matériau massif proposé par Etchegoin *et al.* [12] qui permet de rendre analytiquement compte des données expérimentales de Johnson et Christy [11] (cf. fig. 3.6). Ce modèle prend en

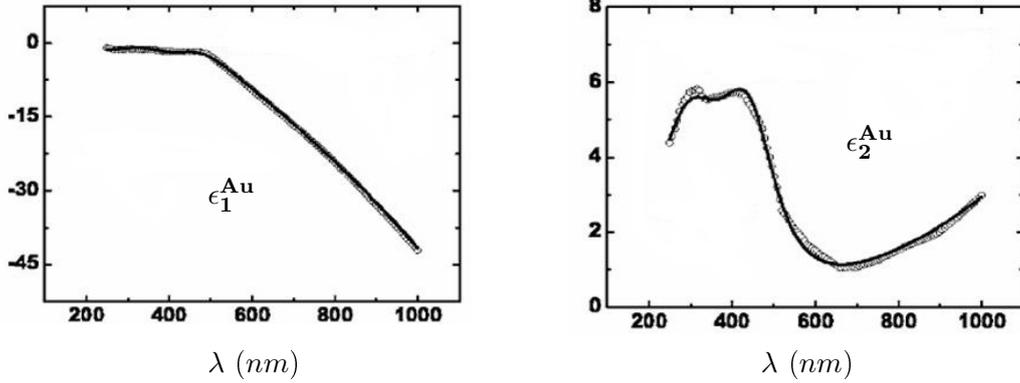


FIGURE 3.6 – Parties réelle (ϵ_1^{Au}) et imaginaire (ϵ_2^{Au}) de la fonction diélectrique de l'or massif. Les (\circ) sont les données de la référence [11]. Les *fits* sont en traits pleins [12].

compte, outre la contribution du modèle de Drude, la contribution due aux transitions électroniques interbandes. La fonction diélectrique de l'or est donnée, avec les mêmes conventions que précédemment, par

$$\epsilon^{massif} = \epsilon_\infty - \underbrace{\frac{1}{\lambda_p^2(1/\lambda^2 + i/\gamma_p\lambda)}}_{\text{Modèle de Drude}} + \underbrace{\sum_{i=1,2} \frac{A_i}{\lambda_i} \left[\frac{\exp i\phi_i}{1/\lambda_i - 1/\lambda - i/\gamma_i} + \frac{\exp -i\phi_i}{1/\lambda_i + 1/\lambda + i/\gamma_i} \right]}_{\text{transitions interbandes}}, \quad (3.12)$$

où les indices i concernent les transitions interbandes.

Nous avons utilisé les valeurs des paramètres ϵ_∞ , λ_p , γ_p , λ_i , γ_i , ϕ_i et A_i , qui permettent de reproduire les données expérimentales de Johnson et Christy [11] (cf. fig. 3.6). Ces valeurs sont tirées de la référence [12].

En écrivant les expressions de ϵ_1^{massif} et ϵ_2^{massif} à partir (3.12) et en les injectant dans les équations (3.10) et (3.11), on peut finalement obtenir une expression analytique de l'absorption à partir de (3.3) permettant d'ajuster correctement les spectres d'absorption expérimentaux. Les paramètres ajustables sont C (la constante de remplissage dans l'équation (3.3)) et Γ dont on cherche à extraire la variation en fonction de la taille des nanoparticules. Il est nécessaire de faire intervenir la variation d'un paramètre supplémentaire (n_m , l'indice de réfraction de la matrice), pour bien ajuster les spectres expérimentaux. Il est difficile de justifier les valeurs de n_m données par les ajustements (n_m de 1.24 à 1.5) si ce n'est par la modification très locale de la constante diélectrique à l'interface nanoparticule/matrice (cf. 3.2.3).

L'ajustement (ou *fit*) des spectres d'absorption par (3.3) permet d'évaluer précisément les valeurs de Γ . La variation de la largeur de la bande d'absorption se calque bien sur une évolution linéaire en $1/R$ (cf. figure 3.8), ce qui valide l'hypothèse de

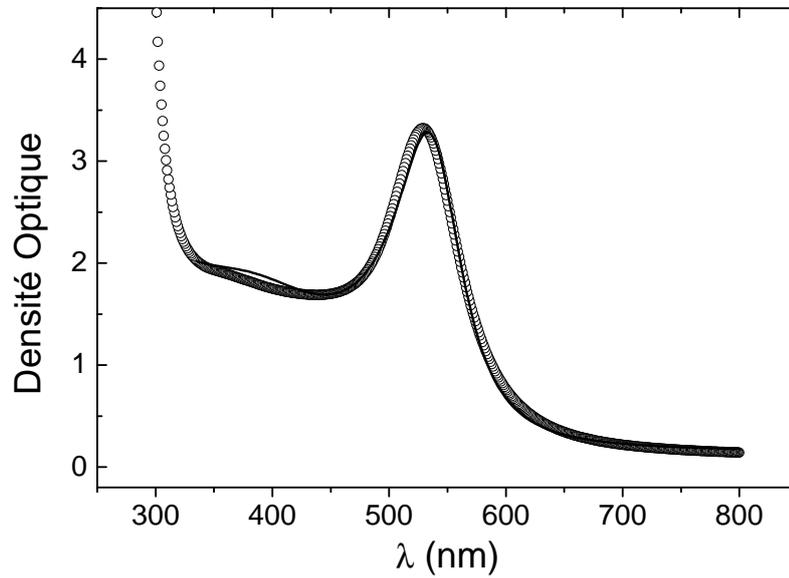


FIGURE 3.7 – Spectre d’absorption de l’échantillon recuit pendant 64 h à 470 °C (o) et son *fit* (traits pleins).

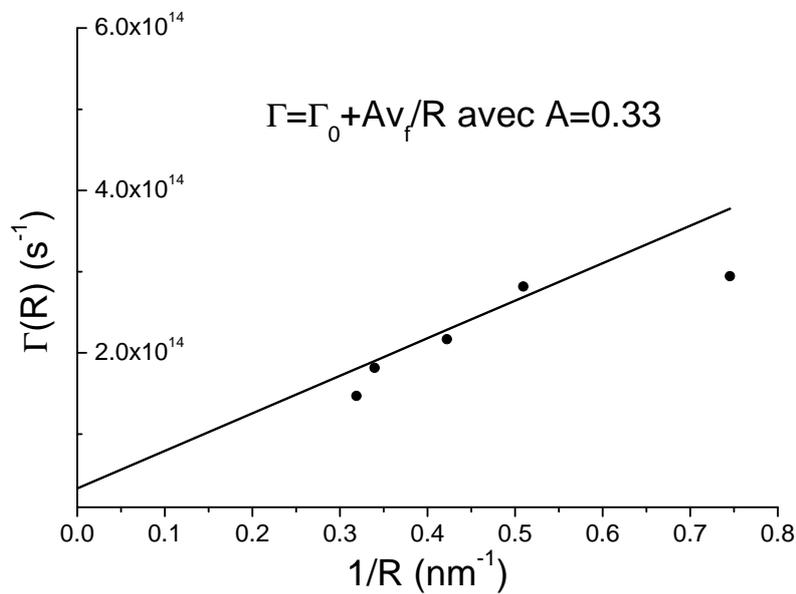


FIGURE 3.8 – Diagramme représentant les différentes valeurs prises par Γ en fonction de $1/R$. Les valeurs de R sont déduites des mesures Raman basse fréquence. Les (●) sont les valeurs données par les fits des spectres d’absorption (série à 470 °C). La droite représente le meilleur fit linéaire de ces données.

la dépendance de la largeur de la bande d'absorption par rapport à la taille des nanoparticules, les valeurs des rayons des nanoparticules étant par ailleurs déduites des mesures Raman basse fréquence (cf. paragraphe 3.4). La valeur de A trouvée ($A = 0.33$) est en bon accord avec celle trouvée par Berciaud *et al.* ($A = 0.25$) à partir de spectres d'absorption de nanoparticules uniques [111]. Les largeurs ainsi déduites s'apparentent à des largeurs homogènes. Cela constitue un argument qui va dans le sens d'une distribution en taille des nanoparticules étroite.

3.3 Microscopie électronique en transmission

Les clichés de Microscopie Electronique en Transmission (MET) ont été pris par Sylvie Migot, du laboratoire de Physique des Matériaux. Le microscope utilisé est un Philips CM 200. Une condition préalable à toute observation est que l'échantillon soit suffisamment peu épais pour que le faisceau d'électrons puisse traverser l'échantillon. Plutôt que la procédure habituelle, longue et ardue, d'amincissement (par amincissement ionique par exemple), une solution plus expéditive mais qui donne cependant des résultats préliminaires satisfaisants a été préférée. Elle consiste à prélever des copeaux du verre en grattant avec une pointe diamantée la surface du verre. Parmi ces fragments, il s'en trouve de suffisamment minces (au bord) pour qu'ils soient observables par MET.

En l'état actuel des choses ces observations permettent difficilement une analyse quantitative des échantillons. Elles donnent cependant des renseignements importants sur ces échantillons. Ces observations permettent de vérifier l'absence de nanoparticules d'or dans l'échantillon non recuit (figure 3.9). Dans les échantillons recuits, on distingue les nanoparticules d'or par leur contraste d'absorption plus élevé comparé à la matrice vitreuse. Sur l'image 3.10 on observe quelques nanoparticules d'or d'aspect sphérique d'environ $9 - 10 \text{ nm}$ de diamètre, espacées d'une à quelques centaines de nanomètres. Lorsque la qualité de l'observation le permet (si l'épaisseur d'échantillon traversée par le faisceau d'électrons est particulièrement faible par exemple), certaines nanoparticules mettent en évidence une morphologie clairement *facettée* (cf. fig. 3.11). Bien que de qualité moyenne, la figure 3.11 a des similitudes avec d'autres clichés MET de nanoparticules faisant apparaître la morphologie cuboctaédrique (thermodynamiquement stable) de nanocristaux cfc (cubique face centrée) d'or [113]. Comme nous le verrons par la suite, à cette anisotropie de structure par rapport à la sphère correspond une anisotropie des paramètres élastiques qui joue un rôle important dans la levée de dégénérescence partielle des modes propres de vibrations des nanoparticules.

3.4 Etude par spectroscopie Raman résonnante des modes de vibration de nanoparticules métalliques

Cette section est consacrée aux expériences de diffusion inélastique de lumière sur les verres Saint-Louis dopés à l'or. La diffusion inélastique de lumière par des

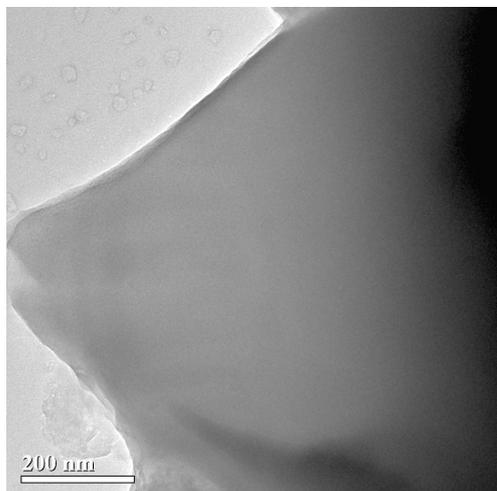


FIGURE 3.9 – Echantillon de verre Saint-Louis non recuit.

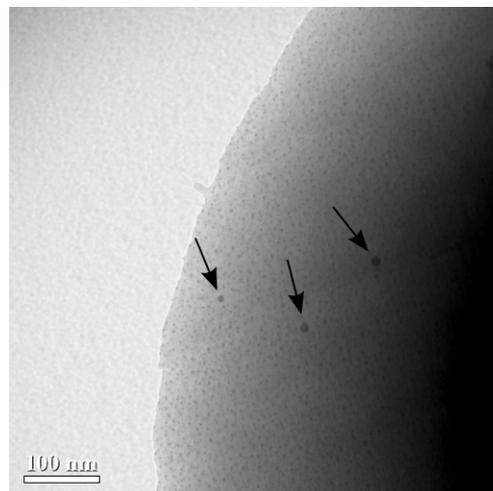


FIGURE 3.10 – Echantillon recuit : les flèches indiquent les nanoparticules.

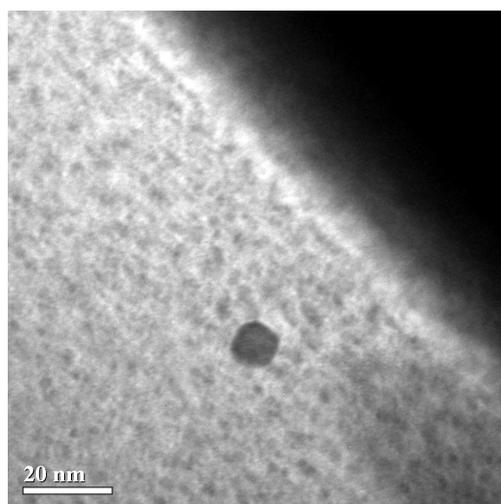


FIGURE 3.11 – Echantillon recuit (observé à plus fort grossissement).

modes de vibrations de nanoparticules donne un signal basse fréquence difficile à mesurer sans l'utilisation d'un dispositif expérimental adéquat. Nous verrons dans cette partie que les dispositifs expérimentaux (et en particulier le Tandem Fabry-Pérot) décrits dans le chapitre 2 sont parfaitement adaptés à ce type de mesures.

3.4.1 Mesures Raman basse résolution

La figure 3.12 montre les résultats des mesures Raman effectuées avec le quintuple monochromateur Z40 sur les verres Saint-Louis dopés à l'or. Chaque spectre est en fait le résultat de l'assemblage de deux spectres : un premier spectre basse fréquence Stokes/anti-Stokes entre -30 cm^{-1} et 30 cm^{-1} et un autre spectre à plus haute fréquence entre 30 cm^{-1} et 100 cm^{-1} (respectivement entre -900 et 900 GHz et entre 900 et 3000 GHz). Pour chacun des deux spectres, la résolution du spectromètre demeure inchangée (fentes d'entrée et de sortie à $200\text{ }\mu\text{m}$ /fentes intermédiaires à $250\text{ }\mu\text{m}$), seul le pas d'intégration est modifié (0.2 cm^{-1} à basse fréquence, 1 cm^{-1} autrement). La longueur d'onde d'excitation est égale à 647.1 nm . La direction de la polarisation de la lumière incidente est verticale. La lumière diffusée est recueillie à un angle de 90° par rapport à la direction de la lumière incidente et à environ 60° de la réflexion.

On reconnaît trois composantes symétriques sur ces spectres :

- à haute fréquence, une large bande appelée pic de boson associée au signal de la matrice vitreuse,
- deux raies fines à basse fréquence, traditionnellement identifiées comme deux des modes sphéroïdaux de nanosphères.

Le pic de boson provient de la diffusion par les modes acoustiques rendus *non* propagatifs du fait du désordre structural dans le verre. Son intensité est proportionnelle à la densité d'états de vibration du verre.

Les seuls modes de vibrations de sphères susceptibles d'être détectés par diffusion Raman sont *théoriquement* les modes radiaux (ou sphériques) ($l = 0$) et les modes quadropolaires ($l = 2$) (cf. les règles de sélection dans [80] et le chap. 2). D'après le calcul des fréquences propres de vibration d'une sphère (dans le cadre du modèle de la sphère élastique homogène cf. chap. 1), la fréquence du mode de vibration quadropolaire est inférieure à celle du mode de vibration radial. Ces considérations (en plus de celles concernant la polarisation des modes) permettent d'identifier sans ambiguïté la nature des modes sur les spectres Raman des verres Saint-Louis.

Le pic intense à plus basse fréquence est dépolarisé⁵ : il correspond au mode de vibration *quadropolaire* de la sphère. Le pic à plus haute fréquence est polarisé⁶ et correspond donc au mode de vibration *radial* (ou *sphérique*). Sa faible intensité est due au fait que le mode sphérique se couple peu efficacement au plasmon de surface *dipolaire*, contrairement au mode quadropolaire [114, 98, 99]. Ces pics se déplacent vers les basses fréquences avec les durées croissantes de recuit, correspondant à une augmentation de taille des nanoparticules [99, 2]. Le déplacement en fréquence des

5. son intensité reste comparable que l'on se place dans une configuration où la polarisation de la lumière incidente et celle de la lumière diffusée sont parallèles ou dans une configuration où elles sont croisées.

6. ce pic est fortement atténué quand les polarisations sont croisées.

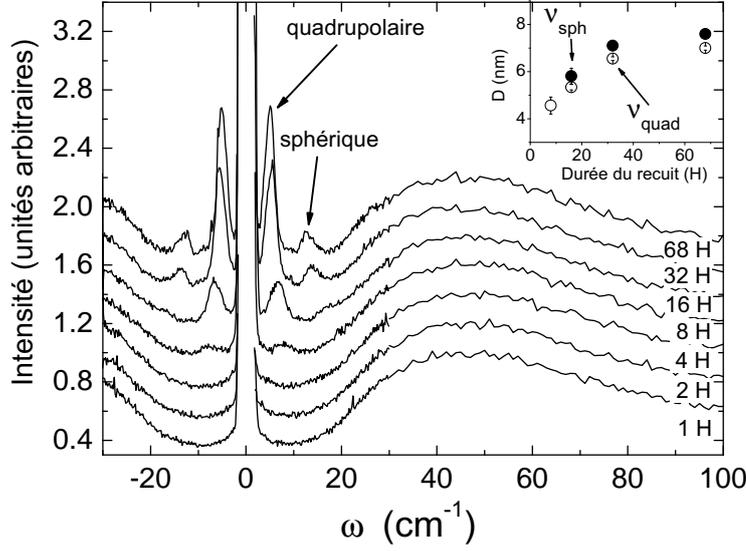


FIGURE 3.12 – Spectres Raman « basse résolution » des échantillons Saint-Louis dopés à l'or (série à 470°C). On rappelle que $1\text{ cm}^{-1} \equiv 30\text{ GHz}$. En encart, les dimensions des nanoparticules telles que déduites de (○) la fréquence du mode quadrupolaire et (●) de la fréquence du mode sphérique.

pics suit une loi en $1/R$ maintes fois vérifiée expérimentalement dans les références déjà citées [42, 99, 2].

Pour les faibles durées de recuit (1 à 4 h) on n'observe pas de modes basse fréquence sur les spectres Raman alors que dans le même temps une résonance plasmon de surface est visible sur les spectres d'absorption correspondants. Cela est peut-être dû à la faible section efficace du processus Raman, au fait qu'il soit masqué par le signal du pic de boson et/ou au peu de cohérence intraparticule dans le cas des échantillons peu recuits.

Les fréquences des modes quadrupolaire et sphérique sont données, dans le cadre du modèle de la sphère élastique libre, par

$$\nu_{quad} = S_{quad} \frac{\langle v_T \rangle}{D} \text{ et } \nu_{sph} = S_{sph} \frac{\langle v_L \rangle}{D} \quad (3.13)$$

avec $\langle v_T \rangle$ et $\langle v_L \rangle$ les vitesses transversale et longitudinale moyennées sur toutes les directions du cristal d'or.

$$\langle v_L \rangle = \frac{1}{3} \left(\sqrt{\frac{C_{11}}{\rho}} + \sqrt{\frac{1/2(C_{11} + C_{12} + 2C_{44})}{\rho}} + \sqrt{\frac{1/3(C_{11} + 2C_{12} + 4C_{44})}{\rho}} \right) \quad (3.14)$$

	ρ ($kg.m^{-3}$)	C_{11} (GPa)	C_{12}	C_{44}
Au	19283	191	162	42.4
Ag	10500	124	94	46

TABLE 3.3 – Valeurs de la masse volumique et des modules élastiques de l’or et de l’argent à température ambiante.

et

$$\langle v_T \rangle = \frac{1}{4} \left(\sqrt{\frac{C_{44}}{\rho}} + \sqrt{\frac{1/2(C_{11} - C_{12})}{\rho}} + \sqrt{\frac{1/3(C_{11} - C_{12} + C_{44})}{\rho}} \right). \quad (3.15)$$

Les valeurs de S_{quad} et S_{sph} dépendent du rapport $\langle v_T \rangle / \langle v_L \rangle$. Pour des sphères, on obtient en prenant $\langle v_T \rangle = 1236 m.s^{-1}$ et $\langle v_L \rangle = 3319 m.s^{-1}$, $S_{quad} = 0.845$ et $S_{sph} = 0.94$. Les valeurs de la vitesse transversale et de la vitesse longitudinale sont calculées à partir des constantes élastiques de l’or massif (cf. tab. 3.3). Les équations 3.13 mènent à une première détermination des tailles des nanoparticules (cf. encart de la fig. 3.12). Les diamètres des nanoparticules dans les verres recuits à $470^\circ C$ sont compris entre 4 et environ $7 nm$. Le léger désaccord entre les valeurs des diamètres déduites des fréquences des modes quadrupolaire et sphérique est imputable à la matrice. Si on prend en compte la matrice, l’écart diminue et du même coup les diamètres des nanoparticules déduits de ces calculs sont revus à la hausse : ils sont compris entre 5 et $8 nm$.

Bien que satisfaisante dans une première approche, l’interprétation des spectres Raman par les modes de vibration de nanosphères ne permet pas *a priori* d’expliquer l’existence de sous-structures mises en évidence en augmentant la résolution du quintuple monochromateur. En examinant attentivement la région à très basse fréquence des spectres, on remarque en effet que le pic du mode quadrupolaire est asymétrique et présente un épaulement sur le pied haute énergie. Pour en avoir le cœur net, nous avons effectué des mesures « haute résolution » de ces échantillons (cf. 3.4.2).

3.4.2 Mesures Raman haute résolution

Nous avons déjà discuté des avantages respectifs du tandem Fabry-Pérot et du quintuple monochromateur Z40 (cf. 2.2.3). En particulier nous avons montré que le tandem permet de faire des mesures à plus haute résolution que le quintuple monochromateur. Nous présentons dans ce paragraphe l’apport de ce dispositif expérimental dans l’étude des verres Saint-Louis dopés à l’or.

Résultats

Les spectres Raman basse fréquence de tous les échantillons sont représentés sur les figures 3.13, 3.14 et 3.15. La longueur d’onde d’excitation ($\lambda = 532 nm$) est résonante avec le plasmon de surface. La puissance du faisceau laser sur l’échantillon

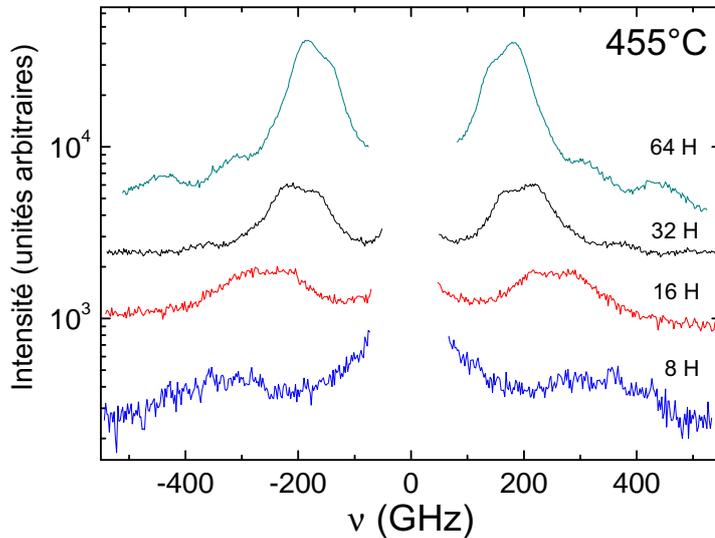


FIGURE 3.13 – Spectres Raman basse fréquence des échantillons de verre Saint-Louis recuits à $455\text{ }^{\circ}\text{C}$.

est de 120 mW . Les spectres ont été réalisés en rétrodiffusion avec des polarisations parallèles (VV) et croisées (VH) afin d'identifier la nature des différentes composantes. L'espacement d des miroirs est de 0.25 mm ce qui correspond à un intervalle spectral libre $\Delta\nu = c/2d$ égal à 600 GHz ⁷. Les trous d'entrée et de sortie du spectromètre sont réglés respectivement à $700\text{ }\mu\text{m}$ et $1000\text{ }\mu\text{m}$ ce qui constitue un bon compromis entre luminosité et résolution de l'appareil. La très bonne stabilité du spectromètre permet de faire des acquisitions très longues (typiquement 12 h par spectre). Lors des premières mesures sur ces échantillons, nous avons observé un groupe de raies non symétriques apparaissant côté Stokes, gênant considérablement les expériences. Après discussion avec le constructeur du spectromètre, il est apparu que ces raies étaient dues à des réflexions parasites dont l'origine est difficile à expliquer. L'ajout de masques supplémentaires entre les cavités Fabry-Pérot a permis de régler définitivement le problème. Les spectres enregistrés avec le tandem FP, de manière plus précise que les spectres enregistrés avec le quintuple monochromateur, mettent en évidence l'existence des différentes composantes du pic quadrupolaire. Le pic du mode quadrupolaire est composé de deux pics (pas complètement résolus) et présente une petite bosse à son pied haute énergie. Ces deux pics sont dépolarisés, comme le pic du mode quadrupolaire. La figure 3.16 montre l'ajustement d'un de ces spectres tiré de la série à $470\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec quatre lorentziennes.

7. en pratique, pour éviter de voir apparaître les ordres « fantômes » immédiatement inférieur et supérieur de la raie élastique sur le spectre, on fixe l'amplitude de balayage à 490 nm , ce qui correspond sur les spectres à une fenêtre de 552 GHz environ.

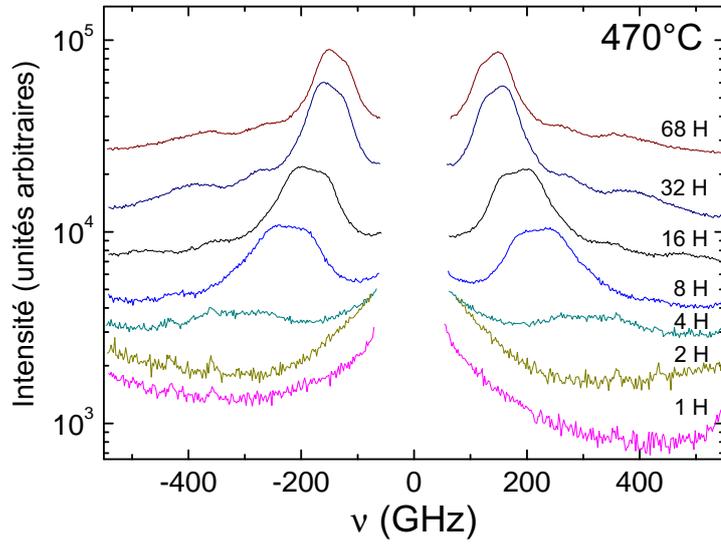


FIGURE 3.14 – Spectres Raman basse fréquence des échantillons de verre Saint-Louis recuits à 470°C.

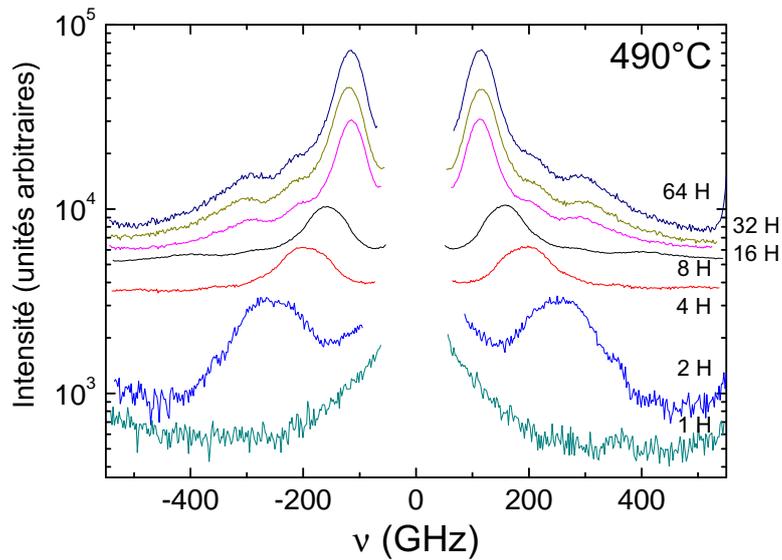


FIGURE 3.15 – Spectres Raman basse fréquence des échantillons de verre Saint-Louis recuits à 490°C.

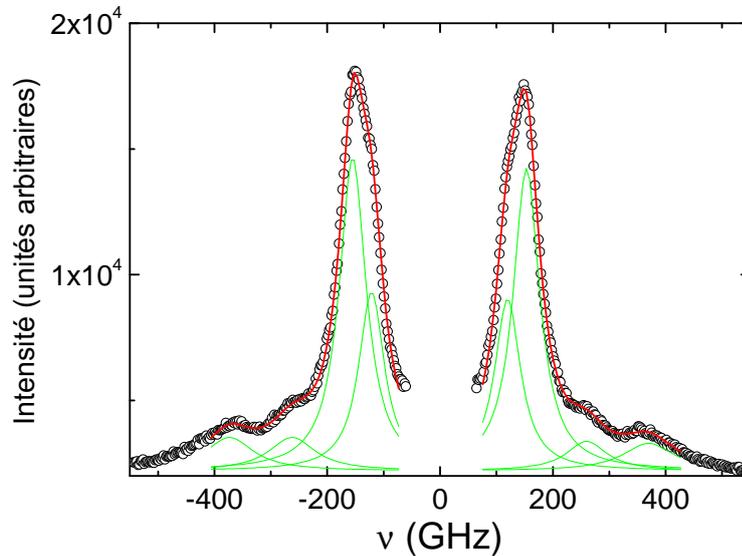


FIGURE 3.16 – Fit à quatre lorentziennes (traits pleins) du spectre de l'échantillon (○) recuit pendant 68 h à 470 °C.

Discussion sur l'origine des pics supplémentaires

Quelle est l'origine des pics supplémentaires dans les spectres Raman basse fréquence ?

Une hypothèse plausible consiste à dire que la distribution en taille des nanoparticules n'est pas monodisperse. Mais cette hypothèse est en contradiction avec l'étroitesse de la bande d'absorption (cf. 3.2.2) et avec le fait que les rapports de fréquence entre les différentes composantes ne varient pas en fonction de la température de recuit (figure 3.17).

Les clichés de MET ont montré que certaines nanoparticules présentaient une morphologie facettée compatible avec celle d'un cuboctaèdre tronqué (figure 3.18). Le passage d'une morphologie sphérique à une morphologie polyédrique correspond à un abaissement de symétrie de la nanoparticule. Nous avons fait l'hypothèse que c'est la levée de dégénérescence des modes de vibration accompagnant l'abaissement de symétrie qui explique la présence de pics supplémentaires.

