HAL
open science

Nano-antennes optiques pour l'exaltation et le contrôle de la fluorescence moléculaire dans des volumes sub-longueur d'onde.

Aouani Heykel

To cite this version:

Aouani Heykel. Nano-antennes optiques pour l'exaltation et le contrôle de la fluorescence moléculaire dans des volumes sub-longueur d'onde.. Physique Atomique [physics.atom-ph]. Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III, 2011. Français. NNT : . tel-00624233v2

HAL Id: tel-00624233

https://theses.hal.science/tel-00624233v2

Submitted on 19 Sep 2011 (v2), last revised 20 Sep 2011 (v3)

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

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

Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III

THÈSE

pour obtenir le grade de **Docteur en Sciences**
de l'Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III

Discipline : Optique, Photonique et Traitement d'Image

Nano-antennes optiques pour l'exaltation et le contrôle de la fluorescence moléculaire dans des volumes sub-longueur d'onde

soutenue publiquement le **Jeudi 8 Septembre 2011** par

Heykel Aouani

École Doctorale : Physique & Sciences de la Matière

Président du Jury :	Dr. Xavier Letartre
Rapporteurs :	Dr. Alexandre Bouhelier
	Prof. Romain Quidant
Examinateur :	Dr. Emmanuel Fort
Directeur de thèse :	Dr. Hervé Rigneault
co-Directeur de thèse :	Dr. Jérôme Wenger

Institut Fresnel — CNRS UMR 6133 — Équipe Mosaic

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans toutes les personnes qui y ont contribué de près ou de loin. En particulier, j'aimerais remercier :

Marc Pena, président de l'Université Paul Cézanne, pour m'avoir octroyé une bourse présidentielle, me permettant ainsi d'effectuer cette thèse.

Hugues Giovannini, directeur de l'Institut Fresnel, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire.

Hervé Rigneault, mon directeur de thèse, pour m'avoir acceuilli dans son équipe et m'avoir encouragé de nombreuses fois au cours des trois dernières années.

Les membres du Jury : Romain Quidant, Alexandre Bouhelier, Emmanuel Fort et Xavier Letartre pour leur lecture méticuleuse du manuscrit, ainsi que pour la qualité scientifique de leurs questions et leurs remarques.

Jérôme Wenger, mon principal encadrant, envers qui je suis extrêmement reconnaissant au vu de la quantité de choses qu'il m'a enseigné au cours de cette thèse. Au delà de ses qualités scientifiques, j'ai aussi appris à découvrir une personne intègre, sincère et qui m'a permis de repousser mes limites plus d'une fois au cours de cette thèse.

Sophie Brasselet, sans qui jamais je n'aurais eu envie de faire une thèse. Même si n'avons pas directement travaillé ensemble ces trois dernières années, elle a toujours été pour moi (et pour bien d'autres aussi) un modèle scientifique.

Caroline Champenois, grâce à qui j'ai pu effectuer mon stage au sein l'équipe MOSAIC et poursuivre en thèse par la suite.

L'équipe de Thomas Ebbesen, et en particulier Oussama Mahboub et Eloïse Devaux pour nous avoir fabriqué de nombreux (et souvent compliqués) échantillons.

Sonia Regnier et Roland Hayn avec qui j'ai eu le privilège de travailler au cours de mon monitorat de l'enseignement supérieur.

Le personnel administratif et technique de l'Institut Fresnel qui a toujours été très efficace.

Les post-doctorants avec qui j'ai eu la chance de travailler : Davy Gérard, qui m'a initié et formé sur la manip, Nadia Djaker, qui m'a beaucoup encouragé , Richard Hostein et David Gachet et avec qui je ne peux compter le nombre de fous rires partagés ensemble.

Les membres passés et présents de l'équipe MOSAIC et en particulier : mes compagnons de cellule Cyril (qui a toujours mis une très bonne ambiance dans le bureau 27 et avec qui je garderais de très bon souvenirs) et Esben, les personnes avec qui j'ai pu tisser des liens et qui vont très certainement me manquer à savoir Dora, Fabiana, Sophie Bru, Pascal (oui même toi !), Zola, Alicja , Alla, Julien Savatier et Peter.

Mes amis les plus fidèles : Sabrina, Nico, Thomas et Soifyia qui m'ont toujours conseillé et encouragé quand rien n'allait.

Enfin, mes derniers mots iront à ma soeur et mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans les tribulations de la vie. Je n'aurais sans doute pas pu aller jusqu'à la fin de cette expérience sans vous.

Table des matières

Introduction **1**

1 Introduction aux notions d'exaltation et de contrôle de fluorescence moléculaire par des nano-antennes optiques **5**

1.1 Principes généraux de fluorescence moléculaire 6

1.1.1 Introduction à la luminescence 6

1.1.2 Quantification des niveaux d'énergie dans une molécule 6

1.1.3 Règles de sélection 7

1.1.4 Transitions radiatives et non radiatives entre états électroniques . . 8

1.1.5 Propriétés d'un émetteur fluorescent 10

1.2 Introduction aux méthodes optiques pour la spectroscopie de molécules uniques 13

1.2.1 Techniques de spectroscopie de fluorescence et principales limitations 13

1.2.2 Méthodes optiques basées sur la structuration du faisceau laser d'excitation 14

1.2.3 Méthodes optiques basées sur l'utilisation de structures photoniques 16

1.3 Modification des propriétés d'un émetteur au voisinage d'une nano-antenne optique 19

1.3.1 Concept de nano-antenne optique 19

1.3.2 Introduction à la densité locale d'états photoniques (LDOS) 20

1.3.3 Directivité et amplification de la densité locale d'énergie électromagnétique au voisinage d'une nanoantenne 21

1.4 Nano-antennes optiques appliquées à l'exaltation et au contrôle de la fluorescence moléculaire 23

2 Analyse de dynamique temporelle de fluorescence pour la caractérisation de nano-antennes **27**

2.1 Principes de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) 28
2.1.1 Introduction à la spectroscopie de corrélation de fluorescence 28
2.1.2 Analyse des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence . . . 28
2.1.3 Expression de la fonction d'autocorrélation temporelle $g^{(2)}(\tau)$ correspondant à une diffusion Brownienne 3D 33
2.1.4 Aspects photophysiques des mesures FCS 33
2.1.5 Facteur de correction pour le bruit de fond 35
2.1.6 Rapport signal sur bruit en FCS 35
2.1.7 Extension de la FCS au cas de l'analyse à deux espèces : Dual-Color FCCS 37
2.2 Mesures de temps de vie de fluorescence par TCSPC 37
2.2.1 Historique 37
2.2.2 Principe et mesures de temps de vie de fluorescence 38
2.3 Dispositif expérimental 39
2.4 Procédure de caractérisation de la fluorescence au voisinage d'une nano-antenne 41

3 Confinement électromagnétique et exaltation de fluorescence par des microsphères diélectriques 45
3.1 Introduction sur l'effet des conditions d'illumination d'une microsphère diélectrique 46
3.1.1 Illumination par onde plane d'une microsphère diélectrique : prédiction théorique de nanojets photoniques 46
3.1.2 Observation expérimentale de nanojets photoniques 47
3.1.3 Illumination d'une microsphère diélectrique par un faisceau Gaussien ultrafocalisé : vers un confinement électromagnétique 3D 48
3.2 Exaltation de fluorescence moléculaire par des microsphères diélectriques . 50
3.2.1 Préparation des échantillons de microsphères 52
3.2.2 Dispositif expérimental et analyses des données FCS en présence de microsphères 52
3.2.3 Exaltation de la fluorescence moléculaire : Mesures expérimentales . 53
3.2.4 Détermination expérimentales des gains à l'excitation et à l'émission sur l'exaltation globale de fluorescence 54
3.2.5 Simulations numériques des contributions des gains à l'excitation et à l'émission 56
3.2.6 Confinement du volume de détection FCS sous la limite de diffraction 59
3.2.7 Comparaison des performances entre microsphères de latex (n_s =1.59) et mélamine (n_s =1.68) 59
3.3 Exaltation de fluorescence sous excitation biphotonique 60
3.3.1 Dispositif expérimental utilisé pour la spectroscopie de fluorescence sous excitation à deux photons 62
3.3.2 Résultats expérimentaux 62
3.4 Conclusion sur les microsphères diélectriques 66

4 Exaltation de fluorescence dans des nano-ouvertures métalliques : influence des paramètres des ouvertures sur l'émission moléculaire 67
4.1 Introduction sur la transmission extraordinaire de la lumière au travers de nano-ouvertures métalliques . . . 68
4.2 Exaltation de fluorescence par des nano-ouvertures percées dans un film d'or 69
4.2.1 Fabrication des nano-ouvertures métalliques . . . 70
4.2.2 Influence de la taille des nano-ouvertures sur l'exaltation de fluorescence moléculaire . . . 70
4.2.3 Détermination des gains à l'excitation et à l'émission contribuant à l'exaltation globale de fluorescence . . . 73
4.2.4 Simulations numériques et interprétation physique . . . 75
4.2.5 Analyse spectrale de l'exaltation de fluorescence dans des nano-ouvertures d'or . . . 78
4.3 Augmentation du confinement électromagnétique à l'intérieur d'ouvertures de diamètres supérieurs à 150 nm par ajout d'une couche supérieure de chrome 79
4.4 Prédiction de l'exaltation de fluorescence dans une nano-ouverture en fonction du rendement quantique de l'émetteur utilisé . . . 81
4.5 Comparaisons des performances entre nano-ouvertures percées dans des films d'or et d'aluminium . . . 82
4.5.1 Influence de la taille des ouvertures en aluminium sur l'exaltation de fluorescence . . . 82
4.5.2 Contributions relatives des gains à l'excitation et à l'émission et fréquence de coupure . . . 83
4.5.3 Conclusions sur les comparaisons des ouvertures d'or et d'aluminium 85
4.6 Influence de la couche d'adhésion entre un susbrat de verre et un film d'or sur l'exaltation de fluorescence . . . 86
4.6.1 Fabrication des nano-ouvertures d'or pour les différentes couches d'adhésion étudiées . . . 86
4.6.2 Mesures expérimentales pour les différentes couches d'adhésion . . . 87
4.6.3 Détermination des contributions physiques participant à l'exaltation de fluorescence et comparaison avec des simulations numériques . . 89
4.6.4 Conclusion sur l'influence de la couche d'adhésion . . . 90
4.7 Conclusion sur les nano-ouvertures métalliques . . . 92

5 Contrôle de l'émission de fluorescence moléculaire avec des nano-ouvertures structurées par réseaux de corrugations 93
5.1 Introduction sur les nano-ouvertures corruguées . . . 94
5.1.1 Directivité de la lumière au travers d'ouvertures corruguées . . . 94
5.1.2 Applications des nano-ouvertures métalliques corruguées . . . 94
5.2 Exaltation de fluorescence moléculaire par des nano-ouvertures corruguées 100
5.2.1 Fabrication et dispositif expérimental . . . 100
5.2.2 Influence du nombre de corrugations . . . 101
5.2.3 Contributions des gains à l'excitation et à l'émission . . . 103

5.2.4 Variations de l'exaltation de fluorescence en fonction du rendement quantique de l'émetteur 104
5.2.5 Couplage entre le champ excitateur et les ondes de surface 107
5.2.6 Analyse spectrale 108
5.3 Contrôle directionnel de fluorescence moléculaire par des nano-ouvertures corruguées 108
5.3.1 Directivité de fluorescence dans la direction normale au plan de l'échantillon 108
5.3.2 Modification de la direction d'émission par variation de la distance a entre l'ouverture centrale et le premier sillon du réseau 111
5.3.3 Interprétation et modélisation physique des résultats obtenus 113
5.3.4 Influence de la longueur d'onde d'émission sur la directivité de fluorescence 117
5.3.5 Nano-spectroscope à réseau pour le filtrage directionnel de l'émission de fluorescence à deux couleurs 120
5.4 Conclusion sur les nano-ouvertures corruguées 122

6 Méthodes alternatives pour le sondage des champs optiques au voisinage de nano-antennes 125
6.1 Sondage des exaltations de champs optiques au voisinage de nano-antennes par étude de dynamique temporelle de boîtes quantiques semi-conductrices 126
6.1.1 Introduction sur les boîtes quantiques semi-conductrices 126
6.1.2 Fabrication des boîtes quantiques CdSe/CdS/ZnS 126
6.1.3 Dynamique de photoluminescence d'états multiexcités 127
6.1.4 Calibration expérimentale du rapport BX/X dans le cas d'une interface de verre 131
6.1.5 Sondage des renforcements de champs électromagnétiques au voisinage de microsphères diélectriques par mesure du rapport BX/X . 132
6.1.6 Sondage des renforcements de champs électromagnétiques dans des nano-ouvertures métalliques par mesure du rapport BX/X 135
6.1.7 Conclusion sur l'utilisation des boîtes quantiques pour le sondage des champs optiques 135
6.2 Sondage des exaltations de champs optiques au voisinage de nano-antennes par spectroscopie sous saturation de fluorescence 137
6.2.1 Introduction sur la spectroscopie sous saturation de fluorescence . . 137
6.2.2 Amélioration de la résolution optique par excitation saturée de fluorescence 137
6.2.3 Exploitation des fréquences harmoniques pour le sondage des champs optiques au voisinage de nano-antennes 139
6.2.4 Dispositif expérimental utilisé pour les mesures de spectroscopie sous saturation de fluorescence 143
6.2.5 Sondage du renforcement d'intensité d'excitation dans des ouvertures simples et corruguées 143

6.2.6 Conclusion sur l'utilisation de la spectroscopie sous saturation de fluorescence pour le sondage des champs optiques 146

7 Utilisation des nano-antennes optiques en biophotonique 147

7.1 Spectroscopie de corrélation de fluorescence exaltée par des nano-antennes optiques 148

7.1.1 Analyse de dynamique moléculaire dans des solutions fortement concentrées avec des nano-ouvertures 148

7.1.2 Amélioration du rapport signal sur bruit et réduction de la durée des expériences FCS à l'aide de nano-antennes 149

7.1.3 Exaltation de la spectroscopie par corrélation croisée de fluorescence à deux couleurs 156

7.2 Vers une miniaturisation des systèmes d'analyse de spectroscopie de corrélation de fluorescence 158

7.2.1 Détection de molécules individuelles à l'aide de lentilles combinées à des microsphères 158

7.2.2 Sonde à fibre optique OFM pour l'analyse moléculaire 160

7.3 Conclusion 166

Conclusion et perspectives 168

Liste des publications auxquelles ont donné lieu ces travaux de thèse 172

Introduction

La seule et unique distinction entre un simple morceau de charbon et un diamant pur provient de l'organisation structurale des atomes de carbone qui les composent. Les lois de la physique autorisant la manipulation et le positionnement d'atomes individuels, la structuration de la matière aux échelles atomique et moléculaire pourrait permettre une révolution dans des domaines aussi variés que la médecine, l'écologie, l'espace, la fabrication, la nourriture et l'armement. Cette supposée révolution nécessite cependant le développement de nouveaux outils technologiques et en particulier des outils d'optique de pointe. En effet, la caractérisation et la manipulation d'objets quantiques peuvent être effectuées en utilisant des techniques expérimentales dans la gamme des fréquences optiques. Dans ce contexte, les techniques de sondage d'objets biologiques par méthodes optiques ont connu un développement considérable au cours des dix dernières années, conduisant à l'avènement d'un domaine de recherche à la frontière entre l'optique, la photonique, la chimie et les sciences du vivant : la biophotonique. L'utilisation d'un rayonnement optique en biologie permet à l'heure actuelle l'étude non-invasive des propriétés du vivant à l'échelle nanométrique. En particulier, le suivi de réactions biologiques au niveau d'une molécule individuelle présente un intérêt majeur dans le domaine de l'analyse biomédicale car il pourrait permettre la détection de mutation ponctuelle de l'ADN et le dosage de protéines non-fonctionnelles. En dépit du développement de contrastes optiques ne nécessitant aucun marquage tels que la génération de second harmonique ou la diffusion cohérente Raman anti-Stokes, le contraste de fluorescence demeure le plus répandu pour détecter des molécules individuelles grâce à sa haute sensibilité de détection et sa simplicité de mise en oeuvre.
Parmi les différentes méthodes d'analyse de molécules en solution existantes, la spectroscopie de corrélation de fluorescence (ou FCS pour Fluorescence Correlation Spectroscopy), introduite en 1972 par Madge, Elson et Webb [1], est sans doute la technique la plus efficace pour réaliser des études moléculaires dans des milieux peu concentrés avec une grande résolution spatio-temporelle. La quantité d'informations accessible par FCS donne accès à une large gamme de processus, dont les temps caractéristiques s'étendent de quelques nanosecondes jusqu'à la seconde. En particulier, les phénomènes de diffusion, les concentrations

locales, la brillance des molécules, les vitesses d'association moléculaires, le temps de vie des états triplet peuvent être explorées par spectroscopie de corrélation de fluorescence [2]. Malgré l'efficacité des techniques de spectroscopie de molécules uniques, celles-ci demeurent limitées par deux phénomènes. D'une part, la détection de molécules individuelles est restreinte à des gammes de concentrations moléculaires inférieures au nanomolaire [3] du fait des limites de diffraction optique inhérentes à tout système de microscopie optique en champ lointain. L'analyse dynamique de molécules individuelles dans des solutions fortement concentrées, comme c'est le cas à l'intérieur des cellules vivantes, impose la réduction des volumes de détection sous les limites de diffraction optique. Les techniques de détection de molécules individuelles sont de plus limitées par le faible niveau de signal de fluorescence émis par molécule, ce qui restreint le choix des marqueurs fluorescents et nécessite des temps d'intégration des expériences élevés [4]. Si différentes méthodes optiques (TIRF, STED, NSOM, ...) peuvent être utilisées pour améliorer la détection de molécules fluorescentes en solution, les confinements des champs électromagnétiques et l'amélioration de l'efficacité de détection apportées par ces techniques sont insuffisants. Pour ces raisons, nous montrerons dans le chapitre 1 que l'utilisation de nano-antennes optiques s'avère indispensable pour réduire efficacement les volumes d'analyse au-delà des limites imposées par la diffraction et exalter le taux de fluorescence par émetteur.
Le concept d'antenne optique, par analogie aux micro-ondes, est un concept physique qui n'a été introduit que très récemment en optique [5]. Une nano-antenne optique est un système qui permet de convertir un rayonnement optique propagatif en espace libre en énergie localisée et réciproquement [6, 7]. Les récentes démonstrations expérimentales sur l'exaltation de fluorescence par des dimères de nano-triangles métalliques [8] et sur le contrôle de la directivité d'un émetteur unique par une nano-antenne Yagi-Uda [9] ont constitué des avancées majeures dans le domaine des nano-antennes optiques. Les propriétés physiques de ces antennes optiques dépendent essentiellement de leur nature, leurs tailles et leurs géométries. Pour ces raisons, leur caractérisation expérimentale est essentielle car elle permet d'en améliorer le design et d'amplifier leurs réponses optiques. L'élaboration de structures optimisées conduit à un fort confinement des champs électromagnétiques incidents et à une exaltation du taux de fluorescence par molécule.
Ce travail de thèse se positionne en amont des applications de détection exaltée de molécules fluorescentes dans des volumes sub-longueur d'onde. Celui-ci a en partie consisté au développement de différentes techniques de caractérisation expérimentale des propriétés de nano-antennes optiques. La principale technique de caractérisation d'antennes optiques, qui sera présentée dans le chapitre 2, consiste à combiner des études de spectroscopie de corrélation de fluorescence et des mesures de temps de vie de fluorescence. Cette procédure de caractérisation de fluorescence permet de déterminer le poids relatif des contributions des gains sur l'intensité d'excitation et sur l'émission participant à l'exaltation globale de fluorescence moléculaire. Bien que très puissante, cette procédure nécessite des temps d'expérimentation assez importants. C'est pourquoi, deux méthodes alternatives rapides (quelques secondes) de sondage des exaltations de champs électromagnétiques seront présentées au chapitre 6. La première d'entre elles consiste à suivre la dynamique temporelle d'états multiexcitoniques de boîtes quantiques semi-conductrices dans le but d'obtenir des

informations sur le renforcement local d'excitation au voisinage d'une nano-antenne. La seconde méthode, appelée spectroscopie sous saturation de fluorescence, exploite les propriétés intrinsèques de non-linéarité du processus de fluorescence.
Les techniques de caractérisation de fluorescence développées ont permis d'étudier différents types d'antennes optiques. Nous verrons dans le chapitre 3 que des microsphères diélectriques illuminées par faisceau Gaussien focalisé permettent de confiner la lumière dans des volumes sub-longueur d'onde (réduction d'un ordre de grandeur du volume de détection sous la limite de diffraction) et d'exalter la fluorescence moléculaire sous excitation à un (gain $\approx$7.5) et deux photons (gain $\approx$10) des émetteurs diffusant au voisinage de ces objets. Pour atteindre des réductions de volume et des gains de fluorescence plus élevés, l'utilisation de nano-antennes plasmoniques s'avère être nécessaire. En effet, les nano-ouvertures métalliques que nous présenterons dans le chapitre 4 permettent d'atteindre des volumes d'analyse de quelques centaines de zeptolitres (10^{-21}L), soit une réduction de trois ordres de grandeurs au-delà des limites de diffraction optique, et d'augmenter le taux de fluorescence par émetteur d'un facteur 25. De la même manière qu'avec une antenne Yagi-Uda [9], un contrôle de la fluorescence moléculaire peut être obtenu en structurant un réseau de sillons périodiques autour d'une simple nano-ouverture comme il sera montré au chapitre 5, avec des exaltations de fluorescence supérieures à un facteur 100. Enfin, les applications en biophotonique des nano-antennes étudiées seront présentées dans le chapitre 7.

CHAPITRE 1

Introduction aux notions d'exaltation et de contrôle de fluorescence moléculaire par des nano-antennes optiques

Les techniques de spectroscopie de molécules uniques permettent d'accéder à des informations qui sont habituellement masquées dans des moyennes d'ensemble sur des milliers de molécules. La fluorescence est de loin le contraste le plus sensible pour détecter des molécules individuellement. Les méthodes de spectroscopie de fluorescence sont en général implentées sur des montages de microscopie confocale. Comme toutes les techniques de microscopie en champ lointain, le volume d'analyse confocal est limité par le phénomène de diffraction optique, et ne permet pas la détection de molécules individuelles dans des solutions fortement concentrées. D'autre part, le faible signal de fluorescence émis par une molécule individuelle nécessite des temps d'intégration expérimentaux assez longs pour obtenir un rapport signal sur bruit correct. Après une introduction sur les différentes méthodes optiques existantes pouvant être utilisées pour contourner ces limites, nous montrerons qu'il faut se tourner vers le domaine des nano-antennes optiques pour confiner efficacement les champs optiques dans des volumes sub-longueur d'onde et exalter fortement les signaux de fluorescence moléculaire.

1.1 Principes généraux de fluorescence moléculaire

1.1.1 Introduction à la luminescence

La luminescence est un terme introduit en 1888 par le physicien allemand Wiedemann pour désigner une émission lumineuse dont l'origine n'est pas purement thermique, par opposition à l'incandescence. Les phénomènes de luminescence peuvent être classés selon leur mode d'excitation. En particulier, on parle de photoluminescence lorsque l'excitation s'effectue par voie optique et l'on distingue deux types de photoluminescence : la fluorescence et la phosphorescence. Les échelles de temps caractéristiques relatifs à ces deux processus, dont l'origine est directement liée aux niveaux électroniques impliqués lors des transitions radiatives, sont à la base de leurs distinctions. En effet, le phénomène de fluorescence est caractérisé par un temps de relaxation radiative de l'ordre de la nanoseconde, alors que ce temps caractéristique est supérieur à la milliseconde pour le phénomène de phosphorescence.

1.1.2 Quantification des niveaux d'énergie dans une molécule

Dans l'approximation de Born-Oppenheimer, on considère que l'on peut découpler le mouvement des électrons de celui des noyaux, en estimant que leur mouvement est beaucoup plus lent que celui des électrons. Une des conséquences directe de cette approximation est que l'énergie totale d'un molécule est la somme des ses énergies électronique, vibrationnelle et rotationnelle, toutes ces énergie étant quantifiées comme illustré en Figure 1.1. Les états électroniques singulets sont notés S_0, S_1 et l'état triplet est noté T_1. Un état dit singulet est un état pour lequel les électrons sont appariés, ce qui conduit à une multiplicité M =1. La multiplicité M est une mesure de la dégénerescence des fonctions d'onde électroniques et elle est définie comme $M = 2S + 1$, S étant le moment de spin total des électrons mis en jeu. Pour un état singulet, les éléctrons étant appariés, les spins prennent respectivement les valeurs $s = \{1/2, -1/2\}$, ce qui conduit à une multiplicité M =1. Pour un état triplet, les électrons étant non appariés, les spins prennent les couples de valeurs $s = \{1/2, 1/2\}$ ou $s = \{-1/2, -1/2\}$, la multiplicité vaut donc $M = 3$.
Les transitions électroniques (comme la transition $S_0 \rightarrow S_1$), qui représentent le passage d'un électron d'un niveau d'énergie à un autre, ont des énergies comprises entre 1 eV (domaine visible) et 10 eV (domaine des ultra-violet). Chaque état électronique est associé à un sous-ensemble de niveaux vibrationnels qui sont caractéristiques des modes de vibration de la molécule. Les transitions entre niveaux vibrationnels ont des énergies de l'ordre de 10^{-1} eV (domaine des infra-rouges) pour des molécules hétéroploaires. Bien qu'ils ne soient pas représentés, chaque état vibrationnel est en soi associé à une multitude d'états rotationnels qui caractérisent le mouvement de rotation de la molécule autour de son centre de gravité. Les transitions entre niveaux rotationnels ont des énergies de l'ordre de 10^{-3} eV (domaines des micro-ondes) pour des molécules hétéropolaires.

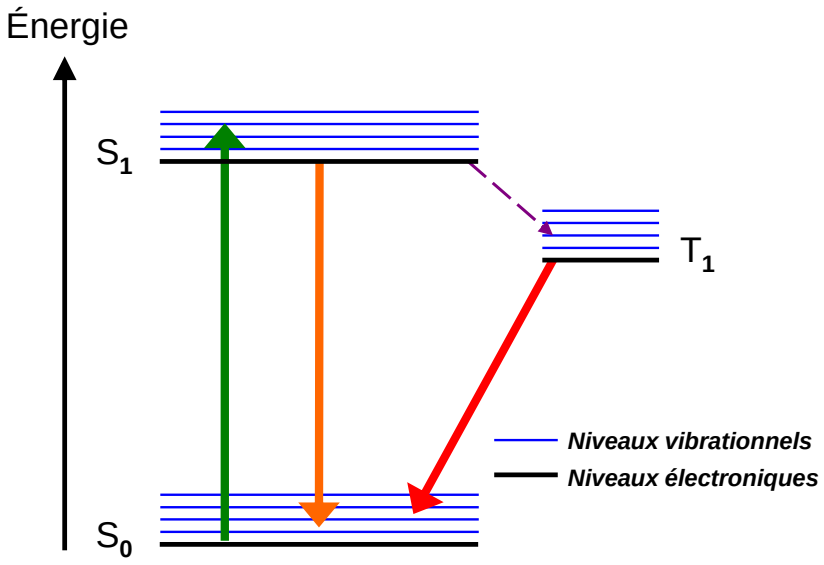


FIGURE 1.1 – *Niveaux d'énergie électroniques et vibrationnels d'une molécule. Selon le principe de Franck-Condon, une transition électronique se produit sans changement des positions des noyaux dans l'entité moléculaire : les transitions sont donc verticales.*

1.1.3 Règles de sélection

On distingue deux règles de sélection pour les transitions d'absorption : les transitions interdites pour des raisons de spin et les transitions interdites pour des raisons de symétrie. Les lois de sélection de spin stipulent que les transitions entre deux états de multiplicité différentes sont interdites. Une conséquence calculatoire immédiate de cette règle est que la variation de multiplicité de spin ΔS entre les niveaux impliqués doit être nulle pour que la transition considérée soit autorisée. De ce fait, les transitions de type singulet-singulet ou triplet-triplet sont autorisées (car ΔS =0), alors que les transitions de type singulet-triplet ou triplet-singulet sont interdites (car ΔS $\neq$0). Cependant, le couplage spin-orbite permettant l'intéraction entre des fonctions d'onde de multiplicité différente, il existe une faible (mais non négligeable) probabilité de transition entre un état singulet et un état triplet. En particulier, le croisement intersystème (passage d'un état singulet vers un état triplet) est rendu possible grâce au couplage spin-orbite. Les considérations sur les transitions interdites pour des raisons de symétrie font quant à elles appel à la théorie des groupes et dépassent le cadre de cette thèse. On précisera cependant qu'une transition interdite pour des raisons de symétrie peut être observée lorsque les vibrations moléculaires provoquent des écarts par rapport à la symétrie parfaite.

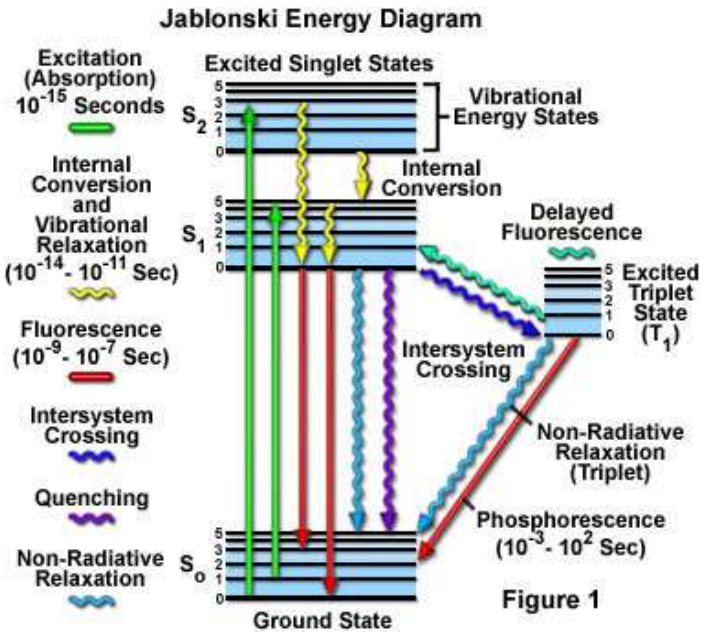


Figure 1.2 – *Diagramme de Jablonski représentant les états électroniques d'une molécule et les transitions entre ces états.*

1.1.4 Transitions radiatives et non radiatives entre états électroniques

Le diagramme de Jablonski (Figure 1.2), nommé d'après le physicien Alexandre Jablonski, permet de visualiser les différents processus mis en jeu au cours des transitions entre états : absorption d'un photon, conversion interne, fluorescence, croisement intersystème, phosphorescence ... L'axe vertical est un axe en énergie, tandis que les états sont groupés horizontalement selon leur multiplicité de spin (de la même manière que la Figure 1.1). Les transitions radiatives sont symbolisées par des flèches droites et les transitions non-radiatives par des flèches ondulées. L'état vibrationnel fondamental de chaque état électronique est représenté par une ligne épaisse et les autres états vibrationnels par un ligne fine. L'absorption d'un photon incident peut porter une molécule dans l'un des états vibrationnel de S_1, S_2, ... Nous allons à présent décrire les processus de relaxation qui s'ensuivent.

Conversion interne

Les processus de conversion interne correspondent à des transitions non radiatives entre deux états de même multiplicité (exemple : transition $S_2 \rightarrow S_1$ en Figure 1.2) ou à la relaxation d'un état vibrationnel excité vers l'état vibrationnel fondamental du même niveau

électronique (exemple : transition $S_{1,v=5} \rightarrow S_{1,v=0}$ en Figure 1.2). Lorsque la molécule est portée vers un niveau vibrationnel excité du premier état excité S_1 après absorption d'un photon incident, la relaxation vibrationnelle conduit l'électron vers le niveau vibrationnel 0 de l'état excité S_1 en 10^{-13} à 10^{-11} s. Cette règle empirique, qui porte le nom de loi de Kasha, est basée sur le fait que les processus de relaxation vibrationnelle sont bien plus rapides que tout autre processus de relaxation.

Fluorescence

L'émission de photons qui accompagne la relaxation $S_1 \rightarrow S_0$ est appelée fluorescence. Malgré le fait que l'émission d'un photon soit un processus aussi rapide que l'absorption (10^{-15} s), la durée de vie moyenne de la molécule dans l'état excité S_1 varie entre 10^{-10} et 10^{-7} s. En raison de la perte d'energie par relaxation vibrationnelle lors des processus de conversion interne, le spectre d'émission de fluorescence est situé à des longueurs d'ondes plus élevées que le spectre d'absorption. Le décalage entre les pics d'absorption et d'émission de fluorescence est appelé déplacement Stokes. La section efficace d'absorption à un photon σ est de l'ordre de 10^{-16} cm^2 pour des sondes fluorescentes organiques standards.

Relaxation non radiative et quenching

Le passage $S_1 \rightarrow S_0$ peut également s'effectuer de manière non radiative, c'est à dire sans émission de photons. D'autre part, il existe une autre forme de relaxation non-radiative appelée quenching et que l'on peut scinder en deux catégories : le quenching dynamique et le quenching statique. Le quenching dynamique trouve son origine lors des collisions intermoléculaires où l'énergie électronique est convertie en énergie cinétique et de vibration. Le quenching statique est observé lors de la formation de complexes non fluorescents.

Croisement intersystème et phosphorescence

Le croisement intersystème est une transition non radiative entre deux niveaux vibrationnels impliquant des états électroniques de multiplicités différentes. Comme il peut être remarqué en Figure 1.2, une molécule dans l'état vibrationnel fondamental de l'état excité S_1 peut être amenée vers le niveau vibrationnel isoénergétique de l'état triplet T_1, avant d'être conduite, après relaxation vibrationnelle, dans l'état vibrationnel de plus basse énergie de T_1. Bien qu'en principe interdit par les règles de sélection de spin, le passage $S_1 \rightarrow T_1$ (dont la durée varie entre 10^{-9} et 10^{-7} s) peut entrer en compétition directe avec les processus de relaxation de $S_1 \rightarrow S_0$.
A température ambiante, la passage de $T_1 \rightarrow S_0$ est dominé par des effets non radiatifs. En effet, la probabilité de relaxation radiative depuis T_1 est faible puisque la transition est en principe interdite. Une conséquence directe est que la relaxation radiative lors du passage $T_1 \rightarrow S_0$, appelée phosphorescence, est caractérisée par une constante de vitesse radiative au moins 1000 fois plus faible que pour la transition radiative $S_1 \rightarrow S_0$. La durée de vie de l'état excité T_1 varie entre 10^{-6} et 1 s. D'un point de vue spectral, la phosphorescence

est située à des longueurs d'onde plus grandes que la fluorescence, car l'état triplet T_1 est énergétiquement plus faible que l'état singulet S_1.

Fluorescence après absorption biphotonique

Une molécule peut également être portée dans un état électronique excité (S_1, S_2, ...) après absorption non-linéaire de deux (ou plus) photons incidents. Pour que ce processus d'absorption biphotonique soit efficace, les deux photons incidents doivent être vus par la molécule dans une fenêtre temporelle de $\Delta\tau \approx 10^{-15}$ s, nécessitant en pratique l'utilisation d'une source laser impulsionnelle femtoseconde. La relaxation depuis l'état excité après absorption biphotonique s'effectue de la même manière que dans le cas de l'absorption monophotonique. La section efficace d'absorption à deux photons étant beaucoup plus faible celle d'absorption à un photon ($\sigma_{2P} \approx 10^{-50}$cm^{4}s/photon), le signal de fluorescence émis après absorption biphotonique est très faible comparé au cas d'une excitation monophotonique.

1.1.5 Propriétés d'un émetteur fluorescent

Les propriétés d'émission d'une molécule ne sont pas intrinsèques mais au contraire dépendent fortement de l'environnement local. Nous allons dans cette section préciser les caractéristiques importantes d'un émetteur fluorescent et discuter des effets de l'environnement sur les propriétés d'émission de fluorescence.

Durée de vie des états excités

Nous noterons les constantes de vitesses des différents processus de relaxation à partir de S_1 de de la manière suivante :

k_r^S : constante de vitesse pour la relaxation radiative $S_1 \rightarrow S_0$ (fluorescence).

k_{nr}^S : constante de vitesse pour les relaxations non radiatives $S_1 \rightarrow S_0$ comprenant la conversion interne et le quenching (dynamique et statique).

k_{cis} : constante de vitesse pour le croisement intersystème. Pour les deux processus non radiatifs précédent, nous introduisons la constante de vitesse de désexcitation totale $k_{nr_{tot}}^S = k_{nr}^S + k_{cis}$.

Pour la relaxation à partir de T_1, nous noterons :

k_r^T : constante de vitesse pour la relaxation radiative $T_1 \rightarrow S_0$ (phosphorescence).

k_{nr}^T : constante de vitesse pour la relaxation non radiative $T_1 \rightarrow S_0$.

Supposons qu'à l'instant t =0, une impulsion lumineuse très courte (c'est à dire plus courte que la durée de vie de l'état excité) fait passer N molécules dans l'état excité S_1. Le retour à l'état fondamental S_0 pouvant s'effectuer de manière radiative ou non radiative, l'équation différentielle régissant ces processus s'écrit :

$$\frac{dN}{dt} = -(k_r^S + k_{nr_{tot}}^S)N, \tag{1.1}$$

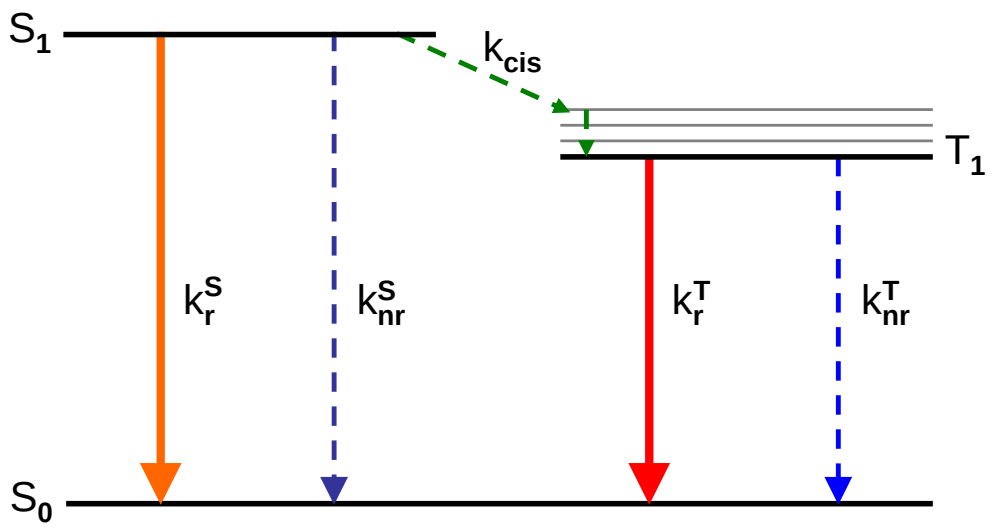


FIGURE 1.3 – *Schéma représentatif des processus de relaxation qui entrent en compétition après le passage d'une molécule dans l'état excité S_1 et constantes de vitesse de ces processus.*

L'intégration de cette équation différentielle conduit à l'équation d'évolution de la population N :

$$N = N_0 \exp(-\frac{t}{\tau_s}). \tag{1.2}$$

où N_0 est le nombre de molécules dans l'état excité S_1 à l'instant 0, et τ_s est la durée de vie de l'état S_1, donnée par :

$$\tau_s = \frac{1}{k_r^S + k_{nr_{tot}}^S}. \tag{1.3}$$

La durée de vie moyenne de l'état excité S_1 est typiquement de l'ordre de la nanoseconde pour des fluorophores standards. La durée de vie τ_s n'est toutefois pas intrinsèque à la molécule et dépend fortement de l'environnement électromagnétique local, comme nous le montrerons en sous-section 1.3.2. Une démonstration expérimentale bien connue est la modification du temps de vie de fluorescence au voisinage d'une pointe métallique de NSOM [10, 11]. Enfin, précisons que l'environnement électromagnétique n'est pas l'unique source de modifications de la durée de vie des états excités puisque la température, le PH, les concentrations moléculaires ou encore l'ajout d'espèces dites de type "quencher" sont également susceptibles de modifier la durée de vie τ_s.

Rendement quantique

Le rendement quantique de fluorescence Φ est défini comme le rapport entre le nombre de photons émis lors de la transition $S_1 \rightarrow S_0$ et le nombre de photons absorbés, et peut s'exprimer en utilisant les constantes de vitesses :

$$\Phi = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr_{tot}}^S} = k_r^S \tau_s. \tag{1.4}$$

Le rendement quantique est une caractéristique importante d'une molécule fluorescente. En effet, un bon fluorophore a rendement quantique proche de 1 et un mauvais fluorophore un rendement quantique proche de 0.
De la même manière que précedemment, nous pourrions définir le rendement quantique de phosphorescence pour la transition $T_1 \rightarrow S_0$, mais cela dépasse le cadre de cette thèse.

Polarisation

La plupart des molécules fluorescentes absorbent préférentiellement la lumière polarisée colinéairement à leur dipôle de transition. Pour des molécules immobiles, l'excitation par une lumière polarisée linéairement conduit à un rayonnement polarisé dans la direction du dipôle de transition de la molécule. Pour des molécules qui diffusent en solution, l'illumination par une onde polarisée privilégie l'excitation des molécules dont les dipôles de transition sont orientés dans une direction proche de celle du vecteur d'onde du champ électrique incident : on parle de photosélection. La distribution des fluorophores excités étant anisotrope, l'émission de fluorescence résultante devrait elle aussi être anisotrope. Cependant, les changements de direction des moments de transition durant le temps de vie de l'état excité (comme les mouvements de rotations des molécules) provoquent une diminution de cette anisotropie qui a pour conséquence directe une dépolarisation partielle voire totale de la fluorescence.

Photostabilité

Le photoblanchiment est un processus se produisant lorsqu'un fluorophore perd de façon permanente la capacité de se désexciter de manière radiative, à cause de dommages chimiques photoinduits. En effet, au cours du passage vers l'état triplet, un fluorophore peut intéragir avec d'autres molécules, ce qui entraîne des modifications covalentes non réversibles. Certains évènements de photoblanchiment étant photodynamique, ils nécessitent une double action combinée de lumière et d'oxygène. Ces réactions ont pour effets de détruire irréversiblement la fluorescence et de produire des radicaux libres susceptibles à leur tour d'intéragir avec d'autres fluorophores. Ainsi, les fluorophores exposés à de trop nombreux cycles d'excitation-émission perdent leur capacité à émettre de la fluorescence. Certains types de molécules fluorescentes photoblanchissent très rapidement après émission de seulement quelques photons, alors que d'autres peuvent émettre en moyenne quelques milliers ou millions de photons avant le photoblanchiment.

1.2 Introduction aux méthodes optiques pour la spectroscopie de molécules uniques

1.2.1 Techniques de spectroscopie de fluorescence et principales limitations

La spectroscopie optique de molécules uniques est une technique d'analyse où les molécules fluorescentes, jouant le rôle de sondes optiques dopant un milieu (liquide, solide ou même des milieux plus complexes comme les milieux biologiques), sont détectées une à une. Comme indiqué dans la section 1.1, les propriétés physiques d'une molécule fluorescente dépendent très fortement du milieu environnant. La largeur des raies d'émission est par exemple fonction de l'environnement local d'une molécule, et moyenner des informations spectroscopiques sur un ensemble très inhomogène de sites du milieu conduit automatiquement à un élargissement des raies et à une réduction importante de la quantité d'informations disponibles. L'étude du comportement d'une molécule individuelle permet de s'affranchir des inhomogénéités de l'échantillon étudié. Un autre point fort de la détection de molécule unique est de permettre le suivi de processus dynamiques sans contrainte de synchronisation comme dans le cas de l'antibunching (appelé également dégroupement de photons). L'antibunching est la propriété d'une molécule d'avoir une probabilité nulle de réemettre un photon immédiatement après l'émission d'un premier photon. Sous excitation laser continue, ce processus est analysable sur une molécule unique. Le phénomène d'antibunching ne peut cependant pas être observé sur un grand nombre de molécules, car celles-ci absorbent et émettent indépendamment les unes des autres.
Dans le cadre de travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la détection de molécules fluorescentes diffusant librement en solution. La détection et l'analyse des signaux optiques émis par quelques molécules est actuellement un sujet de haute importance dans le domaine biophotonique [2]. En particulier, la spectroscopie de corrélation de fluorescence (ou FCS pour Fluorescence Correlation Spectroscopy), que nous décrirons en détails dans le chapitre 2, est une technique de détection de molécules fluorescentes en solution très utilisée pour l'analyse biomoléculaire, et qui permet d'accèder à un grand nombre d'informations : diffusion, photophysique, réactions physico-chimiques ... Les expériences de spectroscopie de corrélation de fluorescence, qui sont en général mises en oeuvre sur des montages de microscopie confocale, se trouvent principalement limitées par deux effets. D'une part, les gammes de concentrations moléculaires qui peuvent être explorées en FCS sont restreintes au nanomolaire à cause du phénomène de diffraction optique, qui impose des dimensions volumique supérieures au femtolitre. L'analyse d'une fraction de molécules dans des solutions fortement concentrées (c'est à dire dans des concentrations très supérieures au nanomolaire), comme c'est le cas à l'intérieur des cellules vivantes [3], nécessite une réduction sub-longueur d'onde du volume de détection. D'autre part, les configurations de microscopie confocale ne permettent pas d'accéder à des niveaux de signaux de fluorescence moléculaire élevés, ce qui restreint le choix des marqueurs fluorescents et nécessite des temps d'intégration des expériences élevés [4].

Les récents progrès effectués en microscopie optique de fluorescence et en nanophotonique ont ouvert de nouvelles opportunités pour contourner les limites de diffraction optique [12, 13, 14] et maximiser le signal de fluorescence par molécule. Dans cette section, nous allons décrire les deux types de méthodes optiques pouvant être utilisées pour effectuer des mesures de spectroscopie de fluorescence dans des volumes sub-longueur d'onde, avec des exaltations du niveau de signal de fluorescence moléculaire. La première d'entre elles nécessite une structuration de la lumière laser excitatrice alors que la seconde consiste en l'utilisation de structures photoniques.
A ce stade de l'exposé, il est important de souligner l'aspect de réciprocité qui existe entre les techniques de spectroscopie de molécules individuelles et l'utilisation de structures photoniques. En effet, si les méthodes photoniques que nous allons présenter en sous-section 1.2.3 permettent d'améliorer très efficacement les techniques de détection de molécules uniques, les techniques spectroscopiques peuvent réciproquement être utilisées pour sonder les propriétés physiques de structures photoniques. Cet aspect de dualité a été le fil conducteur de nos travaux.

1.2.2 Méthodes optiques basées sur la structuration du faisceau laser d'excitation

L'amélioration des techniques de détection de molécules individuelles est liée aux progrès réalisés en microscopie optique. Nous avons indiqué précédemment que la microscopie confocale est, comme toutes les techniques de microscopie en champ lointain, limitée par le phénomène de diffraction. La résolution optique obtenue avec un microscope confocal conventionnel dépend majoritairement de l'objectif de microscope utilisé. Ainsi, avec un objectif de microscope en configuration confocale, la résolution optique selon le critère d'Abbe est de $1.22\lambda/2\mathrm{ON}$ (ON est l'ouverture numérique de l'objectif de microscope définie par $\mathrm{ON}=n\sin\alpha$, où n est l'indice de réfraction dans le milieu d'observation et α est le demi-angle de collection) dans le plan transverse de propagation (λ étant la longueur d'onde de la lumière incidente) et de $1.4n\lambda/\mathrm{ON}^2$ selon la direction de propagation. Pour un objectif à immersion à eau (n =1.33) d'ouverture numérique ON=1.2 et une excitation laser à λ =633 nm, la résolution optique est d'environ 320 nm selon la direction transverse, et de 820 nm selon la direction longitudinale. Ces limites de résolution peuvent être contournées en structurant le faisceau laser excitateur incident.

TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

La microscopie TIRF a été développée dans les années 1980 à l'Université du Michigan (Etats-Unis) par Daniel Axelrod [15]. Cette technique repose sur une illumination en incidence de reflexion totale interne d'une interface solide/liquide, de manière à générer des ondes evanescentes au niveau du plan objet comme illustré en Figure 1.4. Ce champ d'ondes evanescentes, qui est confiné longitudinalement à l'interface entre les deux milieux sur une distance d'une centaine de nanomètres, est ensuite utilisé pour exciter les molécules fluorescentes diffusant sur l'interface supérieure. Cette configuration permet d'obtenir une

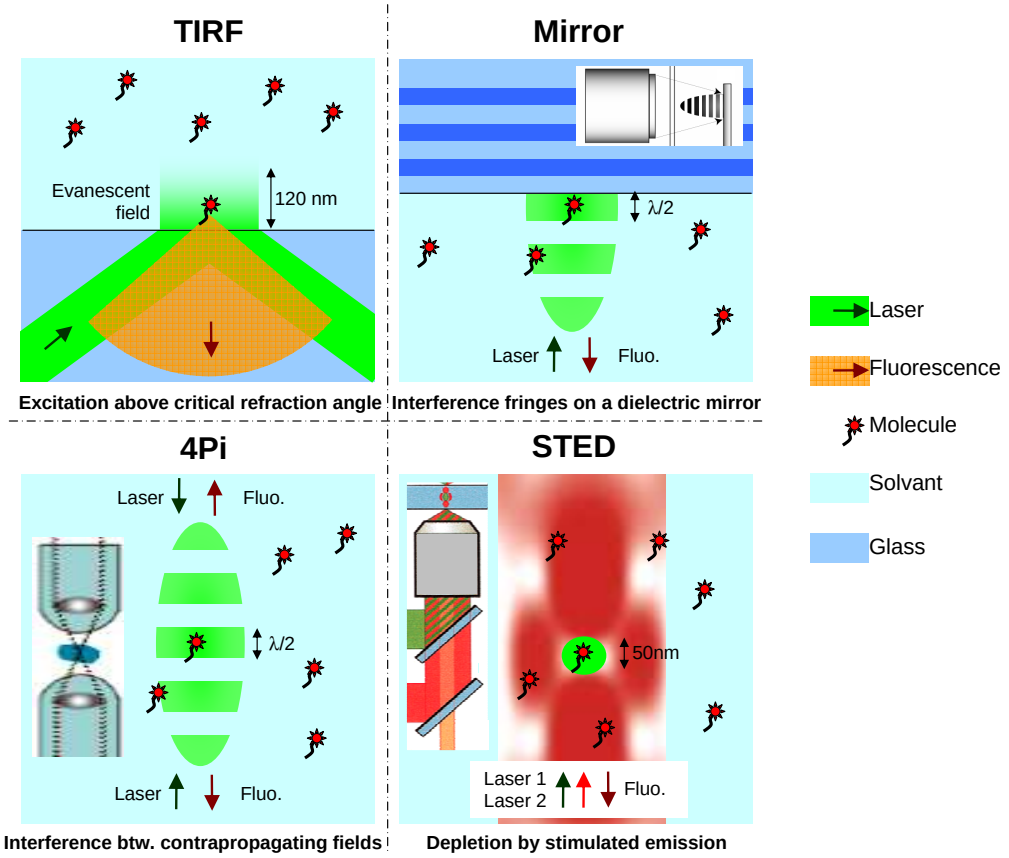


FIGURE 1.4 – *Techniques de microscopie en champ lointain basées sur une structuration de la lumière incidente pour améliorer la détection de molécules en solution [4].*

résolution longitudinale typiquement autour de $\lambda/6$, soit environ 105 nm pour une excitation à λ =633 nm. Le volume de détection effectif est alors réduit d'un ordre de grandeur comparé à un microscope confocal classique. Précisons toutefois que l'utilisation d'un trou de filtrage confocal reste indispensable en microscopie TIRF pour réduire le volume d'analyse dans le plan transverse [16]. De plus, l'utilisation de la FCS sur un montage de microscopie TIRF est limitée par le photoblanchiment des molécules diffusant dans les plans transverses hors focus, ce qui conduit à une déplétion de la fluorescence et une réduction du rapport signal sur bruit. L'excitation en configuration TIRF peut également être effectuée en utilisant une mince couche métallique afin de générer des modes de plasmons de surface, ce qui permet un meilleur confinement spatial et une réduction du bruit [17].

Détection de fluorescence sur un miroir diélectrique

L'utilisation d'un miroir diélectrique placé au point focal du faisceau d'excitation conduit à une modulation cohérente de la lumière incidente réfléchie, avec une interfrange de l'ordre de $\lambda/2n$ comme représenté en Figure 1.4. Cette méthode permet de réduire d'un facteur 6

le volume d'analyse confocal comparé à une configuration classique. De plus, le taux de fluorescence par émetteur diffusant sur le miroir diélectrique peut être exalté jusqu'à un facteur 4 grâce à l'augmentation de la densité d'énergie électromagnétique et du taux d'émission spontanée [18, 19]. Cette technique a été utilisée pour mesurer de manière très précise le coefficient de diffusion des molécules EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) dans le cytoplasme d'une bactérie : Escherichia Coli [20].

Microscopie 4π

La microscopie 4π, développée par Stefan Hell en 1992 [21], est une technique basée sur l'utilisation combinée de deux objectifs de positionnement opposé comme illustré en Figure 1.4. La lumière cohérente issue d'une source laser est divisée en deux faisceaux qui sont ensuite indépendamment focalisés par les deux objectifs opposés. Des interférences constructives entre les deux faisceaux permettent de réduire la dimension longitudinale du volume de détection, avec une résolution 7 fois supérieure à celle obtenue avec un microscope confocal classique. Il existe deux types de microscopes 4π qui différent uniquement par les conditions de détection. Pour un microscope 4π de type A, l'illumination s'effectue en utilisant les deux objectifs et la détection à travers l'un des deux objectifs en mode confocal. En revanche pour le microscope 4π de type C, l'illumination et la détection sont effectuées de manière cohérente avec les deux objectifs. La mise en oeuvre des microscopes 4π reste toutefois très complexe notamment à cause des problèmes de dérives mécaniques qui nécessitent un repositionnement systématique des objectifs.

Microscopie STED : Stimulated Emission Depletion Microscopy

La microscopie STED est une approche assez différente des techniques de microscopie présentées jusqu'à présent, puisqu'elle utilise le principe de déplétion d'émission stimulée de la fluorescence pour diminuer la zone d'émission de fluorescence spontanée [22]. Dans un premier temps, l'excitation est effectuée par un faisceau continu focalisé avec des dimensions limitées par la diffraction (représenté par le faisceau vert sur la Figure 1.4). Un deuxième faisceau impulsionnel (picoseconde ou femtoseconde) STED (représenté par le faisceau rouge sur la Figure 1.4), proprement mis en forme, provoque alors l'émission stimulée à la périphérie du point de focalisation d'excitation. La zone d'émission spontanée de fluorescence est alors fortement réduite, permettant ainsi d'atteindre des résolutions optiques de quelques nanomètres. Cette technique a été utilisée pour l'étude de la dynamique des membranes lipidiques dans des cellules vivantes à des échelles sub-longueur d'onde et de manière non-invasive [23].

1.2.3 Méthodes optiques basées sur l'utilisation de structures photoniques

Nous allons introduire dans cette sous-section les différents types de structures photoniques pouvant être utilisées pour améliorer l'efficacité des techniques de détection de

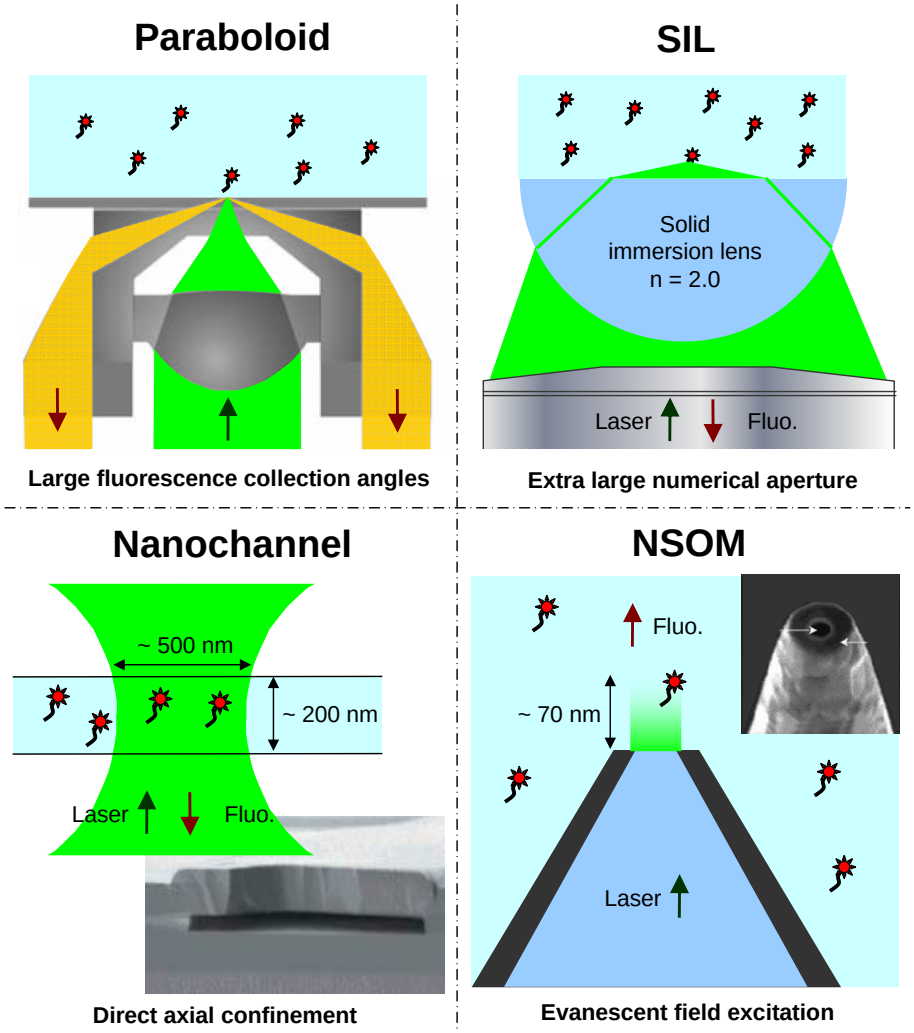


FIGURE 1.5 – *Structures photoniques utilisées pour l'amélioration des techniques de molécules individuelles [4].*

molécules individuelles.

Collecteur paraboloïque

Le principe de cette méthode est basé sur l'utilisation d'un collecteur parabolique pour remplacer l'objectif de microscope. Le collecteur parabolique est composé d'un segment de verre parabolique de révolution comme schématisé en Figure 1.5. Une des caractéristiques particulières de ce système est sa capacité à collecter la lumière au-delà de l'angle critique. Cela permet d'obtenir une efficacité de collection de la fluorescence supérieure à 65% de la lumière émise alors que les objectifs de forte ouverture numérique à immersion classiques ne permettent que d'en collecter 44%. De plus, le volume de détection peut être réduit d'un

facteur 10 comparé à un microscope confocal [24, 25]. Notons également que les collecteurs paraboloïques peuvent être très utiles pour les mesures de diffusion en FCS [26].

Lentilles à immersion solide SIL : Solid Immersion Lens

Le confinement du champ optique excitateur et l'efficacité de collection des photons de fluorescence sont directement liés à l'ouverture numérique de l'objectif de microscope utilisé. Ainsi, en utilisant une lentille à immersion solide (généralement constituée d'un matériau de haut indice de réfraction) placée au point de focalisation de l'objectif, il est possible d'augmenter l'ouverture numérique effective du système [27] comme illustré sur la Figure 1.5. Des expériences conduites en FCS ont montré un gain de 50% sur l'efficacité de collection et un fort confinement du champ électromagnétique en combinant un objectif à air d'ouverture numérique ON=0.6 et une lentille à immersion solide d'indice de réfraction de n =2, comparé à un montage de microscopie confocale conventionnel [28].

Canaux nano-fluidiques

Le développement des techniques de nano-fabrication permet à l'heure actuelle de réaliser des structures capablent de confiner les volumes d'analyses dans des dimensions sub-longueur d'onde, comme c'est le cas avec les nano-canaux fluidiques (Figure 1.5). En particulier, des nano-canaux fabriqués avec des dimensions inférieures au volume d'analyse confocal ont permis de conduire des mesures FCS dans des volumes d'une dizaine d'attolitres [29, 30]. Ces nano-canaux peuvent également être utilisés pour les dispositifs de détection optofluidiques, mais également pour le développement des systèmes FCS sur puces [31].

Microscope optique en champ proche NSOM : Near-Field Scanning Optical Microscope

La microscopie optique en champ proche NSOM est une technique qui permet d'atteindre des résolutions spatiales meilleures que les limites imposées par la diffraction. En effet, grâce à l'éclairement en champ proche (quand la distance entre l'objet et la source est très inférieure à la longueur d'onde), il devient possible de s'affranchir de la diffraction inhérente à tout système optique. La mesure du champ évanescent à l'arrière d'une interface en réflexion totale permet ainsi d'obtenir une image NSOM avec une résolution de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres [32]. Les microscopes NSOM sont en général utilisés avec une fibre optique monomode étirée recouverte en extremité par une mince couche métallique. Au sommet de cette pointe métallique , une ouverture de quelques nanomètres est gravée par faisceau d'ion focalisé comme représenté en Figure 1.5. La région d'illumination de l'échantillon, dans les directions transverse et axiale, dépend de la taille de l'ouverture. Des mesures FCS sur microscope NSOM ont permis de réduire d'un ordre de grandeur le volume d'analyse comparé à un microscope confocal classique [33].
Malgré l'intérêt que suscitent les méthodes optiques décrites dans les sous-sections 1.2.2

et 1.2.3, celles-ci demeurent toutefois insuffisantes pour améliorer très fortement la détection de molécules individuelles dans des volumes d'observation très inférieurs aux limites imposées par la diffraction optique avec des signaux moléculaires fortement exaltés. Pour contourner ces limites de manière plus efficace, il faut se tourner vers le domaine de la plasmonique et en particulier vers les nano-antennes optiques, qui permettent de confiner les champs électromagnétiques et de contrôler totalement les propriétés d'émission de molécules fluorescentes. Les effets physiques à l'origine des modifications des propriétés d'excitation et d'émission d'une molécule fluorescente au voisinage d'une nano-antenne optique vont à présent être décrits.

1.3 Modification des propriétés d'un émetteur au voisinage d'une nano-antenne optique

Comme indiqué dans la section 1.1, les propriétés d'émission d'une molécule fluorescente dépendent fortement de l'environnement local. En particulier, ces propriétés d'émission sont totalement modifiées au voisinage d'une nano-antenne par deux effets : une augmentation de la densité locale d'énergie électromagnétique et une modification de la directivité d'émission. Avant de détailler l'origine physique de ces phénomènes, commençons par introduire le concept de nano-antenne optique.

1.3.1 Concept de nano-antenne optique

Un des aspects les plus intéressants des sytèmes nanométriques est lié aux phénomènes collectifs dominant les propriétés de la matière, qui peuvent générer de fortes réponses à un faible stimuli. Dans le domaine des fréquences optiques, ces phénomènes sont exploités par le biais des nano-antennes optiques. Le concept d'antenne optique, par analogie aux micro-ondes, est un concept physique qui n'a été introduit que très récemment en optique [5]. Selon la définition de Lukas Novotny, une antenne optique est un système qui permet de convertir un rayonnement optique propagatif en espace libre en énergie localisée et réciproquement [6, 7]. Un schéma du principe de fonctionnement d'une antenne optique est présenté en Figure 1.6. Un récepteur ou transmetteur intéragit avec un rayonnement optique propagatif en espace libre via l'antenne. Le récepteur (respectivement transmetteur) est idéalement un émetteur quantique tel qu'un atome, une molécule, une boîte quantique ou encore un nano-cristal. La présence de l'antenne a pour effet de modifier les intéractions entre l'émetteur et le champ électromagnétique incident, permettant ainsi un contrôle des propriétés d'émission de systèmes quantiques uniques. Ce contrôle est rendu possible par les propriétés originales des métaux nano-structurés : les ondes de surface et plus particulièrement les plasmons de surface. Les plasmons de surface sont des oscillations collectives du plasma d'électrons générés par couplage avec un champ optique incident. De par leur nature evanescente, ces ondes de surface permettent de confiner et manipuler la lumière dans des volumes sub-longueur d'onde.

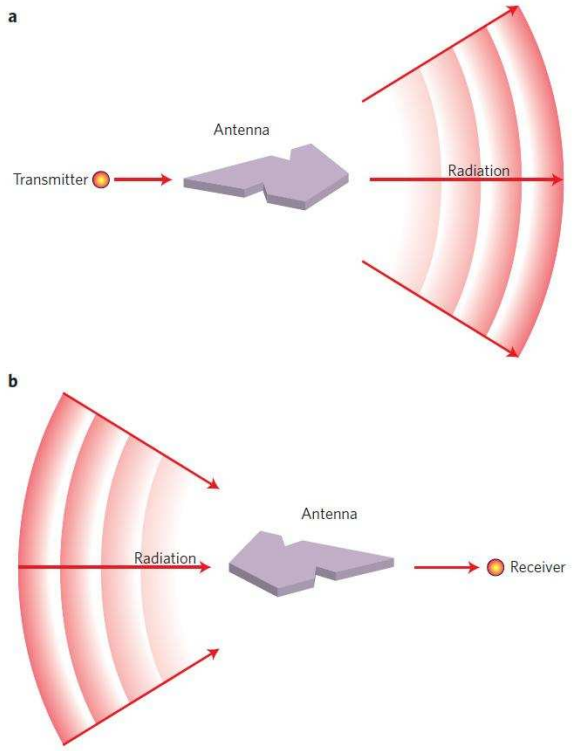


Figure 1.6 – *Schéma de principe du concept d'antenne en transmission (a) et en réception (b). Dans le domaine de la détection exaltée de molécules uniques, ces concepts sont combinés : l'antenne est à la fois utilisée en tant que récepteur et transmetteur [7].*

1.3.2 Introduction à la densité locale d'états photoniques (LDOS)

L'approche semi-classique de la description des modifications des processus de relaxation d'un émetteur induites par l'environnement local est suffisante pour en décrire les processus sous-jacents. De cette manière, le taux de désexcitation d'un émetteur quantique peut s'exprimer à l'aide la règle d'or de Fermi :

$$\Gamma = \Gamma_0 + \frac{4\pi^2\omega^2 A_0}{3c^2}\rho(\vec{r}_0, \omega). \tag{1.5}$$

où Γ et Γ_0 représentent respectivement l'élargissement des niveaux en présence d'une environnement et en espace libre. La constante A_0 est reliée au moment dipolaire de transition μ_{10} (transition entre l'état excité $|1\rangle$ et l'état fondamental $|0\rangle$) par la relation $A_0 = 2\mu_{10}^2/\hbar$, $\vec{r}_0$ représente la position de l'émetteur fluorescent, ω est la fréquence de transition et ρ est la densité locale d'états photoniques. La densité d'états photoniques est un concept fondamental pour l'étude des intéractions entre un émetteur et une nano-antenne métallique car elle contrôle la durée de vie des systèmes. Si on suppose que l'émetteur n'a pas d'axe

privilégié de transition, la densité locale d'états photoniques s'écrit :

$$\rho(\vec{r}_0, \omega) = \frac{\epsilon_0}{\pi k^2} \Im m\, Tr(\overleftrightarrow{G}(\vec{r}_0, \vec{r}_0, \omega)). \tag{1.6}$$

où $\overleftrightarrow{G}$ est la fonction de Green dyadique du système reliée au champs électrique $\vec{E}$ au point d'observation $\vec{r}$ généré par un dipole $\vec{p}$ localisé en $\vec{r}_0$ par la relation :

$$\vec{E}(\vec{r}) = \frac{1}{\epsilon_0} \frac{\omega^2}{c^2} \overleftrightarrow{G}(\vec{r}, \vec{r}_0, \omega)\vec{p}. \tag{1.7}$$

Ainsi, la fonction de Green de l'équation (1.6) est évaluée à la position $\vec{r}_0$ qui est la position de l'émetteur. Cela suggère le fait que la relaxation de l'état excité se produit en réponse au champ propre de l'émetteur. La durée de vie d'un émetteur étant inversement proportionelle à l'élargissement des niveaux Γ, celle-ci est également modulée par la fonction de Green dyadique du système dans lequel l'émetteur est avoisiné. Ces modifications de durée de vie sont directement liés aux intéractions de l'émetteur avec son propre champ rayonné qui est réfléchi par l'environnement local et rétroagit avec l'émetteur, comme observa Purcell en 1946 [34]. Cette rétroaction a également pour conséquence de modifier les niveaux d'énergie et les fréquences de transitions, mais ces effets sont très faibles comparés aux modifications de durée de vie.

1.3.3 Directivité et amplification de la densité locale d'énergie électromagnétique au voisinage d'une nanoantenne

Dans un problème classique, un antenne est introduite pour exalter l'efficacité de transmission du transmetteur vers le récepteur comme schématisé en Figure 1.7. Ce gain sur l'efficacité de transmission peut être obtenu en augmentant la quantité totale de rayonnement émis par le transmetteur, pour laquelle l'efficacité de l'antenne est une figure de mérite utile [7] :

$$\epsilon_{rad} = \frac{P_{rad}}{P} = \frac{P_{rad}}{P_{rad} + P_{nrad}}. \tag{1.8}$$

où P est la puissance totale dissipée par l'antenne, P_{rad} est la puissance rayonnée et P_{nrad} est la puissance dissipée par des voies non radiatiaves (comme l'absorption par exemple). L'efficacité de transmission peut également être amplifiée en utilisant les propriétés de directivité de l'antenne c'est à dire en dirigeant d'autant plus le rayonnement vers le recepteur :

$$D(\theta, \phi) = \frac{4\pi}{P_{rad}} p(\theta, \phi). \tag{1.9}$$

où $D(\theta, \phi)$ est le gain directif selon la direction d'observation (θ, ϕ) et $p(\theta, \phi)$ est la densité de puissance par unité d'angle (ou intensité en optique). La directivité D de l'antenne est une figure de mérite utile qui est définie comme la valeur maximale du gain directif :

$$D = \frac{4\pi}{P_{rad}} p_{max}. \tag{1.10}$$

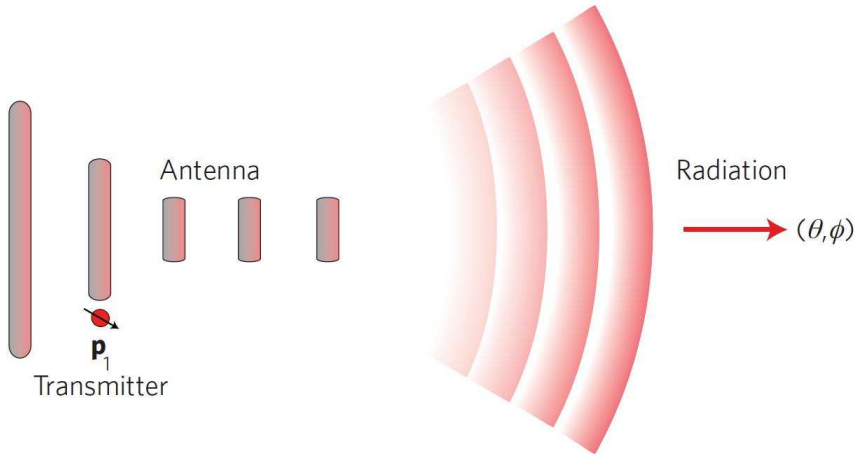


Figure 1.7 – *Exaltation de l'efficacité de transmission du transmetteur vers le récepteur par une antenne. Le transmetteur est modélisé par le dipôle p_1, et le récepteur par le dipôle p_2 [7].*

où p_{max} est la densité de puissance maximale. La combinaison de l'efficacité et de la directivité de l'antenne conduit au gain de l'antenne :

$$G = \frac{4\pi}{P} p_{max} = \epsilon_{rad} D. \tag{1.11}$$

En utilisant le théorème de réciprocité, on peut montrer que l'on peut interchanger les champs et les sources de la Figure 1.7 ce qui conduit à la relation $p_1 E_1 = p_2 E_2$ où E_1 (E_2) est le champ du dipôle p_1 (p_2) évalué à la position du dipôle p_2 (p_1). Dans le cas où le transmetteur est un émetteur quantique à deux niveaux (comme une molécule par exemple), le théorème de réciprocité conduit à une relation entre le taux d'excitation de l'émetteur Γ_{exc} et son taux d'émission radiatif Γ_{rad} [5] :

$$\frac{\Gamma_{exc,\theta}(\theta,\phi)}{\Gamma^0_{exc,\theta}(\theta,\phi)} = \frac{\Gamma_{rad}}{\Gamma^0_{rad}} \frac{D_\theta(\theta,\phi)}{D^0_\theta(\theta,\phi)} \tag{1.12}$$

où l'exposant "0" fait référence au cas en l'absence d'antenne et l'indice θ indique l'état de polarisation. Nous pouvons constater d'après l'équation 1.12 qu'une excitation dans une direction de forte directivité permet une exaltation du taux d'excitation supérieure à celle du taux démission radiatif.

L'avènement des nano-antennes optiques est très largement corrélé avec les avancés technologiques en matière de nanofabrication (faisceau d'ion focalisé, lithographie électronique, ...). Les antennes optiques trouvent leurs applications dans différents domaines de pointe : nanosources de lumière, photovoltaïque, microscopie, spectroscopie et biologie. Les processus physiques décrits dans les sous-sections 1.3.2 et 1.3.3 sont à l'origine des exaltations de fluorescence au voisinage de nano-antennes optiques. Les propriétés physiques des

nano-antennes dépendent essentiellement de leur nature, leurs tailles et leurs géométries. La caractérisation de ces nano-objets permet d'améliorer fortement le désign et d'amplifier les réponses électromagnétiques des antennes. Cette caractérisation s'avère toutefois être une tâche difficile car différents obstacles dans la détection et le contrôle des ces objets nanométriques peuvent être rencontrés. Pour ces raisons, nous avons développé 3 techniques de caractérisation expérimentale qui permettent de sonder les propriétés de nano-antennes. Avant d'introduire ces différentes techniques, nous allons donner un bref aperçu de l'état de l'art actuel dans le domaine des nano-antennes optiques.

