



HAL
open science

Imagerie électro-optique Pockels aux échelles micro et nanométriques en physique et biophysique

Bassam Hajj

► **To cite this version:**

Bassam Hajj. Imagerie électro-optique Pockels aux échelles micro et nanométriques en physique et biophysique. Autre [cond-mat.other]. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2010. Français. NNT : 2010DENS0036 . tel-00562142

HAL Id: tel-00562142

<https://theses.hal.science/tel-00562142>

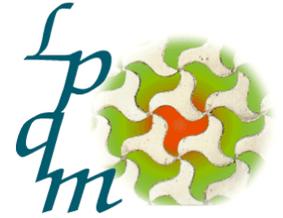
Submitted on 2 Feb 2011

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 DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN



Présentée par



Bassam HAJJ

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Domaine :
SCIENCES PHYSIQUES

Sujet de la thèse :

**Imagerie Électro-optique Pockels aux échelles micro et
nanométriques en physique et biophysique**

Thèse présentée et soutenue à Cachan le 18 Novembre 2010 devant le jury composé de :

Alain MARTY	Professeur	Président
Sophie BRASSELET	Chargée de Recherche	Rapporteur
Jean-Louis OUDAR	Professeur	Rapporteur
Charles SHANK	Professeur	Examineur
Dominique CHAUVAT	Maitre de conférence	Co-directeur de thèse
Joseph ZYSS	Professeur	Directeur de thèse

Laboratoire de Photonique Quantique et Moléculaire
ENS CACHAN/CNRS/UMR
61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX (France)

A ma Famille

Table de matière

INTRODUCTION	1
---------------------------	----------

CHAPITRE I : REVUE DES TECHNIQUES DE MESURE OPTIQUE DE CHAMP ELECTRIQUE 5

I.I Mesure de champ électrique dans les milieux physiques	5
I.I.1 Effet Pockels.....	6
I.I.2 L'effet Kerr.....	7
I.I.3 Effet Franz-Keldysh.....	8
I.II Mesure de champ optique dans des milieux biologiques	9
I.II.1 Biréfringence	9
I.II.2 Colorant :	10
I.II.3 Plasmon de surface	13
I.II.4 Absorption et Variation de la diffusion optique (<i>champ noir ou "dark field"</i>)	14
I.III Une approche différente	17

CHAPITRE II : MICROSCOPIE ELECTRO-OPTIQUE 19

II.I Partie Théorique	19
II.I.1 Indice de réfraction	19
II.I.2 Milieu anisotrope	20
II.I.3 Polarizabilité non linéaire et effet Pockels	22
II.II Partie expérimentale : Microscope Électro-optique	26
II.II.1 Principe générale	26
II.II.2 Réalisation du montage expérimental	32
II.II.3 Analyse des données	40

CHAPITRE III : CHAMP ELECTRIQUE MESURE PAR EFFET POCKELS DANS DES FILMS MINCES DE CRISTAUX MOLECULAIRES DE MNA 43

III.I MNA	44
III.I.1 Electrodes :	44
III.I.2 Films minces organiques : méthode de croissance	46
III.I.3 Propriétés optiques et électro-optiques du MNA	48
III.II Champ électrique : expression analytique	49
III.III Mesure électro-optique et réponse en polarisation	52

III.III.1	Expression analytique et ajustement de la courbe polaire:.....	53
III.III.2	Champ électrique non uniforme (électrodes avec pointes) :	57
III.IV	Conclusion du chapitre et perspectives :	58
CHAPITRE IV : ETUDE DE LA REPONSE ELECTRO-OPTIQUE POCKELS D'UN NANOCRISTAL UNIQUE : APPLICATION AU KTP		61
IV.I	Effet d'une nanoparticule sur un faisceau :	62
IV.I.1	Description de l'effet électro-optique en termes de champ diffusé :	63
IV.II	Propriétés non-linéaires du KTP – propriétés électro-optiques	64
IV.III	Nano KTP : préparation et déposition.....	65
IV.IV	Réponse électro-optique d'une nanoparticule unique :.....	68
IV.IV.1	Réponse en polarisation du signal électro-optique d'un nanocrystal de KTP:.....	69
IV.V	Etude en réflexion.....	73
IV.VI	Interaction entre deux particules électro-optiques	74
IV.VII	Conclusion du chapitre et perspectives.....	75
CHAPITRE V : ETUDE ELECTRO-OPTIQUE D'UNE BICOUCHE ARTIFICIELLE PHOSPHOLIPIDIQUE DOPEE		77
V.I	Bicouche artificielle :.....	79
V.I.1	Dispositif micro-fluidique et étapes de formation d'une bicouche	79
V.I.2	Caractérisation électrique d'une membrane.....	83
V.I.3	Mesure électro-optique et modèle associé.	85
V.II	Modèle simplifié de l'insertion des colorants dans la membrane et effet électro-optique associé	88
V.III	Conclusion et perspectives de ce chapitre.....	92
CHAPITRE VI : APPLICATION DE LA MICROSCOPIE ELECTRO-OPTIQUE A L'ETUDE DE CELLULES VIVANTES : RESULTATS PRELIMINAIRES.....		95
VI.I	Description sommaire de la technique de Patch-Clamp	96
VI.II	Choix des cellules.....	98
VI.II.1	Croissance :.....	98
VI.II.2	Caractérisation électrique des cellules PC12	99
VI.III	Modèle de la réponse électro-optique tridimensionnelle d'une cellule	101

VI.IV Mesures optiques en parallèle avec les mesures de Patch-Clamp (dépendance linéaire).....	102
VI.IV.1 Premières images en MEO des cellules entre électrodes planaires	104
VI.IV.2 Discussion sur l'origine du signal intrinsèque	109
VI.V Conclusion et perspective de ces études cellulaires.....	110
CONCLUSION GENERALE	113
ANNEXE A: CALCUL DU CHAMP ELECTRIQUE ENTRE DEUX BANDES PARALLELES	117
ANNEXE B: REPONSE ELECTRO-OPTIQUE EN POLARISATION D'UN SYSTEME MACROSCOPIQUE : APPLICATION A UN CRISTAL DE KDP.....	119
ANNEXE C : SECTION EFFICACE D'UNE NANOPARTICULE	129

Introduction

La dernière décennie a été marquée par un développement remarquable de la nanophotonique et de la biophotonique. De nombreuses études biologiques profitent de ce développement important de l'instrumentation optique, tout en suscitant de nouvelles exigences. Les mesures optiques de champ électrique à échelle micrométrique voire sub-longueur d'onde, sont aussi devenues une des préoccupations de la recherche au cours de ces dernières années. La non-invasivité ou encore la rapidité des méthodes optiques sont devenues des attentes majeures. Cette thèse s'inscrit dans ce contexte actuellement très vivants et vise à étudier une nouvelle approche pour imager des distributions de champ électrique quasi-statique (ou basse fréquence) par l'utilisation de l'effet électro-optique linéaire (effet Pockels), avec des applications en physique et biophysiques.

Cette thèse a été effectuée dans le Laboratoire de Photonique Quantique et Moléculaire (LPQM) de l'École Normale Supérieure de Cachan (ENSC), au sein du groupe de **Nanophotonique nonlinéaire et Bio-photonique** codirigé par Joseph Zyss et Dominique Chauvat. Le travail de ce groupe est orienté vers le développement instrumental de nouvelles techniques de microscopie linéaire et/ou non-linéaire, pour l'étude des propriétés optiques des matériaux au sens général, jusqu'à l'échelle nanométrique. Ces instruments vont de la microscopie multi-photonique non-linéaire (fluorescence à deux photons, génération de seconde harmonique) à la microscopie plasmon pour la mesure locale d'indices de réfraction, tout en passant par la microscopie électro-optique Pockels.

La microscopie électro-optique Pockels (en anglais **PLEOM** pour 'Pockels Linear Electro-Optic Microscopy'), est une configuration sensible à la présence d'un champ électrique statique dans des milieux non-linéaires quadratiques. L'accès à ce champ se fait au travers de l'effet Pockels, qui est le changement d'indice de certains milieux sous l'influence d'un champ électrique statique [1-2]. Ce phénomène se traduit par une variation de phase d'un faisceau sonde traversant ce milieu. De faibles effets de phase nécessitent une méthode de détection de la phase suffisamment sensible, tel que via un interféromètre. Le développement instrumental de ce type de microscopie avait déjà été entrepris dans le cadre de la thèse de Thimotée Toury [3], et a continué tout au long de la présente thèse. Lors de la thèse de Thimotée Toury, de premiers résultats avaient été obtenus, comme l'analyse d'un modulateur électro-optique fondé sur l'orientation sous champ d'une couche de molécules

non-linéaires [4]. Un tout premier test sur une couche artificielle avait été obtenu mais dans des conditions encore difficilement reproductibles. A la suite de ce travail, des améliorations se révélaient nécessaires et plusieurs questions se sont posées :

- (i) Il fallait rendre les mesures électro-optiques reproductibles grâce à un interféromètre plus stable.
- (ii) Les couches orientées de molécules se sont révélées plus complexes que prévu et un système moléculaire plus simple était requis pour caractériser le microscope électro-optique.
- (iii) Avec sa grande sensibilité, le microscope permet-il d'étudier des objets de tailles nanométriques ?
- (iv) Est-il possible d'améliorer la technique de mesure EO de membrane jusqu'à la rendre utilisable pour la biophysique ?
- (v) L'ambition initiale d'appliquer la PLEOM à l'étude d'un neurone et du potentiel d'action, est elle réellement accessible ?

Ces questions ont guidé le plan de cette thèse qui est détaillée ci-dessous.

Le **premier chapitre** constitue une revue des différentes techniques existantes de mesure et de cartographie de champ électrique. On y décrit les avantages et les inconvénients de chacune. Cela permettra aussi de situer notre approche électro-optique par rapport aux différentes techniques, en termes de sensibilité, de résolution et d'innovation.

Le **deuxième chapitre** de la thèse détaille la réalisation pratique du microscope électro-optique dans sa version actuelle. Deux objectifs de microscope insérés dans un montage interférométrique en configuration Mach-Zehnder constituent l'idée de base de la PLEOM. Une détection homodyne équilibrée, un asservissement de la phase statique des deux bras de l'interféromètre, ainsi qu'une détection synchrone, permettent d'obtenir la stabilité et la sensibilité requises pour une mesure de variation d'indice très faible.

Le **troisième chapitre** de ce manuscrit aborde le sujet de la caractérisation spatiale de la structure des films minces organiques cristallines à base de 2-méthyl-4-nitroaniline (MNA). Ces films minces fortement polaires possèdent un fort degré d'organisation qui se traduit par de grands coefficients électro-optiques Pockels. La croissance délicate de ces couches ainsi que l'étude en MEOP sont décrites en détail. Une des améliorations apportées durant cette thèse est l'étude de la réponse Pockels en fonction de la polarisation du faisceau sonde. Celle-ci reflète la symétrie du milieu étudié tout en permettant de déterminer son orientation

spatiale (e.g. axes cristallins ou diélectriques par rapport à ceux du laboratoire). Cette démarche est validée dans le cas du MNA et on la compare avec des analyses standard d'optique anisotrope, entre polariseurs croisés. On utilise ensuite la MEOP pour imager la réponse Pockels d'un échantillon avec des électrodes structurées, qui reflètent une distribution particulière du champ électrique dans l'espace.

Notre étude a ensuite porté (**chapitre 4**) sur des mesures de faibles effets de modulations induits par un champ électrique. La détection d'une modulation EO Pockels à l'échelle nanométrique constitue dans ce contexte un défi majeur. Nous nous sommes fondés sur des études récentes qui ont été menées au sein du groupe Nano-photonique Quantique du LPQM, sur la génération de seconde harmonique de nano-cristaux de KTiOPO_4 (ou KTP) [5]. A l'échelle macroscopique, ces cristaux non-linéaires sont également connus pour leurs propriétés électro-optiques. Nous sommes ainsi parvenus à détecter la modulation EO de la lumière diffusée par des nano-cristaux de KTP d'une dimension de 150 nm. Une étude en fonction de la polarisation du faisceau sonde permet de déterminer l'orientation spatiale de ces cristaux. Un tel cristal (voire un cristal encore plus petit à l'avenir) pourrait constituer un détecteur de champ quasi-statique local de taille nanométrique.

Cette grande sensibilité de la PLEOM à des effets de champ électrique ouvre une voie intéressante vers des applications en biophysique, voire en biologie. En électrophysiologie les mesures sans contact de champs électriques, présents au travers des membranes cellulaires, présentent un intérêt fondamental. En effet les mesures standard par contact direct d'une électrode avec la membrane, connues sous le nom de "patch-clamp" [6], permettent de mesurer les potentiels d'actions d'une façon précise mais de manière invasive. La méthode optique, sans contact, reste une alternative intéressante car elle préserve en principe l'intégralité de la membrane cellulaire et présente un caractère fondamentalement non invasif. Le système cellulaire étant très compliqué, nous avons commencé par une étude de bicouche phospholipidique artificielle pour calibrer les mesures cellulaires ultérieures mais aussi compte tenu de l'intérêt fondamental en biophysique de l'étude des membranes en tant que telles. La mise en œuvre expérimentale est décrite dans le **chapitre 5**, où les premiers signaux EO Pockels de telles bicouches dopées sont rapportés. On valide ensuite expérimentalement le modèle théorique proposé pour décrire l'insertion du colorant électro-optique dans la membrane. La dépendance linéaire du signal Pockels par rapport à l'amplitude de la différence de potentiel appliquée, permet d'estimer les coefficients électro-optiques du film de molécules de colorant.

Le **chapitre 6** évoque les possibilités d'applications en biologie de ce concept. Dans ce cadre, nous avons utilisé des cellules de type "PC12" pour effectuer des mesures de champ électrique "ex-vivo". Dans un premier temps, il nous est apparu naturel d'utiliser un "patch-clamp" standard pour appliquer un champ électrique transmembranaire connu, mais l'expérience s'est révélée très délicate. Pour simplifier celle-ci, ces cellules ont finalement été excitées par des électrodes en or qui appliquent alors un champ externe sans contact. Le champ créé étant non-uniforme du fait des inhomogénéités diélectriques et de la configuration des électrodes, les mesures de la PLEOM redessinent cette distribution selon les variations de phase. Des premières images de cellules avec ce mode d'application du champ électrique sont présentées. On discute ensuite les avantages et les limitations de notre technique pour l'étude de potentiel d'action dans les neurones, ainsi que la possibilité de signaux d'origines différentes susceptible d'entrer en "compétition" avec l'effet électro-optique Pockels.

Enfin, nous concluons et nous présentons les perspectives générales de notre travail.

Chapitre I : Revue des techniques de mesure optique de champ électrique

Le développement des nanosciences associées à la miniaturisation des composants optoélectroniques requiert une investigation plus précise et résolument innovante des propriétés physiques à cette échelle. A l'échelle micro voire nanométrique, les propriétés des matériaux changent, comme la ferro-électricité par exemple, et de nouveaux effets peuvent être observés associés en particulier au confinement quantique.

A cette échelle, le champ électrique peut jouer un rôle très important aussi bien en physique qu'en biologie. La recherche de nouvelles méthodes de détermination spatiale du champ électrique est donc particulièrement à l'ordre du jour. Les méthodes optiques, sans contact, reçoivent de plus en plus d'intérêt étant donné leurs performances et leur non-invasivité. On décrit dans ce chapitre quelques techniques optiques utilisées pour les mesures de champ électrique dans des milieux physiques et biologiques.

I.1 Mesure de champ électrique dans les milieux physiques

La miniaturisation des composants électroniques et optoélectronique empêche de plus en plus les mesures par contact direct de champ électrique quasi-statique. A cette échelle, toute anomalie de la distribution du champ électrique est susceptible d'entraîner des pertes

d'information. Par conséquent, il est nécessaire d'optimiser la technologie de conception et de fabrication des électrodes. Des mesures sans contact de champ permettent non seulement une mesure non invasive mais aussi non-perturbative de la distribution du champ. Les méthodes optiques offrent ainsi les atouts de la précision et d'une vitesse d'acquisition élevée. Celles-ci sont fondées sur l'utilisation de différentes variations des propriétés électro-optiques des matériaux, telles que : l'effet Pockels, l'effet Kerr ou encore l'effet Franz-Keldysh.

I.1.1 Effet Pockels

La méthode la plus utilisée et plus développée est celle qui a recours à l'effet Pockels. L'effet Pockels est décrit par une variation linéaire de l'indice de réfraction de certains milieux sous l'effet d'un champ électrique externe. Cette propriété est caractéristique des matériaux non-centrosymétriques organisés tels que les cristaux non-linéaires quadratiques. Des travaux datant des années 80 rapportent de telles mesures à grande échelle [7-8]. Durant ces dernières années, cette technique a connu un développement remarquable permettant une cartographie de champ électrique à petite échelle dans des composants optoélectroniques pour des champs électriques appliqués modulés à des fréquences microondes. Ces techniques utilisent dans leur principe un cristal électro-optique mis en contact avec les électrodes dont on veut mesurer le champ rayonné. L'effet Pockels se traduit par une variation de la polarisation d'un faisceau laser sonde réfléchi sur le dispositif. Après un analyseur, cette variation de polarisation est convertie en une variation d'intensité lumineuse détectable sur une photodiode. Le champ électrique étant modulé, une variation d'intensité à la même fréquence permet d'accéder à la partie électro-optique du signal et d'accéder ainsi à la mesurer la distribution du champ électrique.

Pour des fréquences de modulations encore plus grandes (1-300 GHz) il a été possible de générer des harmoniques d'ordre deux et trois de bandes latérales de modulation (*side-bandes*). Il suffit pour cela de changer la tension de décalage ou l'amplitude de la modulation [9]. La méthode des harmoniques des bandes latérales implémentée avec l'utilisation d'une fibre optique sur laquelle un cristal électro-optique est fixé, a permis de cartographier la distribution du champ électrique dans des antennes aux bandes-K (18GHz) (Figure I-1).

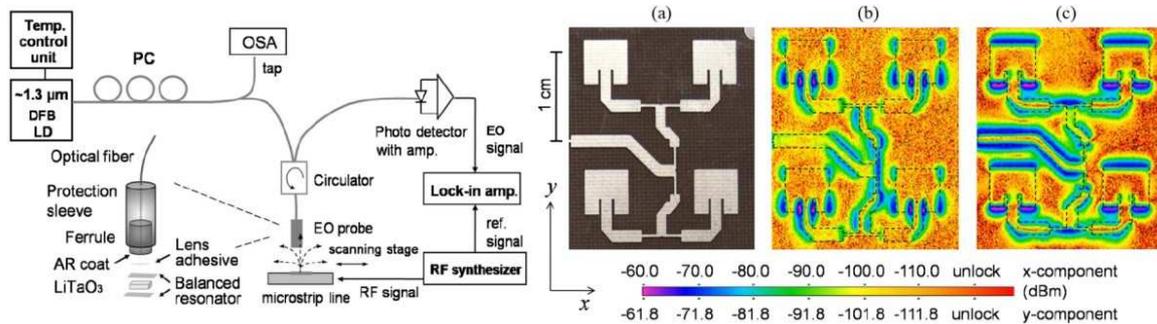


Figure I-1 : (à gauche) Principe de détection et d'imagerie du champ électrique par modulation de l'effet électro-optique dans un cristal EO monté sur une fibre optique [10]. (à droite) (a) antenne de bande-K, (b) composante x du champ électro-optique imagée par la deuxième harmonique, (c) composante y du champ électro-optique [9].

I.1.2 L'effet Kerr

L'effet Kerr correspond aussi à une dépendance de la biréfringence d'un milieu sous l'effet d'un champ électrique externe, cette dépendance étant ici quadratique en champ. Contrairement à l'effet Pockels cette propriété est présente dans tous les milieux, y compris centro-symétriques. L'effet Kerr est surtout utilisé pour la détermination de la distribution de champ électrique dans des milieux liquides comme de l'huile par exemple [11].

Par interférométrie, les franges obtenues en superposant un faisceau référence et un faisceau signal interfèrent au sein d'un milieu Kerr actif, sont altérées par la présence d'un champ électrique. Ce changement repéré sur un détecteur approprié est quantifié en termes du champ électrique perturbant.

Une autre méthode basée sur l'analyse de la polarisation à la traversée d'un milieu sous champ électrique a aussi été utilisée. On détecte une variation de la polarisation du faisceau sonde sous la forme d'une variation de l'intensité transmise entre différentes polarisations incidentes. Ceci permet d'en induire le vecteur champ électrique [12-13].

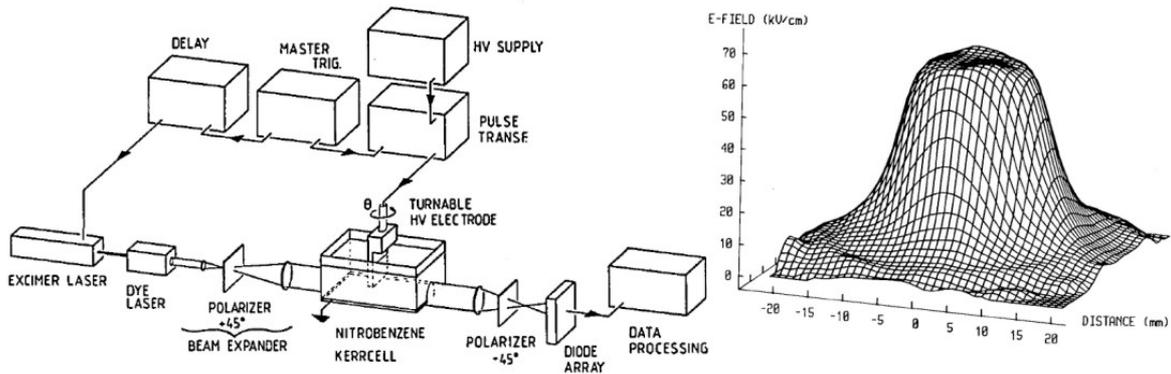


Figure I-2 : (à gauche) schéma expérimental de la mesure entre polariseur croisés. (à droite) Distribution de champ électrique mesuré par effet Kerr dans du nitrobenzène liquide, placé entre deux électrodes, l'une cylindrique et l'autre "infinie". Cette configuration des électrodes permet de créer une forme asymétrique du champ électrique [13].

I.1.3 Effet Franz-Keldysh

L'effet Franz-Keldysh décrit la variation de l'absorption optique d'un semi-conducteur sous application d'un champ électrique à une longueur d'onde généralement proche du bord de la bande de conduction. Quand un champ électrique est appliqué sur le semi-conducteur, le bord de la bande est en effet décalé vers des longueurs d'onde plus petites, et une augmentation de l'absorption est détectable. L'effet Franz-Keldysh se produit dans des semi-conducteurs uniformes, mais requiert l'application de quelques kilo-Volts, ce qui en limite les applications.

Une autre technique utilise le fait qu'un changement du spectre d'absorption est induit, même au-delà de la bande. Ces fluctuations de l'absorption sont mesurées directement par un détecteur approprié [14].

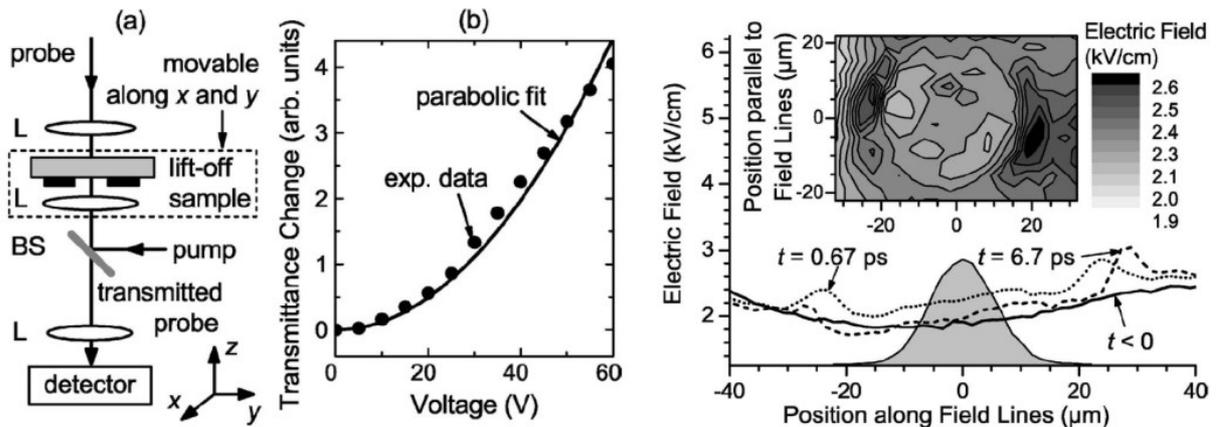


Figure I-3 : (à gauche) schéma expérimental. (à droite) Distribution du champ électrique dans un semiconducteur de GaAs mesuré par effet Franz-Keldysh [14].

I.II Mesure de champ optique dans des milieux biologiques

La propagation des signaux électriques est un grand domaine dans les milieux des sciences de la vie, particulièrement des neurosciences. Des techniques de mesures extracellulaires mais aussi transmembranaires de ces champs ont ainsi été développées. Les premières techniques consistaient à introduire des sondes locales à l'intérieur de la cellule et à mesurer une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule [6]. Cette méthode directe a ouvert la voie au développement de ce qui est considéré comme la meilleure technique actuelle en électrophysiologie : celle du "patch-clamp". En parallèle, les chercheurs ont entrepris de mettre au point des méthodes optiques non-invasives. Les observations de l'influence d'un champ électrique sur les propriétés optiques d'une cellule ont ainsi fait l'objet de plusieurs études : nous en présentons quelques unes ci-dessous.

I.II.1 Biréfringence

La première observation optique de l'effet d'un champ électrique sur les propriétés optiques d'un neurone remonte à la fin des années 60. Une observation de la réponse optique d'un axone placé entre polariseur et analyseur croisés a ainsi montré que les propriétés intrinsèques de ces neurones telles que la biréfringence changent sous l'effet d'un champ électrique [15-16]. Bien que ces observations aient été prometteuses, la résolution et la sensibilité était loin d'être exploitable dans ces premières études. Les recherches ont alors travaillé à améliorer la sensibilité en augmentant l'intensité du signal optique par d'autres méthodes.

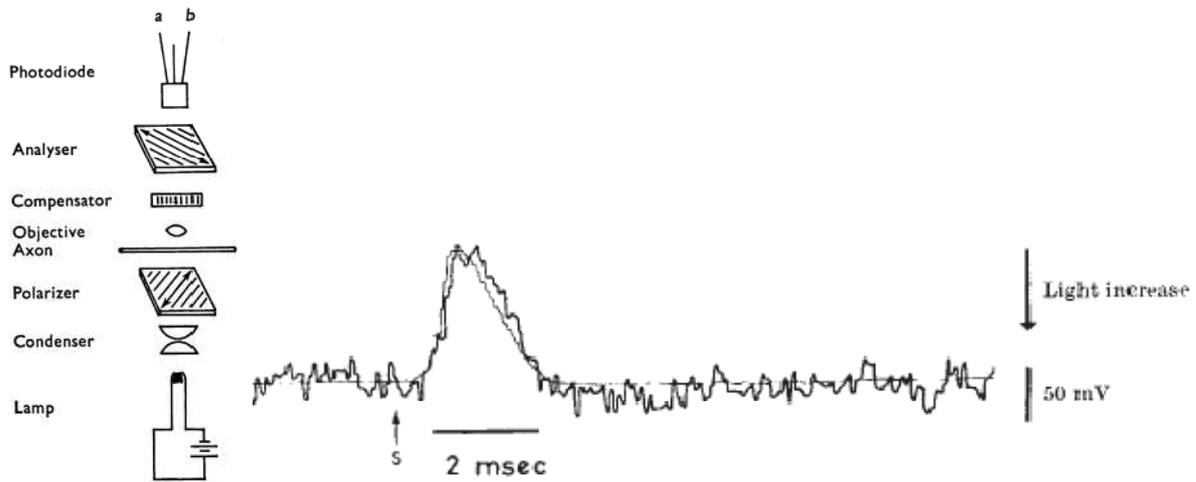


Figure I-4 : Mesure de la birefringence d'un axon géant de squid comparé au signal électrique.

I.II.2 Colorant :

I.II.2.A Fluorescence

Le développement d'une variété de colorants fluorescents a marqué une étape importante dans cette course vers les méthodes toutes optiques [17]. En effet une fois insérés dans la membrane cellulaire, certaines classes de colorants sont capables de sonder une variation de champ électrique local via un changement du signal de fluorescence proportionnel au champ [18-21]. Cette mesure nécessite de différencier la variation de fluorescence par rapport à une ligne de base : $S = F_p - F_0$ (F_p étant le signal de fluorescence induit sous l'effet d'un champ électrique de et F_0 celle de base). Une limitation inhérente à cette technique résulte de ce que, pour la majorité des colorants, la variation de la fluorescence induite par champ électrique est très faible comparée à la fluorescence de base. Une intégration sur plusieurs mesures s'avère dès lors nécessaire. De plus, les colorants sont présents partout dans la cellule et participent ainsi d'une façon non locale à la ligne de base de la fluorescence. Pour accroître le signal optique, la concentration des émetteurs doit être augmentée, ce qui accroît aussi le nombre des émetteurs non influencés par le champ électrique et leur contribution parasite. La qualité du signal décroît alors rapidement. Enfin les colorants sensibles au champ sont le plus souvent photo-toxiques et souffrent du phénomène de photoblanchiment.

I.II.2.B Génération de la seconde harmonique

L'amélioration de l'efficacité de l'excitation et de l'émission est un point critique que l'utilisation de la génération de la seconde harmonique peut permettre de résoudre. En effet la génération de seconde harmonique nécessite une forte focalisation d'un faisceau exciteur

le plus souvent impulsionnel, et elle est générée seulement au point focal de ce faisceau, ce qui minimise le photoblanchiment au dehors du foyer ainsi que l'émission parasite au dehors du point focal. De plus une organisation des colorants non-linéaires avec une orientation privilégiée est nécessaire pour obtenir un signal non nul. Il s'agit à la fois d'une contrainte mais aussi d'un atout. En effet cette contrainte spécifique et relativement exigeante permet aussi de souligner des motifs spécifiques, tels que des contours membranaires où les molécules de colorant sont intercalées au niveau de la couche externe de la membrane phospholipidique. Le seul signal détecté provient alors des colorants de la membrane [22-24]. La génération de seconde harmonique a permis de suivre la propagation de potentiels d'actions dans des neurones avec un bon rapport signal-sur-bruit [24-26].

A noter qu'il s'agit dans ce cas d'un effet non linéaire d'ordre trois ($\chi^{(3)}$), exigeant une forte puissance d'excitation. C'est la contraction de ce tenseur sous l'effet d'un champ électrique statique (ou quasi-statique) en un tenseur d'ordre trois s'ajoutant à un éventuel $\chi^{(2)}$ intrinsèque qui aboutit à la génération de seconde harmonique sensible au champ ($\chi_{eff}^{(2)} = \chi^{(3)}E_0 + \chi^{(2)}$). Notons aussi que cet effet est formellement analogue à la génération de seconde harmonique sous champ électrique (EFISH pour Electric Field Induced Second Harmonic)[27]. La méthode EFISH est très utilisée pour l'étude par génération de seconde harmonique de chromophores sous effet de champ électrique macroscopique. Deux contributions sont alors mises en jeu et sont difficile à discriminer:

- Une composante lente de réorientation moléculaire due à l'effet orientateur du champ électrique par couplage dipolaire.
- Une composante directe et instantanée purement électronique de type mélange à 4 ondes.

Cette double contribution (réorientation lente et polarisation non-linéaire directe) paraît ignorée dans des études récentes et complique considérablement l'interprétation des mesures. Enfin, cette méthode nécessite la focalisation d'une forte intensité lumineuse, ce qui peut éventuellement détruire l'échantillon et augmenter localement le photoblanchiment. A cela s'ajoute la dégradation du signal de GSH lié au problème bien connu de l'internalisation du colorant dans la moitié interne de la membrane (phénomène de retournement ou "capsizing") et qui peut réduire la non-centrosymétrie locale.

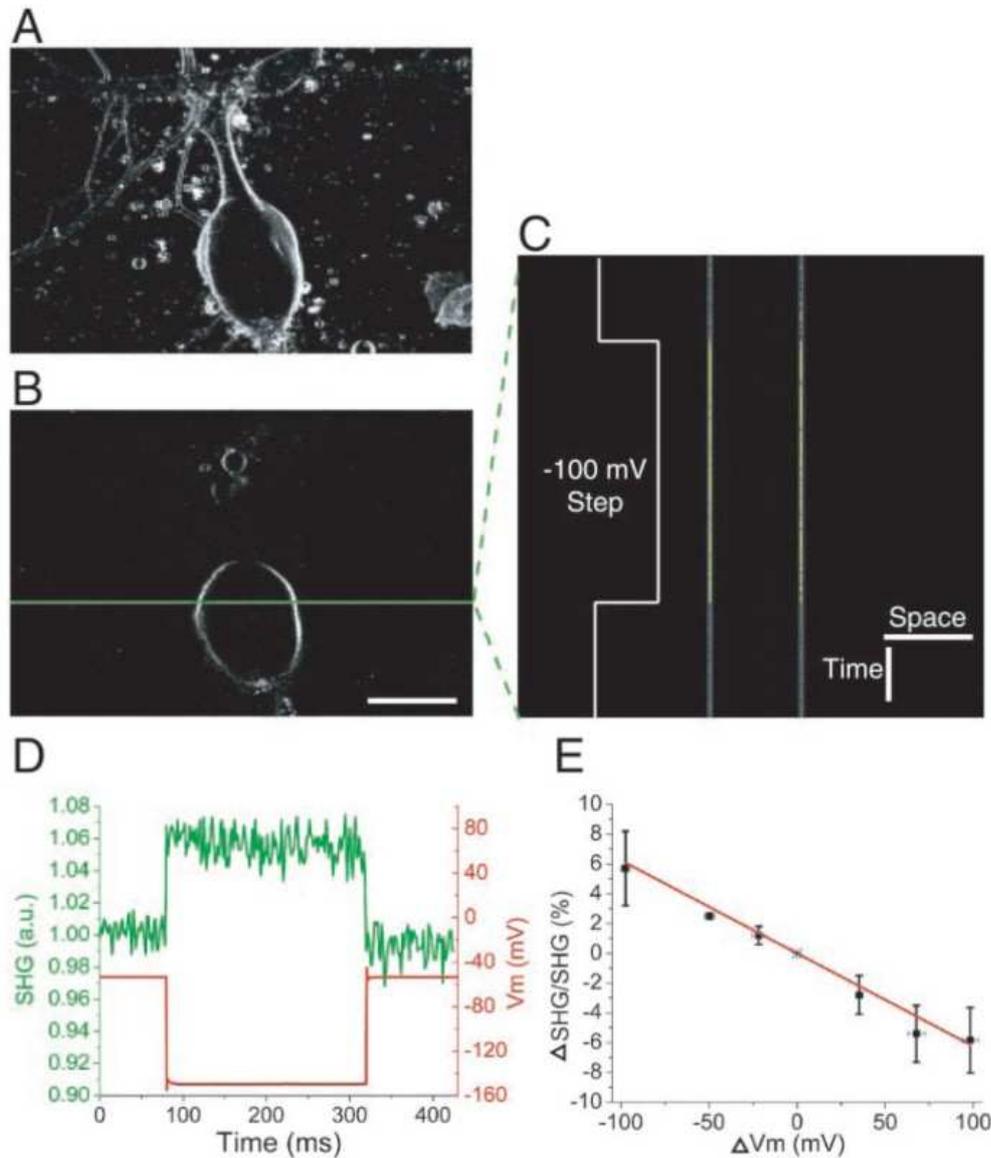


Figure I-5 : Image en GSH d'une cellule dopée. D et E représente la variation de la GSH sous l'influence d'un champ électrique appliqué sur la membrane [24].

I.II.2.C Sondes de champ, par ingénierie génétique

Une démarche prometteuse est l'utilisation de sondes de champ génétiquement codées. Leur utilisation permet de cibler uniquement la membrane plasmique tout en laissant les organelles intracellulaires intactes. Deux stratégies ont été utilisées : la première est la fusion entre la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein* : *GFP*) et les canaux 'voltage-gated', ce qui a conduit à une modification de la conformation de la protéine due au champ dans le canal, et se traduit par une variation de sa fluorescence [28]. La deuxième stratégie utilise un mécanisme hybride où la GFP est attachée à la partie interne de la membrane, puis entre en interaction avec un colorant présent dans la membrane cellulaire, qui subit une

relocalisation dépendante du champ entre les deux monocouches membranaires. Le transfert d'énergie de fluorescence (FRET : *fluorescence resonant energy transfert*) entre ces deux molécules est alors modifié [29]. Ces deux méthodes sont performantes et capables de mesurer de très faibles champs électriques en mode local. Néanmoins, la vitesse de ces processus est limitée, et la détection d'un potentiel d'action par ces méthodes semble difficile. A cela s'ajoutent des problèmes liés au faible niveau du signal, la difficulté d'implémentation ainsi qu'une augmentation de la capacité électrique membranaire, ce qui peut entraîner un blocage de la propagation du potentiel d'action [30].

I.II.2.D Indicateurs de Calcium

Des colorants sensibles au calcium [31], ont aussi été utilisés. En effet la propagation d'un champ électrique à travers une membrane cellulaire est liée à la variation de la concentration en calcium. Ces colorants sont très sensibles : l'ouverture d'un seul canal perméable au calcium est détectable en microscopie à deux photons [32]. Mais la difficulté de la réalisation expérimentale ainsi que son utilisation *in vivo* constituent des limitations.

I.II.3 Plasmon de surface

La résonance de plasmon de surface est un phénomène bien connu pour sa sensibilité aux variations des indices de réfraction effectif ainsi qu'à leur causes: elle offre donc une méthode intéressante pour suivre l'évolution des champs électriques dans des milieux biologiques via les variations d'indices de réfraction. Cette technique, fondée sur la mesure de la variation de l'angle de résonance plasmon sous l'effet d'un changement d'indice à l'interface métal-diélectrique, a été largement développée ces dernières années, conduisant ainsi à des mesures locales de l'indice de réfraction. La propagation d'un champ électrique dans un milieu biologique entraîne une variation d'indice tout au long de cette propagation. Le plasmon de surface s'est avéré apte à mesurer une telle variation, et à estimer le changement d'indice correspondant [33]. Pourtant cette technique est limitée par son faible rapport signal sur bruit (de l'ordre de 4), et la nécessité d'un contact direct de la surface métallique avec les cellules ou les neurones étudiés.

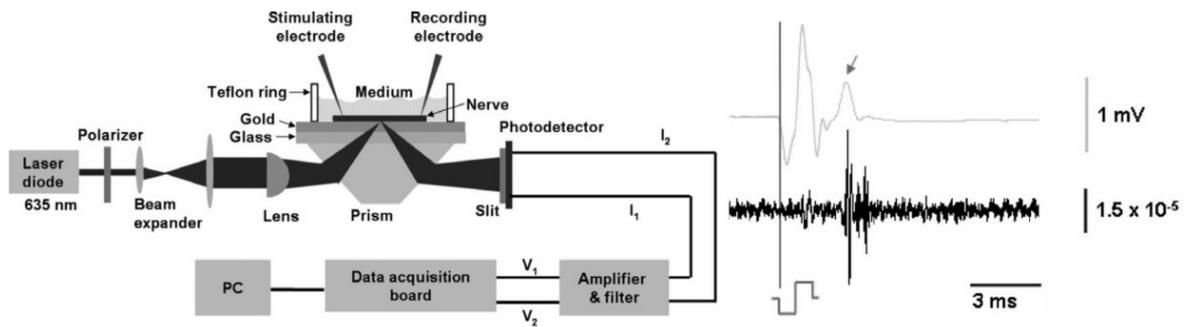


Figure I-6 : Variation de l'indice de réfraction mesuré par la technique de plasmon de surface, comparé à l'excitation électrique d'un neurone [33].

I.II.4 Absorption et Variation de la diffusion optique (*champ noir ou "dark field"*)

L'observation du changement des propriétés intrinsèques des neurones durant une excitation électrique a constitué l'une des premières observations optiques faite par Cohen en 1968 [15]: la biréfringence mais aussi la variation de l'absorption et la diffusion ont été alors observées. Avec le développement de l'instrumentation optique durant ces dernières années, et l'amélioration de la sensibilité de ces techniques, on constate un retour remarquable à l'investigation de l'origine de ces observations [34]. En effet plusieurs articles récents s'attachent à comprendre l'origine exacte de ces effets, et proposent l'influence d'une réorganisation interne des organelles cellulaires due au champ électrique [35].

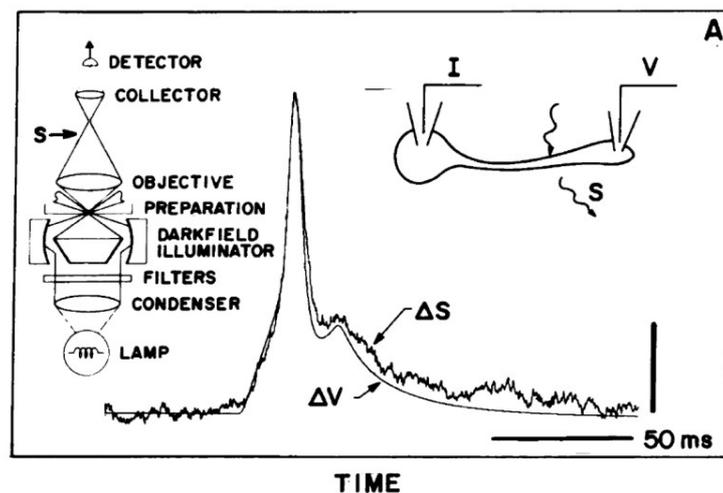


Figure I-7 : Relation linéaire entre la variation de diffusion de la lumière due à la variation de la morphologie du neurone sous l'effet de la différence de potentiel transmembranaire [34].

Récemment, la diffusion optique influencée par champ électrique a été employée pour le suivi du signal. Des techniques connues sous le nom NRIS (*near infrared spectroscopy*)

[36], ou OCT/OCM (*optical coherence microscopy*) [37], ont été adaptées à de telles investigations.

La technique OCM est fondée sur l'utilisation d'un interféromètre de Michelson, où un faisceau signal est focalisé sur l'échantillon. La lumière réfléchiée ou rétrodiffusée est ensuite recombinaée avec un faisceau de référence. On forme ainsi une image des interférences de ces deux faisceaux sur une caméra. Une transformation de Fourier inverse de cette image permet de résoudre en profondeur le signal de la diffusion optique.

