



HAL
open science

Microscopie optique appliquée à la micro-manipulation par pinces magnétiques à haute résolution et à la visualisation de nano-objets métalliques

Etienne Cavatore

► To cite this version:

Etienne Cavatore. Microscopie optique appliquée à la micro-manipulation par pinces magnétiques à haute résolution et à la visualisation de nano-objets métalliques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT: . tel-00627431

HAL Id: tel-00627431

<https://theses.hal.science/tel-00627431>

Submitted on 28 Sep 2011

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

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

Thèse de doctorat de l' UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
Ecole doctorale 389 "La Physique de la particule à la matière condensée"

Spécialité : PHYSIQUE

Laboratoire de Physique Statistique

Département de Physique - Ecole Normale Supérieure



THÈSE

présentée par

Etienne CAVATORE

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Microscopie optique appliquée à la micro-manipulation par pinces magnétiques à haute résolution et à la visualisation de nano-objets métalliques individuels

À soutenir publiquement le 23 septembre 2011 devant le jury composé de:

Pr.	Brahim	Lounis	Rapporteur
Dr.	Erwin J.G.	Peterman	Rapporteur
Dr.	Vincent	Croquette	Examineur
Pr.	Ludovic	Jullien	Examineur
Dr.	Terence	Strick	Examineur

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier les deux rapporteurs de cette thèse, Brahim Lounis et Erwin J. Peterman, qui ont accepté de lire avec attention et de discuter ce manuscrit pendant une période estivale. Merci pour cet investissement. Je tiens aussi à remercier les autres chercheurs, Ludovic Jullien et Terence Strick, qui ont participé à l'évaluation de ce travail en thèse, en tant que membres du jury.

Ce manuscrit de thèse est le résultat d'un parcours jalonné d'aventures scientifiques multiples, initiées dans l'équipe de Physique des Biomolécules du laboratoire de Physique Statistique (ENS Paris). Il est le fruit d'un travail collectif et j'aimerais remercier ici tous les participants à ce sport d'équipe. Sans l'accompagnement de mon directeur de thèse, Vincent Croquette, il m'aurait été impossible de trouver des issues réalistes aux nombreux casse-têtes d'apprentis-expérimentateur. Une science bricoleuse est définitivement sérieuse, elle ne cède pas à la facilité expérimentale mais propose une mise en oeuvre créative et astucieuse des principes théoriques. Je remercie donc mon directeur de thèse pour son enseignement patient malgré mes neurones récalcitrants. J'ai énormément appris à son contact, grâce à l'étendue de son savoir, son approche intuitive des problèmes physiques, ainsi que son grand talent expérimental. Je remercie aussi Maxime Dahan, mon co-directeur de thèse, qui a permis d'envisager cette thèse en tant que porteur du projet initial.

Je tiens aussi à remercier les autres membres de l'équipe. L'ambiance chaleureuse qui règne dans cette équipe est très appréciable, le quotidien pouvant être toujours bousculé par une parenthèse culinaire ou une visite impromptue. Merci à David Bensimon, le deuxième capitaine de l'équipe, dont le positivisme et l'enthousiasme s'associent naturellement à un foisonnement d'idées. J'adresse un remerciement particulier à Jean-François Allemand pour sa bonne humeur permanente, pour son attention dans les moments difficiles, et surtout pour ses audaces culinaires et gustatives. Merci à Nicolas Desprat qui incarne pleinement l'esprit scientifique par sa curiosité infatigable.

Pour les jeunes pousses de l'équipe en D16, il s'agit de jeunes et brillants étudiants en thèse: Timothée Lionnet, Elise Praly, Franscesco Mosconi, Adrien Meglio, Thomas Julou, Fangyuan Ding. Merci à Timothée, qui m'a transmis le virus de la pince magnétique et présenté au tout Paris-Paris, merci à Elise pour une touche féminine indispensable, merci à Franscesco pour sa radio indépendante qui crie pour une nouvelle Italie, merci à Adrien pour les dégustations au club d'Oeno, ses airs d'Opéra en salle obscure, et pour avoir accepté l'écoute matinale de l'air du "Parrain" chanté par Dalida, merci à Thomas, le biologiste "le plus physicien" du groupe, pour ses recettes sucrées et gourmandes, merci à Fangyuan pour son pragmatisme oriental. J'adresse aussi un merci aux post-docs rencontrés au sein du groupe pour des discussions enrichissantes et des bons tuyaux: Keir C. Neuman, un inconditionnel de la France, Giuseppe Lia, un "italiano vero" et Maria Manosas.

Je souhaite également remercier mes collaborateurs chimistes, adeptes de la rapine et de la prise en otage de quelques éléments d'optique: Thomas Le Saux, Kais Zrelli, et les autres thésards, rencontrés au sein de l'équipe de Chimie Biophysique, dirigée par Ludovic Jullien: Pierre Neveu, André Estevez-Torres, Thomas Barilero. Ils ont participé à la bonne ambiance du groupe, naturellement étendu.

En plus des membres de cette équipe, je souhaite remercier les différentes personnes qui ont contribué à cette thèse: Eric Perez, directeur du LPS, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. A l'administration et à la gestion, les secrétaires, Nora Sadaoui, Annie Ribaudeau et Marie Gefflot pour leur disponibilité et leur efficacité. A l'affût d'un bon de livraison oublié ou d'un financement soldé, elles ont toujours trouvé une solution à chacun de nos problèmes. Au service informatique, Zaire Dissi. Je remercie sincèrement l'atelier de mécanique et ses membres, qui ont accepté de m'adopter pendant plus d'un mois pour la réalisation du microscope: Jose Da Silva Quintas, et la relève, Carlos Goncalves, Eric Nicolau. Merci aussi à Bertrand Ducos, responsable de la plate-forme de biologie, et incontournable pour toute construction ADN ou fonctionnalisation de billes.

Pour conclure ces remerciements, je dois énormément à ma famille, ma mère, Viviane et mes soeurs, Anne et Maria, pour leur patience, leur présence et leurs encouragements depuis toujours. Ensuite évidemment merci à Emilie et à mes amis, de Paris et d'ailleurs: Jay, pour la colloc du 20m² rue Bellan, Dadou, pour son soutien indéfectible et son coaching, Le Duch pour une première intro à Paris, KiKi, le visiteur de la semaine.

Je dédie ce travail à mon père, Alain, qui nous a quittés pendant cette thèse.

Table des matières

Table des matières	v
Introduction	3
I Micro-manipulation par pinces magnétiques à haute résolution	7
1 Manipulation à l'échelle de la molécule unique	9
1.1 Introduction : microscopie et biologie, une histoire conjuguée	9
1.2 Visualiser et manipuler une molécule à la fois	10
1.2.1 Motivations biologiques actuelles pour une microscopie à haute résolution . .	10
1.2.2 Limites de principe pour les approches biochimiques en volume	10
1.2.3 Atouts mécanistiques du couplage à la micromanipulation	12
1.3 Manipulation d'ADN et ordres de grandeur	13
1.3.1 Durées	13
1.3.2 Distances	14
1.3.3 Energies	14
1.3.4 Forces	14
1.4 Techniques usuelles de manipulation d'ADN	16
1.4.1 Microscopie à force atomique (AFM)	16
1.4.2 Pinces optiques (OT)	17
1.4.3 Pinces magnétiques (MT)	19
1.5 Comparaison des dispositifs	20
1.5.1 Analyse qualitative	20
1.5.2 Résolution en force	21
2 Dispositif des pinces magnétiques	23
2.1 Introduction	23
2.2 Principe de manipulation : l'ancrage d'une molécule d'ADN unique	23
2.3 Le microscope optique couplé à la micromanipulation	24
2.3.1 Description d'ensemble	24
2.3.2 Microchambre	24
2.3.3 Contrôle actif de la position de l'échantillon	26
2.3.4 Optique	26
2.3.4.1 Cohérence des sources	26
2.3.4.2 Optimisation de l'éclairage	26
2.3.5 Bâti	27
2.4 Génération de force et torsion	29
2.4.1 Aimants	29
2.4.2 Billes paramagnétiques	29

2.4.2.1	Composition magnétique	29
2.4.2.2	Réponse en aimantation	29
2.5	Mesure de position	30
2.5.1	Suivi vidéo utilisant les anneaux d'interférences	30
2.5.1.1	Pointé en (x,y)	31
2.5.1.2	Pointé en z	32
2.5.2	Bruit de pointé	34
2.5.2.1	Calibration absolue des photo-détecteurs CCD en nombre de photons	34
2.5.2.2	Imagerie préliminaire à faibles dérives pour la caractérisation du bruit de photons	39
2.5.2.3	Dépendance au bruit de photons pour l'imagerie des billes magnétiques	43
2.5.3	Augmentation de la résolution spatiale par acquisition haute fréquence	44
2.5.3.1	Résolution intrinsèque transverse subnanométrique	45
2.5.3.2	Résolution intrinsèque axiale subnanométrique	46
2.6	Conclusion	47
3	Mesures de force	49
3.1	Introduction	49
3.2	Mesurer la force magnétique	49
3.2.1	Dynamique du pendule moléculaire	49
3.2.2	Analyse des fluctuations transverses dans l'espace réel	50
3.2.3	Analyse spectrale des fluctuations transverses	52
3.2.3.1	Mise en pratique	52
3.2.3.2	Corrections des dérives basse fréquence	53
3.2.3.3	Corrections du spectre de puissance et extension du domaine de force mesurable	54
3.2.4	Validité des mesures à basse force	57
3.2.5	Mesures à haute force sur brins courts par caméra rapide	58
3.2.6	Limitations des mesures de force	59
3.3	Comment mesurer des hautes forces avec une caméra standard	59
3.3.1	Technique d'exposition modulée	59
3.3.2	Nouvelle analyse des fluctuations transverses dans l'espace réel en fonction de l'exposition	60
3.3.3	Mesure de forces pour des molécules de longueur nulle	61
3.4	Résultats : Premières mesures de hautes forces sur substrats courts	62
3.4.1	Validité du protocole de mesure de force par exposition réduite	63
3.4.1.1	Temps d'acquisition demandé pour la mesure de variance	63
3.4.1.2	Contrôle du bruit de photons	64
3.4.2	Mesures de forces sur une molécule en épingle à cheveux	65
3.4.2.1	Mesures de hautes forces pour la molécule ouverte	65
3.4.2.2	Mesures de force dans le cas d'une extension nulle pour la molécule fermée	66
3.4.2.3	Courbe de force entre 2 et 20 pN	67
3.4.3	Stratégie de mesure rapide pour la mesure des très hautes forces (> 50 pN)	68
3.5	Conclusion : nouvelle gamme de force accessible	69
4	Imagerie par ondes évanescentes	71
4.1	Théorie de la détection optique	71
4.2	Motivations pour une imagerie par réflexion totale	74
4.3	Caractérisation optique de la configuration étudiée	76