L'or cristallise dans le système cubique face centrée (cfc). Le cuboctaèdre tronqué constitue une forme thermodynamiquement stable du nanocrystal d'or [113]. Pour un cuboctaèdre tronqué (groupe de symétrie du cube ou de l'octaèdre), les règles de sélection des modes de vibration changent par rapport à celles de la sphère. On peut montrer par un argument de théorie des groupes que lorsqu'on passe de la symétrie sphérique (groupe de symétrie $O(3)$) à la symétrie de l'octaèdre (groupe de symétrie O_h) le mode $l = 2$ qui est $2l + 1 = 5$ fois dégénéré se sépare en deux

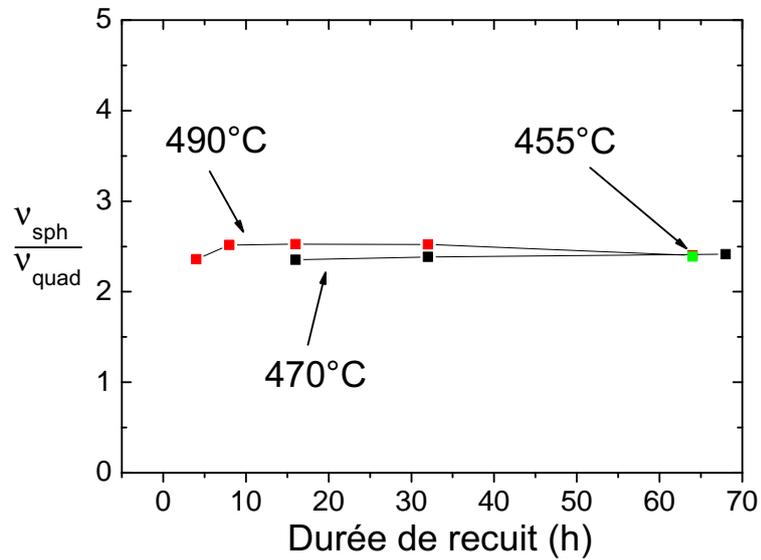


FIGURE 3.17 – Rapports entre les fréquences des modes sphérique et quadrupolaire pour les différentes températures de recuit.

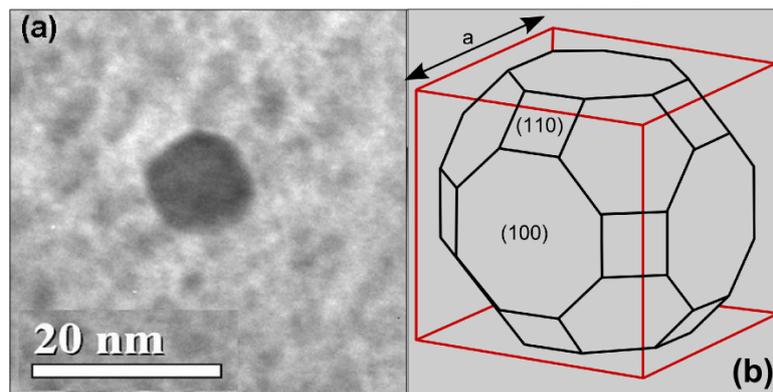


FIGURE 3.18 – (a) Cliché (MET) d'une nanoparticule d'or dans la matrice vitreuse (échantillon Saint-Louis recuit pendant 68 h à 470 °C). (b) Représentation d'un cuboctaèdre tronqué inscrit dans un cube d'arête a dont les faces sont confondues avec ses faces octogonales.

modes de symétrie E_g et T_{2g} , respectivement 2 fois et 3 fois dégénérés⁸. Le mode non-dégénéré ($l = 0$) se transforme en un mode de symétrie A_{1g} .

Ces modes de vibration s'identifient aux ondes élastiques transverse et longitudinale confinées dans des nanocristaux cubiques [27] (même groupe de symétrie que le cuboctaèdre tronqué), mais auxquelles exactement ? L'or possède une anisotropie élastique élevée : $\frac{2C_{44}}{C_{11} - C_{12}} = 2.9$ ($= 1$ dans le cas isotrope, cf. 3.3). Dans le cas d'une anisotropie de structure si importante, le mode de vibration ($l = 2$) d'une sphère a un caractère *transverse* très marqué et le mode ($l = 0$) à l'inverse un caractère *longitudinal* prononcé.

On cherche donc les ondes élastiques transverses confinées dans un cube qui se transforment comme les représentations T_{2g} et E_g :

- les modes T_{2g} sont compatibles avec les ondes transverses se propageant selon la direction [100] à la vitesse $v_T = \sqrt{\frac{C_{44}}{\rho}}$. Les déformations $1/\sqrt{2}(\epsilon_{yz} + \epsilon_{zy})$, $1/\sqrt{2}(\epsilon_{xz} + \epsilon_{zx})$ et $1/\sqrt{2}(\epsilon_{xy} + \epsilon_{yx})$ leur sont associées ;
- les modes E_g sont compatibles avec les ondes transverses se propageant selon la direction [100] à la vitesse $v_{E_g} = \sqrt{\frac{1/2(C_{11} - C_{12})}{\rho}}$. Leur sont associées les déformations $1/\sqrt{2}(\epsilon_{xy} - \epsilon_{yx})$ et $1/\sqrt{6}(2\epsilon_{zz} - \epsilon_{xx} - \epsilon_{yy})$.

Ces ondes élastiques se propageant dans le cas d'un cristal macroscopique infini deviennent stationnaires dans le cas du nanocristal : elles sont confinées, pour celles se propageant selon [100], entre les faces octogonales (100), et pour celles se propageant selon [110] entre les faces carrées (110). En supposant que le cuboctaèdre tronqué est inscrit dans un cube d'arête a , les ondes sont confinées, respectivement, sur des longueurs $L_{100} = a$ et $L_{110} = 1.153a$ (figure 3.18(b)).

D'après ce qui précède, on devrait observer seulement trois types de modes sur les spectres Raman basse fréquence de nos échantillons. Or les spectres des figures 3.13, 3.14 et 3.15 comportent quatre pics (cf. fig. 3.16) au lieu des trois attendus si notre hypothèse est exacte. La raison la plus probable est que les spectres expérimentaux sont le résultat de la superposition des pics dus aux deux populations de nanoparticules, sphériques et facettées : les pics des modes quadrupolaire et sphérique auxquels viennent s'ajouter ceux des modes E_g et T_{2g} . Nous n'avons pas pu observer le pic du mode A_{1g} , vraisemblablement parce qu'il est masqué par le pic du mode sphérique. Des calculs sur les positions relatives des divers pics permettent de vérifier ces assertions.

Les fréquences des modes de vibration du cristal de morphologie cuboctaédrique tronquée sont données, pour les modes de type T_{2g} et E_g par

$$\nu_{T_{2g}} \simeq \frac{v_{T_{2g}}}{L_{(100)}} \text{ et } \nu_{E_g} \simeq \frac{v_{E_g}}{L_{(110)}} \quad (3.16)$$

8. de manière analogue à ce qui se passe dans la théorie du champ cristallin pour les orbitales d d'un ion de transition avec l'introduction du champ octaédrique des ligands.

Pour les nanocristaux dont la forme se rapproche plus de celle d'une sphère les fréquences des modes de vibration ($l = 2$) et ($l = 0$) sont données par les expressions (3.13). La valeur du diamètre de la nanoparticule utilisée pour le calcul est \bar{D} qui est la moyenne du diamètre de la sphère inscrite dans le cuboctaèdre tronqué et du diamètre de la sphère qui lui est circonscrite. Rappelons que le cuboctaèdre tronqué est lui-même « inscrit » dans un carré d'arête a . Nous prenons comme valeur du diamètre moyen $\bar{D} = 1.182 a$.

Il est intéressant de calculer le rapport théorique entre fréquences des modes « cuboctaédriques » et celle du mode quadrupolaire de la sphère. Pour le mode E_g il est donné par

$$\frac{\nu_{E_g}}{\nu_{quad}} \simeq \frac{v_{E_g}}{\langle v_T \rangle} \cdot \frac{\bar{D}}{S_{quad} L_{(110)}}, \quad (3.17)$$

et pour le mode (T_{2g}) par

$$\frac{\nu_{T_{2g}}}{\nu_{quad}} \simeq \frac{v_{T_{2g}}}{\langle v_T \rangle} \cdot \frac{\bar{D}}{S_{quad} L_{(100)}}. \quad (3.18)$$

Avec $v_{E_g} = \sqrt{\frac{1/2(C_{11} - C_{12})}{\rho}} = 867 \text{ m.s}^{-1}$ et $v_{T_{2g}} = \sqrt{\frac{C_{44}}{\rho}} = 1483 \text{ m.s}^{-1}$ les rapports des fréquences sont égaux à

$$\frac{\nu_{E_g}}{\nu_{quad}} \simeq 0.85 \text{ et } \frac{\nu_{T_{2g}}}{\nu_{quad}} \simeq 1.676. \quad (3.19)$$

De la même manière on peut calculer le rapport des fréquences entre le mode sphérique et le mode quadrupolaire. Il est égal à

$$\frac{\nu_{sph}}{\nu_{quad}} = \frac{S_{sph}}{S_{quad}} \cdot \frac{\langle v_L \rangle}{\langle v_T \rangle} \simeq 2.99 \quad (3.20)$$

Dans la figure 3.19 les valeurs théoriques des rapports de fréquence sont comparées aux valeurs expérimentales tirées des « fits » des spectres Raman pour la série d'échantillons recuits à 470°C (fig. 3.16). Nous ne présentons ici que les résultats concernant la série à 470°C mais les résultats avec les autres séries sont semblables. En général les valeurs théoriques et expérimentales se recoupent étonnamment bien et pour toutes les tailles de nanoparticules, ce qui valide nos hypothèses sur la levée de dégénérescence des modes de vibration de la sphère par abaissement de la symétrie des nanoparticules. On observe toutefois une différence notable entre la valeur expérimentale du rapport ν_{sph}/ν_{quad} et la valeur attendue. Nous attribuons cette différence à l'influence de la matrice vitreuse qui induit une atténuation et un déplacement des modes de vibration. Le calcul des modes $l = 0$ et $l = 2$ par la méthode des fréquences complexes (voir la section 1.1.3 et le tableau 1.1) permet de retrouver le rapport expérimental ν_{sph}/ν_{quad} , à condition de connaître les paramètres élastiques de la matrice.

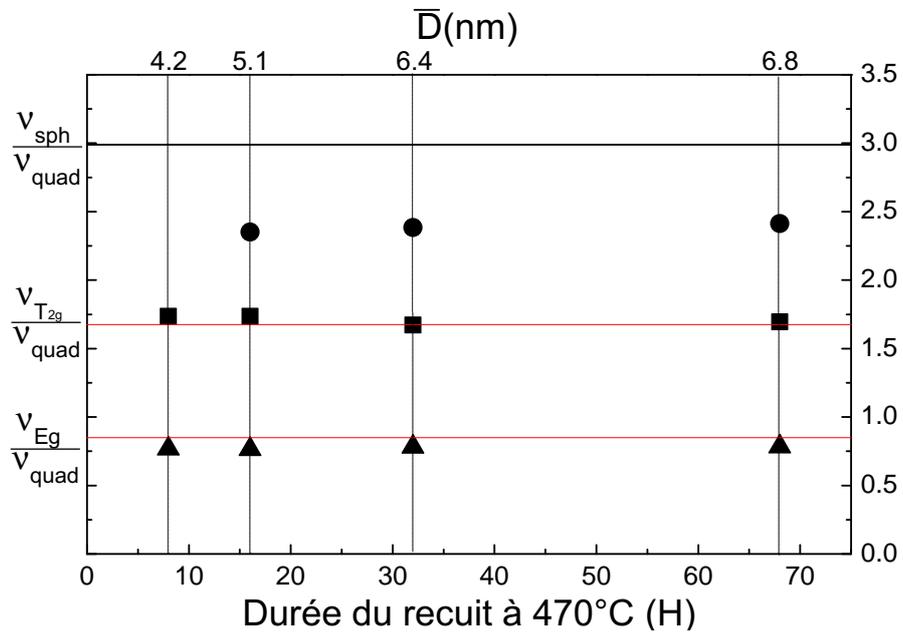


FIGURE 3.19 – Comparaison entre les données expérimentales (symboles) tirées des fits des spectres pour la série d'échantillons recuits à 470 °C et les valeurs théoriques (traits pleins) des rapports de fréquence entre les modes ($l = 0$), T_{2g} , E_g et le mode ($l = 2$) en fonction de la durée du recuit. L'échelle supérieure donne les valeurs du diamètre moyen \bar{D} calculées à partir de ν_{quad} .

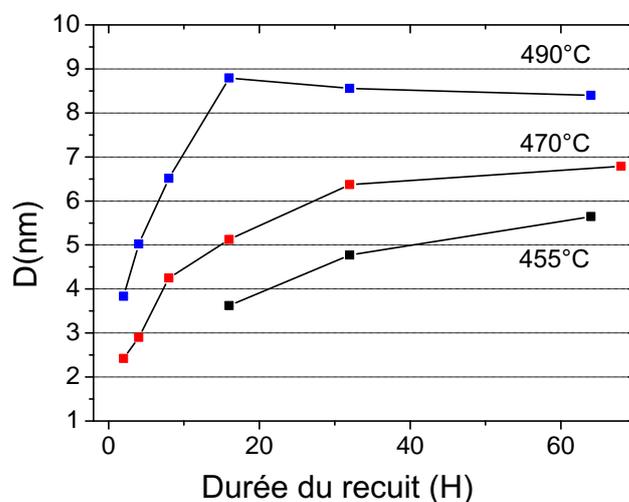


FIGURE 3.20 – Evolution de la taille des nanoparticules calculées à partir de la relation (3.13) en fonction de la durée de recuit et pour les trois températures de recuit.

Evolution de la taille des nanoparticules avec le recuit

Rappelons qu'il est possible d'estimer de manière convaincante la taille des nanoparticules à partir de la position du pic du mode quadrupolaire ν_{quad} et de l'expression (3.13). L'évolution de taille des nanoparticules en fonction de la durée de recuit et pour les trois températures de recuit est représentée sur la figure 3.20.

Les nanoparticules grossissent avec les durées croissantes de recuit et cela quelle que soit la température, bien que l'évolution soit plus rapide quand la température est plus élevée. La taille des nanoparticules passe d'environ 4 nm à 9 nm à $490\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 à 7 nm à $470\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 4 à 6 nm à $455\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les courbes de tailles sont constituées de deux parties (plus marquées à 470 et $490\text{ }^{\circ}\text{C}$ qu'à $455\text{ }^{\circ}\text{C}$) : au début une partie fortement croissante qui témoigne d'une cinétique de croissance rapide puis un plateau. Ainsi entre 32 h et 64 h (ou 68 h à $470\text{ }^{\circ}\text{C}$) la taille des nanoparticules ne change quasiment pas.

Du point de vue du verrier, c'est-à-dire dans une optique de fabrication de verres colorés, il est intéressant de constater que recuire à $490\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 8 h ou à $470\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 32 h revient exactement au même en terme de taille des nanoparticules donc de coloration du verre. De notre point de vue, il est difficile d'expliquer la cinétique de croissance des nanoparticules et en particulier le plateau observé. En particulier, nos tentatives pour ajuster les courbes de croissance par les lois en $t^{1/2}$ et $t^{1/3}$ prévues par les modèles de nucléation-croissance et de mûrissement d'Ostwald [115] n'ont pas abouti.

En résumé nous avons observé par des mesures d'absorption que la synthèse de verres dopés à l'or par voie chimique conduit — par le recuit des verres — à la nucléation et à la croissance de nanoparticules d'or dont la distribution en taille est

très étroite. La formation des nanoparticules d'or se traduit d'ailleurs, du fait de la résonance plasmon de surface, par la coloration de plus en plus foncée des verres avec des durées croissantes de recuit.

Des mesures Raman basse fréquence préliminaires ont ensuite mis en évidence les modes de vibration des nanoparticules et nous ont conduit à faire une première estimation de leur taille.

Enfin, l'utilisation du spectromètre Fabry-Pérot sur ces échantillons, avec l'apport de la très haute résolution, a conduit à la première mise en évidence de la levée de dégénérescence du mode quadrupolaire. Dans l'interprétation que nous donnons, le « splitting » associé à cette levée de dégénérescence est le fait non seulement de l'anisotropie de l'or mais aussi du facettage des nanoparticules.

Chapitre 4

Expériences de diffusion de lumière sur les virus : des solutions aux cristaux tridimensionnels

Cette partie est consacrée aux expériences de diffusion inélastique de lumière effectuées sur les virus qui peuvent être considérés, dans une certaine mesure, comme les équivalents biologiques (en termes de forme par exemple), des nanoparticules métalliques étudiées au chapitre précédent. Des mesures Raman « classiques » de solutions de virus ou de cristaux de virus sont monnaie courante [116, 117, 118, 72] et constituent un outil puissant d'étude structurale des virus. Elles mettent en lumière par exemple la conformation ou l'orientation des molécules ou des groupes de molécules constitutives de la capsid, qui est la coque protéique du virus.

À notre connaissance les mesures Raman basse fréquence destinées à observer les modes de vibration à l'échelle de la particule virale sont les premières (ou parmi les premières, voir la référence [119] sur laquelle nous émettons des réserves) jamais entreprises, bien que l'intérêt pour les modes de vibration de virus de la part des physiciens [23, 43, 44, 45, 46, 37] comme des biologistes [7, 120, 47, 6] soit grandissant.

Le plan de cette partie reflète notre démarche expérimentale, qui a consisté à étudier des échantillons de plus en plus concentrés, des solutions aux cristaux tridimensionnels en passant par les cristaux ou para-cristaux bidimensionnels de virus. Les expériences d'exaltation du signal inélastique des virus sont aussi présentées. Avant cela nous présentons les virus étudiés ainsi que les calculs préliminaires donnant lieu à une première estimation des fréquences de modes de vibration de virus.

4.1 Les virus étudiés

Les virus que nous avons étudiés sont principalement des virus de plantes ou *phytovirus*¹, relativement faciles à obtenir en grande quantité et sans danger pour

1. Voir par exemple sur le site de l'Université de l'Idaho « Plant Viruses Online », <http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm>.

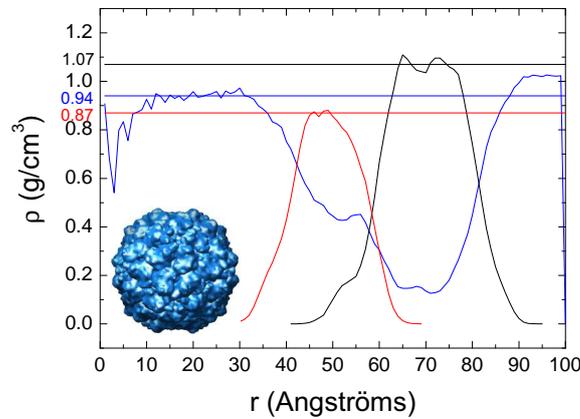


FIGURE 4.1 – Profil de densité radiale du STMV (d’après [13]). En encart la reconstruction tridimensionnelle du STMV.

l’homme.

Nous avons également étudié un virus humain, l’adénovirus de type 5.

4.1.1 Les phytovirus

Nos investigations ont porté sur quatre phytovirus différents : parmi eux, le plus petit des phytovirus, , 17 nm de diamètre et probablement l’un des plus gros phytovirus dont la capsid soit à symétrie icosaédrique (190 nm de diamètre). Deux autres virus de taille intermédiaire (environ 30 nm) complètent cette étude.

Le STMV Le virus satellite de la mosaïque du tabac (Satellite Tobacco Mosaic Virus (STMV)) déjà décrit plus haut infecte les plants de tabac et comme son nom l’indique a besoin pour se répliquer de la co-infection de son hôte par le virus de la mosaïque du tabac (Tobacco Mosaic Virus (TMV)). Son rôle dans la nature n’est pas très clair puisqu’il ne provoque que peu ou pas de modifications des symptômes chez l’hôte.

C’est une particule virale sphérique $T = 1$ d’un diamètre de 17 nm [49, 50, 51] (figure 4.1) qui contient un ARN simple brin de 1059 bases dans une capsid formée de 60 sous-unités protéiques identiques de 159 résidus acido-aminés (masse réduite $M_r = 17542$). Sa structure est connue avec une résolution quasi-atomique [50]. Les résultats de la diffraction des rayons X (DRX) révèlent également que près de la moitié du génome est organisé (et donc « visible » par DRX). Le virion est constitué en masse de 75% de protéine et 25% d’acide nucléique. Un modèle simplifié élaboré à partir des résultats de la référence [13] représente le STMV comme un coeur composé d’eau de 4 nm de rayon entouré par une couche d’ARN de 2 nm d’épaisseur puis par une couche protéique de 2.5 nm d’épaisseur (figure 4.1). Grâce à sa petite taille c’est le premier virus à avoir été simulé entièrement par dynamique moléculaire [13] sur une durée d’environ 13 ns .

Le STMV forme de gros microcristaux (c'est-à-dire dont la taille est de l'ordre de la fraction de millimètre) assez facilement (cf. 4.6.1). La taille de ces cristaux et leur robustesse font qu'ils sont relativement faciles à manipuler et qu'il est possible en particulier de conduire sur ces échantillons des expériences de diffusion de lumière sans avoir à utiliser de microscope.

La solution-mère de virus utilisée pour nos expériences provient du laboratoire du Pr. Alexander McPherson de l'Université de Californie, à Irvine.

Le TBSV Répandu tant en Europe que sur le continent américain ou en Afrique du Nord, le virus du flétrissement du plant de tomate [121, 122] (Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV)) possède en réalité un éventail d'hôtes aussi varié que la tomate, le poivrier ou la pomme. Il est responsable d'un arrêt de la croissance, du jaunissement et de la déformation des feuilles et des fruits des végétaux atteints. La transmission normale du virus s'effectue apparemment sans vecteur, par la graine et le sol.

Le virion est une particule sphérique $T = 3$ de 30 nm de diamètre (figure 4.2). Il contient un ARN simple brin tripartite de 4776 bases et sa capsid est composée de 180 sous-unités protéiques de $M_r = 42000$. Sa structure, très bien connue, a été la première à être élucidée par diffraction des rayons X [59]. A la différence du STMV le modèle issu de la DRX ne rend pas compte de la localisation de l'ARN ainsi que d'une bonne partie (environ 25%) des acides aminés des sous-unités protéiques constituant la capsid. D'autres études permettent de conclure qu'une grande partie des acides aminés manquants (ou « invisibles » en DRX) sont contenus dans une coquille interne. L'ARN tapisse la cavité ménagée entre la capsid et cette coque protéique interne. Le virion contient un pourcentage massique de 83% de protéine et 17% d'acide nucléique.

Comme un certain nombre de virus à symétrie icosaédrique, le TBSV existe sous forme compacte et sous forme gonflée, la transition entre les deux étant commandée par la libération d'ions calcium associés à la capsid (voir le paragraphe 1.2.5). Ce changement de conformation réversible est probablement intimement lié à la décapitation du virus lors de l'infection et reste un phénomène encore mal compris [61].

Le TBSV nous a été fourni par Cécile Méricoux et Patrice Vachette de l'Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire (IBBMC) de l'Université Paris-Sud.

Le BMV Le virus de la mosaïque du brome (Brome Mosaic Virus (BMV)) infecte les graminées par le biais de vers nématodes, et provoque la mort de ces plantes en l'espace d'une trentaine de jours par nécrose. Ce virus présent sur le continent eurasiatique, en Australie et en Amérique Centrale induit l'apparition de taches jaunes sur les feuilles des plants atteints, d'où le nom de *mosaïque*.

Le BMV est une particule sphérique $T = 3$ de 28 nm de diamètre [66, 123] (figure 4.2) qui contient un ARN simple brin tripartite de 8216 bases. La capsid est formée de 180 copies d'une protéine de 189 résidus acido-aminés et de masse réduite $M_r = 20400$. Il est très semblable structurellement au CCMV (cowpea chlorotic mottle virus), virus objet par ailleurs de simulations par NMA [7]. La distribution du

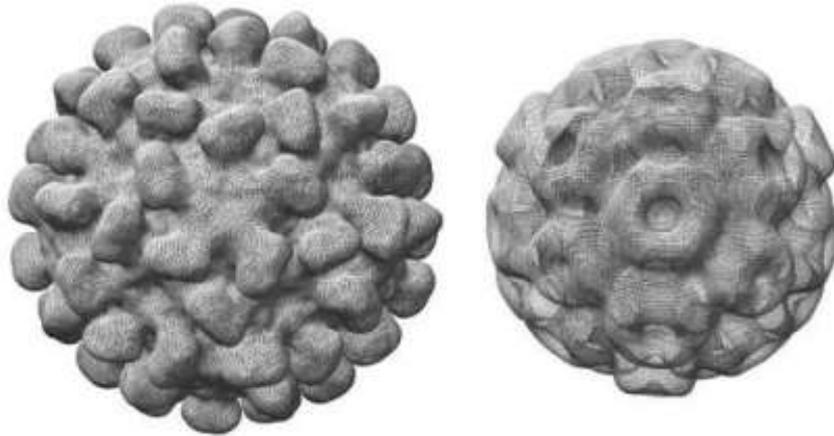


FIGURE 4.2 – Reconstructions tridimensionnelles du TBSV (à gauche) et du BMV (à droite)[14].

matériel génétique à l'intérieur de la capside est non uniforme. Au cœur de la cavité ménagée par la capside il y a un « noyau » d'environ 3.5 nm occupé uniquement par du solvant, ce qui est confirmé par des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles [124, 4]. Le BMV est constitué de 78% en masse de protéines et 22% d'acide nucléique.

Comme le TBSV, le BMV subit un gonflement réversible, non pas ion-dépendant mais pH-dépendant.

Le BMV nous a été fourni par Eric Larquet de l'Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (IMPMC) de l'Université Paris 6.

PBCV-1 *Paramecium bursaria* chlorella virus 1 (PBCV-1) [125, 126, 127, 128] a pour hôte certaines algues vertes unicellulaires qui habitent les eaux douces. La structure de ce très gros virus d' 1 GDa (contre quelques MDa pour le BMV ou le TBSV) est organisée de manière concentrique : une partie centrale constituée d'ADN double brin de taille variable (entre 295 kb et 370 kb) et de protéines, entourée d'une membrane lipidique et par une capside protéique. Sa capside de 190 nm est également à symétrie icosaédrique mais de beaucoup plus grande taille que les virus présentés plus haut. Elle accommode selon un schéma quasi-équivalent ($T = 169$) 1680 trimères et 12 pentamères. Des structures en forme de fibres dont le rôle est mal compris sont parfois observées pointant en dehors de la capside (voir fig. 4.3). PBCV-1 est composé d'environ 64% en masse de protéine, de 21 à 25% d'ADN double brin et de 5 à 10% de lipides. PBCV-1 diffère donc grandement des virus présentés plus haut, d'abord par la taille (et donc le poids moléculaire), par le type de matériel génétique et enfin par la structure.

Du fait de sa très grande taille, PBCV-1 n'a jamais été cristallisé (et ne le sera peut-être jamais). Seul le principal constituant de la capside, Vp54 a pu l'être [129]. Les données de la DRX peuvent être associées à celles de la cryomicroscopie élec-

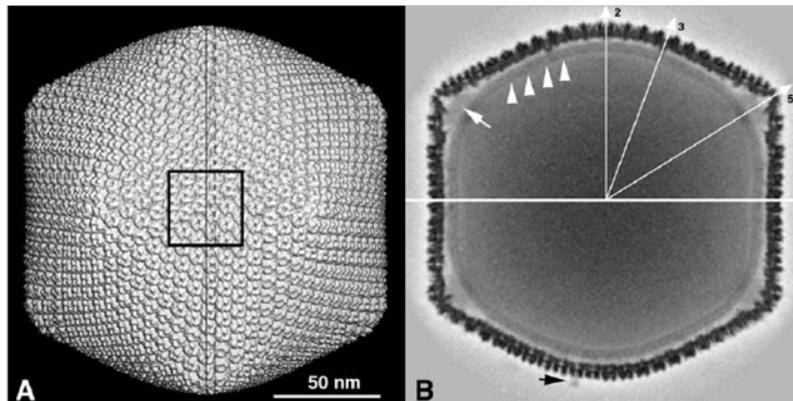


FIGURE 4.3 – (A) Reconstruction tridimensionnelle de PBCV-1. (B) En haut : section à partir de (A) selon la ligne continue avec la représentation des axes de symétrie 2, 3 et 5 de la capside. Les flèches blanches indiquent la membrane lipidique qui apparaît comme une bande diffuse qui suit le contour de la capside. En bas : section selon la ligne pointillée en (A). On observe une structure fibrillaire pointant en dehors de la capside (flèche noire). A part la membrane lipidique on ne distingue pas le matériel génétique à l'intérieur du virion. L'invisibilité du matériel génétique indique que celui-ci ne possède pas les symétries de l'icosaèdre et non pas qu'il est absent. D'après la référence [15].

tronique [15] afin d'élaborer un modèle structural de la capside avec une bonne résolution. Des observations complémentaires d'AFM ont également été faites [63].

PBCV-1 nous a été fourni par James Van Etten du département de Pathologie Végétale de l'Université du Nebraska (Lincoln).

4.1.2 Un virus humain : l'adénovirus

Les adénovirus sont des virus de 70 à 100 nanomètres de diamètre, non enveloppés, à ADN double brin et à capside icosaédrique $T = 25$ [130, 131]. Ils ont une forme icosaédrique marquée (figure 4.4). La capside est formée 252 *unités morphologiques* : 12 pentons (ou pentamères) et $10(T - 1) = 240$ hexons (en fait des trimères et non des hexamères). Chaque penton porte une spicule glycoprotéique, appelée fibre, terminée par une sphère de 4 nm de diamètre.

Les adénovirus ont pour unique hôte l'homme et provoquent fièvre, rhinite, toux et conjonctivite. Le mode de transmission en est direct ou indirect et s'effectue par contact. Les adénovirus jouent un grand rôle en thérapie génique où ils sont utilisés comme vecteurs [16].

L'adénovirus étudié est une souche particulière d'adénovirus de type 5 (Ad5) inactivés. Leur diamètre est de 80 nm et leur masse moléculaire de 175 MDa (dont 13% en masse d'ADN). L'épaisseur de la coque protéique est comprise entre 8 et 10 nm. Les échantillons d'adénovirus ont été élaborés par Laure Franqueville au Laboratoire de Virologie du professeur Boulanger (Université Lyon 1).