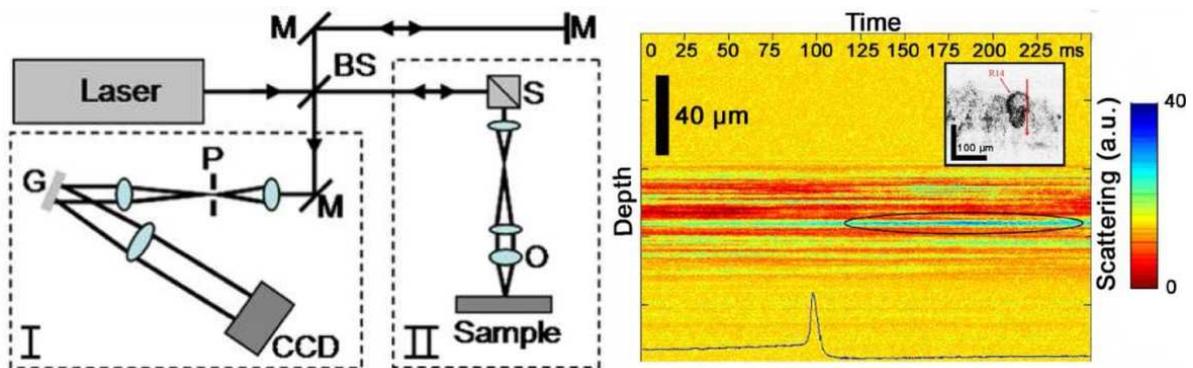


Figure I-8 : (à gauche) schéma expérimental de l'OCM. (à droite) Variation temporelle en profondeur du signal optique mesurée par OCT [37].

La technique NRI est plutôt adaptée à un suivi à grande échelle des phénomènes. On place une matrice de sources de lumière et de détecteurs sur la partie de l'échantillon à étudier, et on détecte la variation de l'intensité diffusée en différents points. Ceci permet de reconstruire en trois dimensions la propagation du signal électrique dans le système nerveux.

Cependant, ces deux techniques restent limitées en résolution spatiale.

Tableau I-1 : Comparaison entre les différentes techniques de mesures de champ électrique.

RS : résolution spatiale, RT : résolution temporelle, Sddp : sensibilité en terme de différence de potentiel.

Technique	Source	RS	RT	Sddp	Remarques générales
Pockels	CW 1305nm 3mW (Ou pulsé)	50 μ m	4ps	50 μ V	Fréquence radio et micro- onde
Kerr	He-Ne CW 0.5mW	0.8mm	--	<kV/mm	--
Franz-Keldysh	840nm 120fs 4pJ	1.5 μ m	>ps	<0.1kV/cm	--
Biréfringence	Lumière blanche	5mm	<10 ms	Bon S/B <10mV	--
fluorescence	488 ou 510nm	2 μ m	--	<10mV	colorant
SHG	Ti-Sa pulsé 940nm 12mW	0.6 μ m (20X 0.75ON)	<1ms	S/B=7 4mV	Colorant, photoblanchiment Moyenne de la réponse
NRIS	CW ou pulsé	Très grande surface	--	--	Sur des grandes dimensions
OCM	Ti-Sa pulsé 800nm	10-50 μ m	100 ms	Bon S/B	Moyenne de la réponse
Plasmon	635nm CW 5mW	100 μ m	<1ms	<1mV	Contact direct avec le métal
Diffusion	Lumière blanche 1mW	50- 100 μ m	<10 ms	<10mV	Moyenne de la réponse

I.III Une approche différente

Toutes les techniques décrites précédemment se sont révélées fiables et performantes. Il reste néanmoins divers problèmes à résoudre pour chacune de ces méthodes, soit en terme de résolution spatiale et/ou temporelle, ou en terme de sensibilité, ou encore relatifs à l'utilisation de fortes puissances optiques, susceptibles d'endommager l'échantillon. Certaines des observations optiques rapportées ci-dessus restent de plus difficiles à interpréter et méritent de plus amples investigations.

Il semble par ailleurs que l'un des effets les plus utilisés en optoélectronique n'ait pas encore été adopté pour l'étude de systèmes biologiques : il s'agit de l'effet électro-optique Pockels qui résulte d'une variation linéaire de l'indice de réfraction sous l'effet d'un champ électrique. Cette variation d'indice induit une variation de phase sur un faisceau sonde, qu'un interféromètre est capable de venir détecter. Dans le cas de l'effet Pockels, la variation de phase est proportionnelle au champ appliqué ainsi qu'aux coefficients électro-optiques mis en jeu. Si le champ est connu on peut alors caractériser les coefficients électro-optiques, et si les coefficients sont connus, remonter à la mesure du champ électrique.

La conception d'un tel système a déjà constitué le sujet de la thèse de Timothée Toury. Lors de ce travail, le principe du microscope a été validé dans le cas de modulateurs électro-optiques à base de polymères fonctionnalisés par des molécules non-linéaires. Ce microscope s'est avéré capable de relever quelques anomalies dans la distribution de la concentration de molécules orientées par champ électrique, en particulier une concentration au voisinage de l'électrode positif d'orientation, ce qui a pu être vérifié par microscopie de génération de seconde harmonique [4].

Cette thèse a pour but de valider complètement le principe du microscope électro-optique dans des milieux physiques différents et à repousser les limites de détection de ce microscope. Ce travail vise également à des applications en biophysique par l'étude de bicouches artificielles et de cellules.

Chapitre II : Microscopie électro-optique

II.I Partie Théorique

L'effet électro-optique Pockels, dont la découverte remonte à Friedrich Carl Alwin Pockels en 1893 [38], se manifeste par la variation de la biréfringence d'un milieu sous l'effet d'un champ électrique statique. L'effet Pockels se manifeste dans les milieux dépourvus de symétrie d'inversion, comme certains cristaux (Niobate de lithium, KTP, KDP...) ou des systèmes polymères fonctionnalisés par des colorants non-linéaires, orientés sous champ électrique. Pour mieux comprendre comment un champ électrique peut influencer l'indice de réfraction de certains matériaux, il faut remonter jusqu'à l'origine microscopique de cet effet [39-40].

II.I.1 Indice de réfraction

La lumière étant une onde électromagnétique, l'interaction de la lumière avec la matière peut être décrite en termes d'interaction du champ électrique avec les charges. Le champ de déplacement électrique est donné par [41] :

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} = \epsilon \vec{E} \quad (\text{II.1})$$

\vec{E} représente le champ électrique, et ϵ (respectivement ϵ_0) la perméabilité électrique du milieu (resp. du vide). \vec{P} est la densité de dipôle induite par le champ externe qui est elle-même en régime linéaire, proportionnelle au champ électrique. Par un calcul classique (ou quantique) l'interaction de la lumière avec les électrons des atomes permet d'évaluer les déplacements de charges induits sous champ. La somme des diverses contributions moléculaires introduira la notion d'un indice de réfraction de la matière. Si N représente le nombre d'atomes par unité de volume, la polarisation induite total est alors $\vec{P} = N \vec{P}$ qui s'écrit

$$\vec{P} = \varepsilon_0 N \alpha(\omega) \vec{E} \quad (\text{II.2})$$

Où α représente la polarisabilité linéaire des molécules. Dans le cas où le milieu est linéaire, la polarisation du milieu est proportionnelle au champ appliqué. On définit la susceptibilité linéaire macroscopique comme somme des polarisabilités atomiques, selon:

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi \vec{E} \quad (\text{II.3})$$

En introduisant l'expression de la polarisation dans les équations de Maxwell on fait apparaître l'indice de réfraction comme le rapport de la vitesse de l'onde dans le vide par rapport à celle dans le milieu. De ces équations on peut déduire

$$n^2 = 1 + \chi \quad (\text{II.4})$$

L'expression (II.1) du champ déplacement électrique devient alors

$$\vec{D} = \varepsilon_0 (1 + \chi) \vec{E} = \varepsilon_0 n^2 \vec{E} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \vec{E} \quad (\text{II.5})$$

Il est à noter que ε_r et n doivent être mesurés à la même fréquence pour que cette dernière relation soit valide. L'indice de réfraction résulte des dipôles induits dans le milieu, et se traduit au travers de l'indice de réfraction par un déphasage de la lumière traversant le milieu par rapport à une lumière non perturbée.

II.1.2 Milieu anisotrope

La partie précédente suppose un milieu isotrope pour lequel la réponse ne dépend pas de la direction du champ appliqué. Dans les milieux anisotropes, un calcul plus compliqué entre en jeu et l'expression (II.3) est généralisable sous la forme suivante :

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} = \varepsilon_0 \begin{bmatrix} \chi_{11} & \chi_{12} & \chi_{13} \\ \chi_{21} & \chi_{22} & \chi_{23} \\ \chi_{31} & \chi_{32} & \chi_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (\text{II.6})$$

Toutefois, il existe un référentiel pour lequel la dépendance de la polarisation est linéaire par rapport au champ existant dans la même direction.

$$\begin{bmatrix} P_X \\ P_Y \\ P_Z \end{bmatrix} = \epsilon_0 \begin{bmatrix} \chi'_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \chi'_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \chi'_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_X \\ E_Y \\ E_Z \end{bmatrix} \quad (\text{II.7})$$

Ce nouveau référentiel est relatif aux axes diélectriques principaux du milieu et les coefficients χ'_{ii} sont les susceptibilités linéaires correspondantes. L'expression (II.5) s'écrit alors en fonction des indices principaux

$$\begin{bmatrix} D_X \\ D_Y \\ D_Z \end{bmatrix} = \epsilon_0 \begin{bmatrix} n_{11}^2 & 0 & 0 \\ 0 & n_{22}^2 & 0 \\ 0 & 0 & n_{33}^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_X \\ E_Y \\ E_Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \epsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_X \\ E_Y \\ E_Z \end{bmatrix} \quad (\text{II.8})$$

Si deux de ces indices sont égaux alors le cristal est dit uniaxe. Lorsque les trois sont différents, on parle alors d'un cristal biaxe. Lorsque la lumière traverse un tel milieu, les indices qui gouvernent sa propagation dépendent de sa polarisation optique.

Considérons la densité d'énergie qui correspond à une onde qui traverse ce milieu

$$U = \frac{1}{2} \vec{D} \vec{E} = \frac{1}{2} \sum_{ij} \epsilon_{ij} E_i E_j \quad (\text{II.9})$$

Dans le système d'axe principal cette expression devient :

$$U = \frac{1}{2} \left[\frac{D_X^2}{\epsilon_{XX}} + \frac{D_Y^2}{\epsilon_{YY}} + \frac{D_Z^2}{\epsilon_{YY}} \right] \quad (\text{II.10})$$

Cette dernière expression montre que les surfaces équi-énergétiques dans l'espace relatif au vecteur \vec{D} , sont des ellipsoïdes. Une transformation des coordonnées suivante

$$X = \left(\frac{1}{2U} \right)^{\frac{1}{2}} D_X, \quad Y = \left(\frac{1}{2U} \right)^{\frac{1}{2}} D_Y, \quad Z = \left(\frac{1}{2U} \right)^{\frac{1}{2}} D_Z \quad (\text{II.11})$$

Aboutit à la forme normalisée

$$\frac{X^2}{\epsilon_{XX}} + \frac{Y^2}{\epsilon_{YY}} + \frac{Z^2}{\epsilon_{ZZ}} = 1 \quad (\text{II.12})$$

Dans sa forme la plus générale, relative à un système d'axes quelconques, cette surface devient :

$$\left(\frac{1}{n^2}\right)_{xx} x^2 + \left(\frac{1}{n^2}\right)_{yy} y^2 + \left(\frac{1}{n^2}\right)_{zz} z^2 + 2\left(\frac{1}{n^2}\right)_{yz} yz + 2\left(\frac{1}{n^2}\right)_{zx} zx + 2\left(\frac{1}{n^2}\right)_{xy} xy = 1 \quad (\text{II.13})$$

On remarque dans cette expression une commutativité entre les indices $\left(\frac{1}{n^2}\right)_{ij} = \left(\frac{1}{n^2}\right)_{ji}$.

Cette équation est celle de l'ellipsoïde des indices. Perpendiculairement à chaque direction de propagation de l'onde optique définie par son vecteur d'onde k , on obtient en section une ellipse dont les deux axes principaux définissent les deux indices de propagation permis pour cette direction ainsi que les directions propres de polarisation. Celles-ci sont indéfinies lorsqu'on se propage le long d'un des deux axes optiques, qui correspondent à des sections circulaires (une seule dans le cas d'un milieu uniaxe, deux pour un biaxe). Ceci a ouvert le champ considérable de l'optique singulier, la phase étant indéfinie le long de cette direction [42].

II.1.3 Polarisabilité non linéaire et effet Pockels

L'origine des effets d'optique non-linéaire, peut être trouvé dans le développement de la densité de polarisation de la matière en puissance du champ électrique. Dans l'approximation du dipôle électrique et de la réponse instantanée, cela s'écrit:

$$\begin{aligned} P_i(t) = & P_i^{(0)}(t) + \sum_j \int_{\tau>0} \tilde{\chi}_{ij}^{(1)}(\tau) E_j(t-\tau) d\tau + \sum_{jk} \iint_{\tau_1, \tau_2 > 0} \tilde{\chi}_{ijk}^{(2)}(\tau_1, \tau_2) E_j(t-\tau_1) E_k(t-\tau_2) d\tau_1 d\tau_2 \\ & + \sum_{jkl} \iiint_{\tau_1, \tau_2, \tau_3 > 0} \tilde{\chi}_{ijkl}^{(3)}(\tau_1, \tau_2, \tau_3) E_j(t-\tau_1) E_k(t-\tau_2) E_l(t-\tau_3) d\tau_1 d\tau_2 d\tau_3 + \dots \end{aligned} \quad (\text{II.14})$$

Les deux premiers termes correspondent respectivement à la polarisation spontanée et à l'effet optique linéaire. Les termes de degré plus élevé en champ, décrivent la réponse non-linéaire. Il faut noter que dans des matériaux qui possèdent une symétrie d'inversion, la nature vectorielle de la polarisation et des champs électriques induit une valeur nulle de la susceptibilité d'ordre deux $\tilde{\chi}^{(2)}$, ainsi que de toutes les susceptibilités de rang pair. Alors, le tenseur $\tilde{\chi}^{(2)}$ n'existe que pour les milieux présentant une non-centrosymétrie. Cette non

centrosymétrie doit se présenter au niveau microscopique mais également macroscopique. Cela exige un certain degré d'organisation dans le système pour que la somme des effets des différentes non-linéarités ne s'annule pas. En effet la susceptibilité non-linéaire macroscopique est liée aux propriétés optiques non-linéaires des molécules individuelles par le biais d'un modèle de gaz orienté [39-40]. En analogie avec l'équation (II.14), la polarisabilité moléculaire est donnée par :

$$\begin{aligned}
p_I(t) = & \mu_I^0 + \sum_J \int_{\tau>0} \tilde{\alpha}_{IJ}(\tau) E_J(t-\tau) d\tau + \sum_{J,K} \iint_{\tau_1, \tau_2 > 0} \tilde{\beta}_{IJK}(\tau_1, \tau_2) E_J(t-\tau_1) E_K(t-\tau_2) d\tau_1 d\tau_2 \\
& + \sum_{J,K,L} \iiint_{\tau_1, \tau_2, \tau_3 > 0} \tilde{\gamma}_{IJKL}(\tau_1, \tau_2, \tau_3) E_J(t-\tau_1) E_K(t-\tau_2) E_L(t-\tau_3) d\tau_1 d\tau_2 d\tau_3 + \dots
\end{aligned} \tag{II.15}$$

où μ_I^0 est le moment dipolaire de la molécule dans son état fondamental, $\tilde{\alpha}_{IJ}$ est la polarisabilité linéaire, $\tilde{\beta}_{IJK}$ et $\tilde{\gamma}_{IJKL}$ les susceptibilités non-linéaires ou hyperpolarisabilités.

On procède ensuite à une transformée de Fourier multiple qui transforme les expressions tensorielles dépendantes des retards en expressions dépendantes des fréquences. La susceptibilité d'ordre deux macroscopique par exemple devient $\chi^{(2)}(-\omega_3; \omega_1, \omega_2)$, ω_3 étant la fréquence obtenue par mixage des fréquences incidentes ω_1 et ω_2 , tout en respectant la conservation d'énergie $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$.

La susceptibilité macroscopique est déduite par sommation des différentes contributions des polarisabilités moléculaires, tout en prenant en compte le facteur de champ local et la distribution d'orientation dans la cellule unité. La susceptibilité moléculaire d'ordre deux est alors reliée alors à l'hyperpolarisabilité moléculaire par l'expression suivante:

$$\chi_{ijk}^{(2)}(-\omega_3; \omega_1, \omega_2) = N f_i^{\omega_3} f_j^{\omega_1} f_k^{\omega_2} \sum_{IJK} \sum_{s=1}^n \cos[i, I(s)] \cos[j, J(s)] \cos[k, K(s)] \beta_{IJK}(s) \tag{II.16}$$

où la sommation est faite sur n molécules dans la cellule unité, N est la densité des cellules unités, et $f_i^{\omega_3}$, $f_j^{\omega_1}$ et $f_k^{\omega_2}$ sont les facteurs de champs locaux pour les différentes fréquences. Les termes en cosinus permettent la transformation des axes moléculaires dans le système d'axe macroscopique. Il est clair qu'une organisation statistique des molécules non-linéaires est nécessaire pour obtenir un effet de second degré non nul.

II.1.3.A Effet Pockels

Nous ne nous intéressons ici qu'au premier terme non linéaire, c.à.d. d'ordre deux. Ce terme comporte deux composantes de champ. Si un de ces champs se situe dans le spectre optique

et que l'autre champ correspond à une fréquence quasi-statique Ω , appliquée par des électrodes appropriées par exemple, et en tenant compte des différentes notations, l'expression de la polarisation d'ordre deux s'écrit :

$$P_i^{Pockels} = P_i^{(2)}(\omega + \Omega) + P_i^{(2)}(\omega - \Omega) \quad (\text{II.17})$$

soit

$$\begin{aligned} P_i^{Pockels} &= \varepsilon_0 \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega + \Omega; \omega, \Omega) E_j(\omega) E_k(\Omega) + \varepsilon_0 \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega - \Omega; \omega, -\Omega) E_j(\omega) E_k(-\Omega) \\ &= \varepsilon_0 2 \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega + 0; \omega, 0) E_j(\omega) E_k(0) \end{aligned} \quad (\text{II.18})$$

La polarisation totale devient

$$P_i = \varepsilon_0 \sum_j \chi_{ij}^{(1)} E_j(\omega) + 2\varepsilon_0 \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega + \Omega; \omega, \Omega) E_j(\omega) E_k(\Omega) + \dots \quad (\text{II.19})$$

La contraction partielle du tenseur $\chi^{(2)}$ par le champ quasi-statique E^Ω est un opérateur linéaire qui s'ajoute à la susceptibilité linéaire $\chi^{(1)}$. Ceci aboutit à une distorsion du tenseur de susceptibilité linéaire, ce qui se traduit par un changement d'indice de réfraction proportionnel au champ électrique. Cet effet est connu sous le nom d'**effet électro-optique linéaire ou Pockels**.

Selon le même raisonnement que dans la partie II.I.2 cet effet se traduit par une distorsion de l'ellipsoïde des indices, dont l'équation devient alors:

$$\left(\frac{1}{n^2}\right)'_{xx} x^2 + \left(\frac{1}{n^2}\right)'_{yy} y^2 + \left(\frac{1}{n^2}\right)'_{zz} z^2 + 2\left(\frac{1}{n^2}\right)'_{yz} yz + 2\left(\frac{1}{n^2}\right)'_{zx} zx + 2\left(\frac{1}{n^2}\right)'_{xy} xy = 1 \quad (\text{II.20})$$

Par rapport à l'équation de l'ellipsoïde des indices sans champ appliqué, la variation des indices est proportionnelle au champ électrique et le facteur de proportionnalité correspondant est connu sous le nom de coefficient électro-optique :

$$\Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)'_{ij} = \left(\frac{1}{n^2}\right)'_{ij} - \left(\frac{1}{n^2}\right)_{ij} = \sum_k r_{ijk} E_k \quad (\text{II.21})$$

Ces coefficients r_{ijk} forment un tenseur d'ordre trois qui dérive lui-même du tenseur de la susceptibilité non linéaire $\chi^{(2)}$ [43-44]:

$$r_{ijk}(-\omega; \omega, 0) = -\frac{2}{\epsilon_{ii}\epsilon_{jj}} \chi_{ijk}^{(2)}(-\omega; \omega, 0). \quad (\text{II.22})$$

Comme une commutativité existe entre les deux premiers coefficients ij du tenseur électro-optique une contraction d'indice peut être effectuée, et on peut réduire le nombre d'indices apparents à deux, de façon à simplifier les notations selon le tableau conventionnel suivant [2] :

Tableau II-1 : Tableau des indices contractés

indice	ij	11	22	33	23	31	12
Indice contracté	l	1	2	3	4	5	6

Le tenseur d'ordre trois devient un tableau de (6×3) éléments, dont la forme générale est

$$r = \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} \\ r_{41} & r_{42} & r_{43} \\ r_{51} & r_{52} & r_{53} \\ r_{61} & r_{62} & r_{63} \end{bmatrix} \quad (\text{II.23})$$

Selon la symétrie du système et le choix des axes certains éléments de la matrice peuvent être égaux, opposés ou encore s'annuler. Une des propriétés importantes de cet effet est son lien étroit avec la symétrie du milieu qu'on peut voir comme une propriété d'anisotropie supérieure.

II.1.3.B Déphasage électro-optique :

Un changement d'indice d'un milieu entraîne nécessairement un changement du déphasage optique subi au travers de la propagation dans le milieu déphasant. Un déphasage optique aura alors deux composantes : l'une dite normale et l'autre à caractère électro-optique. L'expression générale d'un tel déphasage est donné par :

$$\varphi = \varphi_0 + \Delta\varphi_{EO} = \frac{2\pi}{\lambda} n e + \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n e \quad (\text{II.24})$$

la partie électro-optique donnée par :

$$\Delta\varphi_i = -\frac{\pi}{\lambda} n_i^3 e \sum_j r_{ij} E_j^\Omega . \quad (\text{II.25})$$

II.II Partie expérimentale : Microscope Électro-optique

L'effet Pockels correspondant à une variation d'indice sous l'effet d'un champ électrique quasi-statique, la variation de phase d'un faisceau traversant un tel milieu électro-optique peut être détectée et permettre de remonter en principe au champ électrique. La méthode classique consiste à faire interférer un faisceau de référence avec un faisceau sonde traversant l'échantillon. Au niveau microscopique, et pour des études électro-optiques de films minces voire des nanoparticules, on aura affaire à de faibles effets de phase. Des améliorations devront être conçues et mises en œuvre pour améliorer la sensibilité d'un tel interféromètre.

Dans cette partie, la microscopie électro-optique utilisée pour l'étude de l'effet Pockels à l'échelle micrométrique est décrite. Une extension à l'échelle nanométrique sera présentée au chapitre IV, dans le cadre de l'étude de l'effet Pockels de nanocristaux de KTP. Le microscope est constitué d'un interféromètre de type Mach-Zhender dans lequel une détection homodyne équilibrée et une détection synchrone sont implémentées afin de maximiser le rapport signal – sur – bruit pour la détection des faibles effets. Le développement de ce microscope a constitué le travail d'une thèse antérieure qui s'est poursuivi tout au long de la présente thèse. Bien que le principe de fonctionnement n'ait pas changé, des améliorations au niveau du bruit, de la stabilisation et du contrôle ont été menées à bien, et d'autres voies de détections ont été élaborées.

II.II.1 Principe générale

II.II.1.A Détection Homodyne équilibrée

Une méthode performante pour détecter une très faible information dans un faisceau laser est de le faire interférer avec un faisceau plus intense de même fréquence. Cette méthode est appelée détection homodyne équilibrée. La Figure II-1 illustre schématiquement son principe.

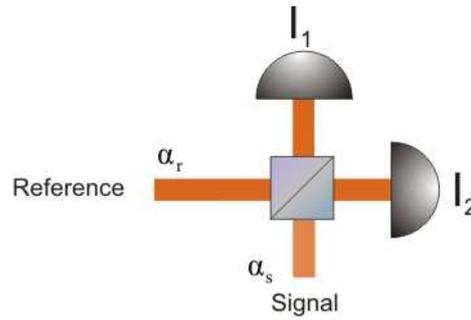


Figure II-1 : principe de la détection homodyne : on combine un faisceau de référence de forte intensité avec un faisceau signal de faible intensité portant l'information dans un cube séparateur. Les deux faisceaux de sortie sont détectés par deux photodiodes.

En effet, si le signal (resp. la référence) a une amplitude α_s (resp. α_r), et si on mélange ces deux faisceaux par un cube séparateur en intensité ou par une simple lame semi réfléchissante, alors les deux faisceaux à la sortie auront les deux amplitudes suivantes :

$$\begin{aligned}\alpha_1 &= \frac{1}{\sqrt{2}}(\alpha_r + \alpha_s), \\ \alpha_2 &= \frac{1}{\sqrt{2}}(\alpha_r - \alpha_s).\end{aligned}\tag{II.26}$$

Les deux intensités lumineuses correspondantes sont :

$$\begin{aligned}I_1 &= \frac{1}{2}|\alpha_r + \alpha_s|^2 \\ I_2 &= \frac{1}{2}|\alpha_r - \alpha_s|^2\end{aligned}\tag{II.27}$$

Pour remonter au terme d'interférence entre les deux faisceaux, il suffit de faire la différence entre les deux photo-courants

$$i_- = \rho_1 I_1 - \rho_2 I_2\tag{II.28}$$

Ici, nous avons introduit le rendement quantique des deux photodiodes (ρ_1 et ρ_2), et on va supposer que les deux rendements sont égaux. Pour des raisons de simplification nous allons raisonner dans la suite en termes d'intensité optique. La différence d'intensité s'écrit

$$I_- = 2 \operatorname{Re}[\alpha_r \alpha_s^*]\tag{II.29}$$

Si une perturbation apparaît sur la voie signal à la suite d'un effet du déphasage, l'interférence fait qu'une fluctuation de l'intensité de la différence des photo-courants sera alors détectée.

$$\Delta I_- = 2 \operatorname{Re} \left[\Delta \alpha_r \alpha_s^* + \alpha_r \Delta \alpha_s^* \right] \quad (\text{II.30})$$

Dans le cadre d'une détection homodyne équilibrée, le faisceau de référence est beaucoup plus intense que la faisceau signal, c'est à dire $\alpha_r \gg \alpha_s$. Dans ce cas l'expression (II.30) devient

$$\Delta I_- = 2 \operatorname{Re} \left[\alpha_r \Delta \alpha_s^* \right] \quad (\text{II.31})$$

En introduisant des déphasages optiques entre les deux voies, résultant soit d'une variation de la différence de marche optique sur la voie référence ϕ_r , soit du déphasage électro-optique sous l'effet d'un champ électrique $\Delta \varphi_{EO}$ dans la voie signal, l'expression de ces fluctuations peut être écrite comme suit :

$$\Delta I_- = 2 \operatorname{Re} \left[\overline{\alpha_r} \overline{\alpha_s} e^{i(\phi_r - \Delta \varphi_{EO})} \right] = 2 \overline{\alpha_r} \overline{\alpha_s} \cos(\phi_r - \Delta \varphi_{EO}) \quad (\text{II.32})$$

Nous avons utilisé les notations $\alpha_r = \overline{\alpha_r} e^{i\phi_r}$ et $\Delta \alpha_s = \overline{\alpha_s} e^{-i\Delta \varphi_{EO}}$. C'est ici le terme $\Delta \varphi_{EO}$, portant l'information relative au déphasage électro-optique, qui nous intéresse. Suivant la valeur de ϕ_r , plusieurs mesures sont envisageables, notamment quand $\phi_r = \pi/2$. Dans ce cas, et si le déphasage électro-optique $\Delta \varphi_{EO}$ est très faible, l'expression (II.32) devient

$$\Delta I_- = 2 \overline{\alpha_r} \overline{\alpha_s} \sin(\Delta \varphi_{EO}) \approx 2 \overline{\alpha_r} \overline{\alpha_s} \Delta \varphi_{EO} \quad (\text{II.33})$$

On remarque que le signal EO est alors détecté directement comme une variation ΔI_- de la différence d'intensité I_- détectée.

Un autre cas pertinent correspond à un déphasage statique pour à $\phi_r = 0$. Dans ce cas, toute fluctuation de l'intensité due à une absorption ($\Delta \overline{\alpha_s} < 0$) ou émission ($\Delta \overline{\alpha_s} > 0$) influencé par un champ électrique est mesurable. Ces deux cas seront détaillés ultérieurement dans la partie "Détection synchrone".

II.II.1.B Boucle d'asservissement

Pour stabiliser et optimiser la différence de phase statique entre les deux bras de l'interféromètre, une boucle de rétroaction permet d'asservir la position d'un miroir monté sur deux cales piézo-électriques. L'une d'elles compense pour les bruits faibles amplitudes hautes fréquences, l'autre pour les bruits de fortes amplitudes aux basses fréquences.

Le circuit de contrôle de ces cales est alimenté par le signal basse fréquence provenant de la différence des courants des photodiodes, ce qui permet en conséquence de compenser toute dérive d'ordre mécanique vibrationnel ou thermique. Cette dernière classe étant à des fréquences inférieures à 2KHz, on limite le signal de commande à une fréquence de coupure de l'ordre de 2KHz.

Une fois ce réglage effectué, on peut observer une stabilisation des signaux issus des deux photodiodes, un autre potentiomètre permettant de régler la position de la deuxième cale piézoélectrique. On fixe ainsi la différence de phase statique entre les deux voies optiques signal et référence : $\phi_r = \pi/2$ correspond à un signal statique égal sur les deux photodiodes, alors que $\phi_r = 0$ correspond à un signal maximal sur une des photodiodes et minimal sur l'autre. L'intérêt de chacun de ces deux cas sera illustré dans la partie suivante.

II.II.1.C Détection synchrone

A de très basses fréquences existent des bruits électroniques importants qui gênent la mesure de tout type d'effet statique. Au signal de la différence des photo-courants des deux photodiodes, s'ajoute un bruit $b^0(t)$ à la fréquence nulle 0. L'expression (II.32) devient alors :

$$\Delta I_- = 2 \overline{\alpha_r} \overline{\alpha_s} \cos(\phi_r - \Delta\varphi_{EO}) + b^0(t) \quad (\text{II.34})$$

Une façon de contourner les inconvénients associés à ces bruits aux très basses fréquences, est l'utilisation d'une détection synchrone. Le principe est de multiplier le signal à basse fréquence (ou continu) par une porteuse à une "haute" fréquence (Ω) éloignée de celle des bruits électroniques. Comme l'effet électro-optique est dû à un champ électrique, il suffit de moduler le champ électrique appliqué à l'échantillon à la fréquence quasi-statique Ω . Le déphasage EO prend alors la forme suivante :

$$\Delta\varphi_{EO} = \varphi_0 \cos(\Omega t + \theta_1) \quad (\text{II.35})$$

où θ_1 est une phase à l'origine. Certains échantillons peuvent subir une variation d'absorption ou d'émission sous l'effet d'un champ électrique. Cela peut jouer un rôle dans le signal final en terme de variations d'intensités détectées. Ces variations vont aussi être modulées à la même fréquence que le champ appliqué et se traduisent par une variation supplémentaire $\Delta\bar{\alpha}_s$ qui s'ajoute à l'amplitude optique sur la voie signal.

$$\bar{\alpha}_s = \bar{\alpha}_s + \Delta\bar{\alpha}_s(\Omega) = \bar{\alpha}_s + \bar{\alpha}_{s0} \cos(\Omega t + \theta_2) \quad (\text{II.36})$$

Comme nous l'avons expliqué ci-dessus, deux points de fonctionnement du déphasage statique sont intéressants : $\phi_r = \pi/2$ et $\phi_r = 0$.

- Cas $\phi_r = \pi/2$:

Dans ce cas l'expression (II.34) devient $\Delta I_- = 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_s \cos(\pi/2 - \Delta\varphi_{EO}) + b^0(t)$
 $= 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_s \sin(\Delta\varphi_{EO}) + b^0(t)$.

Comme $\Delta\varphi_{EO} \ll 1 \text{ rad}$ alors

$$\Delta I_- \approx 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_s \Delta\varphi_{EO} + b^0(t) \quad (\text{II.37})$$

En développant on obtient :

$$\begin{aligned} \Delta I_- &= 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_s \Delta\varphi_{EO} + 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_{s0} \Delta\varphi_{EO} \cos(\Omega t + \theta_2) + b^0(t) \\ &= 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_s \varphi_0 \cos(\Omega t + \theta_1) + 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_{s0} \varphi_0 \cos(\Omega t + \theta_1) \cos(\Omega t + \theta_2) + b^0(t) \\ &= 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_s \varphi_0 \cos(\Omega t + \theta_1) + 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_{s0} \varphi_0 \cos(\theta_1 - \theta_2) + 2 \bar{\alpha}_r \bar{\alpha}_{s0} \varphi_0 \cos(2\Omega t + \theta_1 + \theta_2) + b^0(t) \end{aligned} \quad (\text{II.38})$$

Le signal ΔI_- est ensuite multiplié par le signal de référence R à la même fréquence Ω au niveau de la détection synchrone.

$$R = A \cos(\Omega t) \quad (\text{II.39})$$

Le produit de (II.39) par (II.38) s'écrit :

$$\begin{aligned}
 \Delta I_- * R = & \underbrace{2A\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_s\varphi_0 \cos(\theta_1)}_{DC} \\
 & + b^0(t)A \cos(\Omega t) + 2A\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_{s0}\varphi_0 \cos(\theta_1 - \theta_2) \cos(\Omega t) \\
 & \underbrace{+ 2A\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_{s0}\varphi_0 \cos(\Omega t + \theta_1 + \theta_2)}_{\Omega} \\
 & \underbrace{+ 2A\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_s\varphi_0 \cos(2\Omega t + \theta_1) + 2A\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_{s0}\varphi_0 \cos(3\Omega t + \theta_1 + \theta_2)}_{2\Omega}
 \end{aligned} \tag{II.40}$$

Plusieurs fréquences apparaissent dans l'expression du produit final. On remarque surtout le déplacement du bruit initialement à très basse fréquences vers la fréquence de multiplication, et le retour du signal EO vers les fréquences DC. Une partie du signal associée à la variation de l'amplitude optique sous l'effet d'un changement d'émission ou d'absorption est aussi déplacé vers des fréquences plus hautes. Un filtre passe bas sélectionnera à la fin la partie DC, qui permettra de mesurer la valeur φ_0 du déphasage EO.

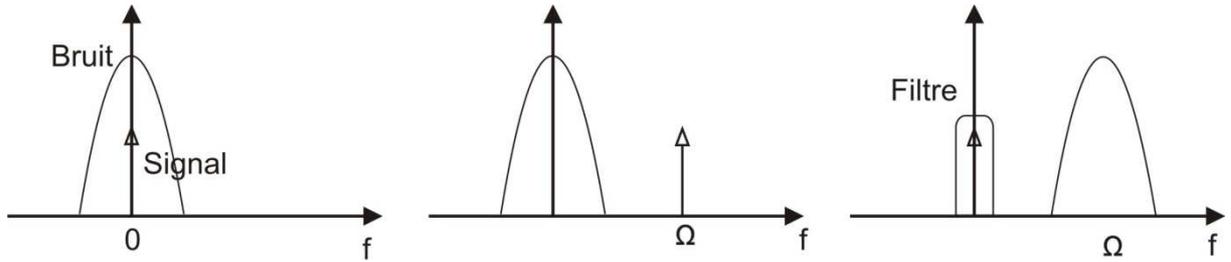


Figure II-2 : Principe de la détection synchrone. (à gauche) le signal DC est noyé par le bruit ; (milieu) On éloigne le signal de la zone bruité en le modulant à haute fréquence ; (droite) en multipliant par un signal référence à la même fréquence on ramène la signal à la zone DC et on le sélectionne par un filtre spécifique.

- Cas $\phi_r = 0$:

Dans ce cas l'expression (II.34) devient $\Delta I_- = 2\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_s \cos(\Delta\varphi_{EO}) + b^0(t)$, et comme $\Delta\varphi_{EO} \ll 1 \text{ rad}$ alors

$$\Delta I_- \approx 2\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_s + b^0(t) = 2\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_s + 2\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_{s0} \cos(\Omega t + \theta_2) + b^0(t) \tag{II.41}$$

On constate directement l'absence de la contribution EO dans la fluctuation de l'intensité optique. La multiplication grâce à la détection synchrone, par la référence R à la même fréquence Ω donne l'expression suivante :

$$\begin{aligned}
 \Delta I_- * R = & 2A\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_s \cos(\Omega t) + 2A\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_{s0} \cos(\theta_2) \\
 & + 2A\bar{\alpha}_r\bar{\alpha}_{s0} \cos(2\Omega t + \theta_2) + Ab^0(t) \cos(\Omega t)
 \end{aligned} \tag{II.42}$$

Le bruit est déplacé vers les hautes fréquences alors que la variation d'intensité sous l'effet de la variation de l'émission ou de l'absorption $\bar{\alpha}_{s_0}$ est ramenée à des basses fréquences. Cette variation d'intensité, proportionnelle à $\bar{\alpha}_{s_0}$, pourra éventuellement être sélectionnée par un filtre passe bas.

II.II.2 Réalisation du montage expérimental

Cette partie décrit le schéma expérimental du microscope électro-optique et sa réalisation technique. Les composants les plus importants de types mécanique, électrique, optique et quelques détails sur l'acquisition des données y sont décrits.

II.II.2.A Description générale du montage expérimental

La structure du microscope électro-optique a subi plusieurs améliorations, qui ont permis d'obtenir une structure versatile avec plusieurs voies de détection possibles. Selon le type d'échantillon étudié, deux configurations respectives verticale ou horizontale ont été montées. En effet, pour l'étude de membranes ou de cellules, l'échantillon en milieu humide ne peut être qu'horizontal, ce qui complique le trajet du faisceau sonde et limite dans une certaine mesure, la stabilité du microscope. Dans la mesure du possible, on privilégie donc une configuration avec un échantillon vertical où le trajet horizontal du faisceau sonde n'est pas dévié. Le gain en stabilité nous a permis par exemple d'étudier l'effet Pockels d'une nanoparticule unique (cf. chapitre IV).

L'interféromètre, montré en Figure II-1, fonctionne comme suit ; Le faisceau d'un laser HeNe à 632.8nm est divisé en deux à l'aide d'un cube séparateur en polarisation. La partie réfléchiée polarisée verticalement sert de faisceau de référence alors que l'autre partie transmise et moins intense passe au travers l'échantillon et constitue le faisceau signal. Une lame demi-onde placée avant ce cube permet de contrôler l'intensité relative sur les deux voies.

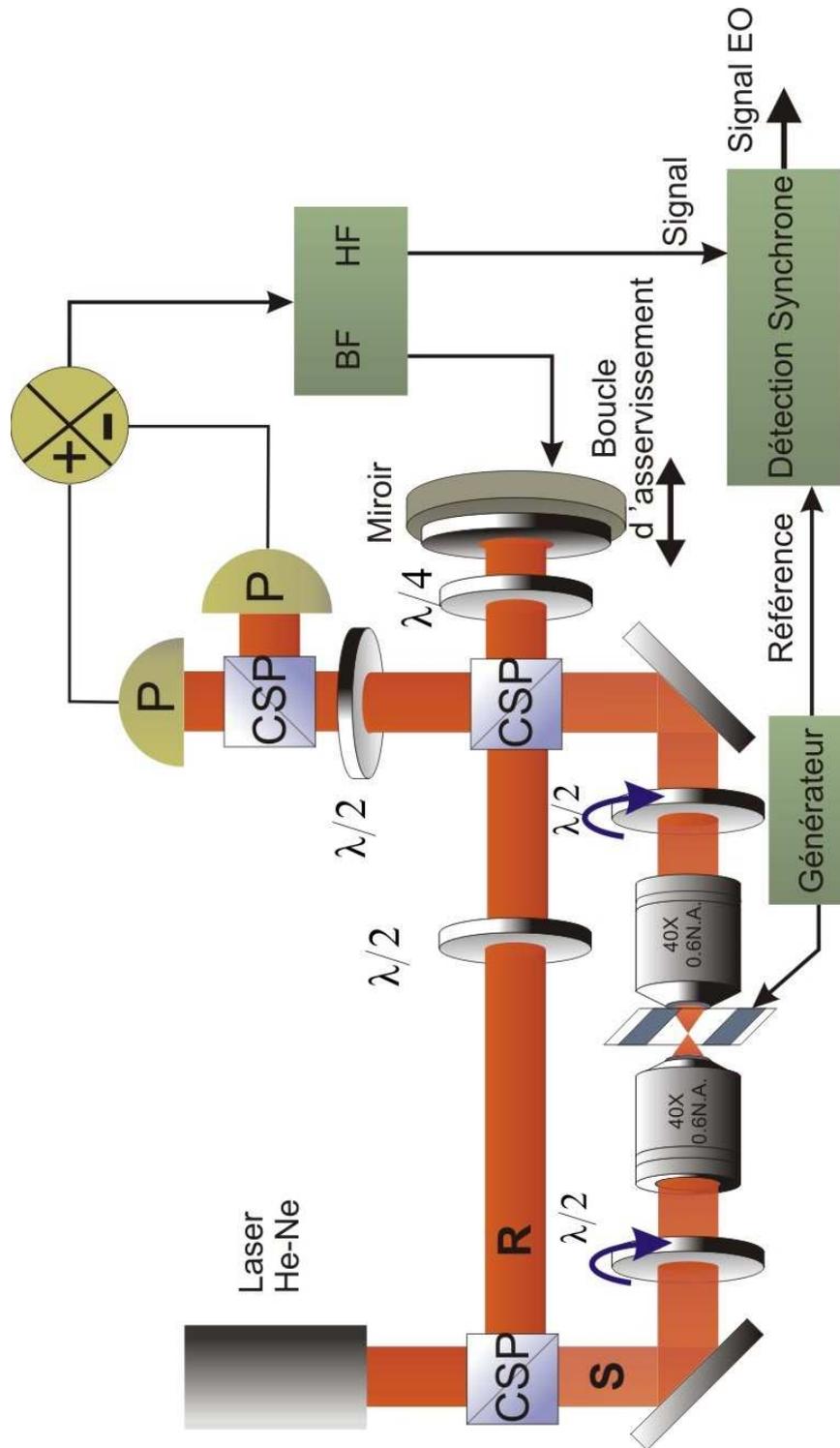


Figure II-3 Schéma principe du microscope électro-optique .

Deux configurations de la voie signal sont possibles (non montré dans la Figure II-1) ; l'échantillon pouvant être placé horizontalement ou verticalement, un miroir permettant de basculer le faisceau dans l'une ou l'autre des configurations.