4.3.1	Réflexion totale à l'aide d'un objectif à grande ouverture numérique	76
4.3.2	Suivi de position	78
4.3.3	Calibration de la profondeur de pénétration	79
4.3.3.1	Principe de calibration	79
4.3.3.2	Calibration pour différentes profondeurs de pénétration	81
4.3.4	Qualités et défauts de l'imagerie par réflexion totale	82
4.3.4.1	Résolution sub-nanométrique pour une molécule de 200 nm	82
4.3.4.2	Insensibilité de l'intensité de l'onde évanescente à la position de focalisation	84
4.3.4.3	Dérives de position aux temps longs	84
4.3.4.4	Dégradation éventuelle de la qualité d'imagerie par speckle	85
4.4	Application à la détermination de positions d'hybridation	87
4.4.1	Motivation : principe de séquençage d'ADN par hybridation	87
4.4.2	Résultats expérimentaux	88
4.4.2.1	Exemple pour l'oligonucléotide T_8	88
4.4.2.2	Positions d'hybridation	89
4.5	Perspectives : autres configurations possibles pour l'imagerie par OE couplée aux pinces magnétiques	90
4.6	Conclusion	91

II Microscopie et signaux optiques périodiques 93

1	Imagerie photothermique de nanoparticules métalliques	95
1.1	Détection de nanoparticules métalliques	95
1.2	La détection photothermique	96
1.3	Démodulation synchrone	97
1.3.1	Principe : démodulation par battement	97
1.3.2	Calcul de l'intensité collectée par battement	98
1.3.3	Imagerie par détection asynchrone	98
1.3.4	Imagerie par détection synchrone en temps réel	98
1.3.5	Synthèse des signaux de modulation	99
1.4	Validation de l'imagerie plein champ	100
1.4.1	Chauffage ohmique d'un fil microscopique	100
1.4.2	Caractérisation de l'onde thermique au voisinage du fil	101
1.4.2.1	Extraction de la phase thermique	101
1.4.2.2	Réponse fréquentielle et détermination du coefficient de diffusion	103
1.4.2.3	Calibration de l'efficacité du chauffage	104
1.5	Détection par excitation plasmonique	106
1.5.1	Chauffage ponctuel par absorption de lumière	106
1.5.2	Montage optique pour la modulation de chauffage	107
1.5.3	Résultats expérimentaux	108
1.5.3.1	Préparation des échantillons	108
1.5.3.2	Détection vidéo en mode asynchrone à l'échelle nanométrique	109
1.5.3.3	Caractérisation du signal photo-thermique par détection synchrone	110
1.5.3.4	Rapport signal sur bruit de détection pour une particule de 100 nm	112
1.5.3.5	Perspective pour l'amélioration du rapport signal sur bruit : la strioscopie optique	114
1.6	Couplage aux champs radio-fréquence	114
1.6.1	Introduction	114

1.6.2	Circuit électrique optimisé pour l'excitation RF	115
1.6.3	Principe de la mesure du couplage thermique par champ radiofréquence	116
1.6.4	Interaction avec la composante magnétique : couplage inductif	117
1.6.4.1	Présentation du couplage inductif	117
1.6.4.2	Résultats expérimentaux: un couplage faible	118
1.6.4.3	Confrontation avec un modèle théorique simple	119
1.6.5	Interaction avec la composante électrique : couplage capacitif	120
1.6.5.1	Présentation du couplage capacitif	120
1.6.5.2	Micro-condensateur pour la génération d'un champ intense	120
1.6.5.3	Un couplage plus efficace	121
1.6.5.4	Mesures d'absorption en fonction de la taille des nanoparticules et de la fréquence d'excitation	122
1.6.5.5	Proposition d'un modèle simple de polarisation d'un milieu conducteur	123
1.6.6	Conclusion	125
2	Démodulation optique en microscopie de fluorescence	127
2.1	Adressage cinétique de l'espèce cible	127
2.1.1	Perturbation périodique d'un équilibre chimique par excitation thermique	128
2.1.2	Conditions de résonance en quadrature	129
2.1.3	Lecture optique pour une réaction d'échange entre espèces fluorescentes	130
2.2	Détection optique synchrone à faible fréquence	130
2.2.1	Synchronisation de l'excitation thermique avec l'acquisition vidéo	130
2.2.2	Accumulation du signal de fluorescence périodique induit par chauffage	131
2.3	Résultats : titration d'oligonucléotides	132
2.3.1	Imagerie en quadrature de phase	132
2.3.2	Titration sélective en présence d'espèces interférentes	133
2.3.3	Article "Temperature Modulation and Quadrature Detection for Selective Titration of Two-State Exchanging Reactants"	135
2.3.4	Informations supplémentaires pour l'article "Temperature Modulation and Quadrature Detection for Selective Titration of Two-State Exchanging Reactants"	146
	Conclusion	161
	Annexes	165
	Bibliographie	173

Introduction

Les progrès technologiques accomplis dans les méthodes de microscopie optique et l'avènement de techniques de micromanipulation ont permis de réaliser un nouveau défi expérimental : visualiser et manipuler en temps réel une molécule à la fois, dans des conditions compatibles avec une activité biologique.

L'hybridation d'un système de manipulation à une visualisation en molécule unique s'est alors révélée particulièrement adaptée à l'étude de l'activité mécanique d'un type de protéines, essentielles à la machinerie cellulaire : les moteurs moléculaires. Ils sont capables d'accomplir des déplacements dirigés, acheminer des chargements, exercer des forces sur des substrats tels que l'ADN ou le cytosquelette, remplir la fonction de moteurs rotatifs. Les efforts poursuivis dans ce type d'expérience se sont alors concentrés sur la localisation de ces acteurs moléculaires aussi bien que sur la caractérisation de leurs propriétés mécaniques, liées à leur déplacement. Le cadre général de ce travail est donc une contribution expérimentale aux techniques de visualisation de molécules uniques par microscopie optique, pour leur couplage à un dispositif de manipulation par pinces magnétiques.

Dans ce travail, nous avons donc entrepris de construire un appareil de pinces magnétiques, initialement dédié à la manipulation d'ADN et pouvant être plus largement étendu à la manipulation de protéines. Ce double objectif nous a conduit à développer une nouvelle stratégie pour la mesure de hautes forces appliquées à des molécules d'extension quasi-nulle.

Pour comprendre en détail la mécanique enzymatique des moteurs moléculaires impliqués dans des processus biologiques universels tels que la réplication, la traduction ou la réparation de l'ADN, une configuration idéale devrait proposer un suivi en temps réel à un niveau de résolution de 0.34 Å (longueur d'une paire de base), dictée par la périodicité du substrat. Notre travail s'est donc focalisé sur une étude du bruit de position de la détection en pinces magnétiques. Pour améliorer la résolution spatiale du dispositif, nous avons développé une imagerie haute-fréquence ainsi qu'une détection optique par ondes évanescentes.

Dans un second temps, nous avons mis au point une imagerie photothermique, en champ large et en temps réel, de nanoparticules métalliques pour le marquage de moteurs moléculaires uniques. Le déplacement d'un moteur moléculaire en interaction avec un brin d'ADN est en général déduit des variations d'extension totale de la molécule d'ADN. Dans certaines configurations en pinces magnétiques, l'activité du moteur ne se traduit par aucun changement d'extension mesurable et une technique de visualisation directe couplée à la micromanipulation peut s'avérer très fructueuse.

L'organisation du manuscrit se divise donc en deux parties principales. La première est consacrée aux améliorations apportées à la détection optique du système de pinces magnétiques.

Dans un premier chapitre, nous précisons le contexte scientifique des manipulations en molécule unique. Nous présentons le champ d'application biologique de cette approche ainsi que ses atouts, comparés aux expériences traditionnelles de biochimie. Nous détaillons ensuite les grandeurs physiques pertinentes pour la manipulation d'ADN en molécule unique qui constitue le cadre expérimental de ce travail. Nous introduisons enfin les différentes techniques de micromanipulation d'ADN.

Le second chapitre détaille le dispositif des pinces magnétiques. Le suivi en temps réel des billes magnétiques (senseurs de force) conduit à une observable expérimentale majeure, la longueur du brin d'ADN sous investigation. Après une analyse détaillée du bruit de pointé sur la position des billes utilisées, nous démontrons que la résolution spatiale est essentiellement limitée par le bruit de photons de la détection optique. La stratégie présentée pour améliorer cette résolution repose alors sur le développement d'une acquisition haute-fréquence.