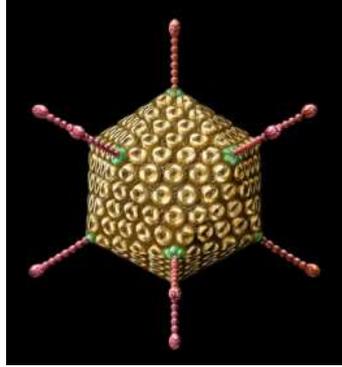


FIGURE 4.4 – Schéma de l'adénovirus.

4.2 Calcul des modes de vibration

Cette section est destinée à donner une estimation — avec toutes les réserves nécessaires — des domaines d'énergie où l'on peut s'attendre à observer des modes de vibration pour les virus étudiés.

Pour évaluer la fréquence de vibration d'une nanosphère et en particulier celle d'un virus « sphérique », nous avons vu dans le chapitre 1 qu'il était indispensable de connaître les vitesses du son longitudinale v_L et transverse v_T dans le virus, ainsi que sa densité ρ .

En l'absence de données sur les paramètres élastiques des virus, les valeurs des vitesses du son habituellement utilisées pour le calcul des modes de vibration de virus (voir les références [43, 44, 45, 46, 37]) sont celles du cristal de lysozyme (en quelque sorte l'archétype du cristal de protéine) déterminées par « pulse-echo » d'ultrasons [132, 133], c'est-à-dire $v_L = 1817 \text{ m.s}^{-1}$ et $v_T = 915 \text{ m.s}^{-1}$. Les mesures Brillouin sur le même cristal de lysozyme donnent des valeurs différentes [33, 21] : $v_L = 2200 \text{ m.s}^{-1}$, correspondant à une augmentation d'environ 20% par rapport aux mesures avec ultrasons. Il ressort des mesures Brillouin effectuées sur des cristaux de virus (cristaux de STMV, voir 4.6) que la vitesse du son v_L est plutôt de l'ordre de 1920 m.s^{-1} . Nos expériences ne nous ont pas permis de déterminer la valeur de v_T . Mais en supposant que le coefficient de Poisson des virus étudiés est proche de celui de la matière « molle » organique [67, 133] c'est-à-dire $\sigma \simeq 0.3$, le rapport $v_T/v_L = \sqrt{\frac{1-2\sigma}{2-2\sigma}}$ (voir chapitre 1) est à-peu-près égal à 0.5 ce qui donne $v_T \simeq 960 \text{ m.s}^{-1}$. En pratique, nous ferons les calculs pour deux valeurs de ce rapport : $v_T/v_L = 0.5$ et $v_T/v_L = 0.25$ qui est une valeur délibérément faible (susceptible de rendre compte d'une flexibilité accrue).

Le modèle le plus simple pour un virus est celui de la sphère pleine élastique. C'est le modèle utilisé dans les références [43, 44, 46] pour le calcul des modes de vibration de virus sphériques. Dans le tableau 4.2 sont répertoriées les fréquences des modes de vibration quadrupolaire et sphérique des virus telles que calculées par le modèle de la sphère élastique. Seuls ces deux modes sont examinés car à ce jour ce sont les seuls à avoir été identifiés sans ambiguïté expérimentalement, en tout cas

v_L/v_T	Sphère libre « hydratée »				Sphère libre « déshydratée »			
	0.5		0.25		0.5		0.25	
	$l=2$	$l=0$	$l=2$	$l=0$	$l=2$	$l=0$	$l=2$	$l=0$
STMV (17 nm)	48	99	24	110	85	176	43	61
BMV (28 nm)	29	60	15	67	57	118	29	132
TBSV (30 nm)	27	56	14	62	46	96	23	107
PBCV-1 (190 nm)	4	9	2	10	8	16	4	5
Adénovirus (80 nm)	10	21	5	23	18	37	9	13

TABLE 4.1 – Fréquences en GHz des modes de vibration de différents virus calculées avec le modèle de la sphère libre. $v_L = 1920 m \cdot s^{-1}$ pour la sphère « hydratée » ; $v_L = 3430 m \cdot s^{-1}$ pour la sphère « déshydratée » sauf pour le BMV ($v_L = 3800 m \cdot s^{-1}$) et le TBSV ($v_L = 3300 m \cdot s^{-1}$).

pour des particules dont la taille est petite devant la longueur d'onde ($D < \lambda$). La partie gauche du tableau intitulée sphère libre « hydratée » donne les valeurs des fréquences pour $v_L = 1920 m \cdot s^{-1}$ qui est la vitesse du son dans le cristal de STMV hydraté (4.6). Dans la partie droite $v_L = 3430 m \cdot s^{-1}$ (cristal de STMV « sec ») sauf pour le BMV ($v_L = 3800 m \cdot s^{-1}$) et le TBSV ($v_L = 3400 m \cdot s^{-1}$) qui sont les valeurs mesurées à partir des couches de virus (section 4.5.3).

Un modèle un peu plus réaliste consiste à prendre en compte leur structure en « oignon ». Le STMV est ainsi constitué d'un cœur composé d'eau de $4 nm$ de rayon entouré de couches concentriques d'ARN de $2 nm$ d'épaisseur et de protéines de $2.5 nm$ d'épaisseur [13]. Les calculs faits par Saviot *et al.* avec ce modèle (en prenant certes des valeurs de la vitesse légèrement différentes et en tenant compte de la viscosité de l'eau) donnent les résultats suivants [37] : $\nu_{l=0} = 110 GHz$ et $\nu_{l=2} = 43.5 GHz$, qui sont des valeurs très proches de celles obtenues avec le modèle de la sphère élastique. De plus ces calculs, bien qu'intéressants du point de vue fondamental, présentent un intérêt limité dans l'optique exploratoire qui est la nôtre.

Plus intéressants peut-être sont les résultats des calculs CFM (complex Model Frequency) prenant en compte l'effet de la matrice. Il n'est cependant pas possible d'utiliser le programme de calcul avec une matrice — l'eau — dont la vitesse transverse v_{Tm} est nulle. Pour que le programme renvoie des résultats cohérents, il faut fixer une valeur de v_{Tm} supérieure ou égale à environ $v_{Lm}/5$. Les paramètres utilisés pour le calcul sont les suivants : $d^m = 0.998$, $v_{Lm} = 1480 m \cdot s^{-1}$ et $v_{Tm} = 296 m \cdot s^{-1}$ ce qui correspond à une matrice très molle. On obtient alors pour le mode quadrupolaire du STMV, $\nu_{quad} = 38 GHz$ et pour le mode radial $\nu_{sph} = 89 GHz$: ce calcul montre que l'effet de la matrice molle (à défaut de celui de l'eau) est de déplacer les modes vers les basses énergies. En toute rigueur il faudrait aussi tenir compte de l'effet de la viscosité de l'eau qui est important à cette échelle de taille [37].

4.3 Solutions

Nous traitons dans ces quelques paragraphes essentiellement le cas de l'adénovirus. L'adénovirus a été étudié sous différents « conditionnements » : en suspension dans une solution tampon aqueuse « classique », et dans une solution formée d'un mélange d'eau et de glycérol (appelée dans la suite solution de glycérol, même si la proportion en glycérol est assez faible). Les concentrations en virus dans ces solutions sont assez variables : de 10^{10} *particules/ml* à, au mieux, 10^{13} *particules/ml* (ce qui correspond à 2.9 *mg/ml*). Ces concentrations bien que très supérieures à des concentrations « physiologiques », représentent néanmoins un pourcentage volumique très faible (0.2% pour 10^{13} *particules/ml*). A la différence des solutions de phytovirus qui peuvent être relativement concentrées (typiquement $C \sim 10^{15}$ *particules/ml*), il est difficile d'obtenir des solutions plus concentrées en adénovirus. Cela est en grande partie dû au fait que la technique de production de virus humains ou animaux est beaucoup plus difficile à mettre en œuvre (cultures cellulaires) et parce que le rendement n'est pas aussi bon que pour les phytovirus.

Avant réception de l'interféromètre Fabry-Pérot au mois de mai 2005, nous avons eu l'occasion de faire plusieurs expériences Brillouin en collaboration avec Alain Polian à l'IMPMC (Institut de Minéralogie et Physique des Milieux Condensés, Paris 6). Avec d'autres expériences menées par nous à Lyon, ces différents essais ont montré qu'il n'y pas de différences significatives entre les spectres de solutions avec ou sans les virus. En particulier, les spectres de la solution aqueuse avec et sans virus sont identiques (figure 4.5). Sur ces spectres on peut voir un seul pic à $\nu = 8.2$ *GHz*, intense et polarisé, le pic Brillouin du liquide correspondant au mode acoustique longitudinal du liquide. Pour la solution de glycérol on observe toutefois une différence entre le spectre de la solution et celui de la même solution avec les virus. Comme le spectre de la solution aqueuse, le spectre de la solution de glycérol présente un pic unique (à $\nu = 10.4$ *GHz* dans le cas du glycérol), pic Brillouin correspondant au mode longitudinal de la solution. Avec l'ajout de l'adénovirus, ce pic se rapproche de la raie élastique ($\nu = 9.5$ *GHz*). Mise à part la légère modification de la réponse de la solution, il n'y a rien d'autre à signaler, et en particulier pas de signal inélastique supplémentaire qui pourrait être attribué à la présence des virus, chose confirmée par des spectres pris sur un intervalle spectral libre $\Delta\nu$ plus grand ($\Delta\nu \sim 60$ *GHz*).

Pour tous les autres virus étudiés en solution (à l'exception de PBCV-1, voir 4.7), comme le TBSV, le BMV ou le STMV, dont les solutions sont pourtant plus concentrées (pour le TBSV, $C = 19$ *mg/ml* et pour le STMV, $C = 11$ *mg/ml*), les résultats de nos investigations dans les domaines d'énergie compatibles avec l'énergie de vibration des virus (et en dehors de ces domaines) sont similaires : on n'observe que le signal inélastique très intense de la solution dans laquelle se trouvent les virus. A ce stade des expériences on se rend compte de la difficulté à détecter en solution le signal inélastique d'un virus, quel qu'il soit. A cela on peut trouver plusieurs explications : la première et la plus évidente est que le faible niveau de signal est lié à la faible fraction volumique ϕ en virus. ϕ est de l'ordre de 0.2% pour les virus, alors que dans la référence [90] par exemple, les auteurs

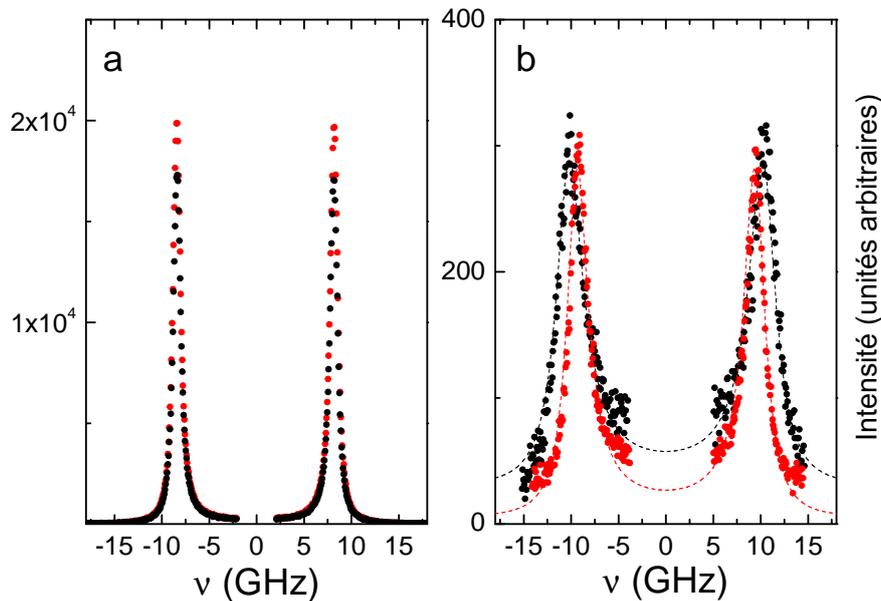


FIGURE 4.5 – Spectres Brillouin de solutions d’adénovirus. (a) En suspension dans une solution aqueuse. (b) En suspension dans une solution de glycérol (symboles noirs : témoin ; symboles rouges : virus).

indiquent observer des modes de vibration de colloïdes uniquement pour des fractions volumiques supérieures à 30%. On ne peut par ailleurs exclure l’hypothèse, déjà avancée dans les références [23, 44, 46, 37], selon laquelle les modes de virus que nous recherchons sont amortis par la solution, du fait d’une part de la presque égalité entre les impédances acoustiques du virus et de la solution et d’autre part du frottement visqueux. Enfin, il est possible que l’activité Raman des modes de vibration de virus soit trop faible pour engendrer un signal suffisamment intense, notamment par rapport au très intense signal Brillouin de la solution.

Afin de surmonter la difficulté liée au solvant, nous avons exploré plusieurs voies. La première consiste à étudier des échantillons plus concentrés (voir les parties 4.5 et 4.6). La seconde voie revient à essayer de contourner le problème en exaltant le signal inélastique des virus.

4.4 Comment exalter le signal du virus ?

4.4.1 Par effet S.E.R.S.

Pour exalter le signal du virus, nous avons entrepris d’exploiter les propriétés de la diffusion de lumière exaltée par des nanoparticules métalliques (effet S.E.R.S., Surface Enhanced Raman Scattering ou Raman exalté de surface [73]). Les mécanismes à l’origine l’exaltation du signal sont multiples, à la fois chimiques et électromagnétiques et pas encore complètement élucidés. Dans une description très simplifiée du

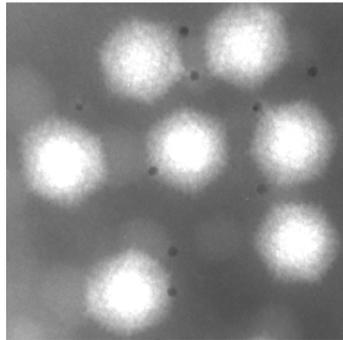


FIGURE 4.6 – Observations par microscopie électronique de virions (adénovirus) sur lesquels sont greffés des nanoparticules d’or par l’intermédiaire d’un anticorps (d’après [16]). A la plupart des virions (au contraste clair) sont fixées une ou deux nanoparticules (au contraste sombre). L’échelle est donnée par les particules d’or (10 nm de diamètre).

phénomène, on peut cependant dire que les nanoparticules métalliques (d’or ou d’argent par exemple) jouent un double rôle : à la fois d’exaltation du champ électrique incident sur les nanoparticules par la résonance plasmon de surface, et aussi d’antenne locale pour le champ diffusé par les entités voisines de la nanoparticule. L’effet S.E.R.S. est maximum quand l’excitation laser se fait à la fréquence du plasmon de surface des nanoparticules.

Des échantillons spécifiques ont été préparés au laboratoire de Virologie. Ce sont des solutions d’adénovirus dans lesquelles des nanoparticules d’or sont spécifiquement greffées aux virus par l’intermédiaire d’un anticorps [16] (fig. 4.6). Mais là encore, nous n’avons pas observé de différences significatives entre le spectre de la solution témoin (solution tampon avec les nanoparticules d’or fixées sur les anticorps) et le spectre de la solution avec les virus greffés, probablement à cause de la faible concentration en virus ($10^{10}\text{ particules/ml}$ dans ce cas) et/ou en nanoparticules métalliques. Il reste que la piste de l’effet S.E.R.S. mérite sans doute d’être explorée de manière approfondie, en utilisant par exemple des substrats S.E.R.S. comme ceux qui commencent à être commercialisés (par la société d3technologies² par exemple) ou des substrats « maison » (lame de verre sur laquelle une surface rugueuse d’argent a été formée par évaporation thermique), ou encore en évaporant des atomes métalliques sur des réseaux bidimensionnels de virus (expériences menées en collaboration avec Juliette Tuillon-Combes au Laboratoire de la Physique de la Matière Condensée et Nanostructures, LPMCN, Lyon 1).

4.4.2 Diffusion inélastique d’UV

Pourquoi utiliser l’UV ?

C’est également dans une démarche d’exaltation du signal inélastique des virus que s’inscrit l’idée d’utiliser une longueur d’onde d’excitation dans le domaine UV et

2. <http://www.d3technologies.co.uk/>

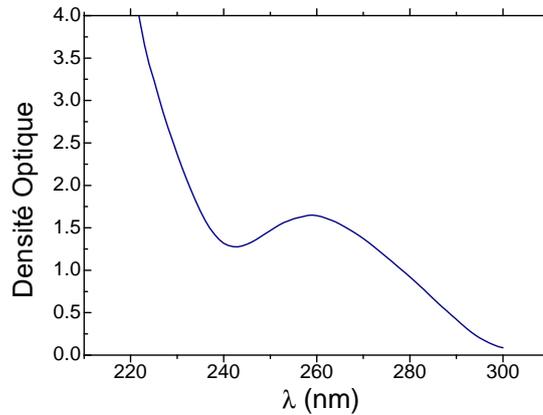


FIGURE 4.7 – Spectre d’absorption d’une solution de TBSV.

non plus dans le domaine visible. Ceci est fait dans le but d’exploiter des propriétés de résonance sur deux plans différents.

Le premier aspect de l’utilisation d’un rayonnement UV est qu’elle rend possible la réalisation d’expériences de diffusion Raman résonnante. Dans ce processus, mis à profit dans l’étude de nanoparticules métalliques (voir le chapitre 3), l’énergie de la radiation excitatrice correspond à l’énergie d’une transition vers un niveau d’absorption électronique du matériau ce qui conduit à une augmentation, parfois spectaculaire, du signal Raman de certains modes.

La diffusion Raman résonnante dans le domaine UV est un outil très employé pour les caractérisations Raman « classiques » de macromolécules biologiques (étude des différentes conformations des protéines, des interactions avec des ligands etc...). Dans ce registre, les virus sont un cas particulièrement favorable à cause de l’existence de deux bandes d’absorption intenses associées aux protéines d’une part et aux acides nucléiques (ADN, ARN) d’autre part. La bande d’absorption caractéristique des protéines se situe autour de 280 nm ; elle correspond essentiellement aux transitions $\pi - \pi^*$ dans les trois acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine). La bande d’absorption caractéristique de l’ADN ou de l’ARN est également liée au caractère aromatique des bases. Le recouvrement de ces deux bandes d’absorption voisines donne généralement une seule bande large, comme illustré par le spectre d’absorption d’une solution de TBSV (figure 4.7). La mesure d’absorption à 280 nm peut aussi être utilisée pour donner une bonne estimation de la concentration en virions dans une solution.

Pour une description de l’application de la diffusion Raman résonnante UV au cas spécifique des virus, on pourra se reporter aux références [117, 72]. L’efficacité de cette approche dans la détection des (ou de certains) modes de vibration moléculaires dans les virus nous incite à la tester dans une autre optique, celle de la détection des modes de vibration basse fréquence de virus.

Le seconde raison de l’utilisation d’une source UV est aussi à relier à une condi-

tion de résonance, mais cette fois-ci dans le domaine « spatial ». Les études Raman/Brillouin de nanobilles de diélectrique réalisées sans condition de résonance énergétique [9] (contrairement aux études des nanoparticules métalliques du chapitre 3) montrent que l'observation des modes basse fréquence n'est possible que lorsque le produit qD est plus grand que π (q étant le moment transféré de la relation (2.6) et D le diamètre de la particule). Cette condition d'existence est à relier aux résonances de Mie [134] (résonances « géométriques »). L'examen des valeurs du paramètre qD (tableau 4.2), montre que les longueurs d'onde du visible ne permettent pas d'approcher la condition de résonance pour des tailles de virus inférieures à la centaine de nanomètres. Avec une radiation UV, on se rapproche de la condition de résonance et il est raisonnable d'espérer observer un effet de la résonance sur le niveau de signal. Les virus de grande taille ($\sim 200\text{ nm}$) sont, de ce point de vue, les candidats les plus favorables. En revanche, il faut garder en mémoire qu'une grande taille implique des énergies de vibration correspondantes faibles (relation (1.25)), ce qui peut poser des problèmes d'observabilité avec certains spectromètres (voir le cas de PBCV-1 par exemple dans la partie 4.7).

λ (nm)	532 (476.5)	244
STMV $D = 17\text{ nm}$	0.6 (0.7)	1.4
TBSV $D = 30\text{ nm}$	1.1 (1.2)	2.4
Adénovirus $D \sim 90\text{ nm}$	3.3 (3.7)	7.2
PBCV-1 $D = 190\text{ nm}$	7.0 (7.8)	15.2

TABLE 4.2 – Valeurs de $qD = 4\pi nD/\lambda_0$ pour quelques virus à différentes longueurs d'onde. $n = 1.55$ [21].

La diffusion inélastique basse fréquence à partir d'une source laser UV n'est pas réalisable avec l'interféromètre Fabry-Pérot dans sa configuration actuelle. A cause du fait qu'il n'existe pas de lentille achromatique pour l'UV, la lentille d'entrée L_1 qui sert pour les trois passages du faisceau (voir la figure 2.8), devrait en effet être remplacée par trois lentilles simples en quartz, montage incompatible avec le faible encombrement de l'interféromètre. En l'absence d'un tandem Fabry-Pérot adapté à l'utilisation de l'UV, l'instrument de diffusion inélastique de rayonnement UV (Inelastic UV Scattering, IUVS) développé sur l'anneau synchrotron Elettra à Trieste (Italie) constitue une très bonne alternative (voir l'annexe C). A l'origine cet instrument a été conçu dans l'idée d'effectuer des expériences de diffusion Brillouin dans une gamme énergie/transfert de moment (E, q) non couverte par les spectroscopies Brillouin lumière, neutrons et rayons X (voir figure 4.8). Comme dans le cas de l'interféromètre Fabry-Pérot, l'instrument est en quelque sorte détourné de sa fonction première (la détection de modes acoustiques) au profit d'expériences de diffusion Raman basse fréquence.

Résultats

Les différentes expériences que nous avons réalisées, dans le cadre de deux demandes officielles de faisceau, ont consisté dans un premier temps à observer la

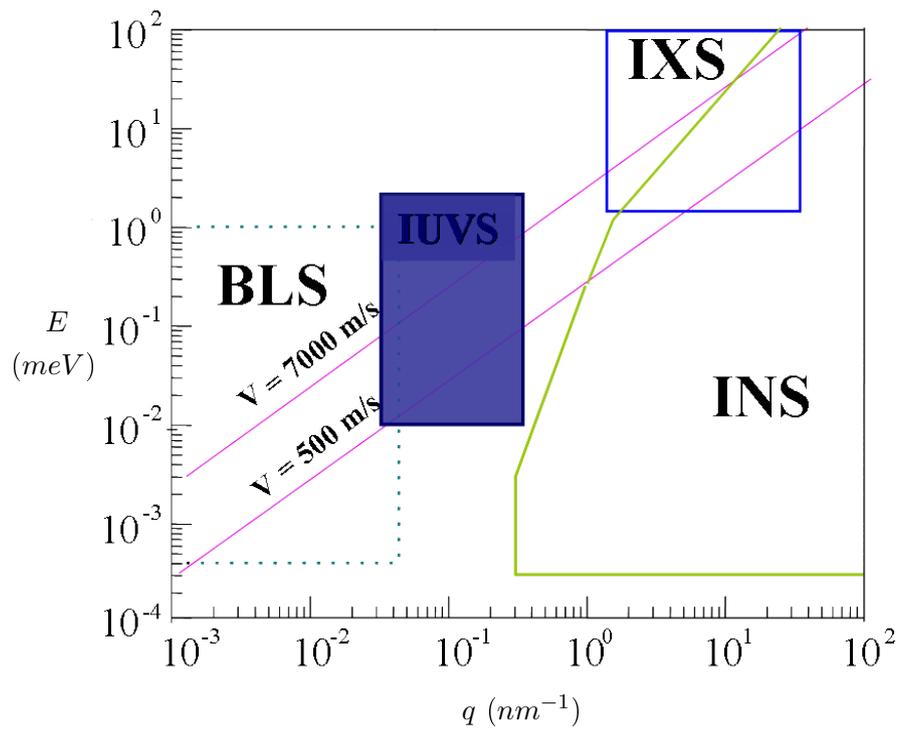


FIGURE 4.8 – Diagramme énergie/moment d'après [17]. Les domaines d'investigation des différentes techniques de diffusion inélastique sont schématiquement représentés. BLS : Brillouin Light Scattering ; IUVS : Inelastic UV Scattering ; IXS : Inelastic X-ray Scattering ; INS : Inelastic Neutron Scattering. $1\ meV = 8\ cm^{-1} = 240\ GHz$.

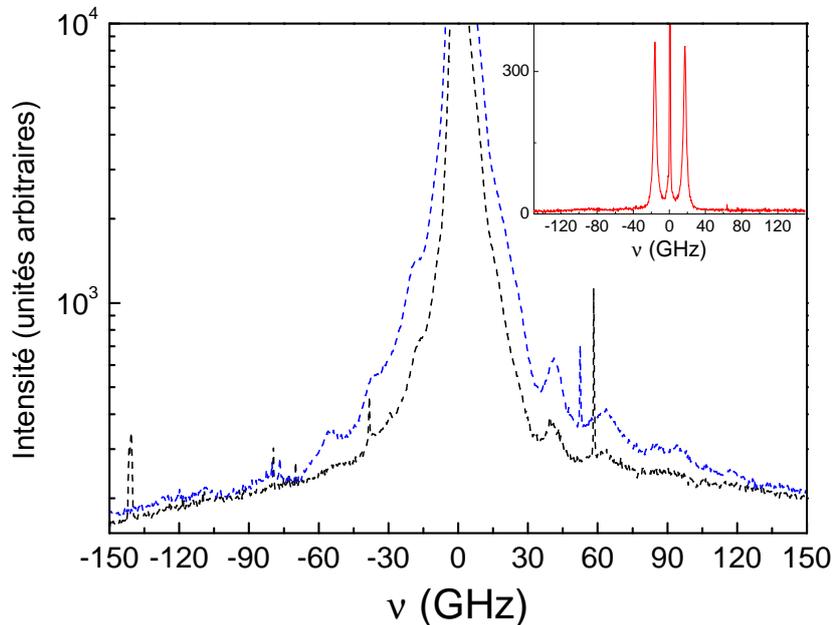


FIGURE 4.9 – Spectres d’une solution de TBSV à 5.1 eV (en noir) et 5.6 eV (en bleu). En encart, un spectre de l’eau.

diffusion par des solutions aqueuses du TBSV et de l’adénovirus à diverses concentrations (à $1.4\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ et $0.4\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour le TBSV, à $0.5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Si le spectre des solutions tampon (sans virus) fait clairement apparaître le doublet Brillouin du liquide (figure 4.9, en encart), les spectres des solutions virales se sont tous révélés inexploitable à cause d’une augmentation considérable du signal élastique et quasiélastique. Cette augmentation traduit essentiellement le fait que du fait de la présence des virus, le milieu devient inhomogène et diffusant. Le pied de cette bande de diffusion intense étant très étendu, il masque toute la région inélastique basse fréquence, relative à la fois à la diffusion Brillouin et au signal Raman recherché. De plus, la forte diffusion de la lumière incidente après passage dans l’échantillon fait apparaître sur les spectres un signal de bruit très perturbé (non symétrique) excluant toute possibilité de détection d’un signal Raman peu intense. La figure 4.9 illustre cette situation à partir de quelques spectres obtenus sur une solution de TBSV, enregistrés à partir de la source synchrotron ou de la source laser. Toutes les structures observées sur ces spectres sont essentiellement le fait de la piètre réponse instrumentale dans le cas d’échantillons très diffusants.

Cette situation malencontreuse avec les suspensions virales ne s’est pas améliorée en observant des arrangements bidimensionnels (gouttes séchées sur un substrat de quartz) de TBSV. Dans ce cas, l’aspect opalescent des dépôts se traduit aussi par une forte diffusion de la lumière incidente, et par conséquent par des spectres similaires à ceux de la figure 4.9.

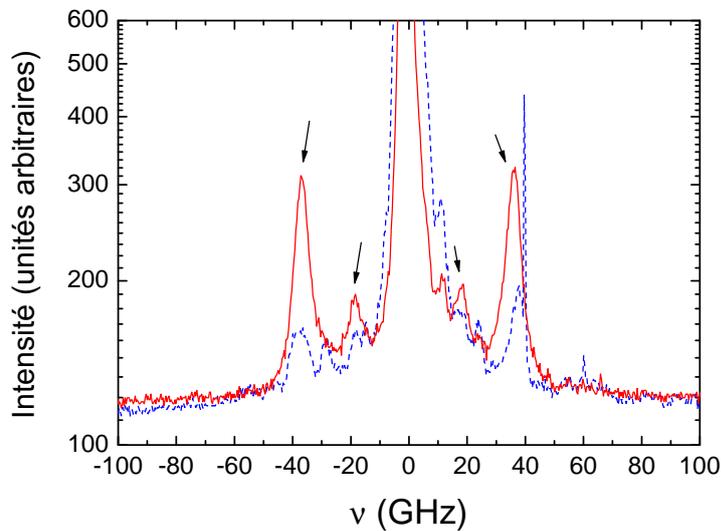


FIGURE 4.10 – Spectres IUVS d’une solution de sulfate d’ammonium (traits pleins) et d’un cristal de STMV (pointillés). Les flèches indiquent les pics Brillouin de la solution de sulfate d’ammonium (à basse fréquence) et ceux du liquide d’indice (à plus haute fréquence).

Pour des raisons similaires, les autres tentatives réalisées sur des microcristaux de STMV se sont également révélées infructueuses. Nous avons à notre disposition des cristaux de STMV hydratés dans des capillaires de quartz scellés de 0.5 mm de diamètre. En plongeant les capillaires dans une cuve remplie de glycérol, le glycérol jouant en quelque sorte le rôle de liquide d’indice, l’intense diffusion par les capillaires a été atténuée mais, d’une part la résolution des mesures en a pâti et d’autre part un signal supplémentaire, celui du glycérol, est apparu sur les spectres. Sur la figure 4.10 on peut voir deux spectres IUVS très similaires à des spectres Brillouin : le spectre de référence est celui de la solution de sulfate d’ammonium dans laquelle le cristal de virus baigne. C’est un spectre à deux composantes : la première à $\nu \sim 18.5\text{ GHz}$ correspond au signal de la solution, la deuxième à $\nu \sim 36.5\text{ GHz}$ au signal du glycérol. Le deuxième spectre (pointillés) est un spectre du cristal de STMV hydraté sur lequel on retrouve les mêmes composantes que sur le spectre de la solution. Il n’y a pas trace de pics supplémentaires, mais comme pour les expériences IUVS précédentes, il est difficile d’être catégorique car pour ces échantillons à fort pouvoir diffusant, les signaux éventuels sont masqués par la mauvaise réponse de l’appareil de mesure.