La première configuration nécessite un axe optique vertical commun aux objectifs de microscope. Pour cela des pièces mécaniques et opto-mécaniques type *Newport* ont été employées pour construire un système élévateur stable (tour). Notons que la configuration historique était verticale, mais la "tour" fabriquée manuellement, bien que compacte, souffrait d'une instabilité, d'une difficulté d'accès, et d'un désalignement fréquent des deux objectifs du microscope. La configuration actuelle bien qu'elle soit moins compacte offre une large liberté de manœuvre, plus de degrés de liberté, ainsi qu'une bonne reproductibilité des mesures.

La deuxième configuration verticale utilise des objectifs ayant un axe optique commun horizontal sur le banc optique. Cette configuration bien stable est utilisée pour les études d'échantillons physiques tels que des modulateurs électro-optiques.

Dans ces deux configurations, deux lames demi-onde dont les deux rotations sont contrôlées par des moteurs tournants peuvent être placées de part et d'autre des objectifs. La première configuration permet de faire varier la polarisation de la lumière traversant l'échantillon, alors que la seconde restitue une polarisation horizontale (en l'absence d'effet optique anisotrope entre les deux lames). Deux autres miroirs acheminent le faisceau signal à travers un deuxième cube séparateur en polarisation afin de réaliser l'interférence avec le faisceau de référence.

Sur la voie de référence une lame demi-onde placée à 45° de l'horizontale fait tourner la polarisation initialement verticale de la référence en horizontale (Figure II-4). Cette polarisation est ensuite transmise à travers le deuxième cube séparateur. Une lame quart-d'onde transforme la polarisation rectiligne en polarisation circulaire droite qui se réfléchit en circulaire gauche sur un miroir perpendiculaire au faisceau. En traversant de nouveau la lame quart-onde la polarisation circulaire gauche se transforme en polarisation linéaire verticale. Cette dernière est réfléchiée par le cube séparateur en polarisation. Ce bras a pour but de contrôler la phase relative entre les deux faisceaux, référence et signal. En effet ce miroir est placé sur deux platines piézo-électriques contrôlées par un circuit électrique qui permet d'asservir le déphasage statique entre les deux voies de l'interféromètre. La Figure II-4 illustre les différentes polarisations après passage par les différents composants optiques.

Après le cube CSP1, les deux faisceaux référence et signal sont superposés spatialement mais avec deux polarisations perpendiculaires. Une lame demi-onde placée derrière le deuxième cube séparateur permet de tourner la polarisation des deux faisceaux de 45° . Ensuite un dernier cube séparateur en polarisation CSP2, assure l'interférence en projetant la polarisation de chaque faisceau, initialement à 45° , sur les deux directions perpendiculaires horizontale et verticale.

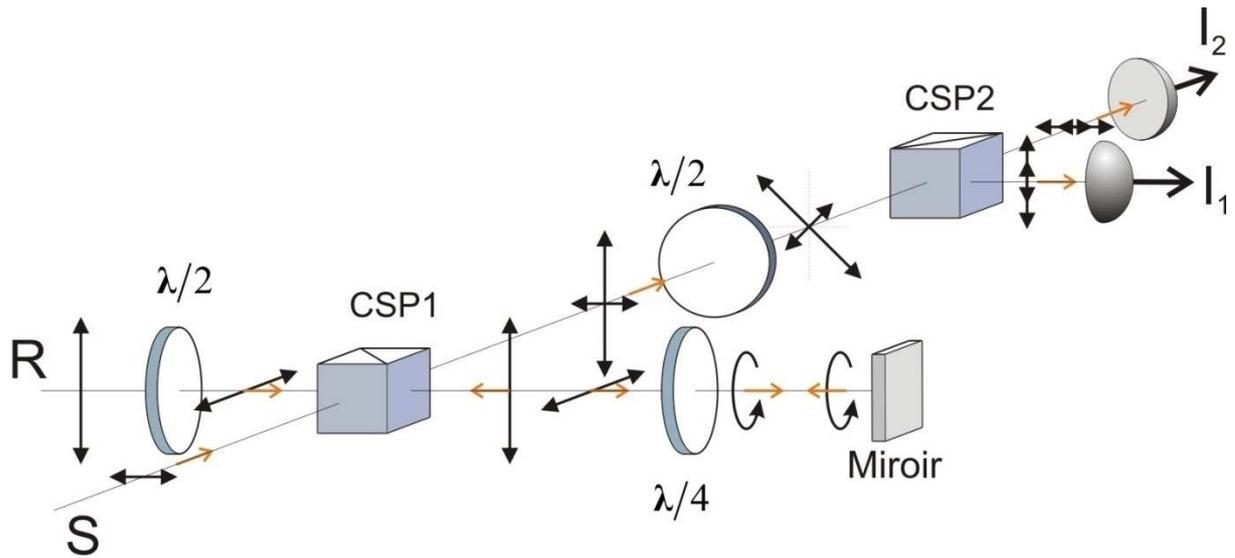


Figure II-4 Jeu de polarisation mis en œuvre pour le contrôle de phase statique entre les deux voies signal et référence avant la séparation sur les deux photodiodes.

Deux photodiodes récupèrent le signal optique de l'interférence et le transforment en deux photo-courants i_1 et i_2 contenant des basses et hautes fréquences. Le signal basse fréquence est utilisé pour commander la boucle d'asservissement de la phase statique, alors que les deux signaux hautes fréquences des deux photodiodes, incluant la fréquence Ω de la modulation EO, sont soustraits avant d'être envoyés vers une détection synchrone. En effet, le champ électrique appliqué sur l'échantillon est modulé à une "haute" fréquence Ω (de quelques dizaine de kHz). Une modulation de l'effet électro-optique à la même fréquence Ω est produite, induisant une modulation du signal d'interférence à la même fréquence. La détection synchrone multiplie la différence du signal électrique par un signal de référence à la même fréquence et donne comme résultat, après filtrage BF, un signal proportionnel au déphasage électro-optique.

II.II.2.B Détails techniques du montage

La réalisation expérimentale des différents points abordés ci-dessus aboutit à un système compact et performant. Tout au long de cette thèse des améliorations ont été menées sur le microscope électro-optique. De nouveaux composants électroniques et optiques ont été ajoutés, afin de le rendre plus maniable et étendre ses applications dans le domaine biophysique. Cette partie présente la configuration actuelle de l'ensemble des composants du microscope électro-optique. La Figure II-5 représente la dernière version du montage expérimental.

II.II.2.B.(i) Source de lumière

Comme l'effet électro-optique Pockels est non-résonnant et ne nécessite pas l'utilisation d'un laser pulsé contrairement aux expériences de seconde harmonique dépendant du champ ou de fluorescence dépendant du voltage, un simple laser He-Ne continu et de faible puissance suffit pour de telles mesures. Par contre il s'est révélé important d'avoir un laser stable en fréquence et en intensité ; des expériences menées avec un laser HeNe multimode ayant une longue cavité, et avec des lasers non stabilisés, ont montré que le battement de fréquences durant un saut de mode peut entraîner un bruit très important au niveau de notre détection.

Nous avons donc opté pour un He-Ne (*REO*) 632.8nm, monomode en fréquence, TEM₀₀, polarisé rectilignement avec une puissance de sortie de 1,5mW. La stabilité en intensité est de $\pm 0,2\%$ sur une heure alors que celle en fréquence est de $\pm 1\text{MHz}$ pour la même durée. Le faisceau laser traverse un isolateur optique empêchant tout retour vers la cavité qui peut induire une instabilité. Il est ensuite épuré par un filtrage spatial et élargi avec un système afocal de façon à couvrir la pupille d'entrée des objectifs de microscope. L'ensemble assure une bonne qualité du faisceau ainsi qu'une stabilité suffisante durant l'acquisition.

II.II.2.B.(ii) Opto-mécanique

Les pièces mécaniques et les supports d'optique ont été acquis chez *Thorlabs* et *Newport*. La tour est majoritairement conçue avec des pièces de la société *Newport*. Les bancs optiques ont été achetés chez *OWIS*. Ces derniers permettent un alignement optique facile et rapide. Pour une plus grande stabilité de l'interféromètre, la hauteur du faisceau est fixée à 6,5 cm. D'autres pièces d'ajustement ont été réalisées à l'atelier de mécanique de l'ENS et du département de physique.

II.II.2.B.(iii) Les optiques

Les composants optiques utilisés sont traités à 632nm à l'exception des objectifs de microscope qui sont large bande. Les lames d'ondes sont fabriquées par *Fichou* alors que les

cubes séparateurs en polarisation proviennent de la société *Melles Griot. Thorlabs* a fournis les cubes séparateurs en intensité.

II.II.2.B.(iv) Les photodiodes

Les photodiodes sont fabriquées par *Hamamatsu*. Ces photodiodes silicium à large bande passante (500MHz) possèdent une surface effective de $0,5 \text{ mm}^2$ permettant une bonne facilité d'alignement. Elles sont associées à des convertisseurs courant-tension. Le signal est ensuite séparé en basse et haute fréquence. Un détecteur auto-équilibré "Nirvana" pourra être utilisé ponctuellement au lieu de ce circuit, mais les résultats présentés ici ont été obtenus avec le circuit électrique décrit précédemment.

II.II.2.B.(v) Détection Sychrone

La détection synchrone est numérique (*EG&G princeton applied research model 5302*). Le signal HF provenant de la différence des signaux des deux photodiodes ΔI_- est multiplié par le signal de référence du générateur permettant d'appliquer un champ électrique modulé sur l'échantillon. L'amplitude et la phase par rapport à cette référence sont données en sortie.

II.II.2.B.(vi) Les objectifs du microscope :

L'aspect microscopique de l'interféromètre nécessite la focalisation du faisceau sur une tache limitée par la diffraction. Cela est réalisé par deux objectifs de microscope placés de part et d'autre de l'échantillon : le premier sert à focaliser le faisceau incident, l'autre à recollimater le faisceau de sortie. Par contre on a intérêt à avoir un front d'onde plan au niveau du point focal de l'objectif du microscope. Un compromis entre grossissement et ouverture numérique est obtenu par l'utilisation de deux objectifs de microscope Nikon $40\times$ O.N. 0,6 à air.

La résolution obtenue est de

$$R = 1.22 \frac{\lambda}{2 \times N.A} \quad (\text{II.43})$$

soit une tache de focalisation de $1.22\mu\text{m}$ de diamètre pour une longueur d'onde de $632,8\text{nm}$. Deux autres objectifs Nikon $40\times$ O.N. 0,8 à immersion d'eau sont aussi utilisés dans le cadre de mesures sur des échantillons biologiques ou biomimétiques (par exemple durant une mesure par patch clamp sur une cellule vivante, voir chapitre VI).

II.II.2.B.(vii) Image en lumière blanche

Les images en lumière blanche sont obtenues avec une caméra couleur CCD (modèle IDS UI-2220-C-HQ commandé chez IMASYS) placée au point focal d'une lentille de distance

focale de 20 cm située en aval de l'objectif du microscope. Un miroir escamotable (flip-flop) situé juste après les objectifs permet de basculer la lumière sur la caméra. Un autre oculaire rend aussi possible la visualisation à l'œil nu.

II.II.2.B.(viii) Platine piézoélectrique

Pour balayer la position du point focal à travers l'intégralité de l'échantillon et obtenir ainsi une cartographie de la réponse électro-optique, l'échantillon est monté sur une platine piézo-électrique *PiezoJena (Tritor 102)* qui permet de faire des scans en x, y et z. Le déplacement en (x,y) par exemple peut être effectué sur une zone de 80 μ m par 80 μ m.

II.II.2.B.(ix) Générateur deux voies

Un générateur commercial deux voies *Tektronix (AFG 3022B)* a été utilisé pour appliquer le champ électrique sur les échantillons. Dans le but d'automatiser l'expérience et notamment l'acquisition des données, ce générateur avec une interface GPIB est lié à un ordinateur qui contrôle la voie de sortie du générateur, l'amplitude, l'offset ainsi que la fréquence de la tension appliquée.

II.II.2.B.(x) Système de patch clamp

Dans le cadre des mesures de potentiel transmembranaire, un système de patch-clamp commercial a été monté dans le microscope. La description du patch-clamp est détaillée dans le dernier chapitre. Un micromanipulateur trois moteurs *Luigs et Neumann* est utilisé pour contrôler la position d'une micropipette fixée sur un préamplificateur. Le signal de ce pré-amplificateur est envoyé vers un *Axon instrument (Axopatch-200A)* qui permet de mesurer un courant ou une différence de potentiel, et d'appliquer une commande externe. Les micropipettes sont étirées par un "pipette-puller" *PC10* de la société *Narishigue*.

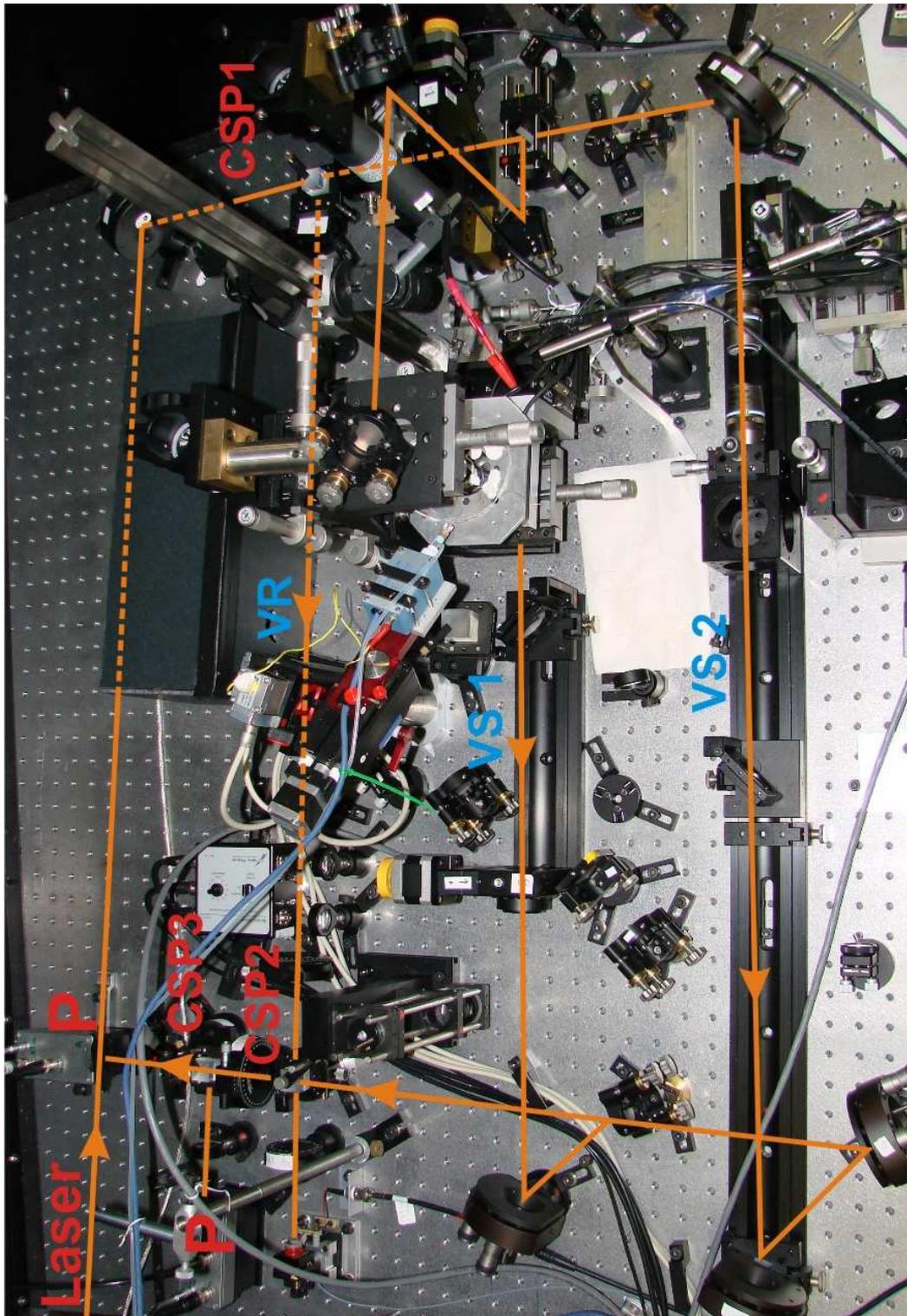


Figure II-5 Photographie du microscope électro-optique. CSP : cube séparateur en polarisation, P : Photodiode, VR : voie référence, VS1 : voie signal pour un échantillon placé horizontalement, VS2 : voie signal pour un échantillon placé verticalement.

II.II.3 Analyse des données

II.II.3.A Programme de control et de détection

Le programme de contrôle et d'acquisition des données a été développé sous LabWindows. Bien qu'il soit plus compliqué à utiliser que LabView, LabWindows permet la réalisation de quelques tâches difficiles, moins bien adaptées à une programmation graphique. Le programme de contrôle est divisé en différentes sous-tâches : contrôle de la platine piézo-électrique, acquisition temporelle du signal de sortie de la détection synchrone, contrôle des moteurs des deux lames demi-onde et du signal de sortie du générateur à deux voies. La connexion avec les différents modules est faite à travers une carte GPIB (sauf une connexion USB pour les photodiodes à avalanche non utilisées dans le cadre de ce manuscrit).

Un point fort du programme est le contrôle et l'accessibilité de tous les paramètres des instruments (temps d'intégration de la détection synchrone, amplitude de la tension appliquée sur l'échantillon ...). Le temps d'acquisition en chaque point d'un balayage et d'autres paramètres de détection peuvent être acquis via l'interface utilisateur. Un contrôle complet du générateur ainsi que des moteurs des lames demi-onde assure une acquisition simultanée de la réponse électro-optique de l'échantillon et de la mesure de calibration avec la cellule KDP de référence (paragraphe ci-dessous), et ce pour chaque direction de la polarisation.

II.II.3.B Normalisation

Ce dernier point est important car tout signal détecté par la détection synchrone est donné en terme de tension (Volts). Pour en déduire un déphasage électro-optique en radian, il faut normaliser ce signal par un signal de référence. Le signal de référence est généré par un cristal de KDP massif bien connu en orientation dont l'effet électro-optique est parfaitement caractérisé. Cette étape permet de corriger le problème lié à la variation de l'intensité lumineuse sur la voie sonde qui fait varier les niveaux délivrés par la détection synchrone. Le logiciel de contrôle décrit dans la partie précédente permet de faire cette acquisition automatiquement.

II.II.3.C Exemple d'une mesure

Pour effectuer une mesure correcte avec le microscope électro-optique, plusieurs étapes doivent être respectées. Un alignement précis de l'interféromètre est nécessaire pour chaque mesure. Selon l'échantillon et son épaisseur, les caractéristiques spatiales du faisceau à la

sortie sont modifiées, aboutissant à une interférence de plus ou moins bonne qualité. Le degré de recouvrement des deux faisceaux signal et référence joue un rôle primordial dans la sensibilité de l'interféromètre. Ce recouvrement peut être visualisé sur un oscilloscope en observant les deux signaux basse fréquence provenant des deux photodiodes. On peut aussi moduler la position du miroir de la voie de référence à basse fréquence et observer la modulation des deux tensions. Plus l'amplitude de la modulation est grande, meilleure est la qualité de l'interférence.

Une fois ceci réalisé, un asservissement de la position du miroir est assuré par la boucle électronique. Deux réglages du gain du système électronique permettent de compenser des bruits aux faibles fréquences, un potentiomètre permettant d'ajuster le déphasage entre les deux bras référence et signal. Dans le cas $\phi_r = \pi/2$ (cf. paragraphe II.II.1.B), on veut atteindre une valeur égale des deux tensions des photodiodes (mode équilibré). Un environnement calme est évidemment favorable pour une bonne stabilité du système à long terme.

Un champ électrique quasi-statique peut alors être appliqué sur l'échantillon à l'aide du générateur à deux voies. La détection synchrone délivre tout signal électro-optique à la même fréquence. Le programme de détection permet de balayer la position du faisceau sur l'échantillon et ainsi de cartographier la distribution électro-optique intrinsèque tout en contrôlant la zone du scan et le temps d'acquisition en chaque point. Une image de cette cartographie est montrée en parallèle. Une étude plus approfondie du signal temporel en un point précis est aussi possible. On vérifie l'origine du signal pour éliminer toute autre cause possible d'un signal qui ne soit pas d'origine optique, et on examine en particulier la dépendance linéaire de l'effet sur le champ appliqué. Une autre partie du programme fait tourner la polarisation de la lumière de façon à sonder la dépendance en polarisation du signal. Les deux dernières étapes sont totalement automatisées avec un contrôle sur le nombre de points, le pas et la marge d'acquisition.

Chapitre III : Champ électrique mesuré par effet Pockels dans des films minces de cristaux moléculaires de MNA

Après avoir décrit le principe de l'effet électro-optique et le montage expérimental mis au point dans le cadre de cette thèse nous démontrons dans ce chapitre la capacité du microscope PLEOM à sonder la distribution du champ électrique dans des films minces à base de différents matériaux. La croissance de ces films minces organiques nécessite une technique bien spécifique pour obtenir une bonne homogénéité des films et une structure monocristalline. Des cristaux organiques de 2-méthyl-4-nitroaniline (MNA) choisis pour leur fort non-linéarité quadratique, ont été déposés en films minces sur des électrodes planaires. Ces dernières ont permis d'appliquer des champs électriques uniformes à ces films monocristallins. La mesure locale de l'effet électro-optique associé a permis de vérifier la distribution du champ électrique modélisé par ailleurs. En particulier, nous avons pu imager des variations abruptes de réponse électro-optique entre deux domaines cristallins adjacents orientés de façon différentes. D'autres formes d'électrodes par exemple en pointes ont permis d'observer une exaltation locale du champ électrique appliqué en bon accord avec la théorie. Dans ce cadre nous détaillerons la mise en point technologique des échantillons ainsi que le calcul théorique de la forme du champ et de la réponse électro-optique. La réponse en polarisation de l'effet Pockels mesurée, sera discutée et comparée à un modèle théorique.

III.I MNA

Le choix des matériaux organiques pour la mesure de la distribution électrique du champ appliqué via l'effet Pockels a été motivé par les coefficients électro-optiques élevés du 2-méthyl-4-nitroaniline MNA ($67 \pm 25 \text{ pm/V}$) [45], ainsi que la caractéristique, générale pour les cristaux organiques, d'une constante diélectrique nettement plus petite que dans les matériaux non-organiques, garantissant ainsi une meilleure pénétration au champ électrique à partir des électrodes externes. Cet atout permet d'utiliser de faibles amplitudes de champ électrique pour induire une modulation EO significative de l'indice de réfraction de l'échantillon. Les cristaux organiques ont été largement étudiés par ailleurs dans le contexte plus général des effets non-linéaire quadratiques (effets paramétriques de mélange à 3 ondes: GSH, somme de fréquences, émission, oscillation et amplification paramétrique) [46].

La grande susceptibilité moléculaire d'ordre deux du MNA provient de la forte polarisabilité des unités moléculaires constituant le cristal, ainsi que du caractère polaire de celle-ci, résultant d'un fort transfert de charge à l'état excité entre groupement donneur (NH_2) et accepteur (NO_2), selon le paradigme bien établi de la diode moléculaire [47].

L'application d'un champ électrique bien caractérisé à travers ces films requiert des électrodes planaires intercalées, d'où la nécessité de mettre au point un processus de fabrication approprié.

III.I.1 Electrodes :

Des électrodes planaires en or ont été fabriquées dans la salle blanche de l'Institut d'Alembert. On utilise des lames de verre de $170 \mu\text{m}$ d'épaisseur, sur lesquelles une fine couche de titane de 10 nm d'épaisseur est déposée. Cette couche d'adhésion facilite l'adhérence d'une couche d'or de 50 nm d'épaisseur. Un film mince d'une résine photo-résiste positive est étalée en utilisant la tournette (Figure III-1-a). La forme des électrodes est imprimée sur un masque à travers lequel la résine photosensible est illuminée par une lampe UV (Figure III-1-b). La partie qui a réagi avec la lumière peut être facilement enlevée avec un solvant approprié, laissant sans protection l'or en dessous. Une solution d'iodure de potassium permet alors d'ôter l'or non protégé (Figure III-1- d), transposant ainsi la forme du masque sur l'or. Le titane quant à lui est retiré à l'aide d'une solution d'acide fluorhydrique (HF) (Figure III-1-e). Ce qui reste de la résine est ensuite dissous avec de l'acétone et de l'éthanol (Figure III-1-g). Les paramètres de déposition ainsi que les temps d'exposition et de gravure ont été mis au point après plusieurs essais et sont reportés dans le

Tableau III-1. Une colle à l'argent liquide mélangée à un durcisseur permet de maintenir des fils électriques en contact avec les extrémités des électrodes.

Tableau III-1 : Les différents paramètres utilisés durant le processus de fabrication des électrodes en or

Dépôt Ti	Temps : 1,42 minutes ; Epaisseur : 10 nm
Dépôt Au	Temps : 8 minutes ; Epaisseur : 50 nm
Spin coating de la Résine S1805	$v = 1000 \text{ rpm}$; $a = 1000 \text{ rpm/s}$; temps 30s
Chauffage	115°C pour 1 minute
Exposition UV	5s
développement	1 minute
Gravure KI	5s
Gravure HF	10s
Lavage Acétone	5 minutes

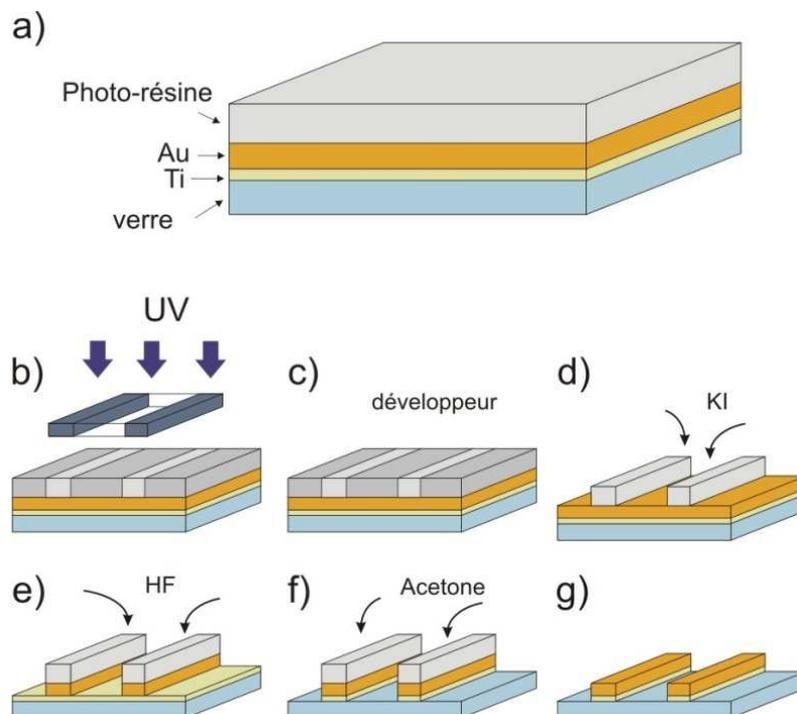


Figure III-1 : Les différentes étapes du processus de photolithographie.

Les formes des électrodes sont diverses et varient entre électrodes planaires simples, avec une pointe ou deux, ainsi qu'une configuration de multi-électrodes de 4 et 6 pointes qui

permet de varier la direction du champ électrique appliqué sur l'échantillon (Figure III-2), ou encore d'appliquer un potentiel multipolaire (plots alternants +V, -V).

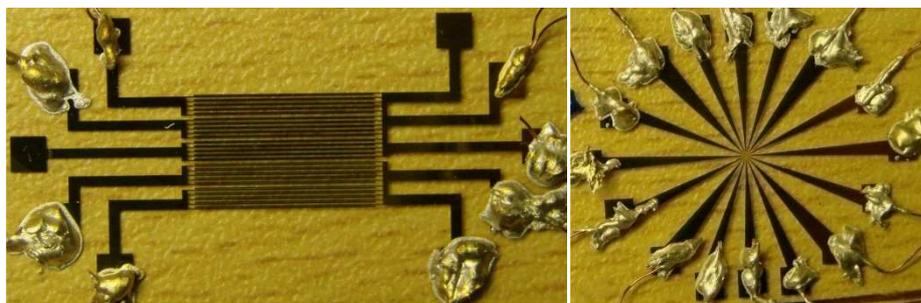


Figure III-2 : Image globale des électrodes en or utilisées pour appliquer un champ électrique statique. Gauche : électrodes planaire. Droite : multi-électrodes 4 points.

III.1.2 Films minces organiques : méthode de croissance

Les cristaux organiques se présentent à l'état brut issus de la synthèse organique sous forme de poudre jaune. Afin d'obtenir une couche mince monocristalline, nous avons utilisé une technique connue sous le nom de méthode de cloche inversée ("*inverted bell*"). Le but est de faire croître le cristal en couche mince autour d'un noyau central monocristallin. Pour cela cette méthode se déroule en deux étapes : tout d'abord l'introduction du cristal entre deux lamelles, puis la croissance cristalline autour d'une unité centrale monocristalline. Dans un premier temps, une lamelle en verre est posée au dessus de la lamelle portant les électrodes en or, de façon à laisser une petite épaisseur d'air entre les deux. Une quantité de poudre du cristal organique est déposée au côté de la lame et chauffée jusqu'à fusion. Par capillarité, le liquide fondu pénètre entre les deux lames, puis amené à constituer couche mince de cristal organique à l'issue d'une étape de refroidissement.

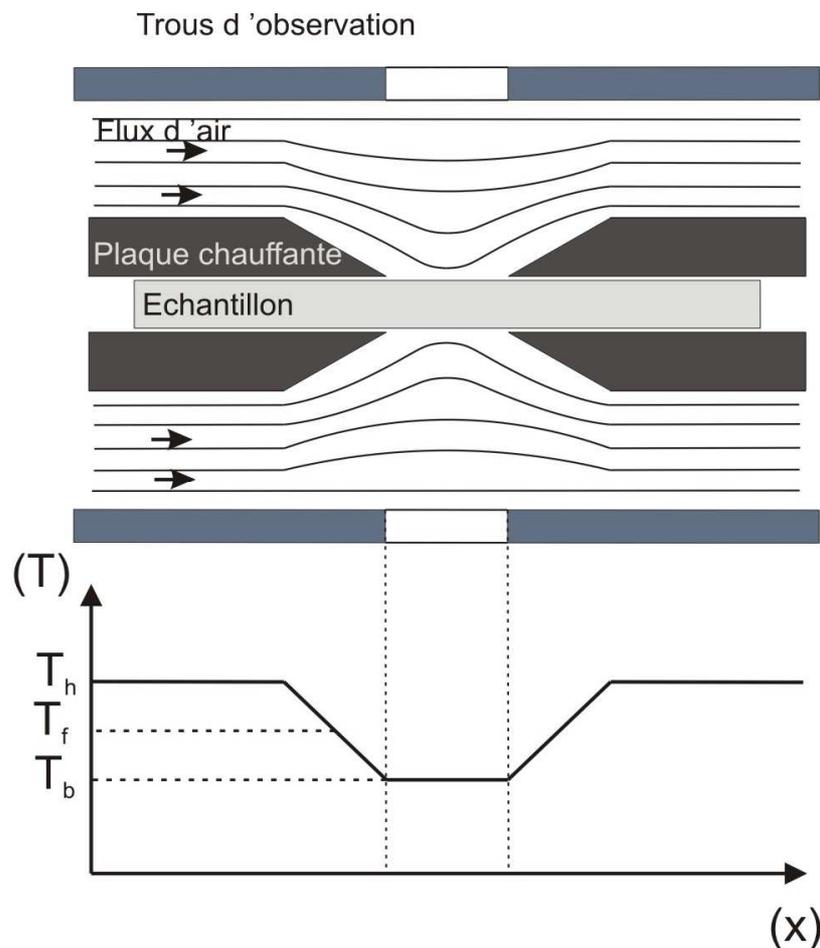


Figure III-3 : Schéma du mini-four utilisé dans la croissance cristalline. L'échantillon est placé entre deux plaques chauffantes percées d'un trou aboutissant à un profil de température en cloche inversée.

T_f : température de fusion, T_h tient pour température haute et T_b pour la température basse.

La deuxième étape permet de faire croître le cristal en mono-structure cristalline autour d'un germe. Pour cela un mini-four est utilisé de façon à contrôler et structurer le profil de la température sur l'échantillon (Figure III-3). Ce mini-four est composé de deux plaques chauffantes percées d'un trou central entre lesquelles l'échantillon est placé. La perte de chaleur est contrôlée au travers de cet orifice par un système de ventilation qui souffle de l'air de part et d'autre de l'échantillon. La température dans le four est plus basse au niveau du trou qui dissipe la chaleur tout en permettant l'observation optique. Le profil de température est dessiné dans la Figure III-3 où le profil de la température en cloche inversée est représenté. La température est contrôlée par un circuit électronique d'asservissement, et permet de faire fondre le cristal autour du point central d'observation. La croissance cristalline se fait comme alors suit: la température est tout d'abord augmentée jusqu'à voisinage de la fusion du cristal. La fusion commence entre les cristallites du bord et se poursuit par des canaux liquides pénétrant entre les cristallites du centre. En jouant sur la

température, le rayon de la zone de la fusion est réduit, et il est possible de choisir une zone ne comprenant qu'un seul cristallite bien sélectionné. Ensuite en élargissant la zone de refroidissement très lentement, la croissance autour de cette cristallite est favorisée et une zone monocristalline obtenue. Pour obtenir un bon résultat, le temps de refroidissement varie entre quelques heures à un jour selon le cristal utilisé. Cette méthode déjà décrite par Serge Gauvin et Joseph Zyss [48], permet d'assurer une bonne reproductibilité de la qualité cristalline des couches minces.

La croissance du MNA est réalisée autour d'une température de 120°C et le refroidissement est de 1°C/h, ce qui permet de faire croître des cristaux de grande qualité optique.

III.1.3 Propriétés optiques et électro-optiques du MNA

Le 2-méthyl-4-nitroaniline (ou MNA) a été principalement étudié à la fin des années 70 et au début des années 80, compte tenu de sa grande polarisabilité moléculaire qui se traduit par de grands coefficients électro-optiques au niveau macroscopique dans des cristaux bien organisés. La cellule unité d'un cristal de MNA est monoclinique [45], avec un groupe spatiale Cc et un group ponctuel m (le seul élément de symétrie du groupe ponctuel d'invariance est un miroir).

En films minces les axes cristallographiques a et c sont présents dans le plan du film alors que l'axe b leur est perpendiculaire (par convention). La molécule de MNA est représentée dans la Figure III-4-a. On remarque les deux groupes amino (donneur), et nitro (accepteur), qui créent le moment dipolaire de la molécule. Les moments dipolaires des molécules dans le cristal sont alignés les uns avec les autres dans le plan $(0,1,0)$, tout en déviant pour les unes légèrement vers le haut et pour les autres vers le bas, formant ainsi une structure fortement polaire non-centrosymétrique. Celle-ci a été analysée du point de vue de l'optimum de la structure cristalline pour la génération de seconde harmonique et l'effet Pockels dans la référence [40]. A noter que le caractère monoclinique de la structure du MNA ne permet pas de localiser les axes principaux diélectriques. Un des axes diélectriques (Y) est perpendiculaire au plan miroir, en conséquent les deux autres s'étendent dans ce plan. C'est le quasi-alignement des molécules de MNA dans une direction donnée qui définit l'autre axe diélectrique X [49].

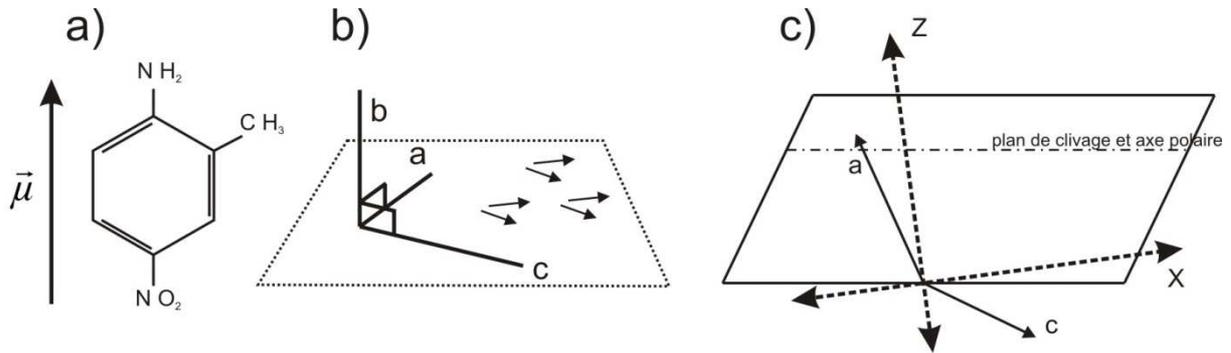


Figure III-4 : a) Molécule de MNA ($C_7O_2N_2H_8$). b) Alignement des molécules et structure dans l'espace des axes cristallographiques du cristal de MNA. c) Configuration des axes optiques principaux par rapport aux axes cristallographiques dans le plan du cristal.

Durant la croissance de ce cristal, différents domaines apparaissent dans le film ainsi que des fissures limitant des zones de quelques centaines de micromètres de dimension. Le plan de clivage dépend notamment de la structure cristalline du MNA qui peut varier d'une zone à l'autre. Il a été démontré que le plan de clivage forme un angle de 8° avec l'axe optique X et de 26° avec l'axe c cristallographique (Figure III-4). Les films minces de MNA sont donc biaxes avec l'axe polaire dans le plan du film.

Une bonne transmission du MNA pour les longueurs d'ondes allant de 500nm à 1900nm permet la réalisation de mesures électro-optiques à 632,8nm. Comme le MNA appartient au groupe ponctuel m , sa matrice électro-optique prend la forme suivante [2] :

$$r = \begin{bmatrix} r_{11} & 0 & r_{13} \\ r_{21} & 0 & r_{23} \\ r_{31} & 0 & r_{33} \\ 0 & r_{42} & 0 \\ r_{51} & 0 & r_{53} \\ 0 & r_{62} & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{III.1})$$

Le coefficient r_{11} est le plus important et il a été estimé à 67pm/V. Les autres coefficients sont négligeables (à 10% près). On s'attend alors à une réponse électro-optique bien directionnelle du MNA par rapport à la polarisation de la lumière.

III.II Champ électrique : expression analytique

La configuration des électrodes utilisée a la forme de deux bandes parallèles en or, de l'ordre de 50nm d'épaisseur, très fines comparées à l'épaisseur du film organique de quelques micromètres (voire Figure III-2 et Figure III-5). Cette configuration permet d'obtenir des

champs électriques bien uniformes au centre, entre les électrodes. Un calcul simple montré dans l'Annexe A, permet de trouver l'expression du champ électrique inter-électrode.

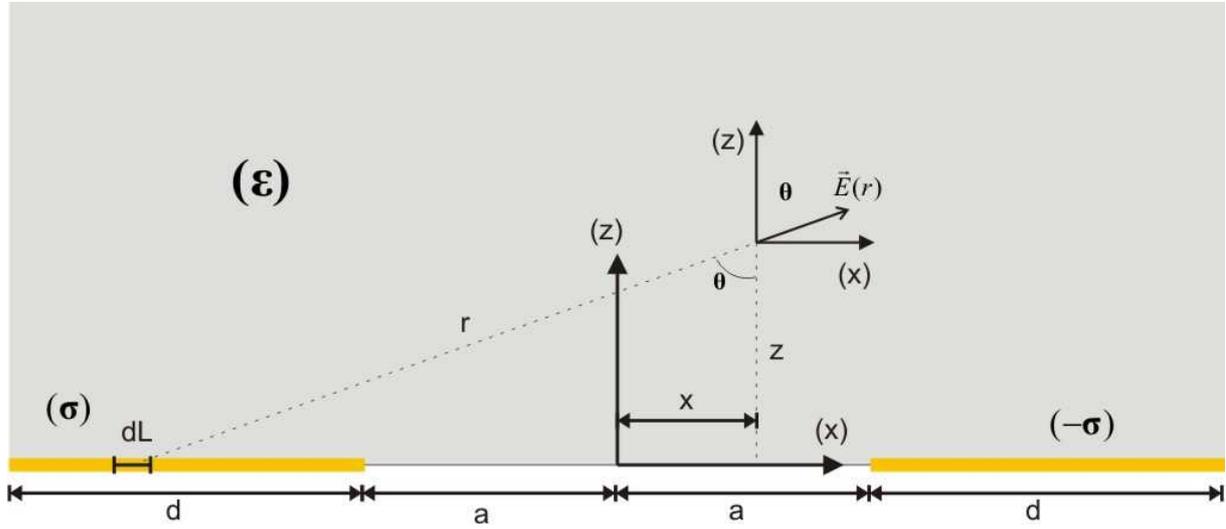


Figure III-5 : Schéma simplifié des électrodes en or et le champ électrique créé entre les deux. Les différents paramètres utilisés dans le calcul y sont présentés.

Les composantes cartésiennes du champ électrique s'écrivent :

$$E_x = \frac{V C}{2\pi\epsilon S} \ln \left[\sqrt{\left(\frac{z^2 + (x+a+d)^2}{z^2 + (x+a)^2} \right) \left(\frac{z^2 + (-x+a+d)^2}{z^2 + (-x+a)^2} \right)} \right] \quad (III.2)$$

$$E_z(\sigma) = \frac{V C}{2\pi\epsilon S} \left[\arctan\left(\frac{a+x}{z}\right) + \arctan\left(\frac{a-x}{z}\right) - \arctan\left(\frac{a+x+d}{z}\right) - \arctan\left(\frac{a-x+d}{z}\right) \right]$$

La Figure III-6 représente le profil théorique du champ électrique le long des deux électrodes (à $z=3\mu\text{m}$), on remarque que le champ est plus intense au niveau des électrodes qu'au centre, où il est par contre plus uniforme.