Un troisième chapitre présente la technique de mesure de force, fondée sur la quantification des fluctuations browniennes du système bille magnétique-brin d'ADN. Nous présentons d'abord les méthodes classiques de mesure de force par analyse temporelle et spectrale des fluctuations. Cependant ces méthodes s'avèrent rapidement limitées par la faible résolution temporelle de la détection vidéo : dans la situation d'une contrainte mécanique élevée appliquée à une molécule courte, la fréquence d'acquisition est alors largement inférieure aux fréquences du mouvement Brownien et le sous-échantillonnage filtre la mesure de force. Pour dépasser ces limitations et étendre la gamme de force mesurable, nous introduisons alors un nouveau protocole de mesure reposant sur la modulation de l'exposition vidéo. Nous appliquons cette stratégie à deux cas pratiques pour démontrer qu'il est possible de réaliser un échantillonnage exact des fluctuations au-delà de la fréquence de coupure du système d'acquisition et ainsi mesurer correctement des forces élevées, même pour des molécules d'extension quasi-nulle.

Le dernier chapitre de cette partie propose une nouvelle technique de détection optique des billes magnétiques par ondes évanescentes, qui permet leur positionnement en trois dimensions. Après avoir précisé le principe optique de détection en réflexion totale par diffusion, nous caractérisons la configuration expérimentale étudiée avec une attention particulière à la calibration de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente et à la résolution spatiale de la technique. Nous appliquons enfin cette technique à un nouveau principe de séquençage d'ADN en molécule unique par manipulation mécanique.

La deuxième partie du manuscrit est principalement consacrée à l'imagerie photothermique et plus généralement à la démodulation des signaux optiques périodiques.

Le premier chapitre présente d'abord le principe de détection photothermique en champ large et en temps réel par détection synchrone. Nous validons ensuite la détection à l'échelle d'une image vidéo en utilisant un objet thermique de taille micrométrique, puis nous démontrons la possibilité d'imager rapidement des nanoparticules d'or uniques par effet photothermique, le chauffage étant produit par absorption optique à la résonance plasmon. Nous expliquons ensuite les limitations de sensibilité de la détection. Pour l'approche photothermique, nous présentons aussi un nouveau mode de chauffage périodique et spatialement étendu : les interactions électromagnétiques entre champ radio-fréquence et nanoparticules métalliques. Pour deux configurations nous permettant de séparer les composantes magnétique et électrique, nous avons calibré l'absorption d'énergie sur des ensembles de nanoparticules en interaction avec des champs oscillants de 1 MHz à 100 MHz, et comparé l'efficacité d'un couplage électromagnétique indirect (inductif) à celle d'un couplage direct (capacitif).

Le deuxième chapitre décrit une application du principe de démodulation optique utilisé pour la photothermie à l'identification sélective d'espèces biochimiques au sein de mélanges complexes. Nous précisons d'abord le principe original d'identification par discrimination cinétique : le système chimique constitué par une réaction d'échange est maintenu dans un état hors d'équilibre par excitation thermique et sa réponse à la sollicitation périodique de température révèle une résonance en quadrature, hautement spécifique pour l'espèce cible. Nous décrivons ensuite l'application de ce principe à la titration d'une espèce biochimique modèle, un oligonucléotide, présent en solution dans deux états régulés par un équilibre d'hybridation (réaction d'échange). Le premier état est faiblement fluorescent contrairement au second et la modulation lumineuse est produite par déplacement thermique périodique de cet équilibre. Dans les conditions de résonance, le système chimique d'échange

agit comme un filtre qualifié de thermo-cinétique et la démodulation du signal de fluorescence en quadrature permet alors l'identification optique de l'espèce cible en présence d'autres espèces interférentes ainsi que sa titration précise, sans séparation physique des différentes espèces.

Première partie

**Micro-manipulation par pinces
magnétiques à haute résolution**

Chapitre 1

Manipulation à l'échelle de la molécule unique

1.1 Introduction : microscopie et biologie, une histoire conjuguée

L'histoire de la biologie moderne démontre une co-évolution symbiotique et durable entre microscopie et expertise du vivant, la biologie s'enrichissant de nouvelles techniques d'observation tout en sollicitant des efforts constants pour leurs améliorations [80].

C'est au milieu du XVII^{ème} siècle qu'Antoni van Leuwenhoek observa pour la première fois la vie cellulaire à l'échelle microscopique: des micro-organismes bactériens à l'aide d'une unique lentille! La microscopie plus qu'un simple outil permit alors l'émergence de concepts essentiels comme la validation de la théorie cellulaire en tant qu'élément unitaire et constitutif de tout organisme vivant. Après plus de deux siècles, la commercialisation de microscope optique munis d'objectifs achromatiques à grande ouverture numérique augmenta la résolution effective jusqu'à 200 nm, suite notamment aux travaux d'Abbe qui établit le rôle exact de la diffraction dans la formation des images. La microscopie de fluorescence constitua une seconde avancée majeure en terme d'augmentation de contraste et de spécificité pour le marquage des acteurs biologiques sous observation.

Un deuxième apport fertile de la physique à la biologie confirmé sur la base d'observations optiques est la notion de comportement statistique sous influence thermodynamique. En 1827, Brown identifia le noyau de cellules végétales et décrit le mouvement erratique de grains de pollen en suspension dans un liquide. Jean Perrin [59] apporta la preuve définitive et quantifiable du concept de molécules par la mesure du nombre d'Avogadro, il confirmait la proposition d'Einstein [42] sur le mouvement Brownien comme tendance naturelle de tout système à relaxer vers l'équilibre thermique (ainsi que la théorie cinétique de Boltzmann appliquée aux liquides). Du point de vue biologique, le compartiment cellulaire devient le siège d'une dynamique inter-moléculaire en perpétuel mouvement aléatoire même dans des conditions de parfait équilibre extérieur, thermodynamique comme mécanique. A cet égard, la seule prédiction scientifique possible de la machinerie cellulaire se présente sous la forme de lois statistiques régissant trafic et réactivité protéiques en son sein, le "hasard" investit alors le domaine de la biologie cellulaire.

Sur ce terrain expérimental à la frontière entre biologie, physique et chimie, où l'investigation consiste en un traitement statistique des observables rapportées par l'optique (temps, position et orientation), l'avènement de techniques de micro-manipulation a permis d'accomplir un vieux rêve : visualiser et manipuler en temps réel une molécule unique, dans des conditions physiologiques.

Dans ce chapitre, j'exposerai d'abord l'originalité de cette approche en précisant les ordres de grandeurs pertinents à l'échelle de la molécule unique et présenterai ensuite les principaux dispositifs de manipulation d'ADN qui définissent le cadre expérimental de ce travail en thèse.

1.2 Visualiser et manipuler une molécule à la fois

1.2.1 Motivations biologiques actuelles pour une microscopie à haute résolution

Un défi actuel pour une microscopie à haute résolution appliquée à la biologie réside dans la caractérisation des principes structuraux de réactivité moléculaire achevés au sein du réacteur cellulaire, tentative pour élucider les mécanismes de reconnaissance de molécules individuelles, de coordination et régulation de tâches cellulaires hautement spécialisées.

Physiquement, il s'agit de comprendre comment sont générés mouvement et force à l'échelle d'enzymes uniques, et relier ces propriétés mécano-cycliques à leurs réarrangements conformationnels. Les processus universels de réplication, traduction et translation requièrent une lecture directionnelle de l'information génétique codée sur des polymères linéaires tels que l'ADN ou l'ARN. Ils impliquent des moteurs moléculaires qui se dessinent comme des modèles remarquables d'outil miniaturisé à rendement élevé et faible taux d'erreur. En tant que transducteur d'énergie, ils couplent l'énergie chimique issue de leur accrochage au substrat ou de l'hydrolyse de l'ATP à un travail mécanique qui assure déplacement et génération de contrainte mécanique. L'organisation modulaire de leur squelette présente donc en général une juxtaposition de domaines, domaine catalytique, source directe d'énergie, et domaine d'interactions spécifiques pour l'identification du substrat et la capacité à transloquer in situ, l'identification de sites d'initiation et de terminaison mais aussi de partenaires déclencheur ou régulateur de leur propre activité.

L'approche expérimentale vise alors à mesurer leur processivité (résidence totale sur leur substrat), leur vitesse et pas élémentaire de déplacement, les contraintes mécaniques exercées i-e force et couple, et la relation entre ATP consommé et mouvement, dans le but ultime d'établir un schéma cohérent entre fonctionnalité, conformation et cinétique. L'échelle d'analyse est dictée par la périodicité du substrat, dans le cas de l'ADN 0.34 Å pour une paire de base. C'est elle qui gouverne de nombreux comportements enzymatiques comme l'incorporation d'un nucléotide sur un brin naissant lors de la réplication. Les possibilités futures de séquençage d'ADN en molécule unique réclament aussi ce niveau discret d'expertise.

Pour comprendre en détail la mécanique enzymatique, une configuration idéale devrait donc proposer le suivi en temps réel d'enzymes uniques, à un niveau de résolution subnanométrique. La cristallographie par diffraction de rayons X offre une telle résolution de l'ordre de 1 Å mais elle impose de travailler sur des enzymes cristallisées, qui ne présentent au mieux qu'une image instantanée et figée du processus dynamique en cours. La modulation d'activité étant liée à des déformations de structure, elle apporte un complément d'information très utile pour l'analyse fonction-structure, malheureusement il est souvent difficile d'obtenir un cristal étudiable. La microscopie électronique qui utilise un faisceau sonde d'électrons à très faible longueur d'onde propose une résolution adaptée mais impose des conditions de travail éloignées des réalités physiologiques (cas de la cryoEM). D'autre part, elle reste limitée par les dommages induits par le faisceau d'électrons d'énergie élevée. La microscopie optique par sa relative facilité de mise en oeuvre et son adaptation naturelle aux problématiques in vivo demeure aujourd'hui encore le meilleur candidat pour atteindre des niveaux de détails accrus dans l'observation du vivant.