1.4 Nano-antennes optiques appliquées à l'exaltation et au contrôle de la fluorescence moléculaire

Afin de positionner ce travail de thèse dans le contexte de la plasmonique, deux exemples expérimentaux marquants des avancées réalisées récemment dans le domaine des nano-antennes optiques vont être présentés.
Le premier exemple concerne les travaux du groupe de William Esco Moerner (Université de Stanford, USA) sur l'exaltation de fluorescence par des dimères de nano-triangles de sommets opposés (ou bowtie) en or. Dans un article publié dans Nature Photonics [8], le gain de fluorescence sur des fluorophores de type TPQDI de faible rendement quantique (Φ =0.025) a été mesuré en fonction de la distance entre les deux nano-triangles comme indiqué en Figure 1.8. Un facteur d'exaltation de fluorescence record de 1340 peut être observé pour un gap d'environ 10 nm entre les deux triangles. Ce gain record est directement lié au faible rendement quantique du fluorophore utilisé. A titre de comparaison, pour un rendement quantique $\Phi = 1$, l'exaltation de fluorescence mesurée se situerait autour d'un facteur 40. Le terme exaltation de fluorescence est donc à prendre avec précaution car l'exaltation de fluorescence dépend en grande partie de la sonde fluorescente utilisée. Notons également que le fait que les fluorophores soient gréffées sur le substrat n'est pas pas compatible avec les applications biologiques, où les molécules diffusent en solution. Ces travaux demeurent toutefois l'état de l'art actuel sur l'exaltation du signal de fluorescence d'un émetteur unique, ce qui permet d'améliorer très fortement le contraste et la détection de fluorescence.
Le deuxième exemple est le contrôle de la directivité d'un émetteur unique avec une nano-antenne de type Yagi-Uda (ou antenne rateau). Cette récente démonstration expérimentale représente une avancée majeure dans le domaine des antennes optiques, et plus généralement en physique fondamentale. La Yagi-Uda est une antenne des micro-ondes inventée peu avant la seconde guerre mondiale et qui a été très utilisée en télévision terrestre. Cette antenne a été récemment transposée dans le régime optique [9] par les groupes de Romain Quidant et Niek van Hulst (ICFO, Barcelone), avec des éléments de dimensions sub-longueur d'onde comme nous pouvons le constater sur les images de microscope électronique à balayage en Figure 1.9 (a). Une boîte quantique semi-conductrice a été greffée sur l'élement alimenté (feed) de cette nano-Yagi-Uda. Après illumination laser, la directi-

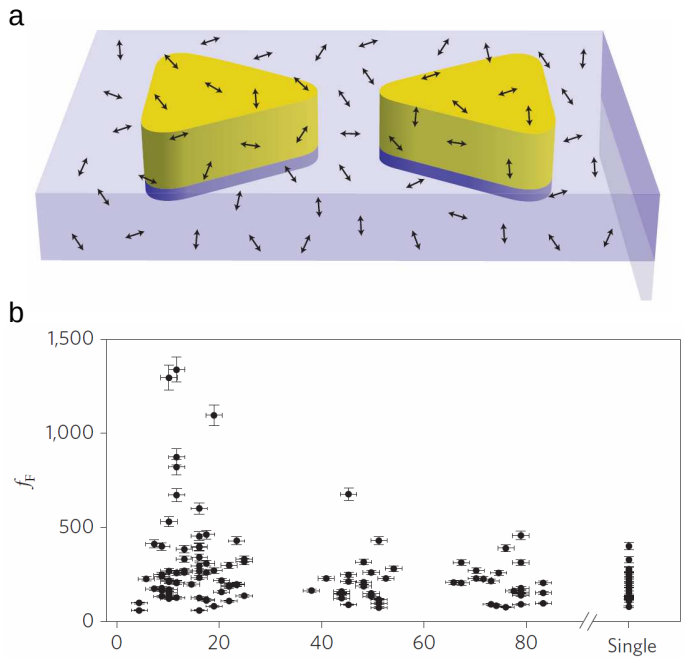


Figure 1.8 – *(a) Schéma des dimères de nanotriangles en or sur lesquels sont déposées des molécules de TPQDI dans du PMMA. (b) Exaltation f_F du signal de fluorescence des molécules de TPQDI en fonction de la distance entre les deux triangles [8].*

vité de l'émission est mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope. L'image du diagramme de rayonnement de la boîte quantique couplée à l'antenne Yagi-Uda et une représentation en coordonnées polaires sont disponibles en Figure 1.9 (b)-(c). Une émission directionelle centrée autour de 49.4° est mesurée, avec une demi-largeur à mi-hauteur de 12.5° selon la direction polaire θ et de 37° selon la direction azimutale φ. Le contrôle de la directivité de l'émission s'effectue préférentiellement dans la direction θ. Ces résultats constituent la première démonstration expérimentale du contrôle de la directivité d'un émetteur unique couplé à une nano-antenne optique multi-éléments.
Dans le cadre de ce travail de thèse, différentes antennes optiques ont été étudiées et caractérisées par des techniques d'analyse de dynamique temporelle de fluorescence : des microsphères diélectriques, des nano-ouvertures percées dans des films métalliques et des nano-ouvertures entourées par des sillons périodiques. Les différentes techniques utilisées pour sonder les propriétés de ces antennes sont : la spectroscopie de corrélation de fluorescence, l'étude de dynamique temporelle de boites quantiques semi-conductrices, et la spectroscopie sous saturation de fluorescence. Réciproquement, les nanoantennes optiques étudiées ont permis d'améliorer très efficacement ces techniques de spectroscopie de fluorescence. La première et principale méthode de sondage des antennes optiques, qui consiste à combiner des études FCS et des mesures de temps de vie de fluorescence, va être introduite dans le chapitre suivant.

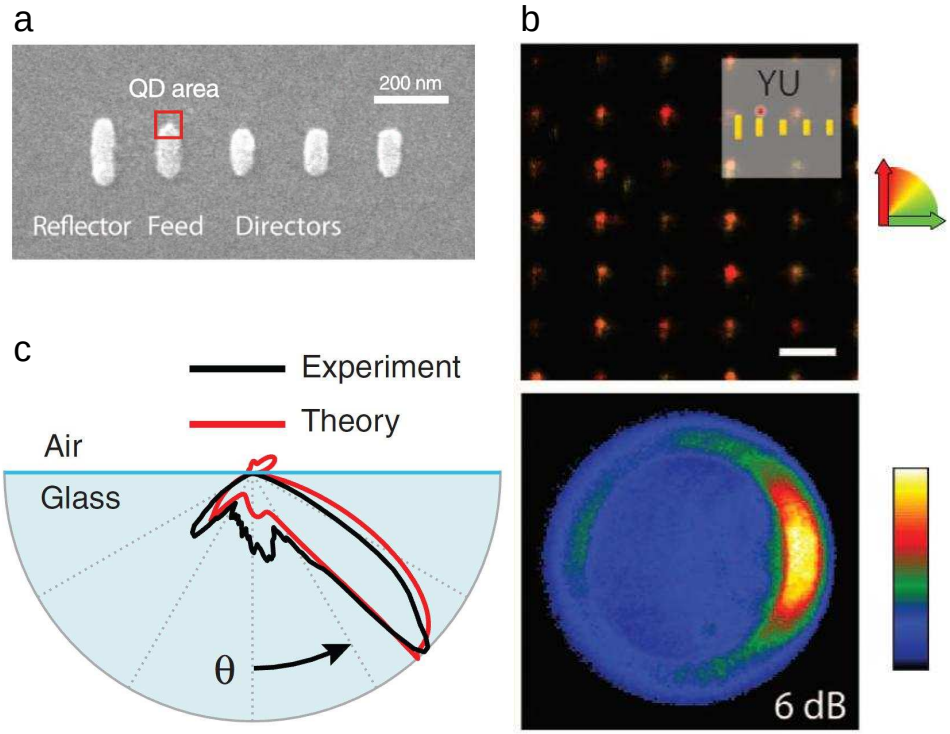


FIGURE 1.9 – *(a) Image de microscope à balayage de l'antenne Yagi-Uda composée de 5 élements : un élement alimenté (feed) un réflecteur et trois directeurs. (b) Image confocale en degré de polarisation et image dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope du diagramme de rayonnement de la boîte quantique combinée à la nano-Yagi-Uda et (c) représentation angulaire en fonction de l'angle polaire θ [9].*

CHAPITRE 2

Analyse de dynamique temporelle de fluorescence pour la caractérisation de nano-antennes

Nous avons vu dans le chapitre 1 que les propriétés d'émission de fluorescence moléculaire dépendent de l'environnement local. En particulier, l'émission de fluorescence d'une molécule peut être fortement exaltée à proximité d'une nanoantenne plasmonique. Cette exaltation de fluorescence trouve son origine physique dans les modifications de l'environnement électromagnétique dues à la présence de l'antenne et qui sont : l'amplification locale de l'intensité d'excitation, la modification du diagramme de rayonnement et l'augmentation du taux d'émission radiatif de l'émetteur. Ces modifications dépendent fortement des tailles, géométries et natures des nanoantennes étudiées. Pour cette raison, la caractérisation expérimentale complète des intéractions entre nano-objets et molécules fluorescentes, et plus généralement l'étude des interactions lumière-matière à l'échelle nanométrique, est un sujet de grand intérêt depuis plus d'une dizaine d'années [35, 36, 37, 38]. La détermination de l'influence des différentes modifications physiques créées par l'antenne s'avère toutefois être une tâche difficile car l'exaltation de fluorescence mesurée est une combinaison intriquée de gains sur l'intensité d'excitation et sur l'émission des molécules.
Dans ce chapitre, nous allons présenter la première et principale procédure expérimentale de caractérisation de fluorescence développée au sein de notre laboratoire, qui consiste à combiner des études de spectroscopie de corrélation de fluorescence et des mesures de temps de vie de fluorescence. Cette procédure permet de discriminer le poids relatif des gains à l'excitation et à l'émission contribuant à l'exaltation globale de fluorescence.

2.1 Principes de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

2.1.1 Introduction à la spectroscopie de corrélation de fluorescence

La capacité de suivre une réaction chimique à l'échelle d'une molécule unique donne accès à des informations habituellemment masquées dans des moyennes d'ensemble sur des milliers de molécules. Parmi les nombreuses techniques existantes basées sur le contraste de fluorescence, la spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS pour Fluorescence Correlation Spectroscopy), introduite en 1972 par Madge, Elson et Webb [1], est sans doute la technique la plus efficace pour réaliser des études moléculaires dans des milieux peu concentrés avec une grande résolution spatio-temporelle. Contrairement aux autres méthodes de fluorescence, le paramètre d'intérêt premier en FCS n'est pas l'intensité moyenne de fluorescence elle-même, mais plutôt les fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence. Ces fluctuations qui apparaissent majoritairement lors de la diffusion translationelle des molécules à travers le point focal d'excitation laser, fournissent des informations sur les coefficients de diffusion translationnelle ainsi que sur le nombre moyen de molécules présentes dans le volume d'observation. Cependant, la quantité d'informations disponibles en FCS ne se limite pas aux coefficients de diffusion et aux concentrations locales puisqu'une large gamme de processus, dont les temps caractéristiques s'étendent de quelques nanosecondes jusqu'à la seconde, peuvent être étudiés (brillance des molécules, vitesse d'association moléculaires, temps de vie des états triplet ...) comme indiqué sur la Figure 2.1. Si le montage initial de Madge nécessitait des temps d'intégration de plusieurs heures à cause du faible rapport signal à bruit, Koppel améliora très efficacement la technique FCS lorsqu'il l'implementa sur un montage de microscopie confocale [39].
Dans le cadre de ce travail de thèse, la FCS a été utilisée pour sa capacité à quantifier le nombre moyen de molécules diffusant dans un volume donné, ce qui permet d'accéder à un paramètre clef pour la procédure de caractérisation de fluorescence et qui est le taux de fluorescence par molécule. Nous allons à présent décrire les principes d'analyses des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence utilisés en FCS.

2.1.2 Analyse des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence

Comme brièvement indiqué dans la sous-section 2.1.1, le paramètre stochastique d'intérêt en FCS est la variation temporelle du signal de fluorescence $I(t)$. La plupart des expériences FCS sont mises en oeuvre sur des montages de microscopie confocale pour sonder le plus petit volume possible et maximiser le signal de fluorescence obtenu à partir d'une molécule individuelle. De cette manière, le volume de détection est défini par les dimensions du point focal d'excitation laser et par l'efficacité de collection du dispositif expérimental. Si on se place dans un régime linéaire d'excitation, l'intensité de fluorescence

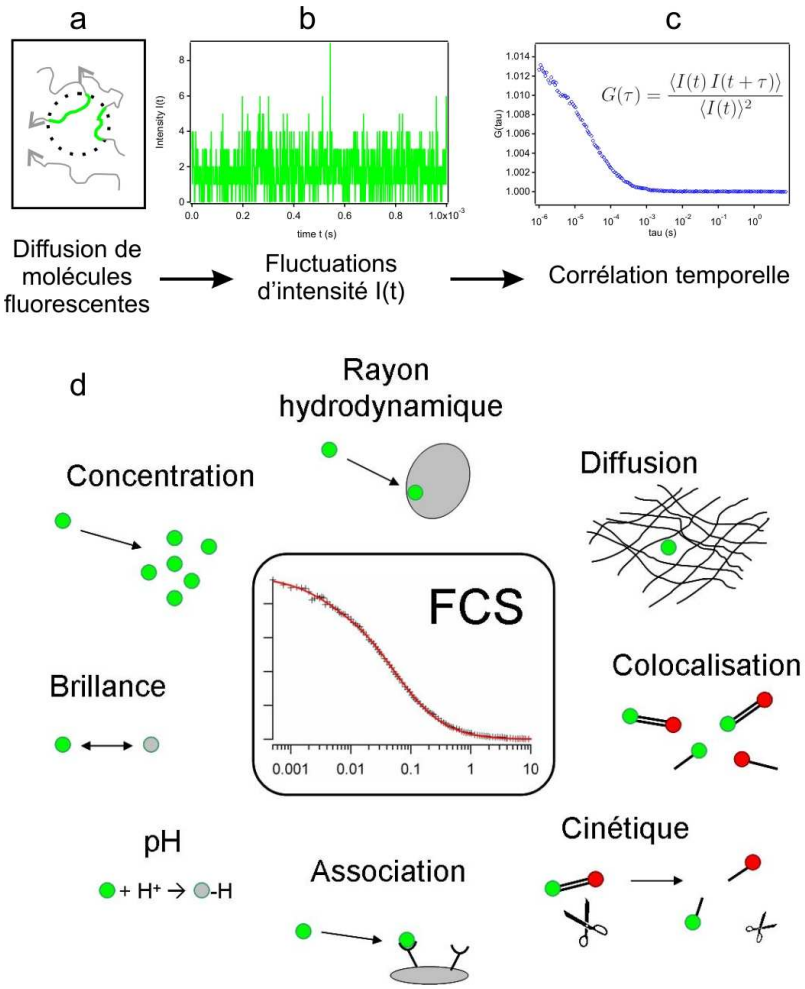


FIGURE 2.1 – *Schéma de principe de la spectroscopie de corrélation de fluorescence. Les fluctuations d'intensité dues à la diffusion des molécules (a) sont mesurées (b) puis corrélées (c) afin de permettre l'étude de divers processus (d).*

collectée est proportionnelle à l'intensité d'excitation du faisceau pompe I_{exc}, nous pouvons donc exprimer le photocourant $I(t)$ mesuré :

$$I(t) = \kappa \int I_{exc}(\vec{r})\; CEF(\vec{r})\; \sigma\; \Phi\; C(\vec{r}, t)\; d^3\vec{r}, \tag{2.1}$$

où : κ représente l'efficacité de collection du montage expérimental,

$I_{exc}(\vec{r})$ est la distribution spatiale de l'intensité d'excitation dans le plan focal objet du microscope,

$CEF(\vec{r})$ est la fonction d'efficacité de collection (sans dimension),

σ est la section efficace d'absorption du fluorophore,

Φ est le rendement quantique du fluorophore,

$C(\vec{r},t)$ est la concentration à l'instant t et à la position $\vec{r}$ de l'espèce fluorescente étudiée.

En regroupant le terme de distribution spatiale d'intensité $I_{exc}(\vec{r})$ et la fonction d'efficacité de collection $CEF(\vec{r})$, nous pouvons faire apparaitre la fonction d'efficacité de détection moléculaire $MDE(\vec{r})$ (MDE pour Molecular Detection Efficiency), définie par :

$$MDE(\vec{r}) = I_{exc}(\vec{r})\ CEF(\vec{r}). \tag{2.2}$$

L'équation (2.3) se réécrit alors comme :

$$I(t) = \kappa \int MDE(\vec{r})\ \sigma\ \Phi\ C(\vec{r},t)\ d^3\vec{r}, \tag{2.3}$$

En faisant l'hypothèse que la puissance d'excitation est constante, les fluctuations de photocourant $\delta I(t)$ sont données par la déviation par rapport à la moyenne temporelle du signal $I(t)$:

$$\delta I(t) = I(t) - \bar{I}, \tag{2.4}$$

Si les fluctuations de fluorescence sont uniquement liées aux changement de concentration locale $\delta C(\vec{r},t) = C(\vec{r},t) - \bar{C}$ à l'intérieur du volume d'observation, les variations de fluctuations de photocourant s'écrivent :

$$\delta I(t) = I(t) - \bar{I} = \kappa \int MDE(\vec{r})\ \sigma\ \Phi\ \delta C(\vec{r},t)\ d^3\vec{r}, \tag{2.5}$$

Nous allons maintenant introduire la fonction de corrélation de photocourant $G(\tau)$ qui compare la fluctuation de photocourant en $(\vec{r},t)$ avec la fluctuation en $(\vec{r'},t+\tau)$ et qui est définie par :

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \langle \delta I(t)\ \delta I(t+\tau) \rangle \\ &= (\kappa\ \sigma\ \Phi)^2 \int\int MDE(\vec{r})\ MDE(\vec{r'})\ \langle \delta C(\vec{r},t)\ \delta C(\vec{r'},t+\tau) \rangle\ d^3\vec{r}\ d^3\vec{r'}, \end{aligned} \tag{2.6}$$

où $\langle\ \rangle$ désigne une moyenne d'ensemble. Il est clair d'après l'équation (2.6) que les fluctuations temporelles de photocourant sont directement liées aux fluctuations de concentrations locales c'est à dire à la diffusion des molécules qui entrent et qui sortent du volume d'observation. La fonction de corrélation de concentration qui compare la fluctuation de concentration en $(\vec{r},t)$ avec la fluctuation en $(\vec{r'},t+\tau)$ est définie par :

$$\phi(\vec{r},\vec{r'},\tau) = \langle \delta C(\vec{r},t)\ \delta C(\vec{r'},t+\tau) \rangle, \tag{2.7}$$

La fonction de corrélation de concentration $\phi(\vec{r},\vec{r'},\tau)$ est indépendante du temps t car on considère un système stationnaire : les propriétés moyennes de $\phi(\vec{r},\vec{r'},\tau)$ sont donc indépendantes du temps t :

$$\phi(\vec{r},\vec{r'},\tau) = \langle \delta C(\vec{r},0)\ \delta C(\vec{r'},\tau) \rangle, \tag{2.8}$$

Si les fluctuations de concentrations $\delta C(\vec{r},t)$ et $\delta C(\vec{r'},t+\tau)$ sont corrélées, alors la fonction de correlation $\phi(\vec{r},\vec{r'},\tau) > 0$. En revanche, si les fluctuations de concentrations sont décorrélées, on a $\phi(\vec{r},\vec{r'},\tau) = 0$. En particulier, si le délai τ tend vers l'infini, c'est à dire pour des intervalles de temps longs comparé au temps de diffusion noté τ_D (qui est le temps moyen de séjour d'une molécule dans le volume de détection), les fluctuations de concentrations ne sont plus corrélées et donc :

$$\lim_{\tau\to+\infty} \phi(\vec{r},\vec{r'},\tau) = 0. \tag{2.9}$$

La variation de ϕ en fonction de τ est une indication de la dynamique du système. Pour un délai temporel τ très petit devant le temps de diffusion τ_D, la fonction de corrélation $\phi(\vec{r},\vec{r'},\tau \ll \tau_D) = \phi(\vec{r},\vec{r'},0)$ ne dépend que des propriétés du système à l'état d'équilibre car chaque fluorophore ayant une position bien déterminée, il ne peut y avoir de corrélation que si et seulement si $\vec{r} = \vec{r'}$. Cela se traduit d'un point de vue mathématique par :

$$\phi(\vec{r},\vec{r'},0) = \langle \delta C^2 \rangle \; \delta(\vec{r} - \vec{r'}), \tag{2.10}$$

où δ est la distribution de Dirac. Pour une solution de fluorophores fortement diluée, la distribution de molécules qui diffusent dans le volume de détection obéit à une statistique de Poisson et donc pour un position et un temps donné, on peut écrire $\langle \delta C^2 \rangle = \bar{C}$, $\bar{C}$ étant la moyenne spatio-temporelle de la concentration moléculaire de l'espèce fluorescente étudiée. L'équation précedente se réecrit alors comme :

$$\phi(\vec{r},\vec{r'},0) = \bar{C} \; \delta(\vec{r} - \vec{r'}), \tag{2.11}$$

Si l'on considère que les variations de concentration dans le volume de détection sont uniquement dues à la diffusion des molécules, les fluctuations de concentrations $\delta C(\vec{r},t)$ obéissent à l'équation classique de diffusion :

$$\frac{\partial C(\vec{r},t)}{\partial t} = \frac{\partial \delta C(\vec{r},t)}{\partial t} = D\nabla^2 \delta C(\vec{r},t). \tag{2.12}$$

où D est le coefficient de diffusion de l'espèce moléculaire étudiée.
Les conditions aux limites pour les fluctuations de concentrations décrites par Elson et Madge [40] imposent :

$$\delta C(\vec{r},t) \;=\; 0 \quad \text{pour } x, y = \pm\infty \;\text{ ou }\; z = +\infty. \tag{2.13}$$

La résolution de l'équation différentielle 2.12 conduit à l'expression suivante pour la fonction de corrélation des fluctuations de concentration [41] :

$$\phi(\vec{r},\vec{r'},\tau) = \frac{\bar{C}}{(4\pi D\tau)^{n/2}} \exp\left(-\frac{\mid \vec{r} - \vec{r'} \mid^2}{4D\tau}\right). \tag{2.14}$$

où D est le coefficient de diffusion et n est le nombre de dimensions accessibles pour la diffusion de l'espèce moléculaire considérée avec :

$$n = \begin{cases} 1 \;\text{ si } \vec{r} = (x), & \text{diffusion 1D} \\ 2 \;\text{ si } \vec{r} = (x,y), & \text{diffusion 2D} \\ 3 \;\text{ si } \vec{r} = (x,y,z), & \text{diffusion 3D} \end{cases}$$

Introduisons à présent la fonction d'autocorrélation normalisée des fluctuations de photocourant $g^2(\tau)$:

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)\ I(t+\tau)\rangle}{\langle I(t)\rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta I(t)\ \delta I(t+\tau)\rangle}{\langle I(t)\rangle^2} = 1 + \frac{G(\tau)}{\langle I(t)\rangle^2}, \tag{2.15}$$

On définit la partie subunitaire de la fonction d'autocorrélation normalisée des fluctuations de photocourant $\gamma(\tau)$ par :

$$\gamma(\tau) = \frac{G(\tau)}{\langle I(t)\rangle^2}, \tag{2.16}$$

Cela permet de réduire l'expression de $g^2(\tau)$ à :

$$g^2(\tau) = 1 + \gamma(\tau). \tag{2.17}$$

Les fluctuations de photocourant étant directement liés aux fluctuations de concentrations, elles sont également décorrélées pour des délais τ très grand devant le temps de diffusion τ_D, d'où :

$$\lim_{\tau \to +\infty} g^{(2)}(\tau) = 1. \tag{2.18}$$

D'autre part, si nous supposons l'ergodicité du photocourant $I(t)$, nous avons $\langle I(t)\rangle = \bar{I}$, d'òu :

$$\langle I(t)\rangle = \bar{I} = (\kappa\ \sigma\ \Phi)\ \bar{C} \int MDE(\vec{r})\ d^3\vec{r}. \tag{2.19}$$

Enfin en utilisant l'equation (2.10), la fonction d'autocorrélation normalisée du photocourant $g^{(2)}$ s'écrit pour $\tau = 0$:

$$g^{(2)}(0) = 1 + \frac{\langle \delta I(t)^2\rangle}{\langle I(t)\rangle^2} = 1 + \frac{(\kappa\ \sigma\ \Phi)^2\ \bar{C} \int [MDE(\vec{r})]^2\ d^3\vec{r}}{(\kappa\ \sigma\ \Phi)^2\ \bar{C}^2 \left[\int MDE(\vec{r})\ d^3\vec{r}\right]^2} = 1 + \frac{1}{\bar{C}\ V_{eff}}, \tag{2.20}$$

où V_{eff} est le volume effectif d'analyse FCS défini par le profil de MDE [42] :

$$V_{eff} = \frac{\left[\int MDE(\vec{r})\ d^3\vec{r}\right]^2}{\int \left[MDE(\vec{r})\right]^2\ d^3\vec{r}}. \tag{2.21}$$

Le nombre moyen de molécules N dans le volume de détection est donnée par $N = \bar{C}V_{eff}$ et l'équation (2.20) se réécrit :

$$g^{(2)}(0) = 1 + \frac{1}{N}. \tag{2.22}$$

L'amplitude de la fonction $g^{(2)}$ au délai $\tau = 0$ est donc inversement proportionnelle au nombre moyen de molécules fluorescentes N dans le volume de détection. La quantification

du nombre de molécules permet d'accéder au taux de comptage par molécule CRM qui est le nombre de photons émis par molécule par seconde : $CRM = \bar{I}/N$, avec $\bar{I}$ le signal moyen de fluorescence. Le taux de comptage par molécule est un paramètre très important en FCS (car directement lié au rapport signal sur bruit comme nous le verrons dans la sous-section 2.1.6) et dans la procédure de caractérisation expérimentale de l'exaltation de fluorescence développée.

2.1.3 Expression de la fonction d'autocorrélation temporelle $g^{(2)}(\tau)$ correspondant à une diffusion Brownienne 3D

En introduisant dans l'équation (2.15), l'expression correspondante de la fonction de corrélation des fluctuations de concentration $\phi(\vec{r}, \vec{r'}, \tau)$ de l'équation 2.14, il vient :

$$g^2(\tau) = 1 + \frac{1}{\bar{C}(4\pi D\tau)^{3/2}} \frac{\int MDE(\vec{r})\, MDE(\vec{r'}) \exp(-\frac{\mid \vec{r} - \vec{r'} \mid^2}{4D\tau}) d^3\vec{r}\, d^3\vec{r'}}{\left[\int MDE(\vec{r}) d^3\vec{r}\right]^2}, \tag{2.23}$$

On considère en général que la MDE a un profil transversal Gaussien dans les expériences FCS en configuration de microscopie confocale [42] :

$$MDE(\vec{r}) = M_0\ \exp\left(-2\frac{x^2+y^2}{\omega_{x,y}^2}\right)\ \exp\left(-2\frac{z^2}{\omega_z^2}\right). \tag{2.24}$$

On en déduit l'expression analytique du volume de détection V_{eff} à partir de l'équation (2.21) :

$$V_{eff} = \frac{\left[\int \exp\left(-2\frac{x^2+y^2}{\omega_{x,y}^2}\right)\ \exp\left(-2\frac{z^2}{\omega_z^2}\right)\ d^3\vec{r}\right]^2}{\int \exp\left(-4\frac{x^2+y^2}{\omega_{x,y}^2}\right)\ \exp\left(-4\frac{z^2}{\omega_z^2}\right)\ d^3\vec{r}} = \pi^{3/2}\ \omega_{x,y}^2\ \omega_z. \tag{2.25}$$

Le temps de diffusion latéral τ_D dans le volume confocal étant défini par $\tau_D = \omega_{x,y}^2/4D$ et en introduisant le paramètre de structure $s = \omega_{x,y}/\omega_z$, la fonction d'autocorrélation normalisée $g^{(2)}(\tau)$ s'écrit :

$$g^2(\tau) = 1 + \frac{1}{N}\frac{1}{1+\frac{\tau}{\tau_D}}\frac{1}{\sqrt{1+s^2\frac{\tau}{\tau_D}}}. \tag{2.26}$$

2.1.4 Aspects photophysiques des mesures FCS

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'émission de fluorescence du niveau S_1 est en compétition directe avec les voies de relaxation non radiatives. En particulier, le passage

de la molécule de l'état singulet S_1 vers l'état triplet T_1 peut s'avérer être un processus non négligeable au cous d'une mesure FCS. En effet, pour les sondes fluorescentes standard utilisés en FCS, la durée de vie de l'état triplet T_1 est en moyenne de quelques microsecondes ce qui est un temps plus court que la durée moyenne de séjour d'une molécule dans le volume confocal (qui est de l'ordre d'une centaine microsecondes pour les fluorophores utilisés au cours de cette thèse). En d'autre terme, la molécule peut se retrouver plusieurs fois dans un état noir durant sa diffusion. Ceci a pour conséquence directe d'engendrer des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence supplémentaires qui ne sont pas dues a la diffusion des molécules mais aux propriétés photophysiques de celles-ci. Pour en tenir compte dans les analyses FCS, il faut introduire dans la partie sub-unitaire $\gamma(\tau)$ de le fonction d'autocorrélation normalisée $g^2(\tau)$, une fonction qui dépend des propriétes photophysiques des molécules. Le processus de corrélation permettant de séparer les temps caractéristiques de diffusion et de photophysique, l'équation (2.17) peut se réécrire de la manière suivante :

$$g^2(\tau) = 1 + \gamma_D(\tau)\, T(\tau) = 1 + \gamma_D(\tau)\, \frac{P_1(\tau)}{\bar{P}_1} \tag{2.27}$$

avec $\gamma_D(\tau)$ la partie sub-unitaire effective de diffusion de la fonction d'autocorrélation normalisée $g^2(\tau)$ et $T(\tau)$ une fonction dépendant des propriétés photophysiques des molécules. La fonction $T(\tau)$ est définie comme le rapport entre la probabilité $P_1(t)$ qu'une molécule soit dans l'état excité singulet S_1 à l'instant t et la moyenne temporelle $\bar{P}_1$ de probabilité qu'une molécule dans le volume confocal soit dans l'état S_1.
Dans le cas d'un modèle classique d'un système à 3 niveaux (deux états singulets S_0 et S_1, et un état triplet T_1), il est possible de calculer l'évolution temporelle $P_1(t)$ en résolvant le système d'équation d'évolution de populations des niveaux électroniques. On montre alors que [48] :

$$g^2(\tau) = 1 + \gamma_D(\tau)\, (1 + n_T \exp(-\frac{\tau}{\tau_T})). \tag{2.28}$$

avec n_T l'amplitude de l'état noir, τ_T le temps de vie de l'état noir. On peut constater que la valeur de la fonction d'autocorrélation temporelle $g^2(\tau)$ est modifiée à l'origine comparée à l'équation (2.22), puisqu'à présent $g^2(0) = 1+(1+n_T)/N$. Le terme $(1+n_T)/N$ correspond à l'inverse du nombre de molécules émettant des photons de fluorescence N_{fluo}, nous avons donc $N_{fluo} = N/(1+n_T)$. En désignant par F_T la fraction de molécules dans l'état triplet, il vient : $N_T = 1 - N_{fluo}/N$, où N est le nombre de molécules total dans le volume confocal, d'où :

$$F_T = 1 - \frac{N_{fluo}}{N} = 1 - \frac{1}{1+n_T} = \frac{n_T}{1+n_T}. \tag{2.29}$$

L'amplitude de l'état triplet n_T vaut donc :

$$n_T = \frac{F_T}{1-F_T}. \tag{2.30}$$

2.1.5 Facteur de correction pour le bruit de fond

L'intensité du photocourant mesuré par un détecteur est proportionnelle au photocourant du signal d'intérêt $i_0(t)$ auquel vient s'ajouter la contribution du photocourant d'un bruit de fond $b(t)$. Le signal $i(t)$ mesuré par le détecteur s'écrit donc : $i(t) = i_0(t) + b(t)$. Si on suppose que le bruit de fond est aléatoire, il n'y a pas de corrélation entre un bruit $b(t)$ à l'instant t et bruit $b(t+\tau)$ à l'instant $t+\tau$, ni entre $i_0(t)$ et $b(t)$. En désignant par $g_0^2(\tau)$ et $g^2(\tau)$ les fonctions d'autocorrélation respectivement en l'absence et en présence de bruit, on a :

$$\begin{aligned}
g^2(\tau) &= 1 + \frac{\langle(\delta i_0(t) + \delta b(t))(\delta i_0(t+\tau) + \delta b(t+\tau))\rangle}{\langle i(t)\rangle^2}, \\
g^2(\tau) &= 1 + \frac{\langle(\delta i_0(t))(\delta i_0(t+\tau))\rangle}{\langle i(t)\rangle^2}, \\
g^2(\tau) &= 1 + \left(\frac{\langle i_0(t)\rangle}{\langle i(t)\rangle}\right)^2 \gamma(\tau), \\
g^2(\tau) &= 1 + \left(1 - \frac{\langle b(t)\rangle}{\langle i(t)\rangle}\right)^2 \gamma(\tau).
\end{aligned} \tag{2.31}$$

Le bruit affecte donc uniquement l'amplitude de la fonction d'autocorrélation c'est à dire l'estimation du nombre de molécules dans le volume confocal (qui est de ce fait ce fait surestimé si on ne tient pas compte du bruit dans l'analyse des données FCS). En revanche, les temps caractéristiques (diffusion et photophysique) ne sont pas affectés par la correction du bruit de fond.
En tenant compte des aspetcs photophysique et du bruit de fond, la fonction d'autocorrélation des fluctuations temporelles du signal de fluorescence $g^2(\tau)$ prend la forme suivante :

$$g^2(\tau) = 1 + \left(1 - \frac{\bar{B}}{\bar{I}}\right)^2 (1 + n_T \exp(-\frac{\tau}{\tau_T}))\frac{1}{N}\frac{1}{1+\frac{\tau}{\tau_D}}\frac{1}{\sqrt{1+s^2\frac{\tau}{\tau_D}}}. \tag{2.32}$$

avec $\bar{B}$, le bruit de fond moyen. Le taux de comptage par molécule se réecrit en tenant compte du bruit de fond comme : $CRM = (\bar{I} - \bar{B})/N$.
Un exemple type de courbe d'autocorrélation (ou corrélogramme) obtenu au cours d'une mesure FCS en solution pour des molécules d'Alexa 647 est présenté en Figure (2.2). L'épaulement au temps court (typiquement autour de 2 μs pour l'Alexa 647) correspond aux fluctuations de fluorescence dues au peuplement / dépeuplement de l'état noir (photophysique), alors que le phénomène de diffusion des molécules est caractérisé par des temps plus longs (autour de 100 μs pour l'Alexa 647).

2.1.6 Rapport signal sur bruit en FCS

Le bruit et la précision statistique sont des paramètres importants dont il faut tenir compte au cours d'une mesure FCS. En effet, d'une part, l'identification des sources de bruit

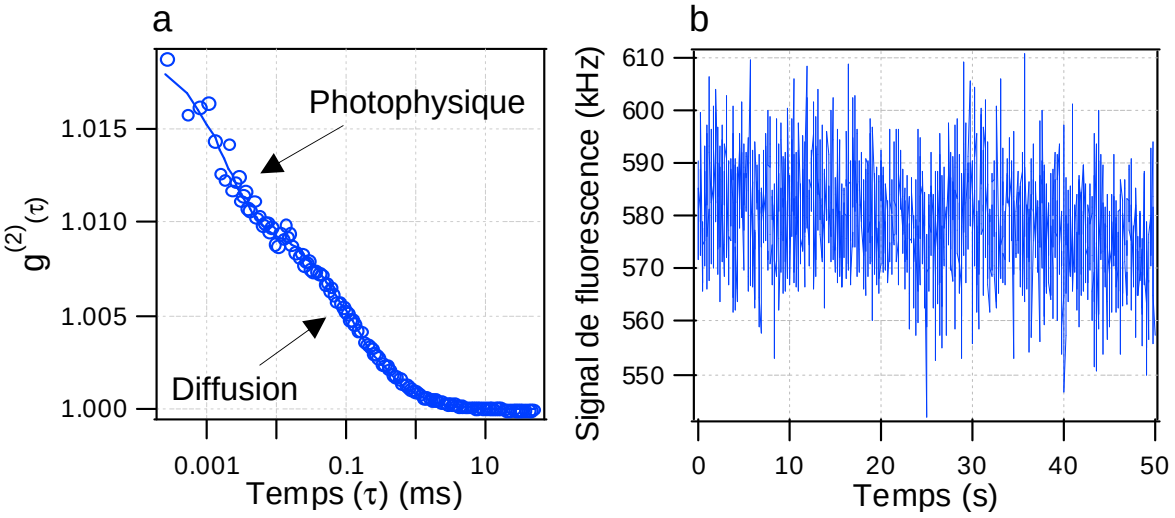


Figure 2.2 – *(a) Corrélogramme obtenue pour des molécules d'Alexa 647 diffusants en solution aqueuse pour une puissance d'excitation P=70 μW à 633 nm. Les cercles représentent les points expérimentaux et la ligne en trait plein est l'analyse des données expérimentales selon l'équation (2.32) qui a conduit aux valeurs suivantes : N =98.7, τ_D =109 μs, s =0.2, n_T =0.89, τ_T =1.8 μs, et CRM =5.9 kHz. (b) Trace temporelle du signal de fluorescence correspondant à (a).*

permet d'optimiser les expériences FCS. D'autre part, les procédures de pondération fondées sur des estimations statistiques pour le bruit permettent des analyses plus précises. La compréhension du rapport signal sur bruit SNR (SNR pour Signal to Noise Ratio) en FCS a fait l'objet de nombreux travaux depuis la contribution de Koppel en 1974 [43, 44, 45, 46] qui démontra que le rapport SNR ne dépend pas du signal total de fluorescence $I(t)$, mais du taux de comptage par molécule CRM multiplié par la racine carré du temps d'intégration T_{tot} et de l'intervalle de comptage $\Delta\tau$ du corrélateur : $SNR \propto CRM\sqrt{T_{tot}\,\Delta\tau}$. Dans les conditions expérimentales d'une MDE à profil transversal Gaussien, d'une diffusion Brownienne 3D, d'un bruit négligeable, et d'un intervalle de comptage petit, la formule de Koppel-Qian-Wenger s'écrit [47] :

$$\mathrm{SNR}_{\Delta\tau\to 0} \simeq \frac{CRM\,\sqrt{T_{tot}\,\Delta\tau}}{(1+1/N)^{1/2}}. \tag{2.33}$$

Pour améliorer le rapport SNR en FCS, on peut soit choisir d'augmenter la puissance d'excitation pour obtenir des taux de comptage par molécule CRM plus importants, soit augmenter le temps d'intégration T_{tot}. Ces deux alternatives sont toutefois assez limitées. En effet, à cause des phénomènes de saturation et de photoblanchiment, l'intensité de fluorescence et donc le taux de comptage par molécule ne peuvent pas être amplifiés au delà d'un certain seuil. D'autre part, augmenter le temps d'intégration T_{tot} d'une centaine

de secondes n'a qu'une influence mineure sur le rapport SNR car celui-ci dépend de la racine carré du temps d'intégration T_{tot}.

2.1.7 Extension de la FCS au cas de l'analyse à deux espèces : Dual-Color FCCS

La spectroscopie par corrélation croisée de fluorescence à deux couleurs Dual-Color FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) est une extension de la méthode FCS standard qui fournit des informations sur les paramètres d'associations moléculaires tels que les concentrations locales, la diffusion, les cinétiques d'association-dissociation et les activités enzmatiques. Au cours d'une expérience de Dual-Color FCCS, les espèces moléculaires d'intérêts sont marquées avec des fluorophores dont les bandes d'emission sont spectralement disjointes. L'excitation s'effectue en général à l'aide de deux lasers continus ou d'un laser pulsé car les bandes d'absorption des fluorophores sont également disjointes. Après excitation, les signaux de chaque fluorophore sont détectés et analysés par corrélation croisée afin d'obtenir des informations sur l'efficacité d'association et de colocalisation. L'expression générale de la fonction de corrélation croisée pour deux espèces i et j est donnée par $g^2_{i,j}(\tau) = \langle I_i(t)\ I_j(t+\tau)\rangle / \langle I_i(t)\ I_j(t)\rangle$, avec $I_i(t)$ et $I_j(t)$ le signal de fluorescence respectivement des espèces i et j.
Dans le cas d'une MDE décrite par un profil Gaussien et pour une diffusion Brownienne 3D des espèces moléculaires considérés, la fonction de corrélation croisée s'écrit :

$$g^2_{i,j}(\tau) = 1 + \frac{C_{i,j} Diff_{i,j}(\tau)}{V_{eff} C_i C_j}. \tag{2.34}$$

où C_i et C_j sont les concentrations respectives des espèces i et j, $C_{i,j}$ est la concentration des complexes marqués simultanément par les espèces i et j et $Diff_{i,j}$ est défini comme :

$$Diff_{i,j}(\tau) = \left(1 + n_{T_{i,j}} \exp(-\frac{\tau}{\tau_{T_{i,j}}})\right) \left(1 - \frac{\bar{B}_{i,j}}{\bar{I}_{i,j}}\right)^2 \frac{1}{(1+\frac{\tau}{\tau_{D_{i,j}}})\sqrt{1+s^2_{i,j}\frac{\tau}{\tau_{D_{i,j}}}}}. \tag{2.35}$$

où $n_{T_{i,j}}$ et $\tau_{T_{i,j}}$ désigne respectivement l'amplitude et le temps caractéristique de l'état noir du complexe formé par les espèces i et j, $\bar{I}_{i,j}$ est l'intensité moyenne totale, $\bar{B}_{i,j}$ est le bruit de fond moyen et $\tau_{D_{i,j}}$ est le temps de diffusion du complexe.

2.2 Mesures de temps de vie de fluorescence par TCSPC

2.2.1 Historique

La durée de vie de l'état excité S_1 pour des fluorophores standard est généralement comprise entre plusieurs centaines de picosecondes et quelques nanosecondes. De ce fait, les techniques de mesures de durée de vie de fluorescence ne se sont véritablement développées

qu'avec l'apparition des détecteurs sensibles et ultra-rapides, et l'avènement des sources lasers adaptées. Les premières mesures de temps de vie de fluorescence ont été réalisées dans le domaine fréquentiel par des méthodes de modulation de phase, les méthodes de mesures résolues en temps étant apparues bien plus tard. Pour les mesures dans le domaine fréquentiel, l'échantillon est excité avec une lumière d'intensité modulée (généralement en utilisant une modulation sinusoïdale avec une fréquence d'une centaine de MHz qui est comparable à l'inverse du temps de vie des états excités des molécules). Cette modulation de l'intensité excitatrice incidente impose une modulation du signal de fluorescence des molécules de l'échantillon étudié à la même fréquence. Cependant, le temps de vie de fluorescence a pour conséquence directe un retard temporel de l'émission fluorescence par rapport à l'excitation. Ce décalage temporel, qui est mesuré expérimentalement comme un décalage de phase, permet d'accéder au temps de vie de fluorescence [48].
Les mesures de temps de vie de fluorescence s'effectuent principalement à l'heure actuelle avec des techniques résolues en temps ce qui permet des mesures ponctuelles extrêmement rapides , à l'origine du développement du contraste d'imagerie FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy).

2.2.2 Principe et mesures de temps de vie de fluorescence

La majeure partie des mesures de temps de vie de fluorescence s'opère à l'heure actuelle dans le domaine temporel, comme ce fut le cas au cours de cette thèse. L'excitation d'une solution de molécules s'effectue avec une source laser impulsionnelle dont la durée d'impulsion est inférieure au temps de vie du niveau excité que l'on cherche à mesurer. À la suite de cette excitation impulsionnelle, l'intensité de fluorescence $I(t)$ est proportionelle à tout instant, à la concentration instantannée de molécules encore excitées N^* :

$$I(t) = k_r^S \; N^* = k_r^S \; N_0^* \exp(-\frac{t}{\tau_S}). \tag{2.36}$$

Ainsi, la réponse impulsionnelle $I(t)$ décroit de façon monoexponentielle. En supposant l'ergodicité du système (c'est à dire que la moyenne statistique d'ensemble est égale à la moyenne temporelle), le temps de vie de l'état excité S_1 peut être mesuré en utilisant un système de comptage de photons uniques corrélés dans le temps (TCSPC pour Time-Correlated Single-Photon Counting). Ce système est basé sur une électronique de type Start and Stop, c'est à dire que l'on va mesurer le temps écoulé entre l'excitation et le premier photon de fluorescence détecté. En répétant cette mesure suffisamment de fois, on obtient un histogramme du nombres de photons détectés en fonction du temps, comme schématisé sur la Figure (2.3). Une fois l'histogramme obtenu, les données sont traitées à l'aide d'une procédure qui tient compte de la limite de résolution de l'appareil. L'analyse de la fonction de réponse de l'appareil (IRF pour Instrument Fonction Response), dont le résultat est présenté en Figure 2.4, a conduit à une décroissance temporelle du type bi-exponentielle : $IRF(t) \propto A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)$ avec $A_1 = 0.516$, $A_2 = 0.484$, $k_1 = 5.710^9$ s^{-1} et $k_2 = 20.710^9$ s^{-1}. Le signal $D(t)$ en sortie du module TCSPC correspond à la convolution de la réponse de l'appareil avec la décroissance moyenne du signal de fluorescence qui est

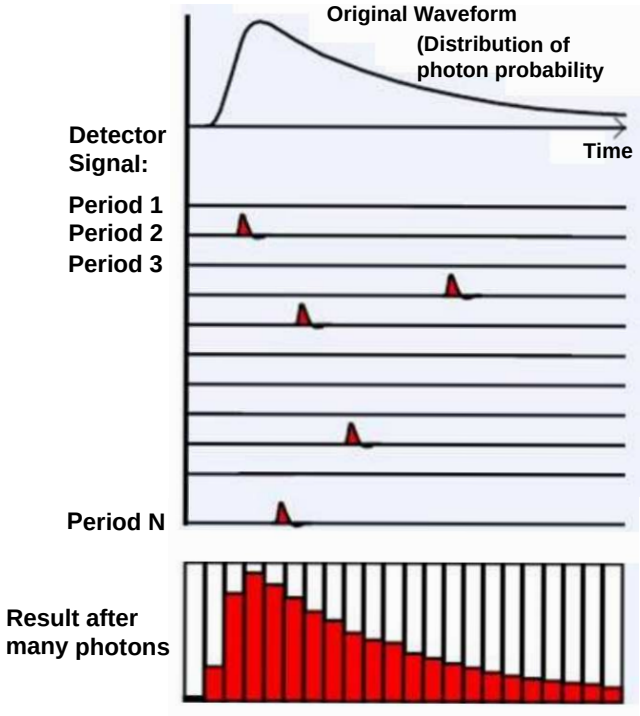


FIGURE 2.3 – *Principe des mesures de temps de vie de fluorescence par TCSPC. En mesurant le temps écoulé entre l'excitation et le premier photon de fluorescence détecté, il est possible de construire un histogramme du nombre de photons détectés en fonction du temps à partir duquel on peut extraire l'information de temps de vie de fluorescence.*

supposée de type mono-exponetielle. La convolution entre la fonction IRF et le déclin de temps de vie de fluorescence est donc de la forme tri-exponentielle :

$$\begin{aligned} D(t) \propto & \left(\frac{A_1}{k_1 - k_{tot}} + \frac{A_2}{k_2 - k_{tot}}\right) \exp(-k_{tot}t) \\ & - \frac{A_1}{k_1 - k_{tot}} \exp(-k_1 t) - \frac{A_2}{k_2 - k_{tot}} \exp(-k_2 t). \end{aligned} \tag{2.37}$$

où k_{tot} est la constante de vitesse de désexcitation totale du niveau excité S_1, et A_1, A_2, k_1 et k_2 sont des paramètres fixes obtenus par l'analyse de l'IRF décrite précédemment.

2.3 Dispositif expérimental

Le montage expérimental est basé sur le principe d'un microscope inversé (Zeiss Axiovert 35M) comme illustré en Figure 2.5. Lors des mesures FCS, l'excitation s'effectue avec un laser HeNe continu à une longueur d'onde de 633 nm. Pour les mesures de temps de vie

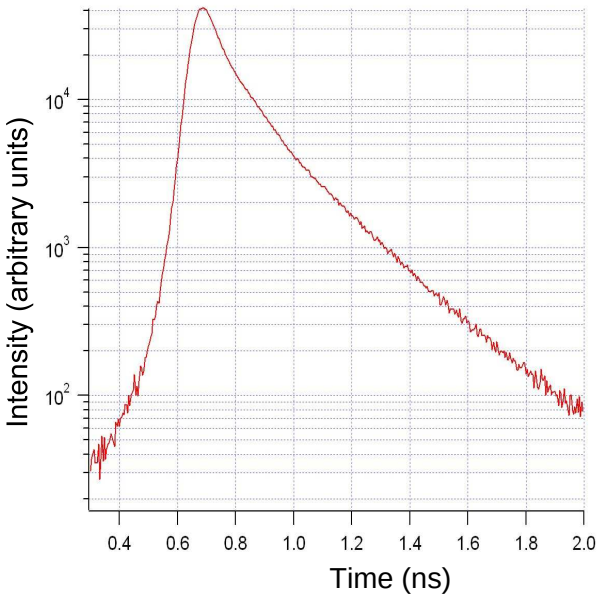


Figure 2.4 – *Fonction de réponse de l'appareil (IRF) de mesure de temps de vie.*

de fluorescence par TCSPC, une deuxième voie d'excitation avec une diode laser picoseconde opérant à 636nm (PicoQuant LDH-P-635, taux de répétition 80 MHz) est utilisée. La puissance du faisceau excitateur est controlée par une lame demi-onde ($\lambda/2$) accolée à un cube polariseur. Une fibre optique monomode (Thorlabs P3-630A- FC-5) permet d'assurer un parfait chevauchement spatial entre le laser continu HeNe et la diode laser picoseconde. Les deux faisceaux excitateurs empruntent donc le même trajet optique en sortie de fibre ce qui garantit un même point focal d'excitation pour les expériences FCS et les mesures de temps de vie de fluorescence. En sortie de fibre, les faisceaux sont élargis à l'aide d'un dispositif afocal de manière à recouvrir toute la pupille arrière de l'objectif de microscope, afin d'obtenir des points de focalisation dont les dimensions transverses sont minimales, et donc une résolution maximale. Un miroir dichroïque (Omega filters XF2072), conçu pour travailler sous une incidence de 45 degrés, réfléchi le faisceau pompe et transmet uniquement le signal de fluorescence ($\lambda \approx 670$ nm). Après réfléxion sur le miroir dichroïque, le faisceau incident est focalisé sur l'échantillon à l'aide d'un objectif à eau de forte ouverture numérique (Zeiss C-Apochromat, grossissement$\times$40, ouverture numérique 1.2) qui va également collecter le signal de fluorescence provenant de l'échantillon (montage dit en épi-fluorescence). Pour les mesures FCS à 633 nm, les sondes fluorescentes que nous avons utilisées sont des molécules d'Alexa Fluor 647 (A647, Invitrogen, Carlsbad CA, rendement quantique Φ_F =30% en solution aqueuse) dont les pics d'absorption/émission sont respectivement situés autour de 650 et 668 nm. La photo-stabilité et le bon rendement de l'Alexa Fluor 647 en font un bon marqueur fluorescent, très utilisé en biologie. Après excitation, la fluorescence des molécules d'Alexa 647 traverse la lentille de tube du microscope (de

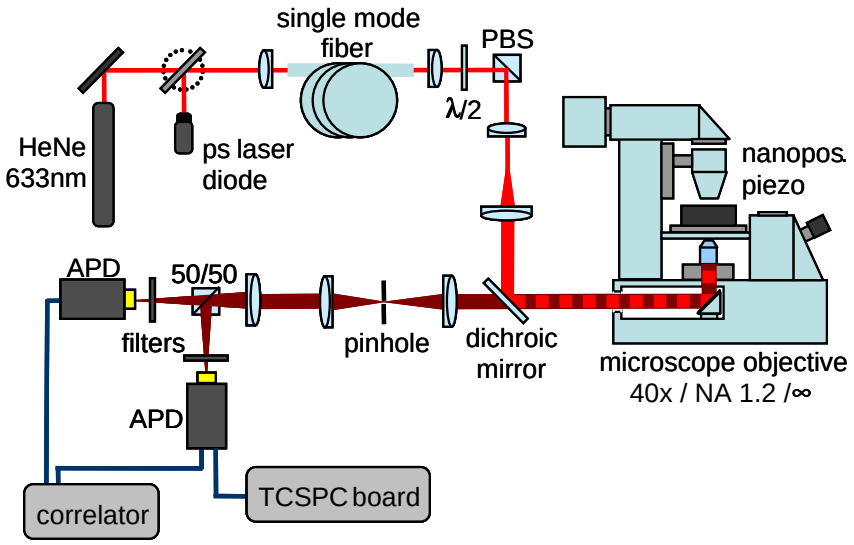


FIGURE 2.5 – *Dispositif expérimental utilisé pour les expériences FCS et les mesures de temps de vie de fluorescence.*

focale f =160 mm) puis est ensuite filtrée par un trou confocal de 50μm placé dans le plan image de l'objectif de microscope. En sortie du trou confocal, le signal de fluorescence est divisé par un cube séparateur 50/50 et focalisé sur deux photodiodes à avalanche (Micro Photon Devices par PicoQuant MPD-5CTC, avec un temps mort de 50 ns et une surface active de 50 μm) placées derrière des filtres fluorescence 670±20 nm. Les fluctuations du signal de fluorescence sont alors analysées par corrélation croisée des signaux de chacunes des photodiodes à l'aide d'un corrélaleur ALV6000. L'analyse des données FCS selon l'équation (2.32) permet de déterminer le nombre de molécules, le temps de diffusion translationnelle, l'amplitude et le temps de vie de l'état triplet ainsi que le taux de comptage par molécule CRM. Pour les mesures de temps de vie de fluorescence, la photodiode est couplée à un module de comptage de photons uniques corrélés dans le temps (PicoQuant PicoHarp 300). La résolution temporelle de notre dispostif expérimental pour les mesures de temps de vie de fluorescence est de 120 ps. Une photographie du montage expérimental est disponible en Figure 2.6. Enfin, précisons qu'une voie d'excitation par une diode laser à une longueur d'onde de 488 nm est également disponible sur notre montage.

2.4 Procédure de caractérisation de la fluorescence au voisinage d'une nano-antenne

La procédure de caractérisation expérimentale de l'exaltation de fluorescence au voisinage d'une nanoantenne consiste à combiner des études FCS en fonction de la puissance

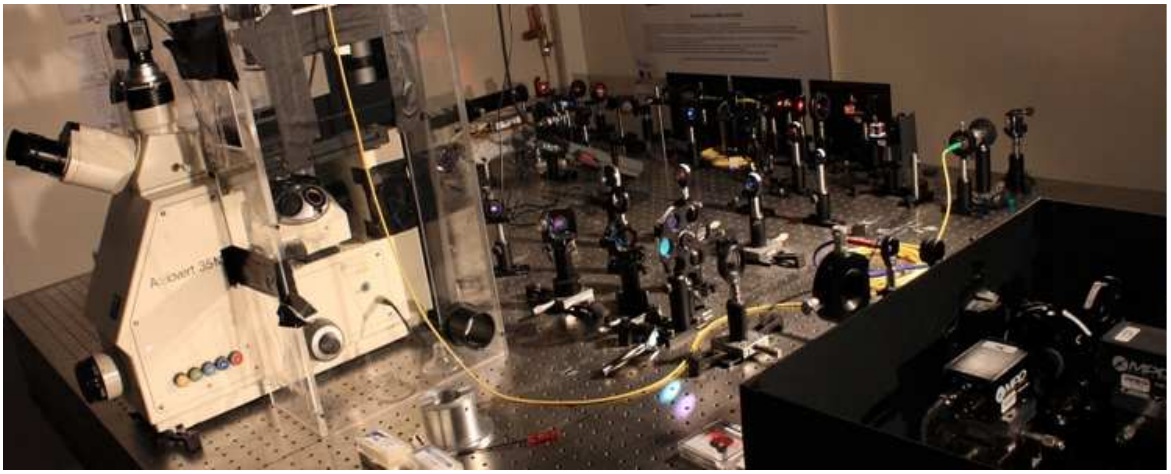


Figure 2.6 – *Photographie du dispositif expérimental.*

d'excitation I_{exc} et des mesures de temps de vie de fluorescence par TCSPC. Par cette méthode, les contributions relatives des gains à l'excitation et à l'émission sur l'exaltation globale de fluorescence en présence d'une nanoantenne peuvent être déterminées.
Comme nous l'avons vu en section 2.1, la FCS permet de quantifier le nombre de molécules dans le volume d'observation et ainsi accéder au taux de comptage par molécule CRM. Nous allons à présent introduire la notion d'exaltation de fluorescence notée η_F et définie comme le rapport entre les taux de comptage par molécule en présence de la nanoantenne CRM_{nano} et pour une solution de référence CRM_{sol} à la même puissance d'excitation, de sorte que :

$$\eta_F = \frac{CRM_{nano}}{CRM_{sol}}. \tag{2.38}$$

Si on fait l'hypothèse que le fluorophore utilisé peut être représenté par un système à 3 niveaux, le taux de comptage par molécule CRM est donnée par [2] :

$$CRM = \kappa\ \Phi\ \frac{\sigma I_e}{1 + I_e/I_s}, \tag{2.39}$$

où I_s est l'intensité de saturation définie comme :

$$I_s = \frac{k_{tot}^S}{\sigma} \frac{1}{1 + k_{cis}/k_{tot}^T}. \tag{2.40}$$

où k_{tot}^S et k_{tot}^T sont respectivement les taux de désexcitation total depuis l'état singulet S et l'état triplet T. Introduisons à présent le taux d'émission $k_{em} = \kappa k_r^S$, qui est le taux

d'émission radiatif effectif collecté par le dispositif expérimental. L'équation 2.39 se réecrit alors :

$$CRM = \frac{k_{em}}{k_{tot}^S} \frac{\sigma I_e}{1 + I_e/I_s}, \tag{2.41}$$

Dans le régime linéaire d'excitation de la fluorescence c'est à dire pour une intensité d'excitation $I_e \ll I_s$, l'équation 2.41 est réduite à :

$$CRM_{low} = \frac{k_{em}}{k_{tot}^S} \sigma I_e \quad \text{pour } I_e \ll I_s. \tag{2.42}$$

Le taux de comptage par molécule CRM_{low} dans le régime linéaire d'excitation de la fluorescence est donc proportionnel à l'intensité d'excitation, à la section efficace d'absorption σ de la molécule, et au rapport entre le taux d'émission radiatif collecté k_{em} et le taux de désexcitation total k_{tot}^S. L'exaltation de fluorescence η_F en présence d'une nano-antenne dans le régime linéaire peut donc s'écrire :

$$\eta_{F,low} = \frac{CRM_{nano}}{CRM_{sol}} = \frac{\eta_{k_{em}}}{\eta_{k_{tot}}} \eta_{I_e} \quad \text{pour } I_e \ll I_s. \tag{2.43}$$

où $\eta_{k_{em}} = k_{em-nano}/k_{em-sol}$, $\eta_{k_{tot}} = k_{tot-nano}^S/k_{tot-sol}^S$ et $\eta_{I_e} = \sigma I_{e-nano}/\sigma I_{e-sol}$ sont respectivements les exaltations sur le taux d'émission radiatif collecté, le taux de désexcitation total et le taux d'excitation.
Dans le régime de saturation de la fluorescence, c'est à dire pour $I_e \gg I_s$, l'équation 2.41 est réduite à :

$$CRM_{sat} = \frac{k_{em}}{k_{tot}^S} \sigma I_s = \frac{k_{em}}{1 + k_{cis}/k_{tot}^T} \quad pour I_e \gg I_s. \tag{2.44}$$

Le taux de comptage par molécule CRM_{sat} dans le régime de saturation de la fluorescence est donc fonction du taux d'émission radiatif collecté k_{em} et du rapport k_{cis}/k_{tot}^T. De plus, on constate que le taux de fluorescence par molécule dans le régime saturé de fluorescence ne dépend plus de l'intensité d'excitation I_e. Ceci est assez intuitif puisqu'à saturation, quelle que soit l'intensisté d'excitation, le nombre de photons de fluorescence émis par molécule ne varie plus. Soulignons également que le rapport k_{cis}/k_{tot}^T est proportionnel à la population relative de l'état triplet T_1 lorsqu'on atteint un régime de saturation de fluorescence [49, 50]. Nous avons vérifié expérimentalement que la population de l'état triplet à saturation en présence des nanoantennes étudiées au cours de cette thèse était très proche de celle de la solution de référence, et donc que le rapport k_{cis}/k_{tot}^T pouvait être considéré comme constant. Si on suppose que la présence de la nanoantenne n'affecte que peu ou pas la population de l'état tripet dans le régime de saturation de la fluorescence, l'exaltation de fluorescence à saturation s'écrit :

$$\eta_{F,sat} = \left(\frac{CRM_{nano}}{CRM_{sol}}\right)_{sat} = \frac{k_{em-nano}}{k_{em-sol}} = \eta_{k_{em}} \quad pour I_e \gg I_s. \tag{2.45}$$

On comprend donc que des analyses dans les régimes linéaire et saturé de fluorescence permettent d'extraire des informations sur les différentes contributions qui participent à

l'exaltation globale de fluorescence en présence d'une nanoantenne. Cette idée est à la base même de notre procédure de caractérisation de la fluorescence que nous allons à présent décrire.

Dans un premiere temps, nous déterminons par FCS les taux de comptage par molécule CRM en fonction de la puissance d'excitation I_e pour une solution de référence et en présence de la nanoantenne étudiée. Les données expérimentales obtenues sont ensuite analysés à l'aide d'un ajustement numérique de l'équation 2.41. Cette analyse permet d'obtenir les taux de comptage par molécule dans le régime linéaire CRM_{low} et à saturation CRM_{sat}. On peut alors déterminer les exaltations fluorescence $\eta_{F,low}$ et $\eta_{F,sat}$ respectivement dans les régimes linéaire et saturé. Comme indiqué en équation 2.45, l'exaltation de fluorescence à saturation correspond au gain sur le taux d'émission radiatif collecté $\eta_{k_{em}}$. Les mesures de temps de vie de fluorescence par TCSPC vont permettre de déterminer le gain sur le taux de désexcitation total $\eta_{k_{tot}}$, qui est simplement le rapport entre le temps de vie du niveau excité S_1 de la molécule en solution et en présence de la nanoantenne $\eta_{k_{tot}} = \tau_{Ssol}/\tau_{Snano}$. Le gain sur l'intensité d'excitation η_{I_e} est alors obtenu d'après l'équation 2.45 par $\eta_{I_e} = \eta_{F,low}\ \eta_{k_{tot}}/\eta_{k_{em}}$.

Cette procédure de caractérisation permet donc de distinguer les contributions respectives de l'excitation et de l'émission sur l'exaltation globale de fluorescence. La FCS n'étant pas une technique de détection de molécule unique au sens strict, puisqu'elle ne donne accès qu'à des informations moyennées sur l'ensemble des molécules qui traversent le volume de détection, la procédure de caractérisation présentée ci-dessus résulte elle aussi d'une moyenne sur toutes les orientations et les positions possibles des molécules.

CHAPITRE 3

Confinement électromagnétique et exaltation de fluorescence par des microsphères diélectriques

Les microsphères diélectriques sont des antennes optiques qui offrent des performances remarquables compte tenu de leur faible coût comparé aux antennes métalliques. Après une introduction sur les effets obtenus au voisinage d'une microsphère selon les conditions d'illumination, nous verrons qu'une sphère éclairée par un faisceau Gaussien focalisé permet de confiner la lumière dans des volumes sub-longueur d'onde et d'exalter la fluorescence moléculaire sous excitation à un et deux photons des émetteurs diffusant au voisinage de ces objets. La détermination de la contribution des gains à l'excitation et à l'émission est rendue possible par la procédure de caractérisation expérimentale présentée au chapitre précedent et confirmée par des calculs théoriques. La réduction du volume de détection et l'exaltation de fluorescence obtenues en placant une microsphère au point de focalisation d'un objectif de microscope sont deux paramètres importants pour conduire des mesures FCS à forte concentration avec des signaux moléculaires exaltés.

3.1 Introduction sur l'effet des conditions d'illumination d'une microsphère diélectrique

3.1.1 Illumination par onde plane d'une microsphère diélectrique : prédiction théorique de nanojets photoniques

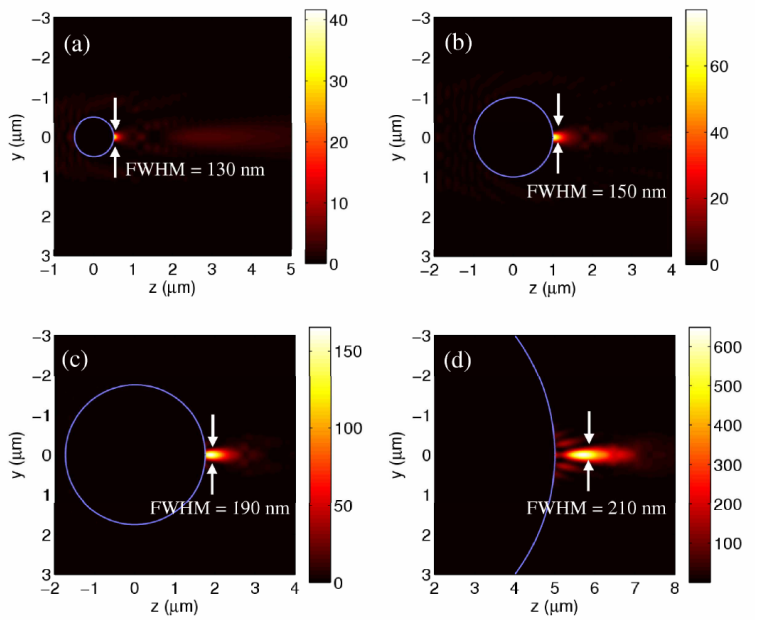


Figure 3.1 – *Nanojets photoniques créés par des microsphères diélectriques (n_s =1.59) illuminées sous onde plane à λ =400 nm polarisée selon la direction $\vec{x}$ et se propageant selon la direction $\vec{z}$. Les diamètres des sphères sont respectivement de 1 μm pour (a), 2 μm pour (b), 3.5 μm pour (c) et 8 μm pour (d) [52].*

En 2004, Chen et al [51] mettent en évidence le phénomène de nanojet photonique : un faisceau de forte intensité, de faible divergence et dont les dimensions transverses sont sub-longueur d'onde, qui peut émerger d'une microsphère éclairée par une onde plane [52]. Pour cela, les auteurs utilisent un outil de modélisation numérique FDTD (Finite Difference Time Domain) pour la résolution des équations de Maxwell. La distribution d'intensité lumineuse émergeant d'une microsphère d'indice de réfraction n_s =1.59 éclairée par une onde plane de longueur d'onde λ =400 nm, polarisée selon la direction $\vec{x}$ et se propageant selon la direction $\vec{z}$, est présentée en Figure 3.1 pour différentes tailles de sphères. Comme nous pouvons le constater, un faisceau de dimension sub-longueur d'onde dans le plan transverse (nanojet) est généré pour des sphères de diamètre inférieur ou égal à 3.5 μm.

Les dimensions des jets photoniques dans le plan $(\vec{x}, \vec{y})$ ainsi que leurs positions selon la direction de propagation $\vec{z}$ sont fonctions de la taille des microsphères. En particulier, un jet photonique de largeur à mi-hauteur (ou FWHM pour Full-Width-Half-Max) dans le plan $(\vec{x}, \vec{y})$ de 130 nm est produit par une sphère de 1 μm (Figure 3.1(a)). Pour une sphère de 3.5 μm (Figure 3.1(c)), un faisceau focalisé de lumière émerge à la surface arrière de la sphère avec un pic d'intensité I_{max} =160I_0 (où I_0 est l'intensité de l'onde plane incidente), une dimension transverse sub-longueur d'onde (FWHM=190 nm) et une extension selon la direction de propagation de l'ordre du micromètre. Ces nanojet lumineux ont d'ores et déja été utilisés pour exalter le signal rétrodiffusé de particules métalliques de dimensions nanométriques [52], le stockage optique d'informations [55], la nano-impression [56, 57, 58], la spectroscopie Raman [59, 60] et le nettoyage laser [61, 62]. Enfin, nous soulignerons que les caractéristiques de ces nanojets photoniques (dimensions FHWM dans le plan transverse, positon et extension selon la direction de propagation, intensité maximale) sont également fonctions de l'indice de réfraction des sphères utilisées et de la longueur d'onde d'excitation de l'onde plane incidente [52].

3.1.2 Observation expérimentale de nanojets photoniques

La première observation expérimentale de nanojets photoniques a été effectuée au sein de l'équipe MOSAIC de l'Institut Fresnel en utilisant un microscope confocal à balayage [63]. La collection des piles d'images dans le plan transverse $(\vec{x}, \vec{y})$ en fonction de la direction de propagation $\vec{z}$ au voisinage d'une microsphère permet la reconstruction complète en trois dimensions du jet photonique. Cette démonstration expérimentale de l'existence de nanojets de lumière a été réalisée avec des microsphère de latex (n_s =1.59) de diamètre 1, 3 et 5 μm déposées sur une lamelle de microscope. Un exemple de piles d'images enregistrées pour une sphère de latex de 3 μm illuminée à λ =520 nm est présentée en Figure 3.2. Ces images correspondent à la distributions d'intensité dans le plan transverse $(\vec{x}, \vec{y})$ à différentes positions de la microsphères en $\vec{z}$, incrémentées par pas de 500 nm (selon la direction de propagation c'est à dire pour des plans $(\vec{x}, \vec{y})$ de plus en plus proches de la sphère). En utilisant les piles d'images de la Figure 3.2, il est possible de reconstruire le nanojet photonique créé par la sphère de 3 μm comme nous pouvons le constater sur la Figure 3.3(a). L'intensité dans le plan transverse pour la position optimale selon la direction $\vec{z}$ (c'est à dire le focus pour lequel l'intensité est maximale) est indiquée en Figure 3.3(b). Cette distribution d'intensité suit une loi Gaussienne, comme attendu d'après les prédictions théoriques [52, 53, 54]. Pour cette position optimale, la largeur à mi hauteur FWHM mesurée est d'environ 270 nm ce qui est une taille inférieure à la longueur d'onde effective de la lumière incidente dans le verre (520/1.5=347 nm). Enfin, on notera qu'une intensité d'excitation exaltée peut être mesurée pour différents plans transverses à la surface de la sphère (Figure 3.3(c)). L'exaltation d'intensité a été calculée en normalisant la distribution d'intensité dans le plan transverse considéré par l'intensité en l'absence de sphère mesurée dans l'air. Pour un focus optimal, un gain d'un facteur 30 sur l'intensité locale d'excitation peut être mesurée avec la sphère de 3 μm et ce gain peut atteindre 59 en considérant une sphère de 5 μm [63]. Malgré l'intérêt que suscitent ces nanojets photo-

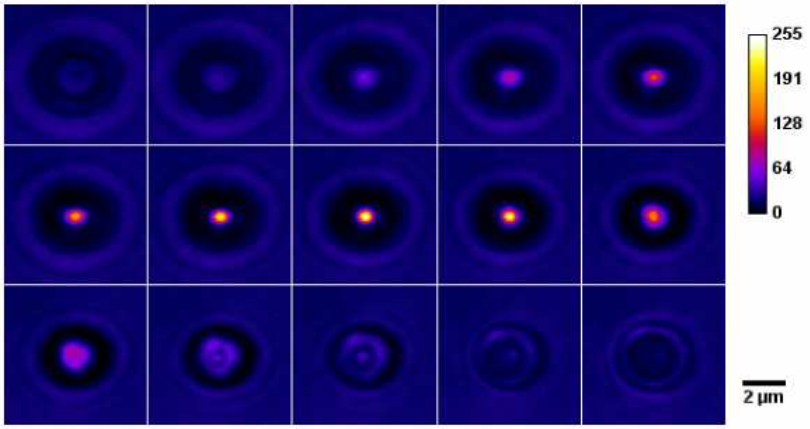


Figure 3.2 – *Piles d'images correspondant à différents plans transverses d'une sphère de latex de 3µm déposée sur une lamelle de microscope et éclairée par une onde plane à λ=520 nm. Ces images 2D ont été enregistrées pour des positions selon $\vec{z}$ incrémentées par pas de 500 nm (lecture de gauche à droite et de haut en bas).*

niques, leur utilisation en microscopie ou spectroscopie demeure assez limitée. En effet, si les dimensions des ces jets de lumière sont très étroites dans le plan transverse, la lumière ne peut être confinée dans des volumes sub-longueur d'onde à cause de la faible divergence de ce type de faisceaux qui a pour conséquence directe une élongation des dimensions selon la direction de propagation (qui peut atteindre plusieurs micromètres). Nous allons voir à présent qu'en considérant une illumination par faisceau Gaussien focalisé au lieu d'une onde plane, la lumière peut être confinée dans des volumes sub-longueur d'onde dans les trois directions de l'espace.