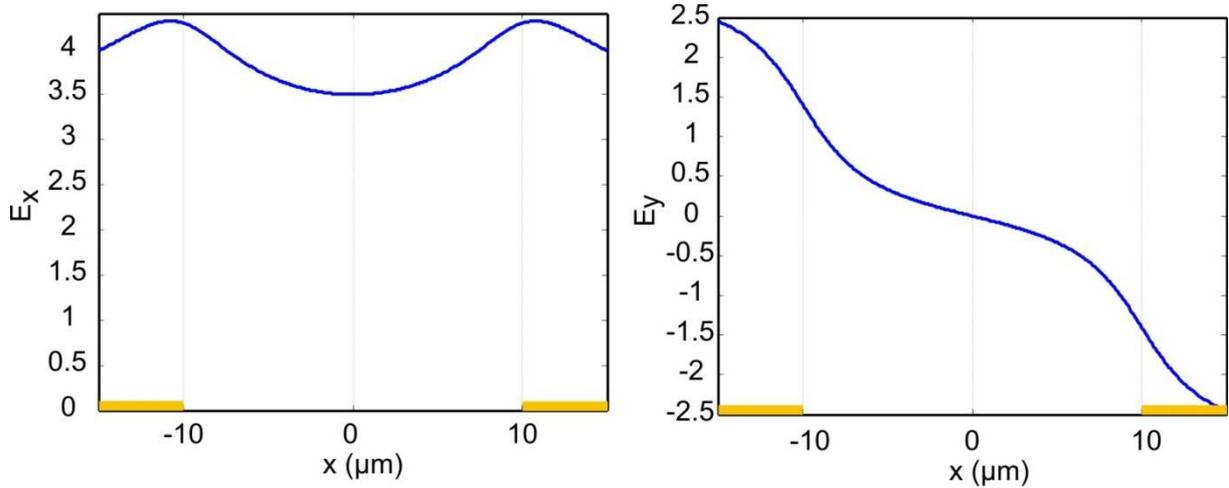


Figure III-6 : Profil des deux composantes E_x et E_y consécutivement du champ électrique (en unité arbitraire) pour une distance de $3\mu\text{m}$ au dessus du plan des électrodes. Dans cet exemple la distance inter-électrode est de $20\mu\text{m}$ (de -10 à $+10\mu\text{m}$).

De par son principe, le microscope électro-optique est capable de sonder cette variation de champ électrique à travers l'échantillon, sous forme d'une variation de phase lorsque l'on balaye la position du faisceau. En effet la variation de l'indice de réfraction selon une direction i sous l'effet d'un champ électrique E s'exprime par

$$\Delta\left(\frac{1}{n_i^2}\right) = \sum_j r_{ij} E_j, \quad (\text{III.3})$$

soit une variation électro-optique de l'indice de réfraction de :

$$\Delta n_i = -\frac{n_i^3}{2} \sum_j r_{ij} E_j(x, z) \quad (\text{III.4})$$

Un déphasage Pockels au travers d'une épaisseur e vaut

$$\Delta\varphi_{i(\text{total})} = \frac{\pi}{\lambda} n_i^3 \int_0^e \sum_j r_{ij} E_j(x, z) dz \quad (\text{III.5})$$

En première approximation, le déphasage mesuré va refléter le profil du champ électrique entre les électrodes. Cela dépend bien sûr de la qualité de la structure des cristaux de MNA formés.

III.III Mesure électro-optique et réponse en polarisation

Une fois un film mince monocristallin formé, on peut procéder à l'imagerie électro-optique de l'échantillon. Une modulation de 10V crête-crête (V_{cc}) en amplitude à une fréquence de 20kHz s'avère suffisante pour obtenir un rapport signal sur bruit très confortable. Une cartographie spatiale de la réponse électro-optique permet de caractériser la qualité cristalline de l'échantillon ainsi que la capacité du microscope à sonder la variation du champ électrique. La Figure III-7 représente un balayage typique de la zone inter-électrode en présence d'une fine couche monocristalline de MNA. On remarque l'uniformité de la réponse au centre de l'échantillon alors que les extrémités montrent une réponse plus intense, en bon accord avec les profils théoriques de champ créé entre des électrodes planaires.

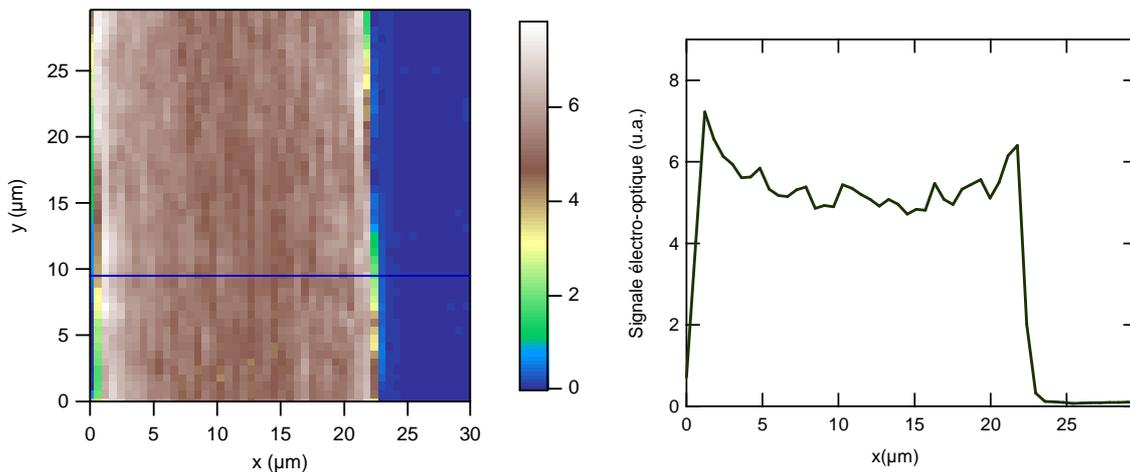


Figure III-7 : Image du déphasage électro-optique obtenue en balayant une région monocristalline de MNA entre électrodes en or. On applique dans ce cas 10V_{cc} d'amplitude de modulation. A droite le profil de la variation du signal électro-optique en traversant cette zone. On remarque que ce profil reproduit la variation du champ électrique théorique montré dans la figure précédente.

Une autre propriété électro-optique de ces films minces est l'anisotropie de la réponse en fonction de l'angle de la polarisation incidente. En tournant la polarisation incidente et en mesurant le déphasage électro-optique correspondant, la réponse en polarisation peut être représentée sur une courbe polaire (Figure III-8-gauche). On remarque la forme en lobes de cette réponse qui reflète la forte polarité du film. La dépendance linéaire du signal en fonction de l'amplitude de la modulation de la différence de potentiel entre électrodes est également bien vérifiée (Voire Figure III-8-droite).

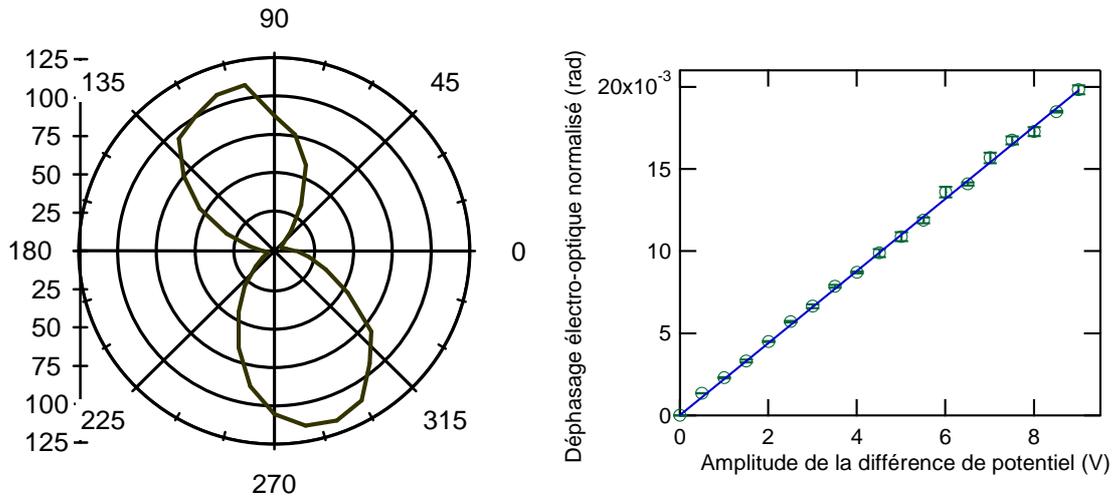


Figure III-8 : (à gauche) Réponse électro-optique en polarisation typique d'une couche de MNA. (à droite) réponse électro-optique linéaire en fonction du champ appliqué

III.III.1 Expression analytique et ajustement de la courbe polaire:

Pour ajuster une fonction théorique sur la réponse en polarisation, nous avons recours à des estimations de l'ordre de grandeur des différents coefficients de la matrice électro-optique. Dans la littérature, les coefficients sont tous négligés devant le coefficient r_{11} qui est dominant. Les films sont plutôt épais ($5\mu\text{m}$) et un modèle macroscopique peut suffire pour décrire cette dépendance en polarisation. En première approximation, l'effet du champ électrique sera décrit, comme mentionné plus haut, par un unique coefficient électro-optique r_{11} . Dans le système lié aux axes optiques du cristal, l'équation de l'ellipsoïde des indices devient sous l'effet d'un champ électrique

$$\left(\frac{1}{n_x^2} + r_{11} E_1 \right) X^2 + \frac{Y^2}{n_y^2} + \frac{Z^2}{n_z^2} = 1 \quad (\text{III.6})$$

E_1 est la composante du champ électrique appliqué selon l'axe X. Aucune transformation n'est donc nécessaire pour se situer dans le système d'axes principaux du système en présence du champ électrique quasi-statique appliqué. La principale contribution électro-optique est ainsi associée à l'indice de réfraction selon l'axe X.

Il a été montré que les axes optiques du cristal présents dans le plan de l'échantillon sont l'axe polaire X et l'axe Z [45, 50]. Dans l'approximation d'une incidence normale du faisceau sonde, l'ellipse d'interaction d'un plan perpendiculaire à la direction de propagation et de l'ellipsoïde des indices s'écrit

$$\left(\frac{1}{n_x^2} + r_{11} E_1 \right) X^2 + \frac{Z^2}{n_z^2} = 1 \quad (\text{III.7})$$

Suivant la direction de la polarisation incidente, la lumière voit deux indices différents $n'_z = n_z$ et $n'_x = \frac{n_x}{\sqrt{1 + n_x^2 r_{11} E_1}}$. Soit α l'angle que fait l'axe plane X du cristal avec l'axe x

du laboratoire, et θ la direction de la polarisation par rapport à ce même axe. L'expression du champ électrique optique traversant les différentes optiques (MNA, les polariseurs et les lames demi-ondes) devient :

$$E_x = E_{in} \cos^2(\theta - \alpha) e^{i \frac{2\pi}{\lambda} e n'_x} + E_{in} \sin^2(\theta - \alpha) e^{i \frac{2\pi}{\lambda} e n'_z} \quad (\text{III.8})$$

Sous influence du champ électrique quasi-statique appliqué de fréquence Ω , n'_x est le seul indice influencé et modulé à la même fréquence. Par conséquent la détection synchrone délivre un signal de la forme :

$$S \propto \cos^2(\theta - \alpha) \varphi_{EO}(r_{11}) \quad (\text{III.9})$$

Deux lobes se présentent suivant la direction de α , qui permettent de pointer la direction de l'axe X (également visible par extinction entre polariseurs croisés, mais dans ce cas, il y a confusion entre X et Z. Seule l'expérience électro-optique permet de lever cette confusion). Donc la dépendance en polarisation du signal électro-optique doit être un \cos^2 suivant la direction de l'axe polaire. Ceci est bien clair dans les courbes obtenues.

L'annexe B présente un calcul similaire mais plus général en utilisant les matrices de Jones avec une application expérimentale au cas d'un grand cristal KDP de référence dont l'orientation est bien caractérisé.

Pour bien illustrer cette dépendance nous avons analysé deux zones cristallines de MNA adjacents orientées différemment. Pour les isoler, nous avons tout d'abord placé le film mince de MNA entre polariseurs croisés. La même zone est ensuite étudiée par le PLEOM. Deux régions d'intérêt, avec deux orientations différentes de l'axe polaire, ont été étudiées.

La Figure III-9 montre une photo prise au microscope polarisé de ces deux domaines adjacents. On remarque qu'une des deux régions est moins brillante que l'autre, ce qui montre que les deux régions n'ont pas la même orientation cristalline. En tournant l'échantillon, nous arrivons à éteindre une des deux régions puis à éteindre l'autre. On note

les deux angles que fait par rapport à l'axe des électrodes, un des axes optiques principaux de chaque région avec les électrodes. Ils valent 12° et 60° respectivement.

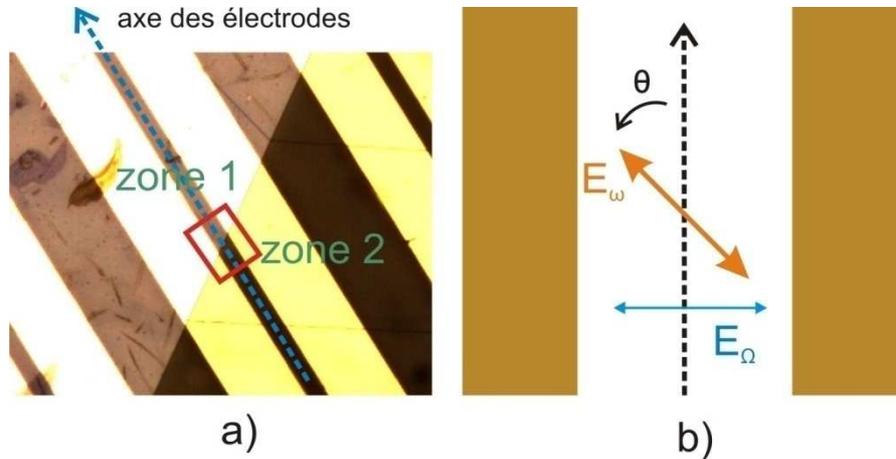


Figure III-9 : Photographie sous microscope en lumière blanche polarisée d'une zone de la couche mince de MNA. On remarque deux zones avec deux intensités lumineuses transmises différentes. Ceci correspond à deux cristaux de MNA orientés de façon distincte.

Les deux zones apparaissent bien homogènes en microscopie électro-optique (Figure III-10). En se passant de part et d'autre de la frontière entre les deux régions, on effectue une analyse en polarisation du signal électro-optique (Tableau III-2).

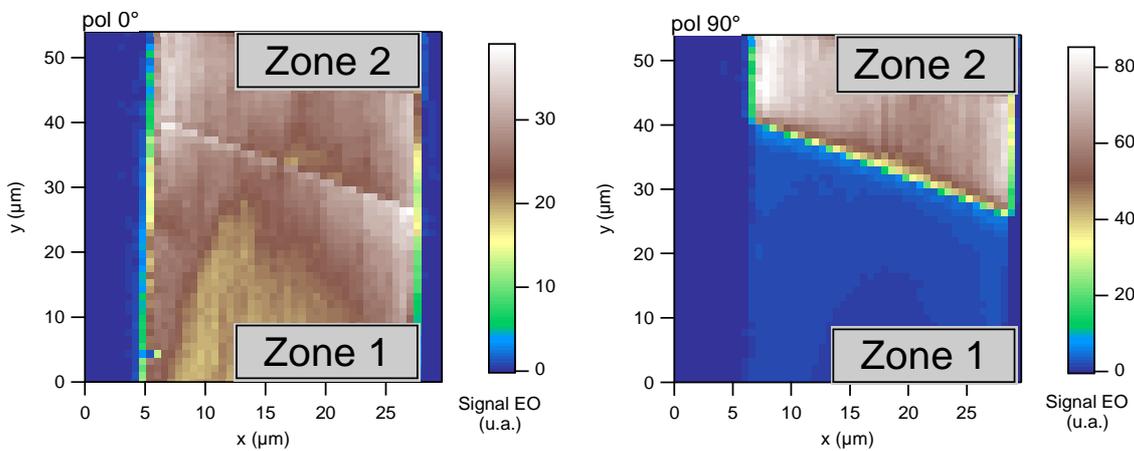
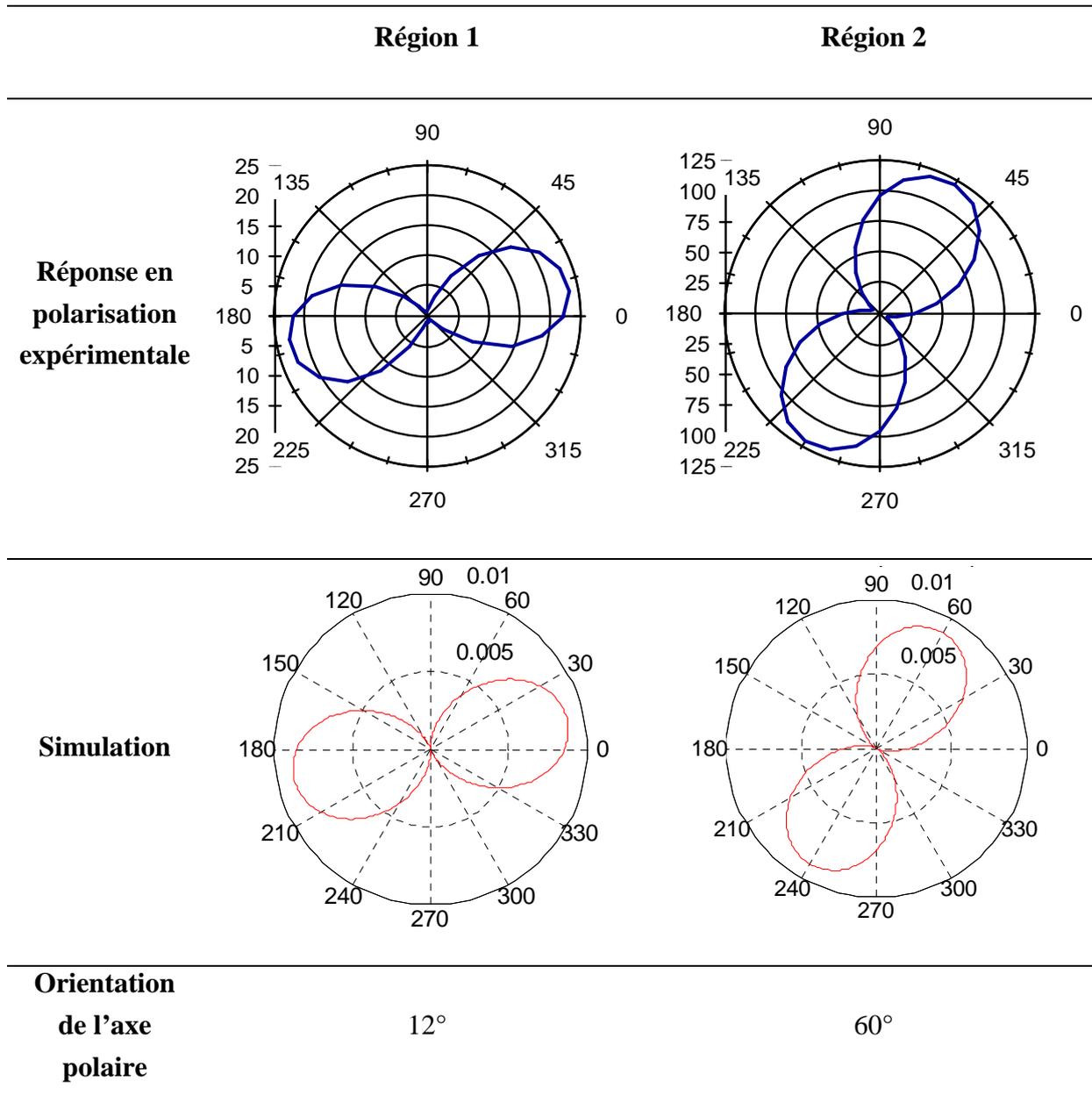


Figure III-10 : Balayage du signal électro-optique de la région intersection des deux zones d'orientations différentes. On remarque la dépendance du signal électro-optique selon l'angle de la polarisation de la lumière (gauche : polarisation 0° , droite : 90°).

Tableau III-2 Comparaison entre (en haut) les réponses en polarisation électro-optiques expérimentales de deux régions adjacentes d'orientation différentes, et (en bas) la prédiction théorique ainsi que la déduction de l'angle que fait l'axe polaire avec l'axe des électrodes pour chaque zone. Les angles d'orientations sont donnés en degrés, et l'angle zéro correspond à l'axe parallèle aux électrodes selon les orientations de la Figure III-9.



La simulation de la réponse électro-optique est en bon accord avec les données expérimentales. Aux erreurs expérimentales près, l'orientation de l'axe principal par rapport à l'axe des électrodes est bien de 12° et de 60° , qui correspond aux mêmes valeurs qu'entre polariseurs croisés. Cependant, il faut noter que l'étude entre polariseurs croisés ne permet pas de reconnaître l'axe polaire principal (orientation indéterminée à 90°), alors que la réponse électro-optique en est capable.

III.III.2 Champ électrique non uniforme (électrodes avec pointes) :

Des électrodes avec une forme en pointe permettent de créer une distribution de champs électriques variables qui est sensiblement plus intense au niveau de la pointe. Pour vérifier expérimentalement cette distribution fortement inhomogène, la microscopie électro-optique offre une bonne sensibilité. Ceci est démontré dans la Figure III-11 où les données expérimentales s'accordent bien avec la distribution du champ électrique théorique (simulation avec le logiciel COMSOL).

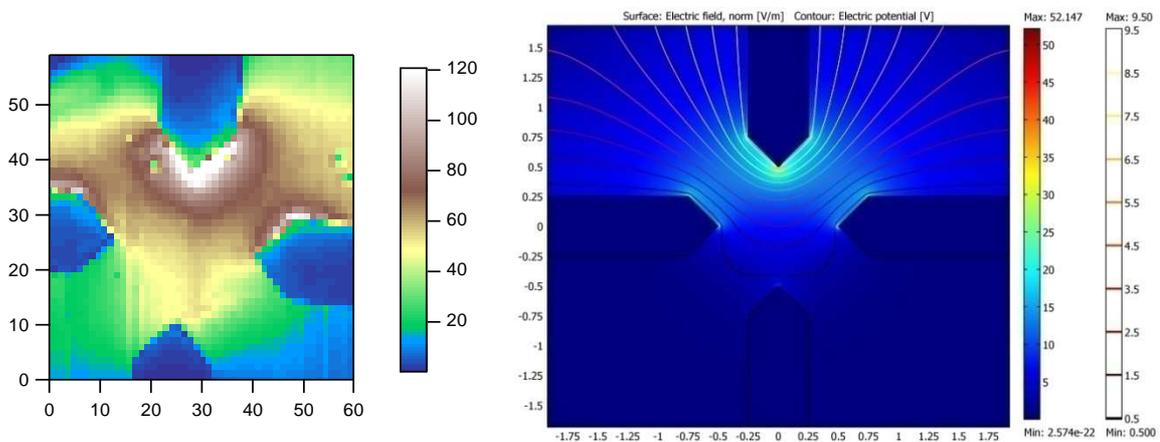


Figure III-11 : (Gauche) : Des électrodes en forme de pointes sont utilisées pour appliquer un champ électrique sur un film mince de MNA. La cartographie de la réponse électro-optique est représentée dans cette figure. Les distances sont données en μm , et la valeur du déphasage électro-optique en unité arbitraire. L'électrode du haut est reliée au générateur, les autres électrodes sont connectées à la masse. Un champ plus intense au niveau de la pointe est visible expérimentalement. Un bon accord est constaté avec la simulation théorique (droite).

Il faut noter qu'aucune dépendance de la réponse en polarisation sur la direction du champ électrique statique n'a pu être détectée. Ceci est dû éventuellement à la forte polarité du film cristallin. La direction du champ électrique aura une influence sur la valeur du signal mais aucune influence sur sa directionnalité (Figure III-12).

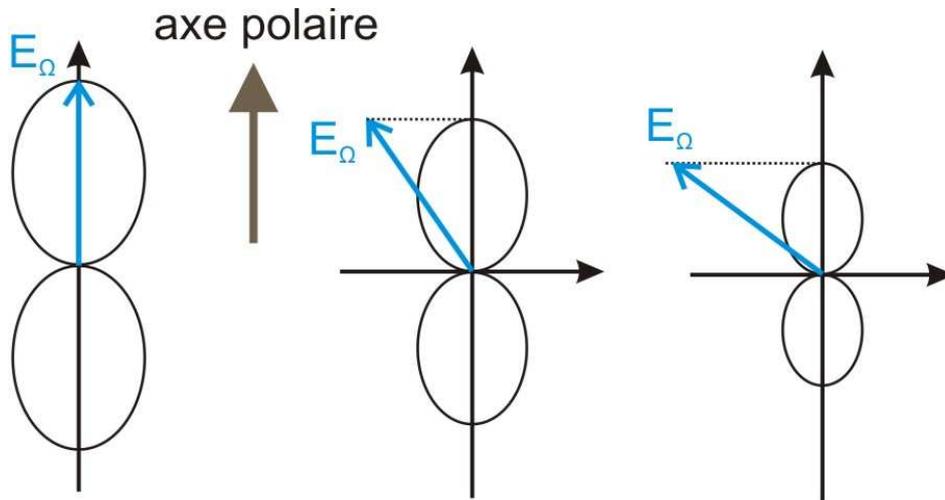


Figure III-12: Illustration de l'effet de la variation de la direction du champ électrique quasi-statique sur la réponse électro-optique en polarisation. La valeur de la projection du champ électrique sur l'axe optique change mais l'orientation de la réponse polaire reste suivant l'axe polaire du cristal.

III.IV Conclusion du chapitre et perspectives :

En conclusion de cette partie nous avons démontré le potentiel du microscope électro-optique pour l'étude de la cristallinité de couches minces de MNA. Ces couches minces, déposées par la méthode de cloche inversée, révèlent une bonne qualité optique et possèdent des propriétés électro-optiques bien connues. Contrairement à des mesures de biréfringence classiques, la PLEOM est capable d'identifier sans ambiguïté l'axe optique principal fortement polaire de ce cristal. Ceci est réalisé en étudiant la dépendance angulaire en polarisation du signal électro-optique enregistré. Nous avons pu ainsi imager deux domaines de MNA monocristallins adjacents, mais orientés différemment.

Dans des couches de MNA bien uniformes, la PLEOM est capable de suivre la distribution spatiale de l'intensité du champ électrique appliqué selon l'axe polaire du cristal de MNA, comme on a pu le montrer avec des électrodes en pointes.

Nous n'avons pas observé une dépendance de la réponse polaire sur la direction du champ électrique appliqué. Cela est dû à la forte polarité de ces couches qui rend le coefficient électro-optique r_{11} dominant. Un changement de la direction du champ électrique ne fait que diminuer les valeurs du déphasage enregistré et n'influence pas la directionnalité de la réponse électro-optique.

La question qui se pose à ce stade est celle du seuil de mesure de la modulation électro-optique. En d'autres termes, la sensibilité actuelle est elle suffisante pour permettre la détection d'une particule électro-optique de taille nanométrique ? Nous nous efforcerons de répondre à ces questions dans le chapitre suivant.

Chapitre IV : Etude de la réponse électro-optique Pockels d'un nanocristal unique : application au KTP

L'effet Pockels électro-optique a été mis en évidence dans de grands cristaux massifs, et films minces non-centrosymétriques. Par ailleurs plusieurs études se sont intéressées à la contribution collective à l'effet Pockels de molécules ou de nanoparticules, dispersées dans un polymère et orientées sous champ électrique [51-54]. Mais aucune observation n'a dévoilé jusqu'à présent à notre connaissance la modulation électro-optique Pockels provenant d'une particule nanométrique unique. Un effet électro-optique à l'échelle d'une telle nanoparticule aurait un grand intérêt pour des mesures de champ électrique résolu à la même échelle, et des applications comme nano-sonde locale de champ. La PLEOM a prouvé sa puissance et sa fiabilité pour sonder la distribution de champ électrique dans des films minces à deux dimensions. Un confinement à trois dimensions de nature à permettre une meilleure caractérisation du microscope actuel se présente ici naturellement comme l'étape suivante.

Dans ce chapitre une description de l'effet d'un champ quasi-statique sur la diffusion par une nanoparticule non-centrosymétrique sera développée, ainsi que la mise en évidence de ce qui constitue à notre connaissance la première détection de modulation électro-optique Pockels d'une nanoparticule unique, ici à base de KTiOPO_4 (KTP) monocristallin.

IV.I Effet d'une nanoparticule sur un faisceau :

Un faisceau focalisé sur une nanoparticule subit une diffusion qui dépend de l'indice du matériau constituant la particule et ainsi que de celui qui l'entoure. Si, de plus, le matériau de cette particule est non-centrosymétrique et lui confère ainsi des propriétés électro-optiques de type Pockels, il peut alors subir une variation d'indice sous l'effet d'un champ électrique externe. Une telle variation induit une modification de l'intensité diffusée par cette particule.

La taille de la particule influence la diffusion, ce qui peut être décrit en terme de section efficace σ_s . La section efficace d'une nanoparticule est proportionnelle à la taille de la particule à la puissance 6 [55]. Dans l'annexe on développe cette description dans le cas d'une particule électro-optique, et on montre l'apparition d'une contribution électro-optique σ_s^{EO} à la section efficace :

$$\sigma_s^{EO} = \frac{\pi}{24} k^4 \left[\frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \right]^2 \frac{6n^4}{(n^2 - 1)(n^2 + 2)} rE d^6 \quad (\text{IV.1})$$

Ici nous avons utilisé l'approximation selon laquelle l'indice de réfraction d'une nanoparticule électro-optique soumise à un champ électrique s'écrit $n_f = n + \Delta n_{EO}$. La partie électro-optique $\Delta n_{EO} = \frac{n^3}{2} rE$ est supposée correspondre à une contribution isotrope du champ électrique valide pour toutes les composantes de l'indice de réfraction de la particule.

On peut envisager la détection directe de la contribution électro-optique par une mesure directe de la variation de la puissance diffusée, et donnée par

$$P = \sigma_{sc} I_{inc} \quad (\text{IV.2})$$

On remarque qu'une diminution des dimensions de la nanoparticule influence fortement le résultat. Si le rayon de la particule est divisé par deux, la puissance diffusée sera divisée par 64. D'où l'intérêt d'une détection sensible de cette diffusion. L'interférence du champ électromagnétique diffusé avec un faisceau référence et l'utilisation d'une modulation du champ quasi-statique appliqué, comme dans la configuration actuelle du microscope, offre une telle sensibilité.

Il faut aussi noter que le champ électrique quasi-statique appliqué entre les électrodes a pour effet de créer un champ électrique local. Celui-ci s'oppose au champ total et induit une

diminution de la valeur du champ effectif agissant sur la particule, ce qui diminue d'autant l'effet électro-optique.

IV.I.1 Description de l'effet électro-optique en termes de champ diffusé :

Dans le cas où un faisceau sonde traverse un matériau électro-optique de dimension transverse plus grande que le "beam-waist", la réponse Pockels de ce matériau est normalement décrite par le changement d'indice de réfraction sous l'effet d'un champ électrique, qui induit un déphasage proportionnel à ce champ.

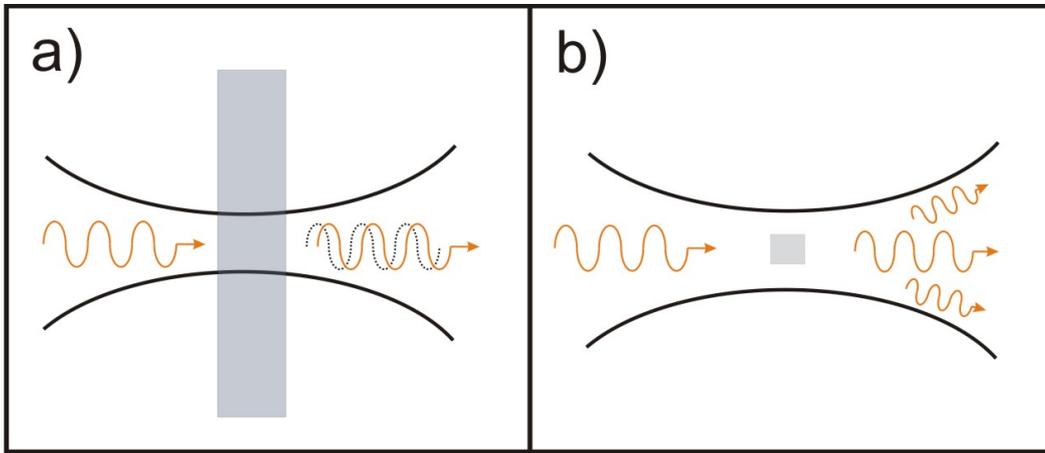


Figure IV-1 : Illustration de la différence entre le cas d'un échantillon dont la taille est plus grande que le point focal et le cas d'une particule dont la taille est plus petite.

Dans le cas d'une nanoparticule de dimensions beaucoup plus petites que le diamètre du faisceau, il faut raisonner en termes de polarisation induite par le champ électrique. La polarisation d'ordre deux, dans le cas de l'effet électro-optique, est alors donnée par :

$$P_i^{(2)Pockels} = \epsilon_0 n_{ii}^2 n_{jj}^2 \sum_j \sum_k r_{ijk} E_j^\omega E_k^\Omega \quad (\text{IV.3})$$

où E_k^Ω est une composante suivant k du champ électrique appliqué, qui est à la fréquence Ω quasi-statique par rapport à la fréquence ω du champ optique E_j^ω . Les indices ijk se rapportent au système d'axes principaux du laboratoire. Le champ diffusé par la particule est proportionnel à la dérivée seconde de cette polarisation par rapport au temps

$$\vec{E}_{sc} \propto \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} = -(\omega + \Omega)^2 \vec{P} \quad (\text{IV.4})$$

Ceci se traduit par une proportionnalité entre le champ diffusé et le champ électrique appliqué :

$$(E_{sc}^{\omega+\Omega})_i \propto -\varepsilon_0 (\omega + \Omega)^2 n_{ii}^2 n_{jj}^2 \sum_j \sum_k r_{ijk} E_j^\omega E_k^\Omega \quad (\text{IV.5})$$

Ce champ diffusé que l'on va faire interférer avec un faisceau de référence, est utilisé pour détecter l'effet électro-optique d'une nanoparticule. Dans la configuration actuelle du microscope électro-optique, le faisceau transmis à travers l'échantillon est recombinaison avec un faisceau de référence. Dans le cas d'une diffusion électro-optique le champ diffusé y est ajouté et l'intensité totale vaut:

$$I = |E_{ref}^\omega + E_S^\omega + E_{sc}^{\omega+\Omega}|^2 = I_{ref} + I_S + 2 \text{Re} \left[(E_{ref}^\omega + E_S^\omega)^* E_{sc}^{\omega+\Omega} \right] \quad (\text{IV.6})$$

Toute variation du champ diffusé induit une variation de l'intensité des franges et ainsi une variation de l'intensité détectée. Le champ électrique étant modulé à une fréquence de 20kHz, l'intensité l'est aussi, et la détection synchrone permet d'extraire le signal modulé à la même fréquence :

$$S = 2 \text{Re} \left[(E_{ref}^\omega + E_S^\omega)^* E_{sc}^{\omega+\Omega} \right]. \quad (\text{IV.7})$$

IV.II Propriétés non-linéaires du KTP – propriétés électro-optiques

Le KTiOPO_4 (KTP) est un cristal largement utilisé et parfaitement caractérisé pour la génération de la seconde harmonique ainsi que ses propriétés électro-optiques. A température ambiante la structure du KTP est orthorhombique avec les constantes de mailles suivantes : $a=12,189\text{\AA}$, $b=6,366\text{\AA}$ et $c=10,584\text{\AA}$. La structure cristalline est représentée à la Figure IV-2. L'origine structurale de la large non-linéarité provient de la présence de plus courtes liaisons Ti-O au sein de l'octaèdre distordu TiO_6 .

Deux contributions sont à l'origine de l'effet électro-optique : une contribution ionique et une contribution électronique. Les deux groupes tétraèdre PO_4 et l'octaèdre TiO_6 contribuent à la partie ionique [56-57].

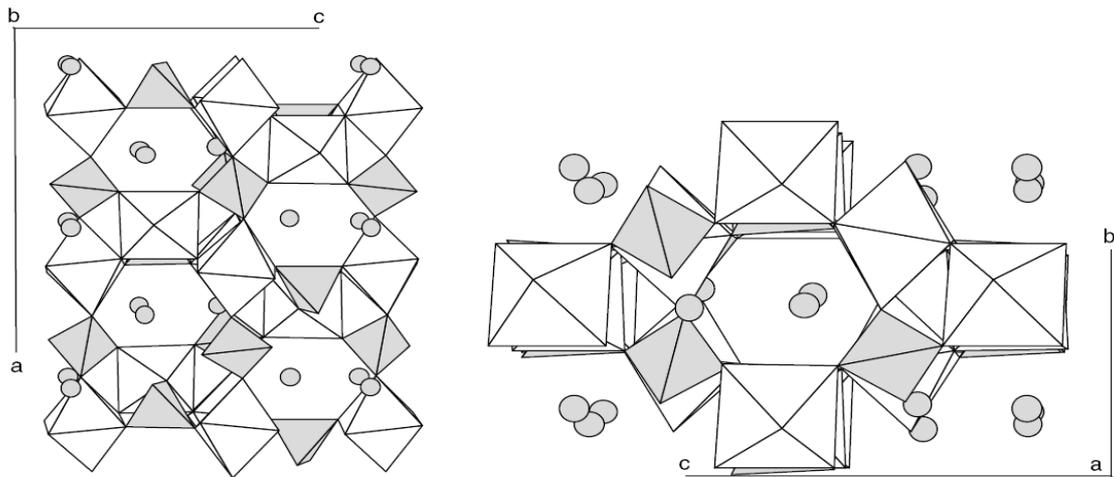


Figure IV-2 : Structure cristalline du KTP vue dans le plan $\langle 010 \rangle$ (gauche) et dans le plan $\langle 100 \rangle$ (droite). En gris sont représentés les unités tétraèdres PO_4 et en blanc les octaèdre TiO_6 . Les cercles gris représentent les atomes K [58].

De point de vue des symétries, le KTP appartient au groupe ponctuel $mm2$, et la matrice des coefficients électro-optiques a la forme suivante :

$$r = \begin{bmatrix} 0 & 0 & r_{13} \\ 0 & 0 & r_{23} \\ 0 & 0 & r_{33} \\ 0 & r_{42} & 0 \\ r_{51} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{IV.8})$$

Les coefficients électro-optiques du KTP sont $r_{13} = 9.5\text{pm/V}$, $r_{23} = 15.7\text{pm/V}$, $r_{33} = 36.3\text{pm/V}$, $r_{42} = 9.3\text{pm/V}$, $r_{51} = 7.3\text{pm/V}$, mesurés à la longueur d'onde 632.8 nm [59-60].

IV.III Nano KTP : préparation et dépôt

Depuis 2005, des travaux menés au LPQM et au laboratoire PMC de l'Ecole Polytechnique ont permis de mettre au point l'élaboration de nanocristaux de KTP. Ceux-ci se sont révélés être des nanolabels photo-stables pour la génération de la seconde harmonique (GSH). Ils constituent alors naturellement de bons candidats pour l'observation d'un effet Pockels à l'échelle de la nanoparticule unique, puisque la partie électronique de l'effet Pockels a une origine commune avec celle de la GSH. Les détails sur la croissance de ces nanocristaux

peuvent être trouvés dans la thèse de Loc Le-Xuan [61], dont nous nous contentons de rappeler ici les points importants.

En résumé, la méthode utilisée, consiste à récupérer de la poudre résiduelle d'un processus de croissance de KTP massif. Durant ce processus, une large distribution de tailles de KTP est présente, rendant nécessaire un tri de taille.

La poudre est tout d'abord mélangée à un polymère, le Polyvinylpyrrolidone (PVP), le tout étant mis dans un bain ultrason, ce qui permet de désagréger les particules et de les recouvrir par une couche de PVP. Cela réduit la possibilité d'une nouvelle agrégation. Ensuite un filtre avec des trous de $1\mu\text{m}$ de diamètre, élimine les grosses particules avant de placer la solution dans des culots en verres. Avec des tailles allant de 30 à 500nm, on procède au tri en taille de ces particules en utilisant une méthode de centrifugation. En effet en centrifugeant cette solution à haute vitesse durant une dizaine de minutes, les grandes particules tombent vers le fond ne laissant surnager que les petites particules. On peut récupérer ce surnageant et le centrifuger de nouveau pour enlever les particules flottantes encore trop petites. En contrôlant la vitesse de la centrifugation ainsi que la durée, on peut contrôler assez soigneusement les dimensions des particules. Une étude de la diffusion dynamique de la lumière permet alors de mesurer leurs dimensions avec précision.

Cette méthode a déjà été validée pour le KTP, et permis d'obtenir des solutions bien monodisperses en taille, utilisables dans des mesures en SHG couplé à une pointe AFM [5, 62]. Dans notre cas nous avons utilisé deux solutions de 150nm de KTP (Figure IV-3).

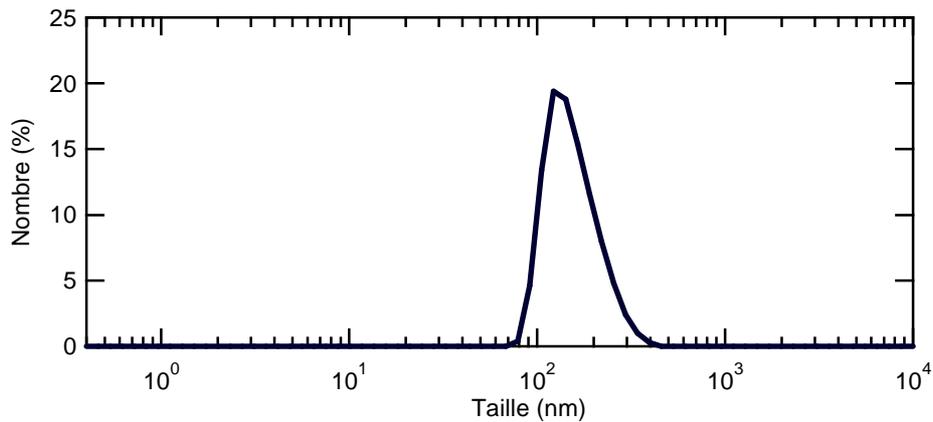


Figure IV-3 : Histogramme en tailles résultant de la diffusion dynamique de la lumière dans une solution de nano-KTP en suspension. On observe un pic à 150nm dont la largeur donne une idée de la distribution en taille.

Pour appliquer un champ électrique aux nano-KTP, on disperse cette solution en utilisant la tournette, sur un substrat comportant des électrodes en or, préalablement structurées par photolithographie comme expliqué au chapitre précédent. Une couche de particules monodisperses de nanoparticules isolées est réalisée.

Comme la diffusion électro-optique de la particule est très faible, des valeurs importantes de champ quasi-statique appliqué sont nécessaires. Un amplificateur de tension permettra d'appliquer jusqu'à 250Vcc sur l'échantillon.