1.2.2 Limites de principe pour les approches biochimiques en volume

Alors que les études traditionnelles de biochimie en volume mettent en jeu un très grand nombre de molécules (un calcul rapide pour un volume de 100 µL et une concentration de 1 µM conduit à une population de 10¹³ molécules), de nombreux processus fondamentaux en biologie s'adressent à des comportements singuliers plutôt que collectifs. Dans les cellules vivantes, la présence d'un gène (en nombre de copies limitées) induit une expression stochastique et désynchronisée entre cellules qui peut générer une grande variabilité fonctionnelle au sein d'une population. Chez la bactérie *Escheria coli*, sous des conditions de répression ces fluctuations d'expression se traduisent par des pics de

production protéique, chaque pic provenant de la transcription stochastique d'un ARN messager unique [128].

Par principe, ces mesures d'ensemble appauvrissent donc toute description à l'échelle moléculaire en moyennant deux types de désordre, les désordres statique et dynamique (figure 1.1 [75, 118]).

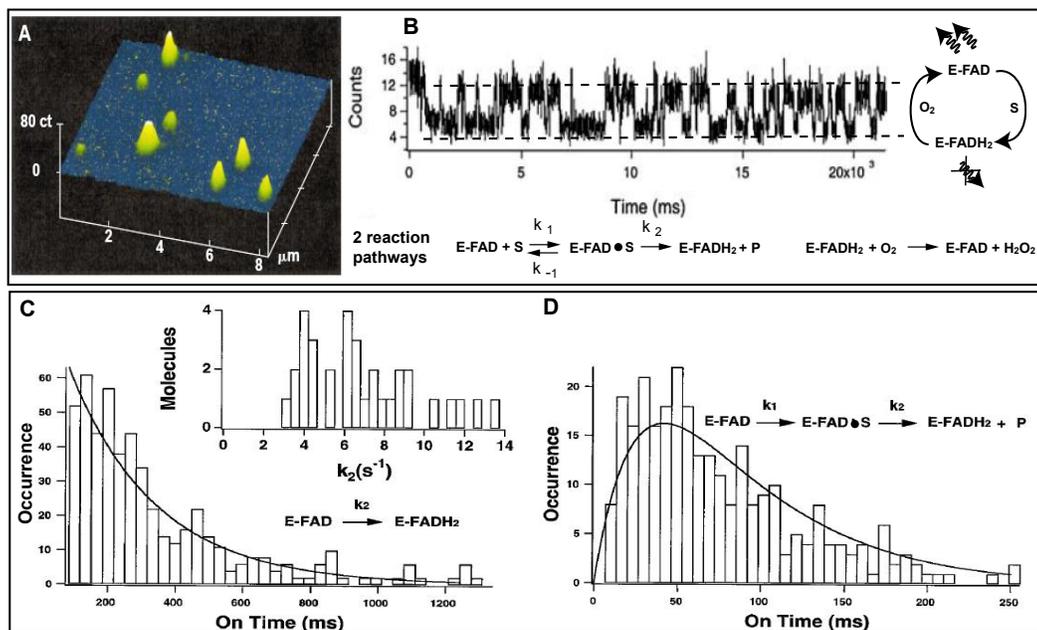


FIG. 1.1 – **A,B: Visualisation du cycle enzymatique à l'échelle de la molécule unique.** L'image (A) présente la détection d'enzymes catalytiques uniques, immobilisées dans un gel d'agarose. Elles catalysent la réaction d'oxydation du cholestérol (S) par l'oxygène, en impliquant un site actif dont la fluorescence dépend de l'état d'oxydation. Au cours d'un cycle unique, l'enzyme sous son état naturellement fluorescent "EFAD" est d'abord réduite en "EFADH₂" par une molécule de cholestérol puis régénérée par oxydation au dioxygène. Chaque cycle d'émission-extinction relève donc d'un cycle enzymatique unique et complet. Le suivi en temps réel de l'émission en fluorescence (échantillonnage à 13 ms (B)) révèle la dynamique stochastique du cycle enzymatique d'une molécule unique. **C,D: Fluctuation statistique à l'échelle de la molécule unique.** En utilisant un dérivé du cholestérol à barrière d'activation plus grande, la seconde étape irréversible de réduction devient cinétiquement limitante (C). L'histogramme des temps passés dans l'état fluorescent (obtenus à partir d'une trace temporelle unique) confirme un processus aléatoire poissonien, la distribution de probabilité suit une loi exponentielle (trait plein) du type $k_2 e^{-k_2 t}$ avec un temps moyen dans cet état égal à $1/k_2$ et $k_2 = 3.9 \pm 0.5 s^{-1}$. Plus surprenant, la constante cinétique k_2 fluctue d'une enzyme à l'autre et exhibe un fort désordre statique. Sur la base de fluctuations spectrales d'émission les auteurs l'attribuent à la présence de plusieurs états conformationnels, activés en parallèle. Dans la limite où k_{-1} est négligeable (cas du cholestérol (D)), la distribution temporelle prend une allure bi-exponentielle (trait plein) du type $\frac{k_1 k_2}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$ avec $k_1 = 2.9 \pm 0.3 s^{-1}$ et $k_2 = 17 \pm 4 s^{-1}$, tant que la quantité en complexe activé demeure faible aucune oxydation ne se produit, ce qui justifie un scénario cinétique de Michaelis-Menten avec apparition de l'intermédiaire réactionnel FADH-cholestérol activé. Au cours de chaque cycle, l'accrochage de l'enzyme à son substrat procède d'une activation et d'un changement d'état conformationnel, l'enzyme éprouve donc le désordre dynamique en présentant différents états transitoires. Résultats extraits de [75].

Le désordre statique rend compte d'une distribution hétérogène des activités pour une population de molécules identiques, exemple de protéines présentant la même séquence d'acides aminés affectées par différents repliements qui diminuent l'activité globale et conduisent à la sous-estimation de l'activité moléculaire.

Le désordre dynamique désigne la variabilité temporelle de l'activité d'une molécule donnée. En moyennant l'activité sur un grand nombre de molécules désynchronisées, on masque les comportements dynamiques individuels comme l'apparition d'états transitoires. Sous réserve d'avoir la résolution temporelle suffisante pour identifier ces étapes, l'étude dans des conditions de molécules uniques apportera par exemple une lecture directe d'un cycle enzymatique.

1.2.3 Atouts mécanistiques du couplage à la micromanipulation

A l'échelle moléculaire, les déplacements biologiques comme la réplication ou la ségrégation chromosomale à l'intérieur du noyau ou de la capsid d'un virus, sont régulés par l'intermédiaire de forces. Inversement, l'immobilisation par accrochage spécifique ligand-récepteur, conduisant à une structure stable en compétition avec les fluctuations thermiques, requiert l'intervention de forces internes de cohésion. Par l'obtention de courbe force/extension, la micromanipulation offre la possibilité de mesurer les forces et énergies de rupture des liens moléculaires qui assurent la stabilité des complexes d'acides nucléiques [72, 124], identifier la signature de motifs répétés au sein des structures protéiques [97, 79] ou encore caractériser la réponse élastique de polymères tels que l'ADN [108, 23].

Dans le cadre plus précis des moteurs moléculaires, on peut imaginer exercer une contrainte mécanique pour réduire leur vitesse et isoler leur pas élémentaire. La kynésine constitue la partie motrice d'un cargo moléculaire en déplacement le long des microtubules du cytosquelette, il assure notamment le transport des composants nécessaires à la conduction des signaux électriques *in vivo*. Une force d'arrêt de 5 pN pour un pas élémentaire de 8.2 nm [113, 101] nous renseigne sur l'efficacité du couplage énergétique: en supposant que chaque pas est nourri par l'hydrolyse d'un ATP (couplage fort), soit un apport d'énergie de $25 k_B T = 100$ pN.nm, le travail à fournir ($W = F \cdot \text{pas}$) impose une force d'arrêt de 12.5 pN dans le cas d'une transduction parfaite. La force mesurée de 5 pN révèle une efficacité moyenne de transduction entre 40 et 50 %. Pour des moteurs à ADN d'une efficacité de 100 %, dont le pas serait d'une paire de base soit 0.34 nm, la force maximale générée au cours d'un déplacement élémentaire devrait atteindre 300 pN. Le moteur viral $\phi 29$ de ségrégation, le champion actuel qui possède 5 sous-unités catalytiques d'ATP, exerce sur son substrat ADN une force de 60 pN [106].

Du point de vue mécanistique, appliquer une force, un couple, ou respectivement fixer l'extension ou le degré de torsion, ajoute un paramètre thermodynamique supplémentaire à la gamme classique des expériences en biochimie (température et concentrations en réactifs/produits). Le travail mécanique fourni par l'opérateur présente soit un avantage, soit un coût au déplacement et perturbe dans les deux cas le paysage énergétique visité au cours du déplacement. En modifiant maxima et minima du profil (figure 1.2), l'application d'une force influe donc la cinétique du cycle biochimique produisant le déplacement. Du point de vue cinétique, la relation vitesse/force en fonction de la concentration en ATP permet alors la caractérisation des sous-étapes limitantes du cycle mécano-chimique et l'estimation indirecte du pas élémentaire [25].

Dans le cas de l'hélicase GP41 impliquée dans la réplication du phage T7 [70], l'activité d'ouverture de l'ADN double-brin est assistée par la force appliquée sur le substrat, subférant un modèle passif où l'hélicase capture des fluctuations thermiques de dénaturation pour ensuite transloquer de manière unidirectionnelle (figure 1.2). La valeur de la vitesse d'ouverture extrapolée à force nulle est de 20 paires de base par seconde. Cette valeur est très inférieure aux mesures réalisées dans la réplication *in vivo* (400 paires de bases). La coopérativité des partenaires de la fourche de réplication, primase et polymérase, est invoquée pour expliquer ce phénomène d'assistance par force, conduisant à la déstabilisation de la double hélice.