3.1.3 Illumination d'une microsphère diélectrique par un faisceau Gaussien ultrafocalisé : vers un confinement électromagnétique 3D

L'étude théorique des intéractions entre une microsphère diélectrique et un faisceau Gaussien ultrafocalisé a été effectuée en collaboration avec l'équipe CLARTE de l'Institut Fresnel [64]. Pour cela, des simulations numériques utilisant une théorie rigoureuse de Lorentz-Mie [65] ont été employées afin de caractériser la distribution d'intensité créée au voisinage d'une sphère de latex de 2 μm dans un environnement aqueux (n=1.33), éclairée par un faisceau Gaussien de longueur d'onde λ =633 nm focalisé avec un objectif d'ouverture numérique ON≈1 qui confère un point de focalisation de mi-largeur transverse à $1/e^2$ de l'intensité maximale (ou waist) de 300 nm et une extension longitudinale de 1.25 μm. La distribution de l'intensité du champ électrique émergeant de la microsphère, pour un

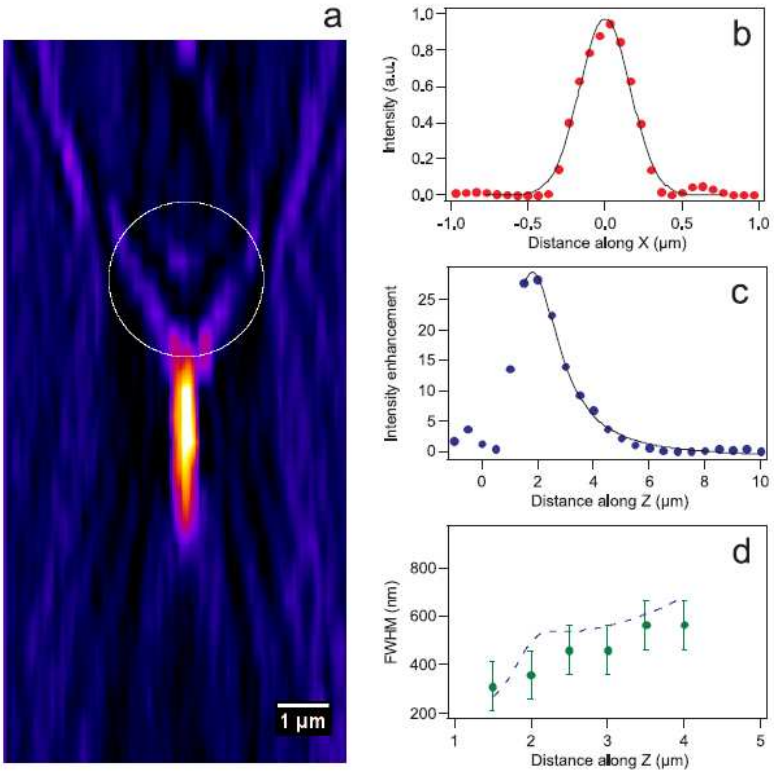


FIGURE 3.3 – *(a) Reconstruction du nanojet photonique selon l'axe optique par une sphère de latex de 3 µm d'après la pile d'image de la Figure 3.2. (b) Coupe de l'intensité selon l'axe $\vec{x}$ du plan transverse pour le point focal optimal. Les points sont les mesures expérimentales et la ligne en trait continu est un ajustement numérique Gaussien. (c) Exaltation de l'intensité d'excitation selon la direction de propagation normalisée par rapport à la distribution d'intensité dans le cas de l'onde plane seule (sans sphère). Les points sont les mesures expérimentales et la ligne en trait continu est un ajustement numérique Loreztien. (d) FWHM du nanojet photonique mesuré dans le plan transverse $(\vec{x}, \vec{y})$ en fonction de la direction de propagation $\vec{z}$. La ligne en pointillée correspond à des simulations numériques pour une sphère de 3 µm dans l'air.*

positionnement optimal de la sphère par rapport au faisceau Gaussien focalisé incident, est présentée en Figure 3.4(a). Pour cette position, un faisceau de forte intensité (un ordre de grandeur plus élevé que l'intensité du faisceau focalisé en l'absence de sphère comme nous pouvons le constater en Figure 3.4(b)) émerge de la sphère, avec des waists transverse (230 nm) et axial (420 nm) inférieurs aux dimensions du point de focalisation du faisceau en l'absence de sphère (indiquées précédemment). Le volume effectif d'excitation, défini par le produit $\pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z/2$, en présence de la sphère de latex est donc réduit d'un ordre de grandeur comparé au cas du faisceau Gaussien focalisé en l'abscence de sphère (le volume effectif est de 0.6 μm^3 soit 6 $(\lambda/n)^3$ pour le faisceau Gaussien incident focalisé contre 0.06 μm^3 soit 0.6 $(\lambda/n)^3$ en présence de la microphère). Cette réduction de volume peut être d'autant plus importante en utilisant une microsphère de mélamine d'indice de réfraction n_s =1.68, comme nous le verrons dans la section 3.2.7. Soulignons toutefois que le rapport entre l'indice de réfraction de la sphère n_s et l'indice du milieu environnant n doit être inférieur à 1.4. En effet, pour des contrastes d'indice plus élevés, le champ électromagnétique est totalement confiné à l'intérieur de la sphère. Pour comprendre les mécanismes physiques qui régissent ces effets de confinement électromagnétique, une méthode de simulation permettant de calculer séparement les champs incident et diffracté a été employée [65]. La carte de l'intensité du champ électrique diffusée par la sphère en l'absence de source est présentée en Figure 3.4(c). Comme nous pouvons le remarquer, un faisceau de forte intensité, de dimension transverse très étroite et d'extension étendue selon la direction de propagation est diffusé par la sphère. Ce faisceau est en réalité très proche d'un nanojet photonique classique obtenue avec une sphère illuminée par onde plane. Une caractéristique assez remarquable est que seule la somme cohérente du champ électrique incident focalisé (Figure 3.4(b)) et du champ diffusé par la sphère (Figure 3.4(c)) permet d'obtenir un confinement électromagnétique dans les trois directions de l'espace (Figure 3.4(a)). La réduction tri-dimensionnelle du volume effectif observée est donc le résultat des intéractions de deux contributions : une collimation du champ électrique incident par la sphère combinée à des effets d'interférences entre les champs incidents et diffusés.
L'exaltation de l'intensité du champ électrique incident et la réduction du volume effectif sont deux caractéristiques importantes que nous avons voulu exploiter par le biais de la FCS pour des raisons fondamentales et appliquées : sonder expérimentalement la distribution électromagnétique à proximité d'une sphère avec des émetteurs fluorescents dans le champ proche et utiliser ces microsphères pour exalter la fluorescence de molécules tout en réduisant le volume d'analyse FCS sous la limite de diffraction.

3.2 Exaltation de fluorescence moléculaire par des microsphères diélectriques

Les microsphères diélectriques présentent de multiples avantages comparés aux nanoantennes métalliques. D'une part, leur nature non-absorbante (car diélectrique) n'affecte pas ou peu le rendement quantique d'un émetteur fluorescent : elles n'introduisent donc pas

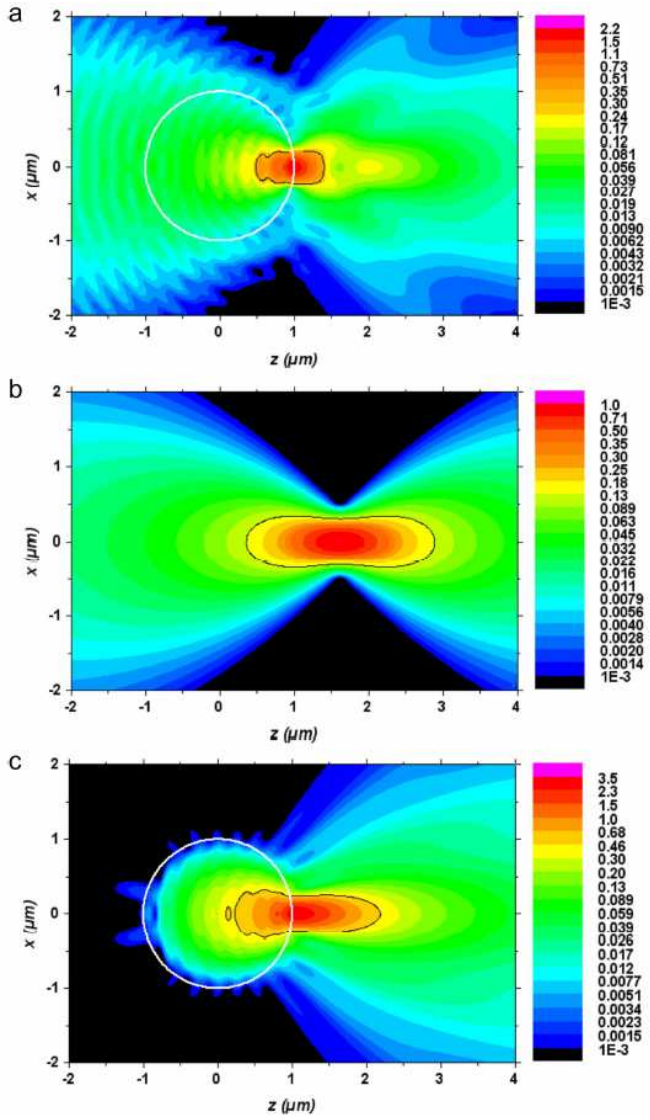


FIGURE 3.4 – *(a) Carte de l'intensité du champ électrique total de la microsphère éclairée par faisceau Gaussien focalisé. Le cercle blanc symbolise la bordure de la sphère et la ligne noire représente le contour d'intensité à I_{max}/e^2. Les figures (b) et (c) sont respectivement les cartes d'intensité du champ incident (en l'absence de sphère) et diffusé par la sphère. La somme cohérente de (b) et (c) conduit à la carte de champ (a).*

de voies de désexcitation non radiatives supplémentaires (ou quenching). D'autre part, le coût extrêmement réduit de ces microstructures (prix≈130 euros pour un flacon de microsphères en solution contenant environ 1 milliard de sphères) permet d'accéder plus facilement au domaine des antennes optiques, habituellement restreint aux structures plasmoniques qui nécessitent des outils de nano-fabrication de pointe (faisceau d'ions focalisé, lithographie ...). Nous allons voir dans cette section que les sphères diélectriques permettent d'exalter la fluorescence moléculaire et réduire le volume de détection en microscopie confocale sous la limite de diffraction [67, 68] avec des performances tout aussi remarquables que celles obtenues avec certains types de nanostructures métalliques.

3.2.1 Préparation des échantillons de microsphères

Les microsphères de latex (n_s=1.59), avec lesquelles nous avons conduit les études expérimentales, sont commercialisées en solution par Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suisse). Les diamètres calibrés de sphères utilisées s'étendent de 0.6 à 5 μm (dispersion inférieure à 0.1 %). Les microsphères en solution concentrée sont dans un premier temps diluées dans de l'eau pure avant d'être dispersées sur une lamelle de microscope (indice de réfraction 1.52, épaisseur 150μm). Après séchage du solvant aqueux, le contact entre les sphères et le substrat de verre est assuré par les forces électrostatiques. La concentration est choisie de manière à avoir une sphère isolée tous les 10 par 10 μm^2.

3.2.2 Dispositif expérimental et analyses des données FCS en présence de microsphères

Les expériences menées avec les microsphères dielectriques ont été effectuées sur le dispositif expérimental décrit au chapitre 2 à la seule exception que le filtrage confocal s'effectue avec un trou confocal de 30 μm. Les sphères de latex sont placées au point de focalisation de notre objectif de microscope de forte ouverture numérique (ON=1.2) à l'aide de la platine de nanopositionnement piezoélectrique. Une goutte de 80 μL de solution fluorescente d'Alexa 647 est ensuite déposée sur le dessus des échantillons de microsphères pour les différentes tailles considérées : 0.6, 1, 1.5, 2, et 3 μm. Des expériences FCS sont alors conduites pour déterminer le nombre moyen de molécules N et le taux de comptage par molécule CRM dans le cas de la solution de référence (hors sphère) et pour les différentes tailles de sphères placées au point de focalisation de l'objectif de microscope comme illustré en Figure 3.5(a). Un exemple de corrélogrammes obtenus lors de ces mesures est présenté en Figure 3.5(b) pour la solution de référence et en présence d'une sphère de 2 μm. Ces mesures (avec et sans microsphère) sont effectuées pour la même concentration en molécules fluorescentes et sur la même lamelle de microscope. Soulignons à présent le fait qu'un modèle de diffusion libre ne peut strictement pas être supposé à proximité d'une microsphère. Cependant, les résultats expérimentaux dont nous allons discuter nécessitent d'estimer les dimensions du volume sondé et le taux de comptage par molécule CRM. Ces deux paramètres sont accessibles via le nombre de molécules N dans le volume de détection, qui est, comme nous l'avons vu au chapitre 2, inversemement proportionnel à

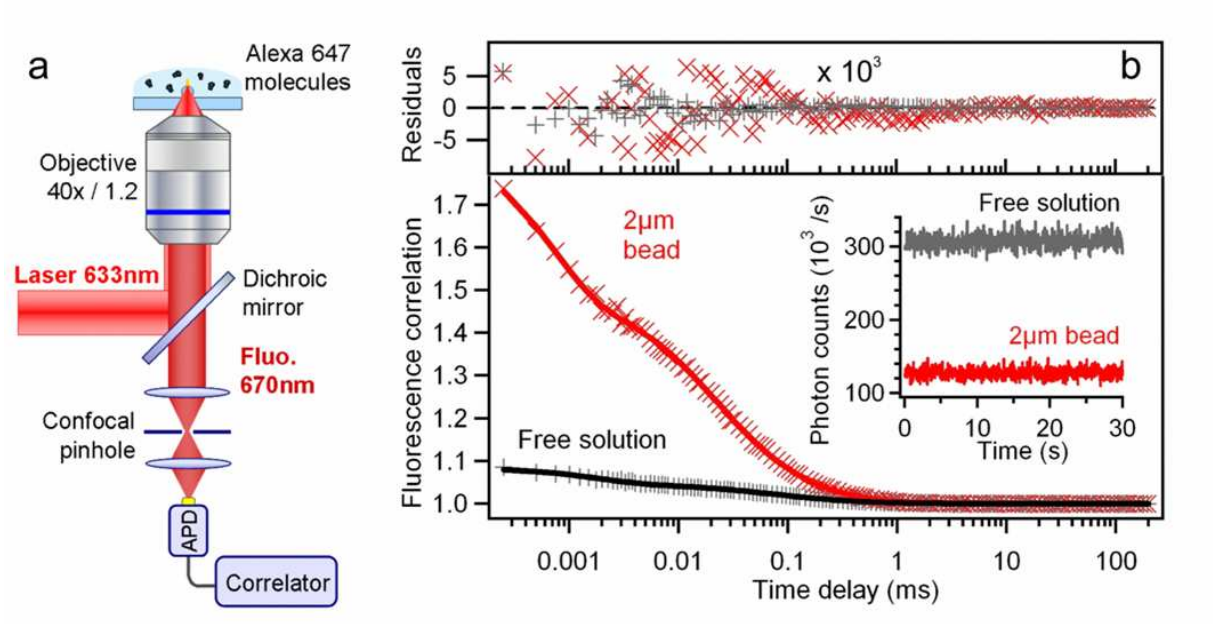


FIGURE 3.5 – *(a) Schéma du dispositif expérimental pour l'étude des microsphères diélectriques. (b) Fonctions de corrélation obtenues pour la solution de référence (noir) et en présence d'une sphère de 2 µm placée au point de focalisation de l'objectif (rouge). L'analyse des données expérimentales a conduit à N =21.3, τ_d =71 µs, n_T =0.80, τ_T =1.9 µs, et CRM =14.5 kHz pour la solution de référence et N =2.06, τ_d =22.6 µs, n_T =0.76, τ_T =0.8 µs, et CRM =62.0 kHz en présence de la microsphère.*

la fonction de corrélation normalisée $g^2(\tau)$ à l'origine (c'est à dire pour un délai $\tau = 0$). L'expression de $g^2(0)$ étant indépendante de la forme du faisceau d'excitation et de la statistique de diffusion, l'estimation du nombre de molécules dans le volume de détection et des paramètres photophysiques n'est pas affectée par les considérations de modèle de diffusion. Ceci est une conséquence directe de la nature Poissonienne de la probabilité de trouver une molécule dans le volume d'observation à un temps donné. La détermination du coefficient de diffusion moléculaire au voisinage d'une sphère est une tâche difficile qui nécessite de prendre en compte de multiples artéfacts provenant du fait que le volume d'observation n'est pas de type Gaussien [66] et qui dépasse le cadre de cette thèse.

3.2.3 Exaltation de la fluorescence moléculaire : Mesures expérimentales

La quantification du nombre de molécules dans le volume d'observation permet de déterminer l'évolution des taux de comptage par molécule CRM en fonction de l'intensité laser incidente (HeNe λ =633 nm) pour les différents diamètres de sphères de latex et

pour le cas de la solution de référence. Les résultats de ces mesures sont présentés en Figure 3.6(a) où les points indiquent les mesures expérimentales et les lignes en trait plein correspondent aux ajustements numériques donnés par l'équation 2.39 du chapitre 2, et qui sont en bon accord avec les données expérimentales. Comme nous pouvons remarquer, des exaltations de CRM sont très clairement observées à toutes les puissances d'excitation laser incidente et pour chaque diamètre de microsphères. De plus, des taux de comptage par molécule supérieurs à 100 kHz sont obtenus en présence des sphères, ce qui sont des valeurs impossibles à atteindre dans le cas de la solution de référence seule. Soulignons que ces valeurs d'exaltation de taux de comptage par molécule sont fonctions du positionnement axial de la sphère, c'est à dire de la position de la sphère par rapport au faisceau incident. Nous reviendrons dans la section 3.2.6 sur la quantification de cette dépendance axiale.
L'exaltation de fluorescence dans les régimes linéaire $\eta_{F,low}$ et saturé $\eta_{F,sat}$ de la fluorescence peut à présent être déduite des ajustements numériques de la Figure 3.6(a) selon la procédure de caractérisation décrite au chapitre 2. Pour rappel, les exaltations de fluorescence sont données par le rapport entre les taux de comptage par molécule CRM en présence de sphère et dans le cas de la solution de référence dans le régime de fluorescence considéré. Les gains de fluorescence $\eta_{F,low}$ et $\eta_{F,sat}$ pour les différentes tailles de microsphères sont indiqués en Figure 3.6(b). Dans le régime linéaire, une exaltation maximale d'un facteur 5 sur la fluorescence moléculaire est obtenue avec la sphère de 1.5 μm, ce qui est une valeur tout à fait comparable avec les gains obtenus en utilisant certaines structures métalliques [69]. Les autres diamètres de sphères donnent également des exaltations sur le taux de comptage par molécules d'au moins 3.4. Nous allons à présent déterminer l'origine physique de cette exaltation de fluorescence à proximité de microsphères.

3.2.4 Détermination expérimentales des gains à l'excitation et à l'émission sur l'exaltation globale de fluorescence

Comme nous l'avons précisé au début de cette section, de par leur nature diélectrique, les microsphères n'affectent que très peu le rendement quantique des émetteurs fluorescents environnants. Pour nous en assurer, nous avons conduit des mesures de temps de vie de fluorescence par TCSPC sur des molécules d'Alexa 647 diffusants à la surface des sphères. Les courbes de déclins de fluorescence obtenues dans le cas de la solution de référence et pour une sphère de 2 μm sont présentées en Figure 3.7. L'ajustement numérique tenant compte de la résolution de l'instrument de mesures a conduit à une estimation du temps de vie des molécules pour la solution de référence de 1.02 ns et de 0.98 ns en présence de la microsphère soit une réduction du temps de vie de seulement 4%. Pour les autres diamètres de sphères, la réduction du temps de vie de fluorescence mesurée se situe en dessous de 4%, ce qui est très proche de la précision statistique de nos mesures expérimentales. C'est pourquoi nous allons considérer par la suite que pour tous les diamètres de sphères diélectrique étudiées, le rendement quantique de l'émetteur fluorescent reste inchangé. Ceci a une conséquence directe sur le taux de désexcitation total qui prend la valeur $\eta_{k_{tot}}$ =1

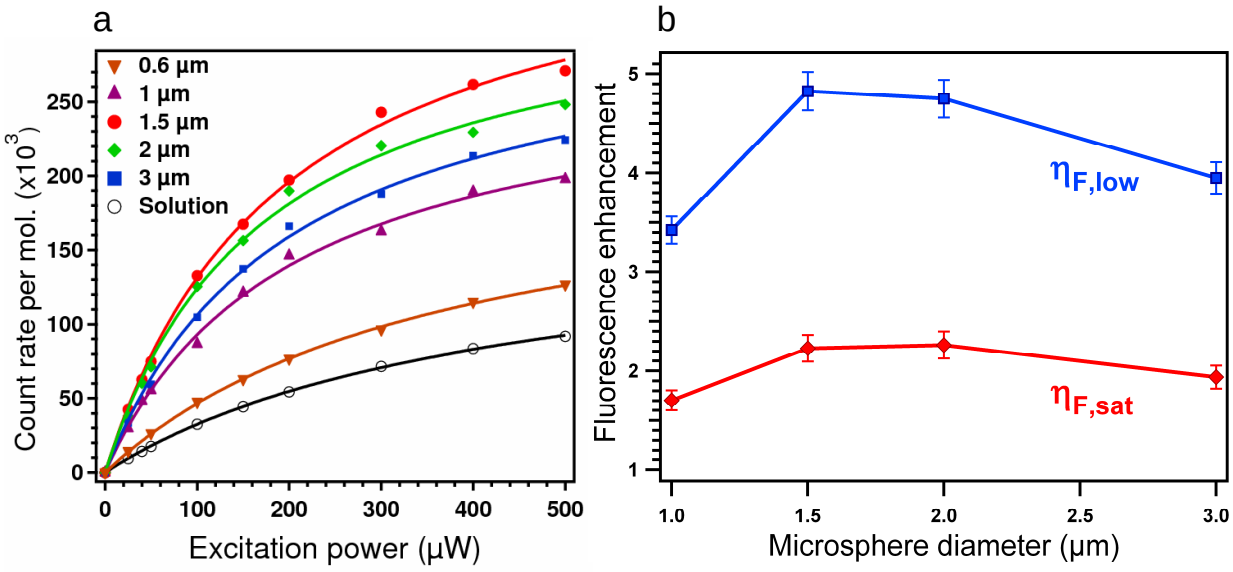


FIGURE 3.6 – *(a) Evolution des taux de comptage par molécule CRM (points) en fonction de la puissance d'excitation et analyses numériques (lignes continues) dans le cas de la solution de référence et en présence de microsphères de latex. Exaltation de fluorescence dans les régimes linéaire $\eta_{F,low}$ et saturé $\eta_{F,sat}$ déduite des mesures (a).*

($\eta_{k_{tot}}$ étant définit comme le rapport entre le temps de vie de la molécule en solution et au voisinage de la sphère).
L'exaltation de fluorescence détectée est donc le résultat d'une combinaison d'un gain à l'excitation η_{I_e} et à l'émision $\eta_{k_{em}}$. Or, nous avons vu que le taux d'émission radiatif collecté était défini par $k_{em} = \kappa\ k_{rad}$ où κ et k_{rad} sont respectivement l'efficacité de collection de notre dispositif expérimental et le taux d'émission radiatif du fluorophore. La présence de la microsphère n'affectant pas le taux d'émission radiatif de la molécule, le gain sur le taux d'émission $\eta_{k_{em}}$ correspond au gain sur l'efficacité de collection $\eta_{k_{em}} = \kappa_{sphere}/\kappa_{solution} = \eta_\kappa$. La contribution des gains sur l'intensité d'excitation est alors déduite des données de la Figure 3.6 par la relation $\eta_{I_e} = \eta_{F,low}/\eta_{F_{sat}} = \eta_{F,low}/\eta_{k_{em}} = \eta_{F,low}/\eta_\kappa$.
Les résultats expérimentaux de la détermination des contributions des gains à l'excitation et à la collection (symbolisés par des points) sont résumés en Figure 3.8. L'exaltation de fluorescence d'un facteur $\eta_{F,low}$ =5 obtenue avec la sphère de latex de 1.5 μm est une combinaison d'un gain sur l'intensité d'excitation de η_{I_e} =2.2 et d'un gain sur la collection de $\eta_{k_{em}}$ =2.2. Une microsphère illuminée sous faisceau Gaussien agit donc comme une microlentille placée dans le champ proche des émetteurs qui permet une surfocalisation du faisceau incident et une amélioration de l'efficacité de collection des photons de fluorescence. Souligons que tous les résultats obtenus avec les microsphères sont indépendants du fluorophore utilisé car l'exaltation de fluorescence mesurée étant une combinaison de gains à l'excitation et à l'émission, il n'y a pas de modifications du taux d'émission radiatif de

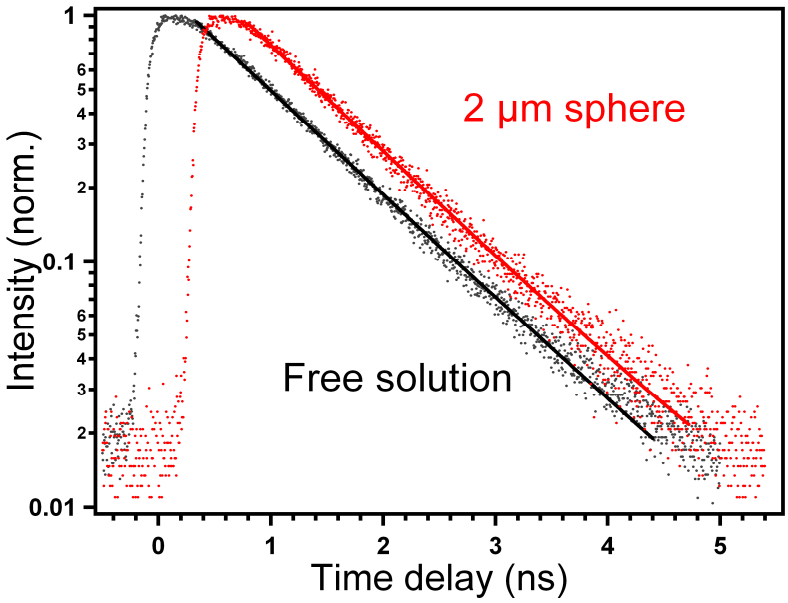


Figure 3.7 – *Mesures de temps de vie de fluorescence dans le cas de la solution de référence et en présence d'une sphère de 2 µm. Les points représentent les mesures expérimentales et les lignes continues sont pour les ajustements numériques qui permettent d'accéder au temps de vie moyen de fluorescence. Les courbes sont décalées horizontalement par souci de lecture.*

l'émetteur considéré, ce qui n'est pas le cas au voisinage d'un nanoantenne métallique.

3.2.5 Simulations numériques des contributions des gains à l'excitation et à l'émission

En complément de nos mesures expérimentales, l'équipe CLARTE de l'Institut Fresnel a effectué des simulations numériques à trois dimensions pour calculer la distribution d'intensité électromagnétique au voisinage d'une microsphère en utilisant la théorie de Lorentz-Mie [65]. Le faisceau Gaussien incident polarisé linéairement a été simulé en utilisant les coefficient de Davis du premier ordre avec des paramètres de faisceau correspondant à la configuration expérimentale utilisée avec l'objectif à immersion d'ouverture numérique ON=1.2 [64]. À titre d'exemple, une carte de la distribution d'intensité du champ électromagnétique est disponible en Figure 3.9 dans le cas d'une sphère de 2 μm. Pour déterminer le gain sur l'intensité d'excitation, nous introduisons la densité d'intensité électromagnétique ρ_e qui est définie comme l'intensité d'excitation totale I_V par unité de volume effectif

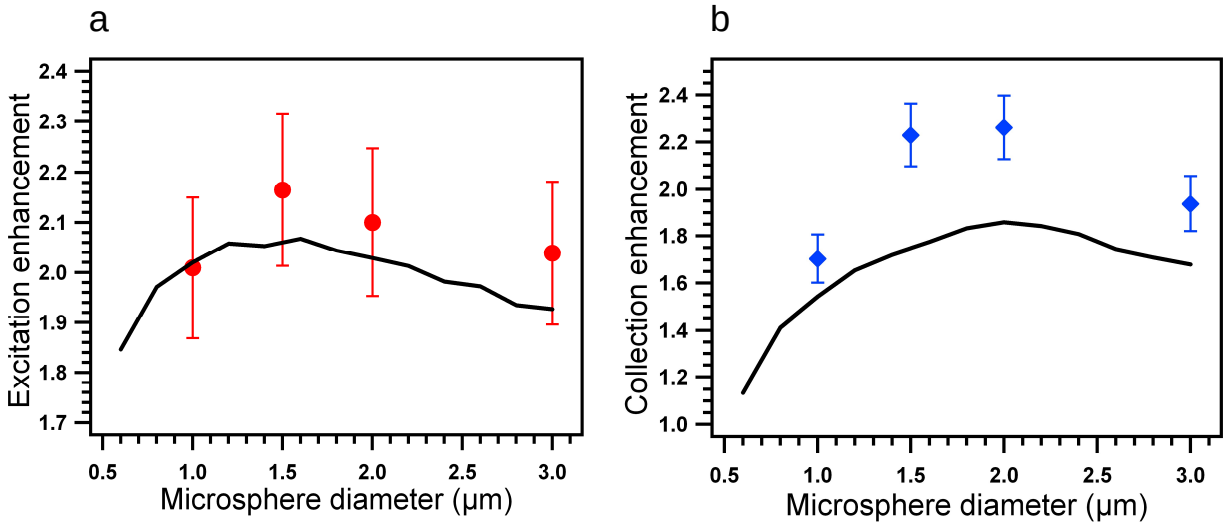


FIGURE 3.8 – *Contributions des gains à l'excitation (a) et à l'émission (b) sur l'exaltation globale de fluorescence en fonction du diamètre des sphères. Les points représentent les mesures expérimentales et les lignes continues sont pour les simulations numériques.*

V_{eff}, $\rho_e = I_V/V_{eff}$, l'intensité totale d'excitation étant donnée par [2, 65, 70] :

$$I_V = \int_V |E|^2 dV. \tag{3.1}$$

où le volume effectif est défini par :

$$V_{eff} = \frac{\left(\int_V |E|^2 dV\right)^2}{\int_V |E|^4 dV}. \tag{3.2}$$

L'intégration numérique de l'intensité du champ électrique est effectuée sur la région en dehors de la sphère où l'intensité est plus forte que $I_{max}/10$, avec I_{max} le maximum d'intensité du champ excitateur. L'exaltation d'intensité est finalement obtenue en calculant le ratio entre la densité d'intensité électromagnétique ρ_e pour le diamètre de sphère considéré et la valeur de ρ_e sans microsphère (c'est à dire lorsque le faisceau est uniquement focalisé par l'objectif d'ouverture numérique ON=1.2). Les résultats de ces calculs théoriques sont tracés en fonction du diamètre des sphères sur la Figure 3.8(a) (ligne continue). Comme nous pouvons le remarquer, les simulations numériques sont en bon accord avec les valeurs expérimentales, avec des différences relatives comparables aux incertitudes sur les mesures expérimentales. Afin de déterminer le gain théorique sur l'efficacité de collection, un dipôle

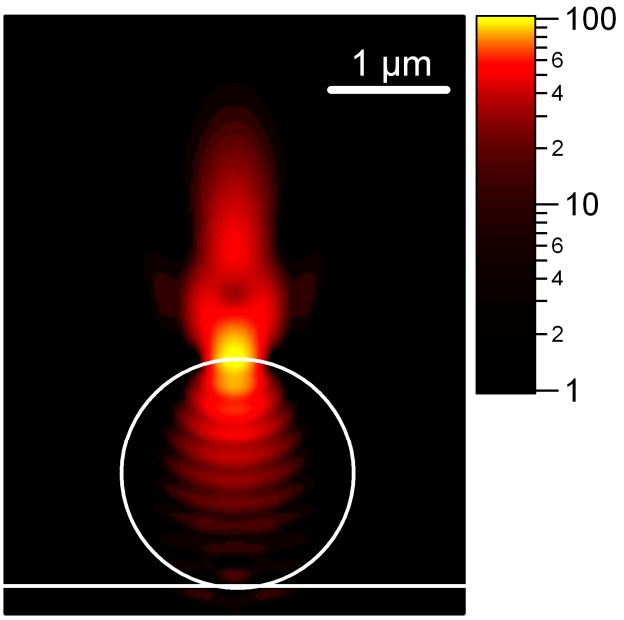


Figure 3.9 – *Simulation numérique de la distribution d'intensité du champ électrique au voisinage d'une sphère de latex (n_s =1.59) de 2 μm illuminée par un faisceau Gaussien à λ =633 nm focalisé par un objectif à eau d'ouverture numérique O.N =1.2. Le milieu environnant la sphère est aqueux (n =1.33) et l'indice de réfraction de la lamelle de verre (représenté par la ligne blanche horizontale) est de n =1.5.*

unique a été placé à proximité de la surface de la sphère à la position correspondant au maximum d'intensité de la distribution du champ électrique (le maximum d'intensité est visible sur la Figure 3.9 dans le cas d'une sphère de 2 μm). La moyenne du flux du vecteur de Poynting a ensuite été calculée en champ lointain à travers une surface sphérique fermée de 20 μm de rayon localisée sous la sphère et centrée sur la position du dipôle avec un demi-angle de collection de 60° correspond à l'objectif à immersion utilisé pour les mesures expérimentales. L'efficacité de collection est obtenue en déterminant le ratio entre le flux du vecteur de Poynting calculé précedemment et le flux du vecteur de Poynting sur toutes les directions de l'espace (c'est à dire dans un angle solide de 4π steradians). Le gain sur l'efficacité de collection est alors déterminé en normalisant l'efficacité de collection en présence d'une microsphère par rapport à la référence sans sphère. Les mesures expérimentales étant moyennées sur toutes les orientations possibles des molécules (car elles diffusent en solution), l'efficacité de collection théorique a été moyennée selon les trois directions de l'espace $\vec{x}$,$\vec{y}$ et $\vec{z}$. Les résultats de ces simulations sur les gains à la collection sont représentés par

la ligne continue de la Figure 3.8(b) et sont en accord avec les mesures expérimentales. La mince différence peut s'expliquer par le fait que les simulations numériques ne tiennent pas compte de la moyenne dans l'espace de la position des dipôles, comme c'est le cas en FCS. En combinant les simulations numériques des gains théoriques à l'excitation et à l'émission, nous obtenons les gains de fluorescence total en fonction de taille des microsphères. Nous pouvons remarquer que les valeurs absolues des contribution des gains à l'excitation et à l'emission sont très proches pour tous les diamètres de sphères. Ceci est assez intuitif par principe de réciprocité de la lumière : la surfocalisation du faisceau incident permet une augmentation de l'intensité excitatrice et réciproquement une amélioration de l'efficacité de la collection des photons de fluorescence dans des proportions similaires.

3.2.6 Confinement du volume de détection FCS sous la limite de diffraction

L'accès au nombre de molécules présentes dans le volume de détection permet de déterminer la taille du volume effectif sondé en présence d'une microsphère. Le confinement électromagnétique produit par une microsphère illuminée par faisceau Gaussien focalisé étant dépendant de la position axiale, la réduction du volume d'observation est elle aussi fonction de la position de la sphère par rapport au faisceau incident. Pour quantifier cette dépendance, nous avons mesuré la réduction du volume effectif détecté (qui est simplement le rapport entre le nombre de molécule en l'absence N_{sol} et en présence d'une sphère N_{sphere}) en fonction de la position selon l'axe $\vec{z}$. Comme nous pouvons le remarquer en Figure 3.10(a), la réduction de volume de détection (représentée par les losanges bleus) est très fortement dépendante de la position axiale $\vec{z}$ et une réduction d'un facteur 10 du volume d'analyse FCS peut être mesurée pour un positionnement optimal (pour z =2.5 μm). L'exaltation de fluorescence $\eta_{F,low}$ dépend également de la position de la sphère par rapport au faisceau incident comme remarquable sur la Figure 3.10(a) (où l'exaltation de fluorescence est représentée par les cercles rouges). L'exaltation de fluorescence et la réduction du volume de détection obtenues en fonction du diamètre des sphères sont résumées en Figure 3.10(b) pour les positions optimales en $\vec{z}$. Une sphère de 2 μm permet de réduire le volume d'observation d'un facteur 10 et en même temps d'exalter la fluorescence moléculaire d'un facteur 5, sans modification du rendement quantique de l'émetteur diffusant. La réduction du volume d'observation est une condition cruciale pour conduire des mesures FCS à forte concentration [3, 4].

3.2.7 Comparaison des performances entre microsphères de latex (n_s =1.59) et mélamine (n_s =1.68)

Nous avons vu précedemment que les microsphères de latex (n_s =1.59) pouvaient exalter jusqu'à 5 fois la fluorescence moléculaire. De plus, nous avons indiqué dans la section 3.1.3 que des sphères fabriquées en résine de mélamine (n_s =1.68) permettaient d'obtenir des confinements électromagnétiques plus importants et donc des intensités locales d'excitation

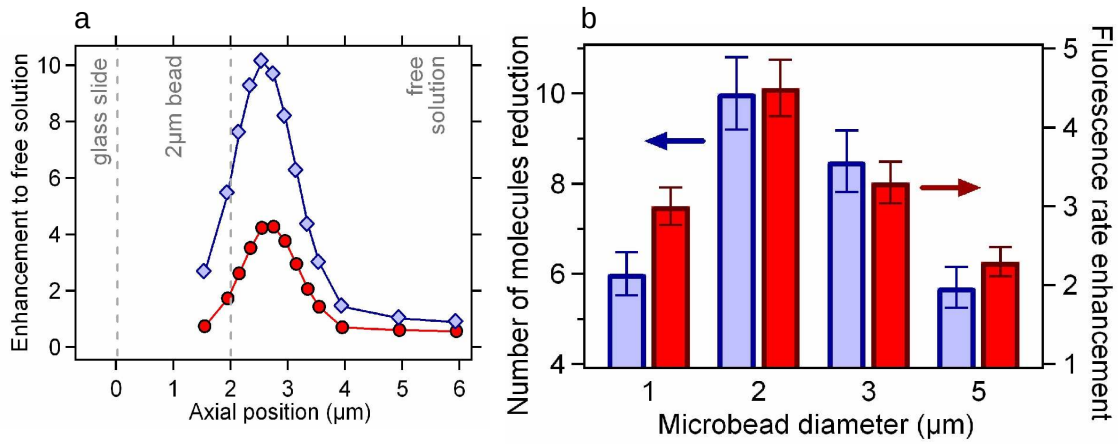


Figure 3.10 – *(a) Réduction du volume d'observation (losanges bleus) et exaltation de fluorescence (cercles rouges) en fonction de la position de la sphère de 2 µm par rapport au faisceau incident. (b) Bilan des exaltation de fluorescence et de la réduction du volume d'observation en fonction du diamètre des microsphères.*

plus élevées. Nous allons à présent montrer qu'une sphère de mélamine de 2 μm permet d'obtenir une exaltation de fluorescence plus forte q'une sphère de latex [71]. Toutes les mesures expérimentales FCS (détermination du nombre moyen de molécules N, évolution des taux de comptage par molécule CRM en fonction de la puissance d'excitation) effectuées avec les sphères de latex ont été reprises pour le cas d'une sphère de mélamine de 2 μm. L'exaltation de fluorescence $\eta_{F,low}$ mesurée à faible intensité d'excitation atteint un facteur 7.5 avec la sphère de mélamine ce qui est une valeur plus forte que celle obtenue avec la sphère de latex comme indiqué en Figure 3.11. Ce gain de fluorescence s'explique majoritairement par une densité d'énergie électromagnétique plus forte au voisinage d'une sphère de mélamine, la collection n'étant quasiment pas affectée par la nature du diélectrique utilisé. Enfin, le confinement du volume d'observation est d'autant plus marqué avec la sphère de mélamine, où une réduction du nombre de molécules d'un facteur 13 est obtenue. La comparaison des exaltations de fluorescence, des gains à l'excitation et à l'émission et la réduction du volume d'analyse entre les sphères de 2 μm de latex et mélamine est résumée en Figure 3.11.

3.3 Exaltation de fluorescence sous excitation biphotonique

La fluorescence sous excitation à deux photons (TPEF pour Two Photons Fluorescence Excitation) est un contraste de plus en plus utilisé en microscopie optique depuis sa

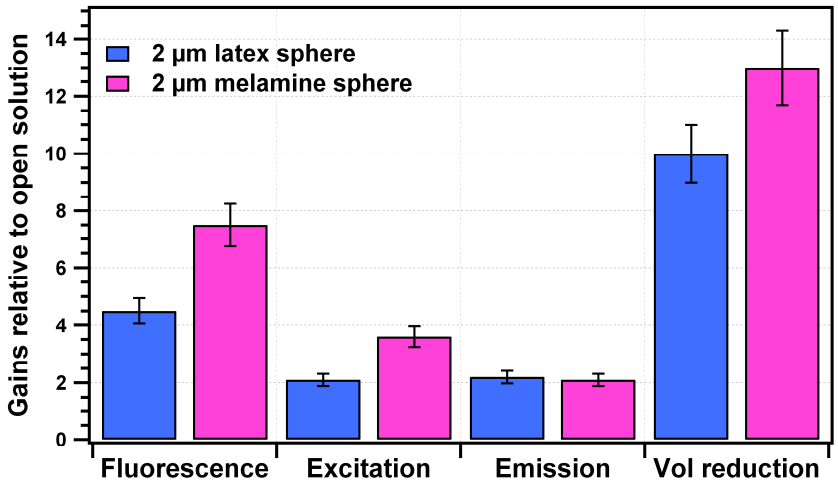


FIGURE 3.11 – *Exaltation de fluorescence, contributions des gains à l'excitation et à l'émission, et réduction du volume de détection FCS par rapport au cas de la solution de référence pour des sphères de 2 μm en latex ou mélamine.*

première démonstration expérimentale en 1990 [72]. De par la nature non linéaire de l'excitation (deux photons incident doivent être absorbés quasi-simultannément par la molécule), le processus de fluorescence à deux photons est intrisèquement résolu en trois dimensions ce qui permet d'améliorer le contraste d'imagerie et de limiter le photoblanchiment des molécules des plans hors-focus par rapport à la fluorescence à un photon. La fluorescence à deux photons a également ouvert de nouvelles opportunités pour étendre les applications de la spectroscopie par corrélation de fluorescence [73, 74, 75, 76, 77]. Cependant, la faible section efficace du processus d'absorption à deux photons (σ_{2P} est de l'ordre de 10^{-50} cm^{4}s/photon alors que la section efficace d'absorption à un photon σ_P est de l'ordre de 10^{-16} cm^2) ne permet pas d'obtenir des taux de comptage par molécule CRM élevés et donc un bon rapport signal sur bruit.
Pour les raisons invoquées précédemment, exalter la fluorescence moléculaire sous excitation à deux photons permettrait d'améliorer efficacement la TPEFCS (TPEFCS pour Two Photons Excitation Fluorescence Correlation Spectroscopy) et plus généralement ouvrir de nouvelles possibilités pour les applications biophotoniques. Afin d'atteindre ce but, de nombreuses études ont suggéré l'emploi de nanostructures métalliques [69, 78, 79] pour exalter les champs optiques incidents et améliorer l'efficacité de collection sous excitation multi-photonique du phénomène de fluorescence. Toutefois, le fort signal de luminescence généré par la structure elle-même limite nettement le rapport signal sur bruit nécessaire pour détecter une molécule unique. De plus, l'emploi de nanostructures plasmoniques est également limité par la tenue au flux des substrats métalliques, qui subissent des dommages photo-induits irréversibles sous forte excitation optique (comme c'est le cas avec

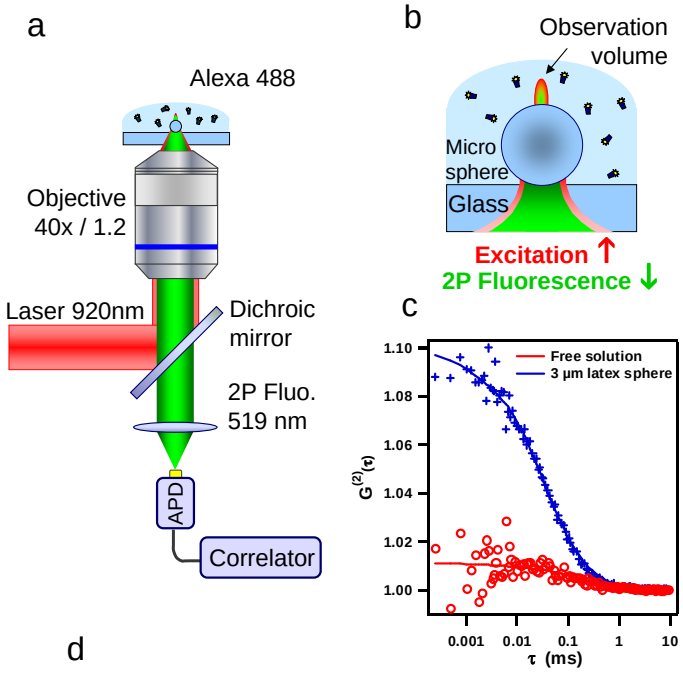
l'excitation par source impulsionnelle).
Afin de contourner les problèmes de luminescence et de tenue au flux des structures plasmoniques, de précédents travaux ont suggéré l'utilisation de microsphères de silice ajoutées à une solution contenant des molécules de rhodamine B en cuvette [53]. Une exaltation de 30% de la fluorescence à deux photons a été mesurée pour cette configuration en intégrant le spectre du signal de la solution de rhodamine B en présence et en l'absence de microsphères. À cause de la moyenne spatiale du phénomène sur une large zone, il n'est pas possible, d'après la méthode expérimentale décrite précédemment, de quantifier le gain de fluorescence à deux photons produit par une microsphère individuelle. Pour cette raison, nous avons voulu caractériser l'exaltation de fluorescence sous excitation à deux photons produit par une sphère unique [80] et par la même occasion, vérifier si ces résultats étaient compatibles avec les mesures sous excitation à un photon.

3.3.1 Dispositif expérimental utilisé pour la spectroscopie de fluorescence sous excitation à deux photons

Le montage utilisé dans cette section diffère quelque peu de celui décrit dans le chapitre 2. Le dispositif expérimental (Figure 3.12(a)) est toujours basé sur le principe d'un microscope inversé avec un objectif à immersion d'ouverture numérique ON=1.2. Pour les mesures FCS à deux photons, une goutte de 50 μL d'Alexa Fluor 488 (A488, Invitrogen, Carlsbad CA, dont les pics d'absorption/émission sont respectivement centrés sur 495 et 519 nm) diluée dans de l'eau pure est déposée au-dessus des échantillons de microsphères. Le nanopositonnement des échantillons selon les trois directions de l'espace est assuré par la platine piezoélectrique. L'excitation à deux photons s'effectue avec un laser impulsionnel accordable Ti :Sapphire qui délivre des impulsions de 150 fs avec un taux de répétition de 80 MHz (Chameleon, Coherent, Santa Clara, CA). Pour les mesures que nous allons décrire, la longueur d'onde d'excitation a été fixée à 920 nm, qui est la longueur d'onde pour laquelle le signal de fluorescence sous excitation à deux photons est optimal sur le montage. Après excitation, le signal de fluorescence est filtré de l'incident laser par un miroir dichroïque et détecté par deux photodiodes à avalanche (PekinElmer SPCM-AQR-14, Boston MA) avec des filtres de fluorescence de type passe-bande (525±25 nm). À cause de la nature non linéaire de l'excitation, il n'est pas utile d'utiliser un trou confocal pour rejeter la lumière provenant des plans hors-focus, ce qui facilite l'alignement du dispositif expérimental comparé au cas de l'excitation à un photon. L'intensité de fluorescence à deux photons est ensuite analysée par le corrélateur ALV6000 pour calculer la fonction de corrélation $g^2(\tau)$. Enfin, les données expérimentales sont étudiées de la même manière que pour l'excitation à un photon.

3.3.2 Résultats expérimentaux

Les mesures FCS sous excitation à deux photons ont été conduites dans le but de mesurer le nombre de molécules N et le taux de comptage par molécule en fonction de l'intensité d'excitation (incrémentée de 7 à 30 mW) dans le cas de la solution de référence



Sphere diameter (µm)	1	1.5	2	3	5
Volume réduction	3.5	5.9	6.7	7.8	6.2

FIGURE 3.12 – *(a) et (b) Dispositif expérimental utilisé pour les mesures FCS sous excitation à deux photons. (c) Corrélogrammes obtenus dans le cas de la solution de référence (bleu) et en présence d'une sphère de 3 µm (rouge) pour une même concentration en molécules d'Alexa 488. (d) Résumé des réductions de volume obtenues pour les différentes tailles de sphères par rapport à la solution de référence.*

et en présence d'une microsphère (diamètre 1.5, 2,3 et 5 μm) placée au point de focalisation de l'objectif. Un exemple de corrélogramme obtenu en solution libre et en présence d'une sphère de 3 μm pour une même concentration est présenté en Figure 3.12(c). La réduction du volume d'observation (la ratio entre le nombre de molécule détectées en solution libre et en présence d'une microsphère) calculée pour chaque diamètre de sphère est indiquée en Figure 3.12(d). L'objectif de forte ouverture numérique utilisé pour les mesures FCS en solution fournissant un volume de détection limité par la diffraction, les volumes sondés en présence de microsphères sont sub-longueurs d'onde, comme dans le cas des résultats obtenus sous excitation de la fluorescence à un photon. On notera en particulier une réduction de volume d'un facteur 8 pour la sphère de 3 μm, ce qui permet de conduire des expériences FCS à plus forte concentration [3, 4].
Les résultats expérimentaux de l'évolution du taux de comptage par molécule CRM en fonction de l'intensité d'excitation sont représentés par des points en Figure 3.13(a) pour

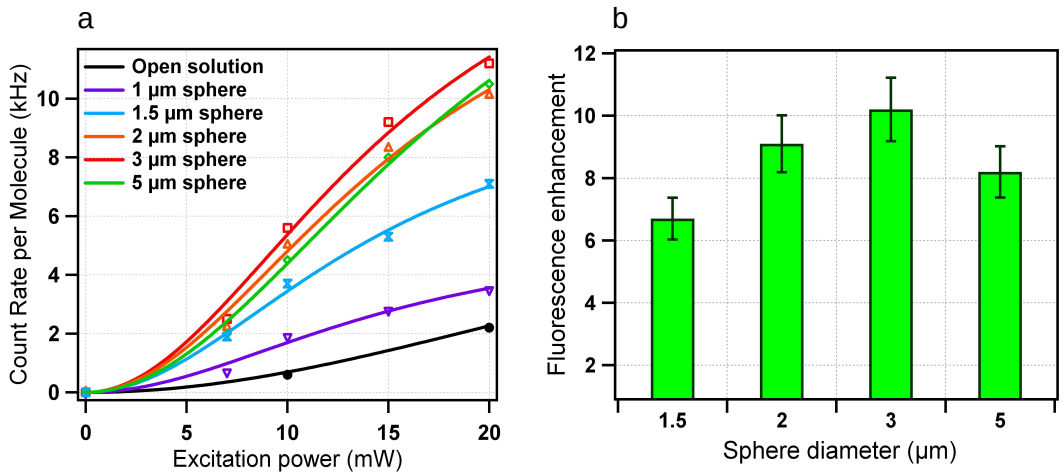


Figure 3.13 – *(a) Evolution du taux de comptage par molécule CRM en fonction de l'intensité d'excitation pour le cas de la solution de référence et pour différents diamètres de microsphères. Les points représentent les mesures expérimentales et les lignes continues symbolisent l'ajustement numérique selon l'équation 3.3. (b) Exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ mesurée dans le régime linéaire normalisée par rapport à la solution de référence pour les différents diamètres de microsphères.*

le cas de la référence en solution et en présence de microsphères. Des taux de comptage par molécule plus élevés pour chaque puissance d'excitation sont obtenus en présence de microsphères comparé au cas de la solution de référence. L'analyse de ces résultats expérimentaux s'effectue en utilisant une expression standard de l'évolution du taux de fluorescence sous excitation à deux photons [2] :

$$CRM = \kappa\ \Phi\ \frac{\sigma_{2P} I_e^2}{1 + I_e^2/I_s^2}. \tag{3.3}$$

où σ_{2P} est la section efficace d'absorption à deux photons du fluorophore considéré (dans le cas présent Alexa Fluor 488) et I_s est l'intensité de saturation sous excitation à deux photons, définie par $I_s = \sqrt{k_{tot}/\sigma_{2P}}$. Les résultats de ces ajustements numériques sont représentés par les lignes continues sur la Figure 3.13(a). Dans le régime linéaire d'excitation de la fluorescence à deux photons ($I_e \ll I_s$), l'expression 3.3 est réduite à $CRM_{low} = \kappa\ \Phi\ \sigma_{2P}\ I_e^2$, ce qui indique que le taux de fluorescence est proportionnel au carré de l'intensité d'excitation. L'exaltation de fluorescence dans le régime linéaire $\eta_{F_{low}} = (CRM_{low})_{sphere}/(CRM_{low})_{solution}$ peut alors se déduire de l'ajustement numérique. Les résultats de ces calculs sont présentés en Figure 3.13(b). Une exaltation de fluorescence à deux photons supérieure à un facteur 6 est obtenue avec chaque diamètre de microsphères. En particulier un gain de fluorescence d'un facteur 10 est mesuré avec une sphère de 3 μm.

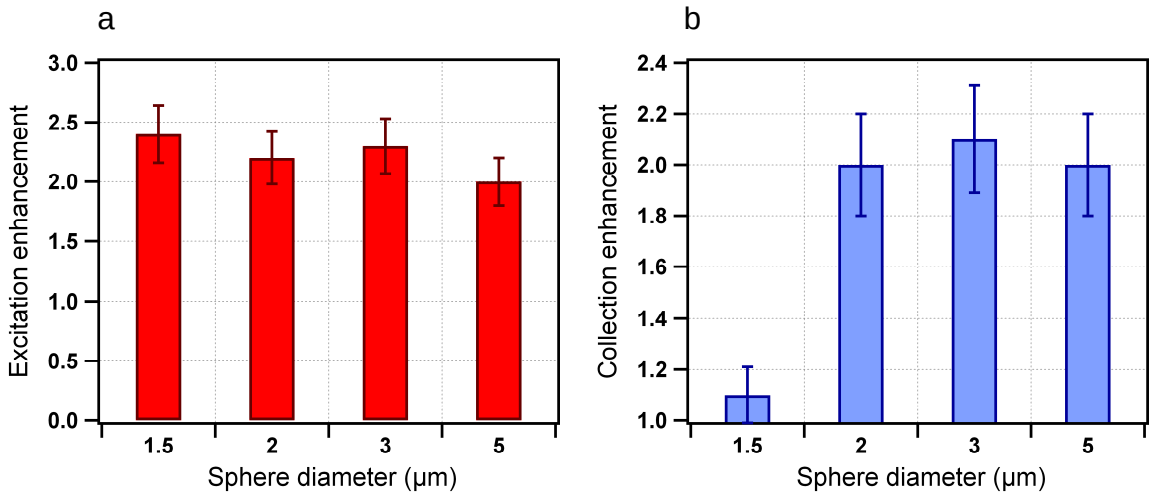


FIGURE 3.14 – *Contributions des gains à l'excitation et à l'émission sur l'exaltation de fluorescence pour les différents diamètres de microsphères.*

Soulignons que pour une puissance d'excitation de 10 mW, le signal de fluorescence total est de 60 kHz pour la solution de référence (sans sphère) et de 72 kHz en présence d'une sphère de 3 μm avec un bruit de photoluminescence (provenant de la sphère) inférieur à 2 kHz. Cela permet d'obtenir un rapport signal sur bruit d'environ 36 en présence de la sphère, avec un bruit de photoluminescence négligeable contrairement aux structures métalliques qui génèrent des niveaux de luminescence élevés [81].
Afin de caractériser la contribution des gains à l'excitation et à l'émission qui contribuent à l'exaltation de fluorescence à deux photons, nous avons étendu la procédure de caractérisation de fluorescence présentée dans le chapitre 2 à l'excitation à deux photons. Dans le régime de saturation (c'est à dire pour $I_e \gg I_s$), le taux de comptage par molécule s'écrit $CRM_{sat} = \kappa\ \Phi\ \sigma_{2P}\ I_s^2$. En considérant que le taux d'émission radiatif des molécules d'Alexa 488 n'est pas affecté par la présence de la microsphère, l'exaltation de fluorescence dans le régime saturé s'écrit : $\eta_{F_{sat}} = (CRM_{low})_{sphere}/(CRM_{low})_{solution} = (\kappa\ \sigma_{2P}\ I_s^2)_{sphere}/(\kappa\ \sigma_{2P}\ I_s^2)_{solution}$. En introduisant l'expression de l'intensité de saturation $I_s = \sqrt{k_{tot}/\sigma_{2P}}$, il vient $\eta_{F_{sat}} = \kappa_{sphere}/\kappa_{solution}$ qui est simplement le gain sur l'efficacité de collection η_κ. Dans le régime linéaire d'excitation, l'exaltation de fluorescence s'écrit (par analogie au cas de l'excitation à un photon) : $\eta_{F_{low}} = \eta_{I_e}^2\ \eta_\kappa$, où η_{I_e} est le gain sur l'intensité d'excitation. Les gains $\eta_{F_{low}}$ et η_κ ayant été déterminés d'après les ajustements numériques de la Figure 3.13(a), nous pouvons déduire le gain sur l'intensité d'excitation $\eta_{I_e} = \sqrt{\eta_{F_{low}}/\eta_\kappa}$. Les gains à l'excitation et à l'émission pour les différents diamètres de sphères sont présentés en Figure 3.14. Comme nous pouvons le constater, l'exaltation de fluorescence d'un facteur 10 obtenue avec la sphère de 3 μm est une combinaison de gains

sur l'excitation et l'émission respectivement d'un facteur 2.3 et 1.9. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus sous excitation à un photon [68], en tenant compte d'un facteur de correction d'échelle spatiale provenant de la différence de longueur d'onde d'excitation, qui est décalée vers les plus hautes longueurs d'onde dans le cas de l'excitation à deux photons.

3.4 Conclusion sur les microsphères diélectriques

Les microsphères diélectriques apparaissent être des antennes optiques simples mais très efficaces pour réduire le volume d'observation en microscopie confocale sous la limite de diffraction et exalter la fluorescence des molécules qui diffusent au voisinage de ces objets. En jouant le rôle de microlentilles placées dans le champ proche des émetteurs, ces sphères permettent d'augmenter l'intensité d'excitation et d'améliorer l'efficacité de collection des photons de fluorescence du dispositif expérimental. Grâce à la procédure de caractérisation de fluorescence développée, nous avons pu expérimentalement et numériquement déterminer le poids relatif des gains à l'excitation et à la collection participant à l'exaltation globale de fluorescence. Enfin, nous soulignerons que les exaltation de fluorescence obtenues sous excitation à un et deux photons au voisinage de microsphères sont très importantes pour les applications biophotoniques. En effet, nous verrons dans le dernier chapitre de cette thèse que les microsphères dielectriques peuvent être très utiles pour les mesures rapides en FCS (c'est à dire pour la réduction du temps d'intégration des mesures), mais également pour les expériences de corrélations croisées à deux couleurs FCCS, les applications endoscopiques et plus généralement dans le domaine de la microscopie confocale.

CHAPITRE 4

Exaltation de fluorescence dans des nano-ouvertures métalliques : influence des paramètres des ouvertures sur l'émission moléculaire

Les nano-ouvertures percées dans des films métalliques ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études expérimentales, théoriques, et appliquées depuis la mise en évidence de leurs propriétés originales de transmission exaltée par Thomas Ebbesen et al [82]. Les résulats obtenus par l'équipe MOSAIC en 2005 [91] sur l'exaltation de fluorescence moléculaire dans des ouvertures nanométriques d'aluminium est l'un des exemples les plus marquants de l'utilisation de ces structures avec des émetteurs dans le champ proche. Pour comprendre l'origine physique cette exaltation, la procédure de caractérisation de fluorescence présentée dans le chapitre 2 a été utilisée et complétée par des calculs théoriques effectués par l'équipe CLARTE. Ces analyses, que nous présenterons tout au long de ce chapitre, ont permis d'améliorer très efficacement le design des ouvertures métalliques en étudiant différents paramètres tels que la géométrie et la taille des ouvertures, la permittivité du métal considéré et la couche d'adhésion métal/substrat utilisée. Ceci a conduit à l'élaboration d'une structure optimisée permettant d'exalter 25× la fluorescence de molécules diffusant dans une ouverture, ce qui est un gain très nettement supérieur à celui obtenu avec les sphères diélectriques présentées dans le chapitre 3. Ces résultats sont importants pour le suivi dynamique de réactions biochimiques à fortes concentrations et plus généralement pour l'analyse moléculaire à l'échelle de quelques émetteurs.

4.1 Introduction sur la transmission extraordinaire de la lumière au travers de nano-ouvertures métalliques

La présence de nano-ouvertures percées dans un film métallique (Figure 4.1 (a)), dont les dimensions sont inférieures à la longueur d'onde de la lumière incidente, a conduit à la découverte de propriétés optiques inattendues comme il a été reporté par Thomas Ebbesen et al en 1998 [82]. Parmi ces effets optiques originaux, la transmission extraordinaire de la lumière (un ordre de grandeur plus élevé que les prédictions de Bethe des années 1940 [83]) et le filtrage spectral de la lumière incidente [84] ont en particulier été mis en évidence. Dès lors, d'importants travaux de recherche fondamentale ont été ménés afin d'étudier et de comprendre l'origine physique de ces phénomènes dans lesquels les plasmons de surface jouent un rôle essentiel. Le traitement de ces effets physiques par un modèle tenant compte de la combinaison des ondes de surface avec une ouverture de dimension sub-longueur d'onde permet d'expliquer l'origine de cette transmission exaltée contrairement au traitement idéalisé de Bethe, qui considérait une ouverture dans un film métallique parfaitement conducteur d'épaisseur nulle. Sous les approximations de Bethe, l'expression de l'efficacité de transmission η_B (normalisée par rapport à la surface de l'ouverture) s'écrit [83] :

$$\eta_B = \frac{64(kr)^4}{27\pi^2} \tag{4.1}$$

où k est la norme du vecteur d'onde de la lumière incidente de longueur d'onde λ ($k = 2\pi/\lambda$) et r est le rayon de l'ouverture. L'efficacité de transmission η_B varie donc en fonction du rapport $(r/\lambda)^4$, ce qui indique que la transmission optique chute très rapidement quand λ devient supérieur à r (Figure 4.1 (b)). Ceci est directement lié au fait que la lumière ne peut pas se propager dans l'ouverture lorsque $\lambda > 4r$, qui est une première approximation de la longueur d'onde de coupure. Dans un cas plus réaliste, la coupure intervient à des longueurs d'onde plus élevées lorsque la conductivité du métal est prise en compte.
Les progrès technologiques effectués en nano-fabrication durant les dernières décénies ont rendu possible la réalisation de nanostructures, permettant ainsi de mesurer les propriétés de transmission et de diffraction par une ouverture métallique de dimensions sub-longueur d'onde dans la gamme des fréquences optiques [85, 86]. Les résultats de ces mesures ont d'une part montrés que la lumière était moins diffractée que prévu [85, 86], et d'autre part que le spectre de transmission mesuré en sortie d'une nano-ouverture métallique circulaire (Figure 4.1 (c)) présente un pic de résonance de l'intensité transmise comme nous pouvons le constater sur la Figure 4.1 (d), ce qui n'était pas prédit par la théorie de Bethe. L'apparition de tels pics de résonance est due à l'excitation des modes de surface plasmons localisés sur les bords des ouvertures métalliques [87], définis par les dimensions latérales des ouvertures, mais aussi à d'autres modes de résonance définis selon la profondeur de l'ouverture et qui contribuent à la transmission extraordinaire [88].
Les propriétés originales des nano-ouvertures métalliques ont été l'objet, malgré leur apparente simplicité, de nombreuses études théoriques et expérimentales [89] et ont ouverts de nouvelles opportunités dans des domaines tels que la miniaturisation des dispositifs op-

tiques et optoélectroniques, la détection chimique mais aussi l'analyse biophysique. L'une des applications biologiques les plus marquantes de l'utilisation des nano-ouvertures métalliques a été effectuée en 2003 par Levene et al [90] en conduisant des études FCS dans des volumes d'analyse sub-longueur d'onde. Cette idée a ensuite été reprise au sein de l'équipe MOSAIC dans le but d'observer des lois de diffusion sous la limite de diffraction.

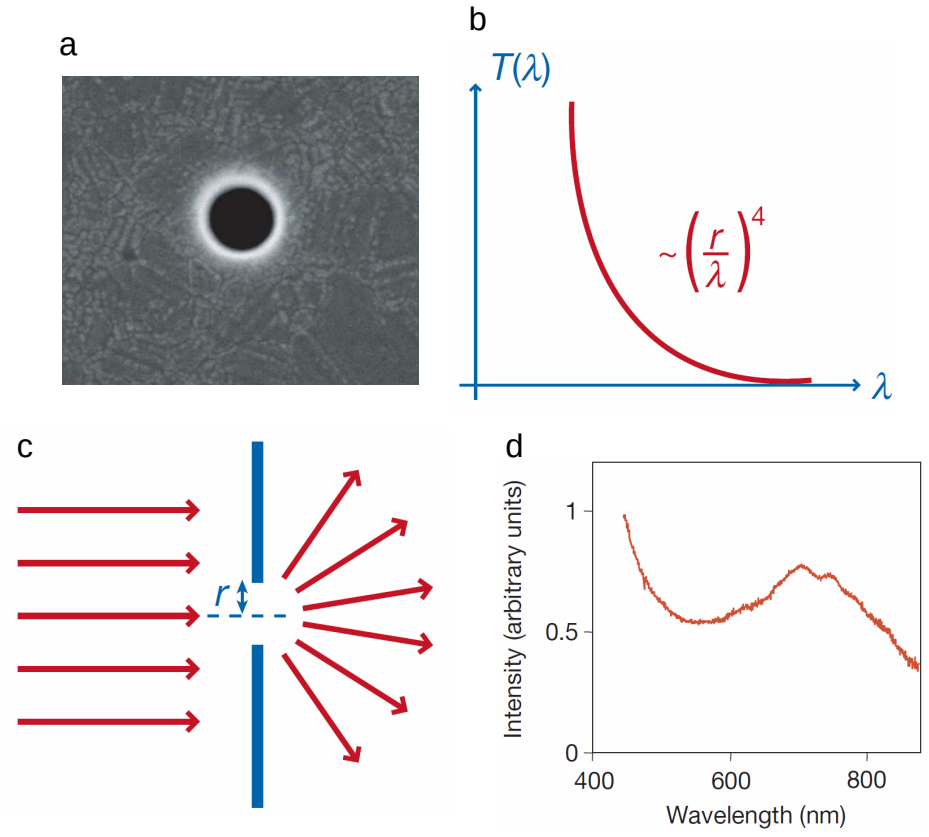


FIGURE 4.1 – *(a) Image de microscope électronique à balayage d'une ouverture de 270 nm percée dans un film d'argent d'épaisseur 200 nm. Spectre de transmission (b) et diffraction (c) de la lumière visible d'une ouverture sub-longueur d'onde percée dans un métal parfait infiniment mince (selon la théorie de Bethe). (d) Spectre de transmission en lumière blanche mesuré pour la structure (a) (unités arbitraires) [84].*

4.2 Exaltation de fluorescence par des nano-ouvertures percées dans un film d'or

Comme indiqué dans la section 4.1, la thématique des nano-ouvertures métalliques a, à l'origine, été développée au sein de l'équipe MOSAIC en collaboration avec Thomas Ebbesen (Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, Strasbourg) pour effectuer des

analyses FCS dans des volumes sub-longueur d'onde. Cependant, dès les première mesures, des résultats assez inattendus sont apparus. En effet, comme il a été reporté en 2005 par Hervé Rigneault et al [91], la fluorescence des molécules diffusants dans des ouvertures métalliques de diamètres compris entre 110 et 420 nm est exaltée. Ces effets n'ont pu être observés par Levene et al [90] car les diamètres des ouvertures utilisées étaient inférieurs à 80 nm, ce qui est un régime bien en dessous de la coupure et pour lequel les pertes par absorption sont importantes comme nous le montrerons dans la section 4.5.
Les premières mesures sur l'exaltation de fluorescence par des nano-ouvertures circulaires ont été effectué sur un film métallique d'aluminium [91]. Pour une ouverture de 150 nm, qui est le diamètre optimal pour un film d'aluminium, les gains mesurés sur le taux de fluorescence de molécules de Rhodamine 6G étaient supérieurs à un facteur 6. D'autres formes d'ouvertures ont également été étudiées comme les géometries rectangulaires [92], mais les gains obtenus sont assez comparables à ceux mesurés avec les géométries circulaires. Pour cette raison, nous avons choisi de ne présenter dans ce chapitre que les résultats obtenus sur les nano-ouvertures circulaires percées dans des films métalliques pour différentes configurations. Une description détaillée sur les contributions physiques à l'origine de l'exaltation de fluorescence dans une nano-ouverture sera également présentée.

4.2.1 Fabrication des nano-ouvertures métalliques

Toutes les nano-ouvertures métalliques utilisées au cours de cette thèse ont été fabriquées à l'Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (Strasbourg). Pour les études que nous allons décrire dans cette section, un film d'or d'épaisseur 200 nm est déposé sur une lamelle de microscope (épaisseur 150 μm) par évaporation thermique. L'adhésion entre le film d'or et le substrat de verre est assurée par une couche de 15 nm de chrome (Cr) partiellement oxydé. Des ouvertures circulaires de diamètres compris entre 80 et 310 nm sont ensuite gravées par faisceau d'ions focalisés (FEI Strata DB235).

4.2.2 Influence de la taille des nano-ouvertures sur l'exaltation de fluorescence moléculaire

L'étude des nano-ouvertures circulaires d'or a été effectuée sur le montage présenté en Figure 4.2, de la même manière que pour l'étude des microsphères du chapitre 3. Contrairement aux sphères diélectriques, les structures métalliques provoquent des changements de durée de vie des émetteurs placés à proximité, qui sont directement liés aux modifications des taux d'émission radiatif k_r^S et non radiatif k_{nr}^S. L'exaltation de fluorescence résultante est donc une combinaison intriquée de gains sur l'intensité d'excitation, sur l'efficacité de collection et sur le rendement quantique d'émission. La détermination des modifications absolues des taux d'émission radiatif et non radiatif est une tâche extrêmement difficile, et qui nécessite de séparer les contributions des modifications sur l'efficacité de collection (κ) et sur le taux d'émission radiatif (k_r^S) participant au gain à l'émission $\eta_{k_{em}}$ ($k_{em} = \kappa\ k_r^S$), ce que ne permet pas la procédure de caractérisation de fluorescence développée. Néanmoins la détermination de la réduction du temps de vie de fluorescence des molécules peut être

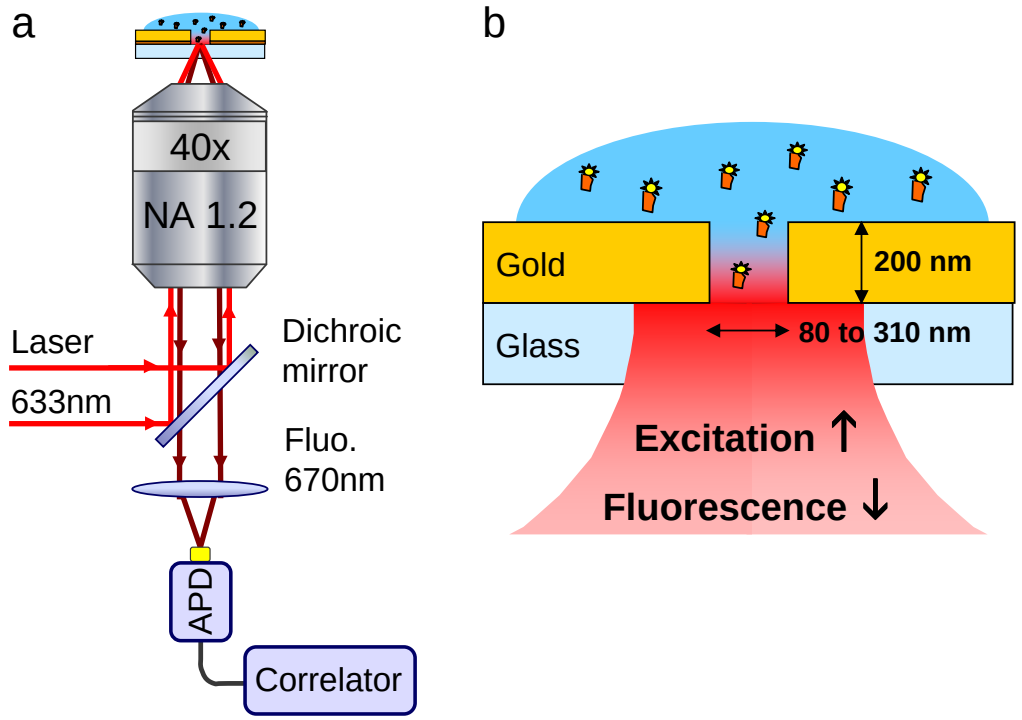


FIGURE 4.2 – *(a) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de nano-ouvertures. (b) Vue agrandie de l'ouverture présentée en (a). Pour les mesures dans les nano-ouvertures, une goutte de 50 μL de solution fluorescente est déposée au-dessus des échantillons. La diffusion constante des molécules à travers le volume de détection permet de limiter l'observation du photoblanchiment.*

considérée comme une mesure relative de la densité locale d'états électromagnétiques dans une nano-ouveture métallique comparée à la solution de référence.
Afin de quantifier l'exaltation de fluorescence sur des molécules d'Alexa Fluor 647 (excitées à λ =633 nm) dans des nano-ouvertures en or (de diamètre allant de 80 à 310 nm), des expériences de spectroscopie de corrélation de fluorescence combinées à des mesures de temps de vie de fluorescence ont été conduites [93]. L'analyse des données FCS s'effectue à l'aide du modèle de diffusion Brownienne de l'équation 2.32 du chapitre 2. Comme au voisinage d'une sphère diélectrique, l'hypothèse d'une diffusion tri-dimensionnelle dans un espace libre ne peut être strictement supposée à l'intérieur d'une nano-ouverture. Cependant, l'information sur l'espace exploré par une molécule dans une nano-ouverture peut être obtenu en considérant le facteur de structure s (pour rappel, s est le ratio entre les dimensions d'excitation dans le plan transverse et longitudial) comme un paramètre libre dans l'analyse numérique. Sous cette considération, le paramètre de structure tend vers l'unité pour toutes les analyses FCS conduites dans des nano-ouvertures. Les corrégrammes obtenus pour les molécules d'Alexa 647 diffusant dans une ouverture de 120 nm sont présentés

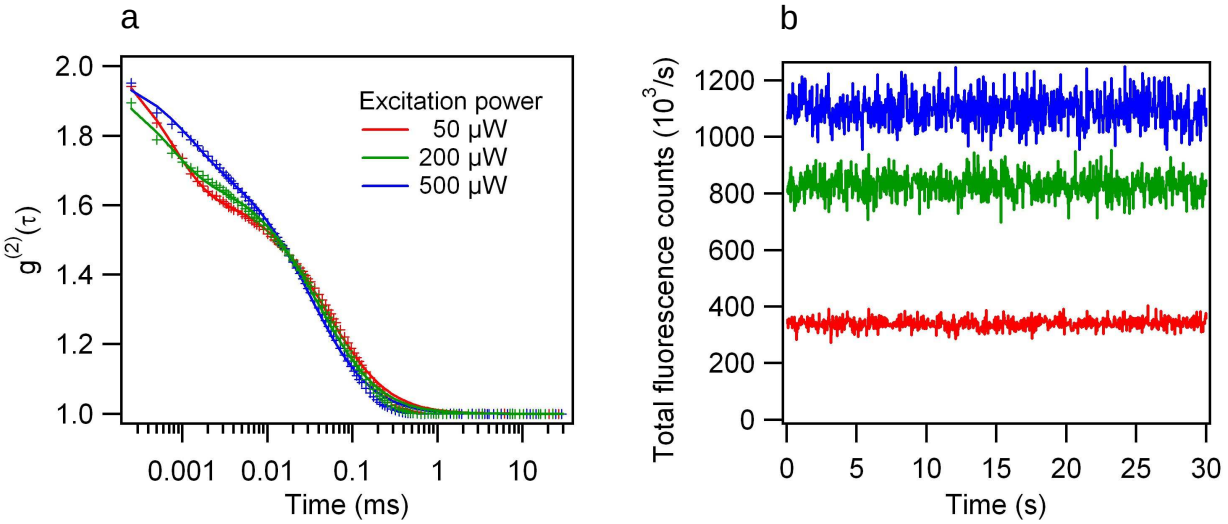


Figure 4.3 – *(a) Fonctions de corrélation obtenues pour des molécules d'Alexa 647 diffusant dans une ouverture de 120 nm (points) et analyses numériques (lignes continues) selon l'équation 2.32 du chapitre 2 pour différentes puissances d'excitation : 50, 200 et 500 μW. (b) Traces temporelles du signal de fluorescence correspondants à (a) pour les différentes puissances d'excitation [93].*

en Figure 4.3 (a) pour différentes puissances d'excitation. L'analyse des résultats a été effectuée en fixant le paramètre $s = 1$, permettant ainsi un ajustement numérique (lignes continues) en très bon accord avec les mesures expérimentales (points). Ces analyses permettent d'accéder au nombre moyen de molécules N diffusants dans l'ouverture, et donc au taux de comptage par molécule CRM.