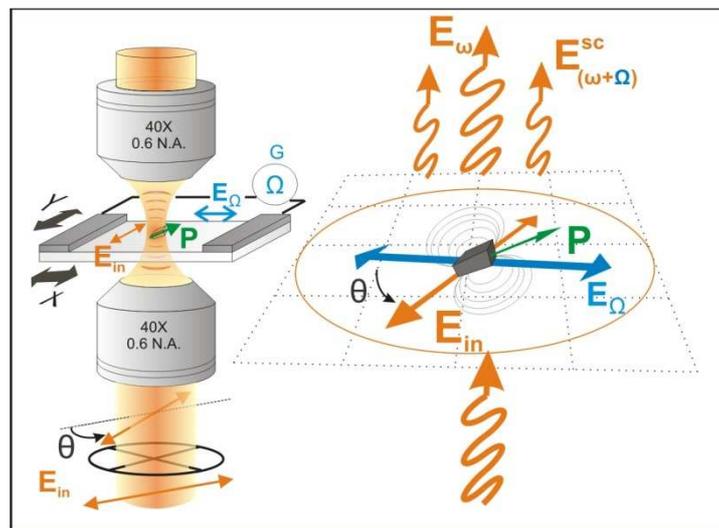


Figure IV-4 : Configuration des différents champs au niveau de l'échantillon : E_{in} champ optique, E_{Ω} champ électrique appliqué et P polarisation induite au niveau de la nanoparticule

IV.IV Réponse électro-optique d'une nanoparticule unique :

En balayant la position de l'échantillon par rapport au point de focalisation, une image de la réponse spatiale de l'effet électro-optique entre les électrodes en or est obtenue, révélant une zone émettrice isolée et limitée par la diffraction (voire Figure IV-5). On attribue cette tache à un nanocristal de KTP d'une dimension de 150nm.

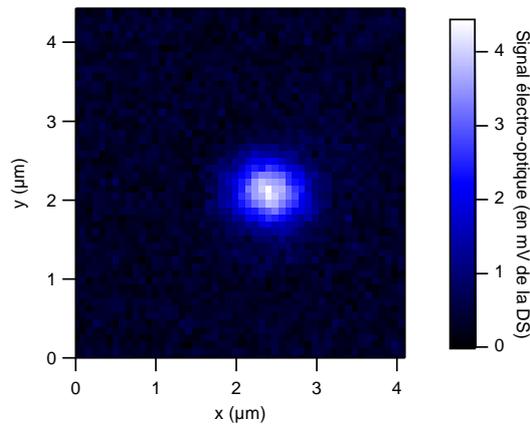


Figure IV-5 : Scan typique de la diffusion électro-optique d'une nanoparticule de KTP, la barre de couleur représente l'intensité de la diffusion EO en unité arbitraire.

Une des signatures de l'effet électro-optique Pockels est la dépendance linéaire du signal électro-optique en fonction de la valeur du champ électrique quasi-statique appliqué. En faisant varier l'amplitude du champ appliqué, une dépendance linéaire du signal électro-optique est bien vérifiée (Figure IV-6). De prime abord, il est délicat d'induire de la pente de cette courbe des valeurs des coefficients électro-optiques étant donné la direction arbitraire du cristal dans l'espace, qui met en jeu différentes composantes du champ électrique. Cependant une analyse en polarisation du signal va nous permettre de confirmer l'origine Pockels de cet effet, ainsi que l'orientation a priori inconnue du nanocristal.

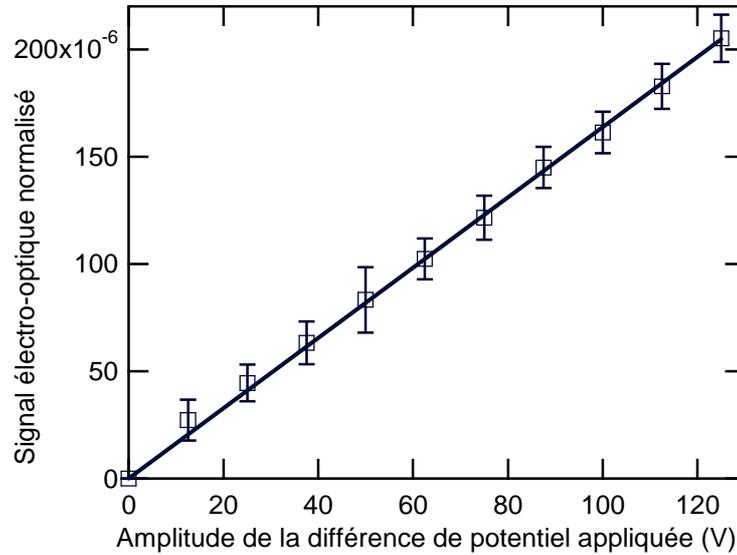


Figure IV-6 : Dépendance linéaire de la réponse électro-optique d'une nanoparticule en fonction de l'amplitude de la différence de potentiel appliqué entre les électrodes.

IV.IV.1 Réponse en polarisation du signal électro-optique d'un nanocrystal de KTP:

Une autre caractéristique de l'effet électro-optique d'un cristal non linéaire est l'anisotropie de sa réponse en fonction de la polarisation de la lumière (équations (IV.3) et (IV.4)). Pour mieux comprendre cette dépendance polaire, une illustration dans un cas simple est développée.

Considérons le cas simple où l'axe principal du nanocrystal (l'axe Z) ainsi que le champ électrique quasi-statique appliqué sont orientés suivant l'axe x du laboratoire (Figure IV-7–a). Dans cette configuration on s'attend à une réponse électro-optique nettement plus grande selon cet axe que sur les autres axes. Dans la configuration actuelle du microscope électro-optique, deux lames demi-onde placées de part et d'autre de l'échantillon permettent cette étude en polarisation. La première lame demi-onde a pour rôle de faire tourner la polarisation linéaire traversant l'échantillon, alors que la seconde permet de récupérer la polarisation initiale horizontale. De façon pratique, cette configuration est utile (voire nécessaire) notamment si l'en veut conserver l'asservissement en longueur de l'interféromètre. De façon formelle, après passage par le premier cube séparateur en polarisation, et la première lame demi-onde, le champ optique s'écrit

$$\vec{E} = E_0^\omega (\cos \theta \hat{u}_x + \sin \theta \hat{u}_y). \quad (\text{IV.9})$$

En passant par l'échantillon, cette lumière subit une diffusion par la nanoparticule avec une contribution électro-optique induite par la présence du champ électrique quasi-statique. En passant par la deuxième lame demi-onde et le cube séparateur qui fonctionne en analyseur de polarisation à la sortie, le champ diffusé par la nanoparticule s'interfère avec le faisceau signal directement transmis et l'intensité de l'interférence se présente sous la forme suivante :

$$I_{interference}(\theta) \approx 2(E_{ref} + E_s)E_{SC} \propto \epsilon_0 E_0 E_1^\Omega (E_{ref}^\omega + E_s) [r_{33} \cos^2 \theta + r_{13} \sin^2 \theta] \quad (IV.10)$$

Cette expression est illustrée dans la Figure IV-7-b. On remarque dans cette expression la présence de termes en $\cos^2 \theta$ et $\sin^2 \theta$. En traçant la courbe polaire de l'intensité, cela se traduit par deux lobes suivant l'axe x et deux lobes suivant l'axe y. Par contre chaque terme est multiplié par un coefficient électro-optique différent (r_{33} ou r_{13}), le plus élevé étant le r_{33} , qui est 4 fois plus grand que r_{13} . Par conséquent, les lobes selon l'axe x sont nettement plus intenses, et la somme des deux contributions donne en réalité un seul lobe suivant l'axe x mais avec une réponse non nulle suivant l'axe y. Le rapport entre les deux valeurs maximale et minimale, le nombre de lobes ainsi que leurs directions permettra de déterminer l'orientation spatiale du nanocristal par rapport au champ électrique quasi-statique appliqué.

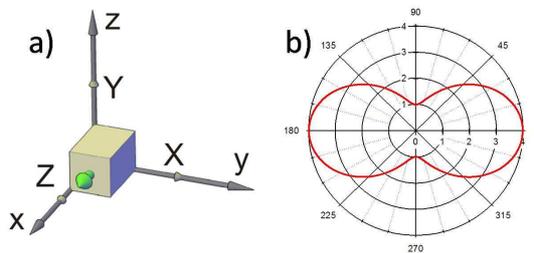


Figure IV-7 : a) Configuration des axes principaux de KTP par rapport aux axes du laboratoire ; b) réponse électro-optique en polarisation correspondante à cette configuration.

IV.IV.1.A Cas général d'une orientation quelconque des axes du nanocristal

Dans le cas général d'une orientation quelconque des axes du nanocristal, l'analyse ci-dessus s'avère plus compliquée. Il faut prendre en compte la direction a priori inconnue de l'orientation du cristal telle que définie par ses angles d'Euler, ce qui impose une transformation du tenseur des coefficients électro-optiques. Cette transformation est représentée par l'équation suivante en coordonnées cartésiennes :

$$r_{i,j,k} = \sum_{i',j',k'} r_{i',j',k'}(i',i)(j',j)(k',k). \quad (\text{IV.11})$$

où (i, j, k) correspondent aux axes (x, y, z) du laboratoire et (i', j', k') aux axes cristallins (X, Y, Z) de la nanoparticule. Les équations (IV.3), (IV.4), (IV.7) et (IV.11) permettent alors de tracer la réponse polaire électro-optique attendue pour différents ensemble d'angle d'Euler.

Les Figure IV-8 a-i, b-i ,c-i représentent les résultats expérimentaux de la dépendance en polarisation de la réponse électro-optique de trois nanocristaux différents. On procède ensuite à la comparaison de ces données avec les résultats théoriques. Une estimation de ces angles dans l'espace peut ainsi être obtenue et représentée sur les Figure IV-8-a-ii, b-ii, et c-ii. A noter que cette orientation est équivalente à une orientation miroir par rapport au centre O. C'est à dire un cristal dont l'axe Z pointe dans le sens $+x$ délivre la même réponse électro-optique en polarisation par rapport à un cristal pointant dans la direction $-x$. La seule façon de distinguer entre les deux orientations est une comparaison de la phase du signal électro-optique (délivrée aussi par la détection synchrone) : on doit s'attendre à une différence de phase de π qu'on pourrait déterminer en interférométrie par rapport à une référence de phase.

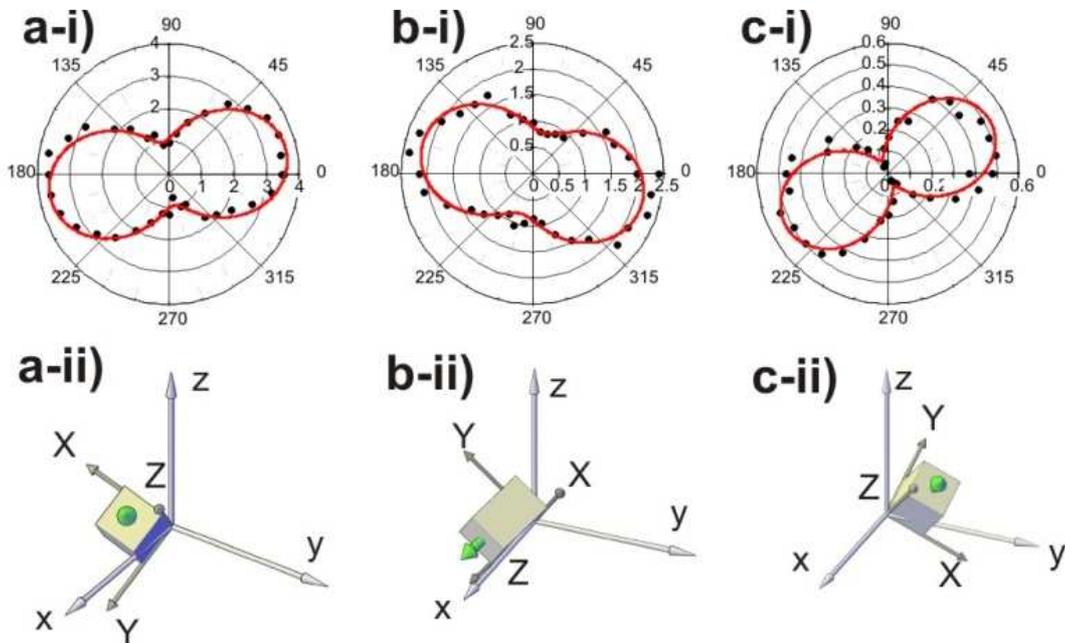


Figure IV-8 : -i) Ajustement théorique de la réponse en polarisation expérimentale pour trois différents orientations. -ii) l'orientation spatiale des axes principaux du cristal pour chaque ajustement

IV.IV.1.B Discussion des erreurs sur l'extraction des angles d'Euler d'un nanocristal

Les erreurs sur la détermination des angles d'Euler sont multiples et peuvent être séparées en erreurs expérimentales et erreurs sur l'ajustement de la simulation aux données expérimentales. Du point de vue expérimental, un désalignement de quelques degrés entre le champ électrique et l'orientation zéro de la polarisation peut exister, ce qui influence la comparaison des données expérimentales avec les résultats théoriques. La simulation contient aussi une certaine indétermination car un certain nombre d'ensemble d'angles d'Euler peuvent donner lieu à une forme de réponse (direction des lobes et rapport entre max et min), ou à des réponses très similaires. Une étude sur cette erreur peut être représentée dans l'espace des angles d'Euler comme des nuages de points d'erreur minimale par rapport aux données expérimentales.

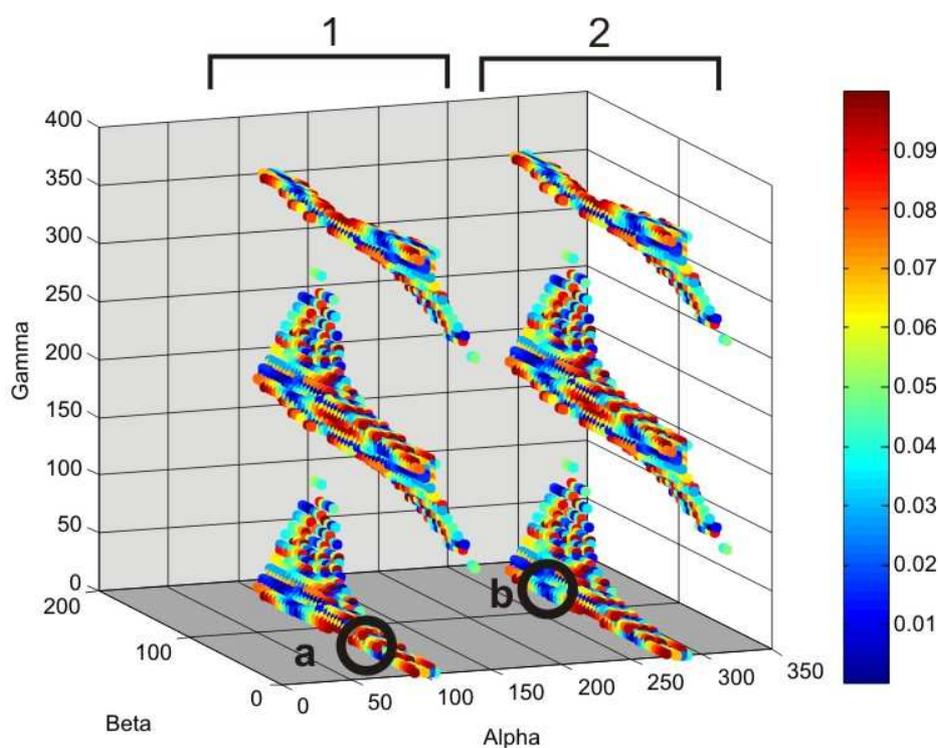
On peut définir cette erreur par la différence entre points expérimentaux et valeurs calculées:

$$\sigma = \frac{1}{N_p} \sqrt{|\text{points expérimentaux}^2 - \text{ajustement}^2|} \quad (\text{IV.12})$$

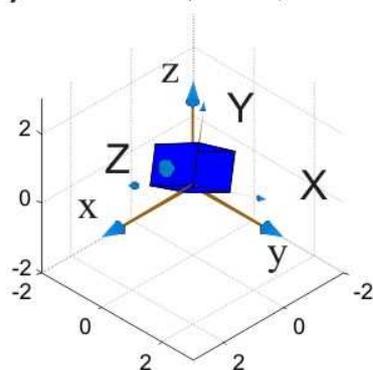
Comme la mise à l'échelle des deux données semble difficile, on représente dans la Figure IV-9 l'erreur relative entre le meilleur ajustement et les autres courbes de la réponse EO en polarisation.

Cette figure trace un nuage de point dont la couleur reflète la différence entre le meilleur ajustement et les autres courbes. On calcule pour chaque point le rapport du maximum de la courbe polaire à son minimum, et on présente la différence entre cette valeur et celle de la meilleure simulation. Le bleu correspond à un minimum d'erreur, alors que le rouge correspond à un maximum d'erreur. Nous avons limité cette erreur à 0,1 en comparant les courbes obtenues aux données expérimentales. L'erreur sur l'angle que fait l'axe principal de la courbe avec celui de la meilleure simulation est prise à $\pm 5^\circ$.

On observe deux régions intéressantes (1 et 2) dans l'espace des angles d'Euler où l'erreur est minimale (Figure IV-9). Les deux sont équivalentes en terme de la direction de l'orientation, mais dans deux sens opposés. Cela correspond à des orientations des axes du cristal dans lesquelles la projection de l'axe principale dans le plan (x,y) fait un angle fixe avec l'axe x. Le PLEOM dans la configuration actuelle n'est pas aussi sensible à l'orientation en z. On peut déterminer ainsi l'orientation de la projection de l'axe du cristal dans le plan (x,y) du laboratoire, avec une erreur de quelques degrés.



a) KTP $\alpha = 100^\circ$ $\beta = 60^\circ$ $\gamma = 10^\circ$



b) KTP $\alpha = 290^\circ$ $\beta = 140^\circ$ $\gamma = 0^\circ$

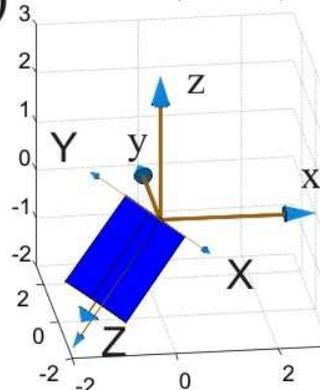


Figure IV-9 : (en haut) Distribution de l'erreur dans l'espace des angles d'Euler. Le bleu foncé correspond à un minimum d'erreur. (en bas) représentation des axes du cristal dans l'axe du laboratoire, chaque cas est représentatif de sens de l'orientation de sa zone.

IV.V Etude en réflexion

La détection en transmission semble limiter quelques applications de la microscopie électro-optique. Mais des méthodes de détection en réflexion plus faciles à réaliser, peuvent être utilisées et permettent d'obtenir des résultats similaires. Il suffit de mesurer les changements de l'intensité réfléchie modulée à la même fréquence que celle du champ. Le schéma de

principe est simple. On envoie un faisceau laser dans l'objectif du microscope tout en passant par un cube séparateur en intensité. La partie réfléchiée sur l'échantillon est ensuite réfléchiée (moitié de l'intensité) par le même cube. Un faisceau référence et le faisceau réfléchi sont ensuite focalisés sur les deux photodiodes du détecteur auto-équilibré Nirvana. Ce dernier permet de mesurer de faibles fluctuations d'intensités sur le faisceau signal quatre fois moins intense que le faisceau référence. C'est bien le cas de l'intensité réfléchiée par la nanoparticule. La Figure IV-10 représente l'image obtenue par balayage de la position du faisceau en réflexion.

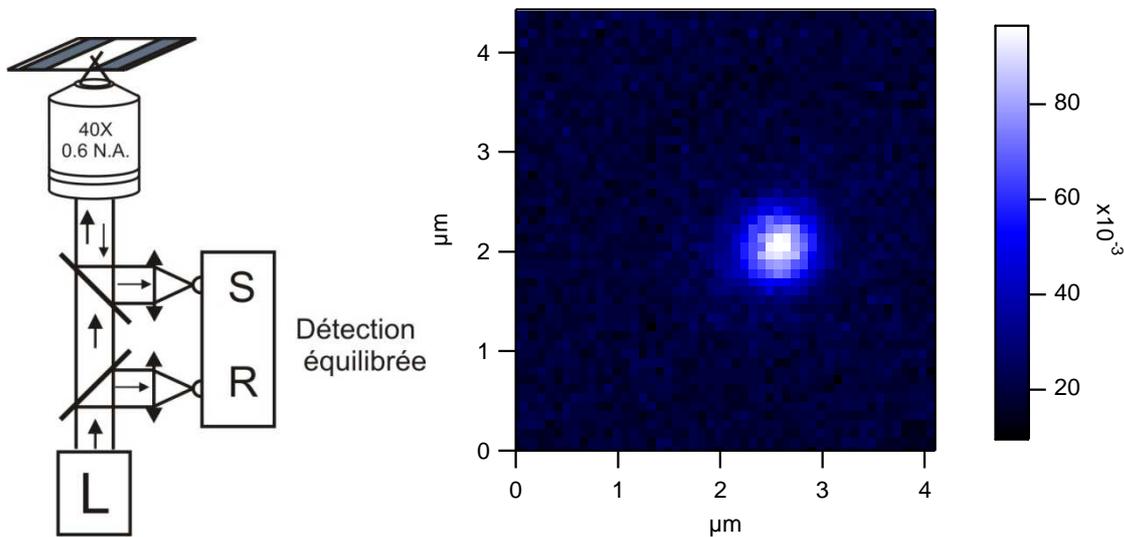


Figure IV-10 : (à gauche) Schéma expérimental de la détection en réflexion. (à droite) Scan typique en réflexion de la réponse électro-optique d'une particule.

IV.VI Interaction entre deux particules électro-optiques

Une des observations les plus intéressantes faites lors de cette étude a été l'interaction entre deux particules proches l'une de l'autre. Dans ce cas on s'attend à deux réponses impulsionnelles qui s'ajoutent l'une à l'autre. Cependant une destruction du signal entre les deux points est observable (Figure IV-11). Une des raisons possible est l'interférence destructive des signaux électro-optiques émanant des deux particules.

Si on regarde la phase de la réponse on remarque un signal intéressant : un basculement de π de la phase électro-optique entre les deux points. Cela veut dire que les deux cristaux pointent dans deux sens différents.

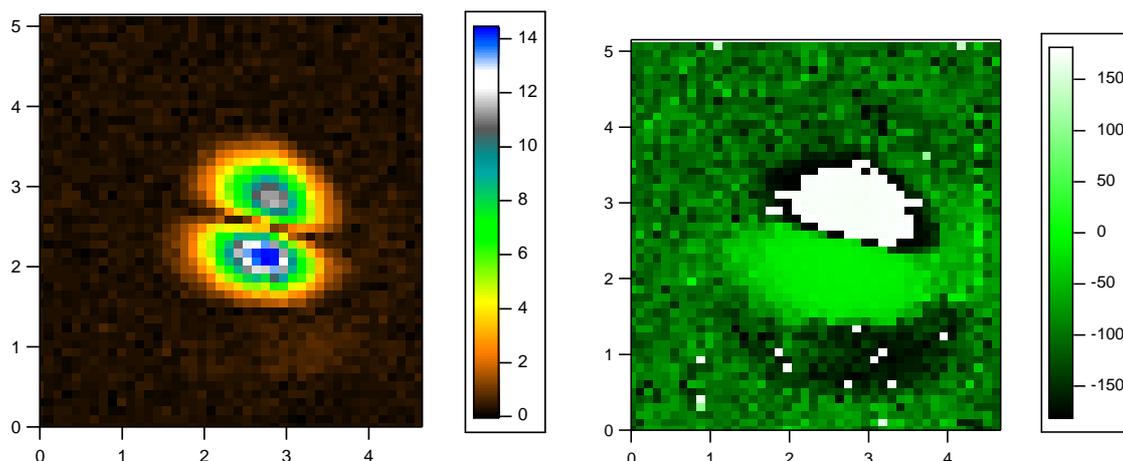


Figure IV-11 : (à gauche) Distribution spatiale de la réponse électro-optique de deux particules adjacentes. On remarque une destruction du signal entre les deux. Cela est dû à l'interférence des signaux. (à droite) Phase de la réponse électro-optique de deux particules adjacentes. On remarque une phase constante pour chaque particule mais une différence de π entre les deux régions. Cela reflète une inversion de la polarité des deux particules l'une par rapport à l'autre.

IV.VII Conclusion du chapitre et perspectives

En conclusion nous avons montré dans ce chapitre ce qui constitue à notre connaissance la première détection de l'effet électro-optique de type Pockels d'une nanoparticule unique, constitué ici de KTiOPO_4 (KTP). Une vérification de la linéarité de la réponse optique ainsi que de l'anisotropie de la réponse démontre sans ambiguïté l'origine électro-optique du signal. Une analyse du signal détecté en termes de variation électro-optique de la diffusion linéaire a permis de mettre au point un modèle permettant d'analyser les données expérimentales et de déterminer l'orientation spatiale du cristal des nano-KTP en 2 dimensions.

Plusieurs voies s'ouvrent dans la continuité de cette recherche sur les nanoparticules comme sondes locales nanométriques du champ électrique quasi-statique. En effet, ayant l'accès au signal électro-optique d'une particule, e.g. la multiplication de sa matrice électro-optique par le champ électrique quasi-statique appliqué, la connaissance de l'orientation du cristal permet de déduire le champ électrique localement.

Si l'on est capable de diminuer la taille des nanoparticules électro-optiques suffisamment, de nombreuses applications sont susceptibles de s'ouvrir en microscopie dans le domaine de la nanophotonique ou de la biophysique. Dans le cadre d'une détection interférométrique, le signal électro-optique est proportionnel au volume de la particule. Par conséquent, une réduction de la taille d'un facteur deux entraîne une diminution du signal d'un facteur 8.

Avec un rapport signal sur bruit de 12 pour des particules de 150nm, il est possible en théorie de détecter le signal d'une nanoparticule de KTP d'une taille de 65nm de dimension. On peut encore diminuer la taille des nanocristaux détectés en utilisant des matériaux plus fortement électro-optique que le KTP, comme c'est le cas pour le Titanate de Barium [63], ou des particules semi-conductrices [64]. D'autres possibilités plus récentes liées à l'exaltation par effet plasmon peuvent aussi être explorées [65].

Une étude plus approfondie nécessite la localisation de la même nanoparticule via la génération de la seconde harmonique ainsi qu'une mesure de taille en AFM, ce qui sera possible avec des échantillons structurés. La dépendance en volume de la réponse électro-optique nécessite la même orientation optimale des différentes nanoparticules. Ceci requiert une étape de *poling* efficace et reproductible de ces nanoparticules.

Enfin, dans le cadre d'un schéma interférométrique, augmenter la puissance sur la voie sonde est de nature à renforcer le signal détecté. Un laser plus puissant mais suffisamment stabilisé aura l'avantage de maximiser cette réponse. D'autres voies de détection en réflexion seront aussi renforcées. Finalement, il sera peut être aussi possible de manipuler des nanoparticules électro-optiques via l'interaction d'un moment dipolaire permanent avec un fort champ électrique statique.

Chapitre V : Etude électro-optique d'une bicouche artificielle phospholipidique dopée

Les deux chapitres précédents étaient dédiés à l'étude de l'effet Pockels dans différents systèmes physiques tels des couches minces de cristaux organiques ou des nanoparticules électro-optiques. Nous avons ainsi établi que la microscopie électro-optique permet de mesurer une distribution de champ électrique quasi-statique avec une bonne résolution spatiale. Cette technique de cartographie de champ pourrait s'avérer intéressante pour l'étude de systèmes biophysiques. C'est le cas par exemple d'une membrane cellulaire, organisée en bicouche, qui délimite une distribution asymétrique d'ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, et dans laquelle des protéines dites protéines membranaires, régulant les flux ioniques, sont immergées. Une telle bicouche constitue une unité de construction pour la majorité des systèmes cellulaires et de leurs organelles. C'est au travers de celle-ci que s'effectuent les échanges avec l'extérieur de la cellule. Il est généralement admis que la majorité des membranes soient construites sur le principe général de la structure en cristaux liquides lyotropiques [66].

Plusieurs types de protéines sont présentes dans une membrane cellulaire, parmi elles les protéines transmembranaires qui permettent la connexion entre l'intérieur et l'extérieur de la

cellule au travers des canaux ioniques. Ces canaux permettent la circulation des ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et de faire varier le potentiel transmembranaire. Une propagation de différence de potentiel au long des neurones permet la transmission des stimulations dans le système nerveux. Comment mesurer une telle différence de potentiel sans avoir recours à des méthodes de détection invasives par contact direct comme c'est le cas dans la méthode de patch-clamp? A la suite de la thèse de Timothée Toury, nous proposons ici une méthode toute optique fondée sur la détection de l'effet électro-optique au travers des membranes dopées.

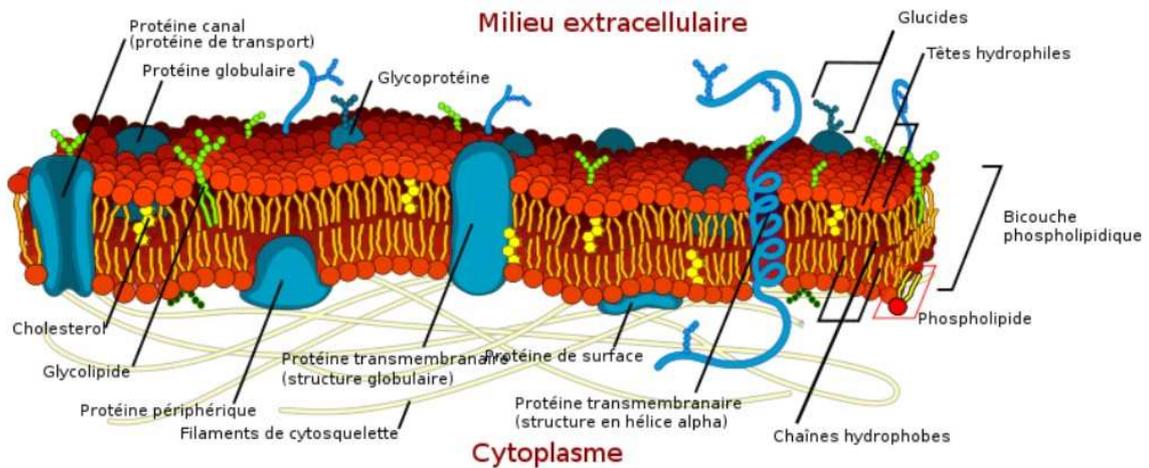


Figure V-1 : Schéma d'une membrane cellulaire, montrant sa structure complexe et ses divers constituants. (Ref wikipedia)

Un système modèle moins compliqué qu'une cellule vivante en préalable à l'étude de celles-ci, est constitué par des lipides artificiellement organisés en bicouche. Ceux-ci ne présentent pas de facteurs de complexité difficilement contrôlables, liés à la forme ou à la distribution des protéines. Une telle bicouche artificielle est couramment utilisée pour des études de protéines transmembranaires.

Dans ce chapitre nous présentons nos études menées sur des bicouches artificielles, formées sur des ouvertures circulaires dans un substrat lui-même immergé dans un dispositif micro-fluidique adapté. Nous commençons par décrire ce dispositif et sa méthode de fabrication, puis nous aborderons la formation de ces bicouches. Une étape de caractérisation électrique d'une bicouche, via des mesures de capacité et de résistance, précèdera les mesures de l'effet électro-optique Pockels.

V.I Bicouche artificielle :

En principe, une bicouche artificielle résulte de l'association de molécules lipidiques dissoutes dans un solvant, qui s'auto-organisent sous l'effet de l'hydrophobicité de leurs têtes polaires en contact avec un milieu aqueux. Sous certaines conditions de température et de pression, ces molécules s'organisent en bicouche. La formation des bicouches artificielles a été le sujet de nombreuses recherches au fil des années, et différentes techniques de formation sont maintenant disponibles. La méthode '*Black lipid membrane*' (BLM), est l'une des plus fiables, avec des résultats reproductibles. La réalisation de telles membranes nécessite l'utilisation d'un dispositif microfluidique bien adapté qui permette par une procédure simple, tout à la fois de former ces bicouches, mais aussi d'avoir accès à la solution tampon de part et d'autre de la membrane. On peut ainsi y introduire différents composés chimiques ou encore des protéines membranaires. Ces biochips ont déjà permis l'étude de l'action d'une seule protéine dans une bicouche, en enregistrant le signal électrique d'ouverture et de fermeture d'un seul canal ionique [67-69].

V.I.1 Dispositif micro-fluidique et étapes de formation d'une bicouche

Pour la réalisation pratique du dispositif micro-fluidique, nous avons bénéficié du savoir faire du groupe de Bruno Le Pioufle du Laboratoire SATIE (Institut d'Almebert), l'étude des bicouches artificielles et leur caractérisation électrique constituant une des activités principales de ce groupe. L'essentiel du travail rapporté dans ce chapitre incluant les mesures électriques a été réalisé avec leur aide.

Dispositif micro-fluidique

Il s'agit tout d'abord de fabriquer une membrane très fine avec une petite ouverture qui sera ensuite prise en sandwich entre deux chambres contenant la solution tampon (Figure V-2). Le dispositif central utilisé est ainsi formé d'un film mince de parylène de 10 μ m d'épaisseur, dans lequel une ouverture (ou plusieurs) de 40 μ m de diamètre a été perforée. Il faut ici respecter la contrainte que l'épaisseur de ce trou soit au moins trois fois plus petite que son diamètre pour que la bicouche soit suffisamment stable (par expérience).

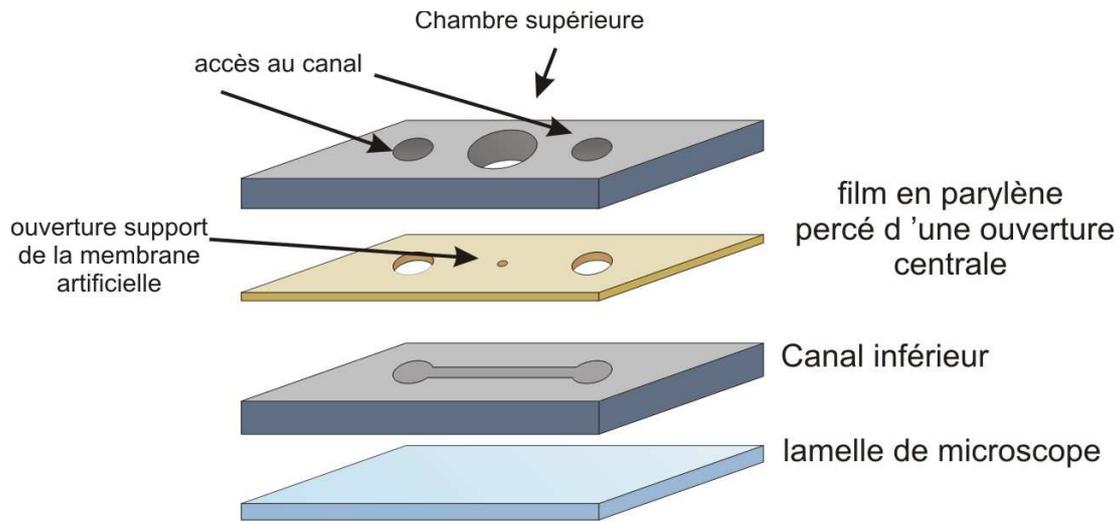


Figure V-2 : Schéma éclaté du dispositif micro-fluidique.

Une plaque de plexi-glass, où un canal a été fraisé mécaniquement, est collée sur une lame de verre (lamelle de microscope de $170\mu\text{m}$ d'épaisseur). Sur ce dispositif on colle le film de parylène perforé puis on ajoute une seconde plaque de plexiglas comportant deux accès au canal, ainsi qu'une chambre circulaire située au dessus de l'ouverture dans le parylène.

Pour la solution tampon, on utilise une solution formée par 0.1M de KCL et 10mM du MOPS (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*) au pH7. Le phospholipide utilisé est le L- α -phosphatidylcholine à partir d'œuf de poulet (Egg, Chicken), à une concentration de 20 mg/ml dissoute dans du N-décane.

Une monocouche de phospholipide est non-centrosymétrique mais son organisation en bicouche rend le système centro-symétrique, ce qui exclut tout effet d'optique non-linéaire du second ordre. Le signal électro-optique Pockels intrinsèque étant a priori nul, il faut doper la membrane de façon asymétrique avec des molécules non linéaire dans une seule des couches. Pour cela le DI-8-ANEPPS constitue un bon candidat. Ce colorant est bien connu pour la sensibilité de sa fluorescence au champ électrique [70-75], et pour ses propriétés optiques non-linéaires d'ordre deux [76-77]. Ces propriétés ont déjà permis le suivi de signaux électriques dans des membranes dopées par modification de sa fluorescence, ou encore par la variation de l'intensité de la génération de la seconde harmonique. La Figure V-3 représente la formule chimique de ce colorant. On remarque sa longue chaîne de carbone qui limite l'internalisation de ces molécules à travers la membrane lipidique et réduit la dégradation du signal optique. Dans notre expérience le DI-8-ANEPPS a été dissous dans du DMSO à une concentration de 1 mg/ml .

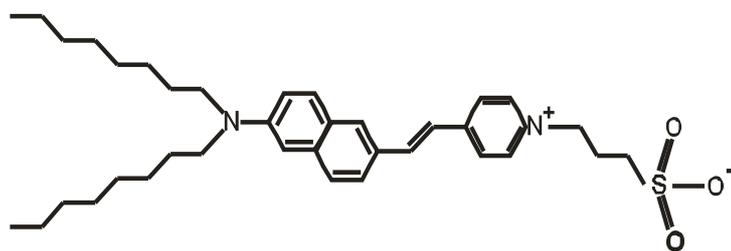


Figure V-3 : Structure chimique du DI-8-ANEPPS

V.I.1.A Procédure de formation de la bicouche et observations optiques

On commence par introduire dans la chambre supérieure du dispositif micro-fluidique 3 μ l du colorant DI-8-ANEPPS dissout dans 15 μ l de la solution tampon (Figure V-4-a), puis on injecte dans le canal inférieur 8 μ l de la solution lipidique. Le lipide s'étale au niveau du trou, et les chaînes lipidiques s'auto-orientent par hydrophobicité lors du contact avec la solution tampon (Figure V-4-b). La même solution tampon, mais cette fois sans colorant, est ensuite introduite dans le canal inférieur, ce qui pousse le lipide restant dans le canal et entoure le lipide présent au niveau de la membrane par la solution tampon des deux côtés (Figure V-4-c). Des films épais de lipides peuvent alors se former, mais sous certaines conditions favorables, le lipide s'organise spontanément en bicouche.

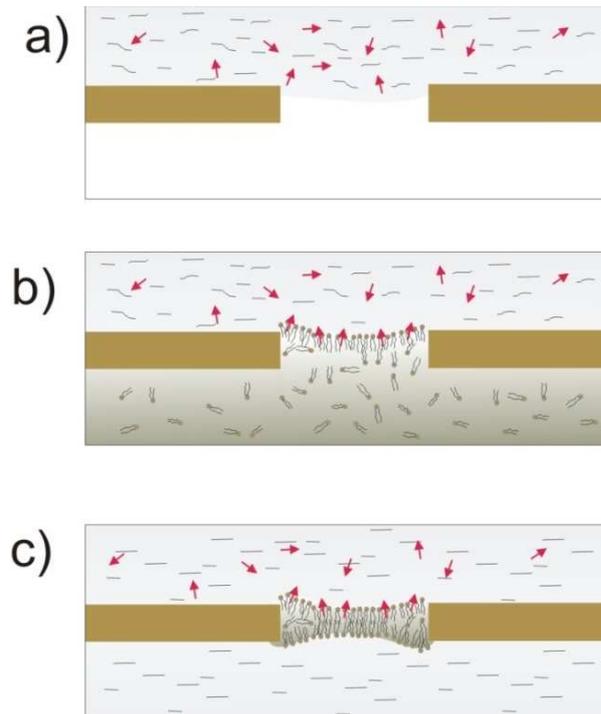


Figure V-4 : Les étapes de formation de la bicouche. a) Introduction dans la chambre supérieure du colorant dissous dans la solution tampon. b) Injection de la solution lipidique dans le canal inférieure. c) Introduction de la solution tampon dans le canal et formation de la bicouche.

V.I.1.B Observations optiques :

Un des avantages de ce dispositif est la possibilité de suivre ces étapes sous microscope optique. En effet, il est possible de constater visuellement la formation de la bicouche. Du fait de l'interférence destructive de la lumière réfléchie sur les faces du film ultramince (quelques nanomètres), la bicouche apparaît noire. Un anneau apparaît autour de la bicouche, connu sous le nom d'anneau de Gibbs. Cet anneau, sous l'influence d'un champ électrique appliqué au travers de la membrane, se rétrécit vers les bords du trou jusqu'à ce que la bicouche couvre éventuellement la totalité du trou pour des valeurs de champs plus grandes.

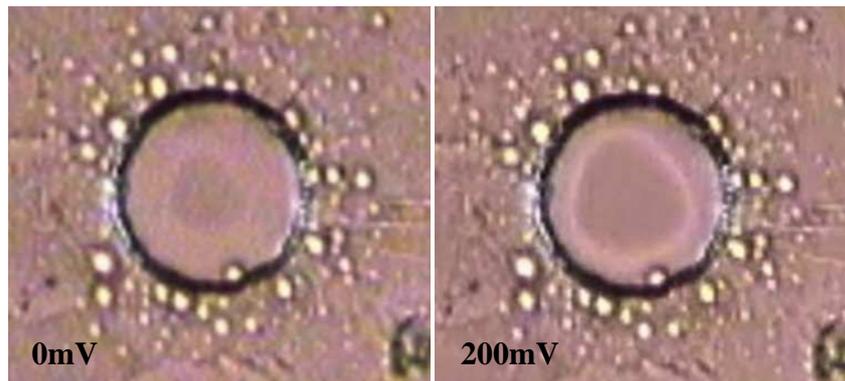


Figure V-5 : Image en lumière blanche du trou sur lequel la bicouche est formée. On y remarque l'anneau de Gibbs qui se rétracte sous l'influence d'un champ électrique statique appliqué.

Une deuxième étape de vérification et de caractérisation électrique est ensuite effectuée. Cette caractérisation électrique des bicouches nécessite l'introduction, dans la partie supérieure et inférieure du biochip, de deux électrodes en argent sur lesquelles une couche de chlorure d'argent a été déposée. Pour cela les fils en argent sont trempés dans une solution d'acide chlorhydrique pendant 10 minutes, pendant lesquelles une couche uniforme se dépose sur ces fils suivant la réaction chimique : $Ag^+ + Cl^- \rightarrow AgCl$.