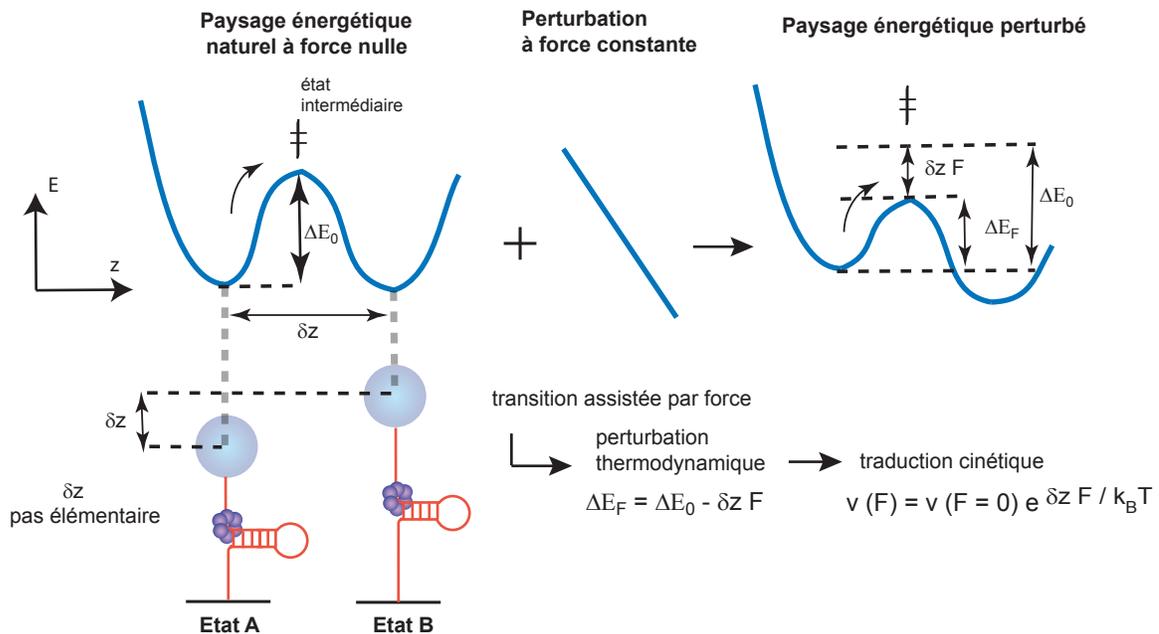


FIG. 1.2 – **Assistance par force d'un processus mécano-chimique.** Nous illustrons ici l'effet de la force sur le paysage énergétique, en coordonnées naturelles (énergie, position) du moteur moléculaire. L'état A représente une hélicase chargée sur une construction ADN de type épingle à cheveux, à une position donnée sur le substrat, l'état intermédiaire correspond à son activation par l'ATP, et l'état B à l'hélicase en translocation après une avancée d'un pas élémentaire et relargage de l'ATP. A force nulle, l'état A est favorisé par une forte barrière d'activation ΔE_0 , l'énergie dans l'état A est légèrement supérieure à l'énergie dans l'état B, par conséquent la vitesse d'ouverture est très faible. En appliquant une force, on diminue le coût d'activation tout en favorisant énergétiquement l'état B. Dans des conditions d'équilibre rapide, la cinétique de A vers B profite d'une dépendance exponentielle selon la force, la vitesse d'ouverture est fortement augmentée.

1.3 Manipulation d'ADN et ordres de grandeur

1.3.1 Durées

En molécule unique, l'échelle de temps dépend du niveau d'analyse de l'organisation: les modes de vibrations et rotations des liaisons inter-atomiques, à la base de la dynamique moléculaire, sont essentiellement locaux (interaction à courte distance), ils autorisent des échanges entre états électroniques à la cadence de la ps. Les réarrangements conformationnels impliquent en général une déformation globale du squelette moléculaire pour favoriser l'accès aux sites actifs: rotation d'hélice, déstabilisation de sous-unités. Ces interactions se manifestent à plus longue distance (typiquement du nm) avec un temps caractéristique de la nanoseconde à la microseconde. La succession des conformations définit les étapes biochimiques élémentaires du cycle enzymatique, la durée du cycle varie de la ms à la s. L'instrumentation actuelle en molécule unique limite la gamme d'observation des phénomènes biologiques aux cycles enzymatiques et à certaines de leurs sous-étapes.

1.3.2 Distances

En micromanipulation d'ADN, les distances caractéristiques s'étendent de la fraction de nanomètre au micron. La longueur maximale est fixée par le nombre total de paires de base (bp) du substrat, typiquement entre 100 bp à 10 kbp soit de quelques dizaines de nm à quelques μm . Dans les conditions typiques de traction (inférieure à 60 pN), l'ADN double brin adopte la forme B dite en hélice avec un diamètre de 2 nm pour un pas de 3.6 nm, l'extension d'une paire de base le long de l'axe hélicale vaut donc 0.34 nm (10.5 bp par tour). Pour l'ADN simple brin sous 10 pN, 0.5 nm par paire de base représente une bonne estimation (même si l'élasticité dépend fortement des conditions salines et de la force appliquée).

1.3.3 Energies

Toutes les énergies seront par la suite le plus souvent exprimées en multiples de l'énergie thermique $k_B T = 4.1 \cdot 10^{-21} \text{ J} = 4.1 \text{ pN}\cdot\text{nm}$ à température ambiante (où k_B désigne la constante de Boltzmann, T la température exprimée en K). $k_B T$ constitue l'échelle d'énergie pertinente au niveau de la molécule unique, puisqu'elle permet de juger de la stabilité d'une liaison. Les énergies des liaisons faibles (type Van der Waals) mettent en jeu quelques $k_B T$, tandis qu'une liaison covalente met en jeu typiquement 100 $k_B T$. L'hydrolyse de l'ATP, une source universelle d'énergie pour les moteurs moléculaires, fournit environ 20 $k_B T$. L'énergie nécessaire pour séparer deux bases de l'ADN est de l'ordre de 2 $k_B T$ [36].

1.3.4 Forces

Force hydrodynamique

Sous l'effet d'un déplacement en milieu en liquide, toute particule subit les forces hydrodynamiques classiques. Établissons donc le nombre de Reynolds appliqué à un objet de taille $L \sim 1 \mu\text{m}$ évoluant à grande vitesse $v = 10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ dans l'eau de masse volumique $\rho = 10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ et de viscosité $\eta = 10^{-3} \text{ S.I.}$:

$$Re = \frac{\rho L v}{\eta} = \frac{10^3 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{-5}}{10^{-3}} = 10^{-5} \ll 1 \quad (1.1)$$

Par conséquent, la dynamique est largement dominée par les effets dissipatifs (la viscosité du milieu) et les effets inertiels sont négligeables [88].

Force de Langevin

Il est ici question de modéliser en terme de force les effets de la diffusion brownienne. La formule de Stokes-Einstein exprime la capacité d'une particule à diffuser sous l'effet de l'agitation thermique:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (1.2)$$

où r désigne le rayon hydrodynamique de la particule et D le coefficient de diffusion (en $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) et η la viscosité du milieu, soit $D \approx 200 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ pour une particule de 2 nm de diamètre en solution aqueuse et à température ambiante. Une particule est d'autant plus affectée par la diffusion que sa taille est faible. En exploitant la relation caractéristique temps-position du phénomène de diffusion $x^2 \sim Dt$, on obtient le temps moyen entre deux chocs:

$$\langle t \rangle = \frac{(1/\rho)^{2/3}}{D} = \frac{(1,5 \cdot 10^{-10})^2}{200 \cdot 10^{-12}} \sim 0.1 \text{ ns} \quad (1.3)$$

où ρ désigne la densité de particules d'eau par unité de volume - 3.10^{11} particules par μm^3 - et $(1/\rho)^{1/3} \sim 1.5 \text{ \AA}$ représente la distance moyenne entre particules. Une particule subit donc de manière incessante les chocs répétés de molécules d'eau. Notons toutefois que dans ce calcul rapide, nous avons grossièrement assimilé la particule d'intérêt à une molécule d'eau.

Par transfert d'impulsion, chaque collision produit une force instantanée, cependant l'isotropie du système (en l'absence de force) impose une redistribution aléatoire de l'orientation des vitesses à chaque nouvelle collision, et statistiquement la force résultante est nulle. La particule garde donc la même position en moyenne et fluctue autour de celle-ci selon une loi de probabilité gaussienne, de la forme $e^{-x^2/4Dt}$ où t est le temps.

L'effet des collisions est donc modélisé sous la forme d'une force - ou plutôt *densité de force* - dite de Langevin, à valeur moyenne nulle et à valeur instantanée aléatoire. Mathématiquement, elle est représentée par une variable aléatoire gaussienne dont la fonction d'auto-corrélation est un dirac :

$$\langle F(t)F(t + \tau) \rangle = 24\pi\eta r k_B T \delta(\tau) \quad (1.4)$$

où r représente le rayon de la particule considérée, η désigne la viscosité du milieu, et δ la distribution de Dirac [65]. Cette définition permet de calculer l'amplitude F_L de fluctuation en force ressentie par une particule durant un temps Δt , c'est-à-dire observée avec une bande passante $\Delta f \equiv 1/\Delta t$ (exprimée en Hz):

$$F_L(\Delta f) = \sqrt{24\pi\eta r k_B T \Delta f} \quad (1.5)$$

Si on applique cette formule à une particule de taille $1 \mu\text{m}$ dans de l'eau à température ambiante, l'amplitude de fluctuation est de $0.01 \text{ pN} \cdot \sqrt{\text{Hz}^{-1}}$. On voit donc que les paramètres expérimentaux, à savoir la taille de la particule que l'on observe et la bande passante de la mesure fixent la résolution de la mesure de force.