L'évolution du taux de fluorescence par molécule en fonction de la puissance d'excitation (incrémentée de 25 à 500 μW) est présentée en Figure 4.4 (a) pour chaque diamètre d'ouverture et pour la référence en solution (les points sont les mesures expériementales et les lignes continues réprésentent l'ajustement numérique selon l'équation 2.39 du chapitre 2). Il est clair d'après ces mesures que les nano-ouvertures permettent d'accéder à des taux de comptage par molécule plus élevés que dans le cas de la solution de référence. Pour évaluer ces gains de manière quantitative, l'exaltation de fluorescence dans les régimes linéaires $\eta_{F_{low}}$ et saturés $\eta_{F_{sat}}$ ont été calculés à l'aide des données issues des analyses numériques de la Figure 4.4 (a). Les gains de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ et $\eta_{F_{sat}}$ mesurés sont indiqués en Figure 4.4 (b) en fonction du diamètre de l'ouverture métallique. Ces résultats montrent que des gains de fluorescence supérieurs à un facteur 4 sont obtenus pour chaque taille de nano-ouvertures dans le régime linéaire d'excitation, avec en particulier un optimum pour une ouverture de 120 nm qui permet d'exalter d'un facteur 12 la fluorescence moléculaire. Pour déterminer l'origine physique de cette exaltation de fluorescence, nous devons à présent appliquer la procédure de caractérisation de la fluorescence développée.

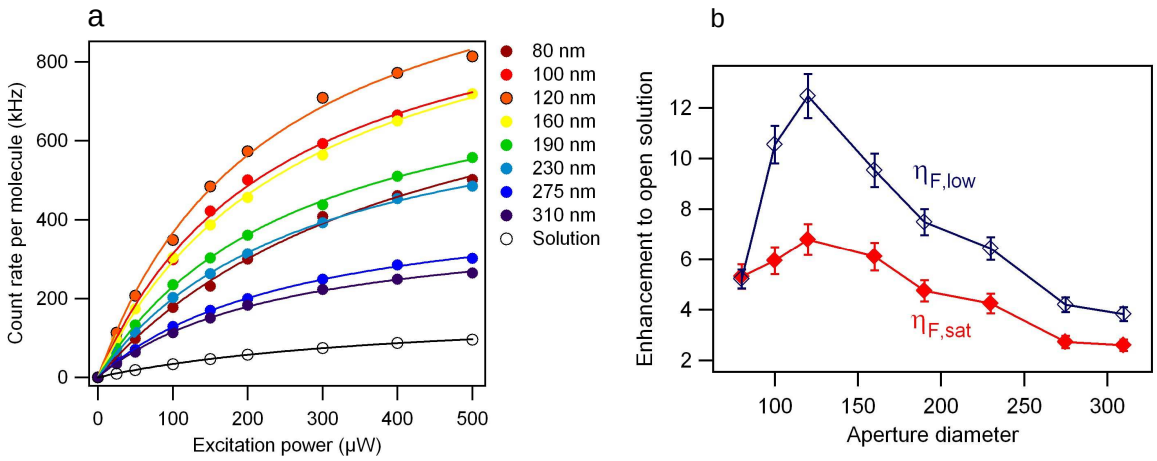


FIGURE 4.4 – *(a) Evolution du taux de comptage par molécule en fonction de la puissance d'excitation dans le cas de la solution de référence et pour les différentes tailles de nano-ouvertures (les points sont les mesures expérimentales et les lignes continues représentent les ajustements numériques selon l'équation 2.39 du chapitre 2). (b) Exaltation de fluorescence dans les régimes linéaire $\eta_{F_{low}}$ et saturé $\eta_{F_{sat}}$ de la fluorescence déduits des ajustements numériques de (a) [93].*

4.2.3 Détermination des gains à l'excitation et à l'émission contribuant à l'exaltation globale de fluorescence

Les changements de propriétés d'émission de fluorescence d'une molécule placée dans une nano-ouverture métallique résultent d'une combinaison intriquée de variations locales et qui sont : une augmentation de l'intensité d'excitation incidente due au confinement électromagnétique dans l'ouverture, une amélioration de la directivité d'émission et une modification du rendement quantique de l'émetteur. Comme nous l'avons montré dans le chapitre 2, l'exaltation de fluorescence dans le régime saturé $\eta_{F_{sat}}$ correspond au gain sur le taux d'émission $\eta_{k_{em}}$ (pour rappel, le taux d'émission est définie par $k_{em} = \kappa\ k_r^S$, où κ est l'efficacité de collection du dispositif expérimental et k_r^S le taux d'émission radiatif). Des exaltations supérieures à un facteur 6 sur le taux d'émission sont obtenues pour des ouvertures de diamètres compris entre 100 et 150 nm (Figure 4.6 (b)). Pour tous les autres diamètre de nano-ouverture, une exaltation minimale de 2.5 est mesurée. Soulignons le fait que les gains à l'émission $\eta_{k_{em}}$ sont dus d'une part à une amélioration de la directivité d'émission vers les détecteurs, une molécule diffusant dans une ouverture émettant préférentiellement vers le bas de l'ouverture (du côté du substrat de verre), et d'autre part à l'augmentation du taux d'émission radiatif k_r^S.
En parallèle des études FCS, des mesures de déclins de fluorescence par TCSPC permettant de déterminer le temps de vie de fluorescence des molécules d'Alexa 647 en solution et dans les nano-ouvertures (pour les différents diamètres) ont été menées. Les résultats sont

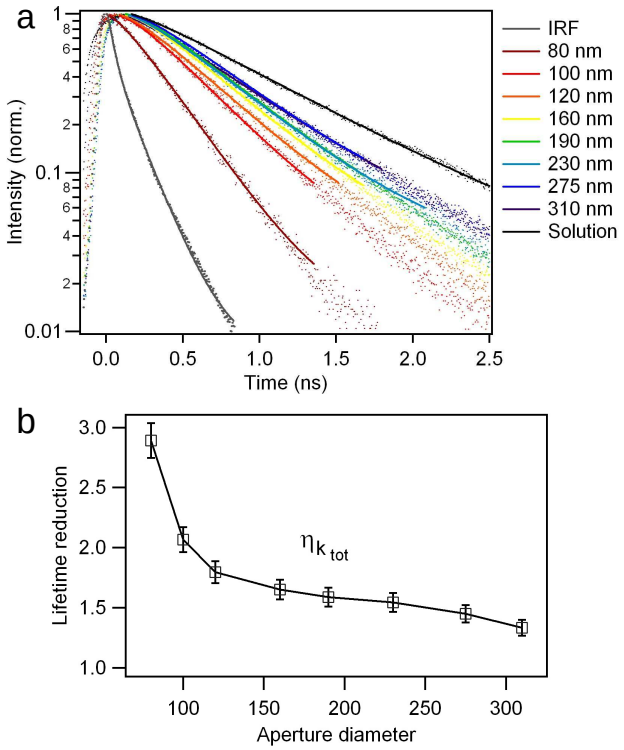


Figure 4.5 – *(a) Traces normalisées du déclin de fluorescence des molécules d'Alexa 647 diffusant en solution et dans les différentes tailles de nano-ouvertures. Les points représentent les mesures expérimentales et les lignes continues indiquent l'ajustement numériques selon l'équation 2.37. Réduction du temps de vie de fluorescence $\eta_{k_{tot}}$, normalisée par rapport au cas de la solution de référence, en fonction du diamètre des ouvertures [93].*

présentés en Figure 4.5 (a), où les points indiquent les mesures expérimentales et les lignes continues représentent l'ajustement numérique utilisant l'équation 2.37. La réduction du temps de vie de fluorescence $\eta_{k_{tot}}$ peut alors calculée pour chaque diamètre d'ouvertures métalliques, comme indiqué en Figure 4.5 (b). Plus la taille de l'ouverture est réduite, plus les molécules diffusant à l'intérieur sont proches des parois métalliques et plus $\eta_{k_{tot}}$ augmente (avec en particulier une réduction d'un facteur $\eta_{k_{tot}}$ =3 pour une ouverture de 80 nm). Ceci est une conséquence directe de la modification de la densité locale d'états photoniques. Comme indiqué précédemment, la réduction du temps de vie de fluorescence peut être vue comme une mesure relative de la densité locale d'états photoniques.
La détermination des gains sur la fluorescence moléculaire $\eta_{F_{low}}$, le taux d'émission $\eta_{k_{em}}$ et le temps de déclin de fluorescence $\eta_{k_{tot}}$ permet à présent d'accéder à l'exaltation sur l'intensité d'excitation par la relation $\eta_{I_e} = \eta_{F_{low}}\ \eta_{k_{tot}}/\eta_{k_{em}}$. Les gains sur le taux d'excitation sont indiqués en Figure 4.6 (d) en fonction du diamètre des ouvertures. Une augmentation de la densité locale d'énergie électromagnétique supérieure à 2 est mesurée pour toutes les

nano-ouvertures, avec un gain η_{I_e} = jusqu'à 3.5 pour un diamètre de 120 nm.

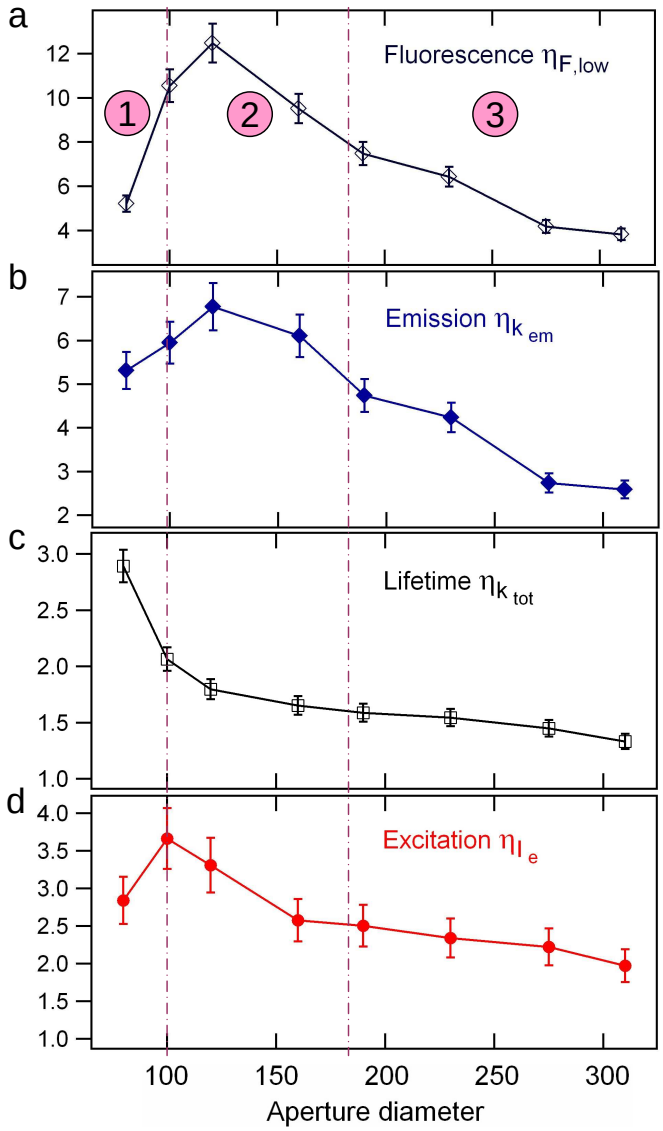


FIGURE 4.6 – *Détermination expérimentale de l'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ (a) et contributions physiques des gains à l'émission $\eta_{k_{em}}$ (b), sur la réduction du temps vie de fluorescence $\eta_{k_{tot}}$ (c) et sur l'intensité d'excitation (d) en fonction du diamètre des nano-ouvertures [93].*

4.2.4 Simulations numériques et interprétation physique

Pour confirmer les résultats expérimentaux de la sous-section précédente, des calculs théoriques ont été effectués afin de déterminer les gains sur l'excitation et l'émission d'une

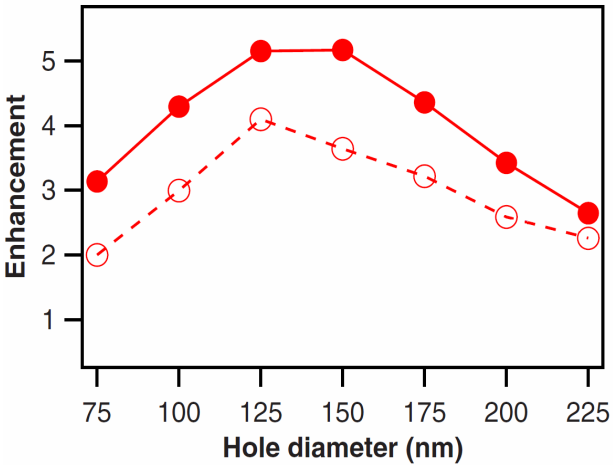


Figure 4.7 – *Contributions des gains à l'excitation (cercles pleins) et à l'émission (cercles vides) en fonction de la taille des nano-ouvertures. Ces résultats ont été calculés par la méthode des éléments finis et moyennés dans un plan de 15 nm à l'intérieur des ouvertures [94].*

molécule placée dans une nano-ouverture [93, 94]. Ces calculs ont été conduits par une analyse numérique basée sur la méthode des éléments finis en utilisant COMSOL MULTIPHYSICS version 3.3. Les dimensions de l'espace de calcul sont de $1.0\times1.0\times1.1$ μm^3, avec des conditions aux limites sur les six faces. Une nano-ouverture unique est placée au centre d'un film d'or d'épaisseur 200 nm déposé sur un substrat de quartz. Pour simplifier les calculs numériques, la zone d'observation a été restreinte à un plan de 15 nm à l'intérieur de l'ouverture. Ceci permet de calculer les contributions des gains relatifs à l'excitation et à l'émission en s'affranchissant de la lourde tâche de normalisation sur le volume complet de l'ouverture.

Afin de déterminer l'exaltation sur l'intensité d'excitation, une onde plane (de longueur d'onde $\lambda = 633$nm) est envoyée à 500 nm de l'ouverture métallique, du côté du substrat de verre. La distribution d'intensité est alors mesurée et moyennée sur le plan d'observation de 15 nm à l'intérieur de l'ouverture. Ces données sont ensuite normalisées par l'intensité moyenne à l'intérieur d'une même surface sans film métallique, permettant ainsi d'accéder au gain sur la densité d'énergie électromagnétique dans une nano-ouverture d'or. Les résultats de ces calculs sont représentés par les cercles pleins en Figure 4.7 et sont en bon accord avec les résultats expérimentaux de la Figure 4.6 (d). En particulier, un optimum sur le gain d'intensité d'excitation est obtenu pour une ouverture de diamètre $\approx$120 nm, comme observé expérimentalement.

Pour le calcul des gains à l'émission, un dipôle de 1 nm est positionné à différents endroits dans le plan de 15 nm dans la nano-ouverture, de la même manière que pour le calcul à l'excitation. La puissance de l'émission rayonnée par le dipôle est estimée en intégrant le vecteur de Poynting selon la composante longitudinale $\vec{z}$ dans un plan localisé 20 nm

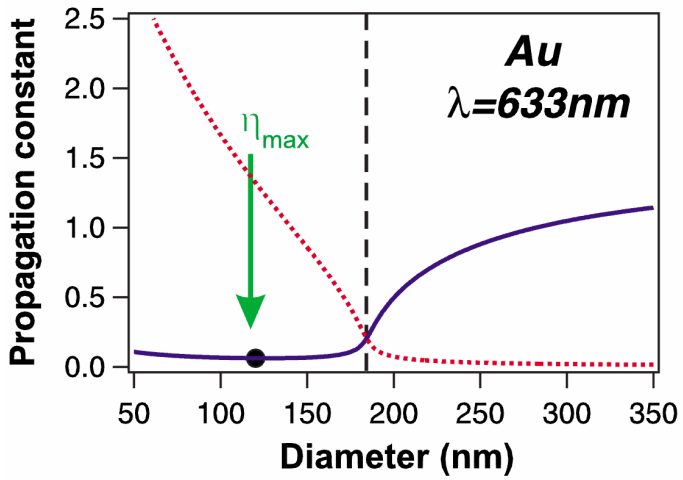


FIGURE 4.8 – *Constante de propagation γ du mode guidé fondamental à l'intérieur d'une ouverture d'or (dans un milieu aqueux d'indice n =1.33) en fonction du diamètre de l'ouverture. La ligne continue représente la partie réelle de γ et la ligne en pointillée sa partie imaginaire. La ligne verticale en pointillée représente la position intuitive de la coupure qui est l'intersection entre les parties réelle et imaginaire de γ. Le diamètre de nano-ouverture pour lequel l'exaltation de fluorescence est maximale est indiqué par la flèche verte et la position pour laquelle la vitesse de groupe v_g est minimale est représentée par un point noir sur la courbe de la partie réelle de γ [94].*

sous le substrat métallique. En normalisant cette puissance par celle calculée en l'absence d'ouverture métallique, on accède au gain à l'émission. Les résultats des gains à l'émission obtenus pour les différents diamètres d'ouvertures sont présentés en Figure 4.7 (cercles vides). Notons que ces calculs ont été effectués pour des orientations de dipôles selon les directions $\vec{x}$, $\vec{y}$ et $\vec{z}$, et les gains à l'émission présentés résultent d'une moyenne de ces différentes orientations. Comme pour l'excitation, on observe un optimum de gain à l'émission pour une ouverture d'environ 120 nm. Ces deux effets combinés sont à l'origine du pic d'exaltation de fluorescence obtenu avec une ouverture d'or de 120 nm. En complément de la détermination des gains à l'excitation et à l'émission, la constante de propagation γ du mode guidé fondamental à l'intérieur d'une ouverture cylindrique infiniment longue a été calculée en fonction du diamètre de l'ouverture par une méthode différentielle [95] (Figure 4.8). L'incide du milieu à l'intérieur du cylindre est fixé à n =1.33, ce qui correspond à la configuration expérimentale pour laquelle les molécules organiques d'Alexa 647 diffusent dans le solvant aqueux. La constante γ est définie comme $\gamma = k_z/k_0$, avec $k_0 = 2\pi/\lambda$. Si l'on considère un conducteur métallique parfait, la coupure est définie comme le diamètre de l'ouverture pour laquelle la partie réelle de la constante de propagation γ s'annule. Si le taille de la nano-ouverture est inférieure à la coupure, γ est imaginaire et il n'existe plus de mode guidé propagatif. Une autre caractéristique de la coupure est que la vitesse de groupe v_g s'annule. Dans le cas d'une métal réel (c'est à dire en tenant compte de l'ab-

sorption), il n'existe pas de coupure définie par l'annulation de la constante de propagation γ. On peut cependant définir de manière assez intuituve la coupure comme la taille de l'ouverture lorsque la partie imaginaire de la constante γ devient supérieure à sa partie réelle [96], ce qui correspond au diamètre indiqué par la ligne verticale en pointillée sur la Figure 4.8 (qui est l'intersection entre les courbes des parties réelle et imaginaire de la constante de propagation γ). De manière assez surprenante, le diamètre de nano-ouverture (120 nm) pour lequel l'exaltation de fluorescence est maximale se situe 50 nm en-dessous de la coupure intuitive. Pour expliquer cet effet, il faut préciser que pour un matériau absorbant, l'intersection entre les parties réelle et imaginaire de la constante de propagation γ ne coïncide plus avec une vitesse de groupe v_g nulle. En effet, pour un métal réel, la vitesse de groupe v_g ne s'annule pas mais passe par un minimum quand la partie réelle de la constante γ est minimale, ce qui correspond également à un maximum de densité locale d'états photoniques [97]. Le minimum de la vitesse de groupe est indiqué par le point noir sur la courbe de la partie réelle de γ de la Figure 4.8. Comme remarquable, cette position correspond également au diamètre d'ouverture métallique pour lequel l'exaltation de fluorescence est maximale. Le gain sur la densité d'énergie électromagnétique à l'intérieur d'une nano-ouverture est donc corrélée avec un maximum de densité de modes photoniques.
L'étude des propriétés des nano-ouvertures avec des émetteurs dans le champ proche a permis de mettre en évidence 3 types de régime comme indiqué en Figure 4.6. Dans la zone n°2, la densité d'energie électromagnétique étant maximale (le champ est évanescent et reste confiné dans la partie inférieure des ouvertures car leurs diamètres sont inférieurs à la coupure), l'exaltation de fluorescence est optimale. Au dessus de la coupure (zone n°3), le champ électromagnétique étant propagatif, la densité d'energie électromagnétique diminue par rapport à la zone n°2, ce qui entraîne également une chute de l'exaltation de fluorescence. Enfin, dans la zone 1, les molécules étant proches des parois métalliques et à cause de l'augmentation des pertes ohmiques (la partie imaginaire de la constante de propagation γ devient importante dans la zone n°1), l'exaltation de fluorescence chute fortement. Ces résultats doivent être pris en considération pour l'optimisation du design des nano-ouvertures métalliques permettant d'exalter la détection de molécules fluorescentes en solution.

4.2.5 Analyse spectrale de l'exaltation de fluorescence dans des nano-ouvertures d'or

En complément des expériences FCS, des analyses spectrales ont été conduites pour étudier l'influence des nano-ouvertures d'or sur le spectre d'émission des molécules d'Alexa 647. Les mesures spectrales ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre à réseau (Jobin-Yvon SPEX 270M) équipé d'une caméra CCD refroidie par oxygène liquide. Les spectres des intensités de fluorescence obtenues ont été normalisés par le nombre de molécules présentes dans le volume d'analyse déduit d'après les études FCS de la sous-section 4.2.2. Les résultats de ces mesures sont présentés en Figure 4.9 (a) pour les différents diamètres de

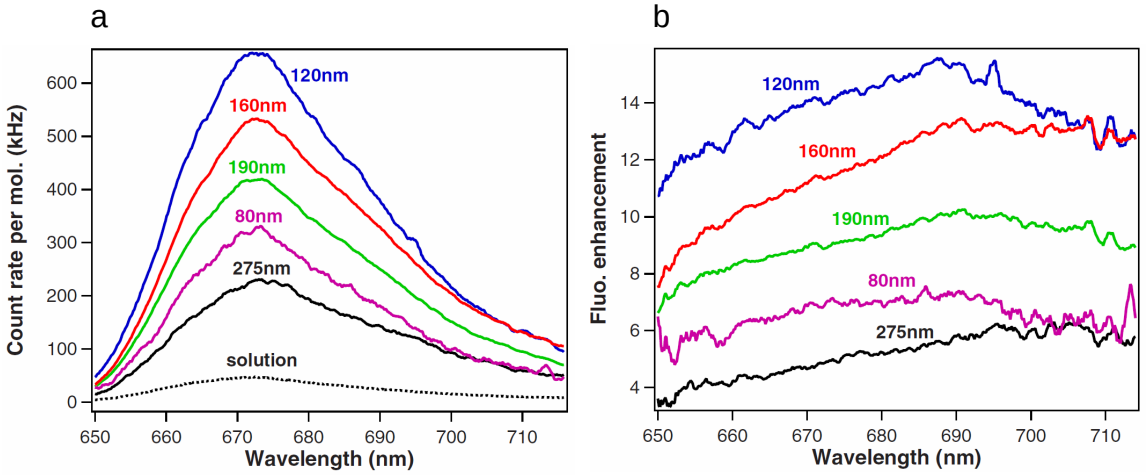


FIGURE 4.9 – *(a) Spectre intégré du taux de fluorescence par émetteur en fonction de la longueur d'onde d'émission des molécules d'Alexa 647 diffusant dans les nano-ouvertures d'or et dans le cas de la référence en solution (temps d'acquisition : 10 s).(b) Exaltation de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission dans les nano-ouvertures normalisée par rapport à la solution de référence [94].*

nano-ouvertures et dans le cas de la solution de référence. Comme attendu, le taux de fluorescence par émetteur est exalté dans toute la gamme spectrale d'émission de fluorescence, avec un gain maximal obtenu pour une ouverture de 120 nm. De plus, la forme du spectre d'émission des molécules d'Alexa 647 est globalement inchangée dans les nano-ouvertures. Les spectres d'émission des intensités par molécule obtenus dans les ouvertures ont été ensuite normalisés par rapport à la référence en solution pour évaluer la dépendance spectrale de l'exaltation de fluorescence η (Figure 4.9 (b)). Dans la gamme 650-690 nm, l'exaltation de fluorescence η augmente en fonction de la longueur d'onde d'émission. Le spectre d'émission des molécules utilisées doit donc être pris en considération pour maximiser les gains de fluorescence obtenus.

4.3 Augmentation du confinement électromagnétique à l'intérieur d'ouvertures de diamètres supérieurs à 150 nm par ajout d'une couche supérieure de chrome

Nous avons vu dans la sous-section 4.2.4 qu'il est possible de distinguer trois types de régimes dans les nano-ouvertures. Dans la zone n°3 de la Figure 4.6, la propagation du champ électromagnétique a pour effet de diminuer l'exaltation de fluorescence. En déposant une couche métallique supplémentaire au-dessus du film d'or, il est possible de diminuer la transmission de la lumière et donc confiner l'énergie électromagnétique dans la

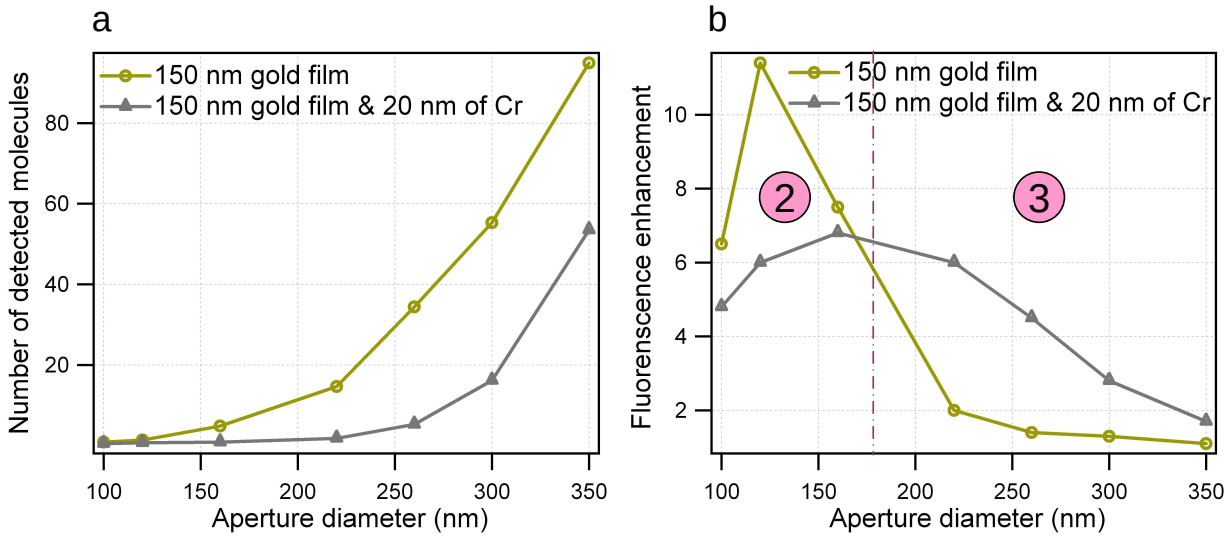


Figure 4.10 – *Evolution du nombre moyen de molécules N (a) et du taux de fluorescence par émetteur CRM (b) en fonction du diamètre des nano-ouvertures percées dans un film d'or en présence (gris) et en l'abscence (jaune) d'une couche supérieure de 20 nm de chrome.*

partie inférieure des nano-ouvertures de la zone n°3. Pour cette étude, un couche de 15 nm de chrome oxydé assure l'adhésion entre un substrat de verre et un film d'or d'épaisseur 150 nm. Une couche de 20 nm de chrome est ensuite déposée au-dessus du film d'or. Des ouvertures circulaires de diamètres 100, 120, 160, 220, 260, 300 et 350 nm sont alors gravées par faisceau d'ions focalisés. Les mêmes diamètres d'ouvertures ont également été gravées dans un échantillon de référence constitué par un film de 150 nm d'or déposé sur un substrat de verre avec une couche d'adhésion de 15 nm de chrome.
L'étude de l'influence de la couche de 20 nm au-dessus du film d'or a été effectuée par spectroscopie de corrélation de fluorescence sur des molécules d'Alexa 647. L'analyse des données expérimentales permet de déterminer le nombre moyen de molécules N diffusant dans les ouvertures et le taux de fluorescence par émetteur CRM. L'évolution du nombre de molécules en fonction du diamètre des nano-ouvertures pour les films métalliques composés de 150 nm d'or et de 150 nm d'or + 20 nm de chrome est présentée en Figure 4.10 (a). Le nombre de molécules détectées en présence du film de 20 nm de chrome au dessus du film d'or est fortement réduit comparé au cas du film d'or seul pour des diamètres d'ouvertures supérieurs à 150 nm. La couche supérieure de chrome a pour effet de confiner le champ électromagnétique dans la partie inférieure des ouvertures. La coupure globale du guide est donc décalée vers de plus hautes longueurs d'onde car la transmission de la lumière au travers des ouvertures est freinée par la présence du film de 20 nm de chrome.
L'évolution de l'exaltation de fluorescence en fonction du diamètre des nano-ouvertures pour les films d'or avec et sans couche supérieure de chrome est présentée en Figure 4.10 (b).

Ces données ont été obtenues en normalisant les taux de comptage par molécules mesurés pour les différentes ouvertures étudiées par rapport à la solution de référence. Pour le film d'or seul, un gain de fluorescence d'un facteur $\eta_{F_{low}}$ =11.5 est obtenu avec une ouverture de 120 nm ce qui est en accord avec les résultats de la section 4.2. Dans la zone n°2, les gains de fluorescence mesurés en présence de la couche supérieure de 20 nm de chrome sont inférieurs à ceux obtenus avec un film d'or seul. Cependant, dans la zone n°3, les gains $\eta_{F_{low}}$ sont plus importants en utilisant la couche de chrome au dessus du film d'or. Pour un diamètre d'ouverture de 220 nm, l'exaltation de fluorescence moléculaire est augmentée d'un facteur 2 à un facteur 6 en présence du film de 20 nm de chrome. Ceci est directement lié au décalage de la fréquence de coupure, qui permet un confinement électromagnétique pour des ouvertures de diamètres supérieurs à 150 nm. Ces résultats ont été utilisés pour diminuer la transmission de la lumière au travers de nano-ouvertures corruguées comme nous le montrerons dans le chapitre 5.

4.4 Prédiction de l'exaltation de fluorescence dans une nano-ouverture en fonction du rendement quantique de l'émetteur utilisé

Comme il a été indiqué dans le chapitre 1 de cette thèse, le facteur d'exaltation de fluorescence dépend très fortement de la sonde fluorescente utilisée et plus précisement de son rendement quantique Φ. Pour un fluorophore idéal (Φ =100%), l'exaltation de fluorescence provient uniquement de la contribution des gains sur l'intensité d'excitation et l'efficacité de collection, aucun gain ne pouvant être obtenu sur le rendement quantique. Plus le rendement quantique Φ d'un émetteur est faible, plus l'exaltation de fluorescence au voisinage d'une nano-antenne peut être importante, dans la limite où les pertes ne dominent pas les intéractions lumière-matière. Pour quantifier la dépendance de l'exaltation de fluorescence en fonction du rendement quantique de l'émetteur diffusant à l'intérieur des nano-ouvertures, un modèle analytique a été développé.
En l'absence de structures plasmoniques (c'est à dire dans le cas de la solution de référence), les molécules présentent un taux d'excitation k_e (avec $k_e = \sigma\ I_e$, où σ est la section efficace d'absorption de la molécule et I_e est l'intensité d'excitation), un taux d'émission radiatif k_r^S, un taux d'émission non radiatif k_{nr}^S et un rendement quantique $\Phi = k_r^S/(k_r^S + k_{nr}^S)$. En introduisant une nano-antenne plasmonique au voisinage des émetteurs fluorescents, le taux d'émission radiatif est modifié en k_r^{S*}, l'efficacité de collection en κ^*, et le taux d'excitation en k_e^*. Le rendement quantique des émetteurs se réécrit alors $\Phi^* = k_r^{S*}/(k_r^{S*} + k_{nr}^S + k_{abs}^*)$, où le taux de relaxations internes non radiatives k_{nr}^S est maintenu constant, et une nouvelle voie de relaxation non radiative k_{abs}^* est introduite pour tenir compte des pertes ohmiques et des transferts non radiatifs d'énergie aux électrons libres du métal [8].
Dans le régime linéaire d'excitation de la fluorescence, l'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ est proportionnelle aux gains sur l'intensité d'excitation η_{I_e} et sur l'émission $\eta_{k_{em}}$, et inversement proportionnelle à la réduction du temps de vie de l'émetteur $\eta_{k_{tot}}$. En explicitant ces

différents termes, l'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ s'écrit :

$$\eta_{F_{low}} = \eta_{I_e} \frac{\eta_{k_{em}}}{\eta_{k_{tot}}} = \frac{k_e^*}{k_e} \frac{\kappa^*}{\kappa} \frac{k_r^{S*}}{k_r^S} \frac{k_r^S + k_{nr}^S}{k_r^{S*} + k_{nr}^S + k_{abs}^*}, \tag{4.2}$$

En introduisant l'expression du rendement quantique initial Φ en l'abscence de nano-antenne plasmonique, l'équation 4.2 se réecrit :

$$\eta_{F_{low}} = \frac{k_e^*}{k_e} \frac{\kappa^*}{\kappa} \frac{k_r^{S*}}{k_r^S} \frac{1}{(1-\Phi) + \Phi\ \zeta} \tag{4.3}$$

où $\zeta = (k_r^{S*}/k_r^S + k_{abs}^*/k_r^S) = (\eta_{k_{tot}} + \Phi - 1)/\Phi$. La quantité ζ pouvant être calibrée lors de la caractérisation expérimentale des structures étudiées, celle-ci peut être utilisée comme un paramètre fixe. L'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ peut alors être tracée (d'après l'équation 4.3) en fonction du rendement quantique inital Φ de l'émetteur.
Les gains de fluorescence moléculaire en fonction du rendement quantique initial de l'émetteur utilisé sont indiqués en Figure 4.11 pour différents diamètres de nano-ouvertures (exprimés en unité de longueur d'onde d'excitation). Pour une ouverture de diamètre 0.2λ, l'exaltation de fluorescence passe d'un facteur 12 à 22 lorsque le rendement quantique de l'émetteur est diminué de 30 à 1%. Ces prédictions analytiques ont été vérifiées expérimentalement en mesurant l'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ dans des nano-ouvertures corruguées lorsque l'on diminue le rendement quantique des molécules d'Alexa 647 (à l'aide d'un quencher) comme nous le verrons dans le chapitre 5.

4.5 Comparaisons des performances entre nano-ouvertures percées dans des films d'or et d'aluminium

Les études expérimentales présentées dans la section 4.2 ont été reconduites pour caractériser l'influence de la permittivité du métal utilisé sur l'exaltation de fluorescence dans une nano-ouverture [94, 98]. Pour ce faire, des mesures sur des ouvertures de diamètre compris entre 120 et 280 nm percées dans un film d'aluminium (épaisseur du film : 200 nm, aucune couche supplémentaire n'est nécessaire pour assurer l'adhésion entre le film métallique et le substrat de verre) ont été effectuées. La gravure de ces ouvertures s'effectue par faisceau d'ions focalisés, de la même manière que pour le film d'or.

4.5.1 Influence de la taille des ouvertures en aluminium sur l'exaltation de fluorescence

L'évolution du taux de fluorescence des molécules d'Alexa 647 (excitées à λ =633nm) en fonction de la puissance d'excitation est présentée en Figure 4.12 (a) pour une ouverture en aluminium de 170 nm (qui correspond au diamètre optimum) et dans le cas de la solution de référence. Ces données peuvent être directement comparées avec les résultats

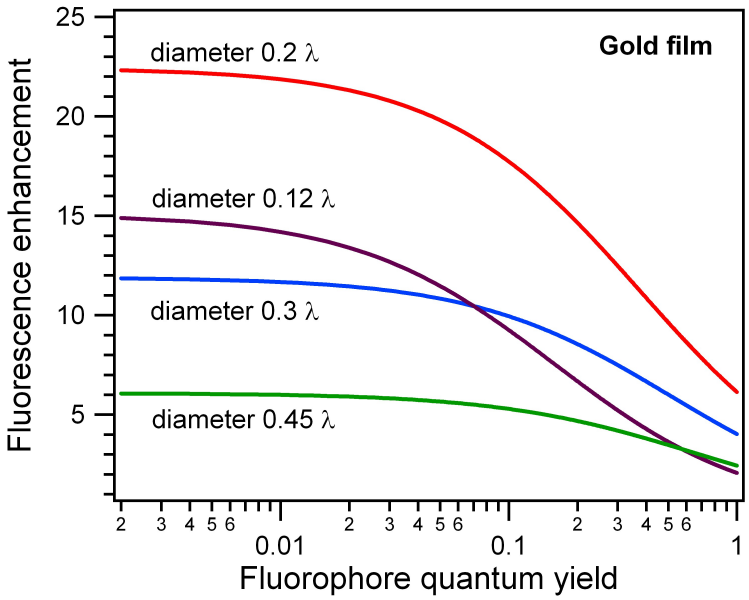


FIGURE 4.11 – *Exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ dans le régime linéaire d'excitation en fonction du rendement quantique initial de l'émetteur fluorescent utilisé obtenue d'après l'équation 4.3 pour des nano-ouvertures (de diamètres exprimés en unité de la longueur d'onde d'excitation λ) percées dans un film d'or [98].*

obtenus pour des nano-ouvertures d'or. Les taux de comptage par molécules mesurés dans les ouvertures d'aluminium sont plus élévés que dans le cas de la solution de référence, mais plus faibles que ceux obtenus avec le film d'or. L'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ dans le régime linéaire d'excitation (déduite de l'analyse numérique selon l'équation 2.39 des résultats expérimentaux de la Figure 4.12 (a)) pour chaque diamètre de nano-ouvertures en aluminium est indiquée en Figure 4.12 (b) (carré bleu). Un gain de fluorescence d'un facteur $\eta_{F_{low}}$ =8 par rapport à la solution de référence est obtenu avec une ouverture en aluminium de 170 nm, ce qui est une valeur plus faible que celle mesurée pour une ouverture en or de 120 nm ($\eta_{F_{low}}$ =12). Le décalage de 50 nm sur le diamètre optimum de l'ouverture est une conséquence directe des différences de permittivité complexe entre l'or et l'aluminium.

4.5.2 Contributions relatives des gains à l'excitation et à l'émission et fréquence de coupure

Les gains sur le renforcement de densité d'energie électromagnétique η_{I_e} et sur l'émission des molécules $\eta_{k_{em}}$ ont été calculés selon la procédure de caractérisation expérimentale développée. Les résultats sont représentés par les carrés bleus en Figure 4.13 (a) et (b) et peuvent être comparés aux valeurs obtenues en utilisant un film d'or (cercles rouges).

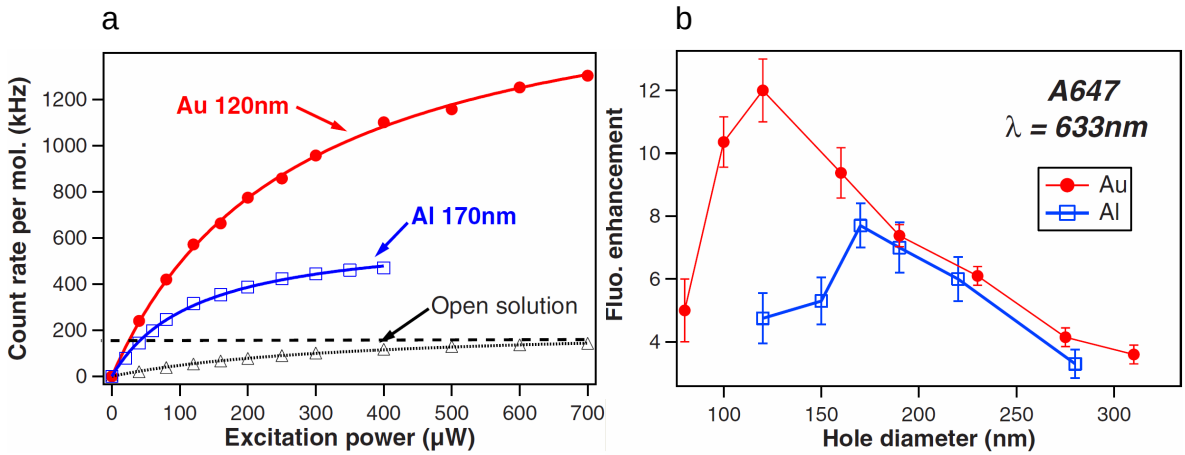


Figure 4.12 – *(a) Evolution des taux de comptage par molécules CRM en fonction de la puissance d'excitation pour les différentes tailles d'ouvertures. Les carrés bleus et les cercles rouges indiquent respectivement les mesures expérimentales obtenues pour les films d'aluminium et d'or et les lignes continues représentent l'ajustement numérique selon l'équation 2.39. (b) Exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ dans le régime linéaire d'excitation des molécules d'Alexa 647 pour les films d'aluminium (carrés bleus) et d'or (cercles rouges) déduits des ajustements numériques de (a) [94].*

L'émission est affectée de façon majeure par la permittivité du métal utilisée. En particulier, pour les diamètres optimum d'ouvertures, les gains à l'émission sont respectivement de 6.8 et 2.8 pour les films d'or et d'aluminium, soit une réduction de 59% sur le nombre de photons de fluorescence collecté.
De manière assez surprenante, l'exaltation sur l'intensité d'excitation calculée pour les ouvertures en aluminium est supérieure à celle des ouvertures en or. En particulier, un gain d'un facteur 4.8 est obtenu avec une ouverture d'aluminium de 120 nm, soit une augmentation de 31% par rapport au film d'or pour le même diamètre d'ouverture. Malgré le fait que l'intensité d'excitation soit plus fortement augmentée dans les nano-ouvertures d'aluminium, l'exaltation de fluorescence globale est de loin supérieure avec les nano-ouvertures d'or.
Les calculs des parties réelle et imaginaire de la constante de propagation γ sont présentés en Figure 4.13 (c). Comme dans le cas du film d'or, la coupure intuitive ne coïncide pas avec le diamètre d'ouverture pour lequel l'exaltation de fluorescence est maximale, mais correspond approximativement au diamètre pour lequel la vitesse de groupe est minimale. Pour des tailles d'ouvertures inférieure à 240 nm, la partie imaginaire de la constante de propagation γ croit de manière exponentielle. Le fait qu'aucune exaltation de fluorescence n'ait été détectée par Levene et al [90] dans des nano-ouvertures en aluminium de diamètres inférieurs à 80 nm semble être dû aux pertes par absorption dans ce régime.

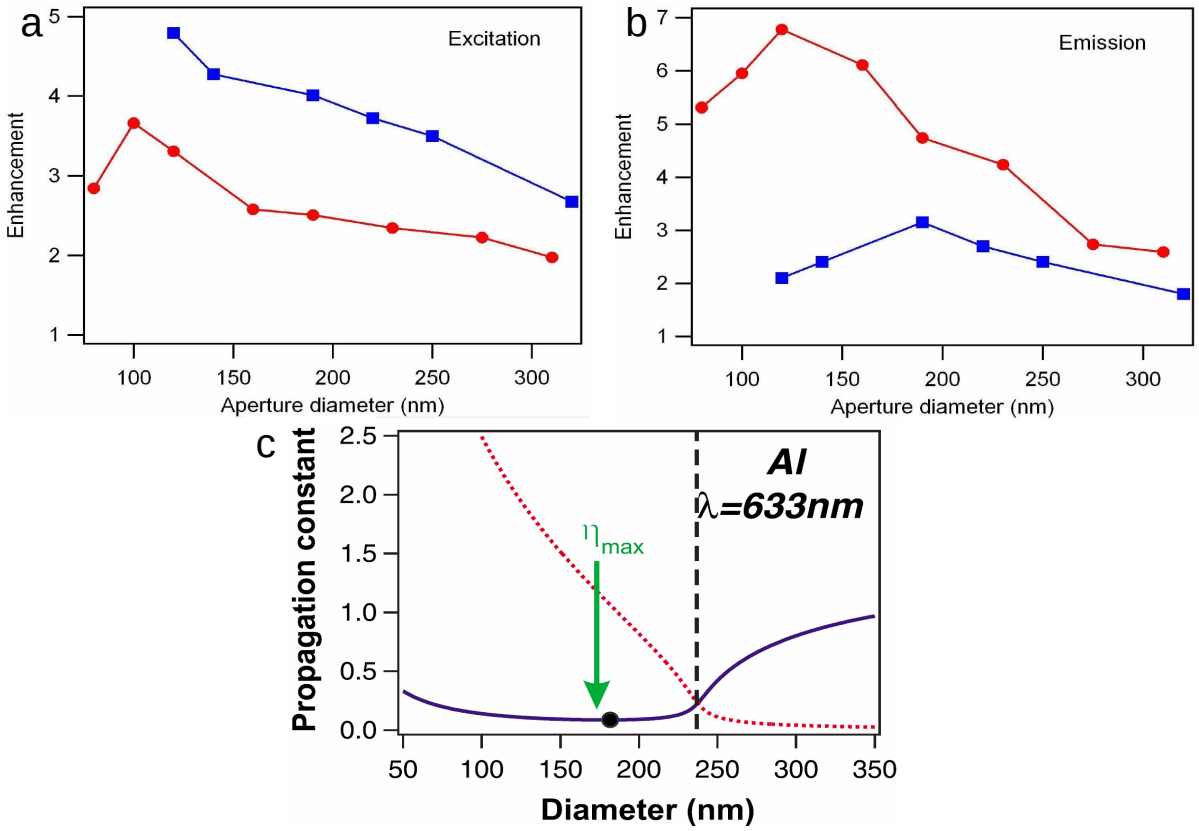


FIGURE 4.13 – *Gains à l'excitation (a) et à l'émission (b) contribuants à l'exaltation globale de fluorescence de la Figure 4.12 (b) pour les différentes tailles d'ouvertures. Les carrés bleus et les cercles rouges représentent respectivement les résultats obtenus pour les films d'aluminium et d'or. (c) Constante de propagation γ du mode guidé fondamental à l'intérieur d'une ouverture d'aluminium (dans un milieu aqueux d'indice n =1.33) en fonction du diamètre de l'ouverture. La ligne continue représente la partie réelle de γ et la ligne en pointillée sa partie imaginaire. La ligne verticale en pointillée représente la position intuituve de la coupure qui est l'intersection entre les parties réelle et imaginaire de γ. Le diamètre de nano-ouverture pour lequel l'exaltation de fluorescence est maximale est indiqué par la flèche verte et la position pour laquelle la vitesse de groupe v_g est minimale est représentée par un point noir sur la courbe de la partie réelle de γ [94, 98].*

4.5.3 Conclusions sur les comparaisons des ouvertures d'or et d'aluminium

L'étude de la permittivité du métal utilisé pour la fabrication des nano-ouvertures a permis de mettre en avant le fait que des taux de fluorescence par molécules plus elevés sont obtenus avec un film d'or comparé à un film d'aluminium. Ces observations semblent

être liées aux amplitudes des résonances plasmons, qui sont plus élevées dans le cas de l'or (dans les fréquences optiques étudiées). Le décalage de 50 nm du diamètre optimum des ouvertures d'or par rapport à l'aluminium, permet d'effectuer des expériences FCS dans des gammes de concentration plus élevées et avec des signaux moléculaires plus fortements exaltés. D'autres mesures expérimentales ont été conduites sur des nano-ouvertures percées dans des films d'argent, mais la rapide oxydation de ce type de métal n'a pas conduit à des résultats concluants.

4.6 Influence de la couche d'adhésion entre un susbrat de verre et un film d'or sur l'exaltation de fluorescence

La majorité des nano-antennes plasmoniques sur susbtrats métalliques sont fabriquées à l'heure actuelle en utilisant des films d'or. Comme nous l'avons précisé lors de la description de la fabrication des nano-ouvertures dans la section 4.2, l'adhésion entre un film d'or et un substrat de verre nécessite l'utilisation d'une couche d'accroche supplémentaire (en général métallique). Cependant, l'influence du film d'adhésion sur les propriétés des antennes est souvent ignorée. De précédentes études expérimentales ont montrées que des couches métalliques de chrome ou titane décalaient, élargissaient et amortissaient les résonances plasmons dans le cas d'une interface plane [99, 100, 101]. Pour des couches diélectriques, des études numériques ont mis en évidence le décalage des résonances plasmons vers de plus grandes longueurs d'ondes dû à l'influence de l'indice de réfraction [102].
Des études expérimentales et théoriques plus détaillées sur la couche d'accroche permettraient un meilleur choix quant à la nature (épaisseur et permittivité) du film d'adhésion à utiliser, et donc une potentielle amélioration des performances des antennes. Pour cette raison, nous avons tiré parti des résultats obtenus sur les nano-ouvertures d'or présentés dans la section 4.2 pour mettre en évidence l'influence de différentes couches d'adhésion verre/or sur l'exaltation de fluorescence moléculaire. Les études que nous allons présenter ont été effectuées en utilisant une ouverture circulaire de diamètre optimisée (120 nm) qui sert de point de comparaison pour toutes ces investigations.

4.6.1 Fabrication des nano-ouvertures d'or pour les différentes couches d'adhésion étudiées

Tous les films métalliques et diélectriques utilisés dans cette étude sont déposés en utilisant une pulvérisation cathodique magnétron DC dans une même chambre. L'adhésion entre le film d'or d'épaisseur 150 nm est assuré par des couches de 5 nm de chrome (Cr) ou titane(Ti), ou 10 nm de titane, ou 10 nm de dioxyde de titane (TiO_2) ou de dioxyde de chrome (Cr_2O_3). Les couches d'adhésion oxydées sont déposées sous pression partielle d'oxygène. Le contrôle du dépot des épaisseurs des couches est opéré par un moniteur piezo-électrique. La calibration du dépôt s'effectue à l'aide d'un cristal de quartz et d'échantillons

tests. Cela garantit une incertitude sur l'épaisseur des différentes couches d'adhésion inférieure à 20 %. Des ouvertures de 120 nm de diamètre réalisées par faisceau d'ions focalisés sont alors gravées dans le film d'or pour les différents échantillons de couches d'adhésion. Enfin, la rugosité du film métallique est vérifiée pour être similaire pour les différentes couches d'adhésion. Un schéma des nano-ouvertures et une image SEM (Scanning electron microscope) d'une coupe d'un échantillon type sont disponibles en Figure 4.14.

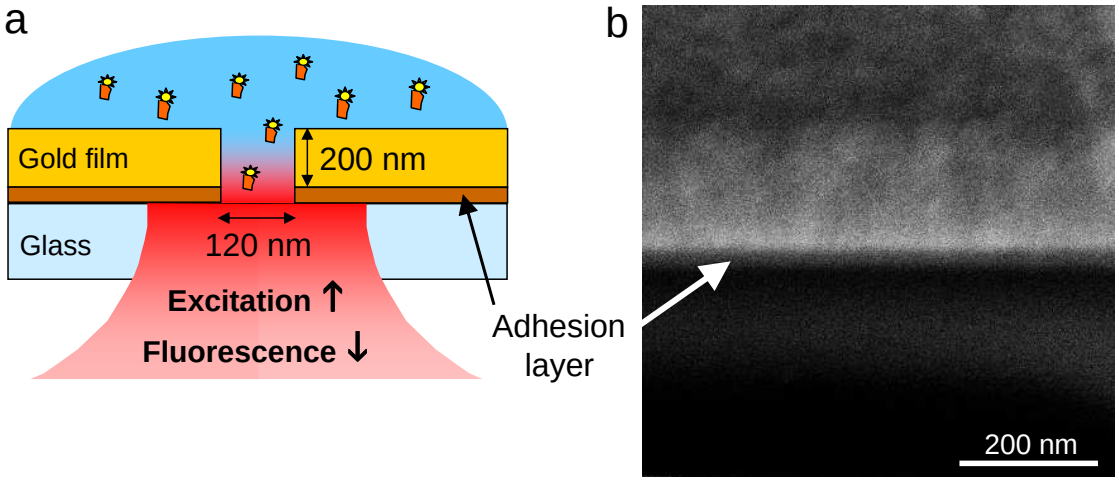
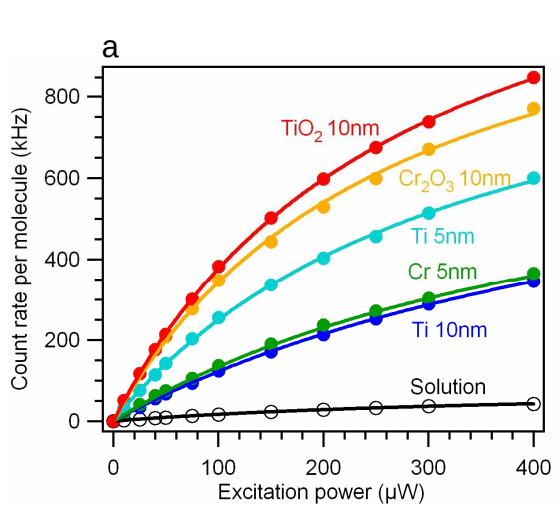


FIGURE 4.14 – *(a) Schéma de la configuration expérimentale des molécules fluorescentes diffusants dans l'ouverture de 120 nm pour différentes couches d'adhésion entre le film d'or et le substrat de verre : 5 nm de Cr ou Ti, ou 10 nm de Ti, ou 10 nm de TiO_2 ou Cr_2O_3. (b) Image SEM de la coupe par FIB (dans le plan longitudinal) d'un échantillon type. La région sombre indiquée par la flèche blanche correspond à la couche d'adhésion.*

4.6.2 Mesures expérimentales pour les différentes couches d'adhésion

L'évolution des taux de comptage par molécule CRM en fonction de la puissance d'excitation (incrémentée de 10 à 400 μW) a été mesurée dans une ouverture de 120 nm pour les différentes couches d'adhésion étudiées et pour la référence en solution. Les résultats de ces mesures sont représentés par les cercles en Figure 4.15 (a). La couche d'adhésion utilisée a une influence majeure sur le taux de fluorescence par molécule. Pour analyser ces données de manière plus précise, les mesures expérimentales ont été traitées selon l'ajustement numérique de l'équation 2.39. Les paramètres d'analyses numériques obtenus sont indiqués dans le tableau en Figure 4.15 (b), où la constante A est définie comme le produit de l'efficacité de collection κ par le rendement quantique Φ et la section efficace σ des molécules d'Alexa 647 ($A = \kappa\ \Phi\ \sigma$).



b

Material	Cr	Ti	Ti	TiO_2	Cr_2O_3	Sol.
Thickness (nm)	5	5	10	10	10	-
A (kHz/μW)	1.6	3.2	1.4	5.1	4.6	0.2
I_s (μW)	480	320	600	280	270	435
τ (ns)	0.41	0.40	0.36	0.40	0.40	0.88

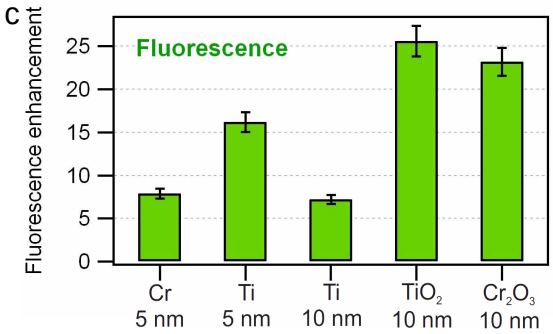


Figure 4.15 – *(a) Evolution des taux de comptage par molécules CRM en fonction de la puissance d'excitation dans une ouverture de 120 nm pour les différentes couches d'adhésion étudiées. Les cercles indiquent les mesures expérimentales et les lignes continues représentent l'ajustement numérique en utilisant l'équation 2.39. (b) Résumé des paramètres (A est définie par $A = \kappa\ \Phi\ \sigma$ et I_s est l'intensité de saturation) obtenus lors des ajustements numériques de (a) et indice de réfraction, (à λ =633 nm) pour les différentes couches d'adhésion.*

L'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ dans le régime linéaire d'excitation est alors calculée en fonction des différentes couches d'adhésion (Figure 4.15 (c)). Une exaltation d'un facteur 25 sur le taux de fluorescence par molécule est obtenue en utilisant une couche de 10 nm de TiO_2, ce qui est le gain le plus élevé ayant été mesuré pour des molécules d'Alexa 647 diffusants dans une nano-ouverture. En comparaison, le gain $\eta_{F_{low}}$ est seulement de 7.2 avec une couche de 10 nm de Ti, soit 3.5× plus faible qu'avec la couche de 10 nm de TiO_2. De manière plus générale, l'utilisation de couches d'adhésion métalliques (Cr, Ti) conduit à des exaltations de fluorescence bien inférieures à celles obtenues avec des couches diélectriques (TiO_2, Cr_2O_3). Cela peut s'expliquer par un fort amortissement des résonances plasmons dû à l'augmentation des pertes dans les couches d'adhésion métalliques [104]. Ces effets semblent être corroborés par le faible taux de fluorescence mesuré avec la couche de Cr comparée à la couche de Ti pour une même épaisseur (5 nm) de film métallique (l'absorption du Chrome est environ 3× plus faible que celle du Titane à 633 nm), et par l'augmentation de l'exaltation de fluorescence lors de la réduction de l'épaisseur du film de Ti ($\eta_{F_{low}}$ passe de 7 à 16 lorsque l'épaisseur de Ti est réduite de 10 à 5 nm). La signature des pertes par absorption est également détectable pour les couches d'adhésion diélectriques puisque le film de TiO_2 (dont l'absorption dans les fréquences optiques est négligeable) permet d'obtenir une exaltation de fluorescence légèrement plus élevée que le

film de Cr_2O_3 (qui présente des résidus d'absorption dans le visible). Soulignons le fait que les résultats expérimentaux sont fortements reproductibles puisque sept nano-ouvertures ont été étudiées pour chaque type de couches d'adhésion, conduisant à des variations sur le taux de comptage par molécules CRM comprises entre 6 et 8%. Ces variations s'expliquent majoritairement par la dispersion sur le diamètre des ouvertures et les incertitudes sur les mesures expérimentales.
En complément des expériences FCS, des mesures de déclins de fluorescence par TCSPC ont été effectuées sur les molécules d'Alexa 647 diffusant dans les nano-ouvertures en fonction des différents films d'adhésion. Les courbes obtenues pour des épaisseurs de 10 nm de Ti et TiO_2 sont présentées en Figure 4.16 (a) (les déclins de fluorescence pour les autres couches métalliques n'ont pas été indiqués car sensiblement identiques au TiO_2). Les temps de vie de fluorescence obtenus selon l'ajustement de numérique de l'équation 2.37 sont disponibles en Figure 4.15 (a). La réduction du temps de vie de fluorescence $\eta_{k_{tot}}$ à l'interieur d'une nano-ouverture pour les différentes couches d'adhésion est disponible en Figure 4.16 (b). Comme nous pouvons le constater, le temps de vie de fluorescence ne dépend que très peu de la couche d'adhésion utilisée, ce qui indique que la densité locale d'états électromagnétiques est dominée par l'épaisseur du film d'or et non pas par la présence de la couche d'adhésion substrat/film métallique.
En combinant les résultats expérimentaux issus des expériences FCS et des mesures de temps de vie de fluorescence, nous pouvons à présent étudier de manière plus détaillée les modifications des gains à l'excitation et à l'émission pour les différentes couches d'adhésion étudiées.

4.6.3 Détermination des contributions physiques participant à l'exaltation de fluorescence et comparaison avec des simulations numériques

Le gain à l'émission $\eta_{k_{em}}$ (qui correspond à l'exaltation de fluorescence dans le régime saturé $\eta_{F_{sat}}$) se déduit des paramètres des ajustements numériques du tableau de la Figure 4.15 (c) ($\eta_{k_{em}} = (AI_s)_{ouverture}/(AI_s)_{solution}$). Le renforcement sur l'intensité d'excitation η_{I_e} peut alors être déterminé par la relation $\eta_{I_e} = \eta_{F_{low}}\ \eta_{k_{tot}}/\eta_{k_{em}}$. Le poids des gains à l'excitation et à l'émission obtenus expérimentalement pour les différentes couches d'adhésion est réprésenté par les barres en Figure 4.17 (a) et (b). Les fortes variations d'exaltation de fluorescence mesurées en fonction de la couche d'adhésion utilisée sont directement liées aux variations des contributions des gains à l'excitation et à l'émission. A cause des effets d'absorption, les couches métalliques présentent des renforcements d'intensité d'excitation plus faibles que ceux obtenus avec les couches diélectriques. Par réciprocité, l'émission est également affectée par ces effets de pertes par absorption. Ces données confirment que l'ajout d'une couche d'adhésion absorbante entre un substrat de verre et un film d'or a pour effet de diminuer considérablement l'amplitude du couplage des interactions entre champ proche et champ lointain.
Pour compléter ces mesures expérimentales, l'analyse numérique par la méthode des élé-

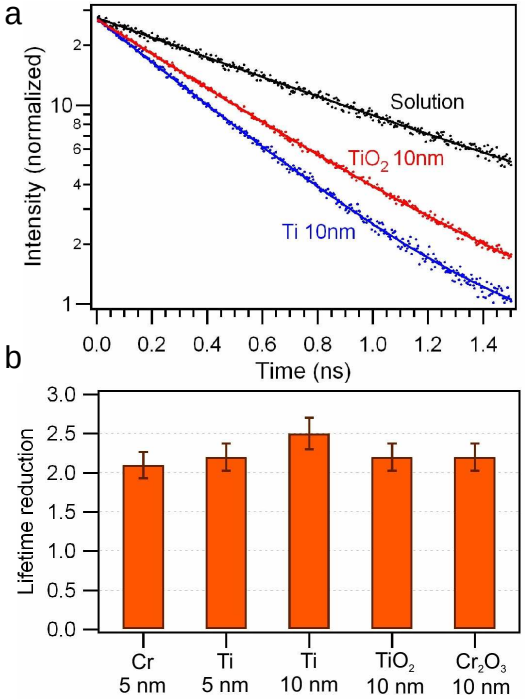


Figure 4.16 – *(a) Traces normalisées des déclins de fluorescence des molécules d'Alexa 647 mesurés dans le cas de la solution de référence (points noirs) et dans une ouverture de 120 nm percée dans un film d'or avec une couche d'adhésion de 10 nm de Ti (points bleus) ou $Ti0_2$ (points rouges). Les lignes continues correspondent aux ajustements numériques selon l'équation 2.37. Réduction du temps de vie de fluorescence des molécules d'Alexa 647 (par rapport à la solution de référence) en fonction des différentes couches d'adhésion étudiées [103].*

ments finis présentée dans la section 4.2 a été employée pour caractériser l'influence de la couche d'adhésion sur l'excitation et l'émission d'une molécule dans une nano-ouverture de 120 nm. Les résultats de ces calculs numériques sont représentés par les tiges encerclées en Figure 4.17 (a) et (b). Ces données théoriques s'accordent assez bien avec les observations expérimentales, ce qui tend à prouver une fois de plus l'influence cruciale de la couche d'adhésion sur les propriétés d'excitation et d'émission des molécules diffusant dans les nano-ouvertures métalliques.

4.6.4 Conclusion sur l'influence de la couche d'adhésion

Les analyses expérimentales et numériques présentées dans cette section ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de la couche d'adhésion entre un substrat de verre et un film d'or. Pour ces investigations, une nano-ouverture de 120 nm percée dans un film d'or a servi de témoin de comparaison pour étudier l'influence des couches d'adhésion

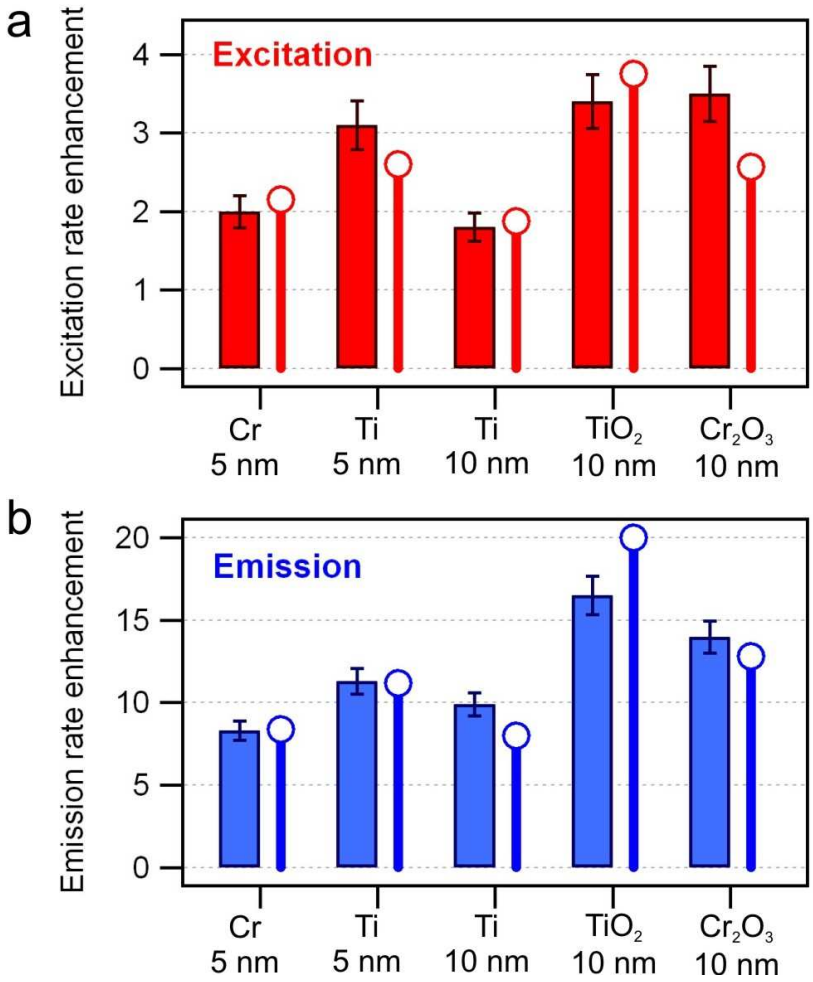


FIGURE 4.17 – *Contributions des gains à l'excitation (a) et à l'émission (b) participants à l'exaltation globale de fluorescence. Les barres rouges et bleues indiquent respectivement les gains expérimentaux pour l'excitation et l'émission, et les tiges encerclées représentent les simulations numériques par la méthode des éléments finis pour l'excitation (rouge) et l'émission (bleu) [103].*

sur l'exaltation de fluorescence moléculaire. La procédure de fabrication et les conditions expérimentales étant les mêmes pour l'étude des différents films d'adhésion, les résultats obtenus montrent clairement que la nature (épaisseur et permittivité) des couches utilisées affecte fortement les propriétés d'excitation et d'émission des ouvertures métalliques. En effet, toute augmentation des pertes par absorption dans la couche d'adhésion utilisée entraine une chute de l'exaltation de fluorescence, ce qui est une indication de l'amortissement de l'amplitude du couplage entre champ proche et champ lointain. Au vu de ces résultats, il apparaît clairement que l'utilisation d'une couche d'adhésion diélectrique comme le TiO_2

est de loin préférable pour améliorer la détection de fluorescence moléculaire. Enfin nous préciserons que ces résultats ne sont pas spécifiques aux ouvertures métalliques, et peuvent être étendus à tout type d'antenne plasmonique fabriquée sur film d'or.

4.7 Conclusion sur les nano-ouvertures métalliques

Les nano-ouvertures métalliques apparaissent être des structures relativement simples et fortement reproductibles pour exalter la fluorescence de molécules en solution et réduire le volume d'analyse sous la limite de diffraction optique. La procédure de caractérisation de fluorescence développée au sein de notre laboratoire a permis l'étude de l'influence des différents paramètres (taille, permittivité, couche d'adhésion) des ouvertures métalliques sur les modifications physiques des propriétés des émetteurs fluorescents. Les résultats obtenus ont permi une étude complète du design des ouvertures, conduisant à l'élaboration d'une structure optimisée (ouverture circulaire de 120 nm de diamètre percée dans un film d'or avec une couche d'adhésion métal/substrat de 10 nm de TiO_2) qui permet d'exalter d'un facteur 25 le taux de fluorescence par émetteur, ce qui est le gain le plus élevé mesuré pour des molécules diffusants dans une nano-ouverture. Nous verrons dans le chapitre 7 de cette thèse que les nano-ouvertures métalliques ont permis d'améliorer le rapport signal sur bruit en FCS et d'effectuer des mesures exaltées de corrélation croisée à deux couleurs (Dual Color-FCCS). Enfin, précisons que contrairement aux antennes directives telles que les Yagi-Uda [9], les nano-ouvertures métalliques ne permettent pas de diriger la lumière selon une direction préférentielle. Nous allons voir dans le chapitre suivant que structurer une simple nano-ouverture par des sillons périodiques permet de contrôler la directivité des molécules diffusant dans l'ouverture centrale.

CHAPITRE 5

Contrôle de l'émission de fluorescence moléculaire avec des nano-ouvertures structurées par réseaux de corrugations

La fluorescence de molécules en solution est en général émise dans toutes les directions de l'espace, car le temps de rotation des molécules est plus court que le temps de vie de l'état excité. Cela limite fortement la détection des signaux optiques moléculaires, car une grande partie de la lumière émise n'est pas détectée. Comme indiqué dans le chapitre 4, une simple nano-ouverture s'avère ne pas être efficace pour rediriger préférentiellement les signaux moléculaires fluorescents. Nous allons voir dans ce chapitre qu'en structurant un réseau de corrugations autour d'une nano-ouverture, l'émission de fluorescence des molécules diffusant dans l'ouverture centrale peut être collimatée dans la direction normale à l'échantillon. De plus, en faisant varier les paramètres géométriques du réseau de corrugations, il est possible de modifier la directivité angulaire de l'émission fluorescente, permettant ainsi un contrôle quasi-total des propriétés d'émission d'objets quantiques. La directivité du rayonnement étant dépendante de la longueur d'onde d'émission, la fluorescence de molécules spectralement différentes sera dirigée dans des directions angulaires différentes. Ces nano-antennes, qui peuvent être vues comme des nano-spectromètres à réseau placés dans le champ proche d'émetteurs en solution, ouvrent de nouvelles opportunités en biophotonique.

5.1 Introduction sur les nano-ouvertures corruguées

5.1.1 Directivité de la lumière au travers d'ouvertures corruguées

La lumière transmise au travers d'une nano-ouverture métallique est diffractée dans les trois directions de l'espace [83, 82, 84], ce qui limite fortement l'utilisation de ces structures pour le contrôle de la lumière à l'échelle nanométrique. En structurant un réseau de corrugations périodiques sur la face d'entrée de l'ouverture (c'est à dire du côté de la face illuminée), la transmission de la lumière est davantage exaltée à certaines longueurs d'onde grâce au couplage avec les ondes de surface, mais la lumière transmise reste diffractée dans les trois directions de l'espace, comme dans le cas d'une simple ouverture. Cette limite peut être contournée en structurant un réseau de sillons périodiques sur la face de sortie de l'ouverture centrale (une image de microscope électronique à balayage de cette structure, qui porte également le nom de bull's eye, est disponible en Figure 5.1 (a)), comme il a été montré par Lezec et al en 2002 [105]. Le réseau périodique entourant l'ouverture centrale permet de satisfaire la conservation d'énergie et d'impulsion et rend ainsi possible un fort couplage entre la lumière propagative incidente et les plasmons de surface. Sous ces conditions de structuration, le couplage de la lumière dans les modes de surface est régit par les règles de sélection de conservation d'impulsion et ne s'effectue donc que pour certains angles spécifiques (Figure 5.1 (b)) à une longueur d'onde donnée (de la même manière que pour un réseau de diffraction en optique physique). Les paramètres de réseau (périodicité entre les sillons, profondeur des sillons, distance entre l'ouverture centrale et le premier sillon du réseau ...) conditionne le spectre et la directivité de la lumière transmise au travers des bull's eyes. En particulier, aux longueurs d'onde résonantes, la lumière transmise au travers de ces structures est exaltée et peut émerger sous certaines conditions en un faisceau fortement collimaté avec une divergence angulaire d'environ 3° [105] (Figure 5.1 (c)-(d)). Ces propriétés remarquables de transmission exaltée et contrôlée sont le produit de trois contributions physiques : un couplage efficace de la lumière incidente avec les ondes de surface dans le champ proche, une transmission exaltée à travers l'ouverture centrale et un découplage efficace de la lumière en champ lointain [106]. Les modes plasmons de surface crées par l'excitation du réseau de sillons périodiques dominent le spectre et la directivité de la lumière émergeant des nano-ouvertures corruguées. Une analyse théorique détaillée de ces effets est disponible dans le cas d'une structure 1D (fente unique entourée d'un réseau de sillons parallèles périodiques) en références [89, 107]. Un traitement 1D du problème est suffisant, car l'origine physique des phénomènes de résonance pour des ouvertures uniques 1D et 2D est similaire, comme il a été reporté en référence [108]. Enfin, précisons que les nano-ouvertures corruguées, plus connues sous le nom de choke ring antennas dans le domaine des micro-ondes, ont été très utilisées pour les applications GPS [109].

5.1.2 Applications des nano-ouvertures métalliques corruguées

Les nano-ouvertures métalliques corruguées ont d'ores et déjà trouvé leurs applications dans différents domaines de l'optique tels que l'imagerie spectrale et polarimétrique, l'exal-

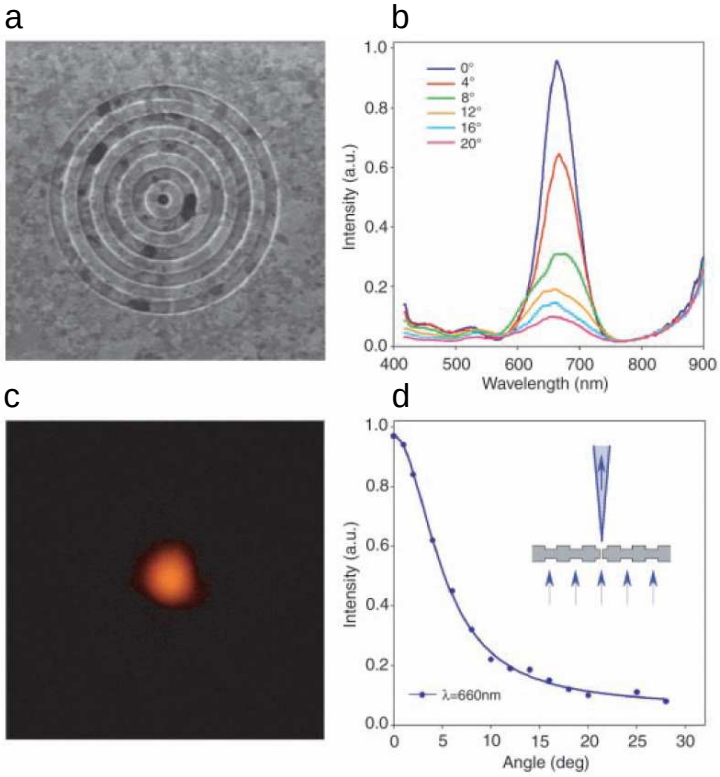


FIGURE 5.1 – *(a) Image de microscope électronique à balayage d'une nano-ouverture d'argent encerclée par un réseau de corrugations (periodicité des sillons : 500 nm, profondeur des sillons : 60 nm, diamètre de l'ouverture centrale : 250 nm, épaisseur du film d'argent : 300 nm). (b) Spectre de transmission de la lumière au travers d'une nano-ouverture d'argent corruguée (periodicité des sillons : 600 nm, profondeur des sillons : 60 nm, diamètre de l'ouverture centrale : 300 nm, épaisseur du film d'argent : 300 nm) pour différents angles de collection. (c) Image de l'intensité transmise par la structure (a) (pic de transmission autour de λ_{max} =660 nm) en utilisant un filtre passe bande de 60 nm de largeur. (d) Distribution angulaire de l'intensité transmise déduite des résultats de (b) à λ_{max} =660 nm [105].*

tation de signaux optiques et la miniaturisation des dispositifs opto-électroniques. Nous allons à présent illustrer des travaux effectués dans ces différents domaines.