V.I.2 Caractérisation électrique d'une membrane

Une bicouche artificielle constitue en réalité un isolant électrique (la bicouche phospholipidique) entre deux solutions conductrices (solution tampon). Cette bicouche possède alors une capacité et une résistance. Le circuit électrique équivalent à la bicouche correspond à une capacité et une résistance en parallèle. Les valeurs de la capacité et de la résistance dépendent fortement du lipide utilisé, de la longueur de sa chaîne de carbone ainsi que du solvant. La valeur de la résistance se situe en général aux alentours des Giga Ω . Par conséquent et en première approximation, on peut remplacer la membrane par une simple capacité. Le milieu tampon, qui entoure la membrane et qui permet la connexion électrique avec les électrodes AgCl, a une résistance équivalente liée à la vitesse de déplacement des ions lors de l'application d'un champ électrique. Un circuit RC en série est donc créé par association de cette résistance d'accès à la membrane avec la capacité de la membrane elle-même.

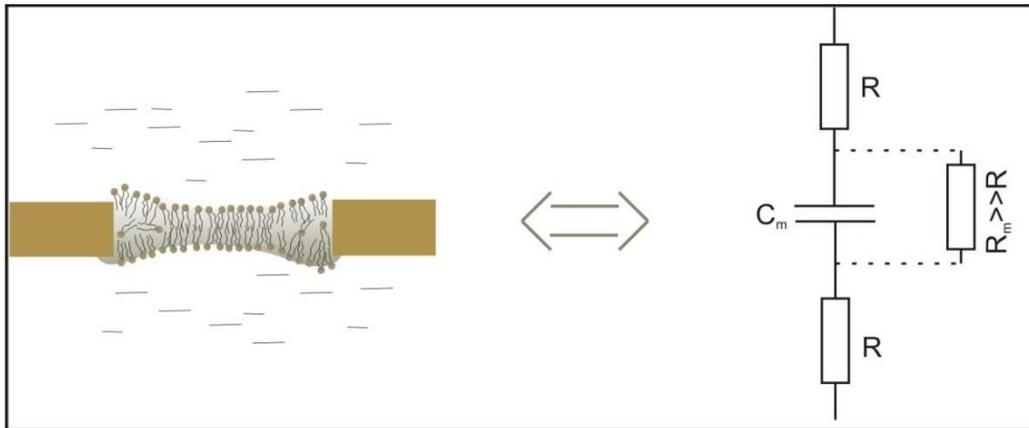


Figure V-6 : Circuit équivalent à une bicouche artificielle.

Un tel circuit RC se comporte comme un filtre passe-bas limitant la marge de fréquence de modulation de la différence de potentiel utilisable. Pour estimer cette fréquence de coupure, une mesure de la conductivité du milieu et de la capacité de la bicouche a été réalisée. Une résistance de $5430\ \Omega$ a été mesurée pour la solution tampon.

La capacité de surface de la bicouche est typiquement de l'ordre de $0,4\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [78]. Comme la bicouche est formée sur une ouverture circulaire de $40\ \mu\text{m}$ de diamètre, d'une surface de $\approx 5 \times 10^3\ \mu\text{m}^2$, on obtient une capacité de l'ordre de $20\ \text{pF}$. Dans notre système microfluidique nous avons en réalité 9 ouvertures pour permettre d'éventuelles mesures en parallèle, soit 9 bicouches formées en parallèles, donnant une capacité totale de l'ordre de $C_t = 180\ \text{pF}$.

La résistance d'accès à une bicouche est donnée par [79] :

$$R_a = \frac{\rho}{4a} \quad (\text{V.1})$$

ρ étant la résistance du milieu tampon, et a le rayon de l'ouverture. La résistance totale est alors $1,8 \times 10^3\ \Omega$.

Le temps de réponse du circuit RC vaut alors $\tau = RC = 3,2 \times 10^{-8}\ \text{s}$ soit une fréquence de coupure de $f_c = \frac{1}{2\pi RC} = 0,5\ \text{MHz}$.

A noter aussi qu'une autre fréquence de coupure existe, c'est celle du milieu conducteur (solution tampon) au dessus de laquelle les ions ne peuvent plus suivre la variation de potentiel. Cette fréquence est donnée par :

$$f_c = \frac{1}{2\pi} \frac{1}{\sigma \varepsilon} \quad , \quad (\text{V.2})$$

où σ est la conductivité du milieu et ε sa permittivité électrique. Dans notre cas cette fréquence est estimée alors à 260 MHz.

Toute fréquence électrique en dessous de ces deux valeurs est utilisable. Les fréquences qu'on utilise sont de l'ordre de 20 KHz.

V.I.3 Mesure électro-optique et modèle associé.

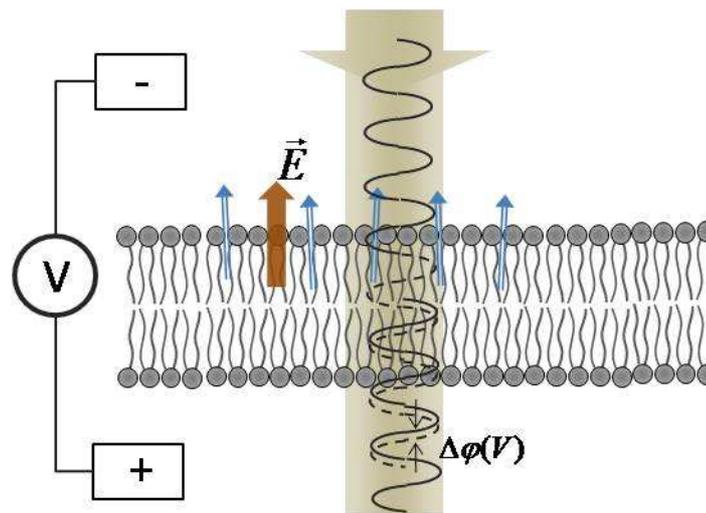


Figure V-7 : Illustration de la création du déphasage électro-optique par transmission au travers une membrane dopée.

Une fois la bicouche formée et le colorant inséré d'un seul côté de la membrane, on procède à la mesure de l'effet EO en utilisant notre système de détection, un faisceau lumineux traversant cette membrane subit alors un déphasage propagatif. Une membrane ayant de plus des propriétés EO Pockels ajoute à ce premier déphasage une contribution électro-optique lorsque le champ électrique quasi-statique est appliqué (Figure V-7). On procède alors à l'acquisition temporelle du signal de la détection synchrone. La Figure V-8

montre un exemple d'acquisition temporelle tout d'abord sans champ appliqué puis après son application. On voit nettement apparaître un signal électro-optique, avec un rapport signal à bruit supérieur à 3, une fois appliqué le champ électrique quasi-statique modulé.

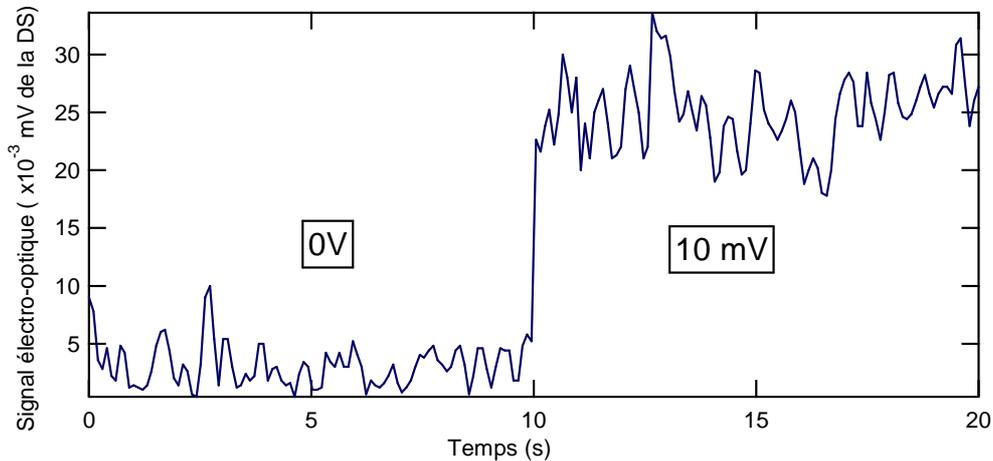


Figure V-8 : Réponse électro-optique temporelle d'une membrane artificielle dopée sous une différence de potentiel de 10mV d'amplitude crête-crête modulée à 20kHz

En variant l'amplitude du champ électrique appliqué sur la bicouche une dépendance linéaire du signal détecté est obtenue (Figure V-9), ce qui constitue une des principales signatures de l'effet électro-optique Pockels.

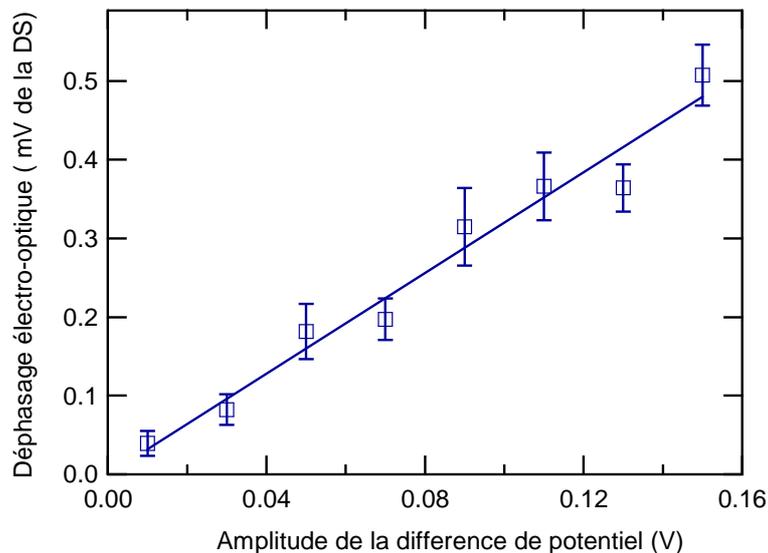


Figure V-9 Dépendance linéaire de la réponse Pockels d'une bicouche dopée en fonction de l'amplitude du champ appliqué.

Pour écarter l'éventualité que le signal observé ne soit pas dû à l'effet Pockels résultants des molécules de colorant et de leur orientation mutuelle au sein de la membrane, mais à un autre effet, nous avons répété cette expérience sans insérer de colorant dans la bicouche. Aucun signal électro-optique n'est alors détecté en l'absence de colorant, ce qui prouve que le signal est bien dû simultanément à la présence du colorant et à l'application du champ électrique. Par ailleurs, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre associé à la description du microscope électro-optique (*chapitre 2*), la variation de l'absorption ou de l'émission du colorant qui peut s'ajouter au signal détecté est elle aussi éliminée du fait que la différence de phase optique entre les deux bras de l'interféromètre est maintenue à $\pi/2$ rad.

En balayant la position du faisceau sonde sur la totalité de la bicouche au niveau de l'ouverture, on reconstitue une cartographie de la réponse électro-optique. Une image typique est représentée sur la Figure V-10, où on reconnaît en particulier l'ouverture dans le biochip. On observe aussi une certaine non-uniformité de la réponse électro-optique. Ceci peut-être dû à une dispersion inégale du colorant dans la membrane. L'hypothèse d'une membrane épaisse n'est pas non plus écartée, ainsi qu'une inhomogénéité de l'effet relaxation orientationnel des colorants.

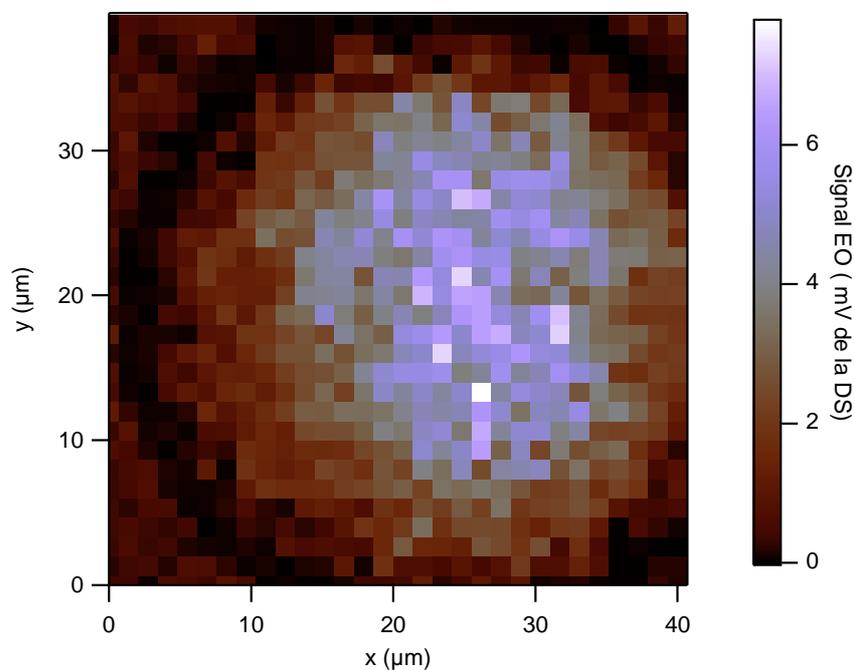


Figure V-10 : Distribution spatiale de la réponse électro-optique dans une membrane dopée.

V.II Modèle simplifié de l'insertion des colorants dans la membrane et effet électro-optique associé

Le modèle le plus simple utilisé pour expliquer l'effet du colorant, est celui d'une insertion dans la membrane avec un degré de liberté azimutal autour de la perpendiculaire au plan de la membrane. Appelons θ_0 , l'angle du cône. On en déduit la matrice électro-optique associée à la distribution conique des molécules (Figure V-11).

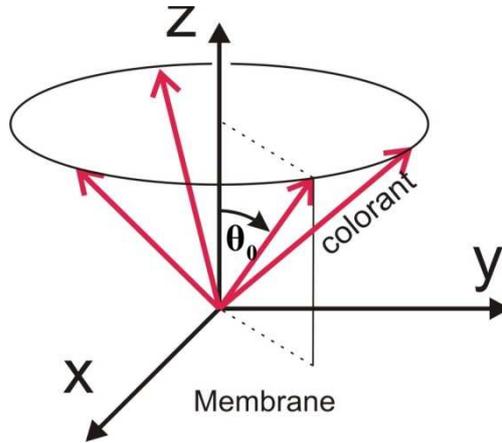


Figure V-11 : Modèle de la distribution en cône des molécules insérées dans la membrane, avec un angle θ_0 fixe entre une molécule de colorant et l'axe perpendiculaire à la membrane

L'effet électro-optique Pockels est lié à la susceptibilité non-linéaire d'ordre deux de la polarisation électrique. Pour une distribution de molécules, cette susceptibilité est décrite par l'expression suivante :

$$\chi_{ijk}^{(2)}(\omega + \Omega; \omega, \Omega) = N f^2(\omega) f(\Omega) \iint_{\vec{\rho}} \beta_{ijk}(\omega + \Omega; \omega, \Omega) P(\vec{\rho}) d\vec{\rho} \quad (\text{V.3})$$

où $\chi_{ijk}^{(2)}(\omega + \Omega; \omega, \Omega)$ est la susceptibilité non-linéaire macroscopique d'ordre 2, Ω représente la fréquence du champ électrique appliqué, qui est quasi-statique par rapport à la fréquence optique ω . Le film de molécules de colorant non-linéaire a une densité N surfacique, et chaque molécule a une polarisabilité moléculaire β . Les indices (i, j, k) se rapportent ici aux axes du laboratoire (x, y, z) . En intégrant sur l'ensemble des molécules uniformément réparties sur le cône d'axe z et d'angle θ_0 , on obtient la susceptibilité macroscopique non linéaire du film. On remarque la nécessité d'une organisation des molécules non-centrosymétriques pour avoir un signal non nulle. L'orientation des molécules dans l'espace est donnée par leurs angles solides $\vec{\rho}$, définis par les angles d'Euler

moléculaires. $f(\omega)$ et $f(\Omega)$ sont les facteurs de champ local optique et statique respectivement. Le tenseur β a une forme plus naturelle dans le système d'axes (I, J, K) associé à la géométrie de la molécule (X, Y, Z) , et par une transformation des axes, l'équation (V.3) devient :

$$\chi_{ijk}^{(2)}(\omega + \Omega; \omega, \Omega) = Nf^2(\omega)f(\Omega) \sum_{IJK} \iint_{\vec{\rho}} \beta_{IJK}(\omega + \Omega; \omega, \Omega) P(\vec{\rho}) (\vec{I} \cdot \vec{i}) (\vec{J} \cdot \vec{j}) (\vec{K} \cdot \vec{k}) d\vec{\rho}. \quad (\text{V.4})$$

Comme la molécule de colorant en question est supposée unidimensionnelle, le transfert de charge intramoléculaire qui décrit β étant principalement orienté selon l'axe de la molécule, on peut réduire le tenseur à une seule composante non nulle selon l'axe principal de la molécule β_{ZZZ} . Dans le cas des molécules de colorant orientées en cône dans la membrane, la probabilité d'orientation peut être exprimée en première approximation par

$$P(\vec{\rho}) = \frac{\delta(\theta - \theta_0)}{2\pi \sin(\theta_0)} \quad (\text{V.5})$$

Par conséquent :

$$\chi_{ijk}^{(2)}(\omega + \Omega; \omega, \Omega) = Nf^2(\omega)f(\Omega) \beta_{ZZZ}(\omega + \Omega; \omega, \Omega) \frac{\iint \delta(\theta - \theta_0) (\hat{I}, \hat{i}) (\hat{J}, \hat{j}) (\hat{K}, \hat{k}) d\theta d\varphi}{2\pi}. \quad (\text{V.6})$$

La symétrie cylindrique ne laisse que quelques composantes non nulles du tenseur (en supposant les relations de Kleinman valide, c.à.d. des conditions d'opérations non résonnantes) :

$$\chi_{zzz}^{(2)} \quad \text{et} \quad \chi_{xxz}^{(2)} = \chi_{yyz}^{(2)} = \chi_{xyy}^{(2)} = \chi_{xzx}^{(2)}, \quad (\text{V.7})$$

avec

$$\chi_{zzz}^{(2)} = Nf^2(\omega)f(\Omega) \beta_{ZZZ} \cos^3(\theta_0) \quad (\text{V.8})$$

et

$$\chi_{xxz}^{(2)} = Nf^2(\omega)f(\Omega) \beta_{ZZZ} \frac{\sin^2(\theta_0) \cos(\theta_0)}{2}. \quad (\text{V.9})$$

Les coefficients électro-optiques sont liés à la susceptibilité non-linéaire d'ordre deux par l'expression :

$$r_{ijk} = -\frac{2\chi_{ijk}^{(2)}(\omega + \Omega; \omega, \Omega)}{n_{ii}^2 n_{jj}^2} \quad (\text{V.10})$$

La notation en indices contractés (regarde Tableau II-1), qui transforme ijk en lk , permet d'écrire la matrice électro-optique sous forme du tableau rectangulaire suivant :

$$[r_k] = \begin{pmatrix} 0 & 0 & r_{13} \\ 0 & 0 & r_{13} \\ 0 & 0 & r_{33} \\ 0 & r_{13} & 0 \\ r_{13} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad (\text{V.11})$$

avec

$$r_{33} = -2 \frac{N}{n^4} f^2(\omega) f(\Omega) \beta_{zzz} \cos^3(\theta_0), \quad (\text{V.12})$$

et

$$r_{13} = -\frac{N}{n^4} f^2(\omega) f(\Omega) \beta_{zzz} \sin^2(\theta_0) \cos(\theta_0). \quad (\text{V.13})$$

en considérant que $n = n_{ii} \approx n_{jj}$. On remarque la dépendance caractéristique des coefficients r_{ij} en fonction de la désorientation angulaire θ_0 (aussi appelée angle de "tilt"). On peut alors obtenir θ_0 par simple division des deux coefficients électro-optiques:

$$\frac{r_{13}}{r_{33}} = \frac{1}{2} \tan^2(\theta_0). \quad (\text{V.14})$$

Cette relation permet de valider le modèle à partir des mesures expérimentales de coefficients électro-optiques.

V.II.1.A Déphasage induit

Une membrane dopée, électro-optiquement active, d'épaisseur e et soumise à un champ électrique, induit un déphasage additionnel sur une onde électromagnétique qui la traverse.

Ce déphasage dépend de la direction de la polarisation de la lumière incidente comme le montre l'équation (V.11) . En terme de déphasage, cela se traduit par l'expression générale suivante:

$$\Delta\varphi_i = \frac{2\pi}{\lambda} e \Delta n_i = -\frac{\pi}{\lambda} e n_i^3 \sum_j r_{ij} E_j^\Omega. \quad (\text{V.15})$$

Dans la configuration de la bicouche dopée, la seule composante non nulle des champs électriques quasi-statique est suivant l'axe z de la membrane. Il est clair que les déphasages électro-optiques suivant deux polarisations linéaires perpendiculaires dans le plan de la membrane (c.à.d. suivant les axes x et y) sont les mêmes. Le Tableau V-1 montre des mesures de cet effet électro-optique, en comparaison avec le cas d'un cristal électro-optique anisotrope référence, le LiNbO₃.

Tableau V-1 : Comparaison de la réponse électro-optique Pockels pour deux polarisations différentes 0° et 90°, entre la bicouche artificielle dopée et un cristal de LiNbO₃.

Polarisation de la lumière	Déphasage électro-optique (x 10 ⁻⁴ rad)	
	Membrane artificielle	cristal de LiNbO ₃
x	2.09±0.14	1.82±0.15
y	2.12±0.23	20.12±2.32

V.II.1.A.(i) Coefficient électro-optique r₁₃ :

Revenons à la dépendance linéaire du signal EO en fonction de la valeur du champ électrique appliqué. En théorie, la pente de cette courbe est proportionnelle au coefficient électro-optique r₁₃ selon l'équation (V.15).

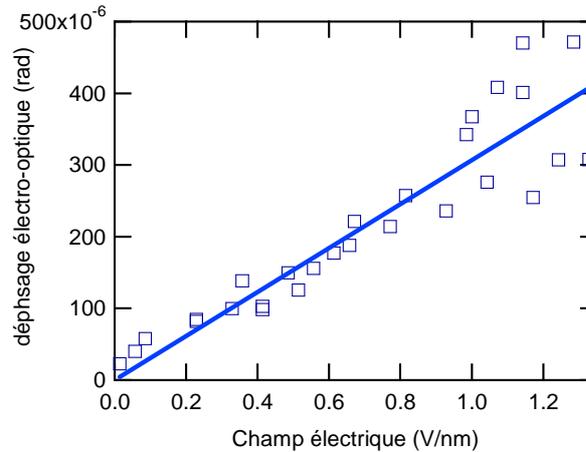


Figure V-12 : Dépendance linéaire du déphasage EO en fonction de la valeur du champ électrique quasi-statique appliqué.

Sur la Figure V-12 la pente de la courbe est estimée à $(\pi/\lambda) e n^3 r_{13} \approx (30.6 \pm 1.2) \times 10^{-5} \text{ rad.nm/V}$. Il est difficile de donner des valeurs exactes de l'épaisseur et de l'indice de réfraction de la bicouche. Ici nous supposons que les propriétés macroscopiques des constituant de la bicouche sont valables microscopiquement, ce qui est couramment supposé pour des films minces [80]. Les valeurs $e=7\text{nm}$ et $n=1.5$ semblent être des estimations raisonnables qui ont déjà été utilisées dans la littérature [81]. On estime ainsi le coefficient électro-optique de la membrane à $r_{13} = 2,6 \text{ pm/V}$. Cette valeur semble raisonnable, puisqu'elle correspond aussi à des signaux SHG non négligeables d'un film orienté de DI-8-ANEPPS rapportés dans certaines publications [77].

V.III Conclusion et perspectives de ce chapitre

Dans ce chapitre nous avons discuté théoriquement et expérimentalement de l'effet électro-optique Pockels d'une membrane artificielle dopée. Ces membranes artificielles sont largement utilisées comme modèle simplifié des membranes cellulaires. L'origine de l'effet électro-optique a été vérifié, ainsi que la dépendance linéaire en fonction de l'amplitude du champ électrique quasi-statique appliqué. Aucune anisotropie optique de la réponse électro-optique en fonction de la direction de la polarisation n'a été enregistrée, ce qui est en bon accord avec la symétrie axiale de la distribution des molécules du colorant dans la membrane.

Il a été observé que certaines membranes artificielles sont capables de supporter des tensions d'une dizaine de volts modulés à haute fréquence. L'hypothèse de la présence de membranes épaisses dans certaines observations n'est donc pas écartée, le même principe de raisonnement restant alors toujours valable.

La meilleure sensibilité à l'effet électro-optique d'une membrane dopée correspond à une différence de potentiel appliquée de 10mV, avec un rapport signal sur bruit non-négligeable, de l'ordre de 3. On a utilisé dans ce cas un objectif de microscope à immersion, ce qui permet une meilleure qualité optique du faisceau traversant le dispositif micro-fluidique. Notons aussi que nous avons mesuré une certaine dépendance de l'effet électro-optique en fonction de la fréquence de modulation, mais nous ne l'avons pas encore étudié en détails (Figure V-13). Ceci nous pousse à faire l'hypothèse qu'il existe une fréquence de résonance d'oscillation mécanique de la membrane, et qu'elle contribue au signal détecté (d'origine EO Pockels ou autre).

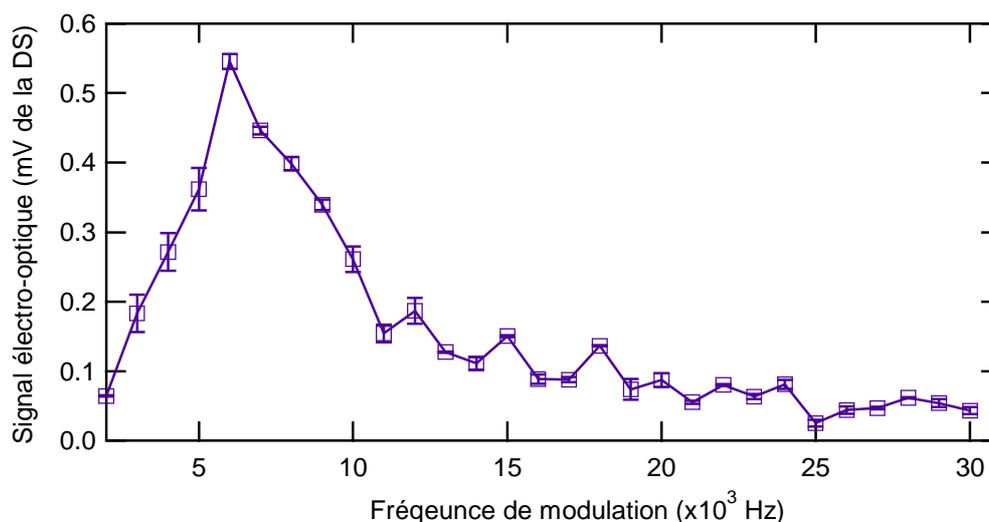


Figure V-13 : Dépendance du signal électro-optique en fonction de la fréquence de modulation de la différence de potentiel appliqué. On observe un pic à 6kHz.

On envisage à la suite de ce travail de faire des mesures en parallèles de la réponse Pockels et de la génération de seconde harmonique (GSH) de façon à estimer la contribution relative des effets mécaniques qui ne contribuent pas à la GSH instantanée. Ceci constituera aussi une étape de validation de la non-centrosymétrie créé par le colorant dans la membrane et de son orientation.

Une meilleure caractérisation de l'orientation du colorant dans la membrane doit être menée. Pour cela une polarisation optique suivant l'axe z est nécessaire au foyer de l'objectif

du microscope. Un faisceau polarisé radialement focalisée avec un objectif de microscope de forte ouverture numérique permettra d'obtenir une telle composante en z . L'objectif de microscope que nous avons utilisé dans nos expériences a une ouverture numérique (O.N. 0,6 dans l'air, 0,8 dans l'eau) trop faible pour cela, ce qui ne permet pas d'atteindre la composante en z au foyer. Une autre possibilité serait d'incliner d'un angle connu la membrane et de mesurer la dépendance en polarisation de l'effet électro-optique en fonction de cet angle d'inclinaison. Une telle mesure permettra d'extraire l'angle d'intercalation du colorant dans la membrane artificielle selon l'équation (V.14). Une meilleure caractérisation de l'effet du colorant nécessitera aussi une mesure de l'effet électro-optique pour différentes concentrations de colorant dans la membrane. On s'attend à une saturation du signal optique au-delà d'une certaine limite, ou à des effets d'orientation mutuelles des colorants (structure mesogène).

La distribution du champ électrique à travers la membrane est compliquée. Nous avons utilisé ici l'approximation que le champ y est uniforme. Toute une génération de colorant existe dont le rôle est de s'insérer dans différentes zones de la membrane : partie externe de la membrane, chaîne carbonique ou partie interne. Nous nous attendons à ce que le signal Pockels de chacun de ces colorants reflète cette non-homogénéité en z du champ électrique.

On peut prévoir d'autres expériences liées à l'introduction de certaines impuretés dans la membrane, ou à l'introduction de canaux ioniques voire à l'influence de l'ouverture des canaux sur le champ électrique effectif dans la membrane. La mesure optique de l'activité de ces canaux avec une sensibilité à l'ouverture d'un seul canal serait une avancée remarquable.

En conclusion, nous avons franchi un premier pas dans un domaine assez vaste et prometteur, et qui sera la première étape d'une caractérisation optique de l'activité électrique des membranes artificielles. Les résultats obtenus durant ce travail montrent une sensibilité suffisante pour des mesures de l'effet électro-optique dans des membranes cellulaires vivantes. Toutefois cette réalisation est limitée par des contributions mal comprises d'autres effets de phases que le chapitre suivant s'efforcera de mettre en évidence et de décrire.

Chapitre VI : Application de la microscopie électro-optique à l'étude de cellules vivantes : résultats préliminaires.

En 1791 Galvani est le premier à faire l'observation expérimentale que le fonctionnement du système nerveux est liée à son activité électrique [82]. Depuis lors, les chercheurs n'ont cessé de concevoir et de construire de nouveaux instruments scientifiques capables de mesurer et contrôler une telle activité électrique.

Différentes techniques, directes et indirectes, ont été développées pour mesurer ou suivre ces variations de champ. Parmi les méthodes indirectes, on peut citer celles qui sont fondées sur l'optique : génération de seconde harmonique, fluorescence, biréfringence et diffusion. Toutefois la méthode directe reste la plus exacte. Cette technique connue sous le nom de "patch-clamp" fut nettement améliorée par Erwin Neher et Bert Sakmann à Göttingen en 1976, ce qui leur valut le prix Nobel de physiologie et médecine en 1991. Leur invention a permis d'enregistrer les courants ioniques associés à un canal ionique unique, et a ainsi permis de mettre en évidence le rôle de ces canaux dans des processus cellulaires tels que la propagation des potentiels d'action [6].

La technique du patch-clamp consiste à mettre une micropipette en contact direct avec l'intérieur de la cellule et à mesurer directement la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. De par sa fiabilité et la rapidité de la mesure, le patch-clamp reste aujourd'hui la technique la plus utilisée par les électro-physiologistes pour des mesures directes de potentiels électriques ainsi que pour l'application d'une excitation électrique.

Cette méthode reste cependant délicate à mettre en œuvre, électriquement et mécaniquement, nécessitant un véritable savoir faire. Autre inconvénient majeur: elle est irréversible en ce qu'elle conduit à la mort de la cellule étudiée. La quête d'une méthode moins invasive sans

contact mécanique, en particulier optique, est donc tout à fait d'actualité et vise à pallier à ces inconvénients.

Dans ce chapitre nous étudions la possibilité d'utiliser la microscopie électro-optique pour réaliser des mesures locales de champs dans les milieux biologiques, en particulier les membranes cellulaires. Nous discuterons en particulier des effets susceptibles d'entrer en compétition avec l'effet Pockels et qui peuvent aussi contribuer à la variation de la phase optique. Le patch clamp sera utilisé pour la caractérisation des cellules utilisées, mais aussi pour l'application d'un champ électrique connu.

VI.I Description sommaire de la technique de Patch-Clamp

Le terme "patch-clamp" (en anglais) désigne une méthode d'électro-physiologie pour la mesure et l'enregistrement de courants ioniques au travers de membranes cellulaires. Cette méthode consiste à mettre en contact une micro-pipette, dont l'ouverture est de l'ordre de $1\mu\text{m}$ en diamètre, avec la cellule étudiée (Figure VI-1). La micropipette est remplie d'une solution ionique très conductrice dans laquelle est insérée une électrode en chlorure d'argent. Une autre électrode de référence plonge dans une solution conductrice où baigne la cellule.

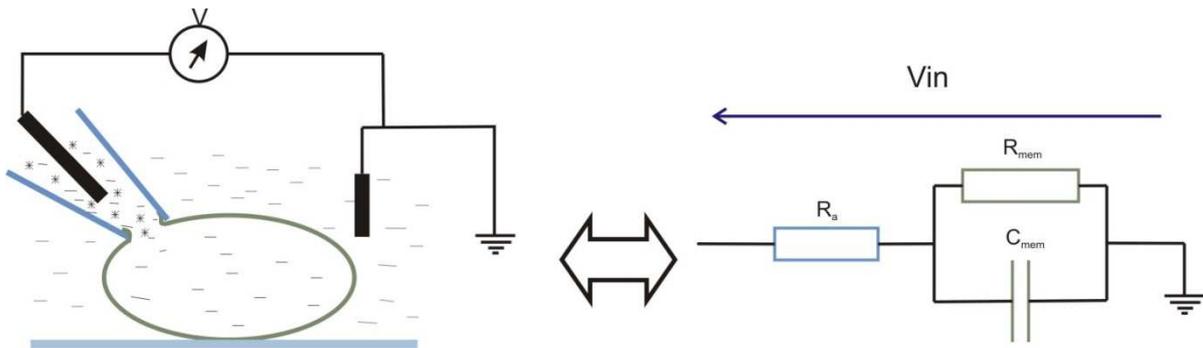


Figure VI-1 : Schéma du principe général du patch-clamp. C_{mem} représente la capacité électrique de la membrane et R_a la résistance d'accès de la pipette. R_{mem} est la résistance de la membrane.

Plusieurs configurations d'utilisation de cette pipette sont possibles : cellule entière (*whole cell configuration*), un fragment de la membrane etc... Ici nous allons nous intéresser au cas de la mesure de l'activité électrique d'une cellule entière. Dans cette configuration, la pipette est amenée en contact de la membrane cellulaire jusqu'à disparition complète de tout courant de fuite, ce qui traduit que la totalité de l'ouverture de la pipette est couverte par la membrane phospholipidique (*Giga-Ohm seal*). Le courant est mesuré par les deux électrodes

en appliquant un signal carré de 5mV d'amplitude modulé à 50Hz avec un offset de -60 mV . Une fois que l'on a obtenu un courant nul, une petite succion permet de rompre la membrane cellulaire et la solution ionique de la pipette entre en contact direct avec l'intérieur de la cellule tout en restant bien isolée de l'extérieur de la cellule. La différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est déterminée à l'aide d'un amplificateur placé aussi près que possible de l'échantillon pour minimiser les bruits. Celui-ci permet de mesurer des courants de l'ordre de quelques nA. La configuration "cellule entière" permet alors d'enregistrer l'activité électrique de la cellule et également d'appliquer un champ électrique connu au travers de la membrane cellulaire. La Figure VI-2 montre d'une façon simplifiée (sans entrer en détails), les différents courants et différences de potentiel entrant en jeu durant ces mesures.

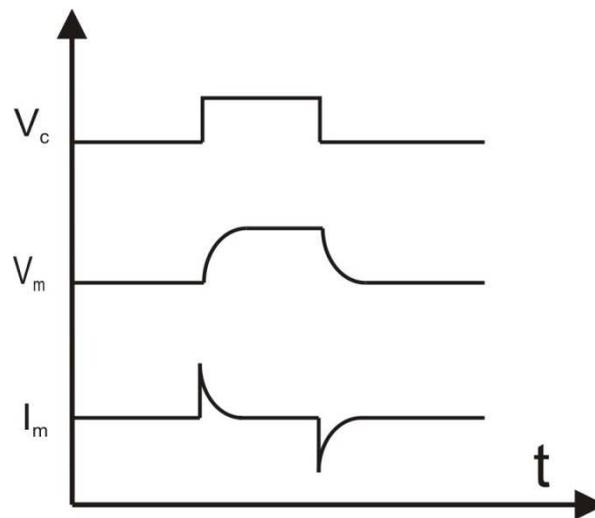


Figure VI-2 : V_c : tension de commande d'amplitude 5mV appliquée au travers de la pipette sur la cellule, V_m est la d.d.p. effectivement appliquée de part et d'autre de la membrane (charge puis décharge), I_m correspond au courant mesuré, qui permet également d'induire la constante de temps $\tau = RC$ à partir de la décroissance du courant transitoire.

Dans notre étude de la réponse optique d'une cellule sous champ, nous allons utiliser le patch-clamp pour la caractérisation électrique, puis ensuite pour l'application d'une différence de potentiel connue au travers de la membrane. L'installation du patch-clamp et les mesures correspondantes ont été réalisées en collaboration avec Brandon Stell, chercheur au sein du groupe de neuroscience dirigé par le Professeur Alain Marty à Paris V.

VI.II Choix des cellules

Les cellules ont été soigneusement choisies pour répondre à nos exigences. Notre choix s'est aussi porté sur des cellules de type PC12 qui dérivent d'une lignée cellulaire de phéochromocytomes de l'*adrenal medulla* du rat [83]. Ces cellules cessent de se diviser et se différencient en neurones sous l'influence d'un facteur de croissance nerveux (*nerve growth factor* –NGF) [84]. Pour cela les cellules PC12 sont utilisées comme modèle pour la différenciation cellulaire. Ce point est intéressant puisque nos études se poursuivront ultérieurement par des mesures de potentiels d'actions auto-déclenchables. Pour nos premiers tests, nous avons choisi des cellules non différenciées. Ces cellules ont une forme plutôt rondes ce qui réduit leur capacité électrique, et qui conduit à une fréquence de coupure plus grande. On détaille ce point dans la partie '*mesures électriques*' ci dessous.

VI.II.1 Croissance :

Les PC12 ont été fournies par la société ATCC, et ont été mis en culture dans les laboratoires du LBPA puis dans celle du département de biologie de l'ENS de Cachan. Les PC12 sont maintenues dans du RPMI 164 + 10% de sérum de cheval, 5% de sérum fœtal de veau et 1% de pénicilline/Streptomycine.

La croissance des PC12 révèle d'un processus délicat. En effet ces cellules sont réputées difficiles à faire croître et s'attachent difficilement aux surfaces de verre ou de plastique. Pour cette raison, chaque changement de flasque nécessite un traitement de la surface avec de la polylysine. En réalité la surface du plastique ou du verre est chargée négativement. Dans le premier cas, ceci est lié au traitement plasma du polystyrène, alors que le verre est chargé via les liaisons pendantes SiO^- de sa surface. Cette charge négative de surface s'oppose à l'accrochage des cellules de PC12. Une couche de polylysine, chargée positivement, permet de rendre la surface électriquement neutre et faciliter ainsi l'adhésion des cellules.

La croissance de ces cellules est réalisée dans un incubateur maintenu à 37°C avec un apport constant de CO_2 . Un changement de milieu nutritif est effectué tous les 3 jours et une division en plusieurs flasques est répétée périodiquement pour éviter la surpopulation.

Pour les expériences sous microscope, les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri. Celles-ci ont été percées au centre pour permettre d'y coller une lamelle de microscope. Cette étape est nécessaire, étant donné la configuration actuelle en transmission du microscope

EO. On évite de cette manière toute sorte de diffusion provenant d'impuretés, et on annule le parcours de la lumière dans le plastique. On préserve alors le caractère gaussien du faisceau optique transmis, alors peu perturbé par la traversée d'un tel dispositif. On enlève ensuite le milieu et on lui substitue un milieu riche en ion. Il s'agit du PBS (*phosphate buffered saline*), une solution tampon capable d'assurer la conduction électrique avec l'électrode maintenue à la masse.

VI.II.2 Caractérisation électrique des cellules PC12

Comme nous l'avons discuté dans le chapitre précédent, l'excitation électrique du système formé par la membrane cellulaire est limitée électriquement par une fréquence de coupure intrinsèque à chaque membrane. Dans la configuration de patch-clamp, la membrane cellulaire est équivalente à une capacité électrique C_m placée en série avec la résistance d'accès de la pipette R_a , ce qui correspond à un comportement en filtre passe bas dont la fréquence de coupure est de $1/2\pi R_a C_m$.

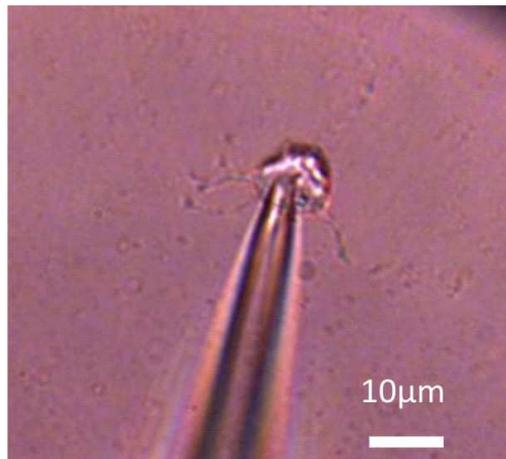


Figure VI-3 : Cellule de PC12 et la micropipette du patch-clamp

Les valeurs de la résistance et de la capacité sont déterminées en étudiant la réponse du système à une excitation électrique de forme carrée. Le temps de chargement de la membrane est une fonction exponentielle croissante, dont la constante de temps correspond à $\tau = R_a C_m$. La Figure VI-4 montre le courant qui passe par l'amplificateur et qui décroît lors du chargement de la membrane. En faisant l'ajustement de ces données avec une exponentielle décroissante, on peut en déduire la constante de temps et ainsi les valeurs de R et C. Les valeurs typiques sont de l'ordre de 22 M Ω pour la résistance et 5 pF pour la capacité des petites cellules, aboutissant à une fréquence de coupure de 1,2kHz.