Force entropique

L'équilibre thermodynamique impose une configuration statistique qui maximise l'entropie, i.e. une occupation de tous les micro-états disponibles : en l'absence de force exercée, l'ADN prend ainsi la forme d'une pelote statistique dans laquelle l'orientation locale de la molécule est aléatoire. Lorsque l'on étire l'ADN, l'alignement de la molécule le long de l'axe de la contrainte réduit le nombre de micro-états accessibles. Ce coût entropique donne naissance à une force opposée à l'étirement, dite *entropique*. Les énergies en jeu sont de l'ordre de $k_B T$ par degré de liberté.

On peut par exemple estimer l'ordre de grandeur des forces mises en jeu pour étirer une molécule d'ADN. Celle-ci est assimilée à une chaîne dont les maillons auraient pour taille sa longueur de persistance ($\xi = 50 \text{ nm}$), ce qui donne: $F \approx k_B T / \xi \approx 0.1 \text{ pN}$.

Force de rupture d'une liaison

Pour obtenir un ordre de grandeur de la force de rupture d'une liaison, on peut adopter une approche dimensionnelle, en utilisant comme ingrédients d'une part l'énergie mise en jeu dans cette liaison et d'autre part la taille de cette liaison. Cette estimation – même si elle donne un ordre de grandeur correct – ne saurait cependant offrir une description satisfaisante du phénomène dynamique que constitue la rupture d'une liaison, puisque toute liaison soumise à une force finit par rompre, pour peu que l'on attende suffisamment longtemps.

Tout d'abord, nous allons nous intéresser à la force de rupture d'une liaison faible (*i.e.* non covalente), comme par exemple la liaison entre deux bases appariées. L'énergie mise en jeu dépend de la nature des bases et de ses voisines, de la température et des conditions salines mais vaut en moyenne $2-3 k_B T$ [36]. Le travail nécessaire pour le dégraissage du double brin implique une séparation d'une distance de 1 nm pour chaque paire de base, la force de rupture de l'appariement vaut environ: $F \approx$

10 pN. Une autre liaison faible intéressante est le lien biotine-streptavidine, utilisé dans les expériences de pinces magnétiques pour ancrer la molécule d'ADN à la bille magnétique. Il s'agit d'une des liaisons faibles les plus solides, sa force de rupture est de l'ordre de 160 pN [44]. Ceci fournit la limite supérieure des forces que l'on pourra appliquer à une molécule d'ADN.

Pour le cas des liaisons covalentes, les énergies mises en jeu sont plutôt de l'ordre de l'eV, c'est-à-dire environ $40 k_B T$, et les distances de l'ordre de 1 Å. La force de rupture d'une liaison covalente est donc de l'ordre du nN.

1.4 Techniques usuelles de manipulation d'ADN

Les techniques de micro-manipulation sont apparues il y a une quinzaine d'années. Je vais limiter la présentation aux trois techniques les plus courantes et les plus avancées en terme de résultats : microscopie à force atomique, pinces optiques et pinces magnétiques.

Le couplage mécanique entre molécule et opérateur extérieur est assuré par un senseur de force, chimiquement lié à une extrémité de la molécule d'intérêt. L'autre extrémité de la molécule est soit lié à une surface (fixe ou mobile), soit à un autre senseur de force. Le senseur est choisi de taille minimale pour faciliter l'accrochage d'une molécule unique, éviter tout gêne stérique dans l'interaction ADN-protéines et surtout maximiser le rapport signal sur bruit de détection en position. Le bruit de dissipation visqueuse présent dans tous les dispositifs augmente inévitablement avec la taille du senseur.

Les principales contraintes pour une diminution de taille résident dans la diminution de la force appliquée (cas des pinces optiques ou magnétiques) ou dans la difficulté de production contrôlée d'objets suffisamment rigides quand il s'agit de taille nanométrique (cas des pointes d'AFM).

1.4.1 Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique fait partie d'une famille plus large de microscopes dits à champ proche ou à sonde locale. Elle est apparue en 1986 avec l'invention du microscope à effet Tunnel par Binnig [20], conçu dans le but d'imager des surfaces avec une résolution atomique. Il s'agit d'une détection ponctuelle qui consiste à balayer la surface d'un échantillon avec une sonde submicrométrique. Point par point, on détermine la valeur d'une grandeur physique : un courant d'électrons pour le microscope à effet Tunnel, un flux de photons pour le microscope à champ proche optique ou une force d'interaction pour le microscope à force atomique. Face à l'incapacité du microscope à effet Tunnel à imager des échantillons non conducteurs, l'AFM a été développé dans le but d'imager des échantillons biologiques en milieu liquide.

Du point de vue de l'instrumentation, la sonde, typiquement une pointe nanométrique de nitrure de silicium, est solidaire d'un cantilever de bien plus grande taille, typiquement $100 \mu\text{m}$ de longueur pour $5 \mu\text{m}$ de largeur et $0.1 \mu\text{m}$ d'épaisseur [120]. En mode d'imagerie, la pointe est amenée à quelques Å de l'échantillon puis déplacée ligne par ligne. Par interaction faible, la proximité d'une molécule provoque une déflexion de l'ensemble pointe-cantilever, cette déflexion est enregistrée à l'aide d'un système optique simple : un faisceau laser est dirigé sur le cantilever et on mesure la position du faisceau réfléchi à l'aide d'un photodiode à quatre quadrants (QPD) ou d'un détecteur de position (PSD). La déviation donne donc accès à la topologie de l'échantillon et permet la visualisation de molécules uniques. Le développement des AFM rapides (à 25 images par seconde) a conduit récemment à un vrai tour de force : visualiser intégralement le déplacement du moteur moléculaire myosin-V [64]. Dans ce cas, un mode dynamique de lecture ou *tapping mode* a été exploité : la pointe oscille à haute-fréquence et minimise par principe le contact avec des échantillons mous et délicats. Cette variante augmente ainsi la "durée de vie" des pointes.

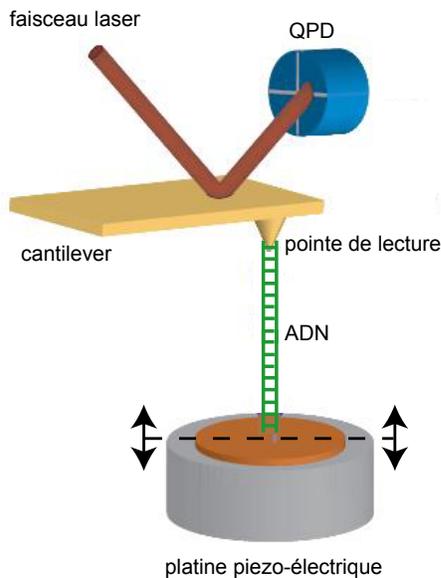


FIG. 1.3 – **Principe de l'AFM.** L'AFM présente l'avantage d'une visualisation à très haute résolution (sub-nanométrique) par lecture ponctuelle. L'échantillon est scanné horizontalement par la pointe nanométrique solidaire du cantilever. La déflexion de l'ensemble est détectée par un pointage laser et permet la cartographie de l'échantillon. L'application de force est obtenue par déplacement vertical et variation de la distance pointe-échantillon.

En mode de force, le déplacement est essentiellement vertical, il est contrôlé par une platine piezo-électrique de nanopositionnement sur laquelle est fixé l'échantillon. Dans un premier temps, on approche la pointe de l'échantillon jusqu'au contact, par interaction non-spécifique la pointe se retrouve liée à une extrémité de la molécule d'intérêt alors que l'autre est spécifiquement accrochée à la surface. Dans un deuxième temps, on applique la force en faisant varier la distance relative pointe-échantillon. La calibration préalable de la raideur du système pointe-cantilever permet d'évaluer la force par le simple produit raideur(k)-déflexion(d): $F = k \cdot d$, valide dans ce régime de faibles déflexions (d est largement inférieure à la longueur de $100 \mu\text{m}$). Selon un modèle simple de poutre élastique, la raideur du levier de longueur $L = 100 \mu\text{m}$, de largeur $W = 5 \mu\text{m}$, d'épaisseur $e = 0.1 \mu\text{m}$ et de module d'Young $E = 10 \text{ GPa}$ s'exprime par:

$$k \sim \frac{EW e^3}{L^3} = 10 \text{ pN.nm}^{-1} \quad (1.6)$$

Les raideurs réelles varient dans la gamme de 10 à 10^5 pN.nm^{-1} .

1.4.2 Pincettes optiques (OT)

Un piège optique est formé en focalisant fortement un faisceau laser à l'aide d'un objectif à grande ouverture numérique (NA) [7, 84, 89]. Le champ électrique associé à l'onde lumineuse polarise une particule diélectrique placée au voisinage du point de focalisation, en réponse ce dipôle induit interagit avec le fort gradient de champ et subit une force qui l'attire toujours vers la zone de fort gradient: la particule d'indice plus élevé que le milieu, typiquement en polystyrène ou en silice, est alors piégée au point de focalisation. Cependant une partie de la lumière est réfléchi par la particule, la pression de radiation résultante exerce un effet axial déstabilisant. La position d'équilibre se situe donc légèrement en avant du point de focalisation. C'est cette balance qui impose l'utilisation d'objectif à grand nombre d'ouverture ($NA > 1,2$), le but étant de minimiser la part des rayons lumineux en incidence

quasi-parallèle. On limite ainsi la résultante axiale par réflexion et on accentue le gradient pour un piègeage plus efficace.