Filtres plasmoniques à photons pour l'imagerie spectrale et polarimétrique

Comme nous l'avons précisé dans la sous-section 5.1.1, les propriétés spectrales et directionnelles de la lumière transmise au travers des nano-ouvertures corruguées dépendent très fortement des paramètres de ces structures. Ces propriétés ont été exploitées par Laux et al [110] en 2008 pour séparer une lumière blanche incidente en différentes bandes spectrales (sensible à la polarisation incidente) comme schématisé en Figure 5.2 (a). Pour ce faire, une triple structure bull's eye a été fabriquée dans un film d'argent par faisceau d'ions

focalisés (Figure 5.2 (b)). La périodicité de chacun des réseaux de corrugations structurant les nano-ouvertures centrales a été ajustée de manière à ce que les résonances se produisent à trois longueurs d'onde différentes. Comme nous pouvons le constater en Figure 5.2 (c), la position et la forme des pics de transmission dépend des paramètres de réseaux considérés. Plus le pas du réseau de corrugations est élevé, plus les pics de transmission sont décalés vers de plus hautes longueurs d'onde. Notons également que les propriétés de transmission associées à une ouverture corruguée individuelle sont modifiées par la présence des structures voisines. Les effets sur la transmission optique liés au chevauchement des structures imbriquées ont été caractérisés et optimisés en positionnant respectivement les ouvertures centrales à des distances pour lesquelles chaque ouverture corruguée ne modifie pas les propriétés de transmission des structures voisines. La lumière transmise au travers de ce triple bull's eye peut alors être spatialement filtrée en longueur d'onde et polarisation.
D'autres géométries ont également été utilisées pour le filtrage en longueur d'onde et en polarisation telles qu'une fente entourée par des sillons parallèles structurés de manière à former un réseau triangulaire (Figure 5.2 (d)), dont le spectre de transmission peut être contrôlé par les paramètres géométriques du réseau. Ces structures de bases peuvent ensuite être combinées sur un même support comme illustré en Figure 5.2 (e), où différentes couleurs intenses sont transmises au travers des structures malgré le fait que les dimensions des objets utilisés soient sub-longueurs d'onde. Ce filtrage de photons, obtenu en ajustant les paramètres géométriques des bull's eyes, permet une nouvelle approche pour l'analyse spectrale et polarimétrique avec des structures extrémement compactes.

Exaltation du taux de conversion de génération de second harmonique

L'avènement des nano-antennes plasmoniques a suscité un fort intérêt quant à l'utilisation des ces structures pour exalter les réponses optiques non-linéaires et permettre la réalisation de nano-sources de lumière accordables en longueur d'onde. Dans cette contribution, Nahata et al [111] ont montré en 2003 que le taux de conversion de génération de second harmonique pouvait être fortement exalté par une structure de type bull's eye. Dans cette étude, une nano-ouverture d'argent (épaisseur du film d'argent 300 nm) de 200 nm de diamètre est structurée par un réseau de corrugations de période 750 nm. Une simple ouverture de 200 nm percée dans un même film d'argent sert de point de référence pour l'étude de l'influence du réseau de corrugations sur la génération de second harmonique. L'excitation des structures s'effectue à l'aide d'un laser impulsionnel Ti :saphir (fréquence 100 MHz, durée d'impulsion 110 fs) accordable en longueur d'onde (de 790 à 880 nm) qui est focalisé en un faisceau de diamètre 30 μm dans le plan de l'échantillon, de manière à illuminer totalement la structure métallique corruguée (de diamètre 5 μm). La génération de second harmonique transmise à travers l'ouverture centrale est alors collectée à l'aide d'un objectif d'ouverture numérique 0.6 et détectée par un photomultiplicateur. Un schéma du dispositif expérimental est présenté en Figure 5.3 (a). Les mesures expérimentales conduites ont permis de déterminer l'évolution de l'intensité du signal SHG transmis au travers des nano-ouvertures simple et corruguée pour une longueur d'onde d'excitation de 790 nm (qui est la longueur d'onde optimale de transmission pour cette structure) en

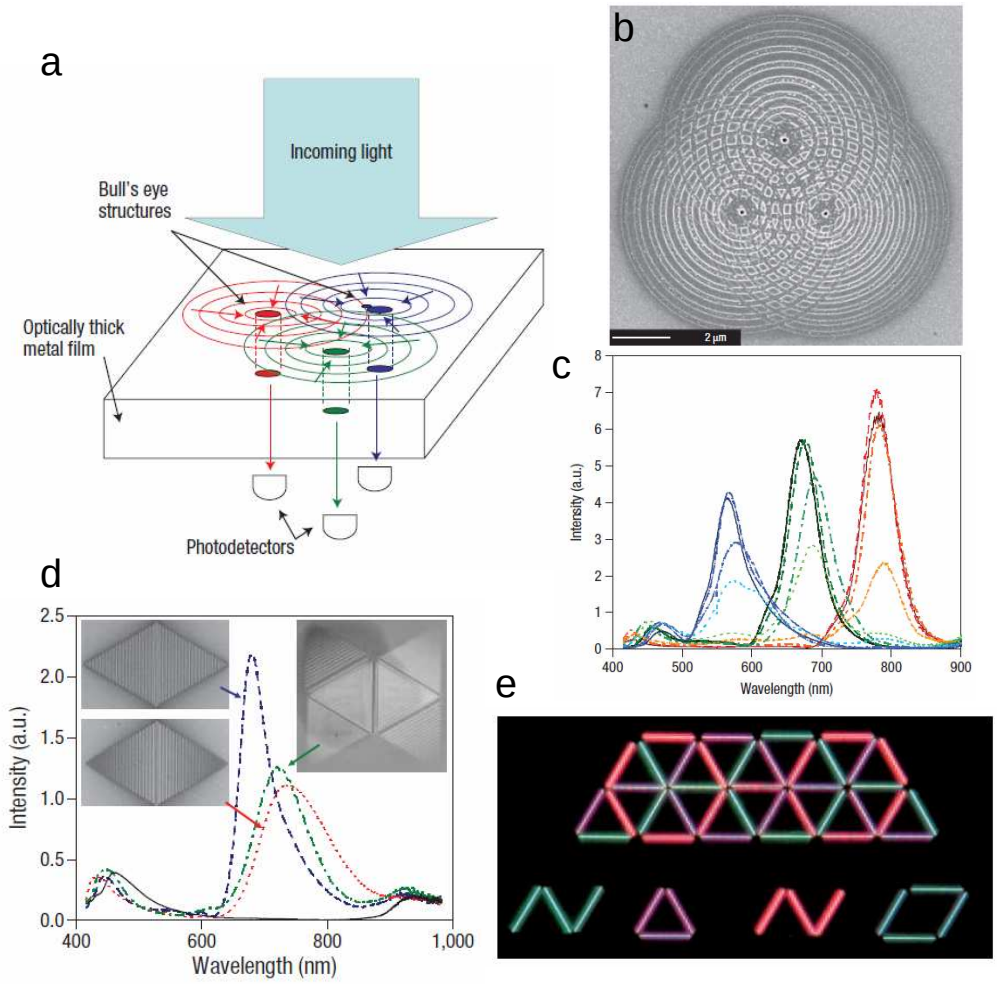


FIGURE 5.2 – *(a) Principe du processus de filtrage spatial et spectral de la lumière blanche incidente traversant une structure formée par l'imbrication de 3 bull's eyes. Les différentes couleurs sont séparées et respectivement rediriger vers 3 photodétecteurs. (b) Image de microscope électronique à balayage de la structure formée par les 3 bull's eyes. La périodicité du réseau est de 730 nm pour la structure du haut (notée A, avec 7 corrugations), 630 nm pour la structure de gauche (notée B, avec 8 corrugations) et 530 nm pour la structure de droite (notée C, avec 10 corrugations). (c) Spectre de transmission mesuré pour les nano-ouvertures A (ligne bleue), B (ligne verte), C (ligne rouge). (d) Spectre de transmission d'une fente unique (longueur 15 µm, épaisseur 170 nm) pour différent gradient de profondeur de sillons. (e) Image de microscope d'un réseau de fentes avec des périodes de 450 nm (violet), 500 nm (vert) et 580 nm (rouge) [110].*

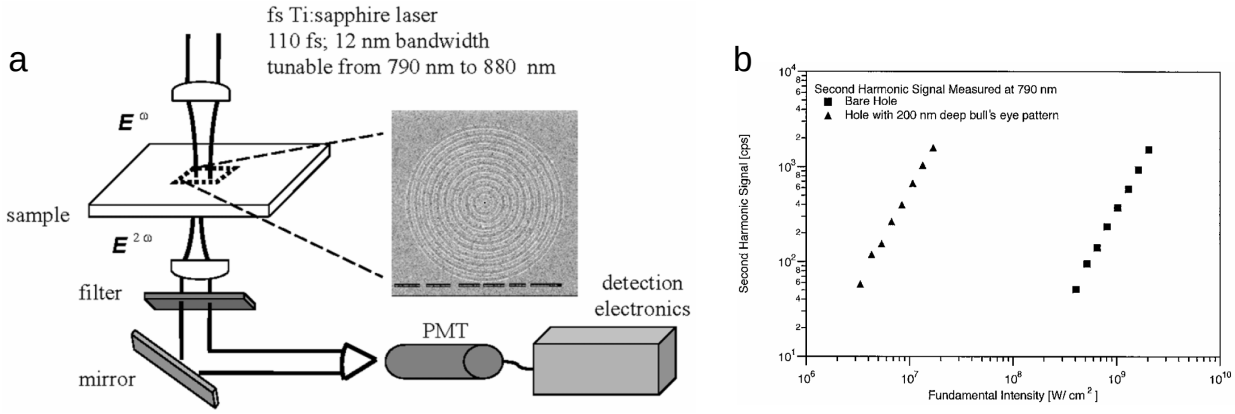


Figure 5.3 – *(a) Dispositif expérimental utilisé pour les mesures SHG. Une image de microscopie à balayage de la structure bull's eye étudiée est également présenté (la taille totale de la structure est de 15 µm). (b) Intensité SHG mesurée en fonction de la puissance laser d'excitation pour les ouvertures simple et corruguée [111].*

fonction de la puissance laser incidente. Les données obtenues (Figure 5.3 (b)) montrent que dans les deux cas, l'intensité de génération de second harmonique varie quadratiquement en fonction de la puissance d'excitation. En comparant ces données, il apparaît qu'une intensité fondamentale 110 fois plus importante doit être focalisée sur la simple ouverture pour atteindre le même niveau de signal SHG obtenu avec l'ouverture corruguée. Cela s'explique par le fait que le réseau de corrugations plasmoniques permet de confiner le champ optique incident au voisinage de l'ouverture centrale par un facteur compris entre 110 et 125, permettant ainsi un taux de conversion SHG exalté 10^4 fois par rapport au cas d'une simple ouverture. Ces travaux constituent la première démonstration expérimentale des effets de renforcements de champ électromagnétique au voisinage de nano-ouvertures corruguées.

Nano-photodiodes

Les structures bull's eyes ont été utilisées en 2005 par Ishi et al [112] dans le domaine opto-électronique pour fabriquer des nano-photodiodes avec des surfaces actives de dimensions sub-longueurs d'onde (300 nm). Le principe de fonctionnement d'une nano-photodiode est indiqué en Figure 5.4 (a). Celle-ci présente trois parties : (i) une électrode métallique supérieure (anode) formée par une nano-ouverture corruguée qui sert à la fois d'électrode de Schottky et de nano-antenne pour le confinement du champ incident, (ii) une structure mesa Si de dimension comparable au diamètre de la nano-ouverture et (iii) et une cathode. Une coupe schématique transverse de la nano-photodiode est présentée Figure 5.4 (b). Dans un premier temps, la lumière incidente excite les modes de plasmons de surface de la structure corruguée ce qui conduit à un confinement du champ électromagnétique et donc à une transmission exaltée de la lumière au travers de l'ouverture. Dans

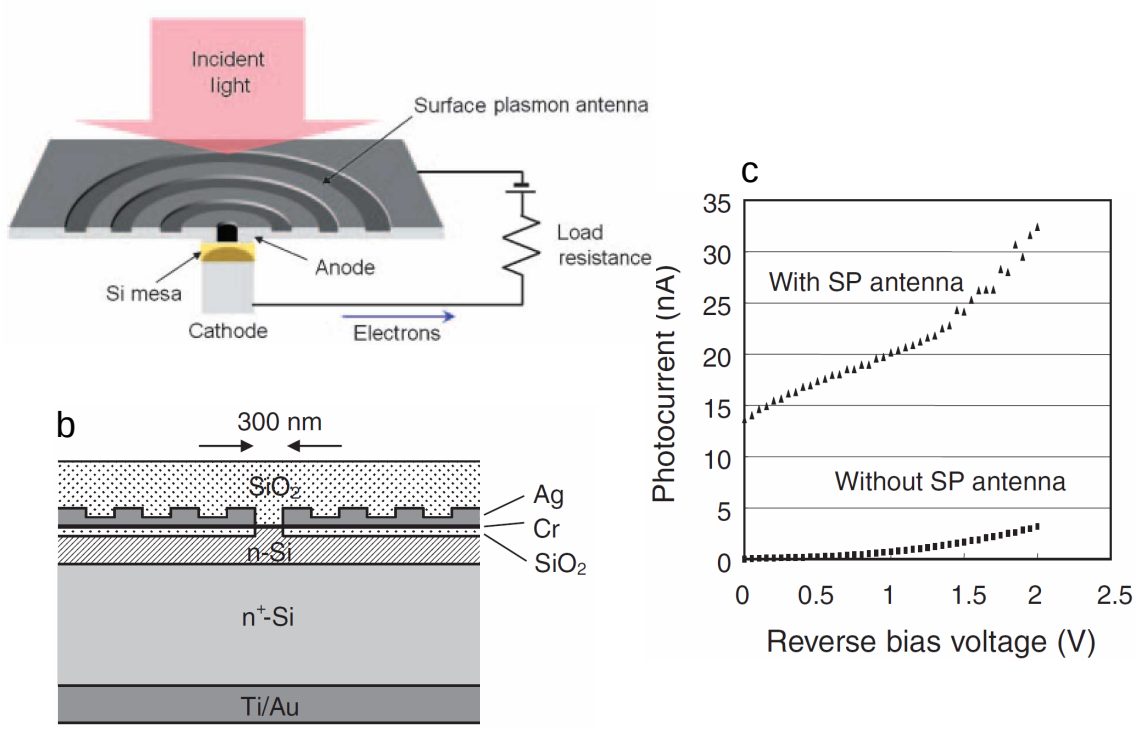


FIGURE 5.4 – *(a) Principe de fonctionnement de la nano-photodiode utilisant une structure bull's eye. (b) Coupe schématique transverse de la nano-photodiode basée sur l'utilisation d'une nano-antenne plasmonique. (c) Photocourant mesuré en fonction du voltage pour la nano-photodiode en présence et en l'absence du réseau de corrugations. La photodiode possède une surface active de 300 nm et elle est illuminée par une diode laser à une longeur d'onde λ =840 nm [112].*

un second temps, le champ proche optique génére des porteurs à l'intérieur de la structure mesa Si. Le processus de conversion opto-électronique est similaire à celui des photodiodes classiques à la seule différence qu'il s'effectue ici à des échelles sub-longueurs d'onde.
Les caractéristiques de photo-réponse de la nano-photodiode ont été mesurées en utilisant une diode laser opérant à une longueur d'onde λ =840 nm (Figure 5.4 (c)). Pour cette étude, la taille du faisceau excitateur est comprise entre 2 et 3 μm avec une puissance d'illumination fixée à 1 mW. Une augmentation du photocourant d'un ordre de grandeur est obtenue en présence de la nano-ouverture corruguée comparée au cas d'une ouverture simple. Cela suggère une exaltation de photogénération des porteurs dans le milieu semi-conducteur due au couplage avec les ondes de surface. La vitesse d'une photodiode dépendant directement de sa surface active, la miniaturisation des composants a permis de réaliser une nano-photodiode rapide fonctionnant au-delà du GHz. Dans le cadre de cette thèse, les nano-ouvertures structurées par réseaux de corrugations périodiques ont été utilisées pour exalter et contrôler la fluorescence de molécules diffusant dans l'ouverture centrale. Ré-

ciproquement, ces émetteurs fluorescents ont permis de sonder les propriétés physiques des nano-antennes en champ proche. Nous allons détailler dans la section suivante les mesures expérimentales conduites pour déterminer l'exaltation de fluorescence moléculaire à l'intérieur de nano-ouvertures corruguées.

5.2 Exaltation de fluorescence moléculaire par des nano-ouvertures corruguées

5.2.1 Fabrication des nano-ouvertures corruguées et dispositif expérimental utilisé

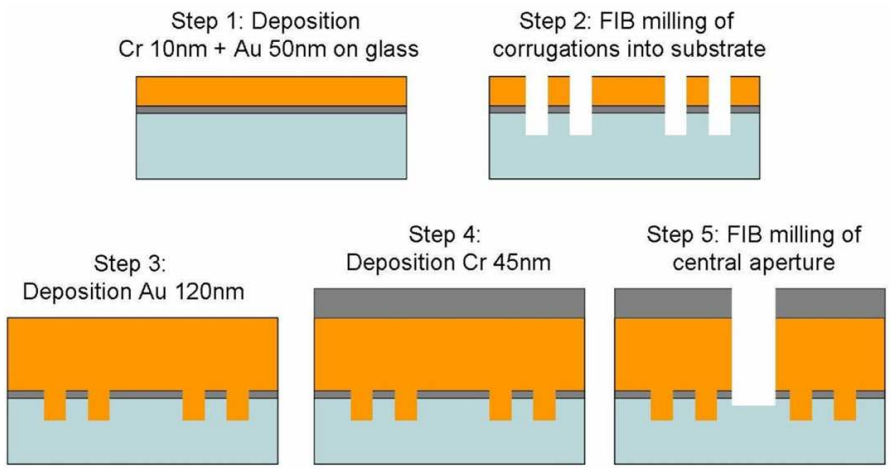


Figure 5.5 – *Procédure de nano-fabrication par faisceau d'ions focalisés des échantillons de nano-ouvertures corruguées [114].*

La fabrication des nano-ouvertures corruguées utilisées dans cette thèse s'effectue par faisceau d'ions focalisés et comporte plusieurs étapes comme indiqué en Figure 5.5. Dans un premier temps, un substrat de verre est recouvert par une mince couche de chrome (10 nm), puis par un film d'or d'épaisseur 50 nm. Des corrugations concentriques (1, 2, 3, ou 5) sont alors gravées par faisceau d'ions focalisés dans les substrats verre-métal, avec une profondeur de 65 nm, une largeur de 200 nm et une périodicité de 440 nm (la périodicité coïncide approximativement avec la longueur d'onde de résonance des plasmons de surface $\lambda_{SP} = \lambda/n_{SP}$ à l'interface or-verre, où λ est la longueur d'onde d'émission de fluorescence et n_{SP} est l'indice de réfraction des plasmons de surface à l'interface or-verre, avec $n_{SP} = \sqrt{\epsilon' \, \epsilon_g/(\epsilon' + \epsilon_g)}$, où ϵ' désigne la partie réelle de la permittivité du métal et $\epsilon_g = n_g^2$ est la permittivité du substrat). Un film d'or d'épaisseur 120 nm est alors déposé au-dessus du substrat corrugué. Pour diminuer la forte transmission de la lumière au travers

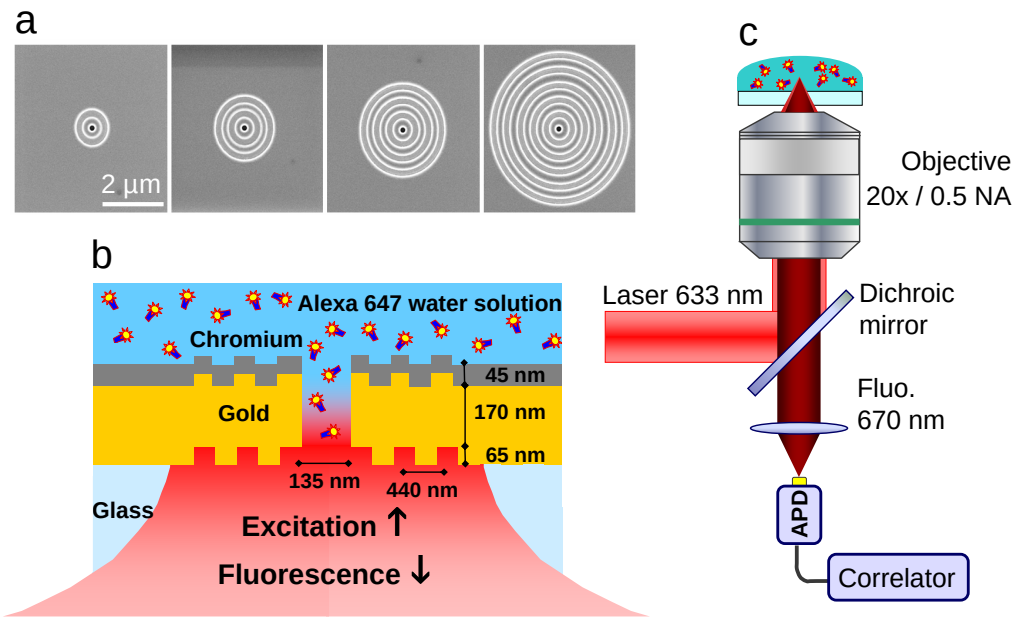
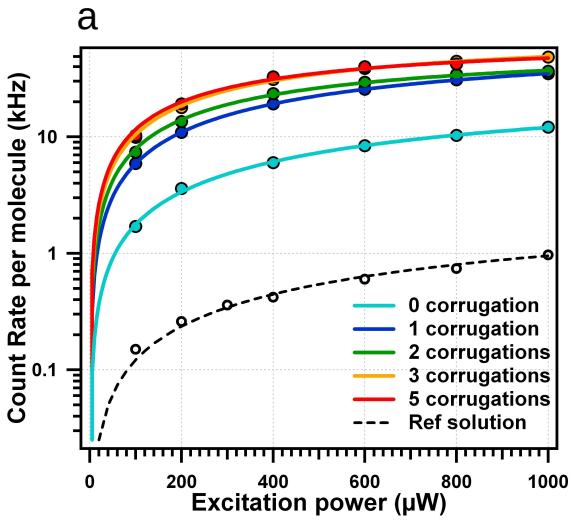


FIGURE 5.6 – *(a) Images de microscope électronique à balayage des nano-ouvertures d'or encerclées par un réseau de 1, 2, 3 et 5 corrugations périodiques (lecture de gauche à droite). (b) et (c) Configuration expérimentale des mesures FCS et TCSPC des molécules diffusant dans l'ouverture centrale [113].*

des bull's eyes, une couche supplémentaire de 45 nm de chrome est déposée au dessus du film d'or (cf. chapitre 4). Enfin, une nano-ouverture de 135 nm est percée au centre de la structure. Des vérifications effectuées par microscopie électronique à balayage ont montré une satisfaisante reproductibilité de fabrication d'une structure à l'autre. Notons que pour les structures étudiées dans cette section, la distance a entre l'ouverture centrale et le premier sillon du réseau est proche de la longueur d'onde de résonance des plasmons de surface λ_{SP} à l'interface corruguée métal/diélectrique (pour les nano-ouvertures corruguées utilisées dans cette section a =440 nm).
Le dispositif expérimental utilisé est le même que celui utilisé dans le chapitre 3 à la seule différence que l'excitation s'effectue avec un objectif d'ouverture numérique ON=0.5 (diamètre du faisceau 1.5μm), ce qui permet d'illuminer les trois premières corrugations du réseau.

5.2.2 Influence du nombre de corrugations sur l'exaltation de fluorescence

Afin de déterminer l'influence du nombre de sillons périodiques structurant l'ouverture centrale sur les propriétés d'excitation et d'émission des molécules d'Alexa 647, des mesures de taux de fluorescence par molécule CRM en fonction de la puissance d'excitation



b

	A (kHz/μW)	I_s (μW)
without corrugation	0.0190	1732
with 1 corrugation	0.0675	1028
with 2 corrugations	0.090	701
with 3 corrugations	0.119	692
with 5 corrugations	0.138	525
reference solution	0.0012	3154

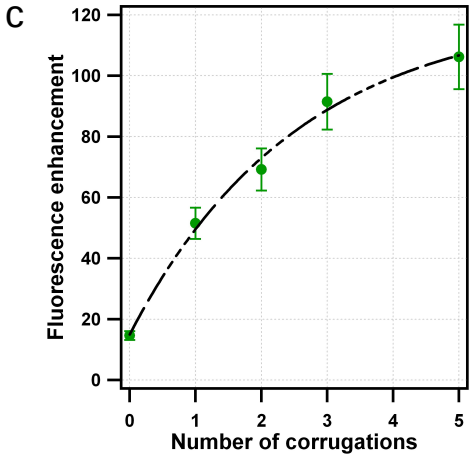


Figure 5.7 – *(a) Evolution du taux de fluorescence par molécule en fonction de la puissance d'excitation pour les différents nombres de sillons entourant l'ouverture centrale et dans le cas de la solution de référence. Les points indiquent les mesures expérimentales et les lignes continues représentent les ajustements numériques selon l'équation 2.39. (b) Paramètres obtenus lors des ajustements numériques des résultats expérimentaux de (a) (avec $A = \kappa\ \Phi\ \sigma$). (c) Exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ mesurée dans le régime linéaire d'excitation en fonction du nombre de corrugations entourant l'ouverture centrale. La ligne continue est une interpolation par une loi exponentielle [113].*

(incrémentée de 0.1 à 1 mW) ont été effectuées par FCS. Les résulats de ces mesures sont présentées en Figure 5.7 (a), où les points indiquent les mesures expérimentales et les lignes continues réprésentent l'ajustement numérique selon l'équation $CRM = AI_e/(1 + I_e/I_s)$ (dont les résultats sont résumés en Figure 5.7 (b)). Des taux de fluorescence par molécule plus élevés sont obtenus avec les nano-ouvertures corruguées par rapport à la solution de référence dans toute la gamme de puissance étudiée. De plus, des taux de comptage par molécules CRM de plus en plus élevés sont mesurés lorsque le nombre de corrugations entourant l'ouverture centrale est augmenté, ce qui met en évidence l'influence des corrugations plasmoniques sur le taux de fluorescence d'un émetteur. Les niveaux de signal par molécule obtenus en présence des nano-ouvertures corruguées permettent de conduire des analyses à l'échelle d'une molécule individuelle en utilisant un objectif de faible ouverture

numérique. Les résultats présentés ici sont fortement reproductibles, avec une incertitude relative de 10% sur la détermination du taux de fluorescence par émetteur CRM correspondant majoritairement aux variations d'une structure à l'autre et à la répétabilité des mesures sur notre dispositif expérimental.
L'évolution de l'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ en fonction du nombre de sillons périodiques (variant de 0 à 5) est directement déduite des ajustements numériques puisque $\eta_{F_{low}} = A_{ouverture}/A_{solution}$. Comme attendu d'après les mesures présentées en Figure 5.7 (a), l'exaltation de fluorescence est affectée de façon majeure par la présence du réseau de corrugations. En particulier, l'ajout de 5 corrugations périodiques permet le passage du gain de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ de 14.5 (pour une nano-ouverture non corruguée) à 106, ce qui est la plus forte exaltation du taux de fluorescence par émetteur mesurée pour des fluorophores diffusants en solution. Un autre point remarquable est l'effet de saturation observé sur l'exaltation de fluorescence lorsque le nombre de corrugations devient supérieur à 3 (Figure 5.7 (c)). Ceci est une conséquence directe de la taille limitée du faisceau Gaussien d'excitation , qui fournit moins d'énergie aux sillons les plus éloignés, et de l'augmentation des pertes liées à la propagation des plasmons de surface lorsque la distance entre les sillons et l'ouverture centrale augmente. Au vu de ces résultats, il apparaît que la gravure de 3 corrugations périodiques autour de l'ouverture semble être un bon compromis entre forte exaltation de fluorescence et complexité de nano-fabrication minimisée. Les processus physiques contribuant aux exaltations de fluorescence des molécules diffusant dans les nano-ouvertures corruguées vont à présent être détaillés.

5.2.3 Contributions des gains à l'excitation et à l'émission

De la même manière que pour l'étude des nano-ouvertures du chapitre 4, la détermination du poids respectif des différents effets physiques participant à l'exaltation globale de fluorescence a été effectuée en utilisant la procédure de caractérisation de fluorescence présentée dans le chapitre 2. Les gains obtenus à l'excitation η_{I_e}, à l'émission $\eta_{k_{em}}$ et sur la réduction du temps de vie de fluoresence $\eta_{k_{tot}}$ sont présentés en Figure 5.8. Comme nous pouvons le constater, les gains à l'excitation et à l'émission sont beaucoup plus élévés en présence du réseau de corrugations. Le gain sur la densité d'intensité d'excitation η_{I_e} augmente graduellement lors de l'ajout de sillons périodiques, ce qui indique une concentration d'énergie électromagnétique de plus en plus élevée dans l'ouverture centrale. Le gain sur l'émission $\eta_{k_{em}}$ est quasi-équivalent quel que soit le nombre de corrugations périodiques entourant l'ouverture. Ceci est dû au fait que l'ajout d'un seul sillon concentrique permet déjà de rediriger efficacement l'émission fluorescente vers les détecteurs. Une analyse détaillée des effets de directivité d'émission de la fluorescence des molécules diffusant dans les nano-ouvertures corruguées sera présentée tout au long de la section 5.3.
Les résultats obtenus dans cette section indiquent que le réseau de sillons périodiques a pour effet d'augmenter les performances de l'ouverture centrale en améliorant très fortement le couplage entre champ proche et champ lointain, ce qui conduit à des exaltations de fluorescence moléculaire dans les nano-ouvertures corruguées très nettement supérieures à celles obtenues dans des ouvertures simples.

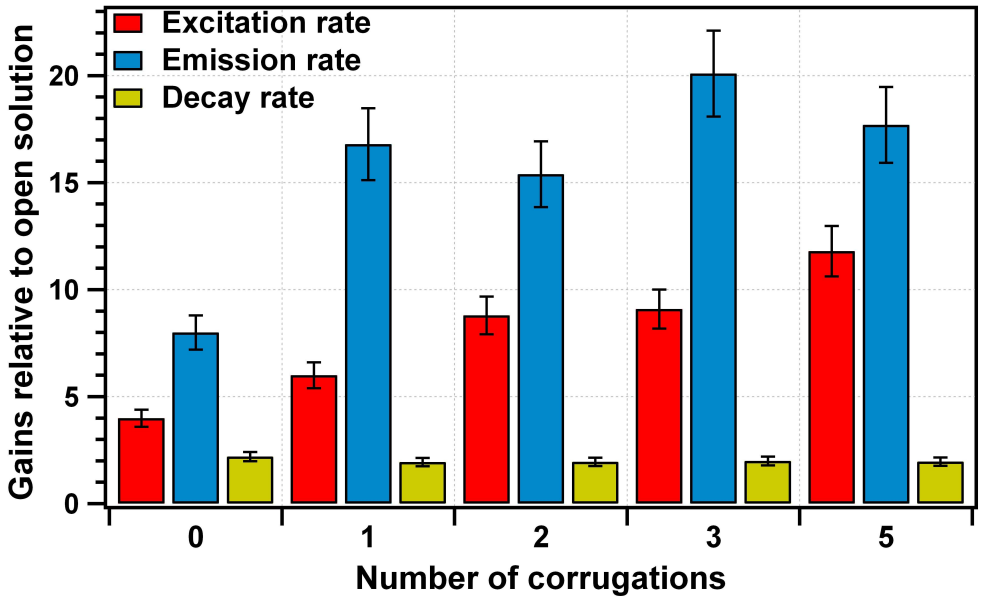


Figure 5.8 – *Contribution des gains à l'excitation η_{I_e}, à l'émission $\eta_{k_{em}}$ et sur la réduction du temps de vie $\eta_{k_{tot}}$ participant à l'exaltation globale de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ indiquée en Figure 5.7 (c) pour les différents nombres de sillons entourant l'ouverture centrale [113].*

5.2.4 Variations de l'exaltation de fluorescence en fonction du rendement quantique de l'émetteur

Il a été indiqué dans les chapitres 1 et 5 que le facteur d'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ dépend du rendement quantique Φ de la sonde fluorescente utilisée. Pour quantifier expérimentalement les variations de l'exaltation de fluorescence en fonction du rendement quantique des émetteurs diffusant à l'intérieur de nano-ouvertures corruguées, nous avons choisi de modifier le rendement quantique de la solution de molécules d'Alexa 647 (Φ_0 =30%) par ajout d'une solution de methylviologène (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, Sigma-Aldrich) avec des concentrations inférieures à 60 mM. En augmentant les voies de relaxation non-radiatives par réaction d'oxydation (transfert d'électron), le methylviologène permet de contrôler le rendement quantique des molécules d'Alexa 647. L'analyse des effets du methylviologène sur l'émission de fluorescence a été effectuée par la méthode Stern-Volmer. Pour cela, l'intensité totale I_F et le temps de vie τ_F de fluorescence ont été mesurés en fonction de la concentration en methylviologène ajoutée $[MV^{2+}]$ et comparés aux valeurs de référence obtenues en l'absence de méthylviologène. La cinétique du processus de déclin du signal de fluorescence des molécules d'Alexa 647 du à l'augmentation du taux d'émission non radiatif suit une loi de Stern-Volmer :

$$\frac{I_{F0}}{I_F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\ \tau_0\ [MV^{2+}]. \tag{5.1}$$

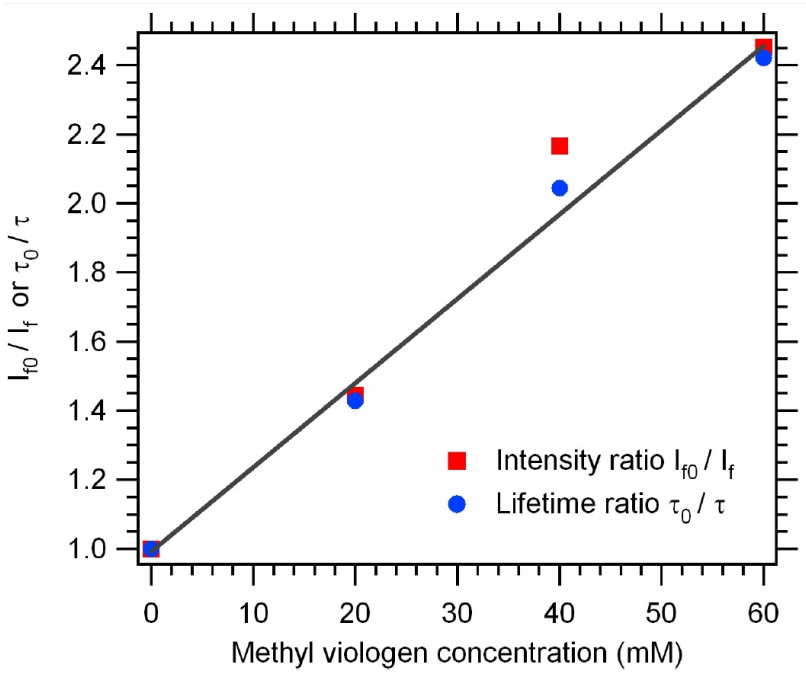


FIGURE 5.9 – *Analyse Stern-Volmer de l'intensité et du temps de vie de fluorescence des molécules d'Alexa 647 en fonction de la concentration en méthylviologène [114].*

où k_q est le taux d'augmentation par pertes non radiatives et I_0 et τ_0 sont respectivement l'intensité totale et le temps de vie de fluorescence des molécules d'Alexa 647 en l'absence de méthylviologène (τ_0 =1.0 ns). Les données expérimentales et l'analyse Stern-Volmer correspondante sont présentées en Figure 5.1. L'ajustement des résultats expérimentaux a conduit à la détermination d'une constante k_q =2.1×10^{10}s^{-1}.M^{-1}. Le rendement quantique des molécules d'Alexa 647 en fonction de la concentration en methylviologène ajoutée est alors obtenue par la relation $\Phi = \Phi_0/(1 + k_q\ \tau_0\ [MV^{2+}])$.
L'évolution de l'exaltation de fluorescence en fonction du rendement quantique des molécules d'Alexa 647 a été expérimentalement mesurée dans une nano-ouverture structurée par 5 corrugations périodiques. Pour cette étude, le facteur exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ obtenue avec cette structure pour des molécules d'Alexa 647 sans ajout de méthylviologène est de 77 comme il a été reporté en référence [114]. Ce gain est plus faible que celui obtenu avec la même structure présentée dans la section 5.2.2 et en référence [113] ($\eta_{F_{low}}$ =106) car la fabrication de l'échantillon utilisé dans cette section n'était pas optimisée. En diminuant le rendement quantique des molécules d'Alexa 647, l'exaltation de fluorescence augmente de manière significative comme nous pouvons le constater en Figure 5.10 (a) (où les mesures expérimentales sont représentées par les points). En particulier, le facteur $\eta_{F_{low}}$ passe de 77 à 120 lorsque le rendement quantique des émetteurs fluorescents est réduit de 30 à 11%.

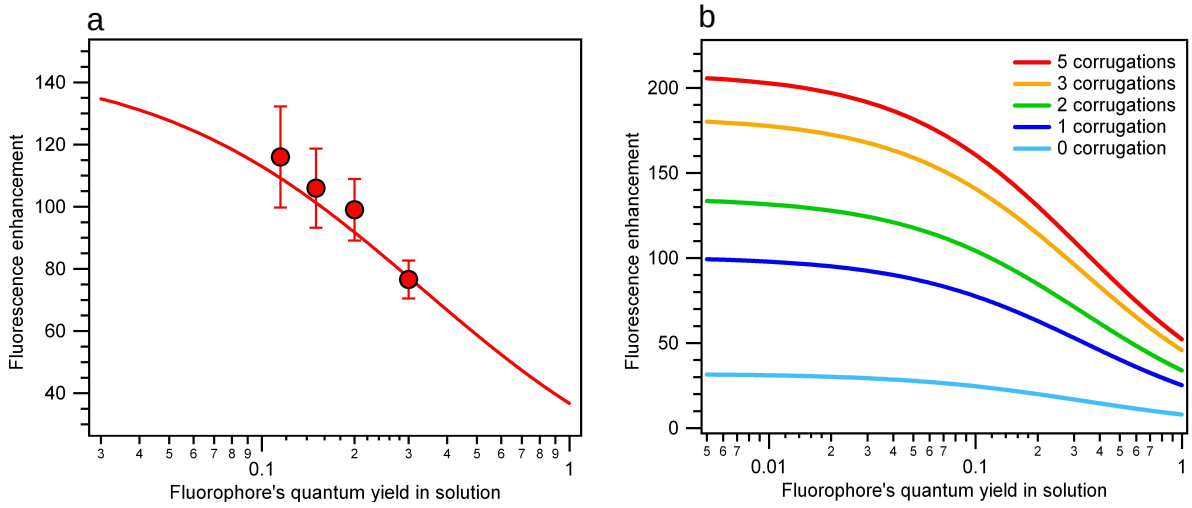


Figure 5.10 – *(a) Exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ dans le régime linéaire d'excitation en fonction du rendement quantique initial de l'émetteur fluorescent utilisé pour une nano-ouverture entourée de 5 corrugations périodiques d'après les gains mesurés en référence [114]. Les points indiquent les mesures expérimentales et la ligne continue représente le modèle analytique calculé d'après l'équation 4.3. (c) Prédictions théoriques des gains de fluorescence en fonction du nombre de sillons entourant l'ouverture centrale d'après les résultats obtenus dans la sous-section 5.2.3 [113].*

En l'absence de structures plasmoniques (c'est à dire dans le cas de la solution de référence), les molécules présentent un taux d'émission radiatif k_r^S, un taux d'émission non radiatif $k_{nr}^S + k_q\ [MV^{2+}]$ et un rendement quantique $\Phi = k_r^S/(k_r^S + k_{nr}^S + k_q\ [MV^{2+}])$. En introduisant une antenne au voisinage des émetteurs fluorescents, le taux d'émission radiatif est modifié en k_r^{S*}, l'efficacité de collection en κ^* et le taux d'excitation en k_e^*. Le rendement quantique des émetteurs se réécrit alors $\Phi^* = k_r^{S*}/(k_r^{S*} + k_{nr}^S + k_q\ [MV^{2+}] + k_{abs}^*)$ (cf. chapitre 4). En utilisant l'équation 4.3 du chapitre 4 et les mesures expérimentales des gains η_{I_e}, $\eta_{k_{em}}$ et $\eta_{k_{tot}}$ obtenus pour la structure étudiée [114], l'évolution de l'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$ en fonction du rendement quantique initial Φ des émetteurs peut être analytiquement déterminée. Les résultats sont représentés par la ligne continue sur la Figure 5.10. Les données expérimentales sont en très bon accord avec le modèle analytique, ce qui est une autre confirmation de la validité de la procédure de caractérisation de fluorescence développée.

Enfin, le modèle analytique et les gains η_{I_e}, $\eta_{k_{em}}$ et $\eta_{k_{tot}}$ mesurés expérimentalement dans la sous-section 5.2.3, ont été utilisés pour prédire l'exaltation de fluorescence en fonction du rendement quantique initial Φ des molécules diffusant dans les nano-ouvertures corruguées pour les différents nombre de sillons (Figure 5.10 (b)). Un gain de fluorescence moléculaire $\eta_{F_{low}}$ =200 pourrait être obtenu en utilisant un fluorophore de rendement quantique Φ =2% diffusant dans une nano-ouverture structurée par 5 corrugations.

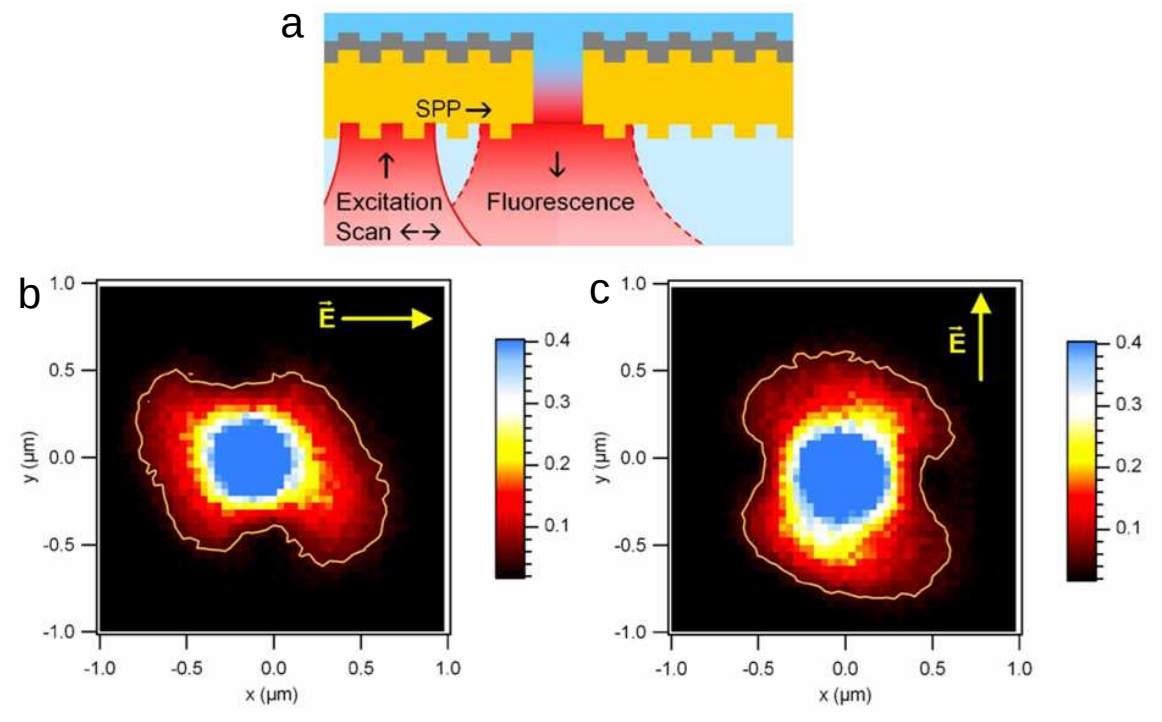


FIGURE 5.11 – *(a) Schéma du principe des expériences présentées dans la section 5.2.5 : le faisceau laser d'excitation est focalisé par un objectif d'ouverture numérique 1.2 et balaye un échantillon de nano-ouverture structurée par 5 corrugations périodiques dans lequel diffusent les molécules d'Alexa 647. (b) et (c) Images de fluorescence respectivement obtenues pour des polarisations horizontale et verticale du champs électrique incident. L'apparition de forme de papillons est caractéristique du couplage sélectif lorsque le champ incident est polarisé TM par rapport au réseau de corrugations [114].*

5.2.5 Couplage entre le champ excitateur et les ondes de surface

Afin de mettre en évidence la capacité que possède les nano-ouvertures corruguées de coupler l'énergie électromagnétique vers l'ouverture centrale via les ondes de surface, des études expérimentales supplémentaires ont été conduites. Pour cela, le laser d'excitation focalisé par un objectif d'ouverture numérique ON=1.2 balaye une nano-ouverture structurée par 5 sillons périodiques afin de détecter la fluorescence des molécules diffusant dans l'ouverture centrale comme schématisé en Figure 5.12 (a). Précisons que lors de ces expériences, la voie de détection de fluorescence n'est pas balayée, seul l'émission de fluorescence provenant de l'ouverture centrale est collectée lorsque l'échantillon est balayé par le laser d'excitation. Les images obtenues (Figure 5.12 (a) et (b)) montrent l'apparition de formes de papillons sensibles à la polarisation du champ incident, ce qui est caractéristique du couplage sélectif lorsque le champ incident est polarisé selon la direction transverse magnétique

(TM) par rapport au réseau de corrugations circulaires. Ces observations expérimentales sont une représentation directe de la dépendance du couplage entre les ondes de surface (et en particulier des plasmons de surface) et le champ électrique incident en polarisation TM.

5.2.6 Analyse spectrale

Les sillons périodiques structurant l'ouverture centrale étant équivalent à un réseau, le spectre d'émission des molécules peut être modifié à cause de la dépendance en longueur d'onde des conditions de résonance. Pour évaluer ces supposées modifications, l'étude du spectre de fluorescence des molécules d'Alexa 647 diffusant dans les ouvertures corruguées a été effectuée de la même manière que dans le cas des ouvertures simples, en utilisant le spectromètre à réseau équipé d'une caméra CCD refroidie. Les intensités de fluorescence mesurées peuvent alors être normalisées par le nombre moyen de molécules diffusant dans l'ouverture centrale. Les résultats de ces mesures spectrales sont présentés en Figure 5.2.6 (a) et peuvent directement être comparés avec ceux obtenus dans le cas des ouvertures non-corruguées et en référence en solution. Comme nous pouvons le constater, le spectre d'émission de fluorescence ne semble pas être notablement affecté par la présence du réseau de corrugations dans toute la gamme spectrale étudiée. L'exaltation de fluorescence η peut alors être tracée en fonction de la longueur d'onde d'émission (Figure 5.2.6 (b)). De la même manière que dans le cas des ouvertures simples, l'exaltation de fluorescence η augmente en fonction de la longueur d'onde d'émission dans la gamme 650-690 nm.

5.3 Contrôle directionnel de fluorescence moléculaire par des nano-ouvertures corruguées

5.3.1 Directivité de fluorescence dans la direction normale au plan de l'échantillon

L'exaltation de fluorescence moléculaire est une des deux caractéristiques importantes que doit permettre une nano-antenne optique. La seconde est la directivité de l'antenne, qui est directement liée à sa capacité à concentrer la lumière rayonnée dans une certaine direction donnée. La caractérisation expérimentale de la directivité du faisceau de fluorescence émise par les molécules diffusant dans les nano-ouvertures corruguées a été effectuée en plaçant l'objectif à immersion d'ouverture numérique ON=1.2 sur notre dispositf expérimental. Cela permet de garantir une plage angulaire de détection suffisante pour les mesures de directivité, avec un angle de collection de $\pm 64°$ centré sur l'axe optique. La distribution angulaire d'intensité a été mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope de forte ouverture numérique par une caméra CCD (Charge-Coupled Device, Kodac KAF-1603) pour les différentes ouvertures corruguées de la section 5.2 (pour rappel, les paramètres géométriques de ces structures sont les suivants : périodicité du réseau

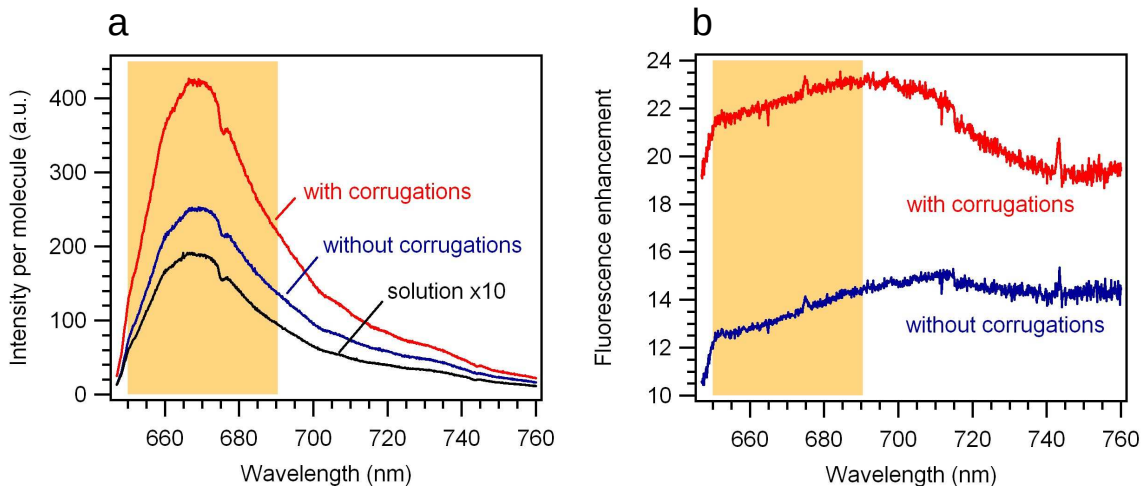


FIGURE 5.12 – *Analyse spectrale de l'exaltation de fluorescence des molécules d'Alexa 647 diffusant dans des ouvertures avec et sans corrugations. (a) Signal de fluorescence normalisé par molécule en fonction de la longueur d'onde d'émission pour un temps d'intégration de 10 s. (b) Exaltation de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission. La zone orangée correspond à la région spectrale (650-690 nm) utilisée pour les mesures d'exaltation de fluorescence présentées en sous-section 5.2.6 [114].*

de corrugations 440 nm, distance entre l'ouverture centrale et le premier sillon du réseau 440 nm, diamètre de l'ouverture centrale 135 nm). Les images obtenues sont présentées en Figure 5.13 en fonction du nombre de corrugations plasmoniques : 0 (a), 1 (b), 2 (c) et 3 (d). Ces images représentent l'intensité émise dans les différentes directions angulaires depuis l'antenne, c'est qui est équivalent au diagramme d'émission mesuré dans l'espace de Fourrier. L'estimation du nombre de molécules obtenue par FCS permet de déterminer l' intensité moyenne rayonnée par émetteur pour les différentes nano-ouvertures corruguées. Ceci permet de mesurer précisément le diagramme d'intensité moyenne par molécule diffusant dans l'ouverture centrale et autorise des comparaisons quantitatives directes des différents diagrammes de rayonnement obtenus.
L'image du diagramme de rayonnement pour une ouverture non-corruguée (Figure 5.13 (a)) est un disque quasi-homogène dont les extrémités correspondent à l'angle maximal de collection de l'objectif utilisé (±64°). L'émission de fluorescence s'effectue donc de manière isotrope pour une simple nano-ouverture car la lumière issue de l'ouverture est diffractée dans toutes les directions de l'espace comme il a été précisé dans le chapitre 4. Pour les nano-ouvertures corruguées, un second disque lumineux centré sur l'axe optique est observé à l'intérieur du disque principal (Figure 5.13 (b)-(d)). En augmentant le nombre de corrugations, ce disque apparaît de plus en plus brillant. La fluorescence provenant des molécules diffusant dans l'ouverture centrale n'est donc plus dirigée de manière isotrope en présence du réseau de corrugations. Une coupe horizontale effectuée au centre du disque principal est disponible en Figure 5.13 (e) pour les différentes nano-ouvertures corruguées.

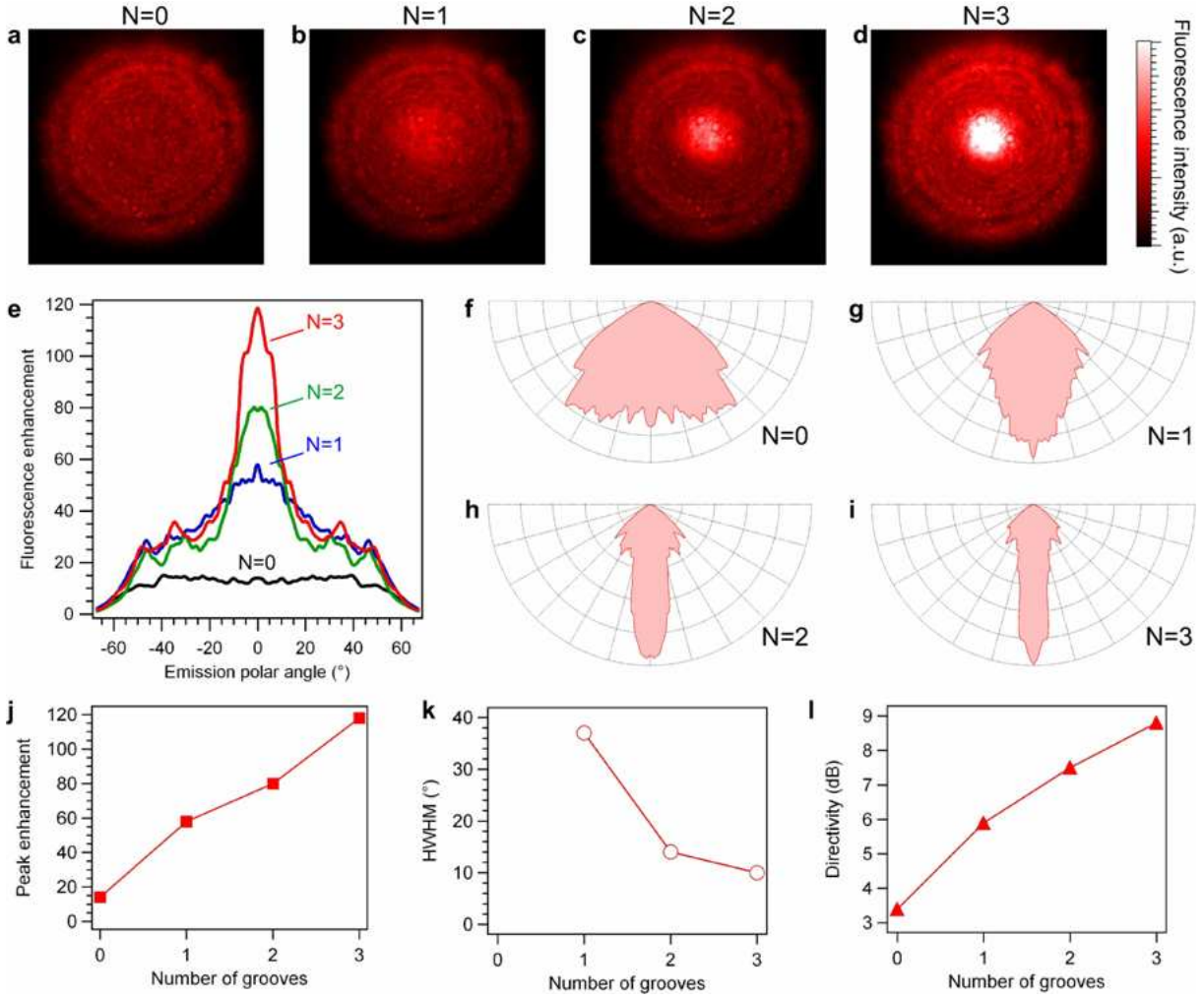


Figure 5.13 – *Diagramme de rayonnement et exaltation de fluorescence des molécules diffusant dans des nano-ouvertures corruguées (paramètre $a \approx \lambda_{SP}$, émission de fluorescence centrée à 670 nm) en fonction du nombre de sillons périodiques. (a)-(d) Distribution d'intensité de fluorescence mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope (ON=1.2) en fonction du nombre de sillons périodiques N incrémenté de 0 à 3. (e) Coupe de l'intensité de fluorescence par molécule en fonction de l'angle polaire de collection θ obtenue d'après (a)-(d). Ces données ont été normalisées par rapport à la solution de référence et représente donc l'exaltation de fluorescence moléculaire en fonction de θ. (f)-(i) Graphes polaires de la distribution d'intensité de fluorescence pour les différents nombres de sillons périodiques. (j) Pics d'exaltation de fluorescence obtenus d'après (e) pour les différentes ouvertures corruguées. (k) Demi-largeur à mi-hauteur (HWHM) des intensités pics calculée en fonction du nombre de sillons. (l) Directivité des nano-ouvertures corruguées calculée en dB [115]*

Les données ayant été normalisées par rapport au cas de la solution de référence, ce graphe représente l'exaltation angulaire de fluorescence moléculaire en fonction du nombre de corrugations entourant l'ouverture centrale. Comme nous pouvons le constater, l'ajout de sillons périodiques permet de très fortement modifier le diagramme de rayonnement, avec une émission qui reste toujours centrée dans la direction θ =0°. Pour visualiser ces données de manière plus intuitive, les intensités de fluorescence mesurées dans chacunes des directions θ ont été tracées en représentation polaire pour les différents nombres de corrugations entourant l'ouverture centrale (Figure 5.13 (f)-(i)). Il apparaît clairement que le réseau de corrugations permet de rediriger préférentiellement la fluorescence issue de l'ouverture centrale selon l'axe optique. Afin de quantifier ces résultats plus précisément, la demi-largeur à mi-hauteur (HWHM) des intensités pics (c'est à dire dans la direction θ =0°) a été calculée pour les différentes ouvertures corruguées. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 5.13 (k). Une valeur HWHM de 8° est mesurée pour une nano-ouverture entourée de 3 sillons périodiques, ce qui est une valeur plus faible que celle obtenue avec l'antenne Yagi-Uda [9].
Dans la théorie des antennes, la directivité D est une figure de mérite qui correspond au rapport entre la densité de puissance I_{max} rayonnée dans la direction d'émission maximale (I_{max} peut être obtenue en utilisant les données de la Figure 5.13 (j)) et la densité de puissance I_{iso} rayonnée par une source isotrope idéale qui émettrait la même quantité de puissance totale :

$$D = \frac{I_{max}}{I_{iso}} = 4\pi \frac{I_{max}}{P}. \tag{5.2}$$

où P est la puissance totale rayonnée. Pour obtenir cette figure de mérite, il est donc nécessaire d'estimer la puissance totale rayonnée par cette source idéale. Cela peut s'effectuer en intégrant l'intensité de fluorescence des molécules diffusant dans l'ouverture corruguée considérée par rapport à l'angle d'émission θ. La puissance obtenue doit alors être corrigée d'un facteur 2, la fluorescence provenant des molécules de l'ouverture centrale étant émise dans le demi-espace inférieur. La directivité D calculée pour chaque structure corruguée est indiquée en Figure 5.13 (i). Une directivité de 8.7 dB combinée à une valeur HWHM de 8° peuvent être obtenues en utilisant une ouverture structurée par 3 sillons périodiques. L'interprétation physique des résultats sur la directivité d'émission sera détaillée dans la sous-section 5.3.3.

5.3.2 Modification de la direction d'émission par variation de la distance a entre l'ouverture centrale et le premier sillon du réseau

En parallèle des résultats obtenus précédemment, des études expérimentales ont été conduites sur des bull's eyes dont la distance a entre l'ouverture centrale et la première corrugation du réseau (Figure 5.14 (a)) a été modifiée par rapport aux structures présentées dans la section 5.3.1 (Figure 5.14 (b)). Pour les mesures que nous allons présenter dans cette section, le paramètre a a été fixé à 220 nm, ce qui correspond appoximativement à la

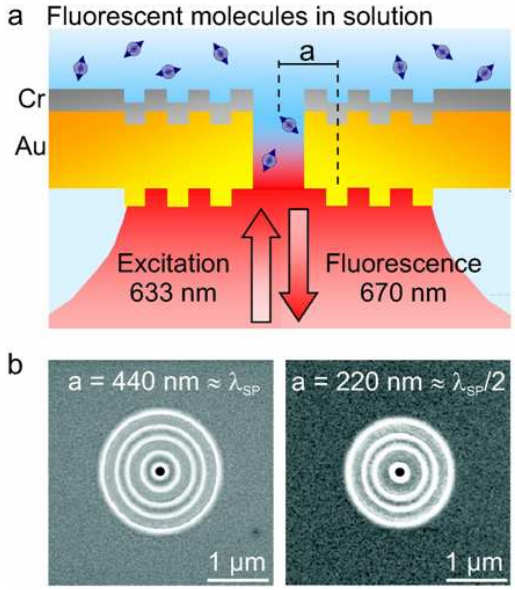


Figure 5.14 – *(a) Schéma de la configuration expérimentale. Le paramètre a représente la distance entre le centre de l'ouverture et le premier sillon du réseau de corrugations. Images de microscopie électronique à balayage des nano-ouvertures corruguées pour des paramètres $a \approx \lambda_{SP}$ (b) et $a \approx \lambda_{SP}/2$ (c) [115].*

demi-longueur d'onde de résonance des ondes de surface ($a \approx \lambda_{SP}/2$ à l'interface corruguée métal/diélectrique. Les autres paramètres des structures demeurent inchangés (profondeur des corrugations : 65 nm, largeur des corrugations 200 nm, périodicité 440 nm, diamètre de l'ouverture centrale 135 nm). Une image de microscopie électronique à balayage d'une structure corruguée de paramètre $a \approx \lambda_{SP}/2$ est disponible en Figure 5.14 (c). Toutes les mesures expérimentales présentées dans la section 5.3.1 ont également été effectuées pour les nano-ouvertures corruguées de paramètre $a \approx \lambda_{SP}/2$.
Les images d'intensité de fluorescence obtenues dans le plan focal arrière de l'objectif à immersion d'ouverture numérique ON=1.2 sont présentées en Figure 5.15 (a)-(d) en fonction du nombre de sillons périodiques. Les images obtenues sont très différentes de celles présentées en Figure 5.13 (a)-(d). En complément du disque principal, un second disque sombre apparaît au centre de l'image, avec une intensité de plus en plus faible lorsque le nombre de sillons du réseau augmente. Une coupe horizontale de l'intensité de fluorescence réalisée au centre du disque principal est disponible en Figure 5.15 (e). Ces données ont également été normalisées à l'aide de mesures FCS sur une solution de référence. Des pics d'intensité de fluorescence apparaissent dans des zones centrées autour de $\theta = \pm 30°$, dont la largeur augmente en fonction du nombres de sillons périodiques. Les valeurs de ces pics sont indiqués en Figure 5.15 (j) selon le nombre de corrugations. Des minimas d'intensité de fluorescence sont mesurés dans la direction normale à l'échantillon (θ =0°). Les représentations de ces résultats en coordonnées polaires et les valeurs HWHM

des intensités maximales sont disponibles en Figure 5.15 (f)-(i) et (k) pour les différentes nano-ouvertures corruguées. Des valeurs HWHM comprises entre 17 et 20° sont mesurées dans des directions centrées autour de $\theta = \pm 30°$. La figure de mérite (directivité) de ces nano-antennes a été calculée de la même manière que précédemment (Figure 5.15 (l)). Une directivité de 5 dB est obtenue pour ouverture centrale structurée par 2 corrugations.

5.3.3 Interprétation et modélisation physique des résultats obtenus

Les différences sur la directivité d'émission obtenues pour des paramètres $a \approx \lambda_{SP}$ et $a \approx \lambda_{SP}/2$ suggérent des effets d'interférences constructives et destructives entre la fluorescence émise en champ lointain depuis l'ouverture centrale et le rayonnement de fluorescence provenant des intéractions avec les ondes de surface qui est redécouplé en champ lointain par le réseau de corrugations périodiques. La fluorescence issue de l'ouverture centrale et la fluorescence réémise par le réseau de corrugations sont en phase dans la direction normale à l'échantillon (θ =0°) lorsque la distance a entre l'ouverture centrale et le réseau de sillons périodiques est multiple de la longueur d'onde λ_{SP}, et en opposition de phase lorsque a est un multiple de la demi longueur d'onde λ_{SP}. Dans le cas d'interférences constructives ($a = \lambda_{SP}$), un pic d'intensité de fluorescence est attendu dans la direction θ =0° tandis qu'un creux d'intensité de fluorescence est attendu à θ =0° pour des interférences destructives ($a = \lambda_{SP}/2$). Ceci fournit une interprétation aux différences observées entre les nano-ouvertures corruguées de paramètres géométriques $a \approx \lambda_{SP}$ (Figure 5.13 (b)-(d)) et $a \approx \lambda_{SP}/2$ (Figure 5.15 (b)-(d)). Pour confirmer ces effets d'interférences, nous allons dans un premier temps présenter une étude basée sur un modèle d'optique physique et qui sera complétée dans un second temps par des simulations FDTD.

Modèle d'optique physique

Pour simplifier le problème, cette étude est restreinte à un cas 2D. La configuration et les notations utilisées sont présentées en Figure 5.16. L'ouverture centrale est remplacée par source ponctuelle émettant à une longueur d'onde λ dans le milieu. La majeure partie du rayonnement est émis dans le demi-espace inférieur d'indice n_g =1.52 et une certaine quantité de rayonnement est couplée aux ondes de surface vers le réseau de corrugations. Pour tenir compte des effets de retard dus à la propagation des ondes de surface à l'interface métal/diélectrique (dont l'indice du mode est noté n_{SP}), l'indice n_{SP} a été considéré en première approximation comme égal à l'indice de réfraction des plasmons de surface à l'interface or-verre : $n_{SP} = \sqrt{\epsilon' \, \epsilon_g/(\epsilon' + \epsilon_g)}$, où ϵ' désigne la partie réelle de la permittivité du métal (nous avons pris ϵ' =12 dans le cas de l'or pour une longueur d'onde λ =670 nm, qui est la longueur d'onde centrale d'émission de fluorescence des molécules d'Alexa 647) et $\epsilon_g = n_g^2$ est la permittivité du substrat. Chaque sillon du réseau est considéré comme une source ponctuelle secondaire de rayonnement, qui redécouple les ondes de surface en champ lointain avec une efficacité relative notée $q(\theta)$. Le paramètre $q(\theta)$ a arbitrairement été définie comme $q(\theta) = q_{max} cos^2(\theta)$, avec une valeur q_{max} =0.2 pour correspondre aux

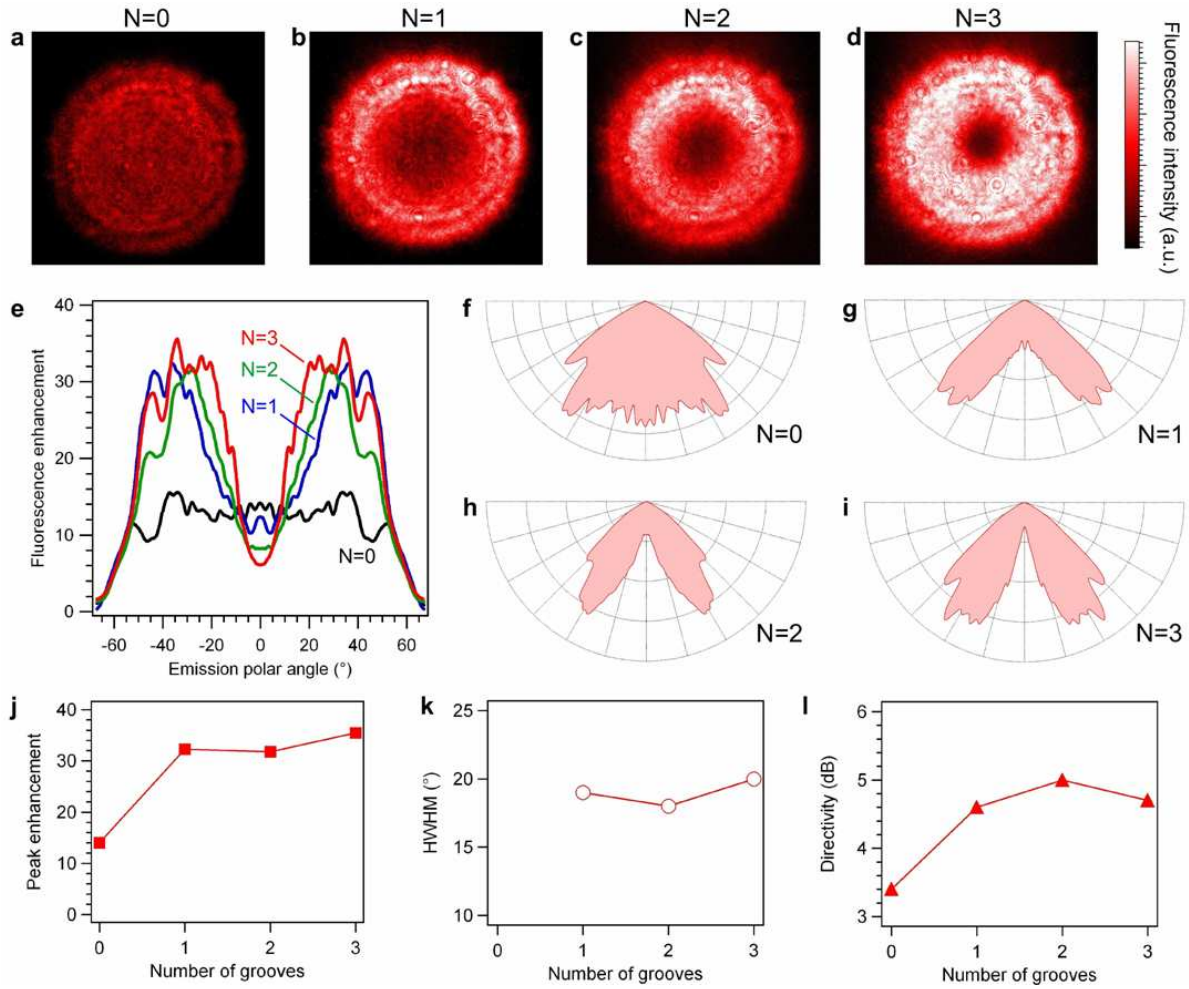


Figure 5.15 – *Diagramme de rayonnement et exaltation de fluorescence des molécules diffusant dans des nano-ouvertures corruguées (paramètre $a \approx \lambda_{SP}/2$, émission de fluorescence centrée à 670 nm) en fonction du nombre de sillons périodiques. (a)-(d) Distribution d'intensité de fluorescence mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope (ON=1.2) en fonction du nombre de sillons périodiques N incrémenté de 0 à 3. (e) Coupe de l'intensité de fluorescence par molécule en fonction de l'angle polaire de collection θ obtenue d'après (a)-(d). Ces données ont été normalisées par rapport à la solution de référence et représente donc l'exaltation de fluorescence moléculaire en fonction de θ. (f)-(i) Graphes polaires de la distribution d'intensité de fluorescence pour les différents nombres de sillons périodiques. (j) Pics d'exaltation de fluorescence obtenus d'après (e) pour les différentes ouvertures corruguées. (k) Demi-largeur à mi-hauteur (HWHM) des intensités pics calculée en fonction du nombre de sillons. (l) Directivité des nano-ouvertures corruguées calculée en dB [115]).*

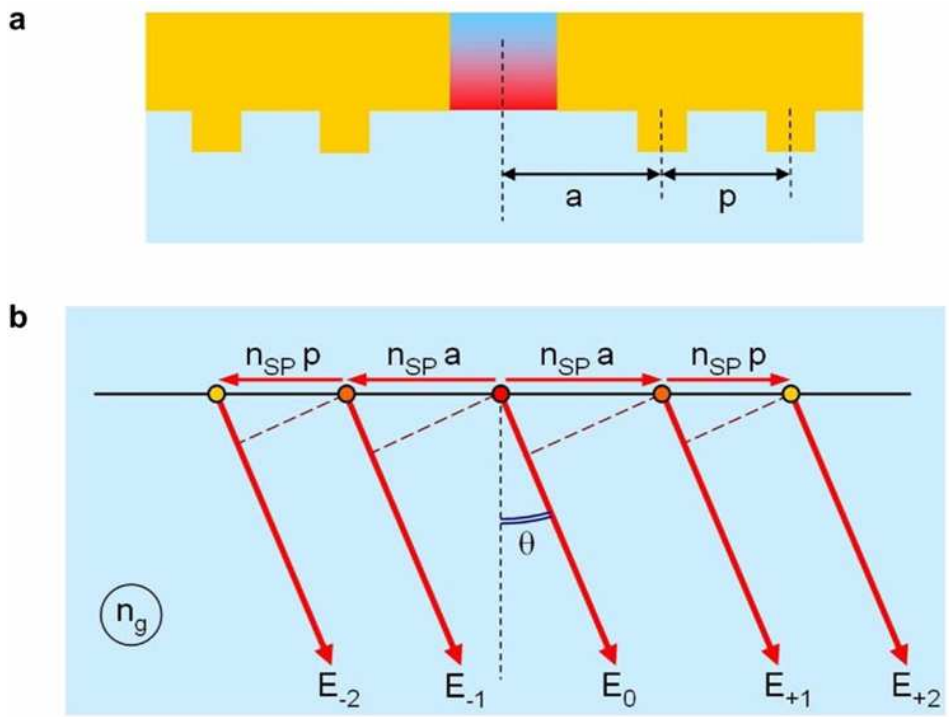


FIGURE 5.16 – *(a) Schéma à 2 dimensions d'une nano-ouverture structurée par un réseau de corrugations de périodicité p et de paramètre a (a est la distance entre l'ouverture centrale et la première corrugation). (b) Notations utilisées pour le modèle d'optique physique décrit. L'ouverture centrale est remplacée par une source ponctuelle monochromatique (point rouge) et chaque sillon du réseau est considéré comme une source ponctuelle secondaire de rayonnement [115].*

observations expérimentales. Cela signifie que chaque sillon du réseau rayonne un maximum d'intensité de q^2_{max} =4% par rapport à l'intensité émise depuis l'ouverture centrale, ce qui paraît être une estimation raisonnable. Avec ce modèle, le champ électrique total rayonné en champ lointain dans la direction θ est donné par :

$$\begin{aligned} E_{tot}(\theta) &= E_0 e^{-i\varphi_0} + q(\theta) E_0 e^{-i\varphi_{+1}} + q(\theta) E_0 e^{-i\varphi_{-1}} \\ &+ q(\theta) E_0 e^{-i\varphi_{+2}} + q(\theta) E_0 e^{-i\varphi_{-2}} + ... \end{aligned} \tag{5.3}$$

où E_0 est l'amplitude du champ électrique directement rayonné par la source dans le substrat (dans le cas d'une source isotrope, E_0 est indépendant de θ), et φ_i est la phase relative du champ rayonné par le sillon i. Au cours de la propagation du champ, les phases relatives s'accumulent avec un retard proportionnel à la différence de marche optique qui est la distance parcourue par les ondes multipliée par l'indice de réfraction du mode. Les phases relatives sont définies comme :

$$\begin{aligned}
\varphi_0 &= 0 \\
\varphi_{+1} &= \frac{2\pi}{\lambda}(n_{SP}a - n_g a\sin(\theta)) \\
\varphi_{-1} &= \frac{2\pi}{\lambda}(n_{SP}a + n_g a\sin(\theta)) \\
\varphi_{+2} &= \frac{2\pi}{\lambda}(n_{SP}(a+p) - n_g(a+p)\sin(\theta)) \\
\varphi_{-2} &= \frac{2\pi}{\lambda}(n_{SP}(a+p) + n_g(a+p)\sin(\theta))
\end{aligned} \tag{5.4}$$

L'intensité totale rayonnée $I(\theta) = |E_{tot}(\theta)|^2$ peut alors être calculée pour chaque angle polaire θ. Les données obtenues d'après les simulations numériques sont présentées en Figure 5.17. Ces résultats numériques reproduisent de manière assez similaire les caractéristiques globales expérimentalement mesurées et les diagrammes de rayonnement pour une émission de fluorescence centrée autour de λ =670 nm avec des structures corruguées de paramètres $a \approx \lambda_{SP}$ et $a \approx \lambda_{SP}/2$. A cause des approximations en sources ponctuelles effectuées sur l'ouverture centrale et les sillons du réseau et des considérations en émission monochromatique, la divergence angulaire est plus faible que celle mesurée expérimentalement. Cependant, l'avantage de ce premier modèle d'optique physique est d'expliquer de manière assez intuitive les effets physiques à l'origine des résultats obtenus expérimentalement.
Dans la direction normale à l'échantillon (θ =0°), le modèle prédit des interférences constructives si les phases relatives φ_i sont des multiples entiers de 2π, i.e. si $n_{SP}a$ est multiple entier de λ. Cela correspond à la configuration expérimentale où a =440 nm, λ =670 nm et n_{SP} =1.69, et donc pour laquelle $n_{SP}a \simeq 1.1\lambda$. En revanche, des interférences destructives dans la direction normale à l'échantillon (θ =0°) apparaissent lorsque le terme $n_{SP}a$ est multiple entier de $\lambda/2$, ce qui correspond à la configuration expérimentale a =200 nm (λ =670 nm, n_{SP} =1.69) et pour laquelle $n_{SP}a \simeq 0.55\lambda$.