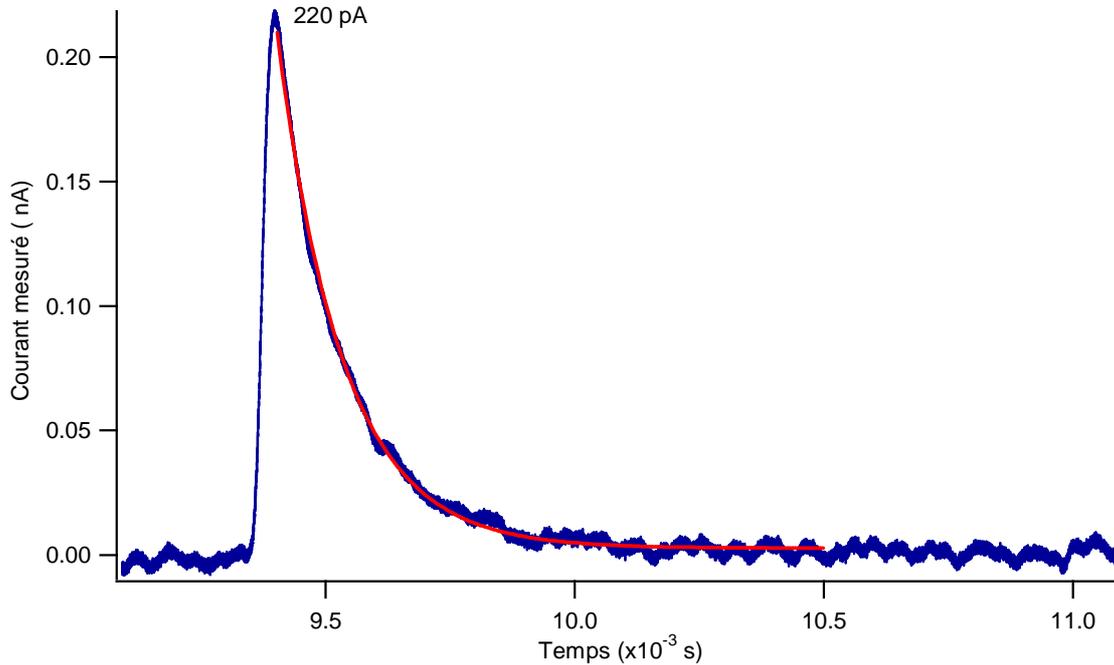


Figure VI-4 : Exemple de décroissance du courant pendant le chargement de la membrane (en bleu), et ajustement avec une exponentielle décroissante (en rouge). Dans cet exemple la résistance est de 23 M Ω alors que la capacité est de 5,7 pF, correspondant à une fréquence de coupure de 1,2kHz.

Pour augmenter cette fréquence de coupure et être capable d'appliquer un champ électrique modulé à une fréquence supérieure à la fréquence de coupure basse du microscope, il faut diminuer la résistance d'accès de l'électrode ou bien la capacité de la membrane. Cette dernière est une propriété intrinsèque à chaque cellule, mais une forme ronde et de petite taille est de nature à réduire la capacité de la membrane cellulaire. D'autre part, la résistance d'accès est influencée par différents facteurs dont la conductivité de la solution ionique dans la micropipette ainsi que le diamètre d'ouverture de cette dernière. Un compromis doit être trouvé entre la dimension de la micropipette et la faisabilité du patch-clamp: la résistance diminue avec l'élargissement du diamètre, ce qui rend d'autant plus difficile la faisabilité du patch. De plus un circuit additionnel existe dans le module électronique Axopatch200B qui permet de compenser cette résistance d'accès. La compensation est exprimée en pourcentage de la valeur de la résistance, et la fréquence de coupure est alors exprimé par $f'_c = 1/2\pi R_a(1-P)C_m$ où P est le pourcentage de compensation. Selon les cas, une augmentation de la fréquence de coupure allant jusqu'à 10kHz pourra aussi être atteinte.

VI.III Modèle de la réponse électro-optique tridimensionnelle d'une cellule

Au chapitre précédent, nous avons développé un modèle pour la réponse électro-optique d'une membrane dopée. Ce modèle est aussi valable pour une membrane cellulaire. La seule différence est la forme plus compliquée d'une cellule et le double passage du faisceau sonde par la membrane. Pour prendre en compte l'angle d'inclinaison de la membrane, une transformation de la matrice électro-optique en chaque point de la membrane est nécessaire pour se reporter au système commun des axes principaux du laboratoire. Cette transformation du système d'axes est donnée par l'équation tensorielle générale :

$$r_{i,j,k} = \sum_{I,J,K} r_{IJK} (\vec{I} \cdot \vec{i})(\vec{J} \cdot \vec{j})(\vec{K} \cdot \vec{k}) \quad , \quad (\text{VI.1})$$

où (I, J, K) correspond au repère (X, Y, Z) de la membrane cellulaire et (i, j, k) celui de (x, y, z) du laboratoire.

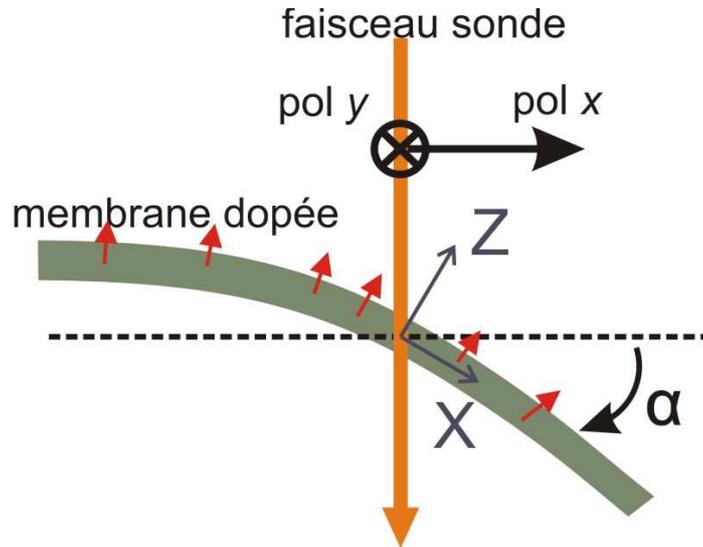


Figure VI-5 : Configuration des différents paramètres quand un angle de déviation existe entre le faisceau sonde et la membrane.

L'expression analytique d'une transformation tridimensionnelle étant compliquée à représenter, nous montrons le cas simple d'une membrane faisant un angle α avec l'horizontale comme montré à la Figure VI-5. La transformation tensorielle se réduit alors à une simple rotation plane d'un angle α autour de l'axe y . La matrice électro-optique devient alors :

$$r' = \begin{bmatrix} 0 & r_{13} \sin \alpha & r_{13} \cos \alpha \\ 0 & 3r_{13} \cos^2 \alpha \sin \alpha + r_{33} \sin^3 \alpha & r_{13} (3 \cos^3 \alpha - 2 \cos \alpha) + r_{33} \sin^2 \alpha \cos \alpha \\ 0 & r_{13} (\sin^3 \alpha - 2 \cos^2 \alpha \sin \alpha) + r_{33} \cos^2 \alpha \sin \alpha & 3r_{13} \sin^2 \alpha \cos \alpha + r_{33} \cos^3 \alpha \\ 0 & r_{13} (\cos^3 \alpha - 2 \sin^2 \alpha \cos \alpha) + r_{33} \sin^2 \alpha \cos \alpha & r_{13} (\sin^3 \alpha - 2 \cos^2 \alpha \sin \alpha) + r_{33} \cos^2 \alpha \sin \alpha \\ r_{13} \cos \alpha & 0 & 0 \\ r_{13} \sin \alpha & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{VI.2})$$

Cette expression relie le déphasage électro-optique à l'angle d'inclinaison α de la membrane ainsi qu'à la polarisation de la lumière incidente. On doit s'attendre, au cas où le champ électrique quasi-statique appliqué est uniforme sur toute la cellule, à un signal plus grand vers les bords de la cellule ($\alpha \approx \frac{\pi}{2}$). Dans ce cas l'axe Z des molécules est orienté suivant la polarisation x (ou y) de la lumière sonde.

VI.IV Mesures optiques en parallèle avec les mesures de Patch-Clamp (dépendance linéaire)

Une des possibilités d'utilisation du système d'acquisition de patch-clamp 'Axopatch' est d'appliquer une différence de potentiel connue au travers de la micropipette, avec une commande électrique externe. Bien que ce soit une méthode directe pour appliquer un champ électrique constant tout au long de la cellule, sa mise en œuvre pratique est compliquée. Le fait que la morphologie cellulaire soit constamment en modification ainsi que l'existence d'instabilités mécaniques, entraîne des modifications des propriétés électriques de la cellule. La valeur de la différence de potentiel appliquée varie elle aussi continument.

D'un point de vue optique, et avec de telles contraintes, on observe un signal au centre de la cellule qui est très bruité et qui varie autour d'une valeur moyenne. Le signal électrique de la commande était modulé à 4 kHz, une fréquence plus petite que la fréquence de coupure de la cellule étudiée (7 kHz). Cette moyenne tracée en fonction de la différence de potentiel de la commande est linéaire, mais présente un écart type important (Figure VI-6).

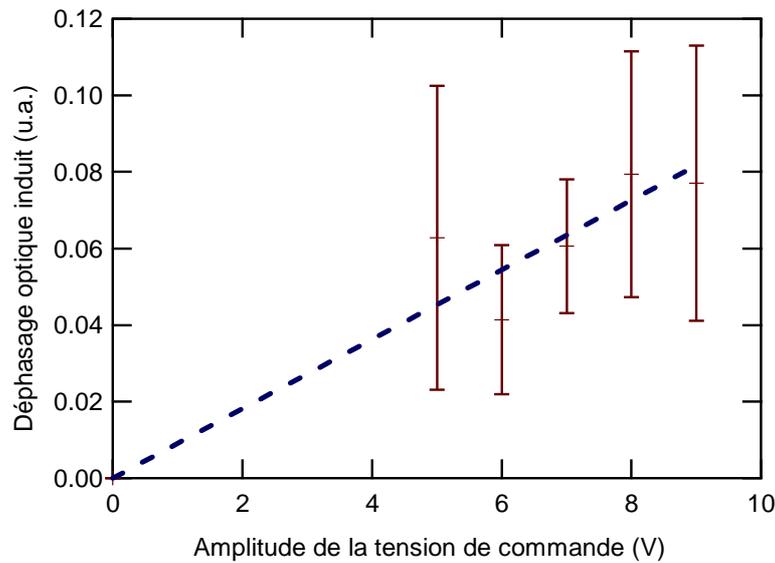


Figure VI-6 : Dépendance approximativement linéaire du signal du microscope EO en fonction de la tension de commande externe. On remarque le grand bruit qui existe dans ces mesures.



Figure VI-7 : vue d'ensemble de l'installation de la mesure de patch-clamp sur le microscope. a) le système Axopatch, b) le système de contrôle des micromanipulateurs, c) configuration des micromanipulateurs et le préamplificateur sur le PLEOM.

Il nous est apparu que le patch-clamp classique induit une limitation expérimentale de notre montage. En effet la pipette est fixée sur la table optique ce qui empêche un balayage spatial de la cellule. Celle-ci est placée sur une platine piézo-électrique séparée des micromanipulateurs du patch (Figure VI-7). Nous avons donc utilisé une méthode plus classique pour l'application d'un champ électrique.

VI.IV.1 Premières images en MEO des cellules entre électrodes planaires

La fréquence de coupure du système (patch-clamp + cellule) s'est révélée constituer une limitation pour l'application de la différence de potentiel électrique. Pour contourner cette difficulté, une application directe du champ électrique au travers d'électrodes planaires pourrait être une alternative. Nous avons réalisé cette excitation avec des électrodes planaires séparées de 220 micromètres avec une épaisseur de 20 micromètres (Ces électrodes ont été réalisées par l'équipe de Bruno Le Pioufle et Olivier Français au SATIE, ENS Cachan). Ceci confère une uniformité du champ électrique et des lignes de champ tout au long des électrodes. Une cellule placée entre ces électrodes déforme les lignes de champ. Par conséquent, une certaine non-uniformité du champ électrique au travers de la membrane cellulaire est créée et doit être appréciée (Figure VI-8).

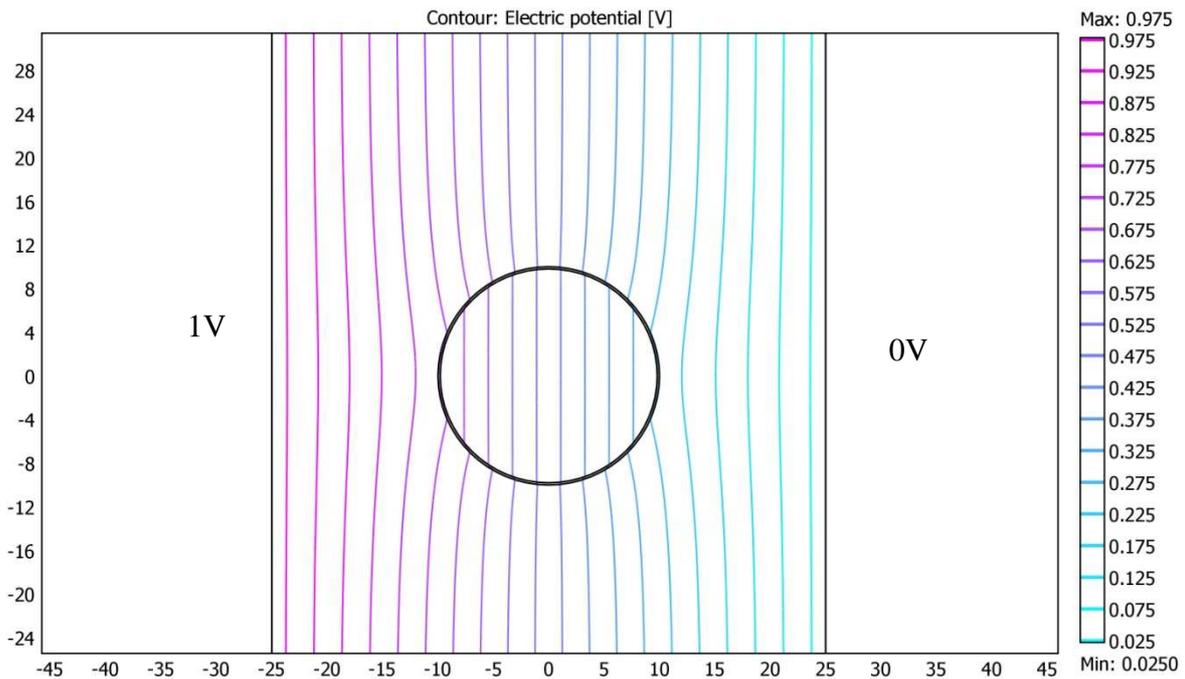


Figure VI-8 : Cartographie des lignes de potentiel au travers d'une cellule ronde placée entre deux électrodes espacées de 50 μ m. Le calcul est fait en utilisant le logiciel COMSOL.

L'application d'un champ électrique uniforme E dans un milieu conducteur entourant une cellule, quelle que soit sa taille et sa géométrie, induit une altération de la distribution

spatiale du potentiel transmembranaire. La variation du potentiel transmembranaire dans une cellule sphérique uniforme est donnée par [85]:

$$\Delta V_m = -\frac{3}{2} E a \frac{\cos \theta}{\sqrt{1+(\omega\tau)^2}}, \quad (\text{VI.3})$$

où θ est l'angle polaire relatif au champ appliqué, a est le rayon de la cellule. $\Omega = \frac{\omega}{2\pi}$ est la fréquence du champ électrique quasi-statique appliqué à travers les électrodes. τ est un temps de relaxation caractéristique donné par

$$\tau = aC_{mem} (\rho_{int} + \rho_{ext}/2). \quad (\text{VI.4})$$

où C_{mem} est la capacité de la membrane cellulaire en F.cm^{-2} , ρ_{int} et ρ_{ext} sont les résistivités des milieux intra- et extracellulaire respectivement exprimées en $\Omega \cdot \text{cm}$.

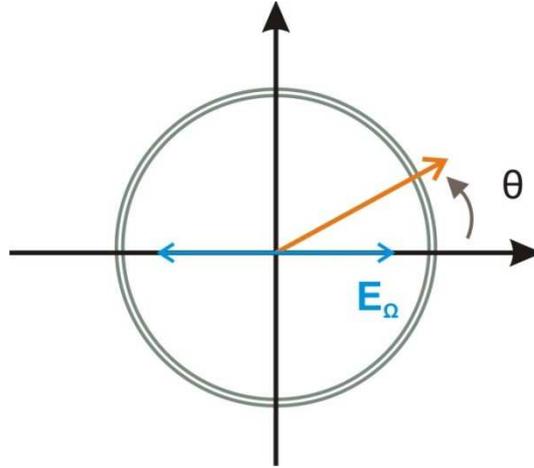


Figure VI-9: Illustration d'une membrane cellulaire et de l'angle θ qui gouverne la distribution spatiale de la différence de potentiel transmembranaire

Dans ce cas, la déformation des lignes de champ induit une augmentation du potentiel extracellulaire d'un facteur $\frac{3}{2}$. La variation de potentiel transmembranaire n'est alors constituée que du changement de la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. La forme en $\cos \theta$ de la différence de potentiel membranaire induit un champ électrique de la même forme représenté dans la Figure VI-10.

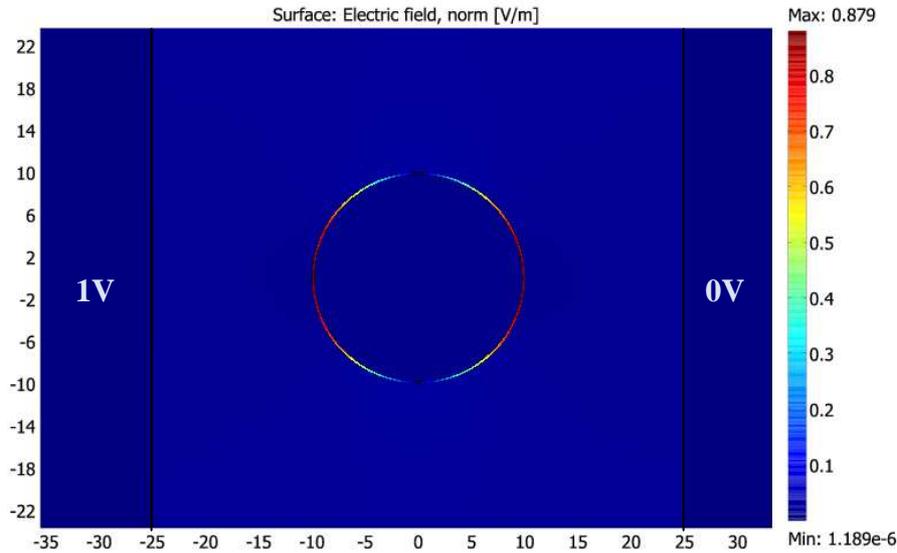


Figure VI-10 : Distribution spatiale des composantes l'amplitude du champ électrique au travers de la membrane cellulaire. On remarque la forme en $\cos(\theta)$ du champ total.

Pour réaliser l'expérience sur les cellules, nous avons prélevé des cellules de PC12 dans un milieu conducteur à base de sucrose. Le RPMI est très conducteur et induit un chauffage très important par effet Joule lors de l'application d'une différence de potentiel de 1V.

$$W = R i^2 = \frac{V^2}{R} \quad (\text{VI.5})$$

W est l'énergie dissipé en forme de chaleur, R la résistance du milieu, i et V représentent le courant et la différence de potentiel dans ce milieu. Le sucrose, moins conducteur, réduit cet échauffement, et reste compatible avec la survie des cellules en dehors de l'incubateur pendant plusieurs heures. Le sucrose utilisé est de 0.25M en concentration, au pH de 6.7 et pour une conductivité de $1.66\mu\text{S/cm}$. Les cellules sont détachées du fond des flasques par un jet de ce milieu, et sont prélevées dans des Eppendorfs. Une goutte de cette solution est ensuite mise sur les électrodes. Un certain temps doit ensuite s'écouler avant le début des mesures : les cellules '*nageantes*' ont en effet besoin d'un certain temps pour s'accrocher au fond du dispositif microfluidique. La forme ronde des cellules non-attachées va faciliter la comparaison des signaux enregistrés avec la prédiction théorique.

Une différence de potentiel modulée à 20 kHz et de quelques volts d'amplitude est ensuite appliquée entre les électrodes. Un temps d'intégration de 100ms est utilisé sur la détection synchrone du microscope EO pour obtenir un signal suffisamment stable.

Les premiers signaux de la variation du déphasage optique avec le microscope EO sont représentés sur la Figure VI-11 qui montre une image par balayage typique de la réponse optique d'un lot de cellules qui subissent l'influence du champ électrique. On obtient des réponses nettes et contrastées qui reflètent la distribution spatiale en $\cos\theta$ du champ électrique.

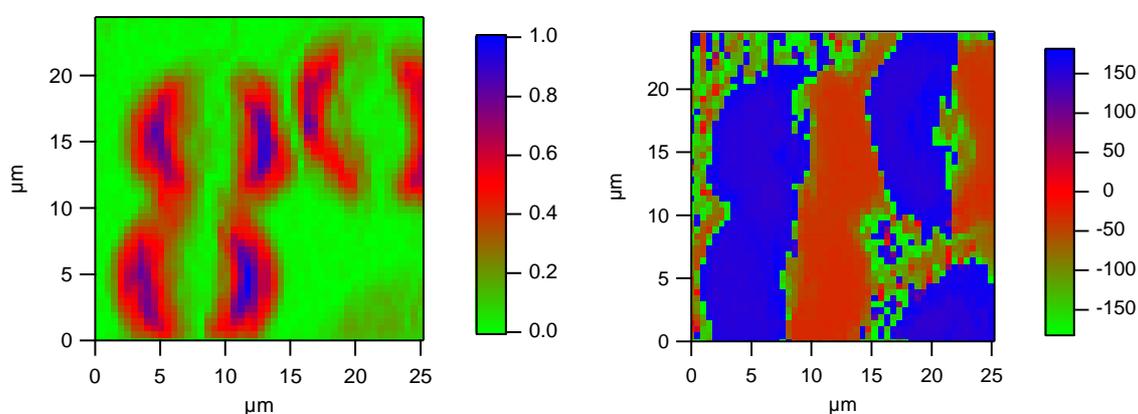


Figure VI-11 : (à gauche) Premières images du déphasage induit par champ électrique appliqué sur des cellules de PC12 placée dans une solution conductrice. Cette image montre une réponse maximale des deux côtés droite et gauche des cellules, près des électrodes. L'intensité est exprimée en mV de la détection synchrone. Ce scan reflète la forme théorique de la distribution du champ électrique. (à droite) Scan de la phase du signal : on remarque le déphasage de π en passant de droite à gauche de la cellule. La phase est donnée en degrés.

Il faut aussi noter l'aspect intéressant de la phase du signal montrée sur la Figure VI-11-b, qui varie de π radians lorsque l'on passe de la moitié droite à la moitié gauche de la cellule. Ce déphasage apparaît lié à l'orientation absolue des molécules, qui sont d'orientations opposées dans les deux moitiés d'une cellule.

Ce type de signal a été observable à la fois dans les cellules dopées par colorant DI-8-ANEPPS, mais aussi et ceci de façon inattendue, en l'absence d'un tel dopage. Pour comprendre l'origine de cette réponse intrinsèque nous avons procédé à d'autres expériences simples.

Premièrement, en variant l'amplitude du champ appliqué au travers les électrodes une réponse quasi-linéaire est obtenue pour les faibles valeurs de champs (Figure VI-12). Au-

delà d'une certaine limite, il apparait une saturation de la réponse. A noter qu'un signal similaire a aussi été enregistré dans des cellules attachées à la surface du substrat, où le champ électrique a été appliqué au moyen de fils conducteurs bien espacés.

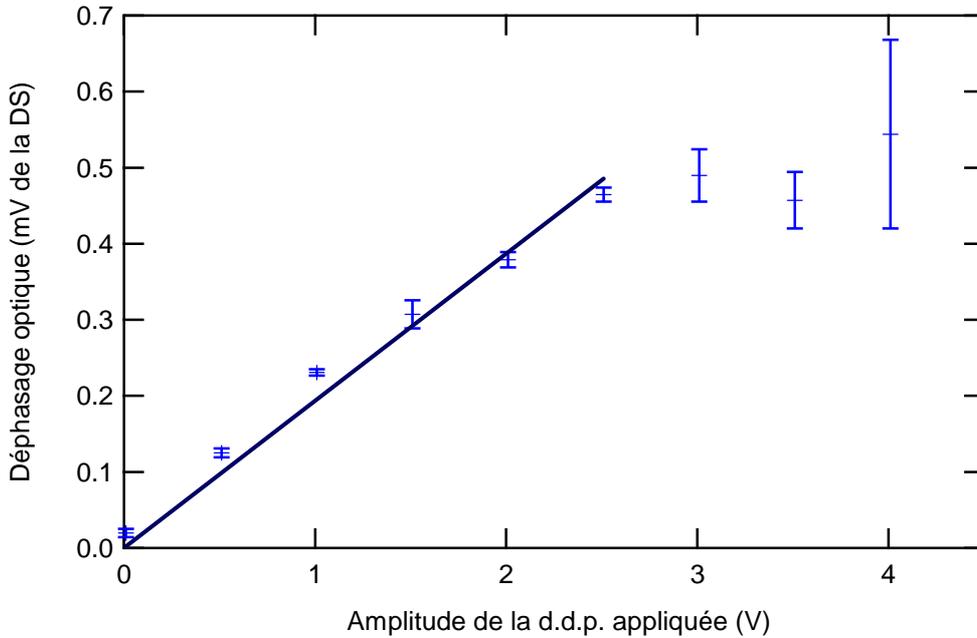


Figure VI-12 : Réponse de la cellule en fonction de l'amplitude de la différence de potentiel appliquée. On remarque une dépendance quasi-linéaire suivie d'une saturation du signal.

En faisant tourner la polarisation de la lumière, nous n'observons qu'une faible variation du signal optique. Mais cette variation reste très bruitée et inexploitable (Figure VI-13). Une amélioration de la sensibilité du microscope est nécessaire afin de pouvoir en retirer une information.

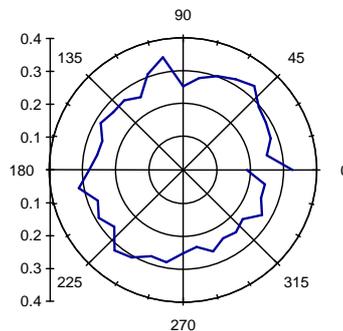


Figure VI-13 : Réponse en polarisation typique de la membrane d'une cellule de PC12.

VI.IV.2 Discussion sur l'origine du signal intrinsèque

Au chapitre précédent, nous avons vérifié que nous ne détectons aucun signal électro-optique lorsqu'une membrane phospholipidique artificielle n'était pas dopée par le colorant. Cela semblerait indiquer que l'on n'attend aucun signal intrinsèque dans une cellule vivante si la membrane est seulement constituée d'une bicouche lipidique, en contradiction avec nos observations. Notons que dans une membrane cellulaire, il existe beaucoup de protéines externes ou internes, ainsi que transmembranaires. Ceci aboutit en théorie à une certaine non-centrosymétrie de la membrane donc potentiellement à un effet Pockels. Mais la question qui se reste posée est de savoir si cette non-centrosymétrie et les non-linéarités associées sont suffisantes pour être détectées directement. Dans la littérature, aucun signal de génération de la seconde harmonique (GSH) n'a été signalé pour une membrane non-dopée. Toutes les mesures en GSH des membranes de cellules ont pour origine un marquage par des colorants nonlinéaires. Cela nous amène à envisager d'autres effets, qui sont induits par le champ électrique, tels que celui de la flexoélectricité de la membrane [86].

En effet comme nous l'avons dit, un phospholipide est non-centrosymétrique mais son organisation en bicouche détruit cette non-centrosymétrie. Par contre si cette membrane subit une certaine flexion, le nombre de dipôles par unité de surface pointant vers l'extérieur n'est plus le même que celui pointant vers l'intérieur. Un certain moment dipolaire est ainsi créé. De plus, et sous l'effet d'un champ électrique externe, des forces sont appliquées qui agissent sur la flexion de la membrane. La position et la force de ces moments oscillent avec les variations du champ électrique appliqué, créant ainsi une oscillation du moment dipolaire total qui peut contribuer au signal observé avec notre microscope.

Toutes ces remarques constituent des hypothèses de travail, qui seront testées par de nouvelles expériences à venir.

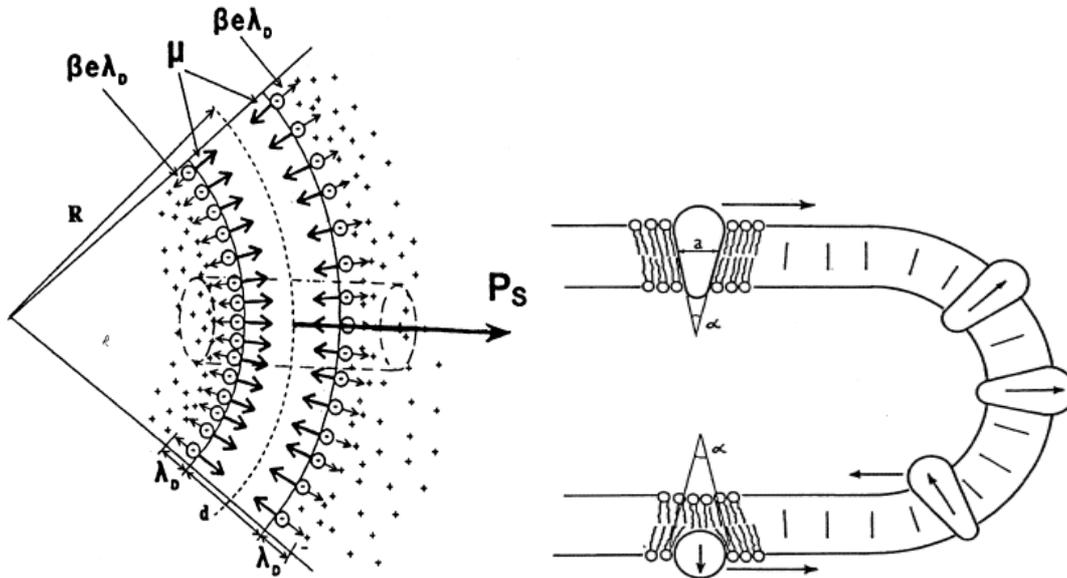


Figure VI-14 : A gauche : principe de la flexoélectricité. A droite : influence possible de la présence de protéine membranaire sur la non-centrosymétrie de la membrane (extrait de la référence[86]).

Notons que des tests supplémentaires avec des liposomes en formation n'ont pour l'instant abouti à une meilleure compréhension, étant donné que le signal détecté pourrait provenir de la multi-couche asymétrique de ces liposomes.

Il ne faut pas non plus écarter la possibilité qu'un champ modulé appliqué induit un certain mouvement de matière et aboutit par conséquent à un changement local de l'indice de réfraction.

VI.V Conclusion et perspective de ces études cellulaires

Ce chapitre a été consacré à l'étude de la réponse électrique de cellules de type PC12. Une caractérisation électrique a été menée et des considérations sur la fréquence de coupure ont été présentées. Nous avons observé un signal optique net et contrasté sur les cellules marquées par le DI-8-ANEPPS, mais aussi, de façon plus inattendue, sur les cellules de PC12 en l'absence de marquage. Nous avons remarqué une certaine dépendance linéaire de ce signal en fonction du champ appliqué pour de faibles valeurs de champ, ainsi qu'une faible dépendance angulaire en fonction de l'orientation de la polarisation linéaire de la lumière.

Ce signal intrinsèque est tout à la fois prometteur et intrigant. D'une part un signal optique intrinsèque proportionnel au champ électrique appliqué, est une avancée remarquable dans la course vers la mesure toute optique des champs électriques. Mais la compréhension de cet effet et des non-linéarités associées ou d'autres effets de phase, n'ont pas pu encore être interprétées d'une façon univoque, même s'il existe des hypothèses plausibles .

En effet, la littérature abonde en interprétations possibles des signaux intrinsèques. Celles-ci ont été un peu laissées de côté pendant une certaine période étant donné l'avancée et l'intérêt qui a été consacré aux colorants membranaires pour la mesure du potentiel d'action [17]. Cependant, les toutes dernières années ont vu une hausse remarquable dans l'observation des effets intrinsèques des neurones, induit par la propagation de champ électrique, comme la diffusion linéaire, la biréfringence induite par champ électrique et les effets de phase associés [36-37]. Le passage d'emblée (et exclusif!) à des expériences d'optiques non-linéaires qui ferait l'économie d'expériences linéaires et d'effet intrinsèques, nous paraît, à l'examen, méthodologiquement problématique. Notons toutefois que toutes ces techniques et les observations citées ne sont pas encore parvenues à une explication suffisamment concluante des effets observés. Notre microscopie présente une approche complémentaire susceptible de se prêter à une investigation plus poussée. En effet une étude de la réponse optique avec et sans colorant, menée conjointement avec la caractérisation électro-optique de ce colorant, nous permettra d'obtenir une meilleure quantification des effets optiques associés au potentiel d'action présent dans les milieux cellulaires.

Enfin, d'un point de vue "technique", la microscopie électro-optique Pockels nécessite jusqu'à présent une modulation périodique du champ électrique permettant une détection synchrone du déphasage optique. Mais il est aussi envisagé de remplacer cette modulation du champ électrique par une modulation de la position du faisceau lumineux sur la cellule pour pouvoir suivre des potentiels d'action transitoires et autres déclenchés dans de vrais neurones.

Conclusion générale

Nous avons décrit dans ce manuscrit la microscopie électro-optique Pockels (PLEOM), son montage expérimental et ses applications dans des domaines physiques et biophysiques. Cette microscopie a démontré sa capacité à étudier des structures cristallines aux échelles micro, voire nanométrique. Au début de ce travail nous nous sommes posés plusieurs questions auxquelles nous pensons avoir répondu dans une certaine mesure.

En particulier nous avons apporté plusieurs améliorations techniques au montage expérimental. Les mesures EO sont maintenant devenues facilement accessibles, reproductibles et offrent un contrôle mieux adapté des différents paramètres de mesure. Ainsi la réalisation d'une cartographie de la distribution de champ électrique dans un échantillon électro-optique peut être obtenue en "routine", ainsi que la caractérisation électro-optique de matériaux sous un champ électrique connu.

Dans ce cadre, nous nous sommes d'abord appliqués à valider le principe de ces mesures, en étudiant des couches minces cristallines moléculaires, dont celle du cristal moléculaire MNA, bien connu pour ses forts coefficients électro-optiques. Des films minces organiques de MNA ont ainsi été réalisés par la méthode de la cloche thermique inversée. Ces films ont montré une réponse électro-optique Pockels uniforme qui reflète la mono-cristallinité de leur structure. L'un des développements intéressants de notre technique PLEOM a été la possibilité de réaliser une étude en polarisation de la réponse Pockels. Cette dépendance angulaire de l'effet Pockels nous informe sur la symétrie de la structure cristalline et l'orientation des axes optiques dans l'espace. L'orientation du film a ainsi pu être déterminée, en bon accord avec les résultats polarimétriques standards. En utilisant des électrodes en forme de pointes et un film cristallin uniforme, nous avons aussi confirmé que la réponse électro-optique reflète bien la distribution spatiale du champ électrique quasi-statique appliqué.

Par ailleurs, dans ce manuscrit nous avons utilisé une détection de l'effet EO en transmission. Notons que pour des échantillons minces ou de tailles nanométriques, une

configuration en réflexion peut s'avérer tout aussi performante. En effet, une variation d'indice induit aussi une variation détectable de l'intensité de la lumière réfléchi. Nous avons vérifié ce principe dans le cas de la modulation électro-optique de la lumière diffusée par un nanocrystal de KTP, à la fois en réflexion et en transmission.

Une des questions actuelles est la capacité à sonder des objets de taille sub-longueur d'onde, voire nanométrique à l'aides de nouvelles techniques non-invasive. Nous avons ainsi montré que la microscopie électro-optique est capable de détecter la modulation électro-optique de la diffusion de la lumière par des nano-cristaux de 150 nm. Cela constitue, à notre connaissance, une avancée originale. De plus l'analyse en polarisation du signal Pockels d'une seule nanoparticule a permis de confirmer son caractère de nanoparticule unique, sa mono-cristallinité et déterminer son orientation dans l'espace.

Une deuxième partie de cette thèse a été dédiée à l'application de la microscopie électro-optique dans des milieux biophysiques. Nous avons abordé le problème des champs électriques présents dans les membranes des cellules vivantes, et la possibilité de détecter la distribution de ce champ par microscopie électro-optique. Nous avons aussi étudié un système modèle constitué d'une bicouche artificielle, bien plus simple qu'une membrane cellulaire. Cette membrane dopée par un colorant non linéaire, le DI-8-ANEPPS est aussi rendue non-centrosymétrique et a montré un signal EO aisément mesurable. Des améliorations récentes nous ont permis d'obtenir une sensibilité de 10 mV pour l'amplitude de modulation effectivement appliquée à une bicouche artificielle. Nous avons aussi discuté du modèle associé à l'intercalation de ce colorant dans la membrane, qui a pu être confirmé dans une certaine mesure au travers de la réponse en polarisation.

Avec une telle sensibilité, il devient envisageable de détecter un potentiel d'action de quelques dizaines de mV dans un neurone. Nous avons donc tenté l'expérience et obtenu des résultats tout à la fois significatifs et surprenants. Ceci n'est peut être pas étonnant dans la mesure où la membrane d'une cellule vivante diffère notablement d'une simple bicouche phospholipidique. En particulier, des protéines y sont insérées et peuvent contribuer à des signaux optiques. La réponse optique en microscopie électro-optique d'une cellule de PC12 marquée par du DI-8-ANEPPS ou non marquée (réponse intrinsèque) placée sous un champ électrique externe a été cartographiée. Cette réponse semble bien refléter la distribution spatiale du champ électrique. Pourtant, il s'avère qu'au contraire des bicouches artificielles, c'est la réponse intrinsèque sans colorant qui domine. Nous cherchons aujourd'hui activement l'origine de ces effets, qui sont peut être à rapprocher des effets de biréfringence

sous champ, déjà étudiés au début des années 70, mais un peu laissés de côté depuis l'avènement des colorants sensibles au champ électrique. Notons cependant que dans des travaux récents, l'apport des constituants intrinsèques à la membrane ainsi que d'autres effets liés à la flexo-électricité étaient invoqués.

De façon générale, ce travail nous aura permis d'étudier l'effet Pockels à différentes échelles, en commençant par de grands cristaux, puis des films minces physiques voire ultraminces en biologie, jusqu'à l'échelle de nanoparticules uniques. Chaque cas a été étudié séparément et des modèles adéquats ont été développés. Les résultats obtenus sont encourageants et ouvrent la voie à plusieurs axes de recherches nouveaux ainsi qu'à des applications possibles.

En effet la sensibilité de la PLEOM à des nanoparticules uniques permet d'envisager l'utilisation de ces particules comme sondes locales de champs électriques quasi-statiques. Sans avoir réalisé une méthode d'ultra-résolution optique comme le STED ou le PALM, une nanoparticule permet dans une certaine mesure de franchir la limite de diffraction en terme de résolution spatiale de mesure du champ électrique quasi-statique. La fonctionnalisation de la surface de ces particules pourrait en effet permettre une avancée intéressante. On peut en effet imaginer une expérience où l'on observe le signal électro-optique d'une particule unique lorsqu'elle traverse une membrane cellulaire. Une caractérisation de temps d'intercalation pourrait par exemple être effectuée.

Les résultats obtenus avec les cellules PC12 méritent aussi une exploitation approfondie. Notre microscope a l'avantage de pouvoir examiner et caractériser la réponse EO au niveau de la membrane. On s'attend à une modification de la réponse EO dans la membrane avec et sans colorant. L'origine du signal intrinsèque semble aujourd'hui mal connue. Le signal EO avec colorant permet en principe de caractériser l'orientation des molécules de colorants insérées dans la membrane et donc la structure de la membrane. Ainsi, la combinaison de résultats avec et sans colorant, pourrait permettre d'en extraire l'origine du signal intrinsèque.

Enfin, l'application de la MEOP comme sonde de champ électrique associé au potentiel d'action dans les neurones (patch-clamp optique) devient de plus en plus une réalité, mais rencontre encore plusieurs problèmes sérieux. En particulier, dans des milieux vivants comme des neurones, les potentiels d'action sont a priori déclenchés de façon aléatoire, ce qui nécessite la mise au point d'une détection asynchrone sans déclenchement externe.

Bien sûr des méthodes multimodales, compatibles entre elles, telles que PLEOM, GSH, biréfringence linéaire ou TPFE permettent de combiner les avantages de ces différentes techniques. Des développements en ce sens sont en cours au laboratoire.

Finalement, nous espérons que ce travail aura permis de contribuer aux progrès et à la crédibilité de la microscopie électro-optique en tant qu'outil d'investigation original et performant en physique et en biophysique.

ANNEXE A: Calcul du champ électrique entre deux bandes parallèles

On montre dans cette partie le calcul analytique de l'expression du champ électrique existant entre deux bandes parallèles dont l'épaisseur est petite comparé à l'épaisseur du milieu inter-électrode.

En effet on peut considérer que les électrodes planaires sont constituées de fins fils conducteurs de longueur infinie. Chaque fil crée en un point M distant de r le champ électrique suivant :

$$\vec{E}(r) = \frac{\lambda}{2\pi\epsilon} \frac{1}{r} \hat{e}_r, \quad (\text{A.1})$$

où λ représente la densité linéique de charge du fil et \hat{e}_r est le vecteur unitaire perpendiculaire au fil et passant par M (coordonnées cylindriques centrées sur le fil). En termes d'élément de surface de largeur dL , le champ élémentaire s'écrit :

$$d\vec{E}(r) = \frac{\sigma dL}{2\pi\epsilon} \frac{1}{r} \hat{e}_r \quad (\text{A.2})$$

σ étant la charge surfacique de la plaque. La dernière expression s'écrit en coordonnées cartésiennes :

$$d\vec{E}(r) = \frac{\sigma}{2\pi\epsilon} \frac{r d\theta}{\cos^2 \theta} \frac{1}{r} (\sin \theta \hat{e}_x + \cos \theta \hat{e}_z). \quad (\text{A.3})$$

On peut exprimer la charge surfacique en fonction de la différence de potentiel qui s'applique entre les deux électrodes. En supposant que les deux électrodes sont maintenues respectivement aux potentiels $+V$ et $-V$, la charge surfacique peut alors être relié à V par une formule capacitive:

$$\sigma = V C/S \quad (\text{A.4})$$

S représente la surface de l'électrode, et C sa capacité électrique.