4.5 Couches bidimensionnelles

L’élaboration de réseaux bidimensionnels (2D) organisés de virus constitue un des moyens d’augmenter la concentration en virus dans nos échantillons. Il n’est pas rare d’observer des inclusions cristallines 2D ou 3D de protéines ou de virus

dans les tissus vivants (par exemple d'adénovirus dans des cellules animales [135], de TBSV [136] ou de BMV [137] dans les feuilles de plants infectés). *In vitro* il est possible, moyennant des conditions de préparation précises, de former des cristaux 2D de virus. Si l'arrangement cristallin est suffisamment bon, l'observation de ces cristaux peut donner des informations structurales sur les contacts entre particules et à l'échelle de la particule [138, 139].

La préparation de surfaces structurées à l'échelle nanométrique par auto-assemblage de macromolécules biologiques connaît par ailleurs un intérêt grandissant. Ces surfaces nanostructurées peuvent en effet constituer des matrices (ou « templates ») pour la croissance organisée de nanoparticules [140, 141, 142, 143].

Dans cette partie, nous décrivons d'abord la synthèse et la caractérisation par TEM et AFM des couches de virus telles qu'élaborées en collaboration avec Eric Larquet à l'IMPMC [14] (Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés, Paris 6) puis nous relatons les résultats des expériences de diffusion inélastique.

4.5.1 Elaboration des couches

Horne *et al.* remarquèrent en préparant des échantillons concentrés de virus pour les observer au MET que l'adjonction de sels de métaux lourds³ (acétate d'uranyle et molybdate d'ammonium) induit chez certains virus icosaédriques la formation de réseaux cristallins à la surface de feuilles de mica [144]. La technique fut ensuite améliorée et étendue à la fabrication de réseaux cristallins 2D de protéines et d'enzymes [139].

La méthode que nous avons utilisée pour fabriquer les couches de virus est celle de Harris [145] : elle consiste à déposer sur un substrat adapté une goutte ($10\ \mu\text{l}$) d'une solution diluée de virus à laquelle est ajoutée une espèce chimique qui joue le rôle d'*agent condensant*. Au cours de l'évaporation de la goutte, l'action combinée de la progression du front d'évaporation, de la diminution d'épaisseur de la goutte et de l'agent condensant conduit à la très forte augmentation de la concentration des particules virales en suspension, jusqu'à la sursaturation. L'interaction forcée entre particules virales conduit alors à la formation d'arrangements compacts plus ou moins ordonnés.

La mise en ordre, favorisée par une vitesse d'évaporation lente, résulte toutefois d'un compromis entre la quantité d'agent condensant et la vitesse d'évaporation. Le rôle précis de l'agent condensant n'est pas clairement établi, même si sa présence est indispensable à la formation des réseaux. Une des hypothèses avancées pour expliquer son rôle dans la mise en ordre est que son action repose sur un écrantage des charges de surface des protéines virales [145].

Le substrat est en général une lamelle de mica mais nous avons aussi parfois utilisé une lame de verre. Du fait de sa structure en feuillet, le mica est un substrat adapté

3. utilisés pour colorer les échantillons

à ces expériences : il est facile à cliver et, fraîchement clivé, donne une surface plane et propre.

En pratique, on découpe de petits carrés de mica d'environ $4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$. Ces dimensions sont adaptées au volume de la goutte déposée : retenue par les bords du mica, celle-ci forme un ménisque épais ce qui favorise une évaporation relativement lente. Les carrés de mica sont clivés juste avant le dépôt pour minimiser les contaminations par des poussières.

Les solutions Les gouttes déposées sont préparées à partir de solutions diluées de virus. Les solutions-mères de virus, conservées à 4°C sont aux concentrations :

- $C_0 = 19\text{ mg/ml}$ pour le TBSV,
- $C_0 = 11\text{ mg/ml}$ pour le BMV.

Elles sont diluées dans un tampon d'acétate de sodium à 200 mM et $pH = 6.5$. On utilise des solutions de concentration environ égale à 0.2 mg/ml . Dans une goutte de $10\ \mu\text{l}$, on peut approximativement estimer le nombre de virus à $N = \mathcal{N}_A CV/M = 3 \cdot 10^{14}$ pour le BMV et $1 \cdot 10^{14}$ pour le TBSV. $\mathcal{N}_A = 6.02 \cdot 10^{23}$ est le nombre d'Avogadro, $C = 0.2\text{ mg/ml}$ la concentration, $V = 10\ \mu\text{l}$ est le volume de la goutte et M le poids moléculaire des virus. $M = 4.6\text{ MDa}$ pour le BMV et 9.3 MDa pour le TBSV.

Les solutions diluées de virus sont mélangées en proportions égales à une solution de molybdate d'ammonium qui joue le rôle d'agent condensant. La solution de molybdate d'ammonium à 10% est préparée à partir de molybdate d'ammonium anhydre dissous dans le tampon d'acétate de sodium. Après dissolution totale, la solution obtenue est filtrée (filtre Millipore $0.22\ \mu\text{m}$) et peut être conservée à 4°C .

Après dépôt sur les micas d'un volume de $10\ \mu\text{l}$ de solution de virus et de molybdate d'ammonium, les micas sont placés sous des boîtes de Petri. La durée de l'évaporation varie selon les conditions de température et d'hygrométrie de la pièce. A 20°C elle est d'environ une heure.

4.5.2 Caractérisation des couches 2D par MET et AFM

MET

Dans un premier temps, au début de ce travail, la caractérisation des échantillons a été effectuée par microscopie électronique en transmission (MET). Les observations ont été faites avec Estela Bernstein du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures (UMR 5586) sur un microscope Philips CM 30. Du fait de leur épaisseur, les substrats de mica ne permettent pas de faire des observations en MET. Il faut procéder à une *réplique sur carbone* ce qui implique des manipulations assez compliquées.

La première étape consiste à évaporer une couche de carbone de quelques dizaines de nanomètres sur les échantillons. Au bout de 24 heures, durée nécessaire à la bonne tenue mécanique du film de carbone, on peut transférer le film sur une grille de microscopie. Le transfert consiste à séparer le film de carbone du substrat en l'immergeant délicatement et progressivement dans une solution aqueuse. Le film

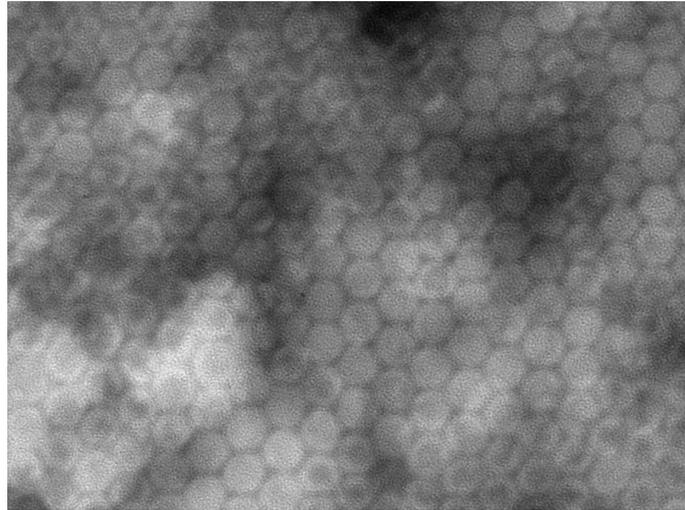


FIGURE 4.11 – Cliché MET d'un réseau 2D de BMV. Le cliché montre un réseau hexagonal très compact et bien organisé de virus. Les variations de contraste sont dues à une répartition inhomogène du colorant. L'échelle est donnée par le diamètre d'un virus $D = 28 \text{ nm}$.

de carbone, extrêmement hydrophobe, se sépare du mica et surnage, emportant la couche de virus. La solution aqueuse dans laquelle est immergée l'échantillon contient de l'acétate d'uranyle qui sert à colorer les virus, ces derniers étant peu contrastés en MET comme la plupart des objets biologiques. L'acétate d'uranyle comme d'autres sels de métaux lourds enrobe les virus dans une gangue qui met en évidence leur contour : c'est le principe de la coloration négative (par opposition à la coloration positive dans laquelle l'objet à observer est coloré).

Le film de carbone auquel est attachée la couche de virus colorée négativement est transféré sur une grille de microscopie (grille de cuivre). La couche de virus, prise entre le film de carbone et la grille de microscopie peut être observée entre les carreaux de la grille. La figure 4.11 montre le résultat d'observations sur une couche de BMV. La couche de BMV est très compacte et très bien organisée. Ces observations permettent également de vérifier l'intégrité des virus.

Les observations par MET posent néanmoins certains problèmes. Le premier est celui de la mise en forme qui est longue et peut faire des dégâts sur les couches de virus. Ensuite un échantillon ayant servi à la caractérisation est inutilisable pour les expériences de diffusion de lumière puisqu'il a été transféré sur une grille de microscopie : il faut alors se contenter d'un échantillon du même lot, préparé au même moment et dans les mêmes conditions certes, mais dont l'état peut être très différent.

AFM

Les images AFM (microscopie à force atomique) ont été réalisées par Armel Descamps au CLAMS (Consortium de Laboratoires d'Analyses par Microscopies à Sondes locales, INSA de Lyon) avec un AFM Digital 3100. Elles ont été effectuées

en mode « tapping » avec des pointes de silicium de 15 nm à une fréquence comprise entre 270 kHz et 310 kHz ⁴. L'appareil utilisé n'était pas équipé pour les mesures en phase liquide. Aucune observation n'a donc pu être effectuée en phase liquide.

La caractérisation des échantillons par microscopie à force atomique (AFM) présente des avantages certains par rapport à la microscopie électronique en transmission (en tout cas pour la caractérisation des échantillons que nous préparons). Elle ne nécessite aucune mise en forme et après observation par AFM un même échantillon peut très bien faire l'objet d'une expérience de diffusion de lumière.

La figure 4.12 montre les résultats des observations sur un échantillon de TBSV. Sur l'image 4.12a, on observe un réseau hexagonal compact très bien organisé formé de billes sphériques. En bas à gauche de l'image, on peut voir un joint de grains entre deux domaines organisés dont les axes font un angle d'environ 30° . L'AFM donne des images tridimensionnelles de surface comme le rappelle la reconstruction de la figure 4.12c. Les zones plus sombres de 4.12a et d indiquent donc la présence de dépressions dans le substrat et non l'absence de virus. Le profil tridimensionnel (4.12b) à partir de l'image 4.12a (trait noir) permet d'estimer la taille des entités (4 particules pour environ 125 nm) à à-peu-près 30 nm ce qui concorde bien avec la taille du TBSV. Le profil est composé de bosses et de creux dont l'amplitude ne dépasse pas quelques nanomètres. Cela montre que les virus forment un assemblage très compact. L'image 4.12c à plus grande échelle montre la grande étendue du réseau de virus et un joint de grain entre deux domaines bien organisés (flèches). En bas à gauche on voit également le substrat.

La solution de BMV s'étant progressivement dégradée au cours de son stockage prolongé, nous avons dû arrêter les expériences sur les réseaux de BMV. C'est l'utilisation de l'AFM qui a permis de confirmer l'état de la solution (figure 4.13). Sur la figure 4.13 la petitesse du réseau observé ne pouvant être imputée au processus de mise en forme de l'échantillon est bien la preuve de la dégradation de la solution-mère de BMV.

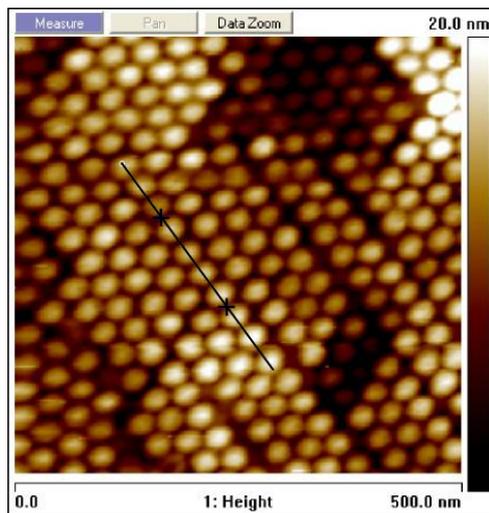
Les couches 2D de virus sont — à plusieurs titres — des échantillons qui devraient favoriser la diffusion inélastique de lumière par les modes de vibration de virus. Dans ces couches très organisées de virus en arrangement compact la concentration en virions est en effet très proche de 100%. Il est de plus envisageable que des effets de cohérence interparticules donnent lieu à une augmentation du signal inélastique diffusé, comme dans le cas récemment observé de nanoparticules métalliques auto-organisées sous forme de réseaux tridimensionnels [105, 106].

4.5.3 Expériences de diffusion de lumière

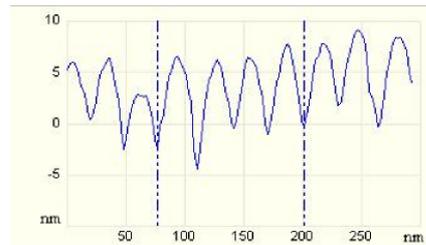
Couches 2D de BMV

En rétrodiffusion, les spectres Brillouin d'une lame de mica sont constitués de manière très reproductible de trois pics : un pic très intense et polarisé à $\nu = 29 \pm 0.2\text{ GHz}$ et deux pics peu intenses, dépolarisés et difficiles à résoudre l'un de l'autre (figure 4.14) [29]. Le premier pic correspond au mode acoustique longitudinal

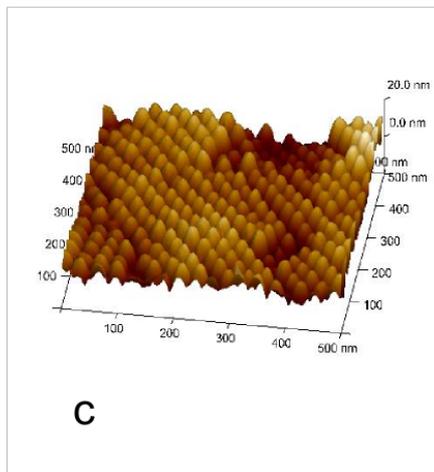
4. la fréquence de résonance exacte dépend de la taille du bras de levier.



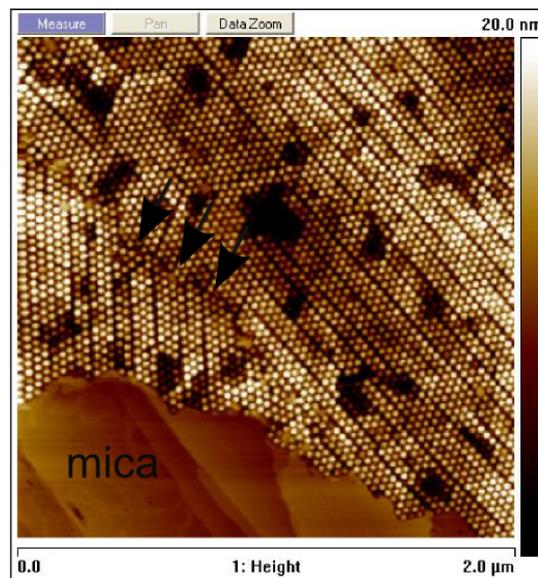
a



b



c



d

FIGURE 4.12 – Clichés AFM de réseaux 2D de TBSV formés sur des lamelles de mica (voir texte).

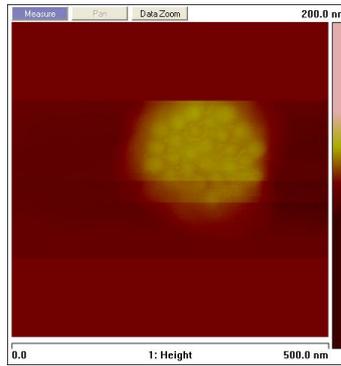


FIGURE 4.13 – Cliché AFM d’un réseau de BMV réalisé à partir d’une solution dégradée de virus.

du mica (mode L), les deux autres étant attribués aux modes acoustiques transverses T_1 et T_2 du mica. Le fait que les modes transverses du mica soient observables en rétrodiffusion (ce qui est en principe interdit) est à relier à la grande anisotropie du mica et au fait que la normale à l’échantillon ne coïncide pas avec l’axe optique de la lentille de focalisation et de collection. Il est en effet nécessaire de tourner la lame de mica si on veut éviter que la réflexion sur la surface du mica pénètre dans l’interféromètre (figure 4.15, en encart). La position des pics transverses T_1 et T_2 dépend de l’angle ϕ entre la normale à la lame de mica et l’axe du montage optique et on observe que lorsque l’angle ϕ diminue, les pics T_1 et T_2 se rapprochent de la raie élastique (figure 4.15). La caractérisation du substrat seul est nécessaire pour différencier les éventuels signaux de virus des nombreuses raies Brillouin du mica (bien qu’elles soient fines).

Les spectres Brillouin de couches de BMV sur mica (figure 4.14) font apparaître au moins une composante supplémentaire par rapport au spectre du substrat seul : la position de ce pic est à $\nu = 23 \pm 1.5 \text{ GHz}$. Pour certains échantillons, un pic à plus basse fréquence ($\nu \sim 10 \text{ GHz}$) apparaît et correspond très probablement au liquide résiduel dans la couche de virus. Ce pic à 10 GHz n’a cependant été observé qu’en de rares occasions alors que le pic à 23 GHz est très reproductible d’un échantillon à l’autre. Mais la position, la largeur et l’intensité du pic à 23 GHz sont assez variables et dépendent vraisemblablement de l’état de la couche de virus et plus particulièrement de son hydratation, tributaire de paramètres que nous contrôlons mal (comme la durée du séchage de la goutte de virus ou l’hygrométrie du laboratoire au moment de la mesure) et de son état d’organisation. Ces considérations démontrent la nécessité d’aménager un environnement expérimental contrôlé.

La question de la nature du mode observé à 23 GHz se pose alors. Première hypothèse : ce mode étant caractéristique d’une couche de faible épaisseur, il pourrait correspondre à un mode de surface (modes Rayleigh ou de Love [146]). On peut cependant définitivement écarter cette hypothèse pour deux raisons : d’une part, la position d’un mode de surface dépend de l’angle ϕ défini plus haut. Or ce n’est pas le cas comme illustré sur la figure 4.15. D’autre part, ces modes ne sont observables que pour des angles suffisamment grands ($\phi > 30^\circ$) : pour des angles plus petits, les

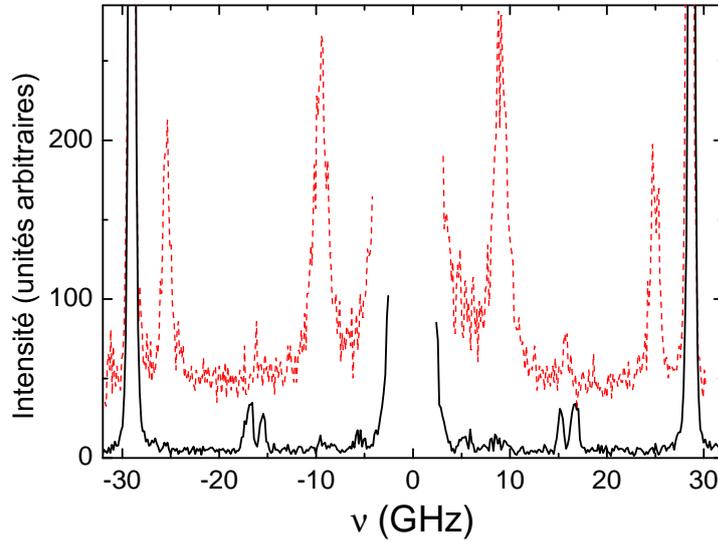


FIGURE 4.14 – Spectres Brillouin d’une lame de mica avec (pointillés) et sans virus (trait plein) en rétrodiffusion à $\lambda = 514.5 \text{ nm}$.

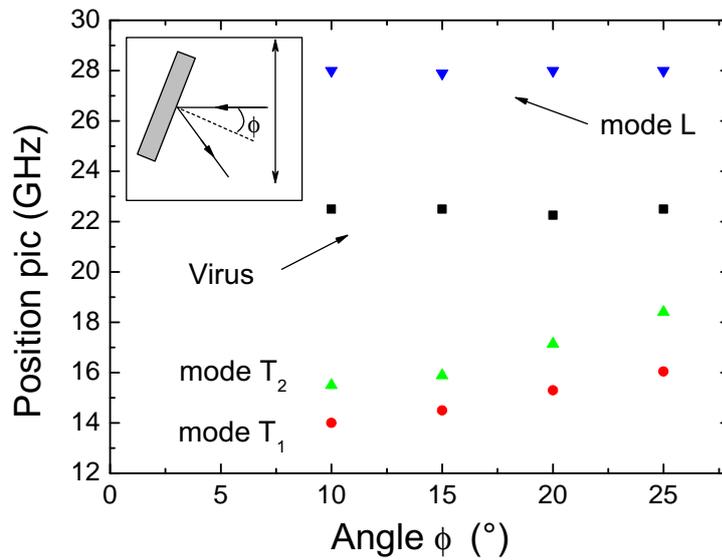


FIGURE 4.15 – Influence de la variation de l’angle ϕ sur la position des pics du mica et de la couche de virus. En encart : description de ϕ .

modes de surface sont généralement à trop basse énergie pour n'être pas confondus avec la raie élastique.

La deuxième hypothèse est qu'il s'agit du mode acoustique longitudinal de la couche de virus. Cette hypothèse est renforcée par le caractère fortement polarisé du mode ($I_{VH}/I_{VV} = 0.14$). Si c'est le cas, on peut faire une estimation (assez grossière) de la vitesse de propagation de ce mode : $v_L = 3800 \pm 300 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ en prenant $n = 1.55$.

La dernière hypothèse sur la nature du mode observé à 23 GHz est qu'il s'agit d'un mode de virus, un de ceux recherchés. D'une part le fait que la fréquence du pic soit peu éloignée de celle estimée par le calcul pour un mode quadrupolaire va dans ce sens. Mais d'autre part le caractère polarisé du mode va à l'encontre de l'hypothèse d'un mode quadrupolaire.

Pour avoir une réponse claire à la question de la nature du mode, il faut donc examiner la dépendance de la fréquence du mode par rapport au moment transféré q , en faisant varier la longueur d'onde d'excitation ou en passant de la rétrodiffusion à 90° . Pour certains échantillons nous avons observé une augmentation de la fréquence du pic parallèlement à la diminution de la longueur d'onde d'excitation (correspondant d'après la relation (2.6) à une augmentation de q). Cette évolution semble indiquer que le mode est de nature acoustique. Mais la grande dispersion des mesures et notre maîtrise imparfaite (à l'époque où ont été effectuées ces expériences) de la configuration à 90° du fait des réflexions multiples et de la relative complexité des échantillons (échantillons composites) font qu'à ce stade des expériences il est difficile de conclure catégoriquement sur la nature acoustique ou quasi-optique du mode à 23 GHz . L'étude d'autres types d'échantillons va permettre de lever cette incertitude.

Signalons enfin que les expériences Brillouin avec un grand intervalle spectral libre ($\sim 150 \text{ GHz}$) n'ont pas permis de détecter d'autres modes à plus hautes fréquences.

Couches 2D de TBSV et autres dépôts

Avec le TBSV nous avons généralisé les types d'échantillons étudiés : couches organisées ou pas organisées, échantillons très concentrés, substrats divers (mica, silice et alumine). Comme dans le cas du BMV, un seul pic supplémentaire a été observé de façon reproductible, à $\nu = 20 \pm 2 \text{ GHz}$. Un exemple de spectre Brillouin de dépôt de TBSV sur un substrat de silice est représenté sur la figure 4.16.

Nous avons également effectué quelques tests sur des dépôts très concentrés (sur substrat de silice) d'autres virus dont nous disposons en très petites quantités : CaMV (Cauliflower Mosaic Virus — mosaïque du chou-fleur, $D = 50 \text{ nm}$ [147]), TMV (Tobacco Mosaic Virus — mosaïque du tabac, virus de forme cylindrique, $D=18 \text{ nm}$ et $L=300 \text{ nm}$ [56]) et TYMV (Turnip Yellow Mosaic Virus — mosaïque du navet, $D = 28 \text{ nm}$ [148]). Le dépôt de CaMV donne un pic à environ 22 GHz , celui de TMV à 19.5 GHz et celui de TYMV à 19.7 GHz .

Par ailleurs nous avons mené une expérience de diffusion de lumière sur un film de protéine, la BSA (Bovin Serum Albumin) de $1 \mu\text{m}$ d'épaisseur, préparé par PLD

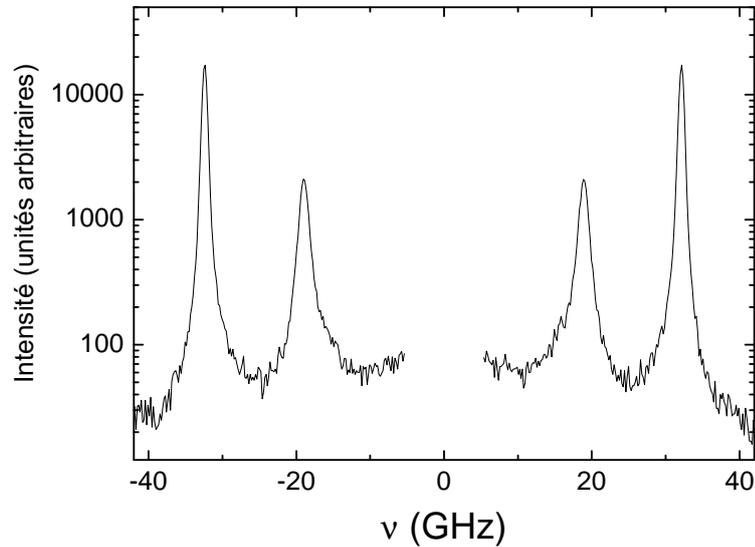


FIGURE 4.16 – Spectre Brillouin d’un dépôt de TBSV sur une lame de silice en rétrodiffusion à $\lambda = 532 \text{ nm}$. A $\nu \sim 19.0 \text{ GHz}$, pic du dépôt de virus; à $\nu \sim 32.5 \text{ GHz}$, pic du substrat.

(Pulsed Laser Deposition) [149] sur un substrat de silice. Le spectre Brillouin du film est représenté sur la figure 4.17. Le spectre du film de protéine présente des similitudes troublantes avec le spectre du dépôt de TBSV (figure 4.16). Ceci ajouté au fait que la position des pics de virus se trouvent dans un domaine de fréquence comparable (en gros entre 19 et 23 GHz), indépendamment de la taille des virus et de leur forme indique sans aucun doute que les modes observés sont des modes acoustiques se propageant dans le film ou le dépôt de virus.

Conclusions

Si l’étude approfondie des couches de virus n’a pas permis de détecter ce qui était recherché, à savoir un mode de virus localisé, il faut néanmoins en rappeler certains résultats intéressants.

Le premier résultat concerne l’AFM : c’est la première fois (à notre connaissance) que cette technique est appliquée à l’observation de réseaux bidimensionnels de virus en phase « sèche ». Les observations AFM ont permis de caractériser les réseaux de virus et d’en apprécier la durabilité.

La fréquence des modes acoustiques observés, bien que dépendant grandement de l’état du réseau de virus ou du dépôt, semble tout de même être liée au virus considéré : pour le BMV, la vitesse longitudinale dans la couche est estimée à $3800 \pm 300 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ et pour le TBSV à $3300 \pm 300 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, impliquant une différence dans les paramètres élastiques des couches de virus.

Enfin il faut de retenir la capacité de l’interféromètre Fabry-Pérot à mesurer des

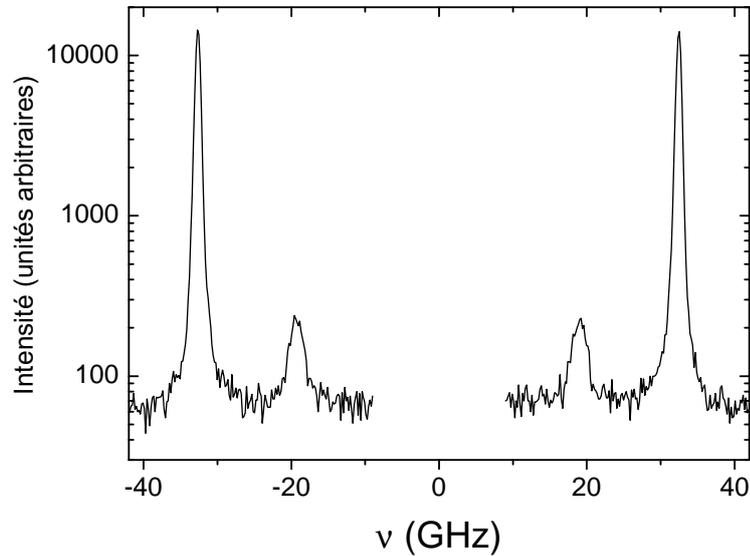


FIGURE 4.17 – Spectre Brillouin d’un film de protéine (BSA) en rétrodiffusion à $\lambda = 532 \text{ nm}$. A $\nu \sim 19.2 \text{ GHz}$, pic du film de protéine ; à $\nu \sim 32.5 \text{ GHz}$, pic du substrat.

signaux inélastiques d’échantillons minces : d’après les images AFM, l’épaisseur des échantillons est inférieure au μm . Il est cependant nécessaire de mesurer avec précision l’épaisseur de ces couches (par ellipsométrie par exemple). Il reste que le seuil de détection apparemment très bas pourrait mener à des applications intéressantes comme l’étude des biofilms [150].

4.6 Cristaux de virus

L’intérêt principal des cristaux réside pour nous dans le fait que ce sont les échantillons les plus concentrés qu’il soit possible d’obtenir.

Pour obtenir des cristaux de virus (ou de protéines), il faut se placer dans des conditions où la résultante des interactions entre particules virales est attractive, ce qui n’est pas le cas dans les conditions physiologiques de pH et de force ionique. Ces conditions sont atteintes pour un certain pH et des concentrations en virus et en précipitant spécifiques à chaque virus et bien qu’un grand nombre de virus aient été cristallisés, aucune recette universelle n’a été trouvée.

4.6.1 Elaboration des cristaux

Sous la direction de Patrice Guet (IBCP, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon) nous avons fait croître des cristaux de STMV par la méthode de la goutte suspendue.

D’un point de vue thermodynamique, la cristallisation est le processus par lequel

une solution sursaturée métastable atteint une énergie libre minimale par diminution de la concentration en protéine ou en virus.

Le facteur déterminant est la solubilité de la macromolécule (protéine ou virus) que l'on cherche à cristalliser. La solubilité dépend de nombreux paramètres tels que la concentration de la macromolécule, le pH, la force ionique, la température etc... Les méthodes de cristallisation reposent toutes sur le principe qui consiste à faire diminuer la solubilité de la macromolécule jusqu'à atteindre un état de sursaturation propice à l'obtention de cristaux, tout en évitant de faire précipiter la macromolécule (figure 4.18).