Simulations FDTD

Afin de confirmer les résultats obtenus avec le modèle d'optique physique, des simulations numériques basées sur un code commercial FDTD (Fullwave Rsoft Inc.) ont été conduites. Pour cela, l'intensité du champ transmis par une fente 2D perçée dans un film d'or de 200 nm et structurée sur la surface supérieure du film métallique par un réseau de 8 sillons parallèles de profondeur 65 nm a été calculée. La fente considérée est dans un milieu aqueu, et est illuminée du dessous par une onde plane polarisée TM à une longueur d'onde de 670 nm dans le vide. Le demi-espace inférieur situé directement sous la fente correspond à un substrat de verre d'indice de réfraction n_g =1.52. L'espace de calcul est de 3.2×2.4 μm, avec une maille uniforme de 2 nm.
Les résultats de ces simulations sont présentés en Figure 5.18 (échelle logarithmique) pour les différentes distances a entre la fente principale et le premier sillon parallèle. Les cas correspondants aux configurations expérimentales a =440 nm et a =220 nm sont présentés en Figure 5.18 (a)-(b), et montrent des effets de directivité sur (Figure 5.18 (a)) et hors

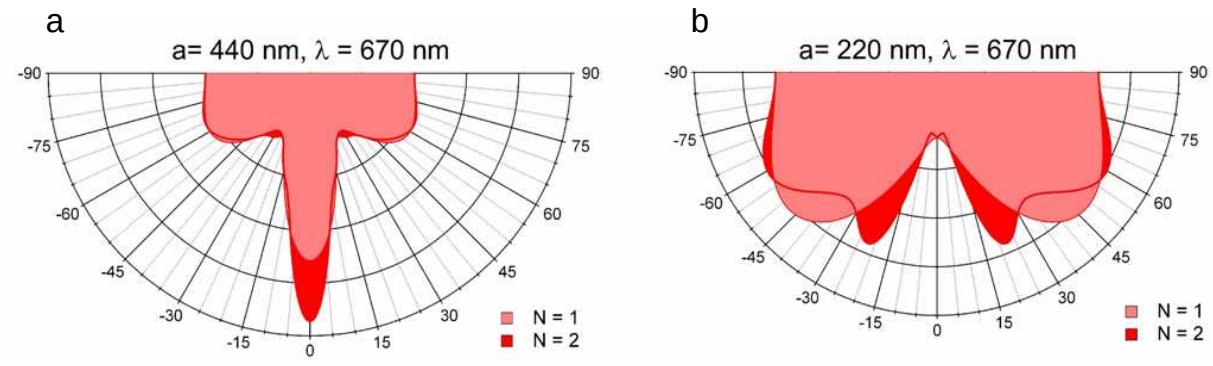


FIGURE 5.17 – *Diagrammes de rayonnement calculés selon le modèle d'optique physique pour des distances a entre l'ouverture centrale et le premier sillon du réseau de 440 nm ($\approx \lambda_{SP}$) (a) et 220 nm ($\approx \lambda_{SP}/2$) (b) [115].*

axe (Figure 5.18 (b)). D'autre part, les résultats obtenus avec le modèle d'optique physique ont suggérés une distance a "optimale" de 400 nm pour une directivité selon l'axe optique (θ =0°) et de 200 nm pour une directivité hors axe optique. Ceci est à nouveau observé sur les simulations FDTD présentées en Figure 5.18 (c)-(d). Les résultats obtenus par FDTD confirment donc le modèle simple d'optique physique présenté au début de cette sous-section, et montrent une élégante correspondance qualitative entre les résultats expérimentaux sur la fluorescence provenant d'émetteurs aléatoirement localisés et les résultats issus des simulations numériques en lumière transmise.

5.3.4 Influence de la longueur d'onde d'émission sur la directivité de fluorescence

Les nano-ouvertures corruguées de paramètre a =220 nm utilisées dans la section 5.3.2 ont également été étudiées à d'autres longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Dans l'étude que nous allons présenter dans cette section, l'excitation de molécules de Rhodamine 6G (Rh6G, Aldrich, St Louis, MO, rendement quantique Φ =95%, pics d'absorption/émission respectivement centrés sur 525/550 nm) s'effectue par une diode laser opérant à une longueur d'onde λ =488 nm. Le faisceau excitateur est focalisé dans le plan de l'échantillon par l'objectif de microscope d'ouverture numérique ON=1.2 et la détection s'effectue sur le même montage de microscopie confocale utilisé pour l'excitation à 633 nm, avec des filtres fluorescence passe-bande 535±20 nm placés devant les photodiodes à avalanches. Les images de la distribution d'intensité de fluorescence enregistrées par la caméra CCD dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope sont présentées en Figure 5.19 (a)-(d) pour les différents nombres de sillons entourant l'ouverture centrale. Contrairement à l'émission de fluorescence centrée sur 670 nm, la directivité d'émission à 560 nm s'effectue dans la direction normale à l'échantillon, c'est à dire pour un angle θ =0°.

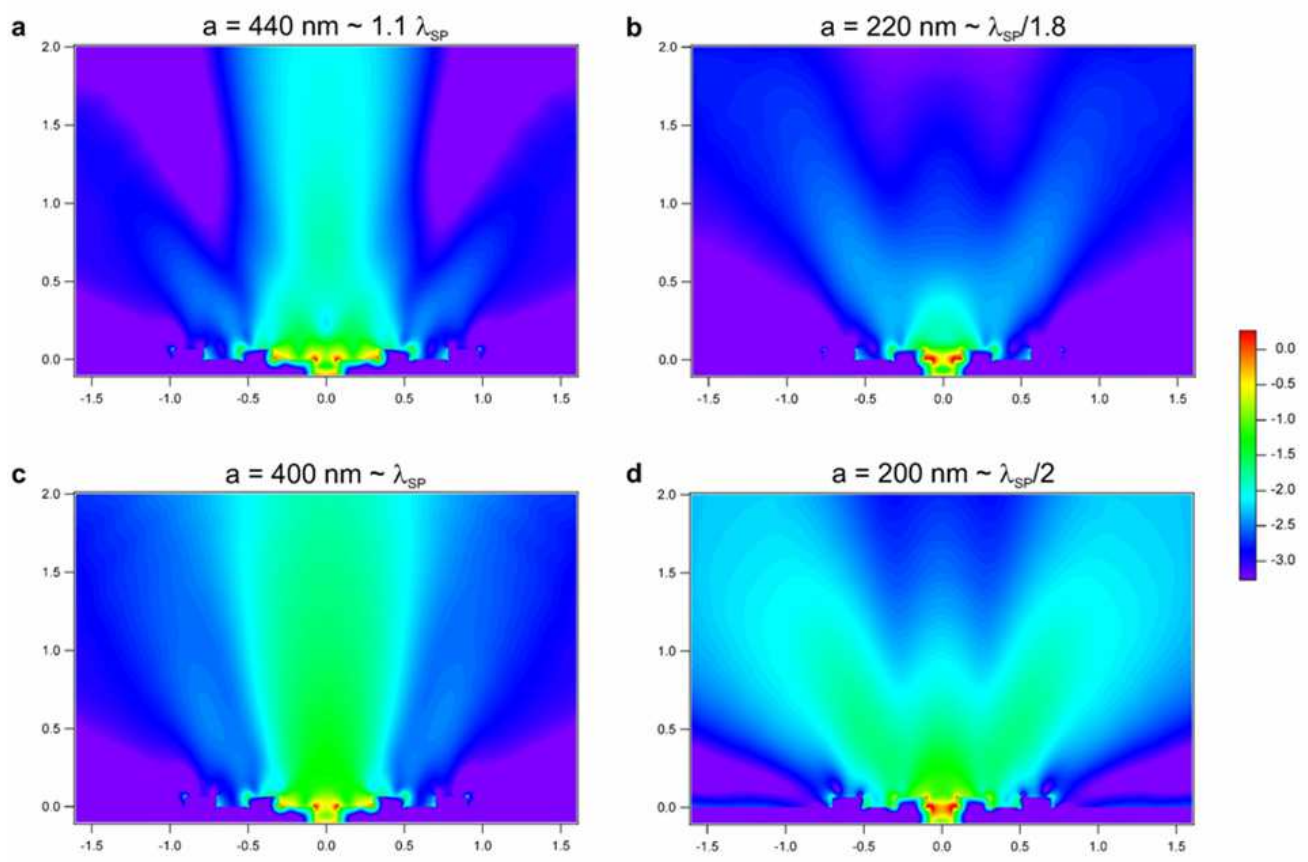


Figure 5.18 – *Distribution (en échelle logarithmique) de l'intensité du champ électrique $|E|^2$ normalisée par rapport à l'intensité du champ incident $|E_0|^2$ pour une distance a entre la fente et le premier sillon parallèle du réseau correspondant aux configurations expérimentales étudiées (a, b) et aux cas "optimal" prédit par le modèle d'optique physique (c, d). La longueur d'onde dans le vide est 670 nm pour toutes les simulations. Les axes en abscisse et en ordonnés sont en μm, et tous les graphes présentés ont la même échelle de niveaux de couleurs [115].*

Ceci est directement lié au décalage de la longueur d'onde d'émission de fluorescence vers de plus courtes longueurs d'onde comparé aux résultats de la section 5.3.2. La distance entre l'ouverture centrale et le premier sillon périodique qui était de $a \approx \lambda_{SP}/1.8$ pour les molécules d'Alexa 647 (émission centrée sur 670 nm), est à présent de $a \approx \lambda_{SP}/1.4$ pour les molécules de Rh6G (émission centrée sur 560 nm). Les phases relatives φ_i résultantes sont alors modifiées, conduisant à des effets d'interférences constructives dans la direction $\theta = 0°$ pour la fluorescence des molécules de Rh6G. Les coupes de l'intensité de fluorescence dans le plan focal arrière et leurs représentations en diagramme polaire sont disponibles en Figure 5.19 (e)-(i) pour les différentes ouvertures corruguées. Comme nous pouvons le

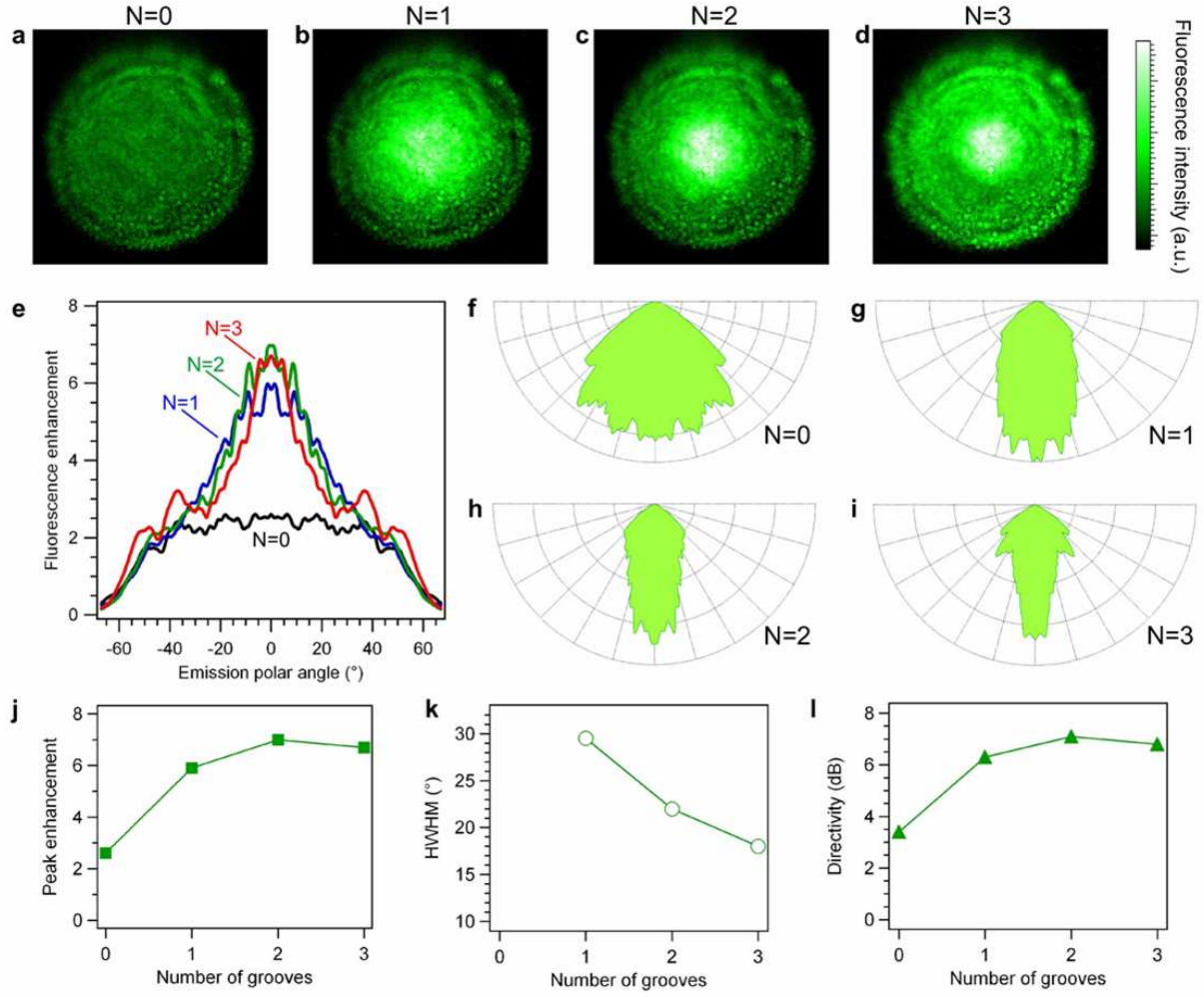


FIGURE 5.19 – *Diagramme de rayonnement et exaltation de fluorescence des molécules diffusant dans des nano-ouvertures corruguées (paramètre $a \approx \lambda_{SP}/2$, émission de fluorescence centrée à 560 nm) en fonction du nombre de sillons périodiques. (a)-(d) Distribution d'intensité de fluorescence mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope (ON=1.2) en fonction du nombre de sillons périodiques N incrémenté de 0 à 3. (e) Coupe de l'intensité de fluorescence par molécule en fonction de l'angle polaire de collection θ obtenue d'après (a)-(d). Ces données ont été normalisées par rapport à la solution de référence et représente donc l'exaltation de fluorescence moléculaire en fonction de θ. (f)-(i) Graphes polaires de la distribution d'intensité de fluorescence pour les différents nombres de sillons périodiques. (j) Pics d'exaltation de fluorescence obtenus d'après (e) pour les différentes ouvertures corruguées. (k) Demi-largeur à mi-hauteur (HWHM) des intensités pics calculée en fonction du nombre de sillons. (l) Directivité des nano-ouvertures corruguées calculée en dB [115].*

remarquer, des exaltations de fluorescence moléculaire $\eta_{F_{low}}$ supérieures à un facteur 5 sont obtenues dans la direction normale à l'échantillon en présence du réseau de corrugations, ce qui sont des valeurs plus fortes que dans le cas d'une simple nano-ouverture. Ces gains demeurent toutefois inférieurs à ceux obtenus sur des molécules d'Alexa 647 excitées à 633 nm. Cela s'explique d'une part, par le rendement quantique élevé des molécules de Rhodamine 6G (Φ =95%), qui ne permet quasiment pas d'obtenir un gain sur le taux d'émission radiatif, et d'autre part, par la permittivité de l'or dans la gamme 540-580 nm. Malgré celà, les valeurs HWHM mesurées pour les intensités pics (Figure 5.19 (k)) et la directivité des rayonnements obtenue (Figure 5.19 (l)) sont assez satisfaisantes, avec en particulier une valeur HWHM de 18° et une directivité de 6.6 dB mesurées pour une ouverture structurée par 3 sillons périodiques.

5.3.5 Nano-spectroscope à réseau pour le filtrage directionnel de l'émission de fluorescence à deux couleurs

Les résultats obtenus dans les sections 5.3.2 et 5.3.4 suggèrent que les longueurs d'ondes d'émission de molécules fluorescentes spectralement différentes peuvent être séparées angulairement en utilisant une nano-ouverture corruguée.

Filtrage directionnel en utilisant un paramètre a =220 nm

Pour cette étude, des molécules d'Alexa 647 (émission centrée sur 670 nm) et de Rh6G (émission centrée sur 550 nm) respectivement excitées à 633 et 488 nm, ont été placées dans les nano-ouvertures corruguées de paramètre a =220 nm (Figure 5.20 (a)). La distribution d'intensité de fluorescence pour les deux espèces moléculaires en présence est mesurée par la caméra CCD dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope ON=1.2. Les images obtenues sont présentées en Figure 5.20 (b)-(d), et les coupes d'intensité de fluorescence sont disponibles en Figure 5.20 (e). Comme attendu, l'émission de fluorescence provenant des molécules d'Alexa 647 est centrée dans la direction θ±30°, alors que l'émission de fluorescence des molécules de Rh6G est dirigée dans la direction θ =0° (Figure 5.20 (e)). Ces résultats montrent clairement qu'un filtrage des photons de fluorescence émis par des molécules spectralement différentes peut être opéré par une nano-antenne (de dimension 1.5 μm) dans le champ proche des émetteurs en solution, ce qui constitue la première démonstration expérimentale d'un contrôle directionnel de fluorescence multi-émetteurs. La nano-ouverture corruguée peut donc être vue comme un spectroscope à réseau dans le champ proche, qui sépare angulairement la fluorescence moléculaire selon la longueur d'onde d'émission. Enfin on notera que ces données sont en accord avec les expériences effectuées en transmission en lumière blanche sur des fentes structurées par des sillons parallèles présentées dans la sous section 5.1.2. Pour de courtes longueurs d'onde, la lumière transmise est centrée selon l'axe optique (θ =0°), alors qu'aux plus hautes longueurs d'onde, la lumière transmise est dirigée hors axe optique.

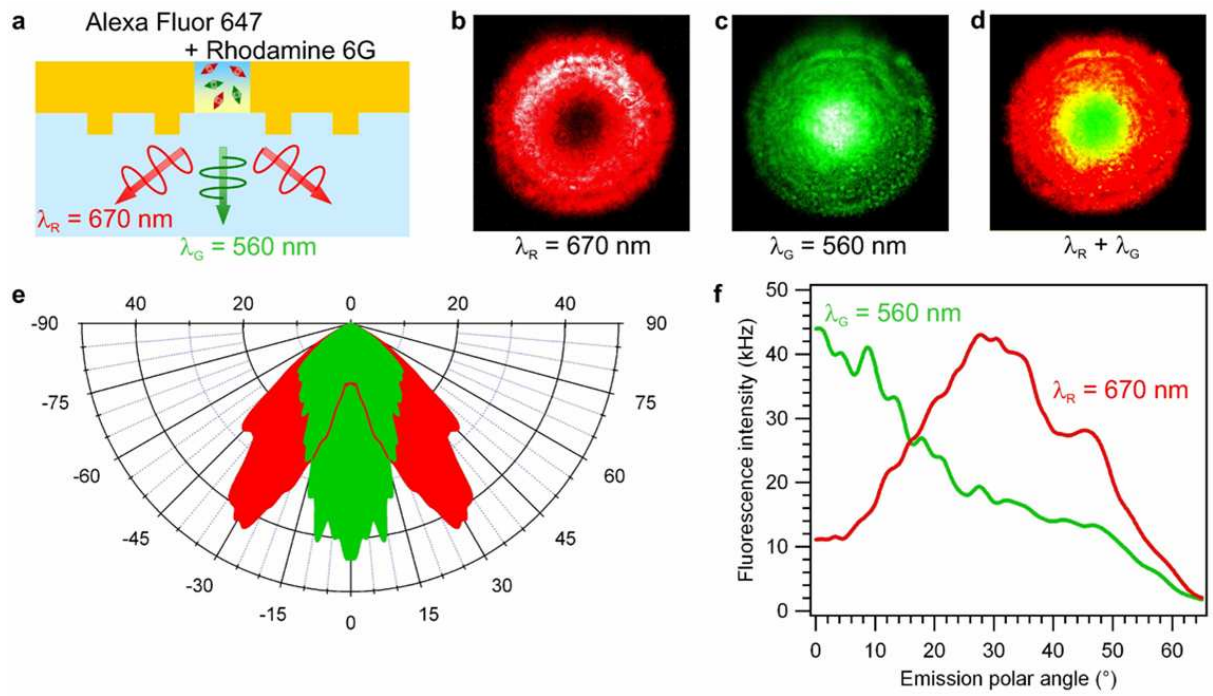


FIGURE 5.20 – *Filtrage angulaire de la fluorescence des molécules d'Alexa 647 (émission à 670 nm représentée en rouge) et de Rh6G (émission à 560 nm représentée en vert) par une nano-ouverture structurée par 2 sillons circulaires de périodicité 440 nm et de paramètre a =220 nm. (a) Configuration expérimentale pour laquelle la solution de molécules d'Alexa 647 et de Rh6G diffusent dans l'ouverture centrale. (b)-(d) Distribution d'intensité de fluorescence mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope (ON=1.2) pour les molécules d'Alexa 647 (b) et de Rh6G (c), et combinaison des deux images (d). Diagramme de rayonnement en fonction de l'angle θ (f) et représentation en coordonnées polaire (e) [115].*

Filtrage directionnel par décentrage de l'ouverture principale par rapport au résau de corrugations

La symétrie azimutale obtenue pour l'émission de fluorescence à 670 nm des molécules d'Alexa 647 en utilisant une ouverture corruguée de paramètre a =220 nm ne permet pas de concentrer les photons de fluorescence de manière optimale dans une seule direction donnée. La première manière de briser cette symétrie azimutale consisterait à structurer des sillons de péridocités différentes et des distance a décalées à gauche et à droite de l'ouverture centrale, ce qui est assez complexe à réaliser d'un point de vue nano-fabrication. Une autre manière plus élégante et moins difficile à réaliser consite à décaler la position de l'ouverture centrale d'une distance δ par rapport au centre géométrique du réseau.
Pour les structures utilisées dans cette étude, le rayon du premier sillon du réseau est de 440 nm, ce qui signifie que le paramètre a est de 440 nm en l'abscence de décalage de l'ouver-

ture centrale (δ =0). Les images d'intensité de fluorescence des molécules d'Alexa 647 et de Rh6G enregistrées par la caméra CCD pour des nano-ouvertures corruguées de périodicité 440 nm et de décalage δ =+150 nm (Figure 5.21 (a)) sont présentées en Figure 5.21 (b)-(d). Sous cette configuration, les faisceaux de fluorescence des molécules d'Alexa 647 et de Rh6G sont collimatés avec des directions angulaires respectivement centrées sur θ =-14° et θ =-23°, et des valeurs HWMW de 14° (pour les molécules d'Alexa 647) et 28° (pour les molécules de Rh6G). Comme attendu d'après les simulations numériques basées sur le modèle d'optique physique (indiquées à l'intérieur de la Figure 5.21 (e)), les faisceaux de fluorescence sont dirigés dans la direction opposée au déplacement δ. Ces expériences montrent qu'une émission directionnelle de fluorescence peut être obtenue sur une large bande spectrale (540 à 690 nm) en modifiant uniquement la position de l'ouverture centrale dans le réseau de corrugations. On notera que les niveaux d'intensité de fluorescence sont plus faibles que dans le cas δ =0, mais des exaltations de fluorescence significatives sont encore mesurées. Les directivités de fluorescence obtenues sont de 6.5 dB pour les molécules d'Alexa 647 et 4.4 dB pour les molécules de Rh6G. Enfin, précisons que le décalage de l'ouverture centrale peut être comparé à une désadaptation d'impédance, qui conduit à de plus faibles intensité d'excitation (mode récepteur) et taux d'émisson (mode transmetteur).

5.4 Conclusion sur les nano-ouvertures corruguées

Nous avons vu dans ce chapitre que les nano-ouvertures structurées par un réseau de corrugations périodiques permettent de collimater le faisceau de fluorescence de molécules en solution dans la direction normale à l'échantillon, avec un taux de fluorescence par molécule exalté comparé au cas de la solution fluorescente en espace libre, ce qui est une différence majeure comparée aux nano-antennes Yagi-Uda [9]. En faisant varier les paramètres géométriques du réseau (périodicité, distance entre l'ouverture centrale et le premier sillon du réseau ...), il est possible de contrôler totalement la direction d'émission de fluorescence moléculaire. La direction angulaire de rayonnement étant fonction de la longueur d'onde d'émission, la fluorescence de molécules spectralement différentes peut alors être séparée spatialement dans le champ proche. Cela ouvre de nouvelles perspectives pour l'analyse moléculaire à forte concentration et suggère de nouvelles applications en biophotonique [116, 117], telles que des biocapteurs multi-sondes dont l'émission de fluorescence serait angulairement séparée.

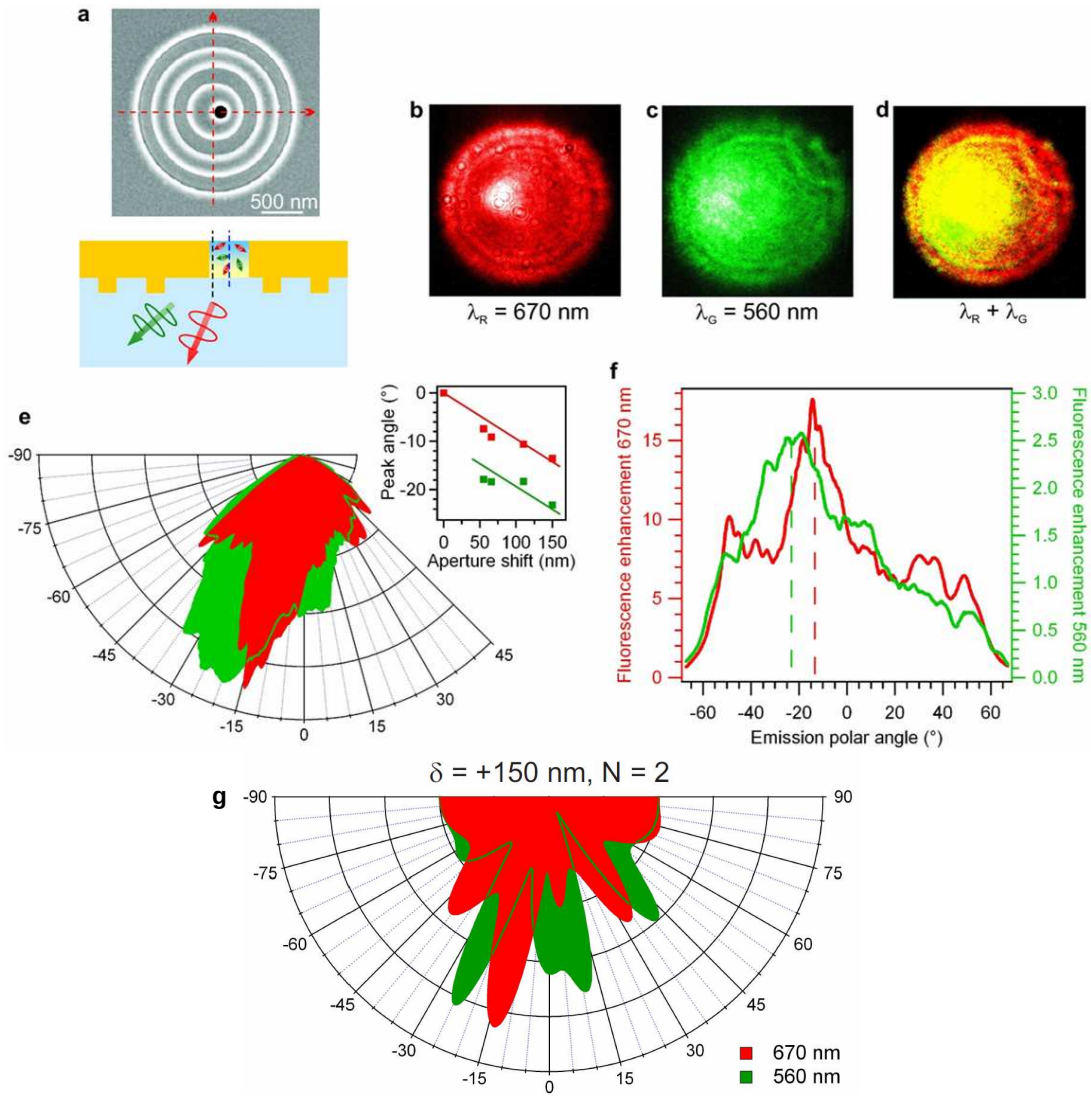


FIGURE 5.21 – *Contrôle directionnel de la fluorescence de molécules d'Alexa 647 (rouge) et de Rh6G (vert) diffusant en solution. (a) Dans la configuration expérimentale, le rayon du premier sillon périodique est de a =440 nm et l'ouverture centrale est décalée d'une distance δ =150 nm par rapport au centre géométrique du réseau de corrugations. (b)-(d) Distribution d'intensité de fluorescence mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope (ON=1.2) pour les molécules d'Alexa 647 (b) et de Rh6G (c), et combinaison des deux images (d). Diagramme de rayonnement en fonction de l'angle θ (f) et représentation en coordonnées polaire (e). Sur (e) est également présentée le déplacement angulaire du pic de rayonnement maximal en fonction du décalage δ de l'ouverture centrale par rapport au réseau de corrugations (les points indiquent les mesures expérimentales et les lignes continues ont été obtenues d'après le modèle d'optique physique). (g) Diagramme de rayonnement calculé selon le modèle d'optique physique pour nano-ouverture structurée par 2 sillons périodiques avec un décentrage de l'ouverture centrale de δ =150 nm [115].*

CHAPITRE 6

Méthodes alternatives pour le sondage des champs optiques au voisinage de nano-antennes

La caractérisation expérimentale des propriétés des nano-antennes optiques présentées dans les chapitres 3, 4 et 5 a été effectuée par des études de spectroscopie de corrélation de fluorescence combinées à des mesures de temps de vie de fluorescence. Bien que très puissante, cette procédure nécessite de déterminer au préalable l'exaltation de fluorescence $\eta_{F_{low}}$, le gain à l'émission $\eta_{k_{em}}$ et la réduction sur le temps de vie de l'émetteur $\eta_{k_{tot}}$ avant d'accéder au gain sur l'intensité d'excitation η_{I_e}. Le gain sur l'intensité d'excitation est toutefois une propriété intrinsèque hautement importante d'une nano-antenne optique (à une fréquence d'excitation donnée) car il ne dépend pas de la sonde utilisée pour le mesurer. Le temps nécessaire pour accéder au paramètre η_{I_e} par la procédure de caractérisation de fluorescence présentée dans le chapitre 2 étant assez important, il a été développé en parallèle deux autres techniques rapides de sondage des renforcements de champs électromagnétiques au voisinage de nano-antennes optiques. La première d'entre elles consiste à suivre la dynamique temporelle d'états multiexcitoniques de boîtes quantiques semiconductrices [118]. En accédant aux amplitudes des populations des états excitoniques et biexcitoniques, il est possible de déterminer de manière très précise l'exaltation sur l'intensité locale d'excitation. La seconde est une technique de spectroscopie sous saturation de fluorescence. En modulant sinusoïdalement l'intensité d'excitation à une fréquence f dans un régime de saturation de fluorescence, il est possible de générer des harmoniques aux fréquences supérieures ($2f$, $3f$, ...) et d'extraire des informations sur l'intensité locale d'excitation à partir de ces harmoniques. Ces deux techniques alternatives vont être présentées dans ce chapitre.

6.1 Sondage des exaltations de champs optiques au voisinage de nano-antennes par étude de dynamique temporelle de boîtes quantiques semi-conductrices

6.1.1 Introduction sur les boîtes quantiques semi-conductrices

Les progrès effectués dans le domaine de la croissance auto-organisée et en particulier en épitaxie par jet moléculaire, ont permis dans les années 1980 la réalisation de structures semi-conductrices de dimensions nanométriques et dans lesquelles les porteurs de charges sont confinés dans les trois directions de l'espace : on parle de boîtes quantiques semi-conductrices ou d'atomes artificiels. Le confinement des porteurs de charge à l'intérieur de ces objets quantiques impose une discrétisation des niveaux d'énergie, avec des spectres d'absorption et d'émission dépendant de leurs tailles caractéristiques. Si la croissance auto-organisée est encore très utilisée actuellement pour la fabrication de boîtes quantiques, une méthode de synthèse par voie chimique en solution a été proposée en parallèle dans les années 1980. Cette méthode consiste à introduire une solution organique des éléments du matériau qui par nucléation vont s'assembler et croître en structures semi-conductrices nanométriques (ou nanocristaux) composées de quelques milliers d'atomes. Les boîtes quantiques (CdSe/CdS/ZnS) utilisées au cours de cette thèse ont été synthétisées par la méthode chimique que nous allons présenter.

6.1.2 Fabrication des boîtes quantiques CdSe/CdS/ZnS

Pour toutes les études conduites sur les boîtes quantiques, nous avons collaboré avec le groupe de Dan Oron du Weizmann Institute of Science (Israël). La synthèse des boîtes CdSe/CdS/ZnS a été effectuée au Weizmann Institute of Science selon la procédure suggérée par Peng et al avec quelques modifications mineures. Un mélange de CdO (0.0128 g, 0.1 mmol), TDPA (0.063 g, 0.216 mmol) et d'ODE de qualité technique (4 mL) a été seché et dégazé sous vide à une température de 120°C pendant 30 min dans un ballon tricol. La solution a ensuite été chauffée à 280°C et une solution de TOPSe, préparée en dissolvant du selenium élémentaire (0.078 g, 0.1 mmol) dans 2 mL de TOP, y a été rapidement ajoutée sous agitation vigoureuse. La température de croissance a alors été réduite à 250°C et maintenue constante jusqu'à ce que les boîtes atteignent la taille désirée (environ 30 min). Cette réaction génère typiquement des nanocristaux de CdSe d'environ 3.6 nm, avec un premier pic d'absorption centré sur 572 nm. Des nanocristaux de CdSe de taille plus importante ont été obtenus en ajoutant goutte à goutte une solution de Cd:Se (1:1 vol. de 0.1M de Cd oléate dans de l'ODE et 0.1M de Se dans du TOP) jusqu'à ce que les boîtes aient la taille désirée. Après un processus de recuit à 250°C durant 30 min, le diamètre atteint est de 5.7 nm, avec un pic d'absorption de 622 nm. Les coquilles de CdS et ZnS sont alors respectivement synthétisées en ajoutant goutte à goutte des solutions de Cd:S et Zn:S à 250°C de manière monotope. Pour la croissance des coquilles de CdS, la solution injectée est composée de 1:1 vol. de 0.1M de cadnium oléate dans de l'ODE et

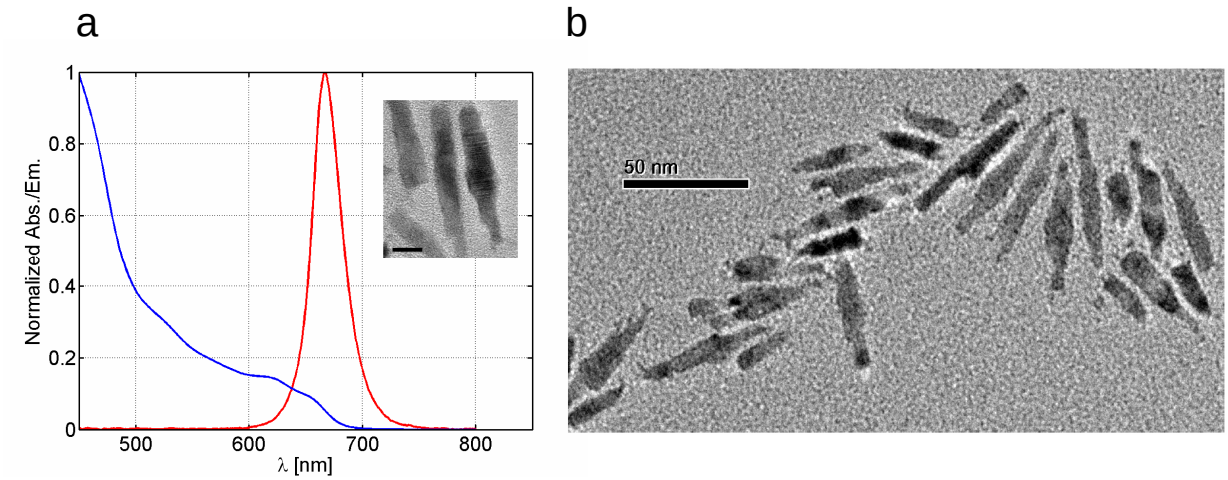


FIGURE 6.1 – *Image par microscope électronique à transmission des boîtes quantiques semi-conductrices synthétisées [118].*

0.1M de soufre dans de l'ODE. Pour la croissance des coquilles de Zns, la solution injectée est composée de 1:1 vol. de 0.1M d'acétate de zinc dans de l'acide oléique et de l'ODE et 0.1M de soufre dans de l'ODE. Après chaque croissance de coquilles, les nanocristaux ont été recuits à 250°C pendant plus de 30 min. Après le dernier recuit, la solution a été refroidie à température ambiante et stockée dans un congélateur jusqu'à précipitation. Les boîtes CdSe/CdS/ZnS finalement obtenues présentent un pic d'absorption à 657 nm et un pic d'émission à 667 nm (Figure 6.1 (a)). Une image par microscope électronique à transmission (Philips T12 opérant à 120 kV) des boîtes quantiques synthétisées est présentée en Figure 6.1 (b).

6.1.3 Dynamique de photoluminescence d'états multiexcités

Contrairement aux systèmes moléculaires, les boîtes quantiques semi-conductrices peuvent présenter de multiples états excités [119, 120]. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux états monoexcités (appelés également excitons notés X et qui correspondent à la création d'une paire électron-trou comme représenté en Figure 6.2 (a)) et aux états biexcités (appelés également biexcitons notés BX et qui correspondent à la création de deux paires électron-trou comme représenté en Figure 6.2 (b)). Le développement mathématique que nous allons présenter a pour but de démontrer que le ratio entre les amplitudes des états biexcitoniques BX et excitoniques X du signal de déclin de photoluminescence varie linéairement en fonction de la puissance d'excitation et permet donc une mesure directe de l'intensité locale d'excitation.
Le modèle cinétique et les notations utilisées dans ce chapitre sont présentés en Figure 6.2 (c), où $p_i(t)$ et k_i désignent respectivement la population relative et le taux de désexcitation total de l'état excité i. La relaxation depuis l'état biexcitonique BX vers l'état excitonique

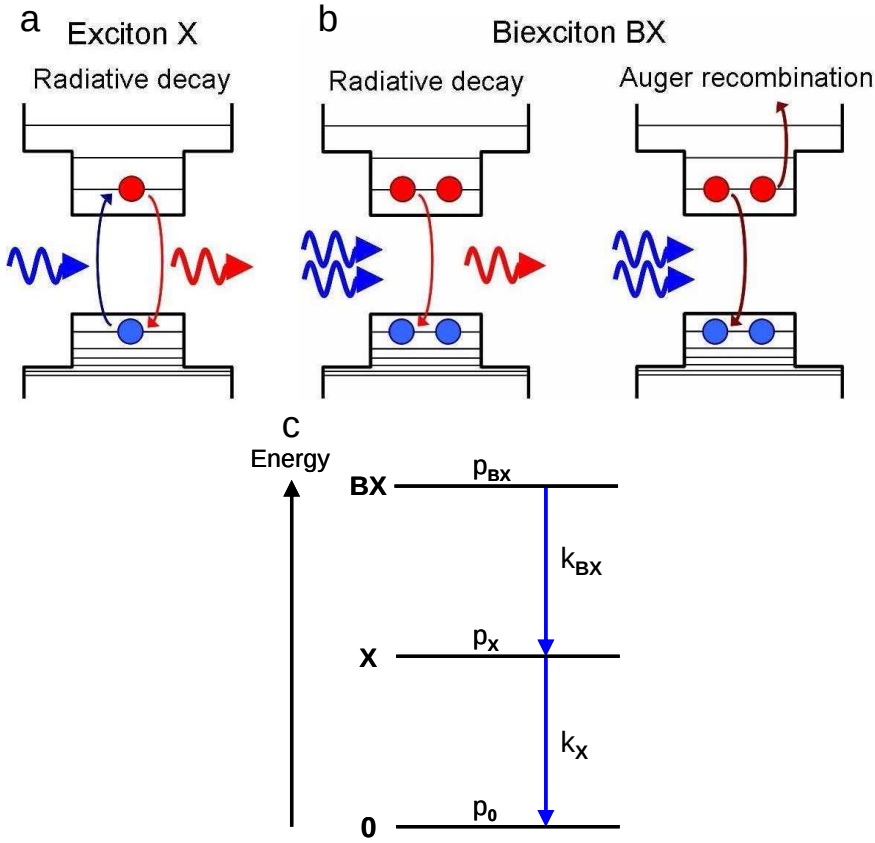


Figure 6.2 – *Description schématique des processus de relaxation excitonique X (a) et biexcitonique BX (b). (c) Représentation du modèle cinétique et notations utilisées [118].*

X peut s'effectuer de manière radiative ou non radiative. Le signal de photoluminescence provenant de la relaxation de l'état excitonique X dépend donc des populations initiales des états excitonique X et biexcitonique BX. Sous ces considérations, les équations d'évolution des populations des états X et BX s'écrivent :

$$\frac{dp_{BX}}{dt} = -k_{BX}p_{BX}(t), \tag{6.1}$$

$$\frac{dp_X}{dt} = -k_X p_X(t) + k_{BX}p_{BX}(t), \tag{6.2}$$

La résolution de ces équations différentielles conduit à :

$$p_{BX}(t) = p^0_{BX}\exp(-k_{BX}t), \tag{6.3}$$

$$p_X(t) = \left(p^0_X + \frac{k_{BX}}{k_{BX}-k_X}p^0_{BX}\right)e^{-k_X t} - \frac{k_{BX}}{k_{BX}-k_X}p^0_{BX}e^{-k_{BX}t}, \tag{6.4}$$

où p^0_i désigne le population relative initiale de l'état i, immédiatement après excitation. Le terme en $e^{-k_{BX}t}$ dans l'équation 6.4 d'évolution de population excitonique p_X traduit le

fait que la population de l'état excité X croît lors de la relaxation de l'état biexcitonique, c'est à dire lorsque la population BX décroît.
Dû au fort confinement des porteurs de charges électromagnétiques dans les boîtes quantiques, la relaxation depuis l'état biexcitonique BX vers l'état excitonique X est essentiellement dominé par l'effet Auger, qui est une forme de relaxation non-radiative. La recombinaison Auger (Figure 6.2 (b)) est un processus au cours duquel l'énergie de recombinaison d'une paire électron-trou est transférée à la paire restante, seule cette dernière pouvant se recombiner et émettre un photon. La durée de vie des processus Auger varie typiquement en fonction du volume et de la forme des boîtes quantiques, dans une gamme temporelle comprise entre une dizaine et quelques centaines de picosecondes, tandis que la durée de vie de l'état excitonique X est généralement de l'ordre d'une dizaine de nanosecondes. Cela se traduit mathématiquement par la relation $k_{BX} \gg k_X$, ce qui conduit à un terme $k_{BX}/(k_{BX} - k_X) \approx 1$. Les équations d'évolution des populations se réécrivent alors :

$$p_{BX}(t) = p^0_{BX} \exp(-k_{BX}t). \tag{6.5}$$

$$p_X(t) = \left(p^0_X + p^0_{BX}\right)e^{-k_X t} - p^0_{BX}e^{-k_{BX}t}. \tag{6.6}$$

Nous pouvons à présent déterminer le signal de photoluminescence $S(t)$ relatif aux populations des états multiexcités et qui est analysé par le système expérimental TCSPC :

$$S(t) = k^{rad}_X p_X(t) + k^{rad}_{BX} p_{BX}(t) = a_X e^{-k_X t} + a_{BX} e^{-k_{BX}t}. \tag{6.7}$$

où k^{rad}_i est le taux d'émission radiatif du i-ème état multiexcité, a_X et a_{BX} sont respectivement les amplitudes des composantes transitoires des temps caractéristiques de relaxation excitonique $\tau_X = 1/k_X$ et biexcitonique $\tau_{BX} = 1/k_{BX}$ contribuant au signal de photoluminescence détecté $S(t)$. Les amplitudes a_X et a_{BX}, qui sont accessibles à travers les mesures de déclins de luminescence effectuées par TCSPC, peuvent être identifiées en utilisant les équations 6.5 et 6.6 :

$$a_X = k^{rad}_X (p^0_X + p^0_{BX}), \tag{6.8}$$

$$a_{BX} = (k^{rad}_{BX} - k^{rad}_X) p^0_{BX}, \tag{6.9}$$

La relaxation de tous les états multiexcités conduisant à un simple état monoexcité X, l'amplitude excitonique a_X est proportionnelle au taux d'émission radiatif depuis l'état X et à la population totale $p_{tot} = p^0_X + p^0_{BX}$ des états excités. L'amplitude biexcitonique a_{BX} dépend quant à elle de la différence des taux d'émission radiatif des états X et BX, ce qui est une conséquence directe de la dépendance temporelle en $e^{-k_{BX}t}$ de la population p_X de l'état excitonique X (la population de l'état excité X croît avec une dynamique temporelle proportionnelle au terme $e^{-k_{BX}t}$ lorsque la population du double état excité BX décroît).
La détermination expérimentale du taux d'émission radiatif biexcitonique s'avère être une tâche difficile car la relaxation depuis l'état BX est fortement dominée par les processus de recombinaison Auger. Cependant, comme il a été montré dans de précédentes études expérimentales [121, 122], le taux d'émission radiatif biexcitonique k^{rad}_{BX} est supérieur au

taux d'émission radiatif excitonique d'un facteur $r \approx 2-3$. Les amplitudes a_X et a_{BX} des composantes transitoires peuvent alors se réécrire comme :

$$a_X = k_X^{rad}(p_X^0 + p_{BX}^0), \tag{6.10}$$
$$a_{BX} = k_X^{rad}(r-1)p_{BX}^0, \tag{6.11}$$

Lorsque les boîtes quantiques sont excitées au-dessus de leur limite de bande, les processus d'absorption de photons peuvent être considérés comme des événements indépendants qui sont décrits par une statistique Poissonienne :

$$P(k, \bar{n}) = \bar{n}^k \frac{e^{-\bar{n}}}{k!}. \tag{6.12}$$

où $\bar{n}$ et k sont respectivement les nombres moyen et absorbé de photons incidents par boîte quantique et par impulsion. La population totale initiale p_{tot} étant proportionnelle à la probabilité d'absorber au moins un photon, celle-ci peut être exprimée comme :

$$p_{tot} = p_X^0 + p_{BX}^0 \propto 1 - P(0, \bar{n}) = 1 - e^{-\bar{n}}. \tag{6.13}$$

La population initiale p_{BX}^0 de l'état BX est quant à elle proportionnelle à la probabilité d'absorber plus d'un photon :

$$p_{BX}^0 \propto 1 - P(0, \bar{n}) - P(1, \bar{n}) = 1 - (1 + \bar{n})e^{-\bar{n}}. \tag{6.14}$$

Les amplitudes a_X et a_{BX} peuvent alors être réexprimées :

$$a_X = k_X^{rad}(1 - e^{-\bar{n}}). \tag{6.15}$$
$$a_{BX} = k_X^{rad}(r-1)(1 - (1+\bar{n})e^{-\bar{n}}). \tag{6.16}$$

Cette démonstration montre que les amplitudes a_X et a_{BX} sont toutes deux proportionelles au taux d'émission k_{rad}^X depuis l'état X. La modification du taux d'émission radiatif k_{rad}^X pour des boîtes quantiques placées à proximité de nano-antennes optiques affectera donc les amplitudes a_X et a_{BX} de la même manière. En calculant le rapport des amplitudes biexcitonique et excitonique, la dépendance en fonction du taux d'émission radiatif k_{rad}^X disparaît :

$$\frac{a_{BX}}{a_X} = (r-1)\frac{1 - (1+\bar{n})e^{-\bar{n}}}{1 - e^{-\bar{n}}}, \tag{6.17}$$

Le terme $(r-1) \approx 1$ étant constant, le rapport a_{BX}/a_X dépend uniquement du nombre moyen de photons absorbés $\bar{n}$. De plus, si l'on considère une excitation en-dessous de la saturation, c'est à dire pour $\bar{n} \ll 1$, le rapport entre les amplitudes biexcitonique et excitonique est réduit à :

$$\frac{a_{BX}}{a_X} = \frac{1 - (1+\bar{n})(1-\bar{n})}{1 - (1-\bar{n})} = \frac{\bar{n}^2}{\bar{n}} = \bar{n}. \tag{6.18}$$

Le rapport a_{BX}/a_X variant linéairement en fonction de l'intensité d'excitation, celui-ci peut donc être utilisé comme sonde locale du champ électromagnétique.

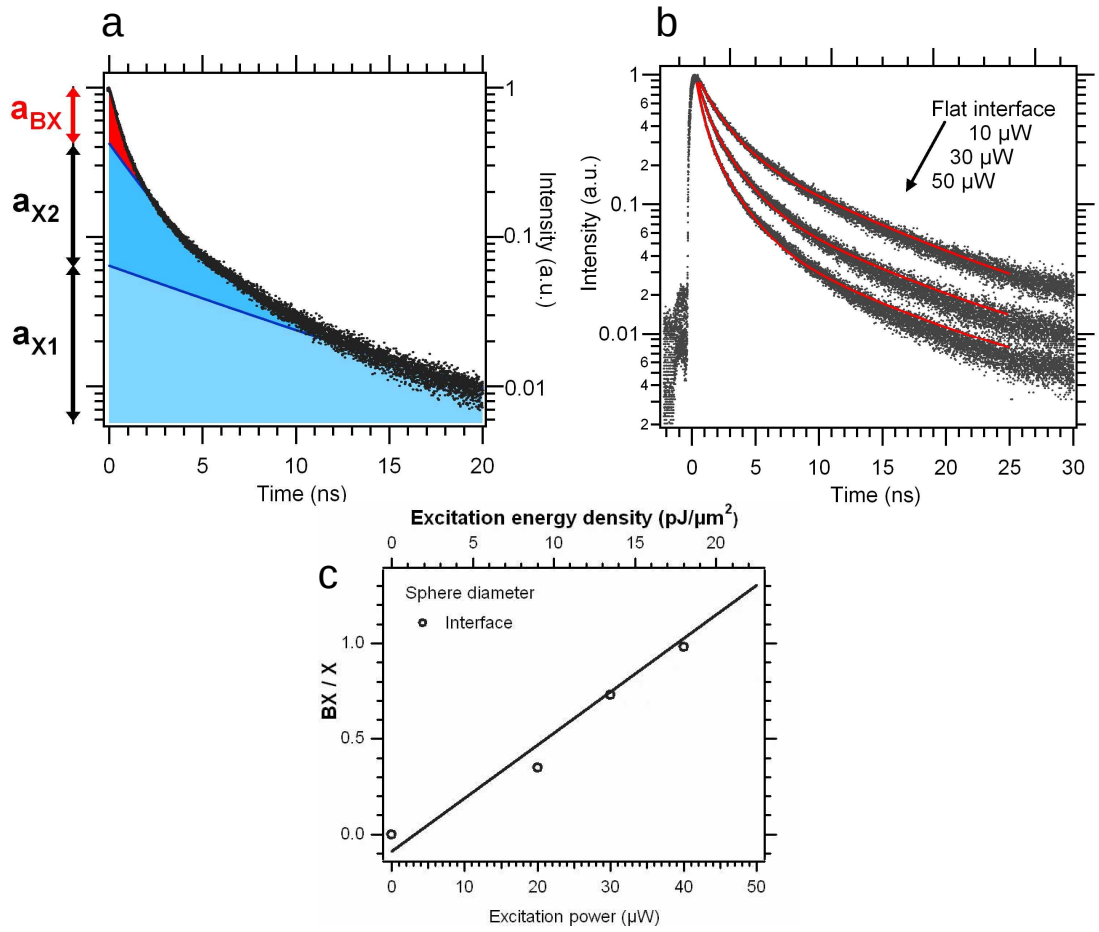


FIGURE 6.3 – *(a) Courbe de déclin du signal de photoluminescence des boîtes quantiques CdSe/CdS/ZnS utilisées et contributions des amplitudes des populations excitoniques X et biexcitoniques BX dans le cas d'une interface de verre pour une puissance moyenne d'excitation de 50 μW. (b) Courbes de déclin de photoluminescence dans le cas d'une interface de verre pour différentes puissances d'excitation (10, 30 et 50 μW). Ces mesures expérimentales montrent une augmentation d'amplitude de la population biexcitonique (temps courts) en fonction de la puissance d'excitation. (c) Rapport entre les amplitudes biexcitoniques et excitoniques (BX/X) en fonction de la puissance d'excitation dans le cas d'une interface de verre [118].*

6.1.4 Calibration expérimentale du rapport BX/X dans le cas d'une interface de verre

Toutes les études expérimentales que nous allons présenter s'effectuent au préalable en calibrant la dynamique d'émission de photoluminescence des boîtes quantiques diluées dans une solution d'heptane dans le cas d'une simple interface de verre. Ces mesures vont servir

de référence pour le sondage des champs optiques au voisinage de nano-antennes. L'excitation des boîtes quantiques s'effectue avec la diode laser pulsée (durée d'impulsion de 50 ps, fréquence de répétition de 20 MHz) opérant à 636 nm. Le signal de photoluminescence est mesuré à l'aide des photodiodes à avalanche rapides et analysé par le système TCSPC. La résolution globale du système est de 120 ps. Un histogramme type du déclin de photoluminescence des boîtes quantiques est disponible en Figure 6.3 (a). Sur cet histogramme sont de plus indiquées les contributions respectives des amplitudes des populations des états excitoniques (temps longs) et biexcitoniques (temps courts). L'évolution des amplitudes des états X et BX en fonction de la puissance d'excitation est présentée en Figure 6.3 (b). À faible puissance d'excitation, la courbe de déclin du signal de photoluminescence de l'état X présente deux composantes (avec des amplitudes notées a_{X_1} et a_{X_2} et qui sont proportionnelles à la population initiale de l'état X [123]) visibles dans les histogrammes de déclin de photoluminescence. Cette double décroissance exponentielle semble provenir d'un mélange statistique de deux types de population de boîtes quantiques, de charges ou encore de fluctuations temporelles du temps de vie de l'état excitonique X comme il a été reporté en référence [124]. D'autre part, lorsque la puissance d'excitation est augmentée, une composante transitoire au temps court apparaît dans la courbe de déclin du signal de photoluminescence. L'amplitude a_{BX} de cette composante est proportionnelle à la population initiale de l'état biexcitonique BX. D'après les considérations précédentes, le signal total de photoluminescence $S(t)$ de l'équation 6.7 doit donc être réécrit comme :

$$S(t) = (a_{X_1}e^{-k_{X_1}t} + a_{X_2}e^{-k_{X_2}t}) + a_{BX}e^{-k_{BX}t} \quad (6.19)$$

$$= (a_{X_1}e^{-t/\tau_{X_1}} + a_{X_2}e^{-t/\tau_{X_2}}) + a_{BX}e^{-t/\tau_{BX}}. \quad (6.20)$$

où τ_{X_1} et τ_{X_2} sont les temps de vie de l'état excitonique X et τ_{BX} est le temps de vie de l'état biexcitonique BX. L'analyse des données obtenues lors des mesures de déclins de luminescence sur les boîtes quantiques placées sur une interface de verre a été effectuée selon l'équation 6.20. Les temps de vie excitonique et biexcitonique ont été évalués à faible puissance d'excitation et utilisés par la suite comme des paramètres fixes avec τ_{X_1} =9.5 ns, τ_{X_2} =2.0 ns et τ_{BX} =0.5 ns. Les amplitudes excitonique et biexcitonique sont quant à elles considérées comme les seuls paramètres libres pour toutes nos investigations. Comme nous l'avons montré dans la section 6.1.3, le rapport des amplitudes $a_{BX}/(a_{X_1} + a_{X_2})$ (appelé également rapport BX/X) varie linéairement en fonction de la puissance d'excitation, ce qui a été expérimentalement vérifié dans le cas de l'interface de verre présenté en Figure 6.3 (c) ou le rapport BX/X a été tracé en fonction de la puissance d'excitation laser.

6.1.5 Sondage des renforcements de champs électromagnétiques au voisinage de microsphères diélectriques par mesure du rapport BX/X

Pour montrer que le ratio BX/X peut être utilisé comme outil de sondage des champs optiques au voisinage de nanoantennes, nous avons choisi de conduire des expériences sur des microsphères diélectriques pour lesquelles les exaltations d'intensité d'excitation η_{I_e}

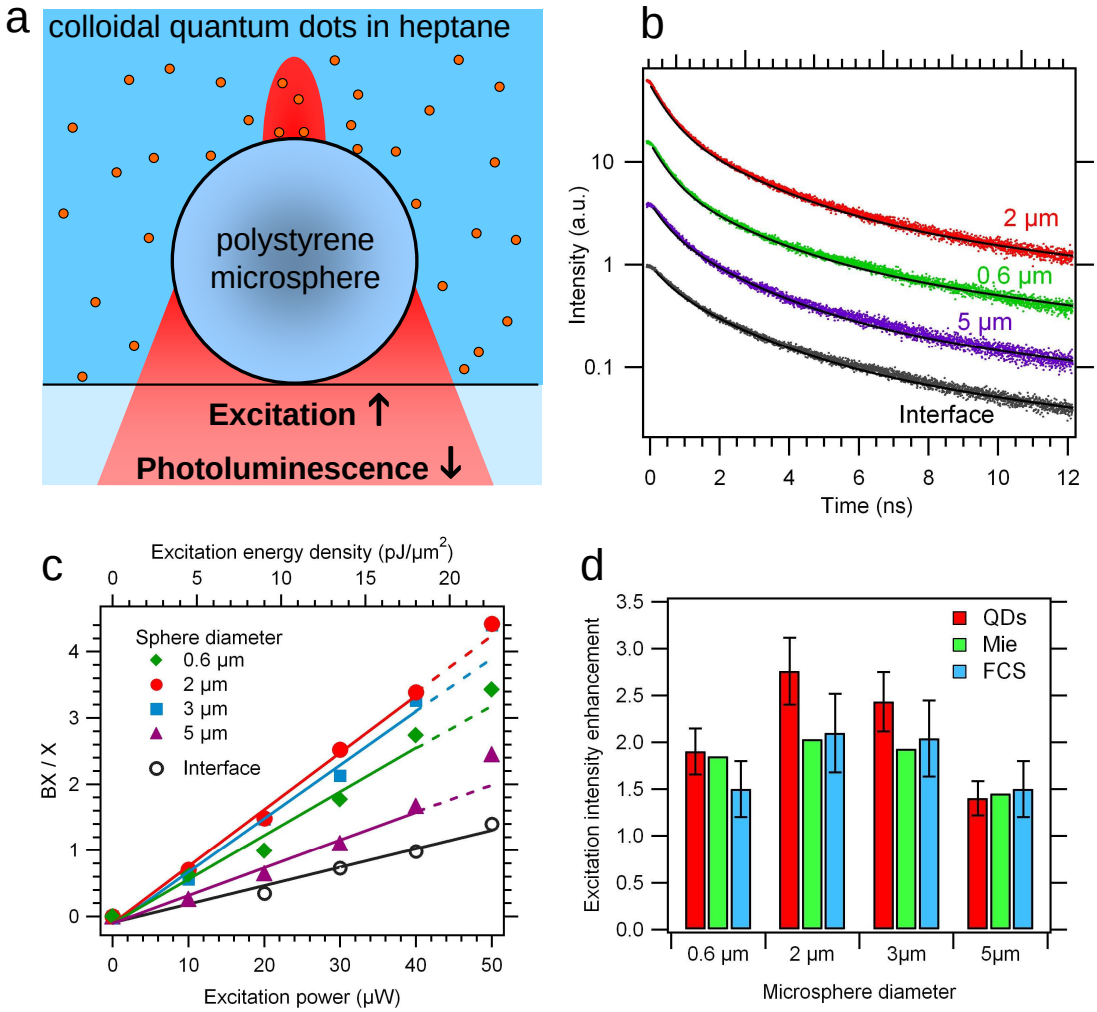


FIGURE 6.4 – *(a) Configuration expérimentale pour le sondage du renforcement de champ électromagnétique au voisinage d'une microsphère diélectrique. (b) Courbes de déclin de photoluminescence mesurées pour différents diamètres de sphères diélectriques (0.6, 2 et 5 µm) et dans le cas d'une interface de verre pour une puissance d'excitation de 30 µW (les courbes ont été décalées par souci de lecture). (c) Evolution du rapport BX/X en fonction de la puissance d'excitation pour les différents diamètres de sphères et dans le cas d'une interface de verre. (d) Exaltations d'intensité locale d'excitation η_{I_e} déduites d'après (c) et comparaison avec les résultats obtenus pas FCS et par des simulations basées sur la théorie de Mie [118].*

ont déja été mesurées par FCS. Pour rappel, le confinement électromagnétique obtenu au voisinage d'une sphère éclairée par faisceau Gaussien focalisé est dû à la collimation du faisceau incident combinée à des effets d'interférences entre les champs incident et diffracté par la sphère. La fabrication des échantillons de microsphères (de diamètres 0.6,

2, 3 et 5 μm) s'effectue selon la procédure présentée dans le chapitre 3. Les sphères sont ensuite placées au point de focalisation de l'objectif de microscope d'ouverture numérique ON= 1.2. La solution de boîtes quantiques CdSe/CdS/ZnS diluée dans de l'heptane est ensuite déposée au-dessus des échantillons de sphères (Figure 6.4 (a)). Des expériences sont alors conduites pour mesurer les déclins de photoluminescence des boîtes quantiques au voisinage des sphères en fonction de la puissance d'excitation. Les résultats des mesures de déclins de photoluminescence sont présentés en Figure 6.4 (b) dans le cas d'une simple interface de verre et en présence des différents diamètres de sphères placées au point de focalisation du faisceau incident pour une puissance d'excitation de 30 μW. Comme nous pouvons le constater, l'amplitude de la composante transitoire biexcitonique aux temps courts est plus élevée au voisinage des microsphères comparée à la simple interface de verre. De par la nature diélectrique des microsphères, les temps de vie des états excitonique τ_{X_1} et τ_{X_2} et biexcitonique τ_{BX} ne sont pas modifiés au voisinage des sphères et reste donc inchangés par rapport au cas de l'interface de verre. L'analyse des données TCSPC s'effectue en utilisant l'équation 6.20 et permet de déterminer les amplitudes excitoniques a_{X_1} et a_{X_2} et biexcitonique a_{BX} en fonction de la puissance d'excitation pour des boîtes quantiques placées au voisinage des sphères. Le rapport BX/X peut alors être calculé en fonction de la puissance d'excitation d'après l'analyse des données TCSPC comme indiqué en Figure 6.4 (c). Pour des puissances d'excitation inférieures à 40 μW, la rapport BX/X augmente linéairement en fonction de l'intensité d'excitation. Dans cette gamme de puissance, la contribution des états multiexcités supérieurs (triexciton TX, ...) et les effets de saturation sont relativement faibles et donc négligeables. Pour des puissances d'excitation supérieures à 40 μW, le rapport BX/X croît plus vite que dans le cas du régime linéaire à cause de la contribution non-négligeable des états multiexcités supérieurs et des effets plus rapides de saturation des états excitoniques X par rapport aux états biexcitoniques BX [122].

L'augmentation des rapports BX/X obtenue en présence des microsphères (par rapport au cas de l'interface de verre) est directement liée à une amplification de la densité d'énergie électromagnétique. La dépendance linéaire du rapport BX/X en fonction de la puissance d'excitation permet d'extraire une pente moyenne notée $a_{BX/X}$ caractéristique de cette évolution. En normalisant les pentes des droites obtenues en présence des différents diamètres de sphères par la pente mesurée dans le cas d'une simple interface de verre, nous accédons directement à l'exaltation sur l'intensité d'excitation $\eta_{I_e} = a_{BX/X_{sphere}}/a_{BX/X_{verre}}$. En particulier, une pente $a_{BX/X_{sphere}}$ de 0.078 μW^{-1} est obtenue pour une sphère de 2 μm alors que la pente $a_{BX/X_{verre}}$ est de 0.028 μW^{-1} dans le cas de l'interface de verre. Cela conduit à un gain $\eta_{I_e} = 0.078/0.028 = 2.78$ pour une sphère de 2 μm, ce qui est en bon accord avec les résultats obtenus par FCS dans le chapitre 2 où un gain $\eta_{I_e} = 2.2$ a été trouvé. Les gains η_{I_e} mesurés en utilisant les boîtes quantiques semi-conductrices sont résumés en Figure 6.4 (d) et peuvent directement être comparés aux gains η_{I_e} expérimentaux obtenus par FCS et aux gains numériques calculés selon la théorie de Mie.

L'utilisation du rapport BX/X pour le sondage des champs optiques va à présent être étendue aux structures plasmoniques, avec lesquelles de plus importantes exaltations d'in-

tensité locale d'excitation peuvent être obtenues.

6.1.6 Sondage des renforcements de champs électromagnétiques dans des nano-ouvertures métalliques par mesure du rapport BX/X

Pour les investigations sur structures plasmoniques, nous avons choisi d'utiliser les nano-ouvertures percées dans un film d'or (de diamètres 120 et 160 nm) présentées dans le chapitre 4 (Figure 6.5 (a)). De la même manière que pour l'étude des microsphères, des mesures de déclins de photoluminescence ont été conduites en fonction de la puissance d'excitation pour des boîtes quantiques diffusant dans les nano-ouvertures. Les résultats, présentés en Figure 6.5 (b), montrent clairement que l'amplitude de la population biexcitonique a_{BX} est fortement augmentée dans les nano-ouvertures comparé au cas de l'interface de verre. Pour analyser ces données, il faut tenir compte du fait que contrairement au cas des microsphères, le temps de vie des états excitoniques est modifié en présence d'une structure métallique à cause de l'augmentation des pertes non-radiatives. Dans le cas des nano-ouvertures d'or utilisées, les temps de vie excitoniques de l'état X ont été réduits à τ_{X_1} =6.4 ns et τ_{X_2} =1.65 ns. La relaxation de l'état biexcitonique BX étant majoritairement dominée par les processus de recombinaison Auger, le temps de vie biexcitonique τ_{BX} n'est pas affecté de façon majeure par la présence de la structure métallique et reste donc fixé à la valeur τ_{BX} =0.5 ns.
Les temps de vie des états X et BX ayant été fixés, l'analyse des données TCSPC selon l'équation 6.20 permet de déterminer les amplitudes excitoniques a_{X_1} et a_{X_2} et biexcitonique BX et donc l'évolution du rapport $a_{BX}/(a_{X_1} + a_{X_2})$ en fonction de la puissance d'excitation, comme indiqué en Figure 6.5 (c). Comme dans le cas des microsphères, les pentes $a_{BX/X_{trous}}$ des droites représentant l'évolution du rapport BX/X en fonction de la puissance d'excitation ont été calculées. En normalisant les pentes $a_{BX/X_{trous}}$ par les pentes $a_{BX/X_{verre}}$, nous pouvons accéder au gain sur l'intensité d'excitation à l'intérieur des nano-ouvertures $\eta_{I_e} = a_{BX/X_{trous}}/a_{BX/X_{verre}}$. Les résultats sont présentés en Figure 6.5 (d) et comparés aux résultats expérimentaux obtenus par FCS et aux simulations numériques FDTD. Là encore, les gains sur l'intensité d'excitation calculés en utilisant le rapport BX/X sont en bon accord avec les mesures effectuées par d'autres méthodes, ce qui montre que le ratio BX/X est un outil puissant et extrêmement rapide pour le sondage des champs optiques au voisinage de nano-antennes. Soulignons de plus qu'en tenant compte des modifications de durées de vie des états excitoniques à proximité d'un métal, cette technique peut être étendue à la caractérisation de tout type de structures plasmoniques.

6.1.7 Conclusion sur l'utilisation des boîtes quantiques pour le sondage des champs optiques

La quantification expérimentale des renforcements de champs électromagnétiques à proximité de nano-antennes est une tâche difficile car les diverses techniques spectrosco-

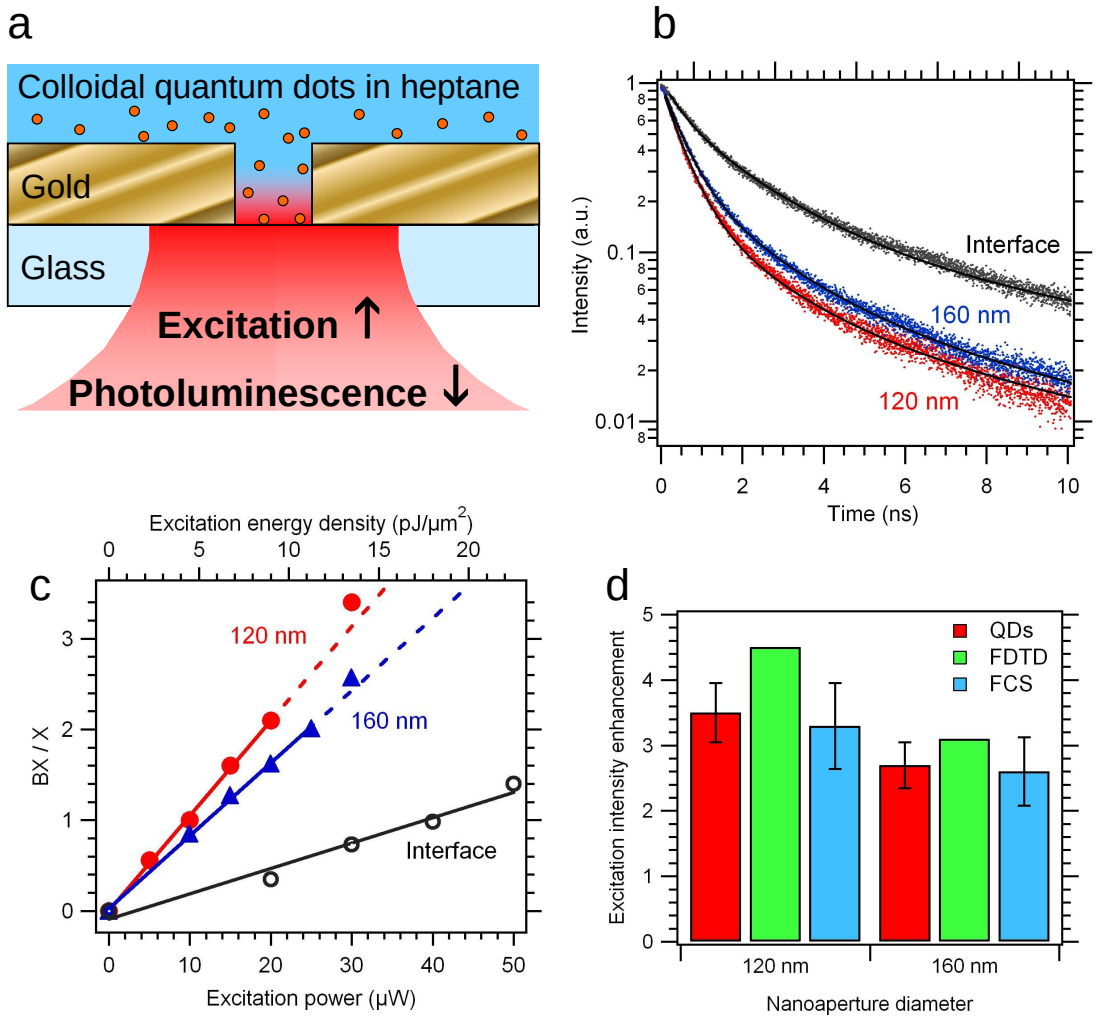


Figure 6.5 – *(a) Configuration expérimentale pour le sondage du renforcement de champ électromagnétique dans une nano-ouverture percée dans un film d'or. (b) Courbes de déclin de photoluminescence mesurées pour des ouvertures d'or de diamètres 120 et 160 nm et dans le cas d'une interface de verre pour une puissance d'excitation de 30 μW. (c) Evolution du rapport BX/X en fonction de la puissance d'excitation pour les ouvertures de 120 et 160 nm et dans le cas d'une l'interface de verre. (d) Exaltations d'intensité locale d'excitation η_{I_e} déduites d'après (c) et comparaison avec les résultats obtenus pas FCS et par des simulations FDTD [118].*

piques habituellement utilisées (fluorescence, diffusion Raman, ...) autorisent uniquement la détermination de l'amplification globale apportée par l'antenne, et qui est une combinaison intriquée de modifications à l'excitation et à l'émission. Dans ce chapitre, un nouvel outil expérimental permettant d'accéder directement aux exaltations d'intensité locale d'excitation a été proposé. En exploitant les propriétés d'états multiexcités de boîtes quantiques

semi-conductrices, il a été montré que le rapport BX/X pouvait être utilisé comme sonde locale du champ électromagnétique, permettant ainsi d'accéder aux modifications locales d'intensité d'excitation au voisinage d'antennes optiques en seulement quelques secondes. Cette technique ouvre de nouvelles opportunités pour la caractérisation expérimentale rapide de nano-antennes optiques à la fréquence d'excitation. Enfin, soulignons que l'exaltation des amplitudes biexcitoniques à proximité d'une nanoantenne représente une nouvelle forme d'exaltation non-linéaire de l'intéraction lumière-matière à l'échelle nanométrique.