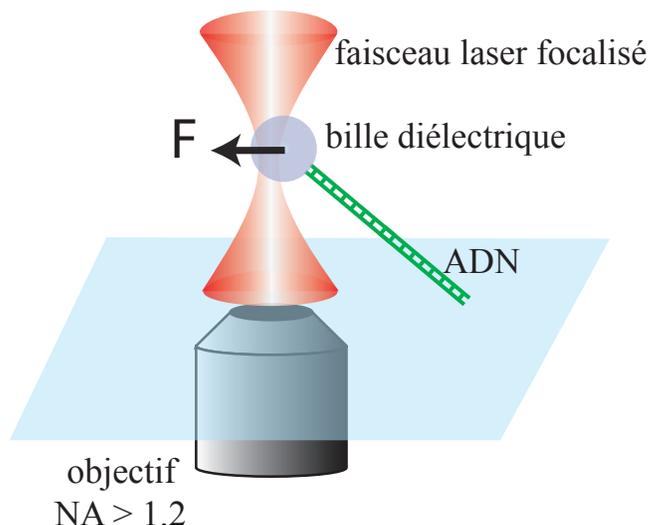


FIG. 1.4 – **Dispositif de pinces optiques.** Le piège optique est formé par la focalisation d'un faisceau laser, il piège une bille diélectrique qui se polarise sous l'effet du champ. La bille est stabilisée au voisinage du point de focalisation.

Le piège agit comme un simple ressort et exerce une force qui augmente linéairement avec l'écart à la position d'équilibre, le potentiel de piégeage reste harmonique pour des déplacements inférieurs à 200 nm. Dans sa version native - ADN étendu entre une surface fixe et une bille piégée optiquement - ce système de micromanipulation constitue une pince en position i-e à distance constante : l'expérimentateur impose la position du piège et la force exercée résulte de l'équilibre élastique du système bille-ADN.

La bille diélectrique est le plus souvent imagée par un détecteur ponctuel comme une photodiode à quatre quadrants et la détection en position bénéficie d'une bande passante pouvant atteindre une dizaine de kHz.

La raideur du piège est naturellement fixée par la qualité de focalisation, l'intensité du faisceau lumineux et la polarisabilité du senseur de force. Couramment, on calibre d'abord la raideur avant de déduire la force à partir de l'écart à la position d'équilibre. Les valeurs atteintes expérimentalement couvrent une gamme de 0.005 à 1 pN.nm^{-1} pour des tailles allant de 200 nm à $1 \mu\text{m}$.

Les pinces optiques sont des pinces en position mais des systèmes ont été développés pour des manipulations à force constante, citons par exemple le contrôle dynamique de la position de la surface [90] par actuateur piezo-électrique (rétroaction à 50 Hz), et un système passif de double piège optique qui exploite une région de saturation du potentiel de piégeage, le potentiel du piège mou y présentant un maximum local [1, 51].

La possibilité d'exercer un couple avec des pinces optiques est liée à la nature de l'onde lumineuse qui transporte à la fois impulsion et moment angulaire (une lumière polarisée circulairement est décrite selon deux états de spin - *héllicité* ± 1 -). Potentiellement, l'assymétrie d'une particule piégée, par sa géométrie ou par ses propriétés biréfringentes, peut changer le moment angulaire de la pince optique et autoriser par ce transfert de moment l'application du couple. La fabrication de micro-cylindres en quartz à axe extraordinaire radial a apporté une solution élégante à ce défi expérimental [67, 38]. La forme cylindrique assure l'alignement de l'objet selon l'axe optique du piège tout en orientant proprement l'axe extraordinaire selon la polarisation du piège, naturellement or-

thogonale à la direction de propagation. En fonctionnalisant une base du cylindre pour y attacher de l'ADN, la rotation de la polarisation incidente et rectiligne impose idéalement la torsion. La mesure du couple est facilement obtenue en analysant le changement du ratio de polarisation droite/gauche, initialement nul.

1.4.3 Pincettes magnétiques (MT)

Les pincettes magnétiques utilisent des billes super-paramagnétiques de tailles comprises entre 0.5 et 4 μm . Placées au voisinage immédiat d'une source magnétique intense, elles s'aimantent sous l'action du champ. Simultanément, sous condition d'un fort gradient de champ dans cette même région, elles éprouvent une force magnétique élevée, proportionnelle à la magnétisation induite et au gradient, qui les attire toujours vers la source magnétique (zone de fort gradient). Le plus souvent, une extrémité de la molécule est liée à la bille magnétique tandis que l'autre est accrochée à la surface de l'échantillon. L'ensemble est monté sur un microscope inversé muni d'un objectif à immersion. La traction effective est souvent souhaitée unidirectionnelle, ce qui est facilement réalisable. La position de la bille est enregistrée en temps réel par acquisition vidéo avec une résolution de l'ordre du nm, la bande passante typique est de 30 Hz.

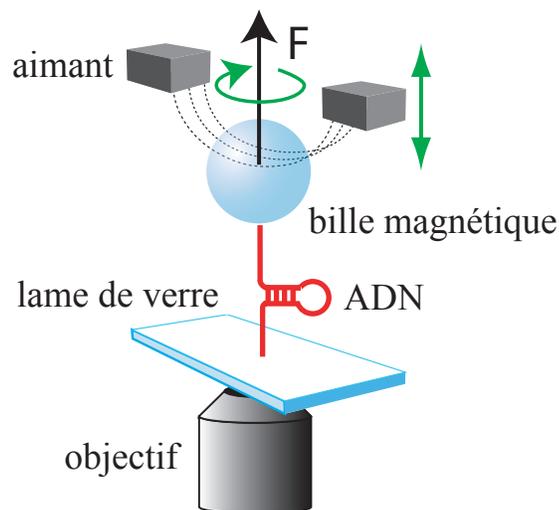


FIG. 1.5 – **Dispositif de pincettes magnétiques.** Un couple d'aimants permanents, monté sur un microscope inversé, génère le gradient de champ nécessaire pour exercer une force verticale sur une bille paramagnétique (ici liée à une construction ADN). Le déplacement du couple d'aimant relativement à la surface permet de moduler cette force. La rotation des aimants autour de l'axe vertical fixe la position angulaire de la bille.

La configuration à aimants permanents met en jeu un dipôle magnétique formé par deux aimants de dimension millimétrique, séparés par une fraction de millimètre. Dans le plan de l'échantillon et à l'intérieur de cet entrefer, les distributions spatiales du champ et du gradient sont homogènes. De manière simultanée et parallèle, on peut appliquer une force très homogène sur chaque bille placée dans cet entrefer. La symétrie du système dans l'entrefer (invariance par translation transverse) impose un gradient essentiellement vertical et une force unidirectionnelle. La distance entre les aimants fixe l'échelle typique des variations du champ magnétique. Au cours d'une manipulation d'ADN, les changements d'extension sont limités à quelques μm . L'intensité du gradient ressenti et la force appliquée demeurent donc constants à l'échelle des déplacements de la bille.

La modulation de la force est obtenue en variant la position relative aimants-surface. La force exercée varie exponentiellement avec la distance aimants-surface de telle sorte qu'en quelques millimètres on couvre toute la gamme de force accessible. La chambre micro-fluidique est construite avec la plus faible épaisseur pour pouvoir amener les aimants au plus près de la surface. La translation verticale des aimants est assurée par des moteurs asservis qui produisent des déplacements très reproductibles.

Contrairement aux pinces optiques, il s'agit d'une pince en force : l'expérimentateur impose une force constante via la position du couple d'aimants et l'extension de la molécule relaxe vers sa valeur d'équilibre. Le système ne fixe pas la raideur, elle est déterminée par l'élasticité de la molécule ancrée à la bille. Cette valeur dépend donc de la force exercée sur la molécule. Pour une molécule d'ADN double brin de longueur $1\ \mu\text{m}$ sur laquelle on exerce une force de $0.5\ \text{pN}$, la raideur vaut quelques $10^{-4}\ \text{pN}\cdot\text{nm}^{-1}$. La raideur augmente linéairement avec la force: à $10\ \text{pN}$, elle vaut environ $10^{-2}\ \text{pN}\cdot\text{nm}^{-1}$. Il existe aussi des systèmes à rétroaction qui permettent de piéger spatialement une bille paramagnétique [50].

La direction du champ magnétique généré par le couple d'aimants est essentiellement transverse (comprise dans le plan de l'échantillon). L'interaction entre chaque bille, assimilée à un moment magnétique induit, et ce champ produit un couple important qui aligne le moment magnétique selon la direction du champ et fixe la position angulaire de la bille. Une simple rotation axiale des aimants entraîne la rotation du champ dans le plan transverse. On peut donc très simplement fixer le degré de torsion de la molécule et tenter de mesurer le couple exercé.

1.5 Comparaison des dispositifs

1.5.1 Analyse qualitative

Gammes de force

Les deux dernières techniques (OT,MT) reposent sur une structuration spatiale du champ électromagnétique pour former un fort gradient. Le champ doit d'abord polariser le senseur pour ensuite générer une force entre dipole induit et gradient de champ. Ce couplage rayonnement-matière varie selon le volume du senseur i-e le diamètre au cube et dépend donc crucialement de la taille. Pour des billes de même rayon et de taille inférieure ou égale au micron, les pinces optiques permettent généralement d'atteindre des forces plus élevées que les pinces magnétiques ($100\ \text{pN}$ avec une bille de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre): dans le cas des OT, le fort confinement spatial du champ sur quelques centaines de nanomètres se traduit par une densité d'énergie élevée pour la manipulation d'un objet unique. Dans le cas des MT, le confinement du champ est dilué sur quelques centaines de μm mais permet naturellement la manipulation d'un nombre élevé d'objets disposés dans le champ de vue. L'utilisation de billes de plusieurs microns de diamètre permet cependant d'atteindre des forces de $100\ \text{pN}$ avec un dispositif de pinces magnétiques à aimants permanents [29] (alors que la force sature avec la taille de la bille dans le cas des pinces optiques manipulant des billes de plusieurs microns). Avec des pinces optiques, on atteint des forces du même ordre avec des puissances lasers importantes du watt ou plus, la contrepartie résidant dans la dégradation des échantillons biologiques. La forte densité de champ au niveau du point de focalisation ($> \text{MW}/\text{cm}^2$) provoque la photo-destruction des spécimens [91], on préfère donc choisir la longueur d'onde du piège dans la fenêtre la moins absorbante pour les milieux biologiques: entre 750 et $1200\ \text{nm}$ (infrarouge proche).