La méthode que nous avons utilisée pour cristalliser le STMV est la méthode de la goutte suspendue (figure 4.18). Dans une enceinte close (puits de cristallisation), un équilibre s'établit par diffusion de vapeur entre la goutte contenant le virus et l'agent précipitant et un réservoir contenant uniquement l'agent précipitant. Le processus de diffusion des espèces volatiles (molécules d'eau et agent cristallisant) concentre l'agent cristallisant et le virus dans la goutte, ce qui diminue la solubilité du virus et si les conditions sont favorables provoque la nucléation de germes puis la croissance cristalline proprement dite. La cinétique de la diffusion dépend non seulement de la différence entre les concentrations de la goutte et celles du réservoir mais également de la géométrie du système, du volume de la goutte et de la distance séparant la goutte du réservoir.

Les conditions de cristallisation du STMV sont très bien connues [51]. L'agent de cristallisation utilisé est une solution de sulfate d'ammonium diluée à 20% dans une solution avec un tampon Tris HCl. La solution-mère de STMV est une solution à la concentration $8.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, le tampon utilisé étant du sulfate de sodium à 0.025 M (pH 6.8).

On pipette dans le puits (de 20 mm diamètre et 20 mm de profondeur) un volume de 700 μl de solution de sulfate d'ammonium. On dépose ensuite sur une lamelle de verre rendue hydrophobe (diamètre 22 mm) 3.5 μl de solution de virus et 3.5 μl de solution de sulfate d'ammonium. La lamelle est alors retournée sur le puits et scellée avec de la graisse (figure 4.18). Le processus est répété pour tous les puits d'une plaque de cristallisation ce qui représente une douzaine de puits. Le kit de cristallisation est stocké à 17°C et au bout d'une dizaine de jours on obtient des cristaux d'aspect allongé dont la taille atteint au maximum (dans notre cas) quelques centaines de microns.

Afin de pouvoir être utilisé pour les expériences de diffraction des rayons X ou de diffusion inélastique de lumière, un cristal doit être transféré dans un capillaire (figure 4.19). Malgré la robustesse des cristaux de STMV le transfert constitue une opération assez délicate que nous décrivons ici brièvement. Dans une goutte il y a en général plusieurs microcristaux de taille suffisante. Un de ces cristaux est « pêché » à l'aide d'une boucle en nylon pour être transféré dans une cupule avec une goutte de solution prélevée dans le réservoir. Un peu de cette solution est aspirée dans un capillaire de 0.5 mm de diamètre. Son rôle est de garantir la bonne hydratation du cristal une fois le capillaire scellé. Le cristal est ensuite aspiré dans le capillaire et l'excédent de liquide autour du cristal est enlevé à l'aide de capillaires de plus petit

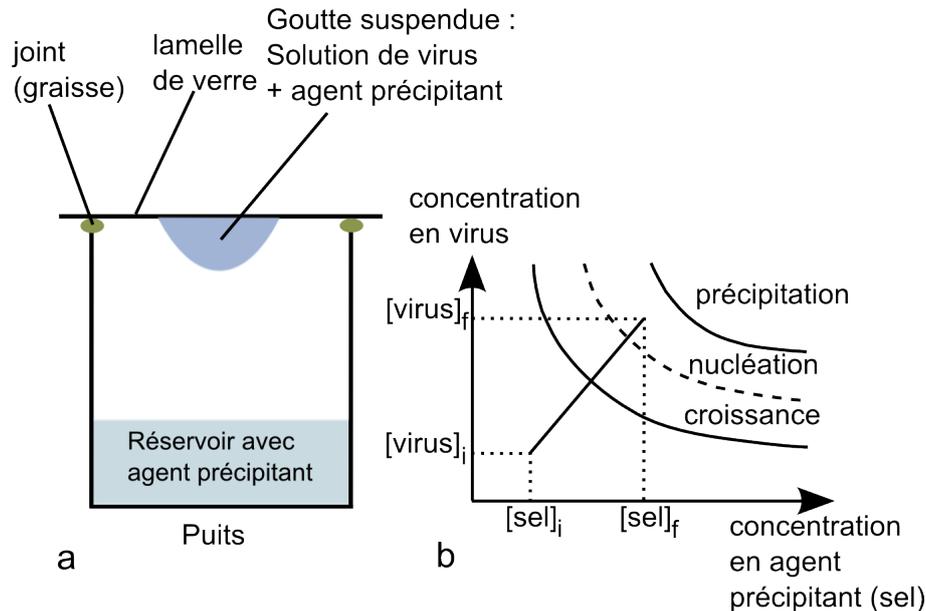


FIGURE 4.18 – (a) Puits de cristallisation. (b) Diagramme de phase d'un virus ou d'une protéine. Le trait représente l'évolution du système dans le puits de cristallisation.

diamètre (0.3 ou 0.1 *mm*). Enfin, les extrémités du capillaire sont scellées avec de la cire. Le capillaire constitue ainsi un milieu clos dans lequel le cristal peut être conservé pour une période assez longue.

Pour obtenir un cristal « sec », il suffit d'ouvrir le capillaire à une extrémité et attendre quelques jours. Le cristal ainsi obtenu est complètement débarrassé du solvant qui l'entoure ; il est cependant toujours hydraté (bien que dans une moindre mesure) ne serait-ce qu'à cause de la présence de molécules d'eau faisant partie intégrante du cristal de virus (molécules d'eau observables par diffraction des rayons X [50]). Il est ensuite possible en étant extrêmement précautionneux de coller le cristal « sec » sur une pointe très fine (voir figure 4.19).

Pour certaines expériences Brillouin (à 90°) il est nécessaire de contrôler un tant soit peu l'orientation de l'échantillon. Nous avons donc préparé d'autres types d'échantillons dans lesquels les cristaux sont pris en sandwich entre deux lamelles de verres. Une feuille plastique très fine dans laquelle une petite fenêtre a été découpée joue le rôle d'espaceur (voir figure 4.19). Il suffit alors de déposer une goutte de solution contenant un cristal et de coller les lamelles de verres à la feuille plastique.

Remarque : nous avons également tenté de faire croître des cristaux de TYMV (mosaïque du navet) et de TMV (mosaïque du tabac) mais sans succès pour l'instant.

4.6.2 Caractérisation des cristaux

Diffraction des rayons X Les expériences de diffraction des rayons X ont été effectuées par Patrice Guet.

Les cristaux de STMV observés par diffraction des rayons X diffractent avec une

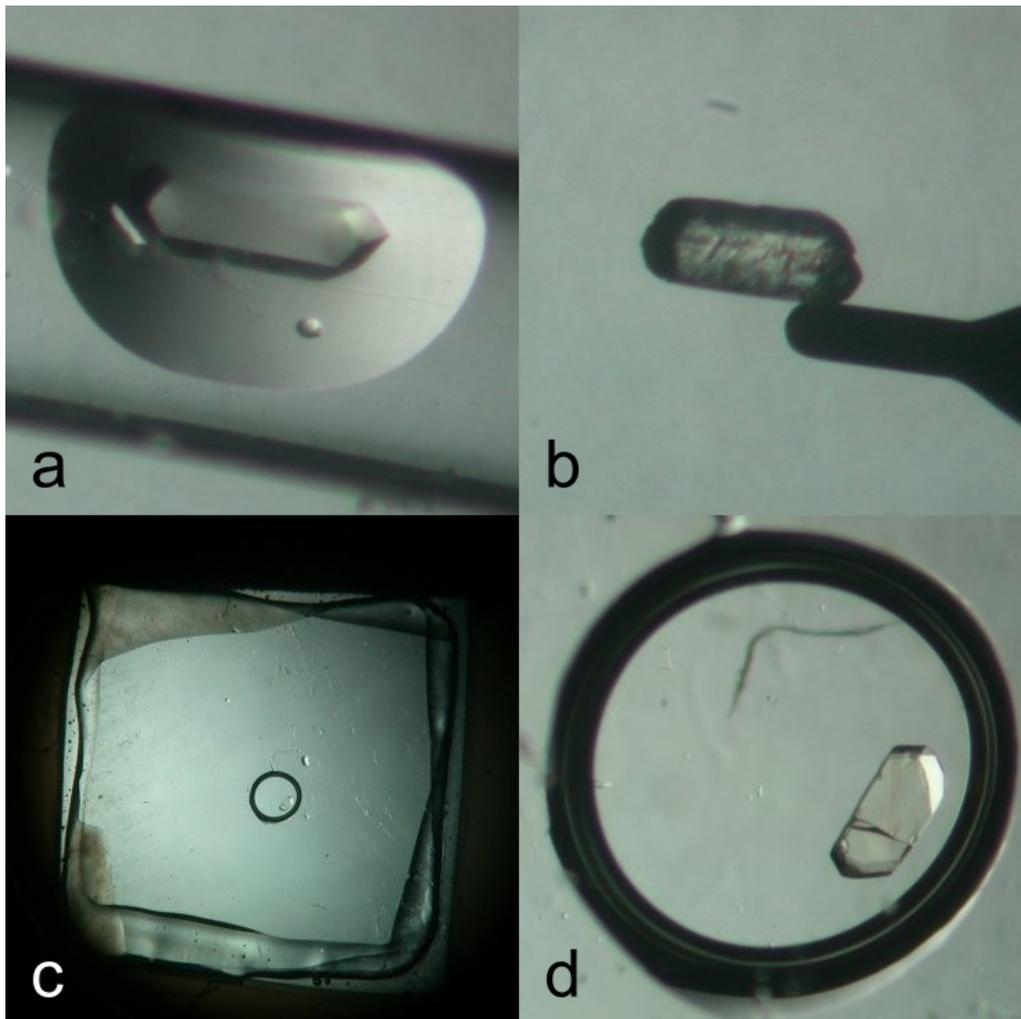


FIGURE 4.19 – Cristaux de virus (STMV) dans un capillaire (a) ou collé sur une pointe (b). En (c) et (d) on peut voir à petit et plus fort grandissement un cristal entre deux lamelles de verre. Les cristaux font entre 200 et 300 μm de long.

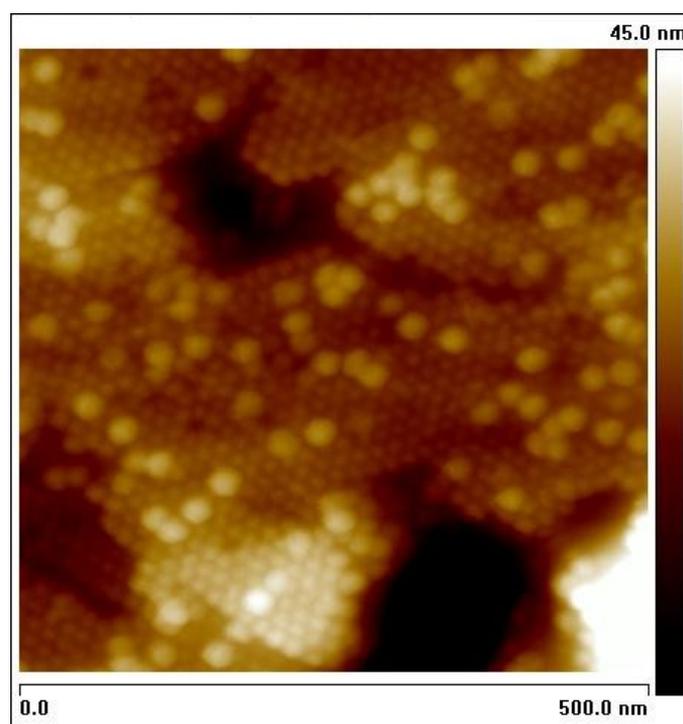


FIGURE 4.20 – Observation par AFM d'un cristal de STMV sec.

bonne résolution (jusqu'à 2 Å) ce qui est la marque d'une bonne qualité cristalline. Les clichés de diffraction permettent également de vérifier que les cristaux de STMV sont orthorhombiques (groupe d'espace $I222$) avec des paramètres de maille quasiment identiques à ceux de la référence [50] : $a = 174$ Å, $b = 191$ Å et $c = 201$ Å.

Les cristaux de STMV une fois séchés diffractent encore avec des paramètres de maille voisins de ceux du cristal hydraté (à ± 2 Å). Cela traduit la grande robustesse des cristaux de STMV, ce que nous avons pu également vérifier par AFM (figure 4.20).

Les cristaux de lysozyme au groupe d'espace $P4_32_12$ et les expériences de DRX donnent comme paramètres de maille : $a = 79$ Å, $b = 79$ Å et $c = 38$ Å. Contrairement aux cristaux de STMV, les cristaux de lysozyme sont très fragiles.

AFM Les observations par AFM ont été faites uniquement sur des cristaux « secs » (l'appareil utilisé n'est pas équipé pour les mesures en phase liquide). Ces mesures ont permis de confirmer les résultats de la diffraction des rayons X sur la durabilité et la robustesse des cristaux de STMV. Sur la figure 4.20 on peut voir les résultats d'une observation par AFM sur un cristal « sec » plus de deux mois après son exposition à l'air libre. Si la surface du cristal présente de nombreux défauts (craquelures, globules semblant résulter de la dégradation des virus etc...), l'allure générale du cristal reste bonne et l'ordre cristallin respecté.

4.6.3 Expériences de diffusion de lumière

Conditions expérimentales

On utilise la radiation à 532 nm du laser Nd-YAG. La puissance laser sur l'échantillon est limitée à 10 mW et on vérifie l'innocuité du rayonnement laser sur l'échantillon par des mesures de diffraction des rayons X avant et après les mesures Brillouin. Des spectres polarisés et dépolarisés sont effectués et plusieurs géométries sont utilisées : rétrodiffusion, 90°R et 90°A (cf. B).

Les échantillons étudiés sont sous différentes formes : pour les expériences en rétrodiffusion dans des capillaires, et pour les autres géométries entre des lamelles de verre.

Estimation de n , v_L et E dans les cristaux de STMV

Un spectre Brillouin caractéristique du cristal de STMV hydraté est représenté sur la figure 4.21. C'est un spectre à deux composantes : la première composante est une bande étroite à $\nu = 8.00 \pm 0.05\text{ GHz}$ ⁵ que l'on peut immédiatement attribuer à la solution tampon dans laquelle le cristal de virus baigne (liquide « intra- » et « extra-cristallin ») en comparant ce spectre à un spectre de la solution seule ; la deuxième bande à $\nu = 11.2 \pm 0.2\text{ GHz}$ est plus large et correspond au signal du virus. Le volume diffusant étant relativement grand (de l'ordre de 1 mm^3), il est difficile d'éliminer le signal de l'eau (en plus du fait que l'eau intracristalline donne également du signal). Les largeurs à mi-hauteur Γ de ces bandes peuvent être déduites d'ajustements (ou *fits*) des courbes expérimentales par des lorentziennes. Elles sont respectivement égales à $1.33 \pm 0.07\text{ GHz}$ et $2.69 \pm 0.06\text{ GHz}$. L'étude de l'influence de la polarisation sur l'intensité de ces bandes montre qu'elles sont polarisées. La position de ces bandes dépend de plus fortement de la géométrie de diffusion, donc du vecteur d'onde transféré \vec{q} . Ces caractéristiques impliquent que les deux bandes observées correspondent à la lumière diffusée par des modes acoustiques longitudinaux propagatifs. Il est donc possible d'estimer la vitesse longitudinale du son dans un cristal de STMV à partir de la figure 4.21 et des données complémentaires des autres géométries. En effet, d'après B, en rétrodiffusion, la fréquence ν du mode acoustique est égale à

$$\nu = \frac{2nv_L}{\lambda}, \quad (4.1)$$

où n est l'indice de réfraction du cristal de virus, v_L est la vitesse longitudinale du son dans le cristal et λ est la longueur d'onde d'excitation. Pour déterminer la vitesse du son nous avons donc au préalable évalué l'indice de réfraction n par des mesures Brillouin dans différentes géométries. L'utilisation de trois géométries différentes (rétrodiffusion, 90°A et 90°R) permet de confronter entre elles les différentes mesures. Le résultat obtenu, $n = 1.55 \pm 0.03$, est comparable à ceux obtenus sur le cristal de lysozyme [151, 31, 33]. La vitesse du son obtenue à partir de cette valeur de l'indice de réfraction est égale à $1920 \pm 70\text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

5. les barres d'erreur « reflètent » la statistique que l'on peut établir à partir de nos nombreuses mesures.

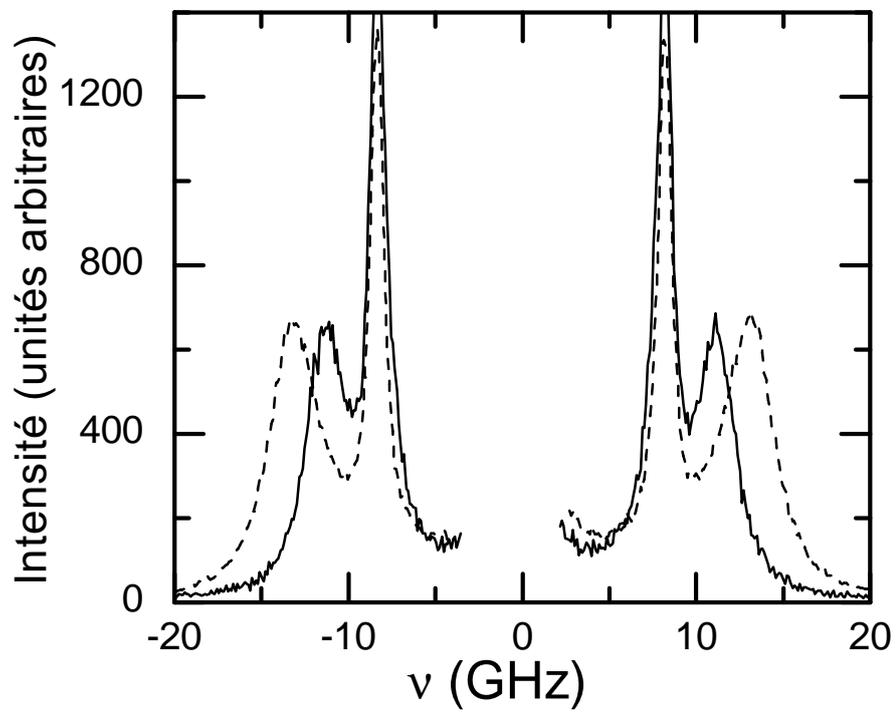


FIGURE 4.21 – Spectres Brillouin polarisés verticalement (VV) d'un cristal de STMV hydraté (traits pleins) et d'un cristal de lysozyme hydraté (pointillés).

Il est intéressant de comparer la vitesse du son obtenue pour le cristal de STMV aux données concernant le cristal de lysozyme hydraté. La vitesse du son dans le cristal de lysozyme déduite d'expériences avec des ultrasons (*pulse echo*) est égale à $1817 m \cdot s^{-1}$ [132, 152] et a constitué la référence pour les calculs de modes de virus en l'absence de données sur les virus. Des mesures Brillouin plus récentes sur un cristal de lysozyme donnent une valeur de la vitesse du son égale à $2200 m \cdot s^{-1}$ (en moyenne sur les directions (110) et (001)) qui est donc très différente de celle obtenue avec les ultrasons. Elle est aussi beaucoup plus élevée que celle donnée par des mesures de *microreed bending* (mesures statiques). D'après [33], cette différence serait imputable à une dépendance en fréquence de la vitesse du son.

La figure 4.21 permet de comparer le spectre Brillouin d'un cristal de STMV et celui d'un cristal de lysozyme effectués dans les mêmes conditions c'est-à-dire en rétrodiffusion et sur des cristaux hydratés dans leur solution tampon. Le spectre du cristal de lysozyme est aussi un spectre à deux composantes : la composante attribuée à la solution tampon (superposable à celle du spectre du cristal de STMV) et la composante provenant du cristal de lysozyme dont la position égale à $13 \pm 0.6 GHz$ dépasse d'environ 15% celle du pic Brillouin du cristal de STMV. Il ne fait donc aucun doute qu'on peut différencier un cristal de lysozyme d'un cristal de STMV. De plus, la détermination de la vitesse du son dans le cristal de lysozyme donne une vitesse de $2230 m \cdot s^{-1}$ qui est une valeur très proche de celle trouvée dans la référence [33].

Soit Λ , le paramètre d'atténuation acoustique normalisé égal à

$$\Lambda = \frac{\pi\Gamma}{\nu} \quad (4.2)$$

avec Γ la largeur à mi-hauteur. On remarque que Λ est proportionnel à l'inverse de Q , le facteur de qualité ($Q = \nu/\Gamma$ et $\Lambda = \pi/Q$). Pour le cristal de STMV Λ est égal à 0.76 ce qui est une valeur proche de celle trouvée pour le cristal de lysozyme hydraté [33]. Cela constitue une indication que l'atténuation des ondes acoustiques dans les cristaux organiques hydratés relève plus de l'eau d'hydratation des constituants du cristal que de la nature de ces constituants.

Le séchage du cristal de STMV provoque un déplacement très important (plus de 80%) du pic Brillouin du cristal. La position du pic Brillouin est égale à $\nu = 20 \pm 0.5 GHz$ et donne une vitesse longitudinale du son égale à $v_L = 3430 \pm 80 m \cdot s^{-1}$ ce qui correspond une fois de plus aux tendances observées pour le cristal de lysozyme [33]. La variation de la largeur du pic Brillouin du cristal « sec » par rapport au cristal hydraté n'est pas la même selon les échantillons observés : les valeurs de Λ s'échelonnent en effet entre des valeurs proches de celles du cristal hydraté et des valeurs proches de 0.3. Cette variabilité est probablement à relier à la qualité cristalline du cristal « sec » à l'échelle de la centaine de nanomètres qui dépend entre autres des conditions de séchage et de la qualité du cristal de départ. Cependant la qualité des cristaux « secs » reste bonne comme en attestent les expériences de diffraction des rayons X et les observations par AFM.

D'après les valeurs des vitesses du son que nous avons déterminées, il est possible d'estimer la valeur du module d'Young E moyennant un certain nombre d'hypo-

thèses. La première hypothèse est que l'anisotropie des paramètres élastiques du cristal est faible, la deuxième étant que la valeur du coefficient de Poisson σ est proche de celle de la matière molle [67, 133]. Enfin on prend pour valeur de la masse volumique ρ du cristal de STMV celle du cristal de lysozyme hydraté ($\rho = 1.2 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), et on obtient pour le module d'Young E une valeur égale à 3.3 GPa ce qui est en bonne adéquation avec des mesures directes de E sur des capsides d'autres virus (mesures d'« indentation » avec une pointe AFM [67]). Pour un cristal « sec », le module d'Young atteint la valeur relativement élevée d'environ 10 GPa .

Remarques Lors de ces expériences nous n'avons pas pu précisément sélectionner telle ou telle orientation cristallographique. Cependant, comme dans le cas du lysozyme, les effets de l'anisotropie des paramètres élastiques sur la vitesse du son sont peu importants et restent en deçà de 10%, ce que confirme la bonne reproductibilité de nos mesures sur des cristaux orientés différemment. Il reste qu'il pourrait être intéressant d'étudier l'effet de l'orientation sur la valeur de la vitesse du son, ce qui pourrait être envisageable à condition de pouvoir aligner le cristal sur une tête goniométrique en faisant préalablement aux expériences de diffusion de lumière une expérience de diffraction.

On remarque par ailleurs que si les règles de sélection interdisent d'observer les modes acoustiques transverses en rétrodiffusion, ces derniers devraient toutefois être visibles dans les autres géométries. La non-observation de ces modes fait qu'il est impossible de déterminer avec précision la vitesse transverse du son, qui est pourtant un paramètre important dans l'évaluation des fréquences de modes de virus. A partir de la valeur du coefficient de Poisson on peut cependant estimer la vitesse transverse du son puisque $v_T/v_L = \sqrt{\frac{1-2\nu}{2-2\nu}}$.

On peut aussi légitimement s'interroger sur la signification de la vitesse du son dans le cristal hydraté de virus. Il faut probablement voir la vitesse du son dans le cristal hydraté comme une sorte de moyenne pondérée des vitesses du son dans le liquide, dans la coque protéique et dans le matériel génétique du virus. Quant au cristal de virus « sec », il convient de nuancer cette appellation puisque même complètement déshydraté, un cristal contient encore un certain nombre de molécules d'eau (première et deuxième couches d'eau de solvatation), étant entendu qu'il ne s'agit pas de molécules d'eau libres.

Recherche de modes propres de vibrations de virus

Les résultats de la recherche des modes propres de vibration dans un domaine de fréquence compatible avec les résultats des calculs théoriques (tableau 4.2) sont présentés sur les figures 4.22 (cristal hydraté dans un capillaire) et 4.23 (cristal sec collé sur une pointe fine). Ces spectres sont les résultats de plusieurs mesures faites pour différents espacements des cavités Fabry-Pérot (13.9 mm , 2.3 mm , 1.15 mm pour le cristal hydraté et 6.9 mm , 1.38 mm pour le cristal sec) correspondant à différents intervalles spectraux libres couvrant un domaine de fréquence compris entre 1 GHz et plus de 100 GHz .

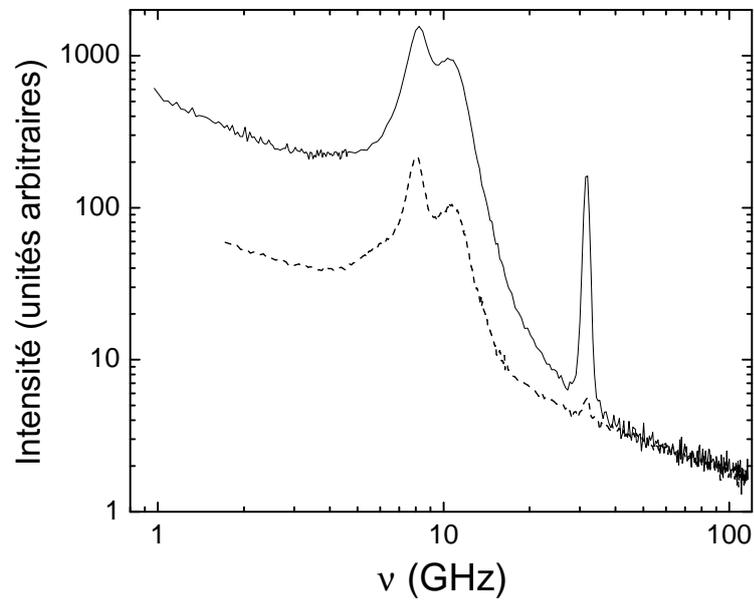


FIGURE 4.22 – Spectres polarisé (trait plein) et dépolarisé (pointillés) d'un cristal de STMV hydraté (côté anti-Stokes uniquement). Le pic à 30 GHz est le signal du capillaire contenant le cristal.

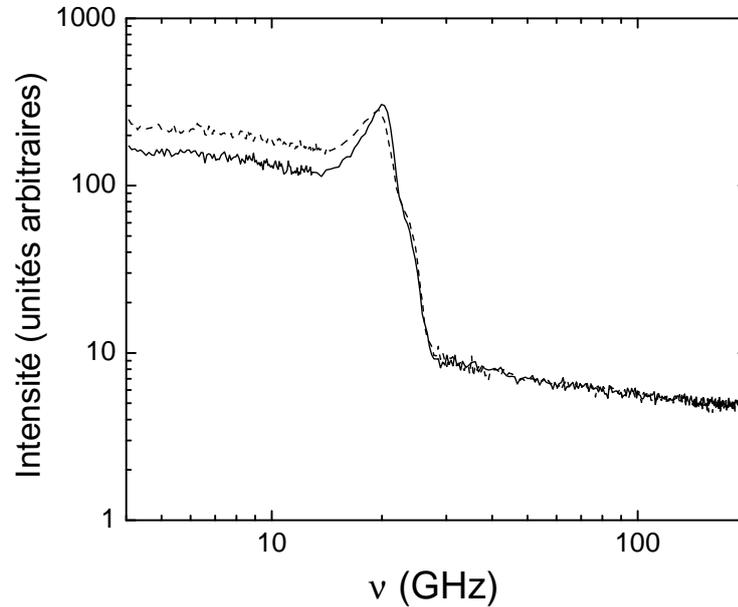


FIGURE 4.23 – Spectres polarisé (trait plein) et dépolarisé (pointillés) d'un cristal de STMV sec (côté anti-Stokes).

Pour le cristal de STMV hydraté (figure 4.22), on observe en plus des pics de la figure 4.21 un pic étroit et très polarisé à $\nu \sim 30 \text{ GHz}$ correspondant au signal du capillaire (silice) contenant le cristal. Sur le spectre dépolarisé le pic du capillaire disparaît quasiment complètement. Cependant, dans l'un comme l'autre cas, on n'observe pas de composante supplémentaire.

Pour le cristal de STMV sec, qui constitue pourtant un échantillon *a priori* idéal pour la recherche de modes de vibration particulières de virus (voir discussion plus bas), on n'observe pas non plus de signal supplémentaire de manière évidente. En plus du déplacement du pic Brillouin du cristal, il existe cependant quelques différences entre les deux spectres qui méritent d'être mentionnées. Premièrement, on peut voir un épaulement sur le pic du cristal sec de virus à $\nu \sim 24 \text{ GHz}$. Ce signal très peu intense qu'on ne peut séparer du pic du cristal (même sur le spectre dépolarisé) peut éventuellement être attribué à la trace d'un mode quadrupolaire (si le rapport v_T/v_L est inférieur à 0.25). La deuxième chose que l'on peut remarquer est la très large « bande » quasiment plate en-dessous de 10 GHz dont la présence est difficile à expliquer : on peut cependant l'associer aux molécules d'eau non mobiles appartenant aux couches de solvatation du virus. Enfin, la dernière chose que l'on peut signaler est le fait que le pic du cristal de STMV sec, contrairement au pic du cristal hydraté n'a pas un caractère très polarisé. Cela est probablement à relier à l'inhomogénéité du cristal comme en témoigne son aspect opalescent (et donc fortement diffusant).

Discussion Comme mentionné plus haut (voir 4.3), on s'attend à ce que les modes de vibration de virus soient très rapidement amortis, du moins dans l'eau, à cause de la presque égalité entre l'impédance acoustique de l'eau et celle des virus [44, 46], ajoutée au fait que la capsid virale soit relativement perméable à l'eau [13] et aussi à cause des effets de la viscosité [37]. En revanche, en plus du fait que les cristaux de virus constituent les échantillons les plus concentrés en virus qu'il soit possible d'obtenir, les cristaux secs de virus présentent l'avantage d'être quasiment complètement dépourvus d'eau « mobile » certainement responsable en grande partie du phénomène d'amortissement. A ce titre ce sont des candidats idéaux à la détection des modes de vibration de virus.