6.2 Sondage des exaltations de champs optiques au voisinage de nano-antennes par spectroscopie sous saturation de fluorescence

Comme il a été vu au cours des études sur les nano-antennes optiques présentées dans les chapitres 3, 4 et 5, la fluorescence est un processus non-linéaire en fonction de la puissance d'excitation. Ces propriétés de non-linéarité vont être exploitées tout au long de cette section.

6.2.1 Introduction sur la spectroscopie sous saturation de fluorescence

Le principe de la spectroscopie sous saturation de fluorescence consiste à moduler sinusoïdalement l'intensité d'excitation à une fréquence f dans un régime non-linéaire d'excitation, et générer des harmoniques aux fréquences supérieures ($2f$, $3f$, ...) afin d'extraire des informations sur l'intensité locale d'excitation. Dans un régime linéaire d'excitation de fluorescence, c'est à dire pour $I_e \ll I_s$ (où I_e est l'intensité d'excitation et I_s l'intensité de saturation de fluorescence), la modulation de l'intensité d'excitation à une fréquence f conduit à une modulation du signal de fluorescence à la même fréquence f (Figure 6.6 (a)). En revanche, dans un régime proche de la saturation de fluorescence, c'est à dire pour $I_e \approx I_s$, l'intensité de fluorescence contient la fréquence fondamentale f, mais également les fréquences harmoniques correspondantes $2f$, $3f$, ... à cause de la déformation du signal d'entrée (Figure 6.6 (b)). Les harmoniques générées peuvent être utilisées pour améliorer la résolution optique en microscopie confocale comme nous allons à présent l'illustrer.

6.2.2 Amélioration de la résolution optique par excitation saturée de fluorescence

Les propriétés de non-linéarité de fluorescence ont été exploitées en 2007 par l'équipe de Satoshi Kawata (Université d'Osaka, Japon) pour améliorer la résolution optique en microscopie confocale [125]. Dans un régime linéaire d'excitation, l'intensité de fluorescence d'un échantillon est proportionnelle à l'intensité d'excitation comme il a été rappelé dans la sous-section précédente. Cependant, lorsque l'intensité d'excitation augmente, un

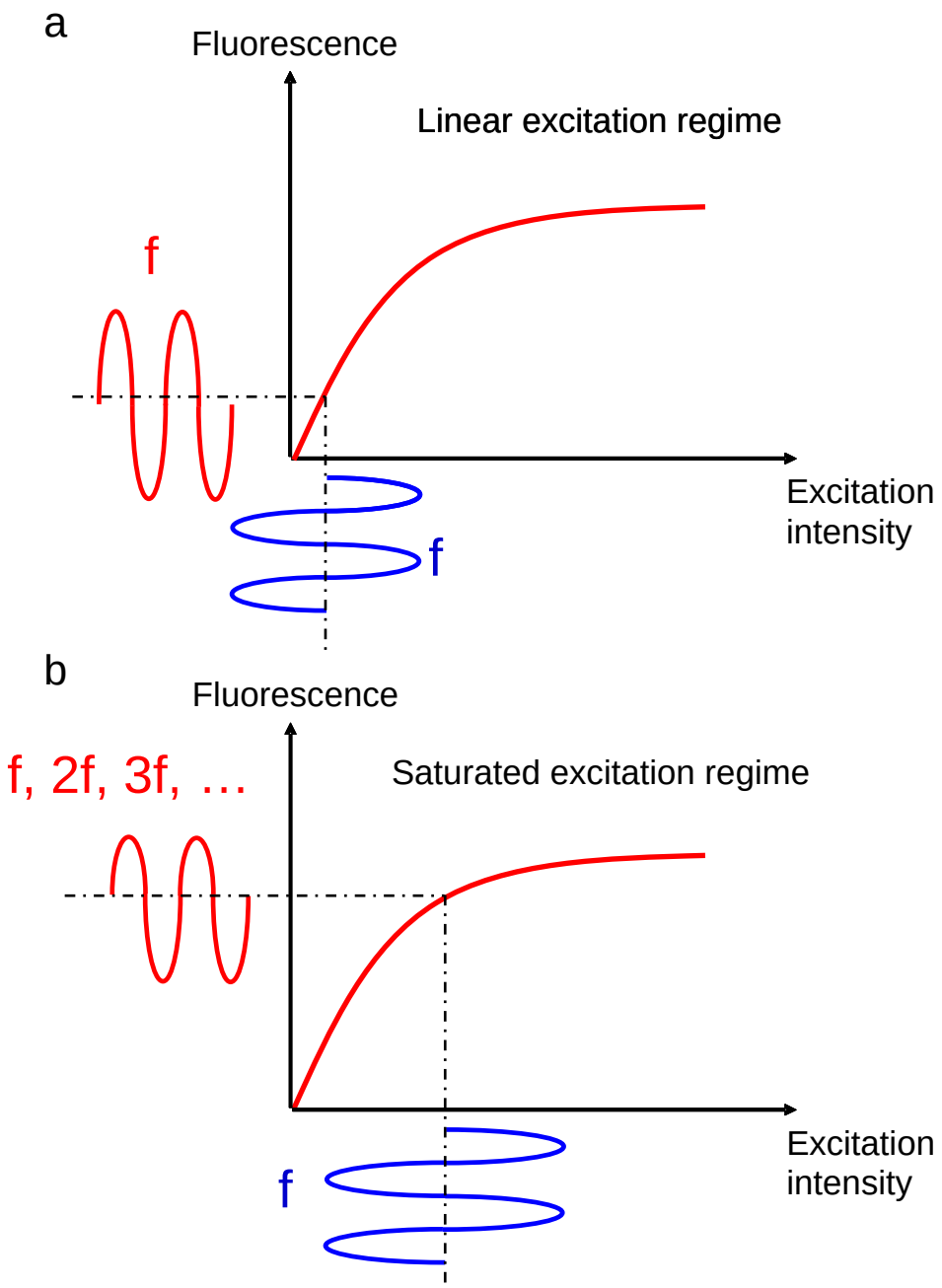


Figure 6.6 – *Principe de spectroscopie sous saturation de fluorescence. Dans un régime linéaire d'excitation (a), le signal de fluorescence d'un échantillon est modulé à la même fréquence f que l'intensité laser incidente. Dans un régime saturé d'excitation (b), la déformation du signal d'excitation d'entrée fait apparaître de nouvelles fréquences harmoniques $2f$, $3f$, ... (en plus de la fréquence fondamentale f) dans le signal de fluorescence.*

régime de saturation est atteint à cause de la durée de vie non-nulle de l'état excité et du nombre limité de molécules dans le volume d'observation. Dans ces conditions, l'intensité de fluorescence n'est plus linéairement proportionelle à l'excitation et la fonction d'efficacité de détection moléculaire MDE se déforme dans un régime de saturation de fluorescence, ce qui entraîne une détérioration de la résolution optique [126]. La fonction MDE déformée contient de hautes fréquences spatiales, qui sont créées lorsque la saturation de fluorescence introduit de fortes non-linéarités entre l'excitation et l'émission. Ces hautes fréquences spatiales apparaissant en premier lieu au pic du faisceau laser d'excitation (c'est à dire au sommet de la Gaussienne d'excitation), celles-ci contiennent des informations structurales à une échelle plus petite que la MDE et peuvent donc être utilisées pour améliorer la résolution spatiale en microscopie confocale.
Pour exploiter ces composantes non-linéaires contenues dans le signal de fluorescence, l'équipe de Kawata a choisi de moduler le faisceau laser excitateur (à une longueur d'onde λ =532 nm) à une fréquence f =10 kHz à l'aide de modulateurs acousto-optiques, et de démoduler l'intensité de fluorescence de molécules de Rhodamine 6G aux fréquences harmoniques correspondantes ($2f$, $3f$, ...) en utilisant une détection synchrone. Pour mettre en évidence la non-linéarité du signal de fluorescence dans un régime saturé, l'intensité de fluorescence démodulée a été mesurée pour différentes fréquences harmoniques comme indiqué en Figure 6.7 (a). Les harmoniques $2f$ (20 kHz), $3f$ (30 kHz) apparaissent lorsque la puissance d'excitation est augmentée. L'évolution de l'intensité de fluorescence mesurée aux fréquences f, $2f$, $3f$ en fonction de la puissance moyenne d'excitation est indiquée en Figure 6.7 (b). Comme nous pouvons le remarquer, l'intensité de fluorescence à f est linéairement proportionnelle à l'intensité d'excitation (hors saturation), alors que l'intensité à $2f$ est proportionnelle au carré de l'intensité d'excitation et l'intensité à $3f$ au cube de l'intensité d'excitation.
Ces harmoniques ont été exploitées pour observer des sphères fluorescentes de 200 nm fixées sur substrat dans un milieu aqueux. Les images obtenues aux fréquences démodulées f (10 kHz) et $2f$ (20 kHz) sont présentées en Figure 6.7 (c). En comparant ces deux images, l'amélioration de la résolution spatiale en démodulant le signal de fluorescence à la fréquence harmonique $2f$ est confirmée.
Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à tirer parti de ces harmoniques pour sonder les renforcements de champs électromagnétiques au voisinage de nano-antennes. Une analyse mathématique de l'exploitation de ces composantes non-linéaires va à présent être détaillée.

6.2.3 Exploitation des fréquences harmoniques pour le sondage des champs optiques au voisinage de nano-antennes

Si l'on considère une excitation laser modulée à la fréquence f, avec une profondeur de modulation α, l'intensité d'excitation s'écrit :

$$I_e(t) = I_{moy}(1 + \alpha \cos(2\pi f t)), \tag{6.21}$$

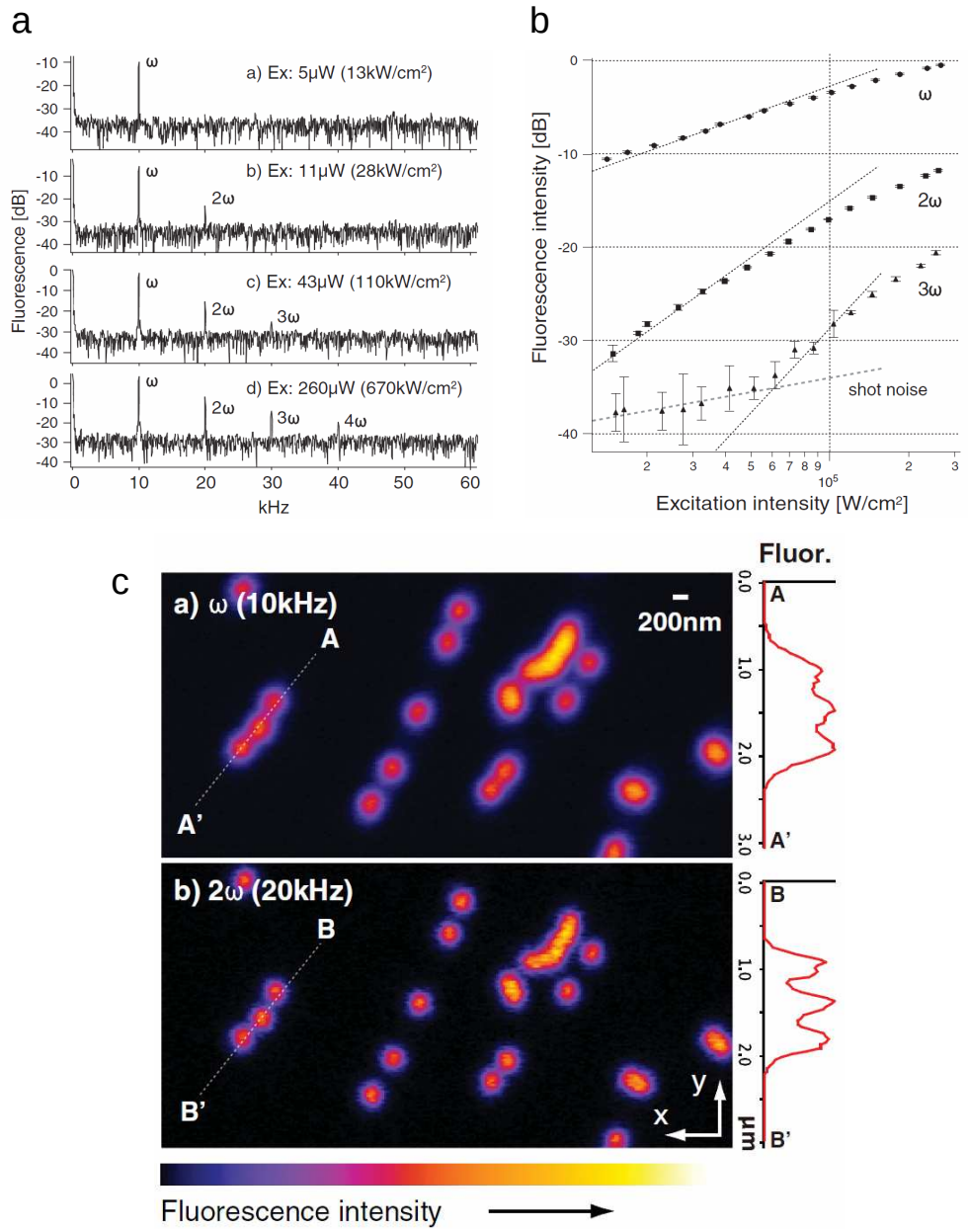


Figure 6.7 – *(a) Fréquences fondamentale de modulation f (10 kHz) et harmoniques générées dans une solution de Rhodamine 6G excitée à λ =532 nm pour différentes puissances d'excitation. Les fréquences sont exceptionnellement notées ω (au lieu de f) sur toutes les figures. (b) Evolution de l'intensité de fluorescence démodulée aux fréquences ω (10 kHz), 2ω (20 kHz), 3ω (30 kHz) en fonction de la puissance d'excitation laser incidente. (c) Image de fluorescence de sphères fluorescentes (200 nm) obtenues en démodulant le signal de fluorescence à la fréquence ω (a) et 2ω (b) [125].*

où I_{moy} est l'intensité moyenne du signal modulé. En introduisant le paramètre $\beta = I_{moy}/I_s$, avec I_s l'intensité de saturation définie par $I_s = k_{tot}^S/(\sigma(1+k_{cis}/k_{tot}^T))$, l'équation précédente se réécrit :

$$I_e(t) = \beta I_s(1 + \alpha\cos(2\pi ft)). \tag{6.22}$$

Le paramètre β est un indicateur du régime de fluorescence dans lequel se trouve le système considéré. Ainsi lorsque $\beta \ll 1$, le système est dans un régime linéaire d'excitation de fluorescence, alors que lorsque $\beta \geq 1$, le système est dans un régime saturé de fluorescence. Comme indiqué dans le chapitre 2, le signal de fluorescence F d'un système à 3 niveaux peut s'écrire [2] :

$$F = \kappa\ \Phi\ \frac{\sigma I_e}{1 + I_e/I_s}, \tag{6.23}$$

En introduisant l'expression de l'intensité d'excitation I_e de l'équation 6.22, il vient :

$$F(t) = \kappa\ \Phi\ \frac{\sigma\beta I_s(1 + \alpha\cos(2\pi ft))}{1 + \beta(1 + \alpha\cos(2\pi ft))}. \tag{6.24}$$

L'intensité d'excitation étant modulée temporellement, le signal de fluorescence $F(t)$ est à présent une fonction périodique (de période f) évoluant dans le temps. Comme toute fonction périodique, $F(t)$ peut être décomposée en série de Fourier de la manière suivante :

$$F(t) = F_0 + F_f\cos(2\pi ft) + F_{2f}\cos(4\pi ft) + F_{3f}\cos(6\pi ft) + ... \tag{6.25}$$

où F_i est le poids de l'harmonique i de fréquence if. Les poids F_i de l'équation 6.25 ont été calculés en utilisant le logiciel Mathematica (Wolfram Research). Pour la fréquence fondamentale f et la seconde harmonique $2f$, ces calculs ont conduit à :

$$F_f = Nk_{em}\frac{\alpha\beta}{(1+\beta)^2}. \tag{6.26}$$

$$F_{2f} = \frac{Nk_{em}}{2}\frac{\alpha^2\beta^2}{(1+\beta)^3}. \tag{6.27}$$

Les poids F_f et F_{2f} dépendent tous deux du taux d'émission radiatif collecté k_{em}. Pour s'en affranchir, nous pouvons introduire le paramètre ρ_F défini par :

$$\rho_F = \frac{F_{2f}}{F_f} = \frac{\alpha}{2}\frac{\beta}{1+\beta}. \tag{6.28}$$

Le paramètre ρ_F est une observable qui ne dépend ni du taux d'émission radiatif collecté ni du nombre moyen de molécules N dans le volume d'observation, mais seulement de l'intensité locale d'excitation à travers le paramètre β.
Pour une solution de référence en espace libre, l'intensité d'excitation $I_{e-sol}(t)$ s'écrit d'après l'équation 6.22 :

$$I_{e-sol}(t) = \beta_{sol}I_{s-sol}(1 + \alpha\cos(2\pi ft)). \tag{6.29}$$

En se plaçant au voisinage d'une antenne optique, l'intensité d'excitation I_{e-sol} peut être fortement exaltée. L'intensité d'excitation I_{e-nano} en présence d'une nano-antenne peut donc être exprimée comme :

$$I_{e-nano}(t) = \eta_{I_e} I_{e-sol}(t). \tag{6.30}$$

où η_{I_e} est l'exaltation sur le taux d'excitation. D'autre part, en utilisant l'équation 6.29, l'intensité I_{e-nano} s'écrit :

$$I_{e-nano}(t) = \beta_{nano} I_{s-nano}(1 + \alpha \cos(2\pi f t)). \tag{6.31}$$

Le paramètre β_{nano} peut alors être identifié en utilisant les équations 6.30 et 6.31 :

$$\beta_{nano} = \eta_{I_e} \beta_{sol} \frac{I_{s-sol}}{I_{s-nano}} = \eta_{I_e} \beta_{sol} \eta_{I_{sat}}. \tag{6.32}$$

où $\eta_{I_{sat}}$ est le gain sur l'intensité de saturation. Le rapport ρ_F en solution libre et au voisinage d'une nano-antenne optique peut alors être déterminé :

$$\rho_{F-sol} = \frac{\alpha}{2} \frac{\beta_{sol}}{1 + \beta_{sol}}. \tag{6.33}$$

$$\rho_{F-nano} = \frac{\alpha}{2} \frac{\beta_{nano}}{1 + \beta_{nano}} = \frac{\alpha}{2} \frac{\beta_{sol}(\eta_{I_e}/\eta_{I_{sat}})}{1 + \beta_{sol}(\eta_{I_e}/\eta_{I_{sat}})}. \tag{6.34}$$

Lorsque $\beta \ll 1$, les équations précédentes se réécrivent :

$$\rho_{F-sol} = \frac{\alpha}{2} \beta_{sol}. \tag{6.35}$$

$$\rho_{F-nano} = \frac{\alpha}{2} \beta_{sol} \frac{\eta_{I_e}}{\eta_{I_{sat}}}. \tag{6.36}$$

En introduisant le paramètre $\eta_{\rho_F} = \rho_{F-nano}/\rho_{F-sol}$, il vient :

$$\eta_{\rho_F} = \frac{\eta_{I_e}}{\eta_{I_{sat}}} \qquad \text{pour } \beta \ll 1, \tag{6.37}$$

D'où :

$$\eta_{I_e} = \eta_{\rho_F} \eta_{I_{sat}} \qquad \text{pour } \beta \ll 1. \tag{6.38}$$

Les grandeurs η_{ρ_F} et $\eta_{I_{sat}}$ étant accessibles par des mesures expérimentales, le renforcement du taux d'excitation η_{I_e} au voisinage d'une nano-antenne optique peut donc être évalué par spectroscopie sous saturation de fluorescence.

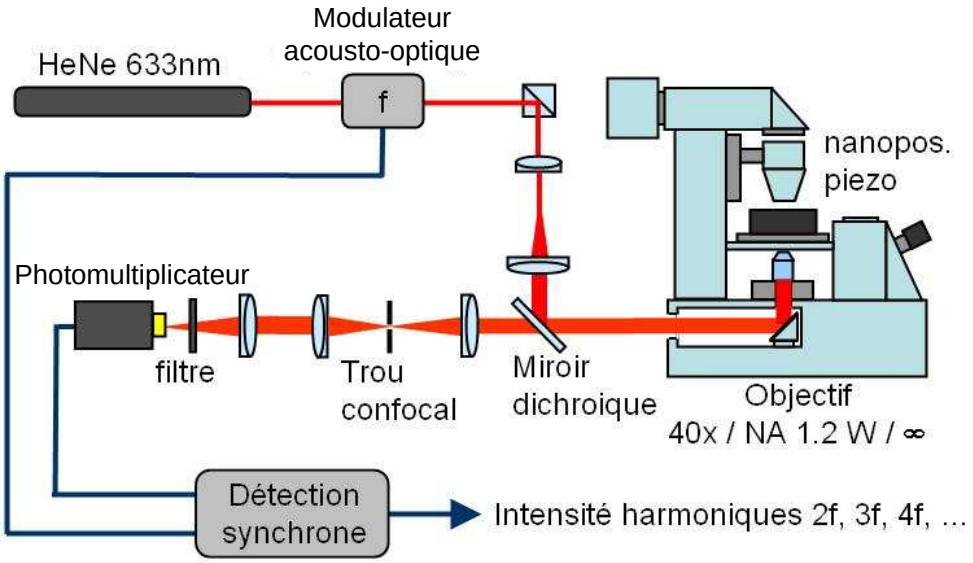


FIGURE 6.8 – *Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les mesures de spectroscopie sous saturation de fluorescence.*

6.2.4 Dispositif expérimental utilisé pour les mesures de spectroscopie sous saturation de fluorescence

Le montage de microscopie utilisé pour les mesures de spectroscopie sous saturation de fluorescence est similaire à celui présenté dans le chapitre 2. Pour moduler le faisceau excitateur, un modulateur acousto optique (MT200-A0.2-VIS, AA Sa ORSAY France) est placé en sortie du faisceau laser He-Ne. La fréquence de modulation a été fixée à f =5 kHz pour toutes les expériences que nous allons présenter. Le faisceau modulé incident est ensuite focalisé au niveau de l'échantillon par l'objectif à immersion à eau d'ouverture numérique 1.2. Le signal de fluorescence est alors collecté puis filtré spatialement et spectralement avant d'être détecté par un photomultiplicateur (H10721-20, Hamamatsu). La démodulation du signal de fluorescence à la fréquence fondamentale et aux harmoniques correspondantes est effectuée par une détection synchrone (7280-DSP Lock-In Amplifier, Signal Recovery, Royaume-Uni) reliée au photomultiplicateur via une résistance de charge de 50 kΩ.

6.2.5 Sondage du renforcement d'intensité d'excitation dans des ouvertures simples et corruguées

Pour montrer que la spectroscopie sous saturation de fluorescence peut être utilisée pour mesurer les exaltations de champs optiques, nous avons choisi d'étudier des antennes précédemment caractérisées par FCS : des nano-ouvertures d'or simples (diamètre 130 nm)

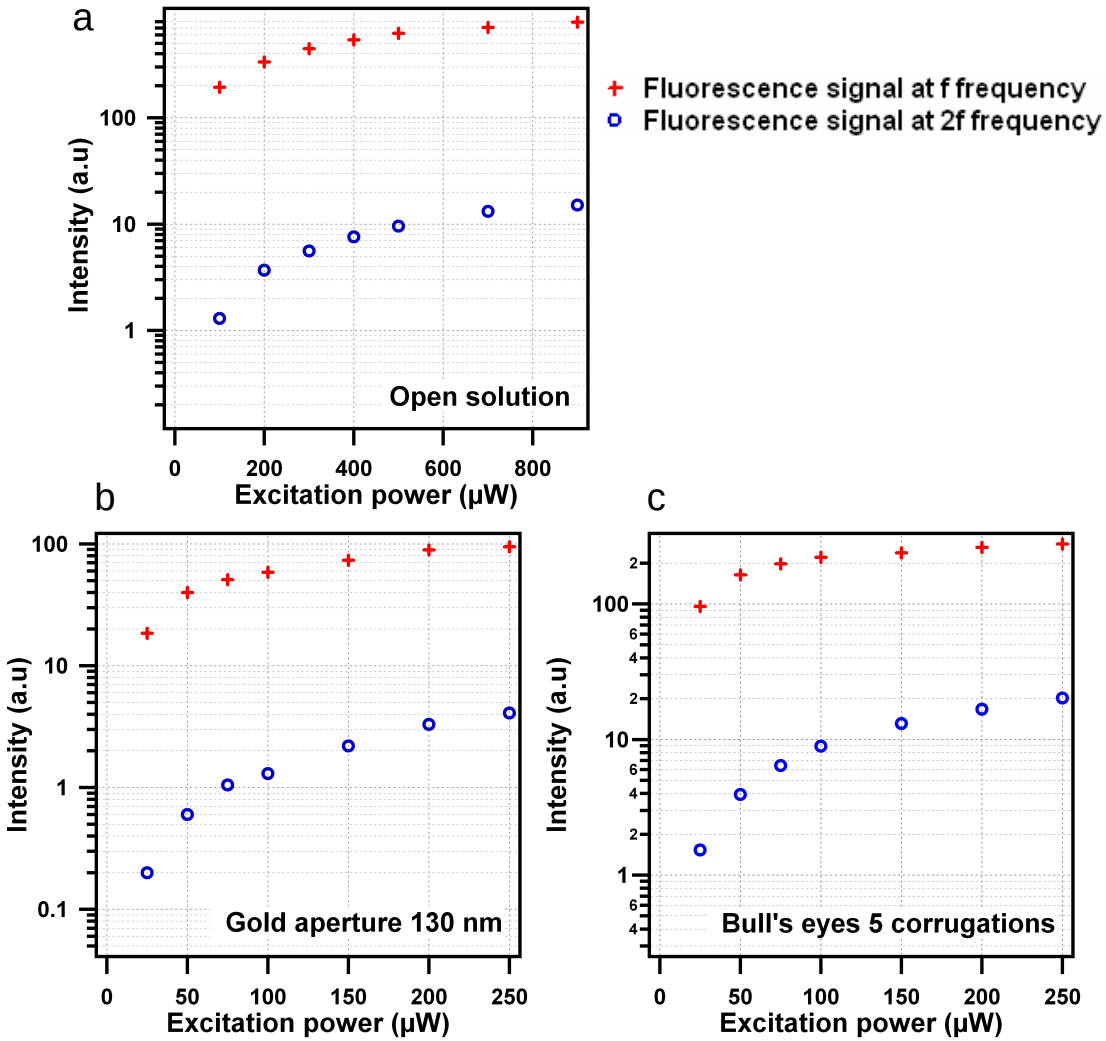


Figure 6.9 – *Evolution de l'intensité de fluorescence démodulée aux fréquences f (5 kHz) et $2f$ (10 kHz) en fonction de la puissance d'excitation laser dans le cas d'une solution libre (a) et dans des nano-ouvertures simples (b) et corruguées (c).*

et corruguées (diamètre 130 nm, périodicité 440 nm, profondeur 65 nm, largeur 200 nm, paramètre a =440 nm). Les sondes fluorescentes utilisées pour toutes les mesures qui vont être présentées sont les molécules d'Alexa 647.

Comme indiqué en sous-section 6.2.3, l'évaluation du renforcement d'intensité d'excitation η_{I_e} nécessite de déterminer les paramètres η_{ρ_F} et $\eta_{I_{sat}}$. Pour ce faire, nous avons commencé par mesurer l'évolution du signal de fluorescence à la fréquence fondamentale f et à la fréquence harmonique $2f$ dans le cas de la référence en solution et dans les nano-antennes étudiées. Les résultats de ces mesures sont présentés en Figure 6.9. Comme nous pouvons le remarquer, la fréquence harmonique $2f$ apparaît à plus faible puissance d'excitation dans

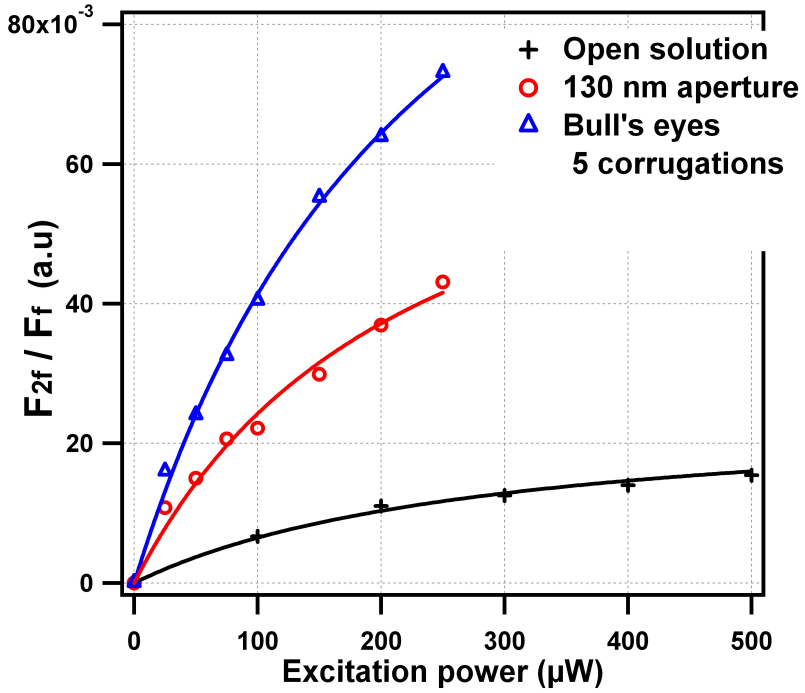


FIGURE 6.10 – *Evolution du paramètre $\rho_F = F_{2f}/F_f$ en fonction de la puissance d'excitation dans le cas d'une solution libre et dans des ouvertures simples et corruguées.*

les ouvertures simples (Figure 6.9 (b)) et corruguées (Figure 6.9 (c)) comparé à la solution de référence (Figure 6.9 (a)). Cet effet est directement lié au renforcement de l'intensité d'excitation dans les nano-ouvertures.
Pour quantifier ces gains, les rapports ρ_{F-sol} pour la solution et ρ_{F-nano} dans les ouvertures ont été calculés (Figure 6.10). Ces résultats ont ensuite été ajustés numériquement en utilisant l'équation 6.33 pour les mesures en solution et l'équation 6.34 pour les mesures avec les nano-antennes. Ces ajustement permettent d'obtenir les expressions ρ_{F-sol} et ρ_{F-nano} lorsque $\beta \ll 1$ (équations 6.35 et 6.36), et donc le paramètre $\eta_{\rho_F} = \rho_{F-nano}/\rho_{F-sol}$.
Les intensités de saturation de fluorescence peuvent quant à elles être déterminées par un ajustement numérique d'après l'équation 6.23 de l'évolution du signal de fluorescence à la fréquence f en fonction de la puissance d'excitation en solution et dans les nano-ouvertures simples et corruguées (Figure 6.9). La détermination des intensités de saturation permet de calculer le gain sur l'intensité de saturation $\eta_{I_{sat}} = I_{s-sol}/I_{s-nano}$ dans les nano-ouvertures simples et corruguées. Nous pouvons alors accéder à l'exaltation de l'intensité d'excitation η_{I_e} au voisinage des antennes. Les résultats sont résumés en Table 6.1. Les gains sur l'intensité d'excitation obtenus sont en bon accord avec ceux mesurés dans les chapitre 4 et 5. En effet, les gains η_{I_e} déterminés par FCS dans des ouvertures simples et corruguées sont respectivement de 3.7 et 7.7 et les gains η_{I_e} mesurés par spectroscopie sous saturation de fluorescence sont de 4.8 pour l'ouverture simple et 7.5 pour l'ouverture corruguée. Ces

	I_s (μW)	$\eta_{I_{sat}}$	ρ_F	η_{ρ_F}	η_{I_e}	η_{I_e} (FCS)
Open solution	287		8.8x10^{-5}			
130 nm gold aperture	227	1.69	3.4x10^{-4}	1.9	4.8	3.7
Bull's eyes 5 corrugations	251	1.14	5.8x10^{-4}	3.5	7.5	7.7

Table 6.1 – *Paramètres expérimentaux obtenus lors de l'étude des ouvertures simples et corrugées par spectroscopie sous saturation de fluorescence et comparaison avec les valeurs mesurées par FCS.*

résultats prouvent que la spectroscopie sous saturation de fluorescence peut être utilisée pour sonder les champs optiques au voisinage de nano-antennes.

6.2.6 Conclusion sur l'utilisation de la spectroscopie sous saturation de fluorescence pour le sondage des champs optiques

La spectroscopie sous saturation de fluorescence est une technique qui exploite les propriétés intrinsèques de non-linéarité du processus de fluorescence. L'avantage de la spectroscopie sous saturation de fluorescence par rapport à l'utilisation de boîtes quantiques présentées dans la section 6.1 est que cette méthode est mise en oeuvre avec des molécules fluorescentes standards. En modulant le faisceau excitateur à une fréquence fondamentale f dans un régime de saturation de fluorescence, des harmoniques aux fréquences élevées apparaissent dans le signal de fluorescence. En exploitant ces harmoniques, il est possible d'accéder au gain sur l'intensité d'excitation au voisinage de nano-antennes optiques sans effectuer de corrélation de fluorescence.

CHAPITRE 7

Utilisation des nano-antennes optiques en biophotonique

La détection de molécules individuelles dans des solutions fortement concentrées reste un défi dans le domaine de l'analyse biomoléculaire. En effet, d'une part la détection de molécules dans des gammes de concentration supérieures au nanomolaire doit être effectuée dans des volumes sub-longueur d'onde, et d'autre part le faible signal de fluorescence émis par une molécule individuelle doit être amplifié pour bénéficier d'un rapport signal à bruit satisfaisant. Pour ces raisons, nous allons voir que les nano-antennes optiques étudiées et caractérisées au cours de cette thèse peuvent être utilisées pour améliorer très efficacement les techniques de détection de molécules individuelles en solution, rendant ainsi possible le suivi de réactions de clivage enzymatique qui requièrent des temps d'intégration courts. Ces antennes optiques ont de plus permis la réalisation d'un dispositif FCS miniaturisé.

7.1 Spectroscopie de corrélation de fluorescence exaltée par des nano-antennes optiques

7.1.1 Analyse de dynamique moléculaire dans des solutions fortement concentrées avec des nano-ouvertures

L'analyse biochimique à l'échelle d'une molécule unique permet de révéler des informations qui ne sont pas accessibles par des mesures d'ensemble. Cette analyse s'effectue en général sur des montages de microscopie confocale avec des volumes de détection de l'ordre de 0.2 femtolitre, ce qui permet de conduire des expériences sur quelques molécules fluorescentes dans des gammes de concentrations allant du picomolaire jusqu'au nanomolaire. Toutefois, la plupart des réactions enzymatiques en biologie s'opérent à des concentrations en ligand beaucoup plus élevées et qui sont de l'ordre d'une centaine de micromolaire comme l'ont montré Samiee et al [3]. Dans leur étude, effectuée sur 30 000 enzymes, le nombre de réactions chimiques a été mesuré en fonction de la concentration

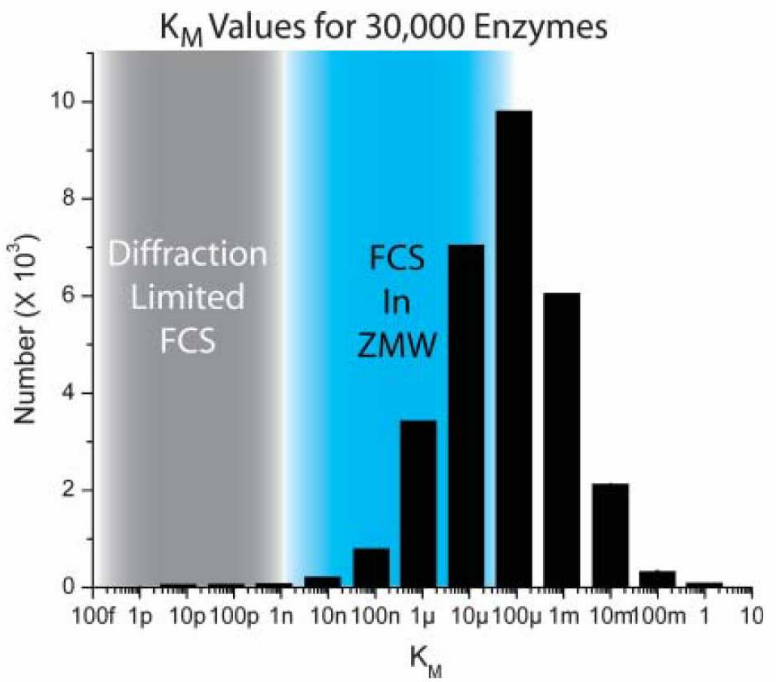


Figure 7.1 – *Histogramme, effectué pour 30 000 enzymes, du nombre de réactions chimiques ayant lieu en fonction de la concentration effective. Les concentrations inférieures au nanomolaire peuvent être étudiées par FCS de manière classique alors que l'analyse de solutions plus concentrées (qui sont typiquement les concentrations que l'on retrouve dans les milieux biologiques) doit être conduite dans des volumes sub-longueur d'onde, comme c'est le cas dans des nano-ouvertures [3].*

effective comme indiqué sur la Figure 7.1. Il apparait clairement que la très grande majorité de réactions s'effectue pour des concentrations supérieures au nanomolaire. Explorer ces gammes de concentrations, qui sont typiquement les concentrations que l'on retrouve dans les cellules biologiques, nécessite de réduire le volume d'observation d'au moins trois ordres de grandeur sous la limite de diffraction optique.
Pour réduire très efficacement le volume de détection afin d'effectuer des mesures FCS à fortes concentrations, l'idée très élégante proposée en 2003 par Levene et al [90] fut d'utiliser des nano-ouvertures en aluminium (épaisseur du film métallique : 89 nm) de diamètres compris entre 30 et 80 nm, comme illustré en Figure 7.2 (a). La distribution d'intensité dans une ouverture de 50 nm de diamètre et de 100 nm d'épaisseur obtenue par des simulations FETD (Finite-Element Time-Domain) en trois dimensions est disponible en Figure 7.2 (b). Ces calculs suggèrent que le champ incident ne se propage pas et reste confiné dans la partie inférieure de l'ouverture. Le confinement du champ électromagnétique et le filtrage spatial imposé par les dimensions de l'ouverture permettent de significativement réduire le volume d'analyse confocal et donc de conduire des expériences FCS à fortes concentrations (Figure 7.2 (c)). En particulier, des concentrations de 250 μM peuvent être étudiées avec une ouverture de 30 nm. Ces prédictions théoriques ont été expérimentalement vérifiées en conduisant des mesures FCS sur des molécules de R110-dCTP pour différentes concentrations micromolaires (Figure 7.2 (d)), et en suivant la dynamique temporelle des activités de l'ADN polymérase [90]. Ces résultats ont constitué une avancée importante dans le domaine de l'analyse biomoléculaire dans des conditions physiologiques. Les nano-ouvertures ont également été utilisées plus récemment pour le séquençage de l'ADN [127]. Ce genre de dispositif de séquençage est actuellement commercialisé par la société Pacific Biosciences.

7.1.2 Amélioration du rapport signal sur bruit et réduction de la durée des expériences FCS à l'aide de nano-antennes

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre 2, le bruit et la précision statistique sont d'importants paramètres en FCS. Dans les conditions expérimentales d'une MDE à profil transversal Gaussien, d'une diffusion Brownienne 3D, d'un bruit négligeable, et d'un intervalle de comptage petit, le rapport signal sur bruit en FCS est donné pour rappel par [47] :

$$\mathrm{SNR}_{\Delta\tau\to 0} \simeq \frac{CRM\sqrt{T_{tot}\,\Delta\tau}}{(1+1/N)^{1/2}} \tag{7.1}$$

Amélioration du rapport SNR avec des nano-ouvertures métalliques

Pour évaluer l'amélioration du rapport signal sur bruit SNR en FCS lors de l'utilisation de nano-ouvertures métalliques de 120 nm (épaisseur du film d'or 200 nm, couche d'adhésion de 15 nm de chrome) présentées dans le chapitre 3, nous avons commencé par conduire 200 acquisitions FCS successives de durée T_{tot} =1 s sur des molécules d'Alexa 647 excitées à 633 nm avec une puissance laser incidente de 40 μW [47]. Les corrélogrammes types obtenus lors des mesures en solution libre et dans les nano-ouvertures pour des temps

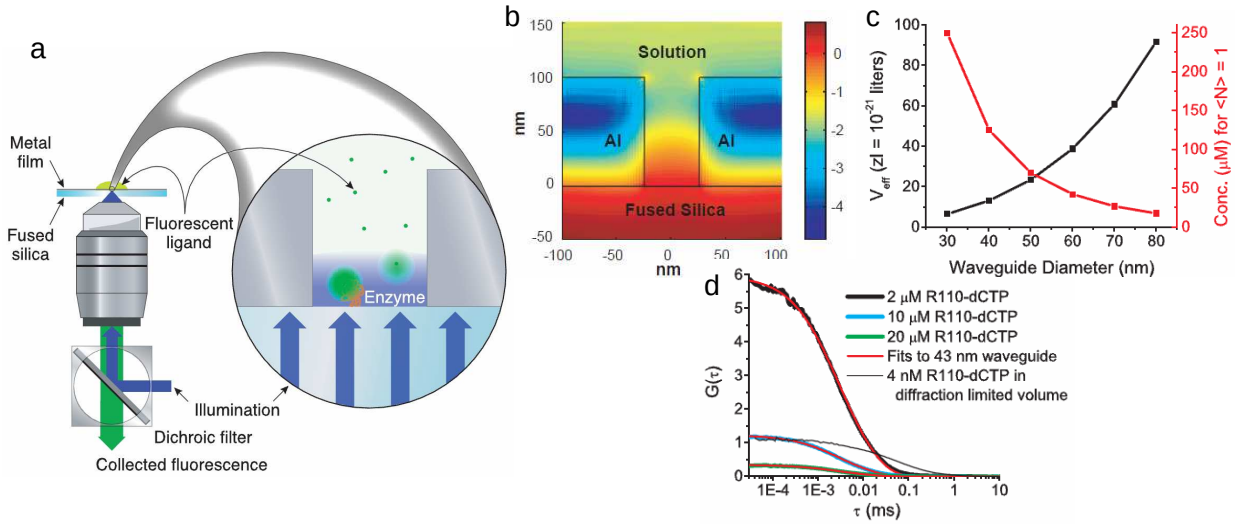


Figure 7.2 – *(a) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les mesures FCS en présence de nano-ouvertures. (b) Simulation 3D FETD (Finite-Element Time-Domain) de la distribution d'intensité pour une ouverture de 50 nm dans un film d'aluminium d'épaisseur 100 nm. (c) Volume effectif et concentration mesurable correspondante (pour lesquelles une molécule est présente en moyenne dans le volume de détection) en fonction du diamètre de l'ouverture. (d) Fonctions de corrélation obtenues par des mesures FCS pour différentes concentrations micromolaires en molécules R110-dCTP [90].*

d'intégration de T_{tot} =1 s ainsi que la moyenne de ces corrélogrammes correspondant à un temps d'intégration T_{tot} =200 s sont présentés en Figure 7.3. Afin de permettre une comparaison directe des rapports SNR dans les deux cas, le nombre moyen de molécules dans chaque volume d'observation a été maintenu quasi-constant par des dilutions appropriées. Cela permet d'éviter des artéfacts de mesures dus à la dépendance du rapport signal sur bruit en fonction du nombre de molécules N. Les nombre moyens de molécules dans les volumes sondés sont respectivement de N =1.18 et N =1.15 dans le cas de la solution libre et dans les nano-ouvertures. L'analyse des données FCS selon l'équation 2.32 a conduit à la détermination de taux de comptage par molécule CRM de 18.1 kHz pour la solution libre et de 181 kHz dans l'ouverture d'or de 120 nm, soit une exaltation de fluorescence de $\eta_{F_{low}}$ =181/18.1=10. Cette exaltation de fluoresence a une influence directe sur le rapport signal sur bruit comme nous pouvons le constater en Figure 7.3, où des corrélogrammes avec un meilleur rapport SNR sont obtenus avec les ouvertures d'or de 120 nm comparé à la solution de référence. Une évaluation plus quantitative de l'amélioration du rapport SNR va à présent être effectuée.

La distribution statistique du premier canal de la fonction d'autocorrélation $g^2(0)$ est indiquée en Figure 7.4 (a), où sont présentés les histogrammes des valeurs de $g^2(0)$ obtenues au cours des 200 acquisitions de T_{tot} =1 s dans le cas des expériences avec nano-ouvertures

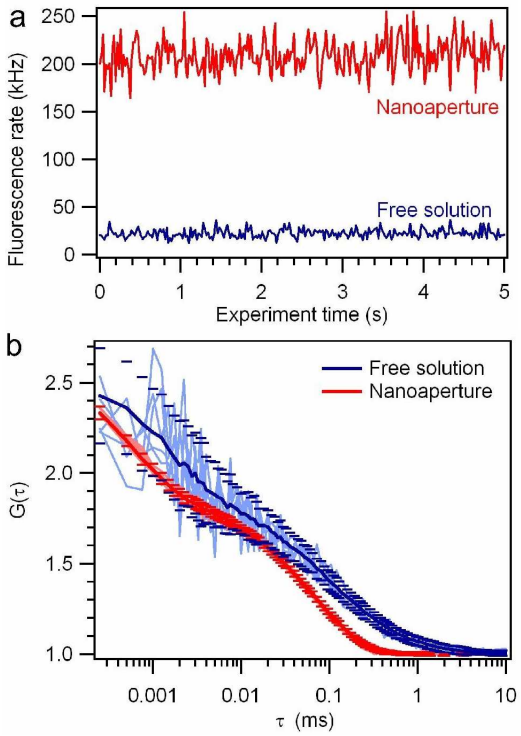


FIGURE 7.3 – *(a) Trace du signal total de fluorescence mesuré dans le cas de la solution de référence et dans une ouverture d'or de 120 nm pour une puissance d'excitation de 40 μW. (b) Fonctions de corrélation correspondant aux traces de (a). Les lignes épaisses correspondent aux fonctions de corrélation pour un temps d'intégration de T_{tot} =200 s et les lignes fines correspondent à différentes fonctions de corrélation obtenues pour un temps d'intégration de T_{tot} =1 s. Les barres horizontales indiquent la déviation standard pour chaque point de la fonction de corrélation calculée d'après les 200 corrélogrammes indépendant de T_{tot} =1 s. L'analyse des données FCS selon l'équation 2.32 a conduit pour les expériences en solution à : N =1.18, τ_D =97.5 μs, s =0.2, n_T =0.74, τ_T =2.2 μs, et CRM =18.1 kHz. Pour les expériences dans les nano-ouvertures, les paramètres d'analyse obtenus sont : N =1.15, τ_D =66 μs, s =0.2, n_T =0.73, τ_T =0.8 μs, et CRM =181 kHz [47].*

et en solution libre. L'analyse de ces données permet de déterminer la moyenne et la déviation standard de $g^2(0)$, conduisant à des rapports SNR de 8.7 pour les expériences en solution libre et de 65.4 pour les expériences dans une nano-ouverture (le rapport SNR étant expérimentalement déduit par SNR= $\bar{g}^2(0)/\sigma_{g^2(0)}$, où $\bar{g}^2(0)$ est la valeur moyenne de $g^2(0)$ et $\sigma_{g^2(0)}$ est la déviation standard obtenues d'après les résultats de la Figure 7.4 (a)). L'utilisation d'une ouverture métallique de 120 nm apporte donc un gain sur le rapport signal sur bruit d'un facteur 7.5, ce qui permet des analyses FCS plus précises. Ces données expérimentales sont à comparer avec les valeurs théoriques du rapport SNR évaluées d'après la formule généralisée de Koppel-Qian-Wenger (équation 7.1) et qui sont de 6.7

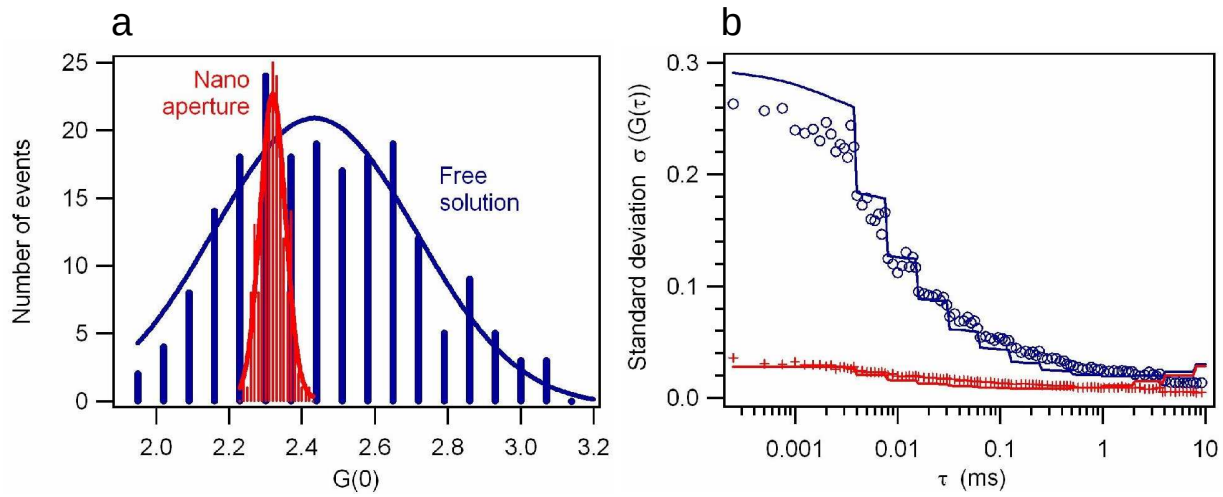


Figure 7.4 – *(a) Histogrammes expérimentaux (barres) de la distribution statistique de $g^2(0)$ correspondant aux données FCS de la Figure 7.3 (T_{tot} =1 s) et analyse numérique basée sur une distribution de type Gaussienne. (b) Déviation standard $\sigma_{g^2(\tau)}$ en FCS. Les points représentent les mesures expérimentales (les cercles bleus indiquent les expériences en solution libre et les croix rouges les expériences dans les ouvertures d'or de 120 nm), les lignes continues indiquent les prédictions théoriques selon l'équation 7.1 [47].*

dans le cas de la solution de référence et 66.2 pour les nano-ouvertures, ce qui est en bon accord avec les données expérimentales.
Le bruit dans les courbes d'autocorrélation de fluorescence aux temps plus longs peut être évalué en déterminant la déviation standard $\sigma_{g^2(\tau)}$ pour chaque point de $g^2(\tau)$ d'après les 200 acquisitions de T_{tot} =1 s. Les résultats sont représentés par des points en Figure 7.4 (b). La déviation standard a également été analytiquement approximée en utilisant les résultats présentés en référence [47], ce qui a conduit à des données en bon accord avec les résultats expérimentaux comme indiqué en Figure 7.4 (b) (lignes continues). Plus le délai temporel τ augmente, plus le taux de comptage moyen par canal du corrélateur $\langle n \rangle$ augmente. Par conséquent, plus le taux de comptage est important, plus le bruit de grenaille relatif est faible, ce qui explique pourquoi la déviation standard $\sigma_{g^2(\tau)}$ diminue lorsque le délai τ augmente.
Enfin, précisons que puisque le rapport SNR en FCS varie en fonction du produit $CRM\sqrt{T_{tot}}$, l'exaltation d'un facteur $\eta_{F_{low}}$ =10 du taux de comptage par molécule CRM dans l'ouverture métallique autorise la réduction d'un facteur 100 de la durée des mesures FCS avec le même rapport SNR, permettant ainsi de conduire des expériences FCS rapides.

Amélioration du rapport SNR avec des microsphères diélectriques

Une étude sur l'amélioration du rapport SNR en FCS a également été effectuée pour des expériences où une sphère de mélamine de 2 μm est placée au point de focalisation

du faisceau laser incident à une puissance de 40 μW [71]. L'exaltation de fluorescence au voisinage d'une sphère de mélamine de 2 μm est de $\eta_{F_{low}}$ =7.5, comme il a été vu dans le chapitre 3. De la même manière que pour les mesures sur nano-ouvertures, 200 acquisitions FCS successives de durée T_{tot} =1 s sur des molécules d'Alexa 647 ont été conduites. Les corrélogrammes moyens normalisés obtenus correspondant à un temps d'intégration T_{tot} =200 s sont présentés en Figure 7.5 (a) dans le cas de solution de référence et lors de l'utilisation d'une microsphère de mélamine. La déviation standard $\sigma_{g^2(\tau)}$ pour chaque point des fonctions d'autocorrélation calculée d'après les 200 corrélogrammes indépendants est également indiquée en Figure 7.5 (a) afin de permmetre une comparaison directe du rapport signal sur bruit dans chacun des cas considérés.
Pour évaluer le rapport SNR de manière plus précise, la distribution statistique de $g^2(0)$ (le premier canal de la fonction d'autocorrélation) a été étudiée. Les résultats sont présentés en Figure 7.5 (b) sous forme d'histogrammes des valeurs de $g^2(0)$ obtenus lors des 200 acquisitions dans le cas de la référence en solution libre et avec une sphère de mélamine de 2 μm. En utilisant ces données, la moyenne et la déviation standard de $g^2(0)$ a été expérimentalement déterminée, conduisant à un rapport SNR de 1.4 pour la solution libre et de 6.3 avec la sphère de mélamine. A titre de comparaison, les prédictions théoriques selon la formule généralisée de Koppel-Qian-Wenger (équation 7.1) ont conduit à la détermination d'un rapport SNR de 1.3 pour la solution de référence et 7.1 pour les expériences avec la microsphère de mélamine, ce qui est en bon accord avec les résultats expérimentaux. L'exaltation de fluorescence des molécules diffusant au voisinage d'une sphère de mélamine de 2 μm permet de réduire la durée des expériences FCS environ 50 fois.

Applications du SNR exalté au suivie de réactions enzymatiques

Nous avons vu précédemment que le rapport signal sur bruit SNR en FCS pouvait être fortement amélioré par l'exaltation du taux de comptage par molécule CRM au voisinage d'une antenne optique. Bien évidemment, pour améliorer encore plus efficacement le rapport SNR en FCS, la durée totale d'acquisition T_{tot} des expériences pourrait être étendue. Cependant, cette stratégie peut s'avérer inappropriée dans certaines applications, pour lesquelles la vitesse et la résolution temporelle sont des paramètres importants ou lorsque le taux de fluorescence par émetteur est faible. Pour mettre en avant l'importance du rapport SNR en FCS lors d'études biomoléculaires, nous nous sommes intéressés au suivi d'une réaction de clivage enzymatique dans une ouverture d'or de 120 nm [47].
Les bactéries possèdent des enzymes qui coupent les acides nucléiques étrangers à des séquences de reconnaissance spécifiques. La découverte et l'exploitation de ces endonucléases de restriction ont autorisé un clivage ciblé de l'ADN, permettant ainsi une ingénierie génétique moderne [128]. Les endonucléases de restriction les plus utilisées dans les laboratoires de génie génétique sont les enzymes de type II. Leurs sites de restriction de 4 à 8 paires de bases sont des séquences palindromiques (se lisent de droite à gauche et inversement, comme le mot radar et la phrase "esope reste ici et se repose"). Les enzymes de type II coupent un double brin d'ADN au niveau de leurs sites de restriction. L'endonucléase orthodoxe de restriction de type II *Eco*RI, produite par la souche bactérienne Escherichia

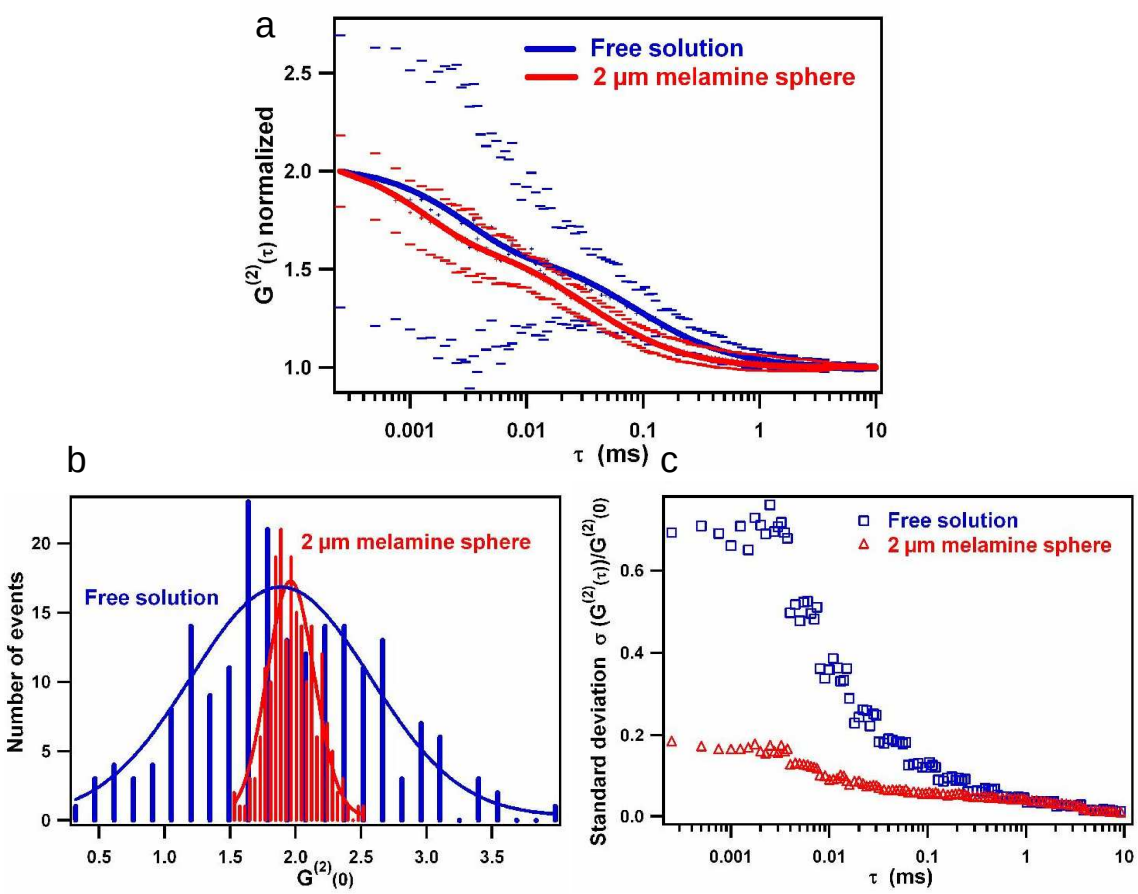


Figure 7.5 – *(a) Fonctions de corrélation obtenues dans le cas de la solution de référence et en présence d'une sphère de mélamine de 2 µm placée au point de focalisation de l'objectif de microscope. Les lignes épaisses correspondent aux fonctions de corrélation pour un temps d'intégration de T_{tot} =200 s et les lignes fines correspondent à différentes fonctions de corrélation obtenues pour un temps d'intégration de T_{tot} =1 s. Les barres horizontales indiquent la déviation standard pour chaque point de la fonction de corrélation calculée d'après les 200 corrélogrammes indépendant de T_{tot} =1 s. (b) Histogrammes expérimentaux (barres) de la distribution statistique de $g^2(0)$ correspondant aux données FCS de (a) pour (T_{tot} =1 s) et analyse numérique basée sur une distribution de type Gaussienne. (c) Déviation standard $\sigma_{g^2(\tau)}$ en FCS. Les points représentent les mesures expérimentales (les cercles bleus indiquent les expériences en solution libre et les croix rouges les expériences avec la microsphère de mélamine), les lignes continues indiquent les prédictions théoriques selon l'équation 7.1 [71].*

coli (bactérie commensale du système digestif de l'homme), coupe la séquence GAATTC entre les deux brins G et A [129] (Figure 7.6 (a)). Pour cela, *Eco*RI se lie dans un premier temps au brin d'ADN de manière non-spécifique, puis diffuse en une dimension selon la

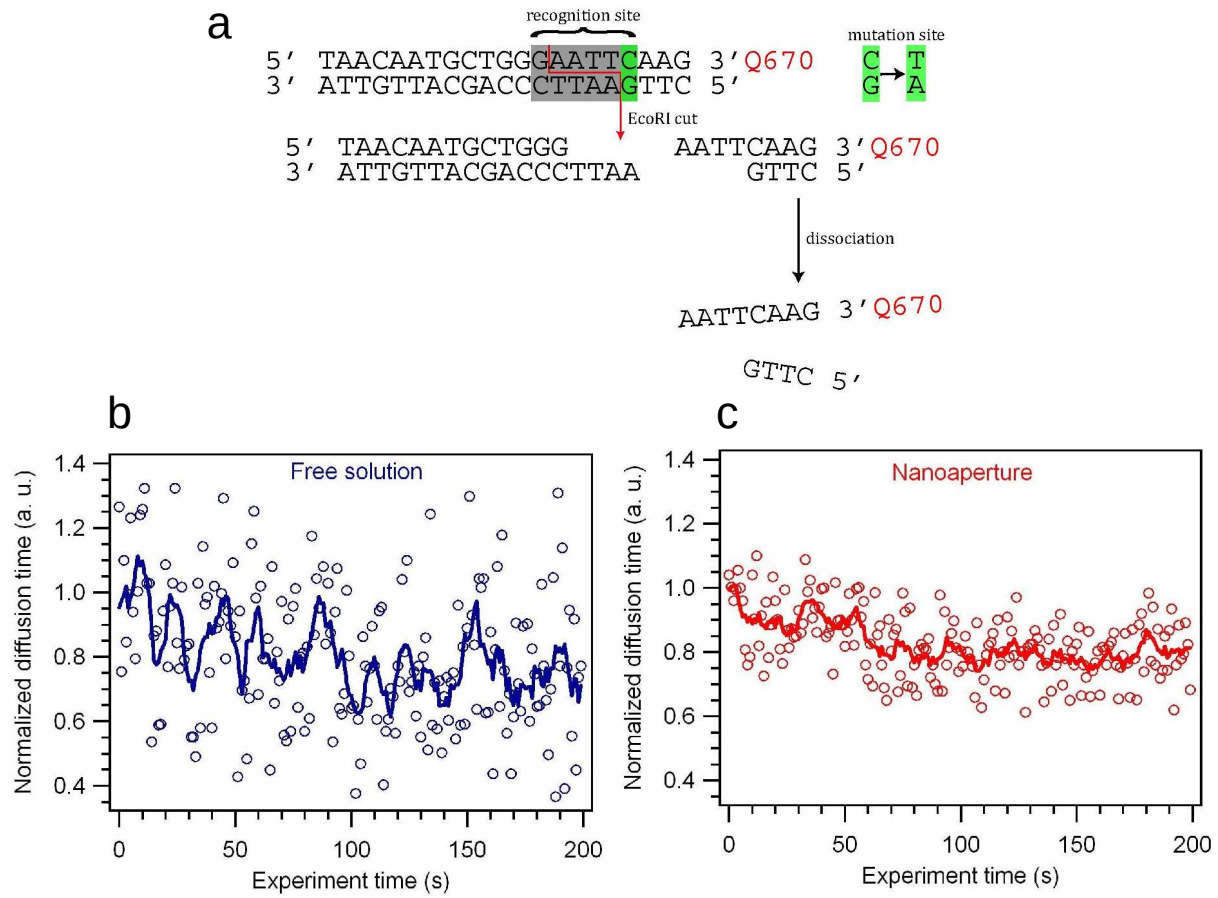


FIGURE 7.6 – *(a) Séquence du substrat d'ADN marqué avec le fluorophore Quasar 670 (Q670). La séquence de reconnaissance de l'endonucléase de restriction EcoRI n'est pas présentée. Temps de diffusion τ_D normalisés mesurés par FCS durant le suivi de la réaction de clivage enzymatique en solution libre (a) et dans une ouverture d'or de 120 nm (b). Les points correspondent à un temps d'intégration T_{tot} =1 s, les lignes à un temps d'intégration T_{tot} =7 s [47].*

double hélice avant d'atteindre la séquence de reconnaissance. Le lien entre et liaison et activité catalytique est encore peu compris, mais des études thermodynamiques combinées à des mesures cinétiques pourraient permettre de comprendre ce lien.
Pour effectuer ces mesures cinétiques par FCS, nous avons réalisé un oligonucléotide synthétique sur substrat clivable par *Eco*RI (et son complément) comme indiqué en Figure 7.6 (a). Cette séquence oligonucléotide correspond à une portion du gène humain $fucA1$. Lorsque le gène $fucA1$ est muté de C à T au nucléotide 1264, le site de coupure de l'enzyme *Eco*RI est éliminé, et le codon glutamine (CAA) en position 422 est modifié en codon stop (TAA). La protéine tronquée résultante cause de sévères formes de fucosidose, une maladie neurodégénérative rare conduisant à une mortalité précoce [130].

L'activité de *Eco*RI a été enregistrée dans une solution tampon contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de $MgCl_2$ et 100 mM de NaCl. Les expériences FCS en solution ont été conduites sur une goutte contenant 100 μL d'ADN sur substrat à une concentration de 85 nM avec 3 μL d'*Eco*RI d'activité 10 u/μL. Pour les expériences dans les nano-ouvertures, le rapport des concentrations finales entre ADN et *Eco*RI a été maintenu constant par rapport à la référence en solution, ce qui permet de garder une cinétique de clivage identique dans les deux cas. La goutte déposée au dessus des nano-ouvertures est composée de 50 μL d'ADN à 1.7 μM et 20 μL d'*Eco*RI d'activité 10 u/μL. Les endonucléases de restriction et l'ADN en solution ont été dilués dans le tampon et immédiatement mélangés avant analyse.
Durant la réaction de clivage, *Eco*RI coupe la liaison chimique entre le fluorophore et la double hélice d'ADN, conduisant à une diminution de la masse moléculaire effective du fluorophore et donc à une variation du temps de diffusion τ_D sondé par FCS (Figure 7.6 (b)-(c)). Avant clivage, la molécule DNA-Q670 a une masse de 14.6 kDa, tandis qu'après clivage, le brin marqué Q670 pèse 4.7 kDa. La réduction du temps de diffusion variant en fonction de la racine cubique du rapport des masses moléculaires, une réduction de $(4.7/14.7)^{1/3} \approx 70\%$ est attendue, ce qui est proche des valeurs des temps de diffusion mesurés après 150 s de réaction (Figure 7.6 (b)-(c)). Les résultats expérimentaux présentés dans le cas de la solution de référence en Figure 7.6 (b) et en utilisant des nano-ouvertures en Figure 7.6 (c) présentent la même allure, mais le rapport SNR lors des mesures avec les nano-ouvertures est 2.7 fois supérieur pour un temps d'intégration T_{tot} =1 s par rapport à la référence en solution. Pour obtenir le même rapport SNR en solution, il faudrait augmenter le temps d'intégration d'environ un facteur $2.7^2 \approx 7$, ce qui entraînerait une perte de la résolution temporelle, d'ou l'intérêt d'utiliser des nano-ouvertures pour sonder des réactions biochimiques spécifiques qui requièrent des taux d'échantillonnage rapides.

7.1.3 Exaltation de la spectroscopie par corrélation croisée de fluorescence à deux couleurs

La spectroscopie par corrélation croisée de fluorescence à deux couleurs (FCCS) est une extension de la technique FCS standard qui permet d'accéder à des paramètres d'association moléculaire comme les concentrations locales, la diffusion, les vitesses d'association/dissociation et les activités enzymatiques. Lors d'une expérience de FCCS, les espèces moléculaires d'intérêt sont marquées avec différents fluorophores spectralement séparables et simultanément excitées par une ligne multi-laser ou un laser impulsionnel. Après excitation, le signal de fluorescence de chacune des espèces fluorescentes est détecté et la fonction de corrélation croisée est calculée afin d'obtenir des informations sur les efficacités d'association et de colocalisation. Si des expériences FCCS peuvent être effectuées à faible concentration moléculaire pour des partenaires réactionnels de forte affinité, l'analyse de réaction d'espèces de faible affinité nécessite de fortes concentrations moléculaires (typiquement dans la gamme du millimolaire) et doit être effectuée dans des volumes réduits. En tirant partie des résultats obtenus en FCS avec les microsphères diélectriques, nous

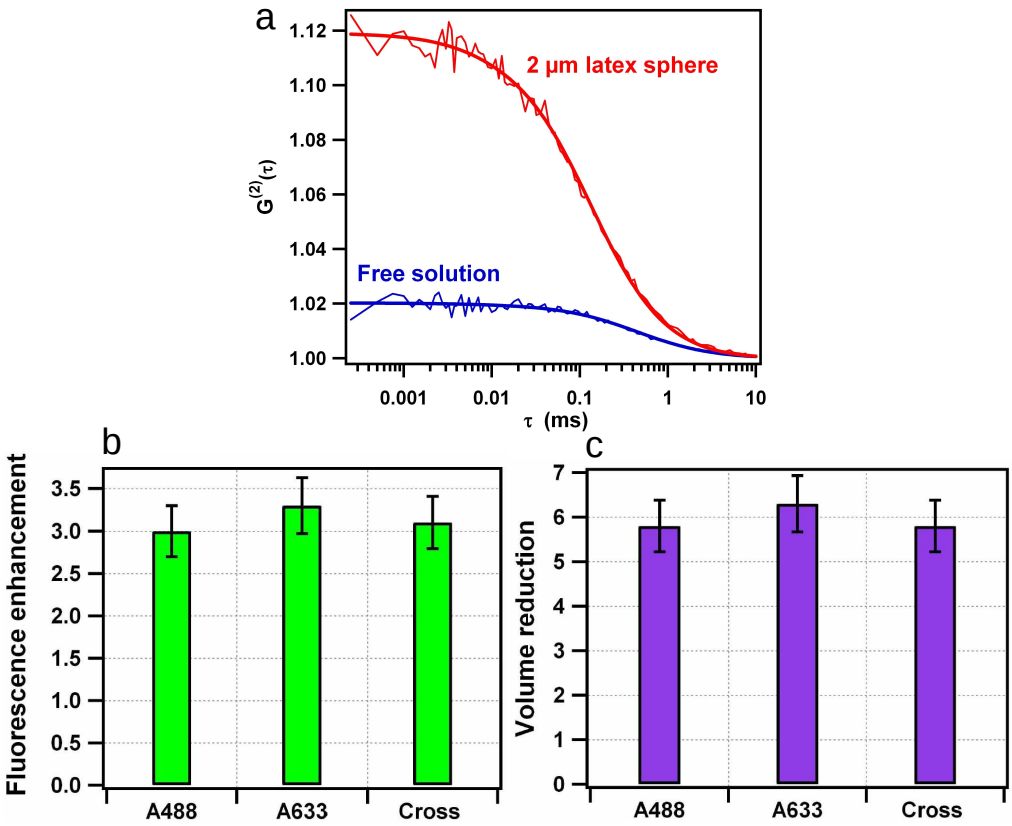


FIGURE 7.7 – *(a) Fonctions de corrélation croisée $g^2(\tau)_{488,633}$ obtenues lors des mesures en solution et en présence d'une sphère de latex de 2 µm placée au point de focalisation de l'objectif de microscope. L'analyse numérique selon l'équation 2.34 ont conduit pour les mesures en solution à N =50.4, τ_D ==445 µs, s =0.2, n_T =0.02, τ_T =6.0 µs, et CRM =1.7 kHz et à N =8.6, τ_D ==127 µs, s =0.2, n_T =0.04, τ_T =6.0 µs, et CRM =5.1 kHz pour les mesures avec microsphère. Exaltation de fluorescence (b) et réduction du volume d'observation (c) mesurées pour l'autocorrélation et la corrélation croisée des brins d'ADN doublement marqués [71].*

avons proposé l'utilisation d'une sphère en latex de 2 μm pour réduire le volume d'analyse FCCS [71].

Pour ces études, une solution de 50 μL de brins d'ADN individuels doublement marqués (In vitro FCCS Standard 488-633, IBA, GmbH, Göttingen Allemagne, pic d'absorption/émission respectivement centrés à 488 et 633 nm) a été déposée sur les échantillons de microsphères de latex. La ligne d'excitation à deux couleurs a été obtenue en combinant le laser He-Ne à 633 nm et le laser à semi-conducteur à 488 nm. Le signal de fluorescence de chaque espèce fluorescente est détectée par deux photodiodes à avalanche avec respectivement des filtres vert (570±20 nm) ou rouge (670±20 nm). Les fonctions d'autocorrélation $g^2(\tau)_{488}$ et $g^2(\tau)_{633}$ pour chacune des espèces sont ensuite calculées pour

s'assurer de l'alignement du dispositif expérimental. Après cette vérification, les mesures FCCS ont été conduites en solution libre et en présence d'une sphère de 2 μm placée au point de focalisation de l'objectif de microscope d'ouverture numérique ON=1.2 pour des puissances d'excitation P_{488} =60 μW et P_{633} =40 μW. La fonction de corrélation croisée $g^2(\tau)_{488,633}$ obtenue est alors ajustée numériquement selon l'équation 2.34 du chapitre 2, donnant ainsi accès au nombre moyen de brins d'ADN doublement marqués, au temps de diffusion des brins et au taux de comptage CRM (qui est ici la somme des photons verts et rouges émis par brin d'ADN marqué par seconde). Les fonctions de corrélation croisée et leurs ajustements numériques dans le cas de la solution libre et en présence de la microsphère sont présentées en Figure 7.7 (a). En exploitant ces données, une exaltation d'une facteur 3 sur le nombre de photons collectés et une réduction du volume d'observation d'un facteur 6 ont été déterminées. Les résultats sont résumés en Figure 7.7 (b)-(c) pour les mesures d'autocorrélation et de corrélation croisée sur les brins d'ADN doublement marqués. Soulignons le fait que les fonctions d'autocorrélation et de corrélation croisée présentent la même allure, ce qui suggère que les aberrations chromatiques ont des effets mineurs dans le cas des microsphères de latex.
Les microsphères diélectriques peuvent donc être utilisées en FCCS pour réduire le volume de détection sous la limite de diffraction, permettant ainsi de conduire des expériences dans des gammes de concentration plus élevées et d'augmenter le nombre de photons collectés par émetteur. De la même manière qu'en FCS, l'exaltation du taux de comptage CRM permet également d'améliorer le rapport SNR en FCCS. Des réactions de clivage enzymatique qui requièrent des temps d'intégration courts pourraient être simplement suivies en utilisant des microsphères.