En intégrant sur toute la surface de la plaque l'expression du champ devient :

$$\begin{aligned}
 E_x(\sigma) &= \frac{V C}{2\pi\epsilon S} \ln \left[\sqrt{\frac{z^2 + (x+a+d)^2}{z^2 + (x+a)^2}} \right] \\
 E_z(\sigma) &= \frac{V C}{2\pi\epsilon S} \left[\arctan\left(\frac{a+x}{z}\right) - \arctan\left(\frac{a+x+d}{z}\right) \right]
 \end{aligned}
 \tag{A.5}$$

De même, la deuxième plaque électrode chargée de $-\sigma$ crée un champ électrique dont l'expression s'écrit :

$$\begin{aligned}
 E_x(-\sigma) &= \frac{V C}{2\pi\epsilon S} \ln \left[\sqrt{\frac{z^2 + (-x+a+d)^2}{z^2 + (-x+a)^2}} \right] \\
 E_z(-\sigma) &= \frac{-V C}{2\pi\epsilon S} \left[\arctan\left(\frac{a-x+d}{z}\right) - \arctan\left(\frac{a-x}{z}\right) \right]
 \end{aligned}
 \tag{A.6}$$

Le champ électrique entre les deux plaques est la somme de ces deux contributions :

$$\begin{aligned}
 E_x &= \frac{V C}{2\pi\epsilon S} \ln \left[\sqrt{\left(\frac{z^2 + (x+a+d)^2}{z^2 + (x+a)^2}\right) \left(\frac{z^2 + (-x+a+d)^2}{z^2 + (-x+a)^2}\right)} \right] \\
 E_z(\sigma) &= \frac{V C}{2\pi\epsilon S} \left[\arctan\left(\frac{a+x}{z}\right) + \arctan\left(\frac{a-x}{z}\right) - \arctan\left(\frac{a+x+d}{z}\right) - \arctan\left(\frac{a-x+d}{z}\right) \right]
 \end{aligned}
 \tag{A.7}$$

ANNEXE B: Réponse électro-optique en polarisation d'un système macroscopique : application à un cristal de KDP

La réponse électro-optique d'un cristal en fonction de la polarisation d'un faisceau sonde peut être étudiée en terme de déphasage électro-optique induit sur la voie signal. Pour cette étude l'utilisation du formalisme de Jones s'avère adapté.

Formalisme de Jones

Un état de polarisation dans l'espace peut être décrit par les composantes de la polarisation suivant deux axes perpendiculaires, qui forment avec l'axe de propagation (z) un système d'axes orthogonaux. Le vecteur de Jones représentant une polarisation donnée d'une onde lumineuse peut s'écrire $\begin{pmatrix} E_x(t) \\ E_y(t) \end{pmatrix}$, où $E_x(t)$ et $E_y(t)$ sont les composantes du champ électrique selon les axes x et y . On peut normaliser ce vecteur à 1. On représente alors une polarisation rectiligne suivant l'axe x par $\begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}$ ou une circulaire droite par $\frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix}$.

Après avoir traversé les différents composants optiques d'un système, la polarisation de la lumière est modifiée. une matrice de transformation peut être ainsi attribuée à chaque composant optique (polariseur, lame demi onde, lame quart d'onde, lame biréfringente en général...). Par exemple dans le cas d'une lame demi-onde, la matrice de transformation est exprimée par :

$$M = \begin{bmatrix} -i & 0 \\ 0 & i \end{bmatrix} \quad (\text{B.1})$$

Si par contre les axes neutres de cette lame sont tournés d'un angle θ par rapport à la polarisation de la lumière, alors une matrice de rotation entre en jeu et ainsi une nouvelle matrice de transformation est créée :

$$M(\theta) = R(-\theta) M R(\theta), \quad (\text{B.2})$$

où $R(\theta)$ est la matrice rotation, M la matrice transformation sans rotation et $M(\theta)$ la matrice transformation finale. Avec :

$$R(\theta) = \begin{bmatrix} \cos(\theta) & \sin(\theta) \\ -\sin(\theta) & \cos(\theta) \end{bmatrix}. \quad (\text{B.3})$$

Dans le cas d'une lame biréfringente, la matrice transformation a la forme suivante [87] :

$$M_{\text{lame}} = \begin{bmatrix} \cos^2 \theta e^{i\phi'} + \sin^2 \theta e^{i\phi''} & (e^{i\phi'} - e^{i\phi''}) \sin \theta \cos \theta \\ (e^{i\phi'} - e^{i\phi''}) \sin \theta \cos \theta & \cos^2 \theta e^{i\phi''} + \sin^2 \theta e^{i\phi'} \end{bmatrix} \quad (\text{B.4})$$

où θ est l'angle de rotation des axes de la lame par rapport aux axes du laboratoire, ϕ' et ϕ'' sont les déphasages selon les axes propres du cristal biréfringent donnés par $\phi' = \frac{2\pi}{\lambda} n' e$ et

$$\phi'' = \frac{2\pi}{\lambda} n'' e.$$

Calcul de n' et n''

Pour trouver les indices de réfraction selon sur les deux axes propres du cristal il faut prendre en compte la distorsion de l'ellipsoïde des indices sous l'effet d'un champ électrique quasi-statique appliqué. C'est cette distorsion qui décrit normalement l'effet électro-optique. Dans le système d'axes principaux (X, Y, Z) sous champ appliqué, l'ellipsoïde des indices est décrite dans le cas général par l'équation suivante :

$$\frac{X^2}{n_x^2} + \frac{Y^2}{n_y^2} + \frac{Z^2}{n_z^2} = 1 \quad (\text{B.5})$$

Dans les cristaux électro-optiquement actifs, l'ellipsoïde des indices subit une distorsion sous effet du champ \vec{E} des axes principaux et son équation devient :

$$\begin{aligned}
& \underbrace{\left[\frac{1}{n_X^2} + \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{XX} \right]}_{a_{11}} X^2 + \underbrace{\left[\frac{1}{n_Y^2} + \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{YY} \right]}_{a_{22}} Y^2 + \underbrace{\left[\frac{1}{n_Z^2} + \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{ZZ} \right]}_{a_{33}} Z^2 \\
& + 2 \underbrace{\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{YZ}}_{a_{23}} YZ + 2 \underbrace{\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{ZX}}_{a_{31}} ZX + 2 \underbrace{\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{XY}}_{a_{12}} XY = 1
\end{aligned} \tag{B.6}$$

Ces variations d'indice étant proportionnel au champ électrique appliqué, elles s'écrivent sous la forme suivante :

$$\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{ij} = \sum_{k=1}^3 r_{ijk} E_k \tag{B.7}$$

En introduisant la notation des indices contractés (*regarde chapitre 2*) on écrit :

$$\begin{pmatrix} \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_1 \\ \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_2 \\ \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_3 \\ \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_4 \\ \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_5 \\ \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_6 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} - \frac{1}{n_1^2} \\ a_{22} - \frac{1}{n_2^2} \\ a_{33} - \frac{1}{n_3^2} \\ a_{23} \\ a_{31} \\ a_{12} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} \\ r_{41} & r_{42} & r_{43} \\ r_{51} & r_{52} & r_{53} \\ r_{61} & r_{62} & r_{63} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_1 \\ E_2 \\ E_3 \end{pmatrix} \tag{B.8}$$

L'équation de l'ellipsoïde des indices dans le système d'axes liés au cristal s'écrit alors

$$a_{11} X^2 + a_{22} Y^2 + a_{33} Z^2 + 2a_{23} YZ + 2a_{31} ZX + 2a_{12} XY = 1 \quad . \tag{B.9}$$

Pour obtenir une équation équivalente utilisant les coordonnées (x, y, z) dans le système d'axes lié au laboratoire, on peut utiliser la matrice transformation basée sur les angles d'Euler (α, β, γ).

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \underbrace{\cos \alpha \cos \gamma - \sin \alpha \cos \beta \sin \gamma}_{b_{11}} & \underbrace{\sin \alpha \cos \gamma + \cos \alpha \cos \beta \sin \gamma}_{b_{12}} & \underbrace{\sin \beta \sin \gamma}_{b_{13}} \\ \underbrace{-\cos \alpha \sin \gamma - \sin \alpha \cos \beta \cos \gamma}_{b_{21}} & \underbrace{-\sin \alpha \sin \gamma + \cos \alpha \cos \beta \cos \gamma}_{b_{22}} & \underbrace{\sin \beta \cos \gamma}_{b_{23}} \\ \underbrace{\sin \alpha \sin \beta}_{b_{31}} & \underbrace{-\cos \alpha \sin \beta}_{b_{32}} & \underbrace{\cos \beta}_{b_{33}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (\text{B.10})$$

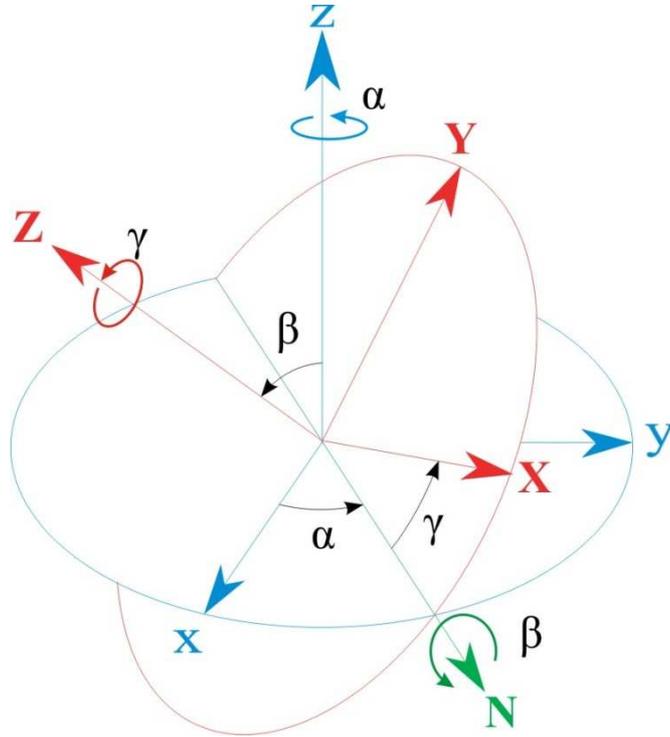


Figure B. 1: Convention utilisé pour le angle d'Euler pour passer d'un système d'axe (x,y,z) à (X,Y,Z)

Si le vecteur de propagation de la lumière est suivant l'axe z du laboratoire, un plan perpendiculaire à z coupe l'ellipsoïde selon une ellipse dont les petit et grand axes définiront les deux indices de propagation de la lumière. En remplaçant z par 0 dans (B.10) on obtient

$$\begin{aligned}
 X &= b_{11}x + b_{12}y, \\
 Y &= b_{21}x + b_{22}y, \\
 Z &= b_{31}x + b_{32}y.
 \end{aligned}
 \tag{B.11}$$

En remplaçant (B.11) dans (B.9) :

$$Ax^2 + By^2 + Cxy = 1, \tag{B.12}$$

avec

$$\begin{aligned}
 A &= a_{11}b_{11}^2 + a_{22}b_{21}^2 + a_{33}b_{31}^2 + 2a_{23}b_{21}b_{31} + 2a_{31}b_{11}b_{31} + 2a_{12}b_{11}b_{21} \\
 B &= a_{11}b_{12}^2 + a_{22}b_{22}^2 + a_{33}b_{32}^2 + 2a_{23}b_{22}b_{32} + 2a_{31}b_{12}b_{32} + 2a_{12}b_{12}b_{22} \\
 C &= 2a_{11}b_{11}b_{12} + 2a_{22}b_{21}b_{22} + 2a_{33}b_{31}b_{32} + 2a_{23}(b_{21}b_{32} + b_{22}b_{31}) + 2a_{31}(b_{11}b_{32} + b_{12}b_{31}) + 2a_{12}(b_{11}b_{22} + b_{12}b_{21})
 \end{aligned}
 \tag{B.13}$$

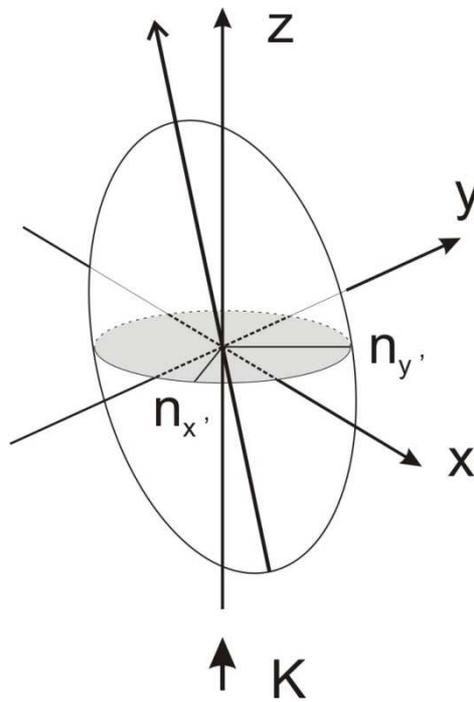


Figure B. 2 : Ellipsoïde des indices distordue sous l'influence d'un champ électrique appliqué, et ellipse d'intersection du plan perpendiculaire à z dont les axes principaux constitue les deux indices $n_{x'}$ et $n_{y'}$.

Une rotation d'un angle ϕ permet de se situer dans le système des axes propres de la lame sous champ électrique:

$$\phi = \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{C}{A-B}\right) \tag{B.14}$$

Après cette rotation, l'équation (B.12) devient

$$x'^2 \left(A \cos^2 \phi + B \sin^2 \phi + \frac{C}{2} \sin 2\phi \right) + y'^2 \left(A \sin^2 \phi + B \cos^2 \phi - \frac{C}{2} \sin 2\phi \right) = 1. \quad (\text{B.15})$$

On déduit alors les deux indices principaux de propagation de la lumière:

$$n_{x'}^2 = \frac{1}{A \cos^2 \phi + B \sin^2 \phi + \frac{C}{2} \sin 2\phi},$$

$$n_{y'}^2 = \frac{1}{A \sin^2 \phi + B \cos^2 \phi - \frac{C}{2} \sin 2\phi}. \quad (\text{B.16})$$

Il suffit alors de remplacer les valeurs de ces indices de réfraction dans l'expression (B.4) et de faire tourner cette matrice d'un angle additionnel ϕ .

Expression finale

Le système actuel comporte un cube séparateur de polarisation, une lame demi-onde tournée d'un angle Θ , l'échantillon placé avec un angle θ soit une rotation total de ϕ due à l'application d'un champ électrique \vec{E} , une autre lame demi-onde avec le même angle de rotation que la première, suivie finalement par un autre cube séparateur en polarisation. La lumière à la sortie interfère avec un champ optique de référence.

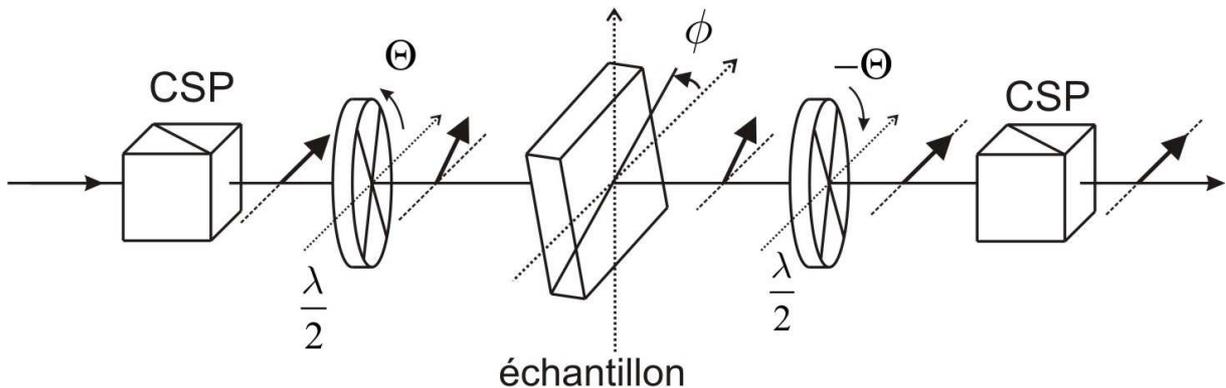


Figure B. 3 : Configuration des différents composants optiques présents dans la voie signal de l'interféromètre

Le champ optique à la sortie de tous ces composantes sera décrit par la multiplication des différentes matrices de transformations et matrices de rotation comme suit :

$$E_{out} = M_{cube} (R_{-\Theta} M_{\frac{\lambda}{2}} R_{\Theta}) M_{echantillon}(\phi) (R_{-\Theta} M_{\frac{\lambda}{2}} R_{\Theta}) M_{cube} E_{in} \quad (\text{B.17})$$

L'interférence de ce champ optique avec le champ optique de référence pour différents angles d'orientation Θ permet de tracer la dépendance théorique de la réponse électro-optique en fonction de la polarisation linéaire du faisceau sonde. Une comparaison avec les données expérimentales permet d'en déduire l'orientation du cristal.

Exemple

Nous appliquons ce calcul au cas d'un cristal massif de KDP, où le champ électrique est appliqué suivant la direction de propagation de la lumière. Ce cristal constitue notre référence pour la calibration des signaux électro-optiques délivré par la détection synchrone. Ce cristal est placé dans la configuration montrée par la figure B.4. Dans cette configuration le champ électrique est appliqué suivant l'axe Z du cristal. Les autres axes peuvent être tournés autour de l'axe Z.

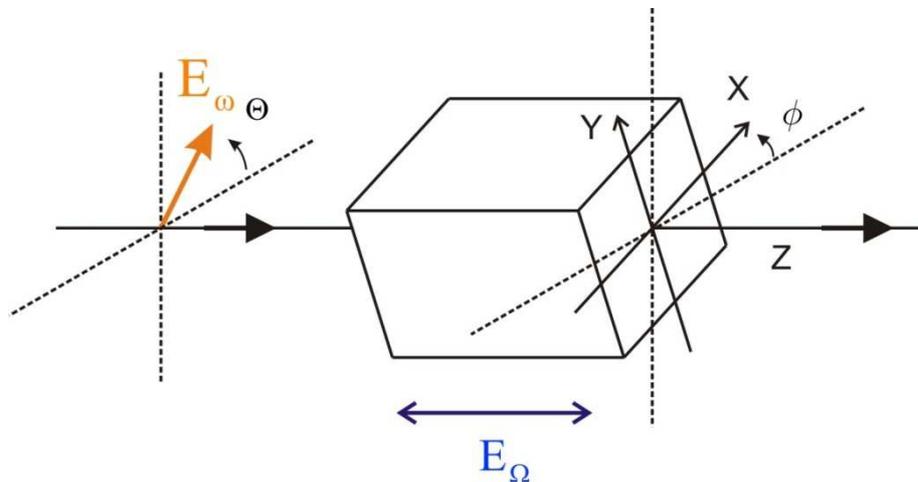


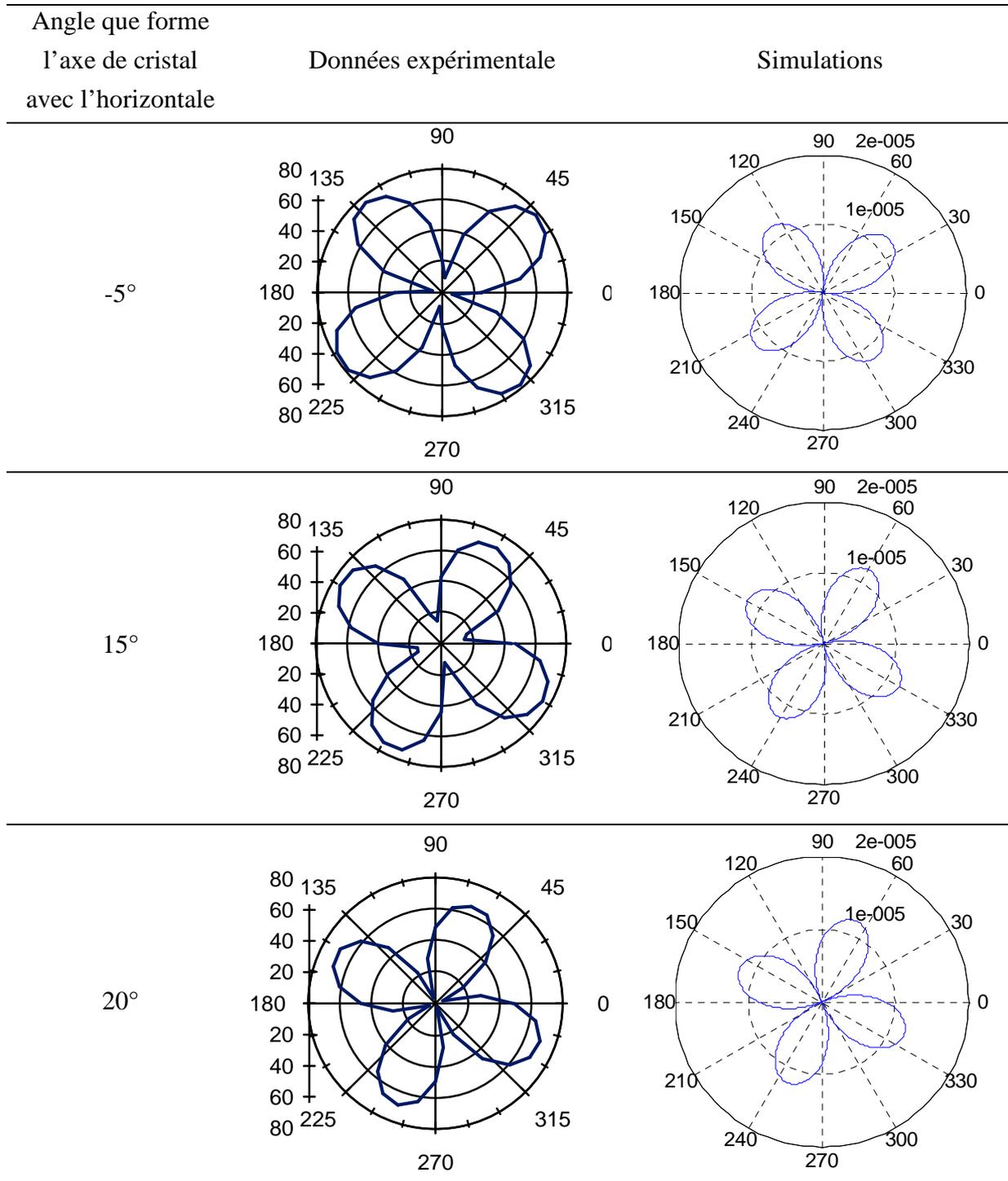
Figure B. 4 : Configuration du cristal de KDP.

Ce cristal de KDP est caractérisé par le tableau tensoriel électro-optique suivante :

$$r = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ r_{41} & 0 & 0 \\ 0 & r_{41} & 0 \\ 0 & 0 & r_{63} \end{bmatrix} . \quad (\text{B.18})$$

Nous avons placé ce cristal entre les deux lames demi-onde et nous avons effectué les analyses en polarisation de la réponse électro-optique. Comme montré dans le tableau suivant, on peut remarquer que cette réponse une forme caractéristique avec 4 lobes, qui sont orientés selon les axes du cristal. Un bon accord entre simulation et données expérimentales est obtenu. A noter qu'aucune différence n'est repérable entre les axes optiques X et Y du cristal. Les angles du tableau sont donc donnés à 90° près.

Tableau B. 1 : Signal électro-optique expérimental en fonction de la polarisation de la lumière incidente dans le cas d'un grand cristal de KDP, et comparaison avec la simulation issue du calcul développé dans cet annexe.



ANNEXE C : Section efficace d'une nanoparticule

Cette annexe a pour but de donner un ordre de grandeur de la contribution électro-optique Pockels à l'intensité diffusée par une nanoparticule, en partant simplement de l'expression 'standard' de la section efficace de diffusion d'une nanoparticule.

Un faisceau monochromatique focalisé sur une nanoparticule subit une diffusion. L'efficacité de cette diffusion peut être caractérisée par une section efficace de diffusion σ_s qui dépend notamment de la dimension d de la nanoparticule :

$$\sigma_s \propto d^6 \quad (\text{C.1})$$

La section efficace d'une nanoparticule constitué d'un matériau d'indice n peut être exprimée comme suit [55] :

$$\sigma_s = \frac{\pi}{24} k^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 d^6 \quad (\text{C.2})$$

où k correspond au nombre d'onde dans le milieu : $k = 2\pi n / \lambda_0$

Si la particule est électro-optique, et si un champ électrique quasi-statique est appliqué, une variation de cette section efficace sera observée. Un champ électrique appliqué à une particule EO induit une variation d'indice proportionnel à ce champ. L'indice peut alors être écrit sous la forme suivante : $n(E) = n + \Delta n$, avec $\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right) = rE$, où r correspond aux coefficients électro-optiques du matériau en question (on se limite ici à un modèle scalaire où existe un seul coefficient électro-optique r), et E est la valeur du champ électrique appliqué au niveau de la particule. Pour $\Delta n \ll n$, on a $2 \frac{\Delta n}{n^3} = rE$ soit $\Delta n = \frac{1}{2} n^3 rE$.

La section efficace devient alors :

$$\sigma_s = \frac{\pi}{24} k^4 \left(\frac{(n + \Delta n)^2 - 1}{(n + \Delta n)^2 + 2} \right)^2 d^6 \quad (\text{C.3})$$

Soit

$$\sigma_s = \frac{\pi}{24} k^4 \left(\frac{n^2 + \Delta n^2 + 2n\Delta n - 1}{(n^2 + \Delta n^2 + 2n\Delta n + 2)} \right)^2 d^6 \quad (\text{C.4})$$

Pour $\Delta n \ll 1$, un développement en premier ordre de Δn donne

$$\sigma_s \frac{\pi}{24} k^4 \left[\frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \right]^2 \left[1 + 4n\Delta n \left(\frac{3}{(n^2 - 1)(n^2 + 2)} \right) \right] d^6 \quad (\text{C.5})$$

En remplaçant Δn par $\frac{1}{2} n^3 rE$, l'expression devient :

$$\sigma_s = \frac{\pi}{24} k^4 \left[\frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \right]^2 \left[1 + \frac{6n^4 rE}{\underbrace{(n^2 - 1)(n^2 + 2)}_{\text{partie électro-optique}}} \right] d^6 \quad (\text{C.6})$$

On obtient alors une expression finale qui comporte un terme EO s'ajoutant à l'expression initiale de la section efficace s'ajoute une partie électro-optique.

Estimation des ordres de grandeurs

La puissance totale diffusée par une nanoparticule est exprimé par :

$$P_s = \sigma_s I_{inc} = (\sigma_0 + \sigma_{EO}) I_{inc} \quad (\text{C.7})$$

où P_{sc} est la puissance totale diffusée par la nanoparticule, I_{inc} l'intensité total incidente sur la particule et σ_{sc} la section efficace de diffusion qui est divisée en deux parties : la diffusion normale σ_0 à laquelle s'ajoute la contribution due à l'effet électro-optique σ_{EO} donnée par m'expression (C.6).

On prend l'exemple d'une nanoparticule de KTiOPO_4 (KTP). Le KTP est un matériau biréfringent qui possède deux indices de réfraction différents selon la polarisation de la lumière, n_o et n_e .

Pour simplifier le calcul prenons les approximations suivantes : $n=1,8$, la différence de potentiel appliqué est de 100V sur une distance de $20\mu\text{m}$ soit un champ électrique d'amplitude $5\text{V}/\mu\text{m}$, et une puissance incidente de 1mW. On prend le plus grand coefficient électro-optique du KTP $r_{33}=36\text{pm}/\text{V}$, et une particule de 150nm de dimension. La longueur d'onde de la lumière utilisée est 632.8nm.

La puissance diffusée est estimée alors à $P_s = 3,47 \times 10^{-5} \text{ W}$ dont une partie électro-optique égale à $P_{EO} = 3,33 \times 10^{-8} \text{ W}$. On remarque que cette faible puissance diffusée est néanmoins détectable directement mais nécessite une intégration de la détection sur une longue période.

Références :

1. Saleh, B.E.A. and M.C. Teich, *Fundamentals of Photonics*, ed. J.W. Goodman. 1991: John Wiley & Sons.
2. Yariv, A. and P. Yeh, *Optical Waves in Crystals—Propagation and Control of Laser Radiation*. 2003: Wiley, New York.
3. Toury, T., *La microscopie électro-optique: Etude, conception, applications*, in *Département de physique*. 2005, ENS de cachan.
4. Toury, T., S. Brasselet, and J. Zyss, *Electro-optical microscopy: mapping nonlinear polymer films with micrometric resolution*. *Optics Letters*, 2006. **31**(10): p. 1468-1470.
5. Le Xuan, L., et al., *Photostable second-harmonic generation from a single KTiOPO4 nanocrystal for nonlinear microscopy*. *Small*, 2008. **4**(9): p. 1332-1336.
6. Hamill, O.P., et al., *Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches*. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 1981. **391**(2): p. 85-100.
7. Valdmanis, J.A., G. Mourou, and C.W. Gabel, *Picosecond Electrooptic Sampling System*. *Applied Physics Letters*, 1982. **41**(3): p. 211-212.
8. Zhu, Z.H., et al., *New Measurement Technique - Cw Electrooptic Probing of Electric-Fields*. *Applied Physics Letters*, 1986. **49**(8): p. 432-434.
9. Lee, D.J. and J.F. Whitaker, *Bandwidth enhancement of electro-optic field sensing using photonic down-mixing with harmonic sidebands*. *Optics Express*, 2008. **16**(19): p. 14771-14779.
10. Lee, D.J., M.H. Crites, and J.F. Whitaker, *Electro-optic probing of microwave fields using a wavelength-tunable modulation depth*. *Meas. Sci. Technol*, 2008. **19**.
11. Sardesai, H.P., W.C. Nunnally, and P.F. Williams, *An Optical Technique for Measurement of Semiconductor Surface Electric-Fields*. *Review of Scientific Instruments*, 1992. **63**(8): p. 3918-3922.
12. Faris, G.W. and H.M. Hertz, *Tunable differential interferometer for optical tomography*. *Appl Opt*, 1989. **28**(21): p. 4662-7.
13. Hertz, H.M., *Kerr Effect Tomography for Nonintrusive Spatially Resolved Measurements of Asymmetric Electric-Field Distributions*. *Applied Optics*, 1986. **25**(6): p. 914-921.
14. Bieler, M., et al., *Ultrafast electric field measurements in semiconductors by spectral integration over electric field-induced Franz-Keldysh oscillations*. *Applied Physics Letters*, 2005. **87**(4).
15. Cohen, L.B., R.D. Keynes, and B. Hille, *Light scattering and birefringence changes during nerve activity*. *Nature*, 1968. **218**(5140): p. 438-41.
16. Cohen, L.B., B. Hille, and R.D. Keynes, *Changes in axon birefringence during the action potential*. *J Physiol*, 1970. **211**(2): p. 495-515.

-
17. Ross, W.N., et al., *Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and Birefringence in stained giant axons: : optical measurement of membrane potential*. J Membr Biol, 1977. **33**(1-2): p. 141-83.
 18. Zecevic, D., *Multiple spike-initiation zones in single neurons revealed by voltage-sensitive dyes*. Nature, 1996. **381**(6580): p. 322-5.
 19. Gross, E., R.S. Bedlack, and L.M. Loew, *Dual-Wavelength Ratiometric Fluorescence Measurement of the Membrane Dipole Potential*. Biophysical Journal, 1994. **67**(1): p. 208-216.
 20. Zochowski, M., et al., *Imaging membrane potential with voltage-sensitive dyes*. Biol Bull, 2000. **198**(1): p. 1-21.
 21. Loew, L.M., *Potentiometric dyes: Imaging electrical activity of cell membranes*. Pure and Applied Chemistry, 1996. **68**(7): p. 1405-1409.
 22. Moreaux, L., et al., *Electro-optic response of second-harmonic generation membrane potential sensors*. Optics Letters, 2003. **28**(8): p. 625-627.
 23. Pons, T., et al., *Mechanisms of membrane potential sensing with second-harmonic generation microscopy*. Journal of Biomedical Optics, 2003. **8**(3): p. 428-431.
 24. Dombeck, D.A., M. Blanchard-Desce, and W.W. Webb, *Optical recording of action potentials with second-harmonic generation microscopy*. Journal of Neuroscience, 2004. **24**(4): p. 999-1003.
 25. Bouevitch, O., et al., *Probing Membrane-Potential with Nonlinear Optics*. Biophysical Journal, 1993. **65**(2): p. 672-679.
 26. Millard, A.C., et al., *Sensitivity of second harmonic generation from styryl dyes to transmembrane potential*. Biophysical Journal, 2004. **86**(2): p. 1169-1176.
 27. Oudar, J.L., *Optical Nonlinearities of Conjugated Molecules - Stilbene Derivatives and Highly Polar Aromatic-Compounds*. Journal of Chemical Physics, 1977. **67**(2): p. 446-457.
 28. Siegel, M.S. and E.Y. Isacoff, *A genetically encoded optical probe of membrane voltage*. Neuron, 1997. **19**(4): p. 735-741.
 29. Chanda, B., et al., *A hybrid approach to measuring electrical activity in genetically specified neurons*. Nature Neuroscience, 2005. **8**(11): p. 1619-1626.
 30. Sjulson, L. and G. Miesenbock, *Optical recording of action potentials and other discrete physiological events: A perspective from signal detection theory*. Physiology, 2007. **22**: p. 47-55.
 31. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A New Generation of Ca-2+ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties*. Journal of Biological Chemistry, 1985. **260**(6): p. 3440-3450.
 32. Sabatini, B.L. and K. Svoboda, *Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis*. Nature, 2000. **408**(6812): p. 589-593.
 33. Kim, S.A., et al., *Optical measurement of neural activity using surface plasmon resonance*. Optics Letters, 2008. **33**(9): p. 914-916.
 34. Stepnoski, R.A., et al., *Noninvasive detection of changes in membrane potential in cultured neurons by light scattering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9382-6.
 35. Foust, A.J. and D.M. Rector, *Optically teasing apart neural swelling and depolarization*. Neuroscience, 2007. **145**(3): p. 887-899.

-
36. Wolf, M., et al., *Near infrared spectroscopy to study the brain: an overview*. Opto-Electronics Review, 2008. **16**(4): p. 413-419.
 37. Graf, B.W., et al., *Detecting intrinsic scattering changes correlated to neuron action potentials using optical coherence imaging*. Optics Express, 2009. **17**(16): p. 13447-13457.
 38. Agullo-Lopez, F., J.M. Cabrera, and F. Agullo-Rueda, *Electrooptics - Phenomena, Materials and Applications*. 1994: Academic Press.
 39. Oudar, J.L. and J. Zyss, *Structural Dependence of Nonlinear-Optical Properties of Methyl-(2,4-Dinitrophenyl)-Aminopropanoate Crystals*. Physical Review A, 1982. **26**(4): p. 2016-2027.
 40. Zyss, J. and J.L. Oudar, *Relations between Microscopic and Macroscopic Lowest-Order Optical Nonlinearities of Molecular-Crystals with One-Dimensional or Two-Dimensional Units*. Physical Review A, 1982. **26**(4): p. 2028-2048.
 41. Iizuka, K., *Elements of Photonics : In Free Space and Special Media*. 2002: John Wiley & Sons, Inc.
 42. Berry, M.V. and M.R. Dennis, *The optical singularities of birefringent dichroic chiral crystals*. Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences, 2003. **459**(2033): p. 1261-1292.
 43. Sigelle, M. and R. Hierle, *Determination of the electrooptic coefficients of 3-methyl 4-nitropyridine 1-oxide by an interferometric phase-modulation technique*. Journal of Applied Physics, 1981. **52**(6): p. 4199-4204.
 44. Singer, K.D., M.G. Kuzyk, and J.E. Sohn, *2nd-Order Nonlinear-Optical Processes in Orientationally Ordered Materials - Relationship between Molecular and Macroscopic Properties*. Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics, 1987. **4**(6): p. 968-976.
 45. Lipscomb, G.F., A.F. Garito, and R.S. Narang, *An Exceptionally Large Linear Electro-Optic Effect in the Organic-Solid Mna*. Journal of Chemical Physics, 1981. **75**(3): p. 1509-1516.
 46. Chemla, D. and J. Zyss, *Nonlinear Optical Properties of Organic Molecules and Crystals*. 1987: Academic Press, London. 3389-1376.
 47. Chemla, D.S., J.L. Oudar, and J. Jerphagnon, *Molecular Engineering Approach to 2nd-Order Optical Susceptibilities of Organic-Crystals and Molecules*. Optics Communications, 1976. **18**(1): p. 54-54.
 48. Gauvin, S. and J. Zyss, *Growth of organic crystalline thin films, their optical characterization and application to non-linear optics*. Journal of Crystal Growth, 1996. **166**(1-4): p. 507-527.
 49. Zyss, J. and G.T. Tsoucaris, *Structure and Properties of Molecular Crystals*, ed. M. Pierrot. 1990: Elsevier: Amsterdam, The Netherlands
 50. Levine, B.F., et al., *Organic-Crystal with an Exceptionally Large Optical 2nd-Harmonic Coefficient - 2-Methyl-4-Nitroaniline*. Journal of Applied Physics, 1979. **50**(4): p. 2523-2527.
 51. Garrido, B., et al., *Optical and electrical properties of Si-nanocrystals ion beam synthesized in SiO₂*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 2004. **216**: p. 213-221.

-
52. Wang, Y.S., et al., *Effects of modulated electric field form and frequency on the electro-optical properties of CdS_{0.1}Se_{0.9} nanocrystals*. Journal of Applied Physics, 2000. **88**(3): p. 1473-1475.
 53. Wang, Y.S., et al., *Electro-optical properties of CdS_{0.1}Se_{0.9} nanocrystals*. Physica E, 2001. **9**(2): p. 310-313.
 54. Woggon, U., et al., *Electrooptic Properties of Cds Embedded in a Polymer*. Physical Review B, 1993. **48**(16): p. 11979-11986.
 55. Colpin, Y., et al., *Imaging and sizing of diamond nanoparticles*. Optics Letters, 2006. **31**(5): p. 625-7.
 56. Sastry, P.U.M., *Bond Susceptibilities and Linear Electrooptic Properties of KTiOPO₄*. Solid State Communications, 1991. **78**(7): p. 593-597.
 57. Sorokina, N.I. and V.I. Voronkova, *Structure and properties of crystals in the potassium titanyl phosphate family: A review*. Crystallography Reports, 2007. **52**(1): p. 80-93.
 58. Gupta, M.C. and J. Ballato, *The Handbook of Photonics*. 2007: CRC press.
 59. Bierlein, J.D. and C.B. Arweiler, *Electrooptic and Dielectric-Properties of KTiOPO₄*. Applied Physics Letters, 1986. **49**(15): p. 917-919.
 60. Bierlein, J.D. and H. Vanherzeele, *Potassium Titanyl Phosphate - Properties and New Applications*. Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics, 1989. **6**(4): p. 622-633.
 61. Xuan, L.L., *Génération de seconde-harmonique de nanoparticules*. 2009, ENS-Cachan.
 62. Sandeau, N., et al., *Defocused imaging of second harmonic generation from a single nanocrystal*. Optics Express, 2007. **15**(24): p. 16051-60.
 63. Johnston, A.R., *The strain-free electrooptic effect in single crystal barium titanate*. App. Phys. Letters, 1965. **7**: p. 195-198.
 64. Zhang, L.M., et al., *Linear electro-optic tensor ratio determination and quadratic electro-optic modulation of electrostatically self-assembled CdSe quantum dot films*. Journal of Chemical Physics, 2002. **116**(14): p. 6297-6304.
 65. Pu, Y., et al., *Nonlinear Optical Properties of Core-Shell Nanocavities for Enhanced Second-Harmonic Generation*. Physical Review Letters, 2010. **104**(20): p. -.
 66. Brown, G.H. and J.J. Wolken, *Liquid crystals and biological structures* 1979: New York.
 67. Le Pioufle, B., et al., *Lipid bilayer microarray for parallel recording of transmembrane ion currents*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(1): p. 328-332.
 68. Suzuki, H., B. Le Pioufle, and S. Takeuchi, *Ninety-six-well planar lipid bilayer chip for ion channel recording fabricated by hybrid stereolithography*. Biomed Microdevices, 2008.
 69. Suzuki, H., et al., *Highly reproducible method of planar lipid bilayer reconstitution in polymethyl methacrylate microfluidic chip*. Langmuir, 2006. **22**(4): p. 1937-1942.
 70. Antic, S. and D. Zecevic, *Optical signals from neurons with internally applied voltage-sensitive dyes*. Journal of Neuroscience, 1995. **15**(2): p. 1392-1405.
 71. Clarke, R.J., *Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1997. **1327**(2): p. 269-278.

-
72. Clarke, R.J. and D.J. Kane, *Optical detection of membrane dipole potential: Avoidance of fluidity and dye-induced effects*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1997. **1323**(2): p. 223-239.
 73. Rohr, S. and B.M. Salzberg, *Multiple-site optical-recording of transmembrane voltage (Msortv) in patterned growth heart cell-cultures - assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale*. *Biophysical Journal*, 1994. **67**(3): p. 1301-1315.
 74. Shynkar, V.V., et al., *Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2005. **1712**(2): p. 128-136.
 75. Zhang, J., et al., *Membrane electric properties by combined patch clamp and fluorescence ratio imaging in single neurons*. *Biophysical Journal*, 1998. **74**(1): p. 48-53.
 76. Bullen, A. and P. Saggau, *High-speed, random-access fluorescence microscopy: II. Fast quantitative measurements with voltage-sensitive dyes*. *Biophysical Journal*, 1999. **76**(4): p. 2272-2287.
 77. Ries, R.S., et al., *Black lipid membranes: visualizing the structure, dynamics, and substrate dependence of membranes*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(41): p. 16040-16049.
 78. Fujiwara, H., M. Fujihara, and T. Ishiwata, *Dynamics of the spontaneous formation of a planar phospholipid bilayer: A new approach by simultaneous electrical and optical measurements*. *Journal of Chemical Physics*, 2003. **119**(13): p. 6768-6775.
 79. Hall, J.E., *Access resistance of a small circular pore*. *J Gen Physiol*, 1975. **66**(4): p. 531-2.
 80. Born, M. and E. Wolf, *Principles of Optics - Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. 7th ed, ed. m. Farley-Born and E. Wolf. 1999, Cambridge: Cambridge University Press.
 81. Lis, L.J., et al., *Interactions between neutral phospholipid-bilayer membranes*. *Biophysical Journal*, 1982. **37**(3): p. 657-665.
 82. Galvani, L., *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius*. 1791.
 83. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
 84. Rubenstein, R., R.I. Carp, and S.M. Callahan, *In vitro replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC12 cells*. *J Gen Virol*, 1984. **65 (Pt 12)**: p. 2191-8.
 85. Marszalek, P., D.S. Liu, and T.Y. Tsong, *Schwan equation and transmembrane potential induced by alternating electric field*. *Biophysical Journal*, 1990. **58**(4): p. 1053-8.
 86. Petrov, A.G., *Flexoelectricity of model and living membranes*. *Biochimica et biophysica Acta* 2001. **1561**.
 87. Huard, S., *Polarisation de la Lumière*. 1994.