Pour expliquer le fait qu'on n'observe pas (sans ambiguïté en tout cas) de modes de vibration de STMV, alors qu'ils sont couramment détectés dans d'autres types de nanoparticules, plusieurs raisons peuvent être invoquées.

La première explication est aussi l'explication la plus simple : les modes de virus (en tout cas les modes du STMV) n'existent pas. Cela tiendrait à la structure du virus qui, bien que très compacte pour une entité biologique (comme cela a pu être mis en évidence par les mesures AFM), ne l'est pas suffisamment pour que des mouvements cohérents puissent exister à l'échelle de tout le virus. Cela peut provenir de la faiblesse des interactions (de type hydrophobe, liaison hydrogène ou Van der Waals) même nombreuses entre constituants de la capsid protéique comparées aux liaisons covalentes (dans des nanobilles de silice par exemple) ou du fait que le matériel génétique contenu dans la capsid n'est pas suffisamment symétrique. Cette interprétation rejoint celle de Freddolino *et al.* [13] qui dans leur étude du STMV entier par dynamique moléculaire montrent qu'il n'y pas de mouvements cohérents à l'échelle du virus tout entier (si ce n'est le long d'une sorte de bande équatoriale du virus). Les conclusions de Freddolino *et al.* sont cependant en contradiction avec les travaux par NMA (analyse des modes normaux [7, 47, 6]) qui montrent l'existence de modes normaux pour de nombreux virus. Mais précisons que ces travaux ne prennent en compte que la capsid des virus et pas le matériel génétique à l'intérieur. De plus, il n'existe pas à notre connaissance de travaux de NMA concernant le STMV.

La deuxième explication serait que même dans les cristaux secs les modes de virus sont amortis du fait de la présence des molécules d'eau liées au virus (première et deuxième couches de solvatation). Mais cela semble peu probable si on considère l'effet du séchage sur les spectres à basse fréquence de protéines globulaires [153].

Une autre explication tiendrait au fait que le signal des virus est trop peu intense parce que les modes de virus ont une amplitude faible et induisent des fluctuations de polarisabilité trop faibles pour être détectées par diffusion inélastique de lumière. Rappelons qu'à ce jour nos tentatives d'exaltation du signal par différentes techniques (SERS et IUVS, voir 4.4) n'ont pas été fructueuses.

Enfin la dernière explication qu'on peut trouver à la non-observation des modes de virus est que la technique utilisée ou plutôt la longueur d'onde utilisée n'est pas adaptée à la taille des objets observés, et ce point sera abordé dans la dernière partie de cet exposé.

4.7 Retour sur les solutions de virus : le cas de PBCV-1

Cette partie traite des dernières expériences en date sur les solutions de PBCV-1 (voir 4.1.1). Pourquoi se consacrer à nouveau à l'étude de solution de virus ? La première raison en est que PBCV-1 est un très gros virus ($D = 190 \text{ nm}$, soit plus de 10 fois la taille du STMV) et ces expériences permettent donc de discuter de l'importance du paramètre qD , le produit du vecteur d'onde transféré dans l'échantillon lors d'une expérience de diffusion de lumière par le diamètre du virus. L'examen des valeurs de qD pour différents virus (tableau 4.2) montre en effet qu'avec PBCV-1 on se trouve dans un cas favorable vis-à-vis de la condition $qD > \pi$. La deuxième raison tient au fait qu'il est possible d'obtenir des solutions très concentrées ($\sim 50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) de ce virus.

La solution-mère de PBCV-1 à la concentration $C = 50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a un aspect laiteux. Cet aspect est dû à la diffusion (élastique) par les particules virales de diamètre $D = 190 \text{ nm}$.

Sur la figure 4.24 est représenté un spectre Brillouin polarisé de la solution de PBCV-1 diluée 20 fois dans sa solution tampon (tampon Tris à pH 7.8). Dans ce cas la fraction volumique en PBCV-1 est de l'ordre de 0.6%. A première vue on observe un spectre à une seule composante dont la nature fait peu de doute : il s'agit du pic de la solution de virus. Ce pic présente cependant une forme inhabituelle et la très longue acquisition d'un spectre dépolarisé révèle la présence d'un deuxième signal dans le pied basse énergie du premier (figure 4.24). Cette deuxième composante très peu intense et beaucoup plus large que la première est dépolarisée ce qui explique qu'elle soit décelable uniquement dans cette configuration.

Quelle est la nature de ce signal : mode acoustique propagatif ou mode de vibration d'ensemble du virus ? Plusieurs choses plaident en faveur de la deuxième réponse :

- le caractère dépolarisé du signal ;
- le fait que si l'on dilue encore plus la solution de PBCV-1, la contribution de cette deuxième bande diminue ;
- les résultats du calcul des modes qui prédisent pour le pic du mode quadrupolaire de PBCV-1 une position proche de celle de ce pic (voir tableau 4.2).

A l'inverse si cette deuxième bande est relative à un mode propagatif, il est difficile de comprendre à quel type de mode propagatif elle correspond. En effet, le caractère dépolarisé de cette bande suggère qu'il s'agit d'un mode transverse. Or de tels modes ne peuvent se propager dans un liquide et malgré la forte concentration en virus, la solution étudiée conserve les caractéristiques d'un liquide. De plus, le rapport ν_T/ν_L serait égal à environ 0.8 ce qui correspondrait à un coefficient de Poisson négatif (cas des matériaux auxétiques [154] comme certaines mousses de polymères).

Pour pouvoir répondre sans ambiguïté à la question de la nature de ce signal, il est nécessaire d'entreprendre une étude de la relation de dispersion. Cette étude est actuellement en cours et la figure 4.25 en résume les résultats qui doivent être considérés comme des résultats préliminaires et partiels mais néanmoins intéressants. Pour faire varier le paramètre qD nous avons soit fait varier la longueur d'onde

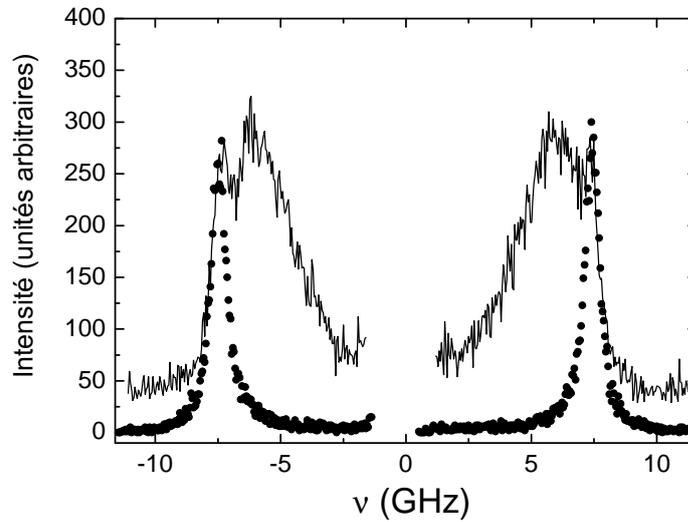


FIGURE 4.24 – Spectres polarisé (●) et dépolarisé (trait plein) d'une solution de PBCV-1 diluée 20 fois. Le spectre dépolarisé est le résultat d'une acquisition très longue (plus de 12 h) ; le spectre polarisé a été pris en moins de 2 minutes.

d'excitation soit la géométrie de l'expérience. Sur la figure 4.25 sont représentés trois spectres de la solution de PBCV-1 correspondant à trois (sur les quatre étudiées) valeurs différentes du paramètre qD . Les positions des différents pics déduites des ajustements par des lorentziennes sont reportés en fonction de la valeur du paramètre qD sur le graphique du bas de la figure 4.25. La variation linéaire de la position du pic de la solution confirme le caractère acoustique du mode. Les points correspondants sont sur une droite passant par l'origine et dont la pente est égale à la vitesse de propagation du mode. A l'inverse la position de la deuxième composante varie peu avec la valeur de qD . Le fait que la dispersion de ce mode dans l'espace des q soit quasiment horizontale suggère que nous observons un mode de vibration localisé dans l'espace réel associé à chaque particule virale.

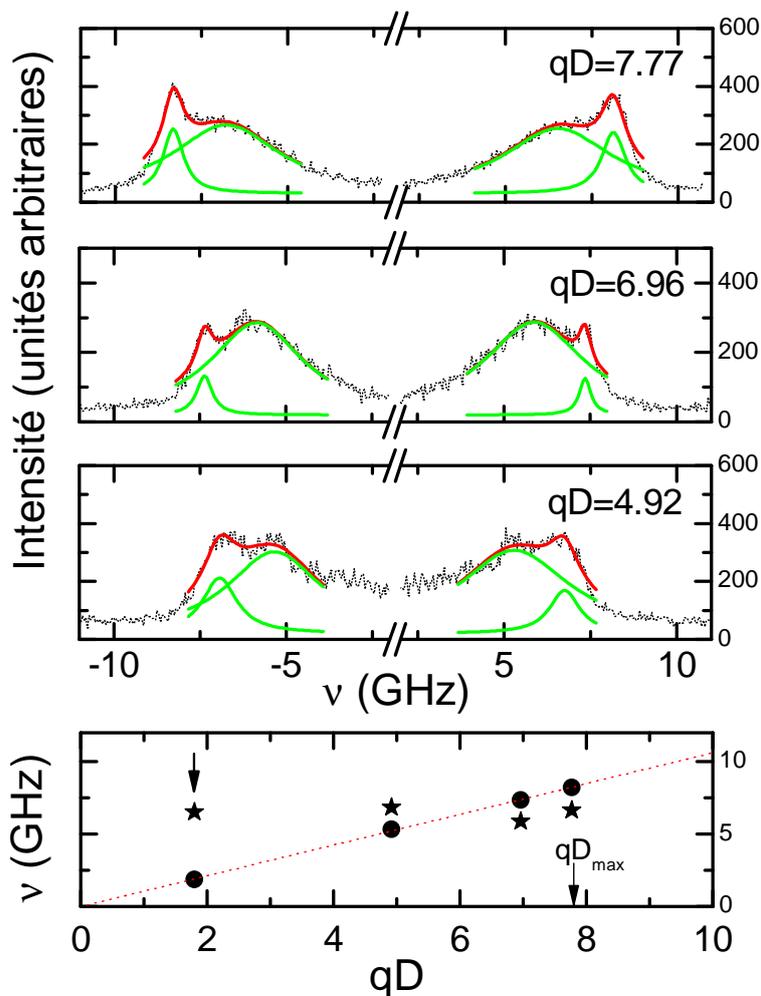


FIGURE 4.25 – En haut : spectres Brillouin dépolarisés de la solution de PBCV-1 diluée 20 fois pour différentes valeurs de qD avec leurs ajustements à deux lorentziennes. En bas sont représentés les points correspondants dans la relation de dispersion. (●) : signal de la solution; (★) : signal du virus. La droite passant par l'origine (pointillés) est le meilleur fit des (●). La première flèche pointe sur un point de la courbe qui est litigieux du fait de la mauvaise statistique du spectre correspondant : sa position demande à être confirmée par des mesures supplémentaires. L'autre flèche indique la valeur maximale de qD accessible au laboratoire. La taille des barres d'erreur est de l'ordre de la taille des symboles utilisés.

Conclusion et perspectives

Ce travail comprend deux volets. Le premier est relatif à l'étude désormais classique par diffusion de lumière des modes de vibration *a priori* bien connus de nanoparticules d'or en matrice vitreuse. Si la levée de dégénérescence engendrée par l'anisotropie des paramètres élastiques de l'or ne fait aucun doute, les effets liés à la morphologie facettée des nanoparticules métalliques semblent faire plus débat et nécessitent donc d'être mieux appréhendés. Nous avons d'ores et déjà entrepris l'étude de nanoparticules mixtes d'or/argent (verres de couleur ambre de la cristallerie Saint-Louis). La richesse des spectres enregistrés avec le tandem Fabry-Pérot sur ces systèmes semble déboucher sur des résultats nouveaux comme l'observation des harmoniques des modes de nanoparticules (jusqu'à l'ordre 8 !) et confirme la levée de dégénérescence du mode quadrupolaire (figure 4.26). La confrontation de ces résultats avec une caractérisation aussi approfondie que possible de la morphologie et de la qualité cristalline des nanoparticules permettra, nous l'espérons, de mieux comprendre le rôle joué par la forme des nanoparticules. Cet aspect pourra aussi être abordé à travers l'examen de nanoparticules aux formes très éloignées de la forme sphérique, telles que les nano-bâtonnets d'argent contenus dans des verres étirés à chaud et exploités commercialement pour leur fort taux de polarisation (figure 4.27). Des mesures exploratoires réalisées sur ce type d'échantillons au cours de ce travail de thèse n'ont pu être menées à terme faute de temps. Les spectres obtenus à ce moment-là ont néanmoins révélé la grande utilité du tandem Fabry-Pérot pour la poursuite de ces travaux.

Enfin, ces études sur des nanoparticules d'or et d'argent pourront être complétées par des travaux similaires sur des systèmes métalliques moins abordés, comme les nanoparticules de cuivre dont les propriétés de couplage avec les excitations plasmoniques sont plus complexes du fait du rôle accru des électrons liés (transitions inter-bandes) [110]. Les premiers essais réalisés sur des verres au cuivre de couleur rouge produits par la verrerie Saint Just⁶ semblent prometteurs.

Le deuxième volet de cette thèse concerne la recherche de modes de vibration de virus, analogues à ceux observés couramment sur les nanoparticules solides. Nous avons donc cherché ces modes sur un grand nombre d'échantillons différents et sous diverses formes : sous forme de solution, de réseaux bidimensionnels ou de cristaux tridimensionnels de virus. Ces recherches ont permis d'établir une première estimation des paramètres élastiques des virus grâce aux spectres Brillouin des cristaux

6. <http://www.saint-gobain-glass.com/saint-just/>

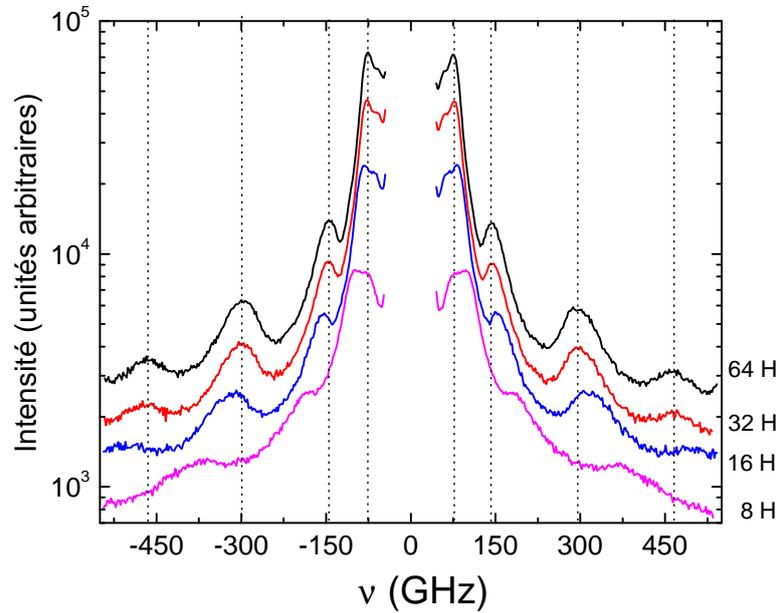


FIGURE 4.26 – Spectres Raman basse fréquence d'un verre Saint-Louis pour différentes durées de recuit à 490°C. Les lignes pointillées sont des guides.

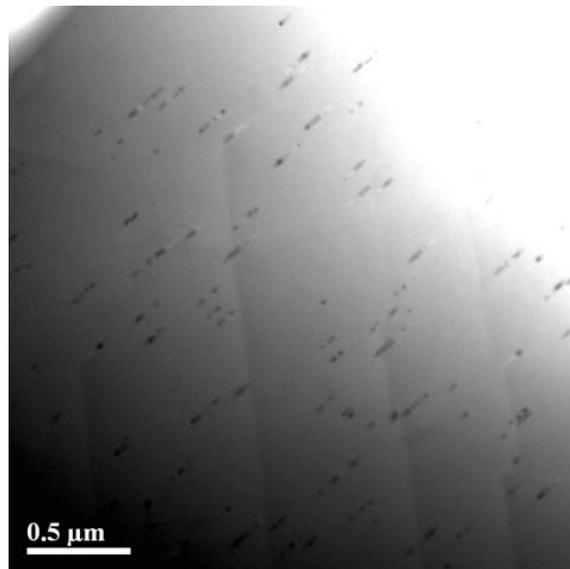


FIGURE 4.27 – Image par microscopie électronique en transmission de nano-bâtonnets d'argent (un échantillon de Polarcor 600, Corning).

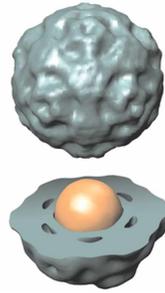


FIGURE 4.28 – Synthèse de réseaux tridimensionnels de nanoparticules d’or : I. Encapsulation des particules d’or fonctionnalisées dans le virus de la mosaïque du brome [1].

tridimensionnels de STMV.

En dépit des nombreux résultats infructueux, ces recherches menées sur les virus ont abouti à des résultats encourageants dans les tous derniers mois de ce travail, à travers l’étude du PBCV-1. Les perspectives immédiates de ces travaux vont consister à étayer nos premiers résultats afin de vérifier la nature « quasi-optique » du mode observé. Dans un premier temps, nous envisageons de changer la nature de la matrice liquide d’une part pour nous affranchir de l’aspect laiteux des solutions (défavorable pour les expériences Raman) et d’autre part pour jouer sur l’impédance acoustique qui contrôle l’amortissement (et donc l’observabilité) des modes de vibration des particules virales. A ces deux égards, le glycérol s’avère être une bonne solution car il constitue à la fois un bon liquide d’indice (suppression de l’aspect laiteux des suspensions de PBCV-1) et il possède une impédance acoustique susceptible d’améliorer le facteur de qualité des modes de virus [46]. Dans l’hypothèse où le signal observé sur le PBCV-1 est identifié comme un mode de nanoparticule, il conviendra d’observer la réponse de virus de tailles différentes mais néanmoins suffisamment grandes pour assurer des concentrations volumiques importantes et donc générer un signal Raman détectable. Pour les virus de plus petite taille ($D < 100 \text{ nm}$), la voie d’exaltation du signal par effet SERS mérite d’être plus amplement explorée. Dans cette perspective, l’étude des cristaux de nanoparticules d’or encapsulées dans des structures virales apparaît intéressante. Ces cristaux (figure 1) sont synthétisés en fonctionnalisant des nanoparticules d’or de manière à ce qu’elles puissent être « encapsidées » dans un phytovirus (figures 4.28). Les propriétés d’auto-assemblage des virus sont ensuite exploitées pour produire des supracristaux tridimensionnels (figure 4.29).

Ces systèmes présentent un triple avantage : celui de pouvoir étudier simultanément le signal propre aux capsides virales (susceptible d’être exalté par les cœurs d’or), le signal des nanoparticules métalliques et éventuellement les propriétés de couplage interparticule résultant de l’assemblage supracristallin. Ces échantillons représentent en quelque sorte la synthèse des différents thèmes abordés au cours de ce travail de thèse.

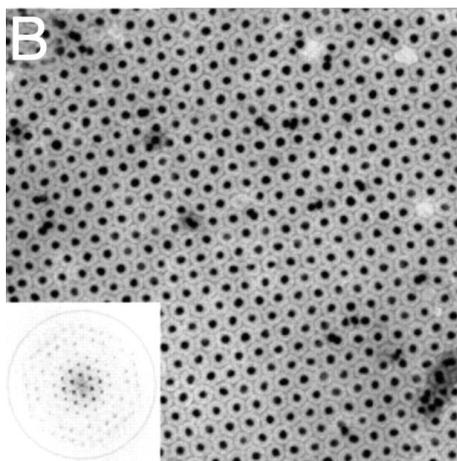


FIGURE 4.29 – Synthèse de réseaux tridimensionnels de nanoparticules d'or : II. par auto-organisation du virus de la mosaïque du brome [1].

Annexe A

Quasi-équivalence

Comment les virus élaborent-ils des capsides de plus grande taille que celle du STMV (virus satellite de la mosaïque du tabac, $D = 17\text{ nm}$) ? Utiliser des sous-unités protéiques plus grandes n'est pas la meilleure solution : l'augmentation en volume de la capside ne compense ni son épaissement ni l'augmentation en taille du génome qui doit coder pour des protéines de structure plus grandes.

Un moyen qui semble à première vue plus compliqué mais qui se révèle être finalement plus économique consiste à assembler plus de sous-unités. La figure A.1 montre comment construire à partir d'un réseau hexagonal plan un icosaèdre dont les 20 faces portent 60 unités asymétriques équivalentes, ce qui signifie que toutes ont exactement le même environnement, donc interagissent de la même manière entre elles. En 1962, Caspar et Klug [155] remarquèrent qu'il est possible de construire des polyèdres plus compliqués en transformant certains sommets d'ordre 6 du réseau hexagonal plan en sommets d'ordre 5 (figure A.1). Avec 12 sommets d'ordre 5 (comme les 12 sommets de l'icosaèdre) répartis de manière régulière, on obtient une surface fermée possédant la symétrie de l'icosaèdre. Pour caractériser ces polyèdres, Caspar et Klug introduisirent T , le *nombre de triangulation* qui correspond à la triangulation par des sous-unités d'un réseau à symétrie icosaédrique sur une sphère. La figure A.1 montre à deux dimensions la signification de T : l'icosaèdre $T = 1$ (a) est triangulé par un seul triangle de réseau élémentaire, tandis qu'il est aisé de voir que les icosaèdres $T = 3$ (b) et $T = 4$ (c) sont triangulés par respectivement trois et quatre triangles.

Le nombre T n'est pas quelconque, il est égal au carré de la distance entre deux sommets d'ordre 5 voisins, l'unité étant le côté de la maille hexagonale. $T = h^2 + hk + k^2$ avec h et k les coordonnées dans le réseau hexagonal du plus proche voisin d'ordre 5 par rapport au sommet pris comme origine. Les valeurs prises par T sont égales à 1, 3, 4, 7, 12, 13...

Prenons l'exemple de capsides $T = 1$ et $T = 3$. Le volume de la capside $T = 3$ est à-peu-près égal à huit fois et demie le volume de la capside $T = 1$. En multipliant par trois le nombre de sous-unités, qui rappelons-le sont identiques, le volume varie *grosso modo* comme 2^3 . Remarquons que certains virus $T = 3$ comme le virus de la Mosaïque du Brome (BMV, Brome Mosaic Virus) peuvent former dans certaines conditions des capsides $T = 1$ [66, 123].

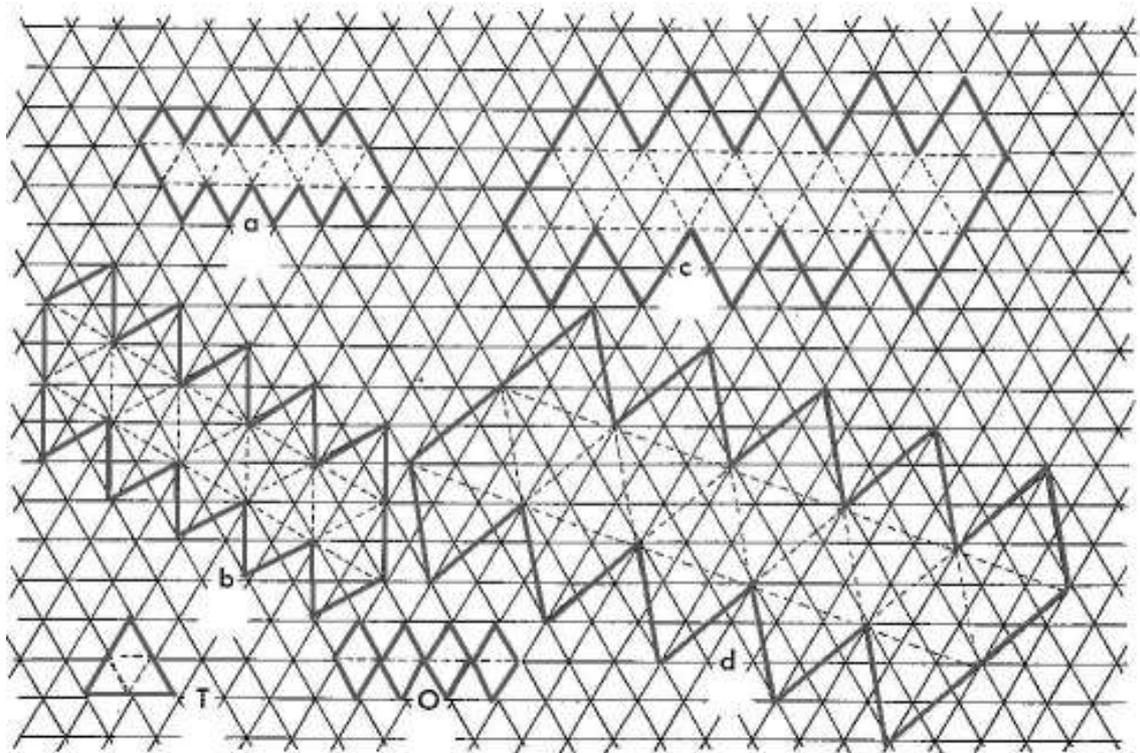


FIGURE A.1 – Construction par découpage d'un réseau hexagonal d'icosaèdres $T = 1$ (a), 3 (b), 4 (c) et 7 (d). Les découpages du tétraèdre (T) et de l'octaèdre (O) sont également indiqués (d'après [3]).

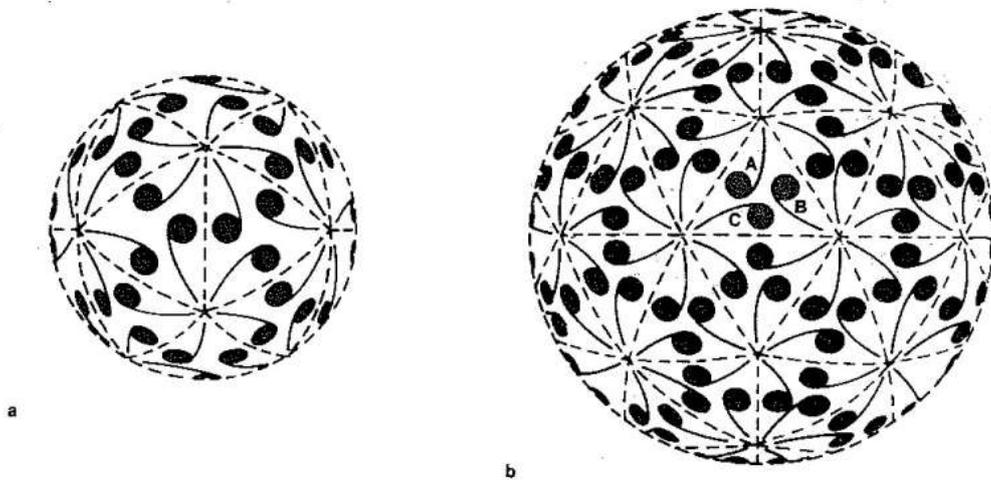


FIGURE A.2 – Arrangement des sous-unités asymétriques — schématisées par les virgules — sur des sphères de réseau icosaédrique $T = 1$ (a) et $T = 3$ (b) [18].

L'arrangement des sous-unités est illustré par la figure A.2 dans laquelle les sous-unités protéiques sont représentées par des virgules. Les 60 sous-unités de la capsid $T = 1$ sont toutes équivalentes. Les $60T = 180$ unités de la capsid $T = 3$ ne sont plus exactement équivalentes et se répartissent en trois catégories : A, B et C. Dans le cas des sous-unités de type A et B par exemple, il y a de petites différences de conformation dues au fait que les sous-unités A sont regroupées autour d'axe d'ordre 5 tandis que les sous-unités B interagissent localement autour d'axes d'ordre 6 (queues des sous-unités). Caspar et Klug [155] firent l'hypothèse que dans le cas de virus possédant plus de 60 sous-unités identiques chimiquement, ces sous-unités protéiques seraient suffisamment flexibles pour subir de légers changements de conformation permettant de s'adapter à ces petites différences d'environnement de contact entre sous-unités. Cette hypothèse constitue la théorie de la *quasi-équivalence*.

La capsid d'un grand nombre de virus est structurée selon le principe de quasi-équivalence [19] (figures 1.2, A.4 et A.5). Parmi ceux que nous avons étudiés, citons le BMV $T = 3$ [66, 123] déjà évoqué, mais aussi le virus du flétrissement du plant de tomate [121, 122] (TBSV, Tomato Bushy Stunt Virus) $T = 3$ et l'adénovirus $T = 25$.

Les figures A.4 et A.5 montrent que d'un virus à l'autre la morphologie de la capsid peut être très différente. Il est d'ailleurs souvent à première vue difficile de vérifier si une capsid possède la symétrie icosaédrique, même si un examen à plus haute résolution permet de le confirmer. La capsid semble faite de bosses et de creux plus ou moins nombreux, répartis de manière différente selon le virus. Ces bosses correspondent en fait à des parties de sous-unités proéminentes qui se regroupent autour d'axes locaux de symétrie. Ces unités morphologiques sont en nombre variable : si ce sont des dimères comme pour le TBSV [121, 122], il y en a $30T$, si ce sont des trimères, $20T$ et il y a $10(T - 1) + 12$ pentamères/hexamères pour le BMV [66, 123] par exemple (figure A.3).

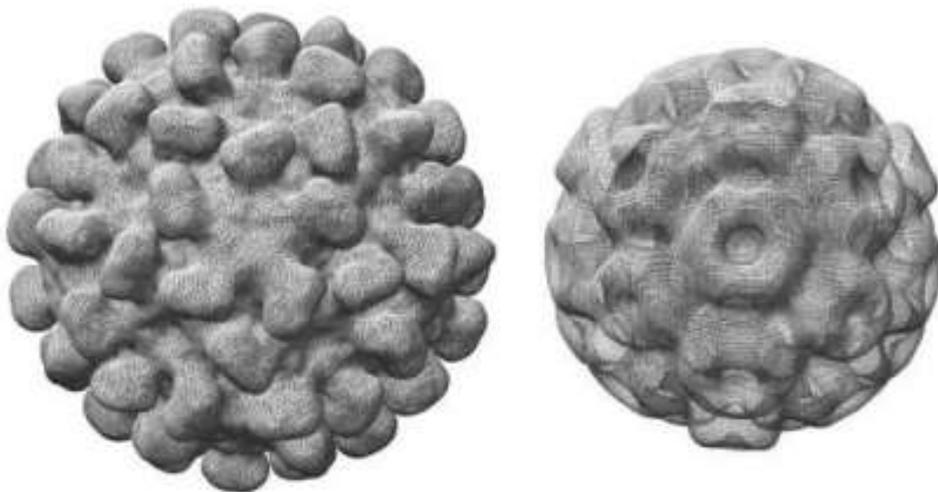


FIGURE A.3 – Agencement des unités morphologiques pour deux virus de $T = 3$, par dimères pour le TBSV (à gauche) et par pentamères/hexamères pour le BMV (à droite)[14].