7.2 Vers une miniaturisation des systèmes d'analyse de spectroscopie de corrélation de fluorescence

7.2.1 Détection de molécules individuelles à l'aide de lentilles combinées à des microsphères

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre 2, les techniques de spectroscopie de corrélation de fluorescence sont généralement implémentées sur des montages de microscopie confocale un objectif de forte ouverture numérique qui est assez coûteux. Proposer une alternative simple et bon marché à ces objectifs de forte ouverture numérique permettrait la réalisation de système du type lab-on-a-chip pour l'analyse biomoléculaire. Pour cette raison, nous avons étudié la combinaison d'une microsphère en latex avec une lentille de faible ouverture numérique pour former un système optique de haute performance [131].
Des mesures FCS dans des milieux peu concentrés ont été realisées avec des lentilles de faible ouverture numérique associées à une microsphère. Un corrélogramme type, enregistré avec un doublet Thorlabs AC080-016-A1 (diamètre 8mm, focale 16mm, ouverture numérique 0.25) combiné à une sphère de 3 μm est présenté en Figure 7.9 (a). Les paramètres

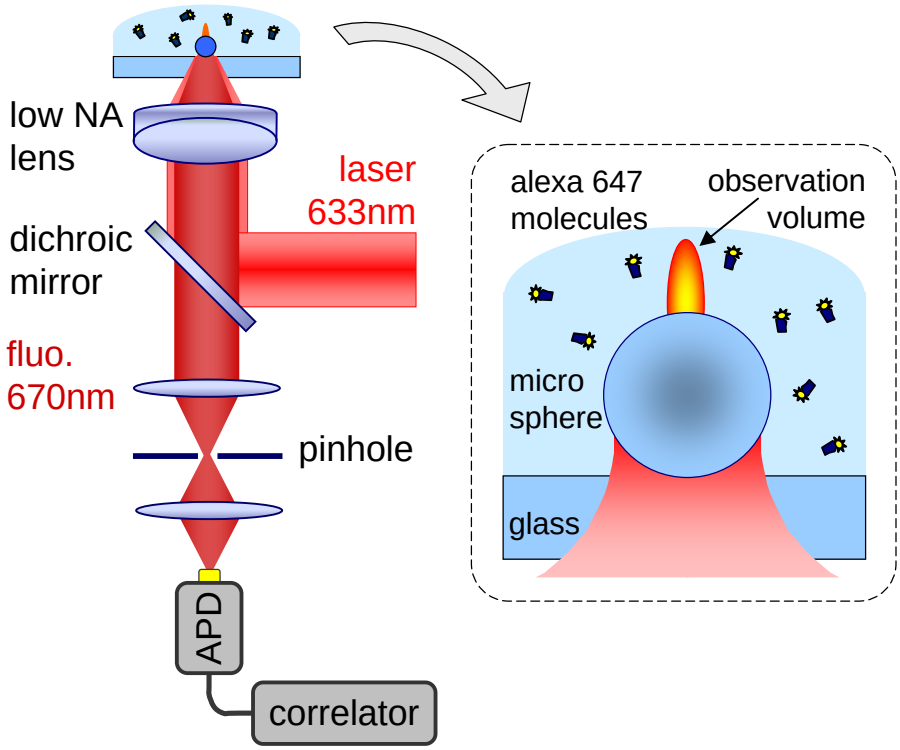
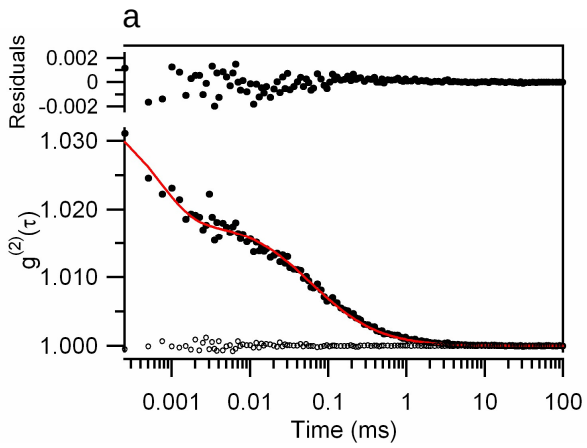


FIGURE 7.8 – *Schéma du dispositif expérimental avec une lentille de faible ouverture numérique combinée à une microsphère de latex [131].*

expérimentaux et l'analyse des données FCS selon l'équation 2.32 sont indiqués et comparés à l'objectif Zeiss d'ouverture numérique 1.2 en Figure 7.9 (b). Précisons que sans la microsphère, aucune mesure FCS ne peut être effectuée avec l'objectif AC080-016-A1 car le signal de fluorescence ne présente pas de corrélations temporelles. Des mesures FCS effectuées avec d'autres lentilles de faible ouverture numérique associées à des microsphères ont montré l'importance de la qualité optique des lentilles et de la correction des aberrations de sphéricité.

Pour compléter les observations expérimentales, des simulations numériques FDTD avec un code commercial (Fullwave) ont permi de décrire l'intéraction entre un faisceau laser Gaussien focalisé et une microsphère. La bille est modélisée par un cylindre diélectrique (indice de réfraction n =1.6, diamètre 2 μm), sur un substrat de verre (n =1.5) dans un milieu aqueux (n =1.33). Le faisceau Gaussien, dont la longueur d'onde dans le vide est de 633 nm, est focalisé par une lentille idéale d'ouverture numérique ON=0.3 qui confère une taille de faisceau limitée par la diffraction à 1.0 μm (Figure 7.10 (a)). Quand une microsphère est placée dans le plan focal de cette lentille, le faisceau incident est davantage focalisé. Ce phénomène est très proche des nanojets photoniques : le faisceau généré en aval de la microsphère possède une dimension transverse sub-longueur d'onde et une faible divergence. Les dimensions transverses et axiales en présence de la microsphère sont res-



b

Objectif	Thor16	Zeiss40x
Référence	AC080-016-A1	C-Apochromat
d_{sphere} (μm)	3	-
N	53.1	12.9
τ_d (μs)	62	62
s	0.15	0.25
n_T	0.9	0.8
τ_T (μs)	1.0	0.7
P_{laser} (mW)	0.2	0.1
CRM (kHz)	1.9	15.8
V_{eff} (fL)	2.0	0.5
C_{min} (nM)	0.4	1.7
C_{max} (μM)	0.8	3.4

Figure 7.9 – *(a) Fonction de corrélation enregistrée avec le doublet Thorlabs AC080-016-A1 combiné à une sphère de latex de 3 μm et résultats des ajustements numériques des données FCS (b) [131].*

pectivement estimées à 390 nm et 1.65 μm. Nous avons donc montré qu'une microsphère en latex peut être combinée à un objectif de faible ouverture numérique pour former un système optique de haute performance. Ceci offre une alternative simple et bon marché comparé aux objectif coûteux utilisés en FCS.

7.2.2 Sonde à fibre optique OFM pour l'analyse moléculaire

Afin de proposer une sonde à fibre optique permettant la détection de molécules individuelles en solution [132], nous avons collaboré avec le groupe de Neso Sojic de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux. Cette sonde optique est composée d'une fibre optique $GeSiO_2$-$FSiO_2$ monomode combinée en sortie avec une microsphère de latex. En jouant le rôle de microlentille placée en sortie de fibre optique, la microsphère permet d'améliorer efficacement l'ouverture numérique effective du dispositif. La gravure de micro-ouvertures en sortie d'un faisceau de fibres optiques s'effectue par attaque chimique. Ces micro-ouvertures, qui correspondent aux coeurs optiques gravés, sont ensuite recouvertes des microsphères diélectriques de 2 μm. Cette procédure permet un alignement et une fixation correcte des sphères en sortie de fibres optiques. Le système fibre optique-microsphère est appelé OFM (Optical-Fiber-Microsphere).

Simulation numérique FDTD

Des simulations numériques FDTD 2D ont été conduites (Fullwave Rsoft Inc.) dans le but de déterminer la distribution électromagnétique en sortie du système OFM (Figure 7.11 (a)). Pour cela, l'espace de calcul a été fixé à 4×8 μm^2, avec une taille de grille de 10×10 nm^2. La microsphère est modélisée par un cylindre diélectrique de 2 μm de dia-

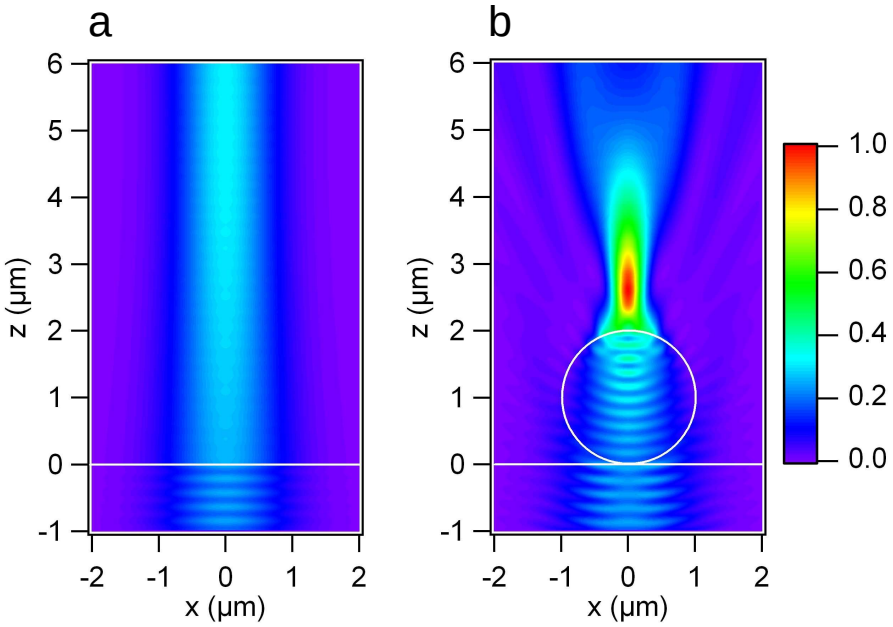


FIGURE 7.10 – *Simulation numérique FDTD de la distribution d'intensité électromagnétique en l'abscence (a) et en présence (b) d'un cylindre de 2 µm éclairé par un faisceau Gaussien à 633 nm avec une ouverture numérique ON =0.3 [131].*

mètre et d'indice de réfraction n =1.59, correspondant à l'indice du latex dans le domaine visible. La fibre optique $GeSiO_2$-$FSiO_2$ a un coeur de 2 μm (d'indice de réfraction 1.49) et un diamètre de gaine de 3.4 μm (d'indice de réfraction 1.43). Le milieu environnant est aqueux (indice de réfraction 1.33).
Le mode fondamental de la fibre optique à une longueur d'onde de 633 nm est envoyé à l'intérieur de la fibre. Lorsque qu'une microsphère est fixée en sortie de fibre, le faisceau émergeant est focalisé et possède une faible divergence, comme nous pouvons le constater en Figure 7.11 (b). Ce faisceau est assez similaire aux nanojets photoniques présentés dans le chapitre 3. En l'absence de microsphère en sortie de fibre, le faisceau émergeant diverge simplement (Figure 7.11 (c)). D'après les résultats de la Figure 7.11 (b), les dimensions FWHM transverse et axiale sont respectivement estimées à 480 nm et 2.7 μm, ce qui sont des valeurs assez proches de celles obtenues avec un objectif de forte ouverture numérique. La focalisation spécifique apportée par la microsphère permet un confinement du champ incident et réciproquement une collection de la lumière plus efficace.

Fabrication de la sonde OFM réalisée à l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux

Le faisceau de fibres est composé de 6000 fibres optiques individuelles organisées sur une surface de 270 μm de diamètre (FIGH-06-300S, Fujikura Ltd). Après polissage des deux

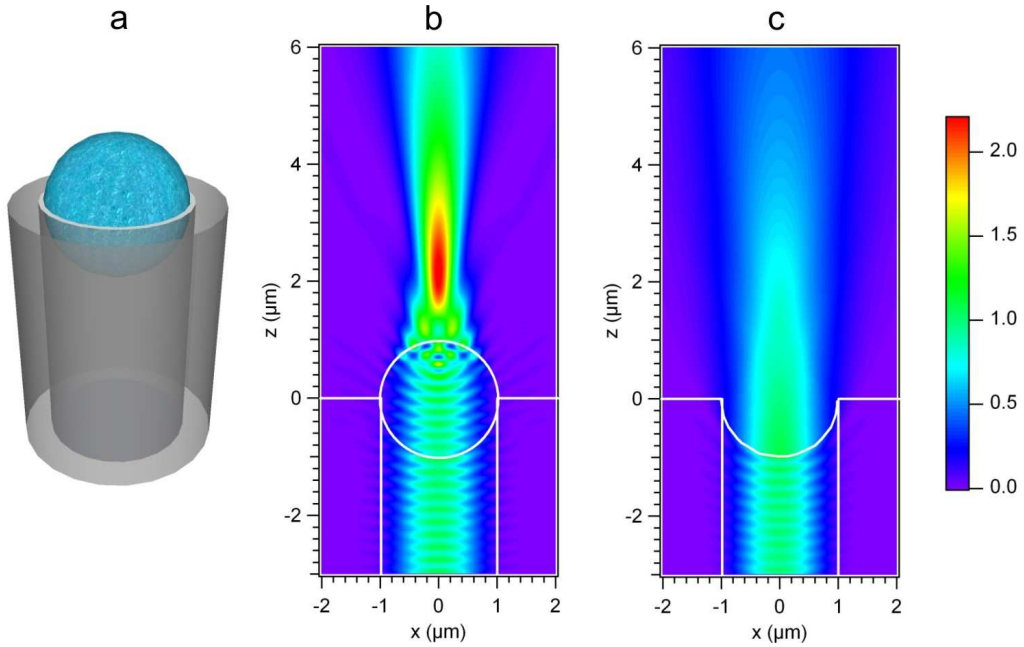


Figure 7.11 – *(a) Configuration expérimentale du système OFM. Simulation numérique FDTD de la distribution d'intensité en présence (b) et en l'abscence d'un cylindre de 2 μm illuminé par le mode fondamental de la fibre optique monomode à 633 nm [132].*

faces du faisceau de fibres , une micro-ouverture à l'extrémité de chaque coeur de fibre est réalisée par attaque chimique de 25 secondes en utilisant une solution d'acide fluoridrique. Le temps de réaction a été adapté de manière à créer des puits permettant la fixation des sphères de latex de 2 μm. Quelques gouttes de solution contenant les microsphères sont alors successivement déposées sur la face attaquée chimiquement. Après séchage du solvant aqueux, les microsphères s'auto-organisent dans les micro-ouvertures, permettant ainsi d'obtenir la sonde OFM (Figure 7.12 (c)). Enfin, de l'eau distillée est utilisée pour évacuer les microsphères non fixées.

Mesures expérimentales et discussion

Les montage expérimental utilisé dans cette section est le même que celui présenté dans le chapitre 2 avec un objectif de microscope d'ouverture numérique 1.2. Cependant, afin de coupler efficacement la lumière dans le système OFM, le diamètre du faisceau laser incident à 633 nm a été réduit pour obtenir une ouverture numérique effective de 0.3. Le micro-positionnement du faisceau de fibres s'effectue avec la platine piezo-électrique et permet l'excitation d'une fibre individuelle. Soulignons que la distance de séparation inter-fibre étant de 4 μm, aucune corrélation croisée des signaux provenant de fibres différentes n'a été détectée.
Pour montrer la capacité du système OFM de permettre des études sur molécules indivi-

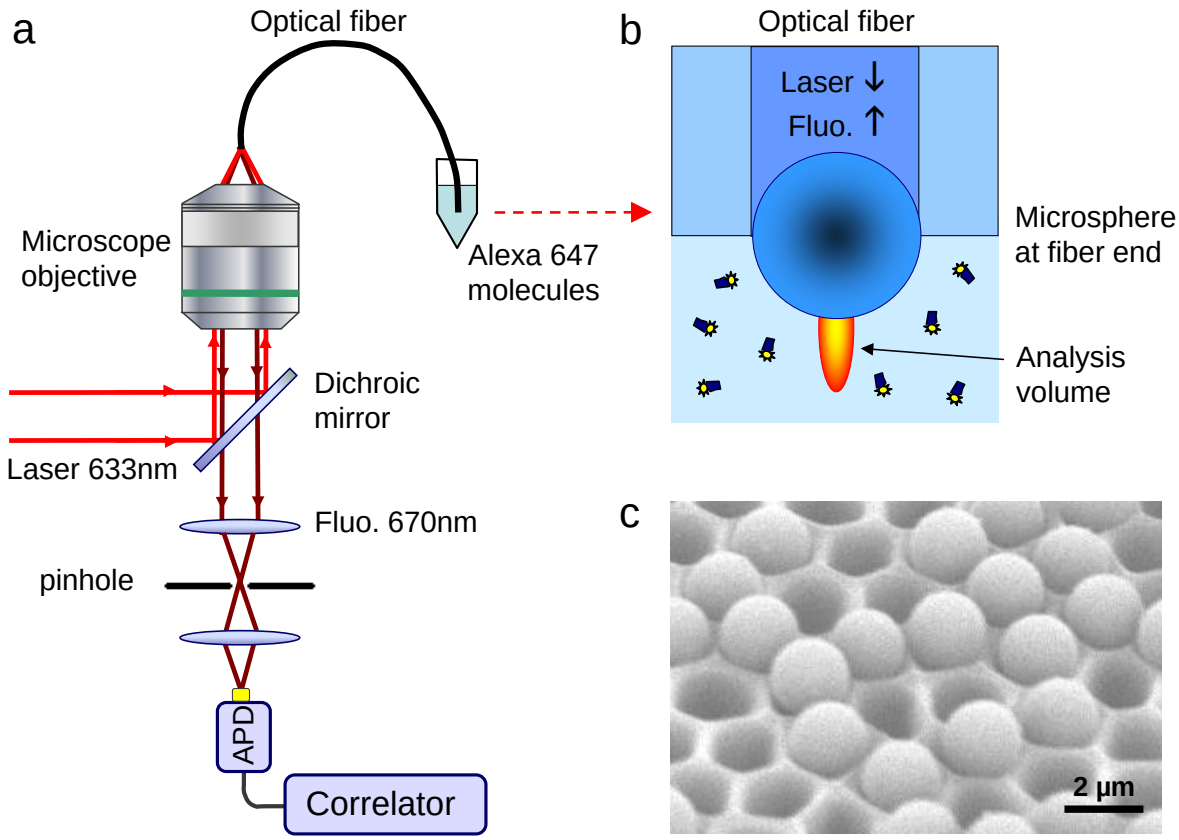


FIGURE 7.12 – *(a) Vue schématique du dispositif expérimental . (b) Vue rapprochée de l'extrémité de la fibre optique combinée à une microsphère. (c) Image de microscopie électronique du faisceau de fibres optiques monomodes partiellement combinées en extémité à une microsphère [132].*

duelles, des expériences FCS ont été conduites en plongeant le faisceau de fibres dans une solution de molécules fluorescentes d'Alexa 647 (Figure 7.12 (b)-(c)). Chaque extrémité de fibre n'étant pas toute associée avec une microsphère (comme nous pouvons le constater en Figure 7.12 (c)), un balayage du faisceau de fibre est nécessaire pour identifier un système OFM (Figure 7.13 (a)). Les zones brillantes en Figure 7.13 (a) correspondent à la présence d'une microsphère en sortie de fibre et pour lesquelles des fonctions d'autocorrélation temporelle de fluorescence sont obtenues (Figure 7.13 (b)), alors que dans les zones sombres qui correspondent à l'absence de microsphère, aucune corrélation temporelle n'est mesurée (Figure 7.13 (c)). D'après ces résultats, la sensibilité de la sonde OFM est suffisament élevée pour détecter des molécules organiques standards diffusant en solution. Pour analyser les données FCS de la Figure 7.13 (b) selon l'équation 2.32, il est important de déterminer précisément le bruit de fond moyen $\bar{B}$. Dans le cas du système OFM, $\bar{B}$ provient essentiellement du signal de luminescence et de diffusion Raman des impuretés ou des dopants dans

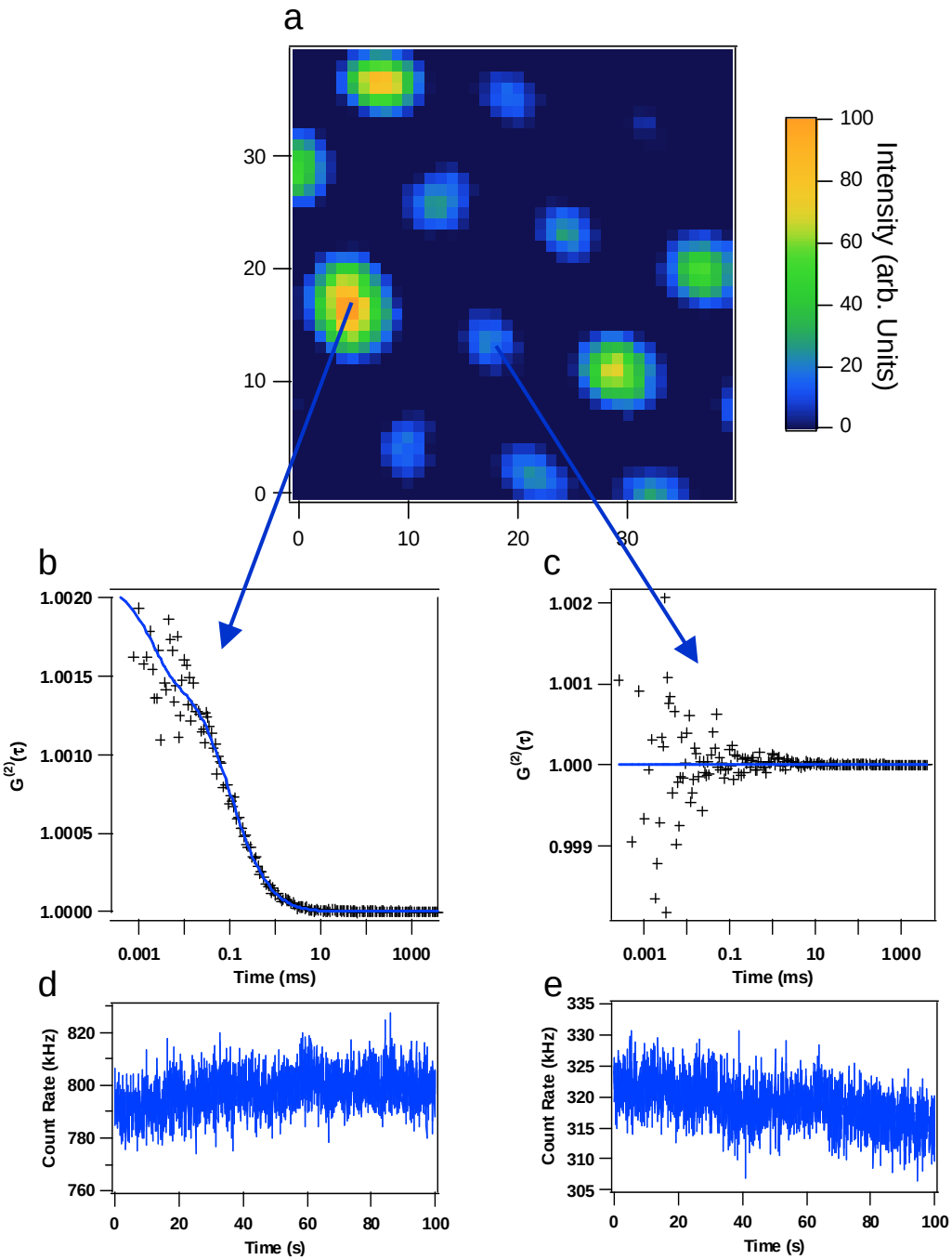


Figure 7.13 – *(a) Image confocale du faisceau de fibres optiques : les zones brillantes correspondent à la présence d'une microsphère à l'extrémité d'une fibre, où des fonctions d'autocorrélation sont obtenues (b). L'analyse numérique selon l'équation 2.32 a conduit à : N =284, τ_D ==123 μs, s =0.2, n_T =0.39, τ_T =2.0 μs, et CRM =1.9 kHz. En l'abscence de microsphère, aucune corrélation temporelle n'est mesurée (c). (d) et (e) correspondent respectivement aux traces du signal de fluorescence de (b) et (c) [132].*

Objective	N	τ_D (μs)	V_{eff} (fL)	CRM (kHz)	P_{laser} (mW)
Zeiss NA 1.2	222	115	0.5	3.5	0.1
OFM system	284	123	0.65	1.9	0.6

TABLE 7.1 – *Résultats des ajustements numériques des données FCS mesurées avec la sonde OFM et avec l'objectif Zeiss d'ouverture numérique 1.2. Le volume d'observation V_{eff} est déduit d'après la mesure du nombre moyen de molécules N et la concentration en émetteur fluorescent.*

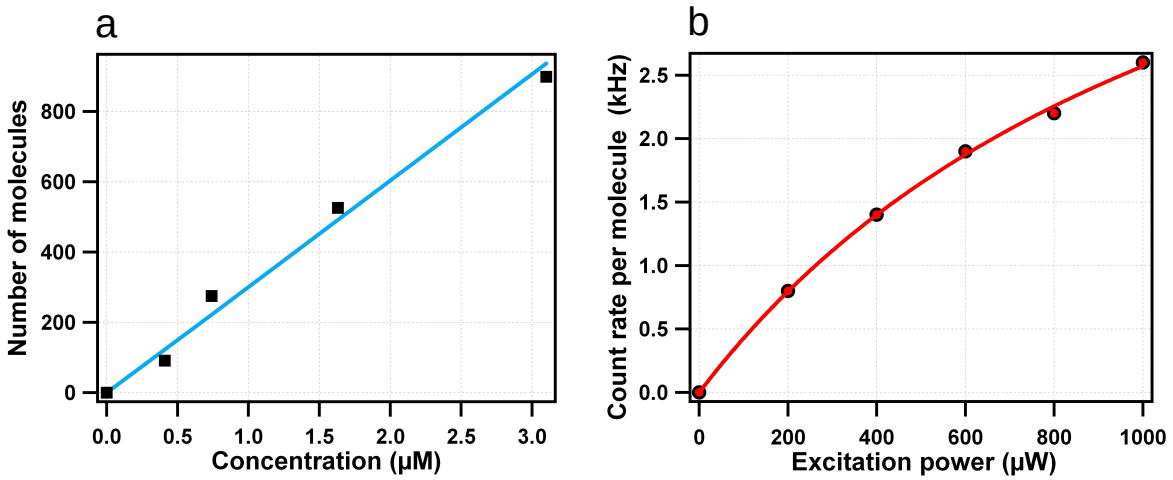


FIGURE 7.14 – *(a) Evolution du nombre de molécules d'Alexa 647 détectées avec la sonde OFM en fonction de la concentration moléculaire calibrée. (b) Taux de comptage par molécule CRM (points) mesuré en fonction de la puissance d'excitation avec la sonde OFM et ajustement numérique (ligne continue) selon l'équation 2.39 [132].*

les fibres optiques. Le bruit moyen $\bar{B}$ a été évalué en mesurant le signal sur les photodiodes à avalanche lorsque le faisceau de fibre est plongée dans une solution d'eau pure. Pour les mesures présentées en Figure 7.13 (b), le niveau de bruit de fond moyen est typiquement de $\bar{B}$ =270 kHz, conduisant à un rapport signal sur bruit SNR de 1.9.
Les résultats expérimentaux mesurés avec la sonde OFM sont résumés en Table 7.1, et comparés aux données FCS obtenues en utilisant l'objectif de microscope d'ouverture numérique 1.2 avec la même solution de molécules d'Alexa 647. Le nombre de molécules moyen détectés est très proche pour chaque système. Ces résultats montrent que le volume d'analyse sondé avec le système OFM est comparable à celui obtenu avec un objectif à immersion de forte ouverture numérique, et sont donc en bon accord avec les simulations numériques FDTD. Malgré un bruit de fond moyen intrinsèque élevé, la sensibilité de la sonde OFM est suffisante pour détecter une fraction de molécules en solution. Pour compléter cette étude, des mesures FCS avec le système OFM pour différentes concentrations calibrées en molécules d'Alexa allant de 0.4 à 3.1 μM ont été effectuées. L'évolution du

nombre moyen de molécules détectées avec la sonde OFM en fonction de la concentration en espèces fluorescentes est présentée en Figure 7.14 (a). Comme attendu pour les mesures FCS, le nombre moyen de molécules détectées suit une loi linéaire en fonction de la concentration moléculaire. A cause du bruit de fond moyen élevé, les études FCS avec la sonde OFM sont limitées à des concentrations moléculaires supérieures à 400 nM.
Des mesures FCS ont également été conduites pour déterminer l'évolution du taux de comptage par molécules CRM en fonction de la puissance d'excitation, incrémentée de 0.2 à 1 mW (Figure 7.14 (b)). Les données expérimentales ont ensuite été ajustées numériquement selon l'équation 2.39 et ont conduit à la détermination de paramètre A =0.05 kHz/μW ($A = \kappa\Phi\sigma$) et I_s =1.26 mW. Ces mesures confirment de nouveau la sensibilité à l'échelle de molécules individuelles de la sonde OFM.

Conclusion sur la sonde OFM

La fixation d'une microsphère diélectrique en sortie de fibre optique permet d'augmenter l'ouverture numérique effective du système et de conduire des mesures FCS à l'échelle de molécules individuelles avec une fibre optique. La limitation principale du système OFM est le bruit intrinsèque généré dans la fibre, qui rend difficiles les mesures FCS pour des concentrations moléculaire inférieures à 400 nM. Utiliser une fibre optique avec un bruit moins élevé et des sondes fluorescentes plus brillantes pourrait permettre de conduire des études FCS au-delà de cette concentration limite.
Cette démonstration, qui a fait l'objet d'un dépot de brevet [133], offre de nouvelles possibilités pour les applications endoscopiques telles que le diagnostic de la maladie d'Alzheimer [134], ou encore les sondes à oxygène [135] et température [136], mais également dans la miniaturisation des dispositifs FCS comme illustré en Figure 7.15. Ce système intégré utilisant la sonde OFM permet des mesures de spectroscopie de corrélation de fluorescence et des mesures de temps de vie de fluorescence. La taille du dispositif expérimental est proche du format papier A3, ce qui en fait le plus petit système FCS jamais réalisé.

7.3 Conclusion

Les nano-antennes optiques étudiées au cours de cette thèse ont été utilisées dans ce chapitre pour améliorer significativement les techniques d'analyses moléculaires dans des solutions fortement concentrées telles que la FCS ou la FCCS. L'exaltation de fluorescence obtenue au voisinage d'une antenne conduit à une forte augmentation du rapport signal sur bruit SNR, permettant ainsi de réduire la durée totale d'acquisition des expériences et suivre des réactions de clivage enzymatique qui requièrent des temps d'intégration courts. Enfin ces nano-antennes peuvent également être utilisées pour la miniaturisation des sytèmes de détection de molécules individuelles en solution comme illustré avec la sonde OFM.

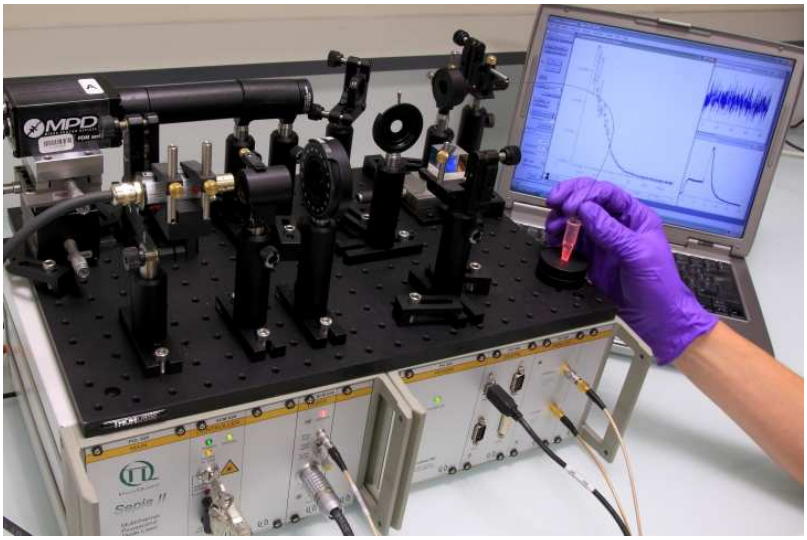


FIGURE 7.15 – *Dispositif expérimental FCS miniaturisé basé sur l'utilisation de la sonde OFM.*

Conclusion et perspectives

L'avénement des nano-antennes optiques est directement lié aux progrès technologiques réalisés dans le domaine de la nano-fabrication au cours des dernières décennies. Les antennes optiques permettent à l'heure actuelle de manipuler, confiner et exalter les champs électromagnétiques dans des volumes sub-longueur d'onde. Les applications de ces nano-objets concernent des domaines de pointe tels que les nano-sources de lumière, les cellules photovoltaïques, la microscopie, la spectroscopie de molécules individuelles ... Comme il a pu être remarqué tout au long de la lecture de ce manuscrit, les propriétés des antennes optiques dépendent essentiellement de leur nature, leurs tailles et leurs géométries. Pour ces raisons, la caractérisation expérimentale des nano-antennes optiques est essentielle car elle permet d'en améliorer le design et d'amplifier leurs réponses optiques.
Ce travail de thèse s'insère dans la problématique actuelle de sondage des propriétés de nano-antennes optiques. Les différentes techniques de caractérisation expérimentale développées au cours de cette thèse consistent à placer des émetteurs quantiques au voisinage d'antennes plasmoniques, et à déterminer les modifications des propriétés d'émission de luminescence. En particulier, la première et principale procédure de caractérisation expérimentale présentée dans le chapitre 2, qui consiste à combiner des études de spectroscopie de corrélation de fluorescence et des mesures de temps de vie de fluorescence, permet de déterminer le poids respectif des gains à l'excitation et à l'émission contribuant à l'exaltation globale de fluorescence moléculaire au voisinage de nano-antennes. Bien que très puissante, cette procédure nécessite des temps d'expérimentation assez importants. C'est pourquoi, deux méthodes alternatives rapides de sondage des exaltations de champs électromagnétiques (présentées dans le chapitre 6) ont également été développées en parallèle. La première d'entre elles consiste à suivre la dynamique temporelle d'états multiexcitoniques de boîtes quantiques semi-conductrices. En accédant aux amplitudes des populations des états excitoniques et biexcitoniques, il est possible de déterminer de manière très précise l'exaltation sur l'intensité locale d'excitation au voisinage d'antennes optiques en seulement quelques secondes. Soulignons également que l'exaltation des amplitudes biexcitoniques à proximité d'une antenne représente une nouvelle forme d'exaltation non-linéaire de l'in-

téraction lumière-matière à l'échelle nanométrique. La seconde méthode, appelée spectroscopie sous saturation de fluorescence, exploite les propriétés intrinsèques de non-linéarité du processus de fluorescence. La modulation du faisceau excitateur à une fréquence fondamentale f dans un régime non-linéaire d'excitation de fluorescence génère des harmoniques aux fréquences élevées dans le signal de fluorescence. En exploitant ces harmoniques, il est possible d'accéder rapidement au gain sur l'intensité d'excitation au voisinage de nano-antennes optiques. Ces deux techniques ouvrent de nouvelles opportunités pour la caractérisation expérimentale rapide de nano-antennes optiques à la fréquence d'excitation.
Le développement de ces techniques de caractérisation expérimentale a permis l'étude de différents types d'antennes optiques. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, les microsphères diélectriques, qui peuvent être vues comme des microlentilles placées dans le champ proche d'émetteur, permettent d'augmenter l'intensité d'excitation et d'améliorer l'efficacité de collection. Ces sphères diélectriques, qui constituent une alternative simple et bon marché face aux structures plasmoniques, permettent de réduire d'un ordre de grandeur sous la limite de diffraction le volume de détection et d'exalter le taux de fluorescence par molécule d'un facteur 7. Afin de réduire encore plus efficacement le volume d'analyse en microscopie confocale et exalter le signal de fluorescence de molécules individuelles, il faut se tourner vers le domaine des nano-antennes plasmoniques. En effet, les nano-ouvertures métalliques présentées dans le chapitre 4 permettent d'atteindre des volumes d'analyse confocale de quelques centaines de zeptolitres (10^{-21}L), soit une réduction de plusieurs centaines de fois du volume confocal limité par diffraction qui est de l'ordre du femtolitre (10^{-15}L), et d'augmenter le taux de fluorescence par émetteur d'un facteur 25. D'autre part, la structuration d'un réseau de corrugations périodiques autour d'une ouverture métallique centrale (chapitre 5) permet de collimater le faisceau de fluorescence dans la direction normale à l'échantillon et d'exalter d'autant plus la fluorescence moléculaire comparé à une simple nano-ouverture. Pour des paramètres de réseau donnés, la directivité du rayonnement étant dépendante de la longueur d'onde d'émission, la fluorescence de molécules spectralement différentes est dirigée dans des directions angulaires distinctes. Ces nano-ouvertures corruguées, qui sont assimilables à des nano-spectromètres à réseau dans le champ proche, sont à l'origine de la première démonstration expérimentale d'un contrôle directionnel de fluorescence multi-émetteurs. Soulignons également que la caractérisation expérimentale de toutes les nano-antennes étudiées au cours de cette thèse a permis d'améliorer le design des structures (nature, taille, géometrie) ce qui a conduit à l'élaboration d'antennes optimisées. Enfin, ces nano-antennes optiques ont été utilisées dans le chapitre 7 pour améliorer très efficacement les techniques de détection de molécules individuelles en solution, et réaliser un dispositif de spectroscopie de corrélation de fluorescence miniaturisé.
En ce qui concerne les perspectives de l'axe nanophotonique de l'équipe MOSAIC, l'étude des propriétés physiques d'autres types d'antennes optiques (dimères de nano-particules, nano-bâtonnets, structures métallo-diélectrique ...) débutera dans les prochains mois en utilisant les techniques de caractérisation de fluorescence développées. Ces nano-antennes optiques pourraient ensuite être exploitées pour la réalisation de nano-circuits plasmoniques dans le but d'étudier des intéractions moléculaires en biologie et de produire de nouveaux

types de biocapteurs. D'autre part, le développement de réseaux de collaborations avec des équipes de chimistes et biologistes est plus que jamais nécessaire pour les applications biophotoniques des nano-antennes optiques étudiées au cours de cette thèse.

Liste des publications auxquelles ont donné lieu ces travaux de thèse

Liste des publications dans des revues internationales à comité de lecture

- H. Aouani, O. Mahboub, E. Devaux, H. Rigneault, T. W. Ebbesen, J. Wenger. *Plasmonic antennas for directional sorting of fluorescence emission.* Nano Letters, vol **11**, pages 2400-2406, 2011.

- R. Hostein, H. Aouani, H. Rigneault, J. Wenger. *Deciphering fluorescence signals by quantifying separately the excitation intensity from the number of emitters.* Optics Letters, vol **36**, pages 3317-3319, 2011.

- H. Aouani, O. Mahboub, E. Devaux, H. Rigneault, T. W. Ebbesen, J. Wenger. *Large molecular fluorescence enhancement by a nanoaperture with plasmonic corrugations.* Optics Express, vol **19**, pages 13056-13062, 2011.

- H. Aouani, O. Mahboub, N. Bonod, E. Devaux, E. Popov, H. Rigneault, T. W. Ebbesen, J. Wenger. *Bright unidirectional fluorescence emission of molecules in a nanoaperture with plasmonic corrugations.* Nano Letters, vol **11**, pages 637-644, 2011.

- H.Aouani, P. Schön, S. Brasselet, H. Rigneault, J. Wenger.*Two-photon fluorescence correlation spectroscopy with high count rates and low background using dielectric microspheres.* Biomedical Optics Express, vol **1**, pages 1075-1083, 2010.

- H. Aouani, S. Itzhakov, D. Gachet, E. Devaux, T. W. Ebbesen, H. Rigneault, D. Oron, J. Wenger. *Colloidal quantum dots as probes of excitation field enhancement in photonic antennas.* ACS Nano, vol **4**, pages 4571-4578, 2010.

- H. Aouani, F. Deiss, J. Wenger, P. Ferrand, N. Sojic, H. Rigneault. *Optical-fiber-microsphere for remote fluorescence correlation spectroscopy.* Optics Express, vol **17**, pages 19085-19092, 2009.

- D. Gérard, A. Devilez, H. Aouani, B. Stout, N. Bonod, J. Wenger, E. Popov, H. Rigneault. *Efficient excitation and collection of single-molecule fluorescence close to a dielectric microsphere.* Journal of the Optical Society of America B, vol **26**, pages 1473-1478, 2009.

- H. Aouani, J. Wenger, D. Gérard, H. Rigneault, E. Devaux, T. W. Ebbesen, F. Mahdavi, T. Xu, S. Blair. *Crucial role of the adhesion layer on the plasmonic fluorescence enhancement.* ACS Nano, vol **3**, pages 2043-2048, 2009.

- J. Wenger,D. Gérard, H. Aouani, H Rigneault, B. Lowder, S. Blair, E. Devaux, T. W. Ebbesen. *Nanoaperture-enhanced signal-to-noise ratio in fluorescence correlation spectroscopy.* Analytical Chemistry, vol. **81**, pages 834-839, 2009.

- J. Wenger, D. Gérard, H. Aouani, H. Rigneault. *Disposable microscope objective lenses for fluorescence correlation spectroscopy using latex microspheres.* Analytical Chemistry, vol **80**, pages 6800-6804, 2008.

Liste des conférences avec actes

- J. Wenger, H. Aouani, D. Gérard, S. Blair, T. W. Ebbesen, H. Rigneault. *Enhanced fluorescence from metal nanoapertures : physical characterizations and biophotonic applications.* Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering, Plasmonics in Biology and Medicine VII, vol **7577**, 2010.

- H. Aouani, N. Djaker N, J. Wenger, H. Rigneault. *High-efficiency single molecule fluorescence detection and correlation spectroscopy with dielectric microspheres.* Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering, Single Molecule Spectroscopy and Imaging III, vol **7571**, 2010.

Dépôt de brevet

- H. Rigneault, J. Wenger, H. Aouani, P. Ferrand, N. Sojic, F. Deiss. Système de spectroscopie à guide d'onde pour l'analyse de particules dans un milieu. Brevet 107045FR, 2009.

Bibliographie

[1] D. Magde, E.L. Elson, W.W. Webb. *Thermodynamic fluctuations in a reacting system. Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy.* Physical Review Letters, vol. *29*, page 705, 1972.

[2] C. Zander, J. Enderlein, R. A. Keller (Eds.). *Single-Molecule Detection in Solution - Methods and Applications.* VCH-Wiley, Berlin/New York, 2002.

[3] K.T. Samiee, M. Foquet, L. Guo, E.C Cox, H.G Craighead. *Lambda-repressor oligomerization kinetics at high concentrations using fluorescence correlation spectroscopy in zero-mode waveguides.* Biophysical Journal, vol **88**, pages 2145-2153, 2005.

[4] J. Wenger, H. Rigneault. *Photonic Methods to Enhance Fluorescence Correlation Spectroscopy and Single Molecule Fluorescence Detection.* International Journal of Molecular Sciences, vol **11**, pages 206-221, 2010.

[5] P.Bharadwaj, B. Deutsch, L. Novotny. *Optical Antennas.* Advances in Optics and Photonics, vol **1**, pages 438-483, 2009.

[6] L. Novotny. *Effective wavelength scaling for optical antennas.* Physical Review Letters, vol **98**, numéro 266802, 2007.

[7] L. Novotny, N. van Hulst. *Antennas for light.* Nature Photonics, vol **5**, pages 83-90, 2011.

[8] A. Kinkhabwala, Z. Yu, S. Fan, Y. Avlasevich, K. Müllen, W. E. Moerner. *Large single-molecule fluorescence enhancements produced by a bowtie nanoantenna.*, Nature Photonics, vol **3**, pages 654-657, 2009.

[9] A. Curto, G. Volpe, T. H. Taminiau, M. Kreuzer, R. Quidant, N.F. van Hulst. *Unidirectional emission of a quantum dot coupled to a nanoantenna.*, vol **329**, pages 930-933, 2010.

[10] P. Anger, P.Bharadwaj, L. Novotny. *Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence.* Physical Review Letters, vol **96**, numéro 113002, 2006.

[11] S. Kühn, U. Håkanson, L. Rogobete, V. Sandoghdar. *Enhancement of single-molecule fluorescence using a gold nanoparticle as an optical nanoantenna.* Physical Review Letters, vol **97**, numéro 017402, 2006.

[12] T. Huser. *Nano-Biophotonics : New tools for chemical nano-analytics.* Current Opinion in Chemical Biology, vol. **12**, pages 497-504, 2008.

[13] H. Blom, L. Kastrup, C. Eggeling. *Fluorescence fluctuation spectroscopy in reduced detection Volumes.* Current Pharmaceutical Biotechnology, vol. **7**, pages 51-66, 2006.

[14] J. T. Mannion, H. G. Craighead. *Nanofluidic structures for single biomolecule fluorescent detection.* Biopolymers , vol. **85**, pages 131-143, 2006.

[15] N.L. Thompson, T.P. Burghardt, D. Axelrod. *Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal-Reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy.* Biophysical Journal, vol. **33**, pages 435-454, 1981.

[16] K. Hassler, M. Leutenegger, P. Rigler, R. Rao, R. Rigler, M. Gösch, T. Lasser. *Total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy (TIR-FCS) with low background and high count-rate per molecule.* Optics Express, vol. **13**, pages 7415-7423, 2005.

[17] J. Borejdo, N. Calander, Z. Gryczynski, I. Gryczynski. *Fluorescence correlation spectroscopy in surface plasmon coupled emission microscope.* Optics Express, vol. **14**, pages 7878-7888, 2006.

[18] P.F. Lenne, E. Etienne, H. Rigneault. *Subwavelength patterns and high detection efficiency in fluorescence correlation spectroscopy using photonic structures.* Applied Physics Letters, vol. **80**, pages 4106-4108, 2002.

[19] H. Rigneault, P.F. Lenne. *Fluorescence correlation spectroscopy on a mirror.* Journal of the Optical Society of America B, vol. **20**, pages 2203-2214, 2003.

[20] E. Etienne, P.F Lenne, J.N. Sturgis, H. Rigneault. *Confined diffusion in tubular structures analyzed by fluorescence correlation spectroscopy on a mirror.* Applied Optics, vol. **45**, pages 4497-4507, 2006.

[21] S. Hell, E.H.K. Stelzer. *Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope.* Journal of the Optical Society of America A, vol. **9**, pages 2159-2166, 1992.

[22] L. Kastrup, H. Blom, C. Eggeling, S.W. Hell. *Fluorescence fluctuation spectroscopy in subdiffraction focal volumes.* Physical Review Letters, vol. **94**, numéro 178104, 2005.

[23] C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V.N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schönle, S.W. Hell. *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell.* Nature, vol. **457**, pages 1159-1162, 2008.

[24] J. Enderlein, T. Ruckstuhl, S. Seeger. *Highly efficient optical detection of surface-generated fluorescence.* Applied Optics, vol. **38**, pages 724-732, 1999.

[25] T. Ruckstuhl, J. Enderlein, S. Jung, S. Seeger. *Forbidden light detection from single molecules.* Analytical Chemistry, vol. **72**, pages 2117-2123, 200.

[26] J. Ries, T. Ruckstuhl, D. Verdes, P. Schwille. *Supercritical angle fluorescence correlation spectroscopy.* Biophysical Journal, vol. **94**, pages 221-229, 2008.

[27] K. Koyama, M. Yoshita, M. Baba, T. Suemoto, H. Akiyama. *High collection efficiency in fluorescence microscopy with a Solid Immersion Lens.* Applied Physics Letters, vol **75**, pages 1667-1669, 1999.

[28] A. Serov, R. Rao, M. Gösch, T. Anhut, D. Martin, R. Brunner, R. Rigler, T. Lasser. *High light field confinement for fluorescent correlation spectroscopy using a solid immersion lens.* Biosensors and Bioelectronics, vol **20**, pages 431-435, 2004.

[29] M. Foquet, J. Korlach, W.R. Zipfel, W.W. Webb, H.G. Craighead. *DNA fragment sizing by single molecule detection in submicrometer-sized closed fluidic channels.* Analytical Chemistry, vol **74**, pages 1415-1422, 2002.

[30] M. Foquet, J. Korlach, W.R. Zipfel, W.W. Webb, H.G Craighead. *Focal volume confinement by submicrometer-sized fluidic channels* Analytical Chemistry, vol **76**, pages 1618-1626, 2004.

[31] D. Yin, E.J. Lunt, A. Barman, A.R Hawkins, H. Schmidt. *Microphotonic control of single molecule fluorescence correlation spectroscopy using planar optofluidics.* Optics Express, vol **15**, pages 7290-7295, 2007.

[32] A. Lewis, H. Taha, A. Strinkovski, A. Menevitch, A. Katchatouriants, R. Dekhter, E. Amman. *Near-field optics : From subwavelength illumination to nanometric shadowing.* Nature Biotechnology, vol **21**, pages 1378-1386, 2003.

[33] D. Vobornik, D.S. Banks, Z. Lu, C. Fradin, R. Taylor, L.J. Johnston. *Fluorescence correlation spectroscopy with sub-diffraction-limited resolution using near-field optical probes.* Applied Physics Letters, vol **93**, numéro 163904, 2008.

[34] E. M. Purcell. *Spontaneous emission probabilities at radio frequencies.* Physical Review, vol **69**, page 681, 1946.

[35] W. L. Barnes. *Fluorescence near interfaces : the role of photonic mode density.* Journal of Modern Optics, vol. **45**, pages 661-699, 1998.

[36] J. R. Lakowicz. *Radiative decay engineering 5 : metal-enhanced fluorescence and plasmon emission.* Analytical Biochemistry, vol **337**, pages 171-194, 2005.

[37] E. Fort and S. Grésillon. *Surface enhanced fluorescence.* Journal of Physics D : Applied Physics, vol **41**, pages 013001, 2008.

[38] J. Wenger, D. Gérard, J. Dintinger, O. Mahboub, N. Bonod, E. Popov, T.W. Ebbesen, H. Rigneault. *Emission and excitation contributions to enhanced single molecule fluorescence by gold nanometric apertures.* Optics Express, vol. **16**, page 3008-3020, 2008.

[39] D.E. Koppel, D. Axelrod, J. Schlessinger, E.L. Elson, W.W. Webb. *Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility.* Biophysical Journal, vol. **16**, pages 1315-1329, 1976.

[40] E.L. Elson, D. Magde *Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory.* Biopolymers, vol. **13**, pages 1-27, 1974.

[41] L. Wawrezinieck. *Confinement moléculaire et organisation de la membrane des cellules vivantes : analyse de la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence*, Thèse de Doctorat, Université Aix-Marseille II, 2006.

[42] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask. *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background : analysis of translational diffusion.* European Biophysics Journal, vol. **22**, pages 169-175, 1993.

[43] D.E. Koppel. *Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy.* Physical Review A, vol. **10**, pages 1938-1945, 1974.

[44] H. Geerts. *Experimental realization and optimalization of a fluorescence correlation spectroscopy apparatus.* Biophysical Chemistry, vol. **7**, pages 255-261, 1983.

[45] H. Qian. *On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy.* Journal of Biochemical and Biophysical Methods, vol. **38**, pages 49-57, 1990.

[46] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, J. Fitter. *Statistical analysis of diffusion coefficient determination by fluorescence correlation spectroscopy.* Journal of Fluorescence, vol. **15**, pages 415-422, 2005.

[47] J. Wenger,D. Gérard, H. Aouani, H Rigneault, B. Lowder, S. Blair, E. Devaux, T. W. Ebbesen. *Nanoaperture-enhanced signal-to-noise ratio in fluorescence correlation spectroscopy.* Analytical Chemistry, vol. **81**, pages 834-839, 2009.

[48] J.R Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy.* Third Edition, Springer, USA, 2006.

[49] J. Widengren, R. Rigler, and U. Mets, *Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy.* Journal of Fluorescence, vol **4**, pages 255-258, 1994.

[50] J. Widengren, U. Mets, and R. Rigler, *Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution : a theoretical and experimental study.* Journal of Physical Chemistry, vol **99**, pages 13368-13379, 1995.

[51] Z. Chen, A. Taflove, V. Backman. *Photonic nanojet enhancement of backscattering of light by nanoparticles : a potential novel visible-light ultramicroscopy technique.* Optics Express, vol. **12**, pages 1214-1220, 2004.

[52] X. Li, Z. Chen, A. Taflove, V. Backman. *Optical analysis of nanoparticles via enhanced backscattering facilitated by 3-D photonic nanojets.* Optics Express, vol. **13**, pages 526-533, 2005.

[53] S. Lecler, S. Haacke, N. Lecong, O. Crégut, J.-L. Rehspringer, C. Hirlimann. *Photonic jet driven non-linear optics : example of two-photon fluorescence enhancement by dielectric microspheres.* Optics Express, vol **15**, pages 4935-4942, 2007.

[54] A. V. Itagi, W. A. Challener. *Optics of photonic nanojets.* Journal of the Optical Society of America B, vol **22**, pages 2847-2858, 2005.

[55] S.-C. Kong, A. Sahakian, A. Taflove, V. Backman. *Photonic nanojet-enabled optical data storage.* Optics Express, vol **16**, pages 13713-13719, 2008.

[56] K. Piglmayer, R. Denk, D. Bäuerle. *Laser-induced surface patterning by means of microspheres.* Applied Physics Letters, vol **80**, pages 4693-4695, 2002.

[57] E. McLeod, C. B. Arnold. *Subwavelength direct-write nanopatterning using optically trapped microspheres.* Nature Nanotechnology, vol **3**, pages 413-417, 2008.

[58] A. Pereira, D. Grojo, M. Chaker, P. Delaporte, D. Guay, M. Sentis. *Laser-fabricated porous alumina membranes for the preparation of metal nanodot arrays.* Small, vol **4**, pages 572-576, 2008.

[59] K. J. Yi, H. Wang, Y. F. Lu, Z. Y. Yang. *Enhanced Raman scattering by self-assembled silica spherical microparticles.* Journal of Applied Physics, vol **101**, numéro 063528, 2007.

[60] J. Kasim, Y. Ting, Y. Y. Meng, L. J. Ping, A. See, L. L. Jong, S. Z. Xiang. *Near-field Raman imaging using optically trapped dielectric microsphere.* Optics Express, vol **16**, pages 7976-7984, 2008.

[61] M. Mosbacher, H.-J. Münzer, J. Zimmermann, J. Solis, J. Boneberg, P. Leiderer. *Optical field enhancement effects in laser-assisted particle removal.* Applied Physics A : Materials Science & Processing, vol **72**, pages 41-44, 2001.

[62] B. S. Luk'yanchuk, N. Arnold, S. M. Huang, Z. B. Wang, and M. H. Hong. *Three-dimensional effects in dry laser cleaning.* Applied Physics A : Materials Science & Processing, vol **77**, pages 209-215, 2003.

[63] P. Ferrand, J. Wenger, A. Devilez, M. Pianta, B. Stout, N. Bonod, E. Popov, H. Rigneault. *Direct imaging of photonic nanojets.*, Optics Express, vol **16**, pages 6930-6940, 2008.

[64] A. Devilez, N. Bonod, B. Stout, D. Géerard, J. Wenger, H.Rigneault, E. Popov. *Three-dimensional subwavelength confinement of photonic nanojets.* Optics Express, vol **17**, pages 2089-2094, 2009.

[65] B. Stout, M. Neviere, E. Popov. *Light diffraction by three-dimensional object : differential theory.* Journal of the Optical Society of America A, vol **22**, pages 2385-2404, 2005.

[66] A. Gennerich, D. Schild *Fluorescence Correlation Spectroscopy in Small Cytosolic Compartments Depends Critically on the Diffusion Model used.* Biophysical Journal, vol **79**, pages 3294-3306, 2000.

[67] D. Gérard, J. Wenger, A. Devilez, D. Gachet, B. Stout, N. Bonod, E. Popov, H. Rigneault. *Strong electromagnetic confinement near dielectric microspheres to enhance single-molecule fluorescence.* Optics Express, vol **16**, pages 15297-15303, 2008.

[68] D. Gérard, A. Devilez, H. Aouani, B. Stout, N. Bonod, J. Wenger, E. Popov, H. Rigneault. *Efficient excitation and collection of single-molecule fluorescence close to a dielectric microsphere.* Journal of the Optical Society of America B, vol **26**, pages 1473-1478, 2009.

[69] E. Fort, S. Grésillon. *Surface enhanced fluorescence.* Journal of Physics D-Applied Physics, vol **41**, numéro 013001, 2008.

[70] W.W. Webb. *Fluorescence correlation spectroscopy : inception, biophysical experimentations, and prospectus.* Applied Optics, vol **40**, pages 3969-3983, 2001.

[71] H. Aouani, N. Djaker N, J. Wenger, H. Rigneault. *High-efficiency single molecule fluorescence detection and correlation spectroscopy with dielectric microspheres.* Single Molecule Spectroscopy and Imaging III, SPIE Photonics West, vol **7571**, 2010.

[72] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.* Science, vol **248**, pages 73-76, 1990.

[73] K. M. Berland, P. T. C. So, E. Gratton. *Two-Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy : Method and Application to the Intracellular Environment.* Biophysical Journal, vol **68**, pages 694-701, 1995.

[74] L. Brand, C. Eggeling, C. Zander, K. H. Drexhage, C. A. M. Seidel. *Single-Molecule Identification of Coumarin-120 by Time-Resolved Fluorescence Detection : Comparison of One- and Two-Photon Excitation in Solution.* The Journal of Physical Chemistry A, vol **101**, pages 4313-4321, 1997.

[75] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, W.W.Webb. *Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation.* Biophysical Journal, vol **77**, pages 2251-2265, 1999.

[76] K. G. Heinze, A. Koltermann, P. Schwille. *Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dualcolor fluorescence crosscorrelation analysis.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol **97**, pages 10377-10382, 2000.

[77] S. A. Kim, K. G. Heinze, K. Bacia, M. N. Waxham, and P. Schwille. *Two-Photon Cross-Correlation Analysis of Intracellular Reactions with Variable Stoichiometry.* Biophysical Journal, vol **88**, pages 4319-4336, 2005.

[78] E. J. Sanchez, L. Novotny, X. S. Xie. *Near-field fluorescence microscopy based on two-photon excitation with metal tips.* Physycal Review Letters, vol **82**, pages 4014-4017, 1999.

[79] C. Lin, K. Chiu, C. Chang, S. Chang, T. Guo, S. Chen. *Surface plasmon-enhanced and quenched two-photon excited fluorescence.* Optics Express, vol **18**, pages 12807-12817, 2010.

[80] H.Aouani, P. Schön, S. Brasselet, H. Rigneault, J. Wenger.*Two-photon fluorescence correlation spectroscopy with high count rates and low background using dielectric microspheres.* Biomedical Optics Express, vol **1**, pages 1075-1083, 2010.

[81] P. J. Schuck, D. P. Fromm, A. Sundaramurthy, G. S. Kino, W. E. Moerner *Improving the mismatch between light and nanoscale objects with gold bowtie nanoantennas.* Physical Review Letters, vol **94**, numéro 017402, 2005.

[82] T. W. Ebbesen, H. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, P. A. Wolff. *Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays.* Nature, vol **391**, pages 667-669, 1998.

[83] H. A. Bethe. *Theory of diffraction by small holes.* Physical Review, vol **66**, pages 163-182, 1944.

[84] C. Genet, T. W. Ebbesen. *Light in tiny holes.* Nature, vol **445**, pages 39-46, 2007.

[85] C. Obermüller, K. Karrai. *Far-field characterization of diffracting apertures.* Applied Physics Letters, vol **67**, pages 3408-3410, 1995.

[86] A. Degiron, H. J. Lezec, N. Yamamoto, T. W. Ebbesen. *Optical transmission properties of a single subwavelength aperture in a real metal.* Optics Communications, vol **239**, pages 61-66, 2004.

[87] E. Popov, N. Bonod, M. Neviere, H. Rigneault, P. F. Lenne, P. Chaumet. *Surface plasmon excitation on a single subwavelength hole in a metallic sheet.* Applied Optics, vol **44**, pages 2332-2337, 2005.

[88] F. J. Garcia-Vidal, E. Moreno, J.A Porto, L. Martin-Moreno. *Transmission of light through a single rectangular hole.* Physical Review Letters, vol **95**, numéro 103901, 2005.

[89] F. J. Garcia-Vidal, L. Martin-Moreno, T. W. Ebbesen, L. and Kuipers. *Light passing through subwavelength apertures.* Reviews of Modern Physics, vol **82**, pages 729-787, 2010.

[90] M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb. *Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations.* Science, vol **299**, pages 682-686, 2003.

[91] H. Rigneault, J. Capoulade, J. Dintinger, J. Wenger, N. Bonod, E. Popov, T. W. Ebbesen, P. F. Lenne. *Enhancement of single-molecule fluorescence detection in subwavelength apertures.* Physical Review Letters, vol **95**, numéro 117401, 2005.

[92] J. Wenger, P. F. Lenne, E. Popov, H. Rigneault, J. Dintinger, T. W. Ebbesen. *Single molecule fluorescence in rectangular nano-apertures.* Optics Express, vol **13**, pages 7035-7044, 2005.

[93] J. Wenger, D. Gérard, J. Dintinger, O. Mahboub, N. Bonod, E. Popov, T. W. Ebbesen, H. Rigneault. *Emission and excitation contributions to enhanced single molecule fluorescence by gold nanometric apertures.* Optics Express, vol **16**, pages 3008-3020, 2008.

[94] D. Gérard, J. Wenger, N. Bonod, E. Popov, H. Rigneault, F. Mahdavi, S. Blair, J. Dintinger, T. W. Ebbesen. *Nanoaperture-enhanced fluorescence : Towards higher detection rates with plasmonic metals.* Physical Review B, vol **77**, numéro 045413, 2008.

[95] N. Bonod, E. Popov, M. Neviere. *Differential theory of diffraction by finite cylindrical objects.* Journal of the Optical Society of America A, vol **22**, pages 481-490, 2005.

[96] F. I. Baida, A. Belkhir, D. Van Labeke, O. Lamrous. *Subwavelength metallic coaxial waveguides in the optical range : Role of the plasmonic modes.* Physical Review B, vol **74**, numéro 205419, 2006.

[97] H. Rigneault, J.-M. Lourtioz, C. Delalande, A. J. Levenson. *Nanophotonics.* ISTE, London, 2006.

[98] J. Wenger, H. Aouani, D. Gérard, S. Blair, T. W. Ebbesen, H. Rigneault. *Enhanced fluorescence from metal nanoapertures : physical characterizations and biophotonic applications.* Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering, Plasmonics in Biology and Medicine VII, vol **7577**, 2010.

[99] H. Neff, W. Zong, A. M. N. Lima, M. Borre, G. Holzhuter. *Optical properties and instrumental performance of thin gold films near the surface plasmon resonance.* Thin Solid Films, vol **496**, pages 688-697, 2006.

[100] B. A. Sexton, B. N. Feltis, T. J. Davis. *Characterisation of gold surface plasmon resonance sensor substrates.* Sensors and Actuators A : Physical, vol **141**, pages 471-475, 2008.

[101] D. Barchiesi, D. Macias, L. Belmar-Letellier, D. van Labeke, M. Lamy de la Chapelle, T. Toury, E. Kremer, L. Moreau, T. Grosges. *Plasmonics : influence of the intermediate (or stick) layer on the efficiency of sensors.* Applied Physics B, vol **93**, numéro 177181, 2008.

[102] X. Jiao, J. Goeckeritz, S. Blair, M. Oldham. *Localization of near-field resonances in bowtie antennae : influence of adhesion layers.* Plasmonics, vol **4**, pages 37-50, 2009.

[103] H. Aouani, J. Wenger, D. Gérard, H. Rigneault, E. Devaux, T. W. Ebbesen, F. Mahdavi, T. Xu, S. Blair. *Crucial role of the adhesion layer on the plasmonic fluorescence enhancement.* ACS Nano, vol **3**, pages 2043-2048, 2009.

[104] X. Jiao, J. Goeckeritz, S. Blair, M. Oldham. *Localization of near-field resonances in bowtie antennae : Influence of adhesion layers.* Plasmonics, vol **4**, pages 37-50, 2009.

[105] H. J. Lezec, A. Degiron, E. Devaux, R. A. Linke, L. Martin-Moreno, F. J. Garcia-Vidal, T. W. Ebbesen. *Beaming light from a sub-wavelength aperture.* Science, vol **297**, pages 820-822, 2002.

[106] A. Degiron, T. W. Ebbesen. *Analysis of the transmission process through single apertures surrounded by periodic corrugations.* Optics Express, vol **12**, pages 3694-3700, 2004.

[107] L. Martin-Moreno, F. J. Garcia-Vidal, H. J. Lezec, A. Degiron, T.W. Ebbesen. *Theory of highly directional emission from a single subwavelength aperture surrounded by surface corrugations.* Physical Review Letters, vol **90**, numéro 167401, 2003.

[108] L. Chen, J. T. Robinson, M. Lipson. *Role of radiation and surface plasmon polaritons in the optical interactions between a nano-slit and a nano-groove on a metal surface.* Optics Express, vol **14**, pages 12629-12636 , 2006.

[109] J. M. Tranquilla, J. P. Carr, H. M. Al-Rizzo. *Analysis of a choke ring groundplane for multipath control in global positioning system (GPS) applications.* IEEE Transactions on antennas and propagation, vol **42**, pages 905-911, 1994.

[110] E. Laux, C. Genet, T. Skauli, T. W. Ebbesen. *Plasmonic photon sorters for spectral and polarimetric imaging.* Nature Photonics, vol **2**, pages 161-164, 2008.

[111] A. Nahata, R.A Linke, T. Ishi, K. Ohashi.*Enhanced nonlinear optical conversion from a periodically nanostructured metal film.* Optics Letters, vol **28**, pages 423-425, 2003.

[112] T. Ishi, J. Fujikata, K. Makita, T. Baba, K. Ohashi. *Si nano-photodiode with a surface plasmon antenna.* Japanese Journal of Applied Physics, vol **44**, pages L364-L366, 2005.

[113] H. Aouani, O. Mahboub, E. Devaux, H. Rigneault, T. W. Ebbesen, J. Wenger. *Large molecular fluorescence enhancement by a nanoaperture with plasmonic corrugations.* Optics Express, vol **xxx**, pages xxx, 2011.

[114] H. Aouani, O. Mahboub, N. Bonod, E. Devaux, E. Popov, H. Rigneault, T. W. Ebbesen, J. Wenger. *Bright unidirectional fluorescence emission of molecules in a nanoaperture with plasmonic corrugations.* Nano Letters, vol **11**, pages 637-644, 2011.

[115] H. Aouani, O. Mahboub, E. Devaux, H. Rigneault, T. W. Ebbesen, J. Wenger. *Plasmonic antennas for directional sorting of fluorescence emission.* soumis à Nano Letters, 2011.

[116] J. M. Moran-Mirabal, H. G. Craighead. *Zero-mode waveguides : Sub-wavelength nanostructures for single molecule studies at high concentrations.* Methods, vol **46**, pages 11-17, 2008.

[117] B. McNally, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, Z. Weng, A. Meller. *Optical recognition of converted DNA nucleotides for single-molecule DNA sequencing using nanopore arrays.* Nano Letters, vol **10**, pages 2237-2244, 2010.

[118] H. Aouani, S. Itzhakov, D. Gachet, E. Devaux, T. W. Ebbesen, H. Rigneault, D. Oron, J. Wenger. *Colloidal quantum dots as probes of excitation field enhancement in photonic antennas.* ACS Nano, vol **4**, pages 4571-4578, 2010.

[119] A. P. Alivisatos. *Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots.* Science, vol **271**, pages 933-937, 1996.

[120] V. I. Klimov. *Spectral and dynamical properties of multilexcitons in semiconductor nanocrystals.* Annual Review of Physical Chemistry, vol **58**, pages 635-673, 2007.

[121] B. Fisher, J. M. Caruge, Y. T. Chan, J. Halpert, M. G. Bawendi. *Multiexciton fluorescence from semiconductor nanocrystals.* Chemical Physics, vol **318**, pages 71-81, 2005.

[122] N. R. Ben-Haim, D. Oron. *Optical sectioning by multiexcitonic ladder climbing in colloidal quantum dots.* Optics Letters, vol **33**, pages 2089-2091, 2008.

[123] G. Nair, M. G. Bawendi. *Carrier multiplication yields of CdSe and CdTe nanocrystals by transient photoluminescence spectroscopy.* Physical Review B, vol **76**, numéro 081304, 2007.

[124] B.R. Fisher, H. J. Eisler, N. E. Stott, M. G. Bawendi. *Emission intensity dependence and single-exponential behavior in single colloidal quantum dot fluorescence lifetimes.* Journal of Physical Chemistry B, vol **108**, pages 143-148, 2004.

[125] K. Fujita, M. Kobayashi, S. Kawano, M. Yamanaka, S. Kawata. *High-resolution confocal microscopy by saturated excitation of fluorescence.* Physical Review Letters, vol **99**, numéro 228105, 2007.

[126] G.C. Cianci, J.R. Wu, K.M. Berland. *Saturation modified point spread functions in two-photon microscopy.* Microscopy Research and Technique, vol **64**, pages 135-141, 2004.

[127] J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R. Dalal, A. deWinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach, S. Turner. *Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules.* Science, vol **323**, pages 133-138, 2009.

[128] A. Pingoud, M. Fuxreiter, V. Pingoud, W. Wende. *Type II restriction endonucleases : structure and mechanism.* Cellular and Molecular Life Sciences, vol **62**, pages 685-707, 2005.

[129] R. Yoshimori, D. Roulland-Dussoix, H.W. Boyer. *R factor-controlled restriction and modification of deoxyribonucleic acid : restriction mutants.* Journal of Bacteriology, vol **112**, pages 1275-1279, 1972.

[130] P.J. Willems, H.C. Seo, P. Coucke, R. Tonlorenzi, J.S. O'Brien. *Spectrum of mutations in fucosidosis.* European Journal of Human Genetics, vol **7**, pages 60-67, 1999.

[131] J. Wenger, D. Gérard, H. Aouani, H. Rigneault. *Disposable microscope objective lenses for fluorescence correlation spectroscopy using latex microspheres.* Analytical Chemistry, vol **80**, pages 6800-6804, 2008.

[132] H. Aouani, F. Deiss, J. Wenger, P. Ferrand, N. Sojic, H. Rigneault. *Optical-fiber-microsphere for remote fluorescence correlation spectroscopy.* Optics Express, vol **17**, pages 19085-19092, 2009.

[133] H. Rigneault, J. Wenger, H. Aouani, P. Ferrand, N. Sojic, F. Deiss. Système de spectroscopie à guide d'onde pour l'analyse de particules dans un milieu. Brevet 107045FR, 2009.

[134] M. Pitschke, R. Prior, M. Haupt, D. Riesner. *Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy.* Nature Medicine, vol **4**, pages 832-834, 1998.

[135] N. Opitz, P.J. Rothwell, B. Oeke, P.S. Schwille.*Single molecule FCS-based oxygen sensor (O-2-FCSensor) : a new intrinsically calibrated oxygen sensor utilizing fluorescence correlation spectroscopy (FCS) with single fluorescent molecule detection sensitivity.* Sensors and Actuators B, vol **96**, pages 460-467, 2003.

[136] F.H.C Wong, D.S Banks, A. Abu-Arish, C. Fradin. *A molecular thermometer based on fluorescent protein blinking.* Journal of the American Chemical Society, vol **129**, pages 10302-10303, 2007.

Résumé

Les nano-antennes optiques permettent la manipulation, le confinement et l'exaltation des champs électromagnétiques dans des volumes sub-longueur d'onde. Les applications de ces nano-objets concernent des domaines variés tels que les nano-sources de lumière, la photovoltaïque, la microscopie, la spectroscopie ... Les propriétés physiques de ces nano-antennes dépendant essentiellement de leur nature, leurs tailles et leurs géométries, la caractérisation expérimentale de ces nano-objets est essentielle car elle permet d'en améliorer fortement le désign et d'amplifier les réponses électromagnétiques.
La problématique de ce travail de thèse concerne la caractérisation et l'exploitation des propriétés de nano-antennes optiques. Différentes techniques de caractérisation expérimentale de nano-antennes ont été développées au cours de cette thèse : spectroscopie de corrélation de fluorescence, suivi de dynamique temporelle de boîtes quantiques, spectroscopie sous saturation de fluorescence. Ces techniques ont été appliqués pour étudier différents types d'antennes optiques : microsphères diélectriques, nano-ouvertures simples et nano-ouvertures corruguées. Réciproquement, ces nano-antennes optiques ont été utilisées pour améliorer efficacement la détection de molécules fluorescentes en solution, avec des exaltations de fluorescence moléculaire supérieures à un facteur 100 et un contrôle de la directivité d'émission de fluorescence, ouvrant ainsi de nouvelles opportunités en biophotonique.

Mots clefs : nano-antennes optiques, plasmonique, biophotonique, fluorescence, spectroscopie de corrélation de fluorescence FCS, exaltation et directivité de fluorescence, boîtes quantiques

---

Abstract

Optical nanoantennas allow manipulation, confinement and enhancement of light in sub-wavelength volumes. The applications of these nano-objects are related to various fields such as nano-light sources, photovoltaic, microscopy, spectroscopy ... The physical properties of these nanoantennas depending mainly on their nature, sizes and geometries, the experimental characterization of these nano-objects is essential because it allows to improve significantly their design and amplify the electromagnetic responses.
The focus of this work concerns the characterization and exploitation properties of optical nanoantennas. Several experimental characterization techniques of nanoantennas have been developed during this thesis : fluorescence correlation spectroscopy FCS, temporal dynamics monitoring of quantum dots, spectroscopy by saturated excitation of fluorescence. These techniques were applied to study different types of optical antennas : dielectric microspheres, bare nanoapertures and corrugated nanoapertures. These optical antennas have been used to effectively improve the detection of fluorescent molecules in solution, with fluorescence enhancement greater than a factor of 100, together with a directivity control of the fluorescence emission, opening new opportunities in biophotonics.

Keywords : optical nanoantennas, plasmonics, biophotonics, fluorescence, fluorescence correlation spectroscopy FCS, enhancement and directivity of fluorescence, quantum dots