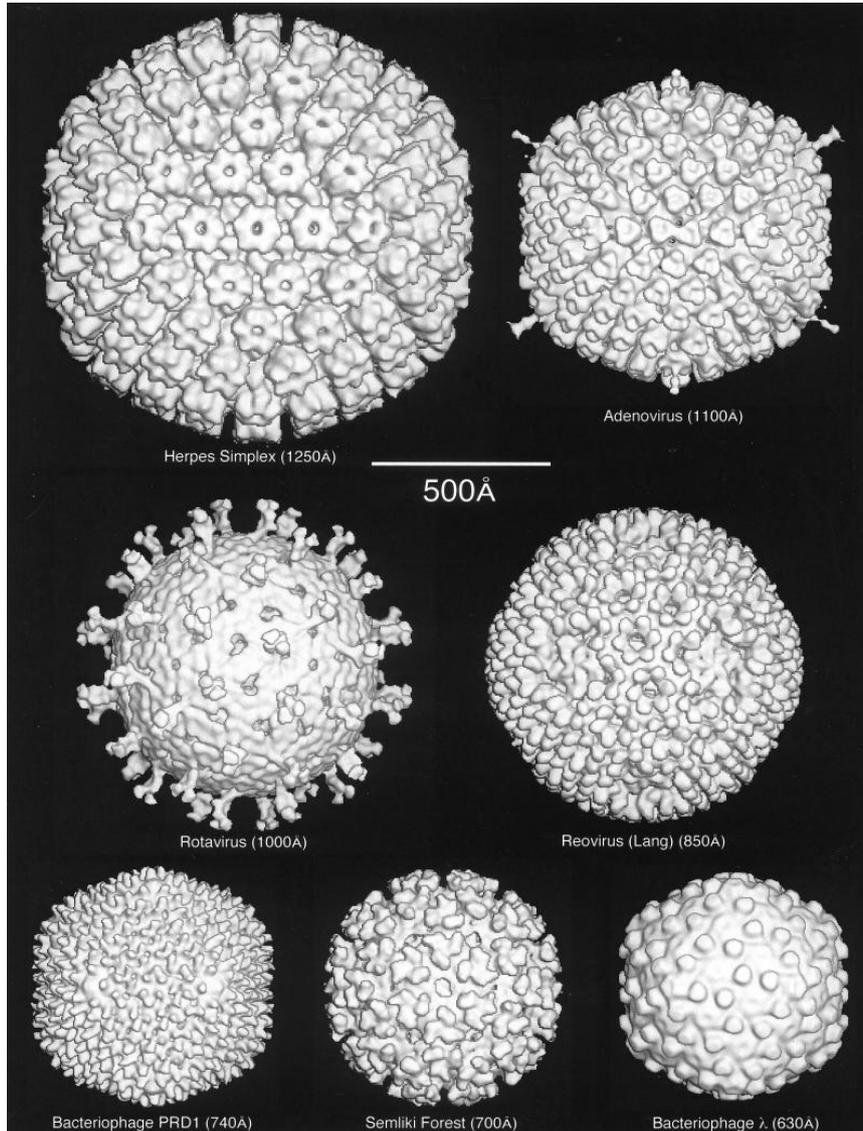


FIGURE A.4 – Exemples de virus isométriques (voir aussi planche suivante) : reconstructions tridimensionnelles à partir de clichés de cryomicroscopie électronique.

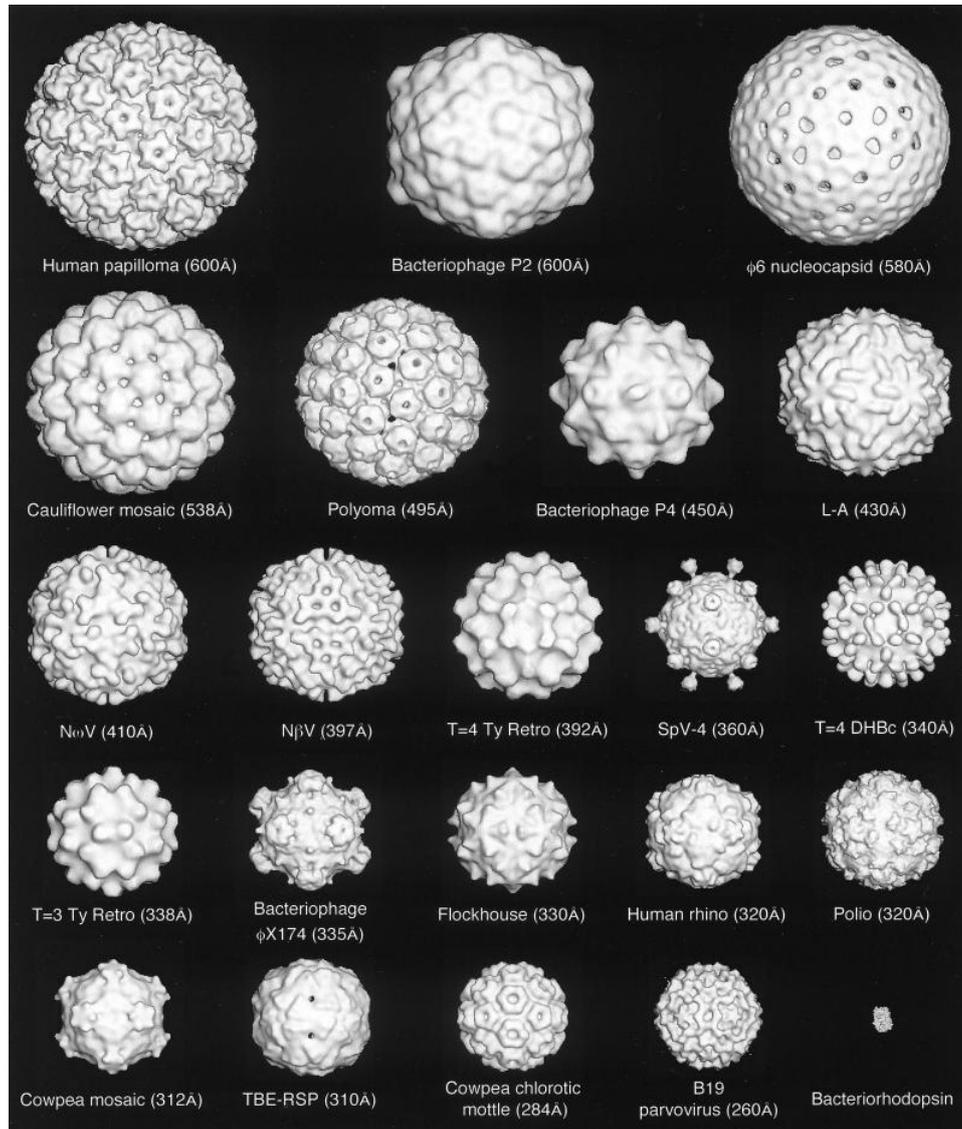


FIGURE A.5 – Exemples de virus isométriques (suite). A titre de comparaison, le monomère d'une protéine, la bactériorhodopsine est représenté [19].

Annexe B

Géométries de diffusion utilisées

La figure B.1 décrit les différentes géométries que nous avons utilisées au cours de nos expériences Brillouin.

Pour des échantillons dont l'indice de réfraction est « isotrope » (échantillons non biréfringents), l'équation (2.6) permet de calculer la valeur de q , le moment transféré au cours du processus de diffusion inélastique de lumière et de ν le déplacement Brillouin :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \text{ et } \nu = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{vq}{2\pi} = \frac{2nv}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{B.1})$$

où n est l'indice de réfraction du matériau, λ_0 la longueur d'onde de la radiation incidente, θ l'angle entre \vec{k}_0 et \vec{k} , ν le déplacement Brillouin et v la vitesse du son.

Rétrodiffusion

$$q_{180} = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \text{ et } \nu_{180} = \frac{2nv}{\lambda_0}. \quad (\text{B.2})$$

90 °

$$q_{90} = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \frac{\sqrt{2}}{2} \text{ et } \nu_{90} = \frac{nv\sqrt{2}}{\lambda_0}. \quad (\text{B.3})$$

90°A

D'après la loi de Snell-Descartes pour la réfraction, $\theta = 2r$ où $r = \arcsin(\frac{\sqrt{2}}{2n})$.
Donc

$$q_{90A} = \frac{4\pi}{\lambda_0} \frac{\sqrt{2}}{2} \text{ et } \nu_{90A} = \frac{v\sqrt{2}}{\lambda_0}. \quad (\text{B.4})$$

Dans ce cas ni le moment transféré ni déplacement Brillouin ne dépendent de l'indice de réfraction du matériau considéré.

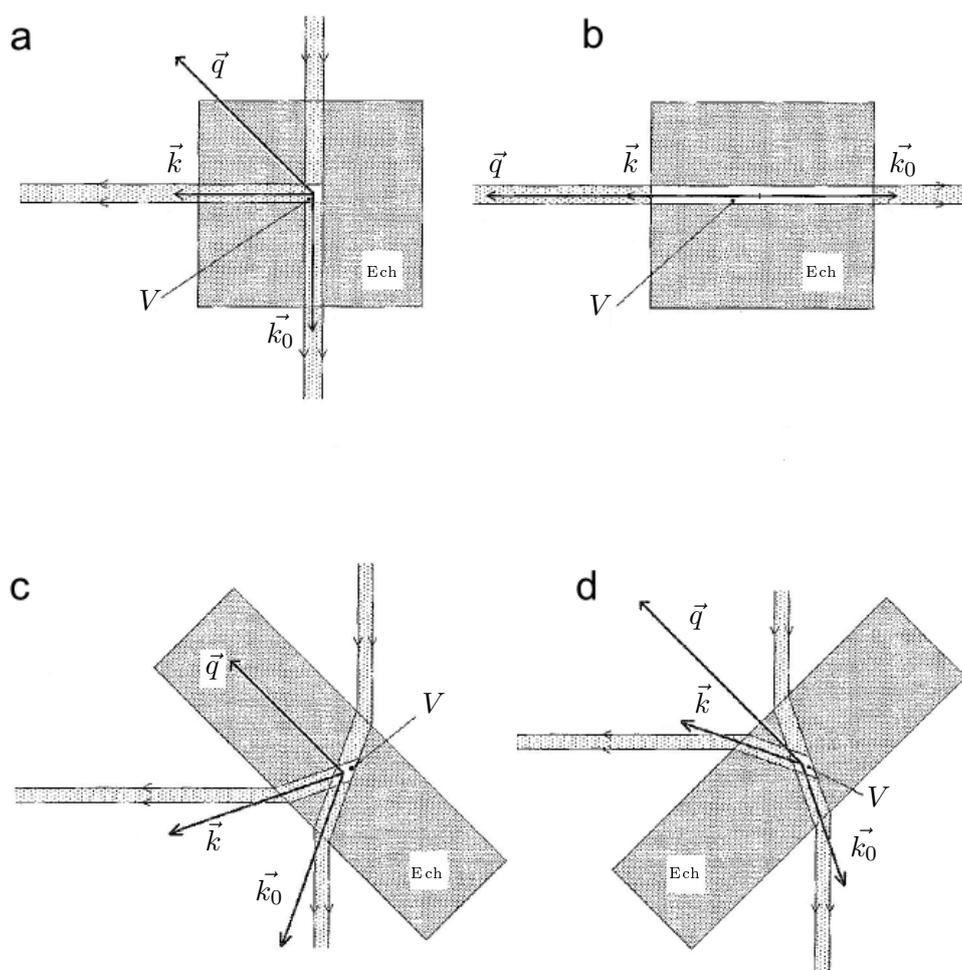


FIGURE B.1 – Différentes géométries de diffusion. (a) 90° , (b) rétrodiffusion, (c) 90°A , (d) 90°R . V volume diffusant ; Ech échantillon ; \vec{k}_0 et \vec{k} vecteurs d'onde incident et diffusé ; \vec{q} moment transmis à l'échantillon.

90°R

Dans ce cas $\theta = \pi - 2r$. Il suffit alors de remarquer que $\sin(\pi/2 - r) = \cos r = \sqrt{1 - \sin^2 r}$ et on obtient alors

$$q_{90R} = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sqrt{\frac{4n^2 - 2}{4n^2}} \text{ et } \nu_{90R} = \frac{v\sqrt{4n^2 - 2}}{\lambda_0}. \quad (\text{B.5})$$

En toute rigueur l'utilisation des géométries 90°R et 90°A requiert un échantillon à faces parallèles.

Rapports entre déplacements Brillouin

Les rapports entre les déplacements Brillouin sont donc égaux à :

$$\frac{\nu_{180}}{\nu_{90}} = \sqrt{2} \quad (\text{B.6})$$

$$\frac{\nu_{180}}{\nu_{90A}} = n\sqrt{2} \quad (\text{B.7})$$

$$\frac{\nu_{180}}{\nu_{90R}} = \frac{2n}{\sqrt{4n^2 - 2}} \quad (\text{B.8})$$

Estimation de l'indice de réfraction du verre Saint-Louis

En faisant une série de mesures dans les géométries adéquates, il est donc possible d'évaluer l'indice de réfraction d'un échantillon transparent.

La figure B.2 représente des spectres Brillouin du verre dopé à l'or (verre Saint-Louis) dans deux géométries différentes à 90 °et 90 °A. A 90 °, la fréquence du pic Brillouin est égale à $\nu_{90} = nv\sqrt{2}/\lambda$ et à 90 °A à $\nu_{90A} = v\sqrt{2}/\lambda$. La connaissance de ν_{90} et ν_{90A} permet donc de remonter à la valeur de n l'indice de réfraction du verre. D'après les relations (B.8), on a

$$n = \frac{\nu_{90}}{\nu_{90A}} = \frac{19.72}{12.36} \simeq 1.59. \quad (\text{B.9})$$

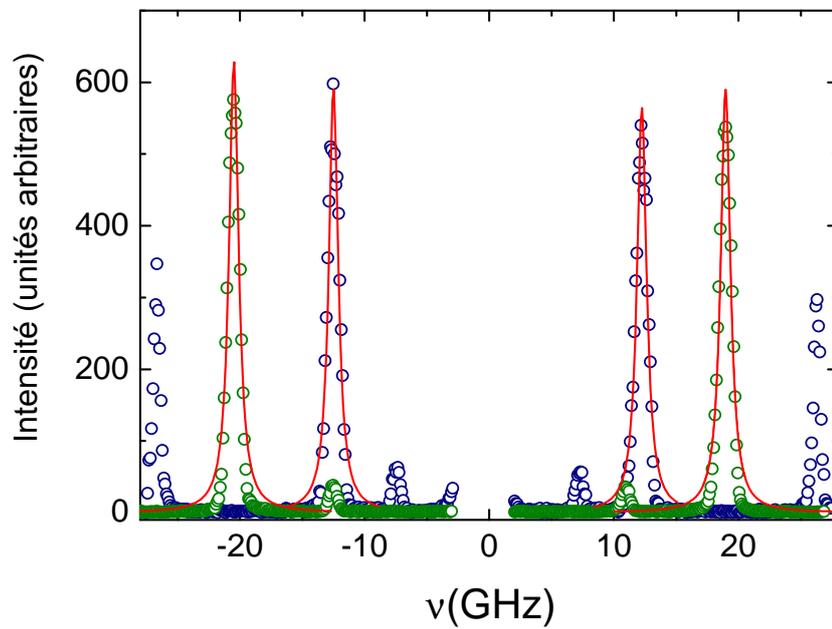


FIGURE B.2 – Spectres Brillouin de l'échantillon Saint-Louis recuit à 490°C pendant 1 h pris à 90° (symboles verts) et $90^\circ A$ (symboles bleus). Les traits pleins représentent les ajustements du pic longitudinal dans les deux géométries.

Annexe C

La ligne de diffusion UV inélastique (IUVS)

La ligne de diffusion UV inélastique [156, 17] à ELETTRA (Trieste, Italie) est construite sur le principe d'un simple monochromateur à réseau (figure C.1). Le point source de la ligne est un onduleur [157] de 4.5 m délivrant au point échantillon après monochromatisation un flux d'environ 10^{12} photons/s . Le rayonnement incident polychromatique est monochromatisé par un premier réseau (montage de Czerny-Turner) avec une résolution $\Delta E/E \sim 10^{-6}$ (figure C.1, en encart). Après diffusion par l'échantillon, le faisceau est dispersé par un second monochromateur (analyseur) et collecté par une caméra CCD. Outre le faisceau UV issu du synchrotron dont la longueur d'onde peut être ajustée entre 110 nm et 240 nm ($11-5\text{ eV}$), la ligne peut fonctionner avec une source externe laser de longueur d'onde fixe $\lambda = 244\text{ nm}$. Dans ce cas, le premier étage dispersif n'est pas utilisé.

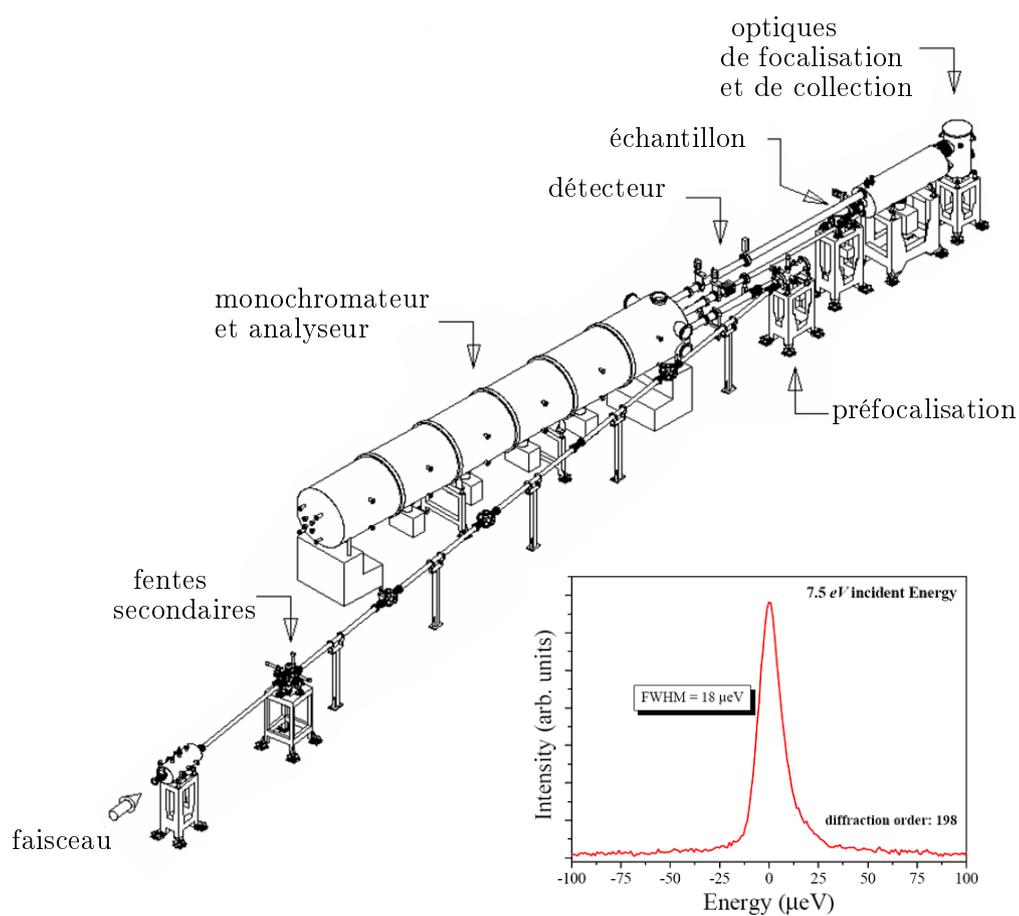


FIGURE C.1 – Schéma de la ligne de diffusion inélastique d’UV à ELETTRA. En encart, la fonction de résolution du monochromateur.

Annexe D

Abréviations utilisées

Tandem FP	interféromètre Fabry-Pérot multipassage
FP	Fabry-Pérot
ISL	intervalle spectral libre
IUVS	Inelastic Ultraviolet Scattering

BMV	Brome Mosaic Virus
STMV	Satellite Tobacco Mosaic Virus
TBSV	Tomato Bushy Stunt Virus
TMV	Tobacco Mosaic Virus
PBCV-1	<i>Paramecium Bursaria</i> Chlorella Virus 1
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique

AFM	microscopie à force atomique
DRX	diffraction des rayons X
MET	Microscopie Electronique en Transmission
NMA	Normal Mode Analysis
DO	densité optique

Bibliographie

- [1] J. SUN, C. DUFORT, M.-C. DANIEL, A. MURALI, C. CHEN, K. GOPINATH, B. STEIN, M. DE, V. M. ROTELLO, A. HOLZENBURG, C. C. KAO et B. DRAGNEA, « Core-controlled polymorphism in virus-like particles », *PNAS*, vol. 104, p. 1354–1359, jan. 2007.
- [2] H. PORTALÈS, *Etude par diffusion Raman de nanoparticules métalliques en matrice diélectrique amorphe*. Thèse doctorat, Université Claude Bernard - Lyon 1, 2001.
- [3] M. GIRARD, L. HIRTH, G. LEBEURIER et J. WITZ, *Virologie moléculaire*. Doin, 1989.
- [4] M. CASSELYN, J. PEREZ, A. TARDIEU, P. VACHETTE, J. WITZ et H. DELACROIX, « Spherical plant viruses : interactions in solution, phase diagrams and crystallization of Brome Mosaic Virus », *Acta Crystallographica Section D*, vol. 57, no. 12, p. 1799–1812, 2001.
- [5] J. WITZ et F. BROWN, « Structural dynamics, an intrinsic property of viral capsids », *Archives of Virology*, vol. V146, p. 2263–2274, déc. 2001.
- [6] H. W. van VLIJMEN et M. KARPLUS, « Normal mode calculations of icosahedral viruses with full dihedral flexibility by use of molecular symmetry », *Journal of Molecular Biology*, vol. 350, p. 528–542, juil. 2005.
- [7] F. TAMA et C. L. BROOKS III, « The mechanism and pathway of pH induced swelling in cowpea chlorotic mottle virus », *Journal of Molecular Biology*, vol. 318, p. 733–747, mai 2002.
- [8] S. ADICHTCHEV, *The dynamics of molecular glasse studied by light scattering*. Thèse doctorat, Universität Bayreuth, 2006.
- [9] W. CHENG, J. WANG, U. JONAS, G. FYTAS et N. STEFANO, « Observation and tuning of hypersonic bandgaps in colloidal crystals », *Nat Mater*, vol. 5, p. 830–836, oct. 2006.
- [10] P. BILLAUD, E. COTTANCIN, L. ARNAUD, G. BACHELIER, C. BONNET, N. DEL FATTI, J. LERMÉ, F. VALLÉE, J.-L. VIALLE, M. BROYER et M. PELLARIN, « Correlation between the extinction spectrum of a single metal nanoparticle and its electron microscopy image », *En cours de publication*, 2007.
- [11] P. B. JOHNSON et R. W. CHRISTY, « Optical constants of the noble metals », *Phys. Rev. B*, vol. 6, p. 4370–, déc. 1972.

- [12] P. G. ETCHEGOIN, E. C. L. RU et M. MEYER, « An analytic model for the optical properties of gold », *J. Chem. Phys.*, vol. 125, p. 164705–3, oct. 2006.
- [13] P. FREDDOLINO, A. ARKHIPOV, S. LARSON, A. MCPHERSON et K. SCHULTEN, « Molecular dynamics simulations of the complete Satellite Tobacco Mosaic Virus », *Structure*, vol. 14, p. 437, 2006.
- [14] B. STEPHANIDIS, « Organisation de nanoparticules d'argent sur des matrices biologiques bidimensionnelles », Mém. D.E.A., Université Paris VI, 2004.
- [15] X. YAN, V. BOWMAN, N. H. OLSON, J. R. GURNON, J. L. VAN ETTEN, M. G. ROSSMANN et T. BAKER, « The structure of a T=169d algal virus, PBCV-1, at 15 Å resolution », *Microscopy and Microanalysis*, vol. 11, p. 1056–1057, 2005.
- [16] P. HENNING, K. M. E. ANDERSSON, K. FRYKHOLM, A. ALI, M. K. MAGNUSSON, P.-A. NYGREN, O. GRANIO, S. S. HONG, P. BOULANGER et L. LINDHOLM, « Tumor cell targeted gene delivery by adenovirus 5 vectors carrying knobless fibers with antibody-binding domains », *Gene Ther*, vol. 12, p. 211–224, oct. 2004.
- [17] G. BALDI, S. CAPONI, L. COMEZ, S. DI FONZO, D. FIORETTO, A. FONTANA, A. GESSINI, C. MASCIOVECCHIO, M. MONTAGNA, G. RUOCCO, S. SANTUCCI et G. VILIANI, « Brillouin ultraviolet light scattering on vitreous silica », *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 351, p. 1919–1923, juil. 2005.
- [18] D. M. FIELDS, Bernard N. and Knipe, P. M. HOWLEY et D. E. GRIFFIN, éd., *Fields' virology*, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [19] T. S. BAKER, N. H. OLSON et S. D. FULLER, « Adding the third dimension to virus life cycles : Three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs », *Microbiol Mol Biol Rev.*, vol. 63, p. 862–922, 1999.
- [20] F. VALLÉE, « Réponses optiques spectrale et temporelle des nanoparticules métalliques ».
- [21] B. STEPHANIDIS, S. ADICHTCHEV, P. GOUET, A. MCPHERSON et A. MERMET, « Elastic properties of viruses », *Biophys. J.*, vol. 93, p. 1354–1359, août 2007.
- [22] U. KREIBIG et M. VOLLMER, *Optical properties of metal clusters*. Springer, 1995.
- [23] P. de GENNES et M. PAPOULAR, *Polarisation Matière et Rayonnement*, p. 243–258. Paris : P.U.F., société française de physique éd., 1969.
- [24] A. E. ERINGEN et E. S. SUHUBI, *Elastodynamics - Volume 2*. Academic Press, 1975.
- [25] E. ROCA, C. TRALLERO-GINER et M. CARDONA, « Polar optical vibrational modes in quantum dots », *Phys. Rev. B*, vol. 49, p. 13704–, mai 1994.
- [26] L. SAVIOT, *Etude par diffusion Raman du confinement des vibrations optiques et acoustiques dans des nanoparticules de CdSe et de silicium poreux*. Thèse doctorat, Université Claude Bernard - Lyon 1, 1995.

-
- [27] C. KITTEL, *Introduction to Solid State Physics - 7th ed.* Wiley, 1996.
- [28] G. B. BENEDEK et K. FRITSCH, « Brillouin scattering in cubic crystals », *Phys. Rev.*, vol. 149, p. 647–, sept. 1966.
- [29] L. E. MCNEIL et M. GRIMSDITCH, « Elastic moduli of muscovite mica », *Journal of Physics : Condensed Matter*, vol. 5, no. 11, p. 1681–1690, 1993.
- [30] A. POLIAN, M. GRIMSDITCH et I. GRZEGORY, « Elastic constants of gallium nitride », *J. Appl. Phys.*, vol. 79, p. 3343–3344, 1996.
- [31] C. L. CAYLOR, S. SPEZIALE, S. KRIMINSKI, T. DUFFY, C.-S. ZHA et R. E. THORNE, « Measuring the elastic properties of protein crystals by Brillouin scattering », *Journal of Crystal Growth*, vol. 232, p. 498–501, nov. 2001.
- [32] A. POLIAN, « Brillouin scattering at high pressure : an overview », *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 34, no. 7-8, p. 633–637, 2003.
- [33] S. SPEZIALE, F. JIANG, C. L. CAYLOR, S. KRIMINSKI, R. E. ZHA, C.-S. Thorne et T. S. DUFFY, « Sound velocity and elasticity of tetragonal lysozyme crystals by Brillouin spectroscopy », *Biophysical Journal*, vol. 85, p. 3202–3213, 2003.
- [34] T. D. ROSSING, « Chladni’s law for vibrating plates », *Am. J. Phys.*, vol. 50, p. 271–274, mars 1982.
- [35] H. LAMB, « On the vibrations of an elastic sphere », *Proc. London Math. Soc.*, vol. s1-13, p. 189–212, nov. 1881.
- [36] W. ZUERN, G. LASKE, R. WIDMER-SCHNIDRIG et F. GILBERT, « Observation of Coriolis coupled modes below 1 mHz », *Geophys. J. Int.*, vol. 143, p. 113–118, 2000.
- [37] L. SAVIOT, C. NETTING et D. MURRAY, « Damping by bulk and shear viscosity of confined acoustic phonons for nanostructures in aqueous solution », *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, p. 7457–7461, juin 2007.
- [38] H. PORTALÈS, L. SAVIOT, E. DUVAL, M. GAUDRY, E. COTTANCIN, M. PELLARIN, J. LERMÉ et M. BROYER, « Resonant Raman scattering by quadrupolar vibrations of Ni-Ag core-shell nanoparticles », *Phys. Rev. B*, vol. 65, p. 165422–, avril 2002.
- [39] L. SAVIOT et D. B. MURRAY, « Longitudinal versus transverse spheroidal vibrational modes of an elastic sphere », *Phys. Rev. B*, vol. 72, p. 205433–6, nov. 2005.
- [40] D. B. MURRAY et L. SAVIOT, « Phonons in an inhomogeneous continuum : Vibrations of an embedded nanoparticle », *Phys. Rev. B*, vol. 69, p. 094305–9, mars 2004.
- [41] L. SAVIOT, B. CHAMPAGNON, E. DUVAL, I. A. KUDRIAVTSEV et A. I. EKIMOV, « Size dependence of acoustic and optical vibrational modes of CdSe nanocrystals in glasses », *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 197, p. 238–246, mai 1996.
-

- [42] E. DUVAL, A. BOUKENTER et B. CHAMPAGNON, « Vibration eigenmodes and size of microcrystallites in glass : Observation by very-low-frequency Raman scattering », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, p. 2052–2055, May 1986.
- [43] L. H. FORD, « Estimate of the vibrational frequencies of spherical virus particles », *Phys. Rev. E*, vol. 67, p. 051924–, mai 2003.
- [44] L. SAVIOT, D. B. MURRAY, A. MERMET et E. DUVAL, « Comment on “estimate of the vibrational frequencies of spherical virus particles” », *Phys. Rev. E*, vol. 69, p. 023901–1, fév. 2004.
- [45] A. A. BALANDIN et V. A. FONOBEROV, « Vibrational modes of nano-template viruses », *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 1, p. 90–95, 2005.
- [46] M. TALATI et P. K. JHA, « Acoustic phonon quantization and low-frequency Raman spectra of spherical viruses », *Phys. Rev. E*, vol. 73, p. 011901–6, jan. 2006.
- [47] F. TAMA et C. L. BROOKS III, « Diversity and identity of mechanical properties of icosahedral viral capsids studied with elastic network normal mode analysis », *Journal of Molecular Biology*, vol. 345, p. 299–314, jan. 2005.
- [48] S. C. HARRISON, *Fields' virology*, chap. 2. Principles of Virus Structure, p. 53–86. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [49] N. BAN, S. B. LARSON et A. MCPHERSON, « Structural comparison of the plant satellite viruses », *Virology*, vol. 214, p. 571–583, déc. 1995.
- [50] S. B. LARSON, J. DAY, A. GREENWOOD et A. MCPHERSON, « Refined structure of Satellite Tobacco Mosaic Virus at 1.8 Å resolution », *Journal of Molecular Biology*, vol. 277, p. 37–59, mars 1998.
- [51] S. B. LARSON, S. KOSZELAK, J. DAY, A. GREENWOOD, J. A. DODDS et A. MCPHERSON, « Three-dimensional structure of Satellite Tobacco Mosaic Virus at 2.9 Å resolution », *Journal of Molecular Biology*, vol. 231, p. 375–391, mai 1993.
- [52] P. J. G. BUTLER, « The current picture of the structure and assembly of Tobacco Mosaic Virus », *J Gen Virol*, vol. 65, p. 253–279, fév. 1984.
- [53] C. BUCHEN-OSMOND, « The Universal Virus Database ICTVDB », *Comput. Sci. Eng.*, vol. 5, p. 16–25, mai 2003.
- [54] F. H. C. CRICK et J. D. WATSON, « Structure of small viruses », *Nature*, vol. 177, p. 473–475, 1956.
- [55] F. H. C. CRICK et J. D. WATSON, « Virus structure : general principles », in *CIBA Foundation Symposium on the nature of viruses* (G. E. W. WOLSTENHOLME et E. C. P. MILLAR, éds), p. 5–13, Churchill : London, 1957.
- [56] H. FRAENKEL-CONRAT et R. C. WILLIAMS, « Reconstitution of active Tobacco Mosaic Virus from its inactive protein and nucleic acid components », *PNAS*, vol. 41, p. 690–698, oct. 1955.
- [57] R. ZANDI, D. REGUERA, R. F. BRUINSMA, W. M. GELBART et J. RUDNICK, « Origin of icosahedral symmetry in viruses », *PNAS*, vol. 101, p. 15556–15560, nov. 2004.

-
- [58] D. MARVIN, L. WELSH, M. SYMMONS, W. SCOTT et S. STRAUS, « Molecular structure of fd (f1, M13) filamentous bacteriophage refined with respect to x-ray fibre diffraction and solid-state NMR data supports specific models of phage assembly at the bacterial membrane », *Journal of Molecular Biology*, vol. 355, p. 294–309, jan. 2006.
- [59] S. C. HARRISON, A. J. OLSON, C. E. SCHUTT, F. K. WINKLER et G. BRICOGNE, « Tomato Bushy Stunt Virus at 2.9 Å resolution », *Nature*, vol. 276, p. 368–373, nov. 1978.
- [60] M. ADRIAN, J. DUBOCHET, J. LEPAULT et A. W. MCDOWALL, « Cryo-electron microscopy of viruses », *Nature*, vol. 308, p. 32–36, mars 1984.
- [61] R. ARAMAYO, C. MERIGOUX, E. LARQUET, P. BRON, J. PEREZ, C. DUMAS, P. VACHETTE et N. BOISSET, « Divalent ion-dependent swelling of Tomato Bushy Stunt Virus : A multi-approach study », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1724, p. 345–354, août 2005.
- [62] G. BINNIG, C. F. QUATE et C. GERBER, « Atomic force microscope », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, p. 930–, mars 1986.
- [63] Y. G. KUZNETSOV, J. R. GURNON, J. L. VAN ETTEN et A. MCPHERSON, « Atomic force microscopy investigation of a chlorella virus, PBCV-1 », *Journal of Structural Biology*, vol. 149, p. 256–263, mars 2005.
- [64] Y. G. KUZNETSOV, A. J. MALKIN, R. W. LUCAS et A. MCPHERSON, « Atomic force microscopy studies of icosahedral virus crystal growth », *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 19, p. 333–346, déc. 2000.
- [65] Y. G. KUZNETSOV, A. J. MALKIN, R. W. LUCAS, M. PLOMP et A. MCPHERSON, « Imaging of viruses by atomic force microscopy », *J Gen Virol*, vol. 82, p. 2025–2034, sept. 2001.
- [66] R. W. LUCAS, Y. G. KUZNETSOV, S. B. LARSON et A. MCPHERSON, « Crystallization of Brome Mosaic Virus and $T = 1$ Brome Mosaic Virus particles following a structural transition », *Virology*, vol. 286, p. 290–303, août 2001.
- [67] I. L. IVANOVSKA, P. J. de PABLO, B. IBARRA, G. SGALARI, F. C. MACKINTOSH, J. L. CARRASCOSA, C. F. SCHMIDT et G. J. L. WUITE, « Bacteriophage capsids : Tough nanoshells with complex elastic properties », *PNAS*, vol. 101, p. 7600–7605, mai 2004.
- [68] J. P. MICHEL, I. L. IVANOVSKA, M. M. GIBBONS, W. S. KLUG, C. M. KNOLLER, G. J. L. WUITE et C. F. SCHMIDT, « Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength », *PNAS*, vol. 103, p. 6184–6189, avril 2006.
- [69] M. BABINCOVA, P. SOURIVONG et P. BABINEC, « Resonant absorption of ultrasound energy as a method of hiv destruction », *Medical Hypotheses*, vol. 55, p. 450–451, nov. 2000.
- [70] G. RUBEL, « Brillouin spectroscopy : a new tool for biological detection and discrimination », in *23rd Army Science Conference*, 2003.
-

- [71] R. ZANDI et D. REGUERA, « Mechanical properties of viral capsids », *Phys. Rev. E*, vol. 72, p. 021917–12, août 2005.
- [72] R. TUMA et G. J. THOMAS, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, chap. Raman spectroscopy of viruses. John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- [73] M. MOSKOVITS, « Surface-Enhanced Raman spectroscopy : a brief retrospective », *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 36, no. 6-7, p. 485–496, 2005.
- [74] R. S. PENCIU, M. KAFESAKI, G. FYTAS, E. N. ECONOMOU, A. STEFFEN, W. Hollingsworth et W. B. RUSSEL, « Phonons in colloidal crystals », *Europhys. Lett.*, vol. 58, p. 699–704, 2002.
- [75] M. H. KUOK, H. S. LIM, S. C. NG, N. N. LIU et Z. K. WANG, « Brillouin study of the quantization of acoustic modes in nanospheres », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 90, p. 255502–, juin 2003.
- [76] M. H. KUOK, H. S. LIM, S. C. NG, N. N. LIU et Z. K. WANG, « Erratum : Brillouin study of the quantization of acoustic modes in nanospheres [phys. rev. lett. 90, 255502 (2003)] », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 91, p. 149901–, oct. 2003.
- [77] W. HAYES et R. LOUDON, *Scattering of light by crystals*. Wiley & Sons, 1978.
- [78] L. LANDAU et E. LIFCHITZ, *Physique théorique - tome 8 - Electrodynamique des milieux continus 2è édition*. Editions Mir, 1990.
- [79] J. R. SANDERCOCK, *Trends in Brillouin scattering : studies of opaque materials, supported films, and central modes*, chap. 6, p. 173–206. Springer-Verlag, 1982.
- [80] E. DUVAL, « Far-infrared and Raman vibrational transitions of a solid sphere : Selection rules », *Phys. Rev. B*, vol. 46, p. 5795–, sept. 1992.
- [81] B. HILLEBRANDS, « Progress in multipass tandem Fabry-Perot interferometry : I. a fully automated, easy to use, self-aligning spectrometer with increased stability and flexibility », *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 70, p. 1589–1598, mars 1999.
- [82] S. M. LINDSAY, M. W. ANDERSON et J. R. SANDERCOCK, « Construction and alignment of a high performance multipass vernier tandem Fabry-Perot interferometer », *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 52, p. 1478–1486, oct. 1981.
- [83] R. MOCK, B. HILLEBRANDS et R. SANDERCOCK, « Construction and performance of a Brillouin scattering set-up using a triple-pass tandem Fabry-Perot interferometer », *Journal of Physics E : Scientific Instruments*, vol. 20, no. 6, p. 656–659, 1987.
- [84] J. R. SANDERCOCK, « Tandem Fabry-Pérot Interferometer - Operator Manual ». JRS Scientific Instruments, Lindenmoosstrasse 10 8910 Affoltern a.A. Suisse, 1999.
- [85] G. HERNANDEZ, *Fabry-Perot Interferometers*. Cambridge University Press, 1986.
- [86] M. BORN et E. WOLF, *Principles of optics, 6th edition*. Pergamon Press, 1993.
- [87] J. WIEDERSICH, S. V. ADICHTCHEV et E. RÖSSLER, « Spectral shape of relaxations in silica glass », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 84, p. 2718–, mars 2000.

-
- [88] J. WIEDERSICH, *Quasi-elastische Lichtstreuung von Gläsern*. Thèse doctorat, Universität Bayreuth, 2000.
- [89] J. LIU, L. YE, D. A. WEITZ et P. SHENG, « Novel acoustic excitations in suspensions of hard-sphere colloids », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 65, p. 2602–, nov. 1990.
- [90] R. S. PENCIU, G. FYTAS, E. N. ECONOMOU, W. STEFFEN et S. N. YANNOPOULOS, « Acoustic excitations in suspensions of soft colloids », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 85, p. 4622–, nov. 2000.
- [91] A. M. URBAS, E. L. THOMAS, H. KRIEGS, G. FYTAS, R. S. PENCIU et L. N. ECONOMOU, « Acoustic excitations in a self-assembled block copolymer photonic crystal », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 90, p. 108302–, mars 2003.
- [92] W. CHENG, J. J. WANG, U. JONAS, W. STEFFEN, G. FYTAS, R. S. PENCIU et E. N. ECONOMOU, « The spectrum of vibration modes in soft opals », *J. Chem. Phys.*, vol. 123, p. 121104–4, sept. 2005.
- [93] G. TOMMASEO, G. PETEKIDIS, W. STEFFEN, G. FYTAS, A. B. SCHOFIELD et N. STEFANO, « Hypersonic acoustic excitations in binary colloidal crystals : Big versus small hard sphere control », *J. Chem. Phys.*, vol. 126, p. 014707–9, jan. 2007.
- [94] Y. LI, H. S. LIM, S. C. NG, Z. K. WANG, M. H. KUOK, E. VEKRIS, V. KITAEV, F. C. PEIRIS et G. A. OZIN, « Micro-Brillouin scattering from a single isolated nanosphere », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 88, p. 023112–3, jan. 2006.
- [95] G. MARIOTTO, M. MONTAGNA, G. VILIANI, E. DUVAL, S. LEFRANT, E. RZEPKA et C. MAI, « Low-energy Raman scattering from silver particles in alkali halides », *Europhysics Letters (EPL)*, vol. 6, no. 3, p. 239–243, 1988.
- [96] M. FUJII, T. NAGAREDA, S. HAYASHI et K. YAMAMOTO, « Low-frequency Raman scattering from small silver particles embedded in SiO_2 thin films », *Phys. Rev. B*, vol. 44, p. 6243–, sept. 1991.
- [97] M. FUJII, T. NAGAREDA, S. HAYASHI et K. YAMAMOTO, « Erratum : Low-frequency Raman scattering from small silver particles embedded in SiO_2 thin films », *Phys. Rev. B*, vol. 52, p. 14273–, nov. 1995.
- [98] B. PALPANT, H. PORTALÈS, L. SAVIOT, J. LERMÉ, B. PRÉVEL, M. PELLARIN, E. DUVAL, A. PEREZ et M. BROYER, « Quadrupolar vibrational mode of silver clusters from plasmon-assisted Raman scattering », *Phys. Rev. B*, vol. 60, p. 17107–, déc. 1999.
- [99] H. PORTALÈS, L. SAVIOT, E. DUVAL, M. FUJII, S. HAYASHI, N. DEL FATTI et F. VALLEE, « Resonant Raman scattering by breathing modes of metal nanoparticles », *J. Chem. Phys.*, vol. 115, p. 3444–3447, août 2001.
- [100] H. PORTALÈS, L. SAVIOT, E. DUVAL, M. GAUDRY, E. COTTANCIN, J. LERMÉ, M. PELLARIN, M. BROYER, B. PRÉVEL et M. TREILLEUX, « Resonance and composition effects on the Raman scattering from silver-gold alloy clusters », *European Physical Journal*, vol. 16, p. 197, 2001.
-

- [101] M. CAZAYOUS, C. LANGLOIS, T. OIKAWA, C. RICOLLEAU et A. SACUTO, « Cu-Ag core-shell nanoparticles : A direct correlation between micro-Raman and electron microscopy », *Phys. Rev. B*, vol. 73, p. 113402–4, mars 2006.
- [102] B. CHAMPAGNON, B. ANDRIANASOLO, A. RAMOS, M. GANDAIS, M. ALLAIS et J.-P. BENOIT, « Size of Cd(S,Se) quantum dots in glasses : Correlation between measurements by high-resolution transmission electron microscopy, small-angle x-ray scattering, and low-frequency inelastic Raman scattering », *J. Appl. Phys.*, vol. 73, p. 2775–2780, mars 1993.
- [103] L. SAVIOT, B. CHAMPAGNON, E. DUVAL et A. I. EKIMOV, « Size-selective resonant Raman scattering in CdS doped glasses », *Phys. Rev. B*, vol. 57, p. 341–, jan. 1998.
- [104] C. PIGHINI, D. AYMES, N. MILLOT et L. SAVIOT, « Low-frequency Raman characterization of size-controlled anatase TiO₂ nanopowders prepared by continuous hydrothermal syntheses », *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 9, p. 309–315, avril 2007.
- [105] A. COURTY, A. MERMET, P. A. ALBOUY, E. DUVAL et M. P. PILENI, « Vibrational coherence of self-organized silver nanocrystals in f.c.c. supra-crystals », *Nature Materials*, vol. 4, p. 395–398, 2005.
- [106] A. COURTY, P. ALBOUY, A. MERMET, E. DUVAL et M. PILENI, « Intrinsic vibrational coherence in face-centered cubic supra-crystals of silver nanocrystals : Raman scattering measurements », *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, p. 21159–21166, nov. 2005.
- [107] A. BOUKENTER, B. CHAMPAGNON, E. DUVAL, J. L. ROUSSET, J. DUMAS et J. SERUGHETTI, « Vibrational modes in silica aerogels : low-frequency Raman scattering », *Journal of Physics C : Solid State Physics*, vol. 21, no. 34, p. L1097–L1102, 1988.
- [108] C. F. BOHREN et D. R. HUFFMAN, *Absorption and scattering of light by small nanoparticles*. John Wiley and Sons, 1983.
- [109] B. PALPANT, B. PRÉVEL, J. LERMÉ, E. COTTANCIN, M. PELLARIN, M. TREILLEUX, A. PEREZ, J. L. VIALLE et M. BROYER, « Optical properties of gold clusters in the size range 2-4 nm », *Phys. Rev. B*, vol. 57, p. 1963–, jan. 1998.
- [110] E. COTTANCIN, G. CELEP, J. LERMÉ, M. PELLARIN, J. HUNTZINGER, J. VIALLE et M. BROYER, « Optical properties of noble metal clusters as a function of the size : Comparison between experiments and a semi-quantal theory », *Theoretical Chemistry Accounts : Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)*, vol. 116, p. 514–523, sept. 2006.
- [111] S. BERCIAUD, L. COGNET, P. TAMARAT et B. LOUNIS, « Observation of intrinsic size effects in the optical response of individual gold nanoparticles », *Nano Lett.*, vol. 5, p. 515–518, mars 2005.
- [112] M. EICHELBAUM, K. RADEMANN, R. MÜLLER, M. RADTKE, H. RIESEMEIER et W. GÖRNER, « On the chemistry of gold in silicate glasses : Studies on a

- nonthermally activated growth of gold nanoparticles », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, no. 48, p. 7905–7909, 2005.
- [113] M. FLÜELI et J.-P. BOREL, « Surface energy anisotropy measurements on a small cuboctahedron of gold observed by high resolution electron microscopy (HREM) », *Journal of Crystal Growth*, vol. 91, p. 67–70, 1988.
- [114] J. I. GERSTEN, D. A. WEITZ, T. J. GRAMILA et A. Z. GENACK, « Inelastic Mie scattering from rough metal surfaces : Theory and experiment », *Phys. Rev. B*, vol. 22, p. 4562–, nov. 1980.
- [115] G. DE MARCHI, G. MATTEI, P. MAZZOLDI, C. SADA et A. MIOTELLO, « Two stages in the kinetics of gold cluster growth in ion-implanted silica during isothermal annealing in oxidizing atmosphere », *J. Appl. Phys.*, vol. 92, p. 4249–4254, oct. 2002.
- [116] S. A. OVERMAN et J. G. J. THOMAS, « Novel vibrational assignments for proteins from Raman spectra of viruses », *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 29, no. 1, p. 23–29, 1998.
- [117] G. J. THOMAS, « Raman spectroscopy of protein and nucleic acid assemblies », *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 28, no. 1, p. 1–27, 1999.
- [118] R. TUMA, « Raman spectroscopy of proteins : from peptides to large assemblies », *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 36, no. 4, p. 307–319, 2005.
- [119] K. TSEN, E. DYKEMAN, O. SANKEY, N.-T. LIN, S.-W. TSEN et J. KIANG, « Observation of the low frequency vibrational modes of bacteriophage M13 in water by Raman spectroscopy », *Virology Journal*, vol. 3, no. 1, p. 79–, 2006.
- [120] F. TAMA, O. MIYASHITA et C. L. BROOKS III, « Normal mode based flexible fitting of high-resolution structure into low-resolution experimental data from cryo-EM », *Journal of Structural Biology*, vol. 147, p. 315–326, sept. 2004.
- [121] S. C. HARRISON, « Structure of Tomato Bushy Stunt Virus : I. the spherically averaged electron density », *Journal of Molecular Biology*, vol. 42, p. 457–464, juin 1969.
- [122] P. HOPPER, S. C. HARRISON et R. T. SAUER, « Structure of Tomato Bushy Stunt Virus : V. coat protein sequence determination and its structural implications », *Journal of Molecular Biology*, vol. 177, p. 701–713, août 1984.
- [123] R. W. LUCAS, S. B. LARSON et A. MCPHERSON, « The crystallographic structure of Brome Mosaic Virus », *Journal of Molecular Biology*, vol. 317, p. 95–108, mars 2002.
- [124] M. CASSELYN, *Modifications structurales du Virus de la Mosaïque du Brome et interactions entre particules virales en solution : application à la cristallisation*. Thèse doctorat, Université Paris VI, 2002.
- [125] J. L. VAN ETTEN, L. C. LANE et R. H. MEINTS, « Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. », *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 55, p. 586–620, déc. 1991.

- [126] X. YAN, N. H. OLSON, J. L. VAN ETTEN, M. BERGOIN, M. G. ROSSMANN et T. S. BAKER, « Structure and assembly of large lipid-containing dsDNA viruses », *Nat Struct Mol Biol*, vol. 7, p. 101–103, fév. 2000.
- [127] J. L. VAN ETTEN, M. V. GRAVES, D. G. MÜLLER, W. BOLAND et N. DELAROCQUE, « Phycodnaviridae - large DNA algal viruses », *Archives of Virology*, vol. 147, p. 1479–1516, août 2002.
- [128] A. A. SIMPSON, N. NANDHAGOPAL, J. L. VAN ETTEN et M. G. ROSSMANN, « Structural analyses of Phycodnaviridae and Iridoviridae », *Acta Crystallographica Section D*, vol. 59, no. 12, p. 2053–2059, 2003.
- [129] N. NANDHAGOPAL, A. A. SIMPSON, J. R. GURNON, X. YAN, T. S. BAKER, M. V. GRAVES, J. L. VAN ETTEN et M. G. ROSSMANN, « The structure and evolution of the major capsid protein of a large, lipid-containing DNA virus », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, p. 14758–14763, nov. 2002.
- [130] W. C. RUSSELL, « Update on adenovirus and its vectors », *J Gen Virol*, vol. 81, p. 2573–2604, nov. 2000.
- [131] C. ZUBIETA, G. SCHOEHN, J. CHROBOCZEK et S. CUSACK, « The structure of the human Adenovirus 2 penton », *Molecular Cell*, vol. 17, p. 121–135, jan. 2005.
- [132] M. TACHIBANA, K. KOJIMA, R. IKUYAMA, Y. KOBAYASHI et M. ATAKA, « Sound velocity and dynamic elastic constants of lysozyme single crystals », *Chemical Physics Letters*, vol. 332, p. 259–264, déc. 2000.
- [133] M. TACHIBANA, H. KOIZUMI et K. KOJIMA, « Effect of intracrystalline water on longitudinal sound velocity in tetragonal hen-egg-white lysozyme crystals », *Phys. Rev. E*, vol. 69, p. 051921–5, mai 2004.
- [134] R. S. PENCIU, H. KRIEGS, G. PETEKIDIS, G. FYTAS et E. N. ECONOMOU, « Phonons in colloidal systems », *J. Chem. Phys.*, vol. 118, p. 5224–5240, mars 2003.
- [135] C. MORGAN, G. C. GODMAN, P. M. BREITENFELD et H. M. ROSE, « A correlative study by electron and light microscopy of the development of type 5 adenovirus : I. electron microscopy », *J. Exp. Med.*, vol. 112, p. 373–382, août 1960.
- [136] M. RUSSO et G. P. MARTELLI, « Ultrastructural observations on tomato bushy stunt virus in plant cells », *Virology*, vol. 49, p. 122–129, juil. 1972.
- [137] Y. PALIWAL, « Electron microscopy of Bromegrass Mosaic Virus in infected leaves », *Journal of Ultrastructure Research*, vol. 30, p. 491–502, mars 1970.
- [138] B. WELLS, R. W. HORNE et P. J. SHAW, « The formation of two-dimensional arrays of isometric plant viruses in the presence of polyethylene glycol », *Micron (1969)*, vol. 12, no. 1, p. 37–45, 1981.
- [139] B. LORBER, M. ADRIAN, J. WITZ, M. ERHARDT et J. R. HARRIS, « Formation of two-dimensional crystals of icosahedral RNA viruses », *Micron*, vol. In Press, Corrected Proof, p. –, 2008.

-
- [140] S.-W. LEE, C. MAO, C. E. FLYNN et A. M. BELCHER, « Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses », *Science*, vol. 296, p. 892–895, mai 2002.
- [141] N. BRAUN, W. MEINING, U. HARS, M. FISCHER, R. LADENSTEIN, R. HUBER, A. BACHER, S. WEINKAUF et L. BACHMANN, « Formation of metal nanoclusters on specific surface sites of protein molecules », *Journal of Molecular Biology*, vol. 321, p. 341–353, août 2002.
- [142] R. A. McMILLAN, C. D. PAAVOLA, J. HOWARD, S. L. CHAN, N. J. ZALUZEC et J. D. TRENT, « Ordered nanoparticle arrays formed on engineered chaperonin protein templates », *Nat Mater*, vol. 1, p. 247–252, déc. 2002.
- [143] K. T. NAM, D.-W. KIM, P. J. YOO, C.-Y. CHIANG, N. MEETHONG, P. T. HAMMOND, Y.-M. CHIANG et A. M. BELCHER, « Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes », *Science*, vol. 312, p. 885–888, mai 2006.
- [144] R. HORNE et I. PASQUALI RONCHETTI, « A negative staining–carbon film technique for studying viruses in the electron microscope : I. preparative procedures for examining icosahedral and filamentous viruses », *Journal of Ultrastructure Research*, vol. 47, p. 361–383, juin 1974.
- [145] J. R. HARRIS, *Negative staining and cryoelectron microscopy*. Bios Scientific Publishers, 1997.
- [146] G. CARLOTTI, D. FIORETTO, L. PALMIERI, G. SOCINO, L. VERDINI et E. VERONA, « Brillouin scattering by surface acoustic modes for elastic characterization of ZnO films », *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 38, p. 56–61, 1991.
- [147] R. A. ANI, P. PFEIFFER et G. LEBEURIER, « The structure of Cauliflower Mosaic Virus ii. identity and location of the viral polypeptides », *Virology*, vol. 93, p. 188–197, fév. 1979.
- [148] M. A. CANADY, S. B. LARSON, J. DAY et A. MCPHERSON, « Crystal structure of Turnip Yellow Mosaic Virus », *Nat Struct Mol Biol*, vol. 3, p. 771–781, sept. 1996.
- [149] M. A. HERNANDEZ-PEREZ, C. GARAPON, C. CHAMPEAUX, P. SHAHGALDIAN, A. COLEMAN et J. MUGNIER, « Pulsed laser deposition of bovine serum albumin protein thin films », *Applied Surface Science*, vol. 208-209, p. 658–662, mars 2003.
- [150] J. R. LAWRENCE, D. R. KORBER, B. D. HOYLE, J. W. COSTERTON et D. E. CALDWELL, « Optical sectioning of microbial biofilms », *J Bacteriol.*, vol. 173(20), p. 6558–6567, 1991.
- [151] B. CERVELLE, F. CESBRON, J. BERTHOU et P. JOLLES, « Morphologie et propriétés optiques des cristaux de lysozyme de poule de type quadratique et orthorhombique », *Acta Crystallographica Section A*, vol. 30, p. 645–648, sept. 1974.
-

- [152] M. TACHIBANA, K. KOJIMA, R. IKUYAMA, Y. KOBAYASHI et M. ATAKA, « Erratum to : 'sound velocity and dynamic elastic constants of lysozyme single crystals' [chem. phys. lett. 332 (2000) 259-264] », *Chemical Physics Letters*, vol. 354, p. 360–, mars 2002.
- [153] M. DIEHL, W. DOSTER, W. PETRY et H. SCHOBER, « Water-coupled low-frequency modes of myoglobin and lysozyme observed by inelastic neutron scattering. », *Biophys. J.*, vol. 73, p. 2726–2732, nov. 1997.
- [154] K. E. EVANS et A. ALDERSON, « Auxetic materials : Functional materials and structures from lateral thinking! », *Advanced Materials*, vol. 12, no. 9, p. 617–628, 2000.
- [155] D. L. D. CASPAR et A. KLUG, « Physical principles in the construction of regular viruses », in *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 27, p. 1–24, 1962.
- [156] C. MASCIOVECCHIO, A. GESSINI, S. DI FONZO, L. COMEZ, S. C. SANTUCCI et D. FIORETTO, « Inelastic Ultraviolet Scattering from high frequency acoustic modes in glasses », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 92, p. 247401–4, juin 2004.
- [157] J. BARUCHEL, J. L. HODEAU, M. S. LEHMANN, J. R. RÉGNARD et C. SCHLENKER, édés, *Neutron and synchrotron radiation for condensed matter studies*, vol. 1 Theory, instruments and methods. EDP Sciences - Springer Verlag, 1993.

**Modes de vibration de nano-objets :
des nanoparticules métalliques aux virus biologiques**

Comparée à leur structure généralement très bien caractérisée, la dynamique collective des nano-objets est assez mal connue. En une vingtaine d'années, la diffusion inélastique de lumière est devenue un outil puissant dans l'étude de la dynamique des nano-objets.

Ce travail traite de la transposition de cette technique habituellement appliquée à l'étude des modes propres de vibration de nanoparticules solides à la recherche de modes similaires chez leur équivalent biologique, les virus.

Nous revenons dans un premier temps sur les expériences Brillouin (ou Raman basse fréquence) sur des verres dopés à l'or et discutons de l'utilité du tandem Fabry-Pérot en particulier par l'apport de la haute résolution dans la détection des levées de dégénérescence associées à l'anisotropie des paramètres élastiques des nanoparticules d'or facettées.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à la recherche de modes de vibration d'ensemble sur des virus à morphologie sphérique à travers l'étude de différents types d'échantillons : solutions, couches bidimensionnelles et cristaux tridimensionnels de virus. Cette partie rend compte d'une première détermination des constantes élastiques globales d'un cristal de phytovirus. Alors que pour les virus de petite taille (15 – 30 nm) aucune preuve indiscutable de l'existence d'un mode de vibration de virus n'a pu être trouvée, pour un virus de plus grande taille (~ 200 nm), un signal s'apparentant à un mode de vibration de virus a été observé.

Vibration modes of nanoparticles : from metallic clusters to viruses

Compared to their structure which is in general very well characterized, the collective dynamics of nano-objects are quite poorly documented. Over the last two decades, inelastic light scattering has become a powerful tool in studying the dynamics of nano-objects.

This work is about the application of this technique usually dedicated to the study of the vibration eigenmodes of solid nanoparticles (metallic clusters, silica nanospheres) to the investigation of similar modes in their biological counterparts, *i. e.* viruses.

The first part of this work deals with the Brillouin (or low frequency Raman) experiments on gold nanoparticles embedded in glasses. The advantage of using the Tandem Fabry-Pérot Interferometer is then discussed : thanks to the high resolution of this setup, it is possible to observe the lift of degeneracy associated with the elastic anisotropy of the faceted gold nanoparticles.

In the second part of this work we try to investigate the overall vibration modes of sphere-like viruses through the study of different kinds of samples : solution, two-dimensional layers and three-dimensional virus crystals. The search for this modes leads to a first estimate of the elastic constants of a phytovirus crystal. For small viruses (15 – 30 nm), no firm evidence of eigenmodes is found, while for a bigger virus (~ 200 nm) we observe a signal which could be related to a vibration mode of the virus.

DISCIPLINE

Physique

MOTS-CLES

Raman, Brillouin, modes de vibration, basses fréquences, nanoparticules, virus, plasmon

LABORATOIRE DE RECHERCHE :

Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents - UMR 5620 CNRS/UCBL, Domaine Scientifique de la Doua, Université Claude Bernard Lyon 1, bâtiment Alfred Kastler, 10 rue André-Marie Ampère, 69622 Villeurbanne cedex, France.