Stabilité de la force appliquée

Un avantage des pinces magnétiques est le contrôle de la force : les sources du champ magnétique sont des aimants macroscopiques, ils sont stables mécaniquement et leurs propriétés magnétiques dépendent très faiblement de la température (dans des conditions normales d'utilisation à température

très inférieure à la température de Curie). Pour les pinces optiques, une attention particulière doit être portée sur le choix de la source laser. Elle doit présenter de hautes stabilités de puissance et de pointage, les chemins optiques doivent être isolés et préservés des fluctuations thermiques et acoustiques, dans le cas contraire ces perturbations produisent des variations d'indice et de chemin optique qui provoquent des déplacements délétères du piège et des fluctuations dans la force imposée.

1.5.2 Résolution en force

La résolution en force d'une technique est souvent fixée par la force de Langevin. Celle-ci vaut $F_L(\Delta f) = \sqrt{24\pi\eta r k_B T \Delta f}$. La viscosité et la température sont des paramètres imposés par la biologie (manipulation en milieux aqueux pour des températures comprises entre 25 et 37°C). La bande passante ne peut pas être inférieure à la fréquence caractéristique du phénomène observé (typiquement 1-100 Hz). Le paramètre de contrôle restant est la taille de la particule considérée, c'est à dire celle du senseur de force.

Pour les pinces optiques et magnétiques, les résolutions typiques en force sont comparables puisque les billes utilisées ont des tailles voisines: 0.1 pN pour une bille de 1 μm mesurée avec une bande passante de 60 Hz. Pour l'AFM en prenant en compte la taille de 100 μm lors des fluctuations de l'ensemble pointe-cantilever, on obtient une résolution de 1 pN pour une bande passante de l'ordre de la centaine de Hz. Cependant dans le cas de l'AFM, les composantes basses fréquences dues au bruit en $1/f$ introduisent d'importantes fluctuations de position qui limitent souvent la résolution en force à une dizaine de pN.

Chapitre 2

Dispositif des pinces magnétiques

2.1 Introduction

Dans le domaine de la micromanipulation, les premières mesures de l'élasticité d'une molécule unique d'ADN datent du début des années 1990 [107]. Les résultats obtenus par l'équipe de C. Bustamante utilisaient des billes magnétiques comme actuateur mécanique, associés à des aimants et des écoulements.

Depuis, des dispositifs plus évolués, nommés *pinces magnétiques*, ont été mis au point dans notre laboratoire [112]. Ils sont particulièrement adaptés à l'étude d'une molécule d'ADN soumise à une traction et/ou à une contrainte de torsion. Il ne s'agit pas de *pinces* à proprement parler, puisque la bille n'est pas piégée autour d'une position choisie, mais tirée dans une direction donnée. D'autres dispositifs utilisant des champs magnétiques créés par des électroaimants dans les trois directions de l'espace permettent de créer des pièges magnétiques en asservissant la position de la bille [50, 55, 37].

Dans ce chapitre, je présenterai le dispositif le plus courant des pinces magnétiques qui est développé dans notre laboratoire et commercialisé par PicoTwist, en éclairant les améliorations visant à augmenter la résolution et la stabilité du montage. Ce chapitre est donc consacré dans un premier temps au principe des pinces magnétiques, puis à quelques éléments propres au montage expérimental mis en oeuvre pour cette thèse.

2.2 Principe de manipulation : l'ancrage d'une molécule d'ADN unique

Pour pouvoir manipuler une molécule unique d'ADN, il faut être capable de l'ancrer d'une part à une surface et d'autre part à une bille magnétique. La stratégie adoptée consiste à fixer sur chacune des extrémités de la molécule d'ADN un groupement chimique qui forme une liaison stable avec un groupement complémentaire. La stabilité de la liaison doit être suffisante pour que l'on puisse observer et manipuler l'ensemble pendant une durée de l'ordre de quelques heures à quelques jours.

Les groupements utilisés sont d'une part le couple biotine/streptavidine, et d'autre part le couple digoxigénine/antidigoxigénine. Il est possible d'acheter des billes magnétiques recouvertes de streptavidine, et il est assez simple d'obtenir une surface de verre fonctionnalisée par de l'antidigoxigénine [77]. Diverses méthodes classiques de biologie moléculaire permettent de fonctionnaliser les extrémités de l'ADN d'une part avec de la biotine, d'autre part avec de la digoxigénine [69].

L'ADN fonctionnalisé est mélangé dans un tube à essai à une solution de billes magnétiques (figure 2.1A), et incubé afin que l'extrémité biotine des molécules d'ADN se fixe à la surface streptavidine des billes (figure 2.1B). Le mélange est ensuite injecté dans la microchambre où se déroulent les expériences. En l'absence de force magnétique, les billes sédimentent lentement, ce qui favorise les contacts avec la surface inférieure de la chambre, recouverte d'antidigoxigénine (figure 2.1C). L'ensemble surface-ADN-bille constitue donc un système auto-assemblé. En jouant sur le rapport

des concentrations de billes et d'ADN lors du mélange en tube à essai (typiquement 10^8 billes pour 10^7 molécules d'ADN dans $10 \mu\text{L}$), on peut se placer dans des conditions où très peu de billes sont effectivement fixées à une molécule d'ADN. La probabilité que deux molécules soient ancrées sur une seule bille est par conséquent très faible. Cette éventualité constitue d'autant moins un problème que des tests simples d'élasticité permettent de s'assurer que la bille est ancrée par un lien unique à la surface. Néanmoins il faudra rincer suffisamment la chambre pour évacuer l'excès de billes libres.

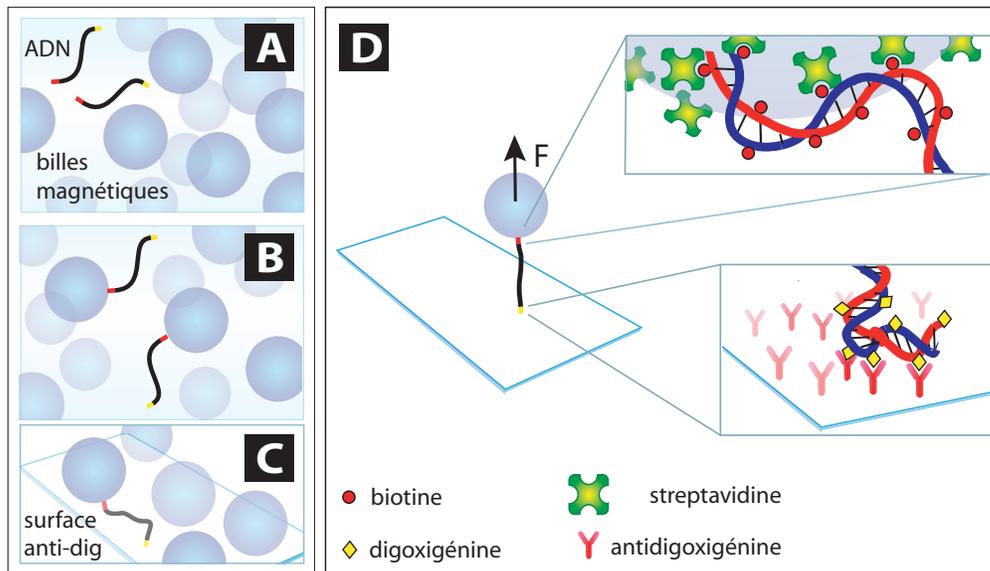


FIG. 2.1 – **Stratégie d'ancrage des molécules d'ADN.** **A:** Dans un tube à essai, des molécules d'ADN modifiées à leurs extrémités (respectivement biotine et digoxigénine) sont mélangées à un large excès de billes magnétiques fonctionnalisées streptavidine. **B:** Après incubation, un faible nombre de billes porte une molécule d'ADN. **C:** Le mélange billes-ADN est incubé (en l'absence de force magnétique) dans une microchambre dont la surface est recouverte d'antidigoxigénine. **D:** Après quelques minutes de rinçage, seules les billes portant une molécule d'ADN restent piégées au voisinage de la surface. Il est possible de les étirer verticalement en approchant les aimants de l'échantillon. Les encadrés montrent le détail de l'ancrage de la molécule d'ADN sur la bille d'une part (haut), et sur la surface d'autre part (bas).

2.3 Le microscope optique couplé à la micromanipulation

2.3.1 Description d'ensemble

Le principe des pinces magnétiques a déjà été décrit ailleurs [111, 50]. Rappelons en les caractéristiques essentielles : il s'agit principalement d'un microscope inversé, muni d'un couple d'aimants permettant de micromanipuler une bille magnétique (figure 1.5). Un éclairage quasi-parallèle permet d'imager les billes et de suivre la position 3D de plusieurs billes simultanément.

2.3.2 Microchambre

La microchambre dans laquelle sont injectées les billes est réalisée en intercalant un morceau d'adhésif double face évidé en son centre entre une lamelle de verre et un film de mylar transparent d'épaisseur $50 \mu\text{m}$. Les dimensions du canal ainsi créé sont $50 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 60 \mu\text{m}$, soit un volume utile de $15 \mu\text{L}$ (figure 2.2).

Cette micro-chambre est ensuite fixée à une plaque de plexi-glass par un nouvel adhésif double face sur sa partie supérieure, la plaque assure ainsi la tension du film de mylar et la rigidité de la cellule. Le film de mylar ainsi que la plaque de plexi-glass sont percés par deux trous en regard d'un millimètre de diamètre qui permettent l'injection et l'évacuation de fluide dans la chambre. Le fluide pour l'injection est déposé dans un réservoir d'une contenance de $500 \mu\text{l}$, une connectique à un tube souple (par le champ de la plaque) permet l'évacuation, l'autre extrémité du tube étant liée à un pousse-seringue qui assure une aspiration à faible débit (typiquement $10 \mu\text{l.mn}^{-1}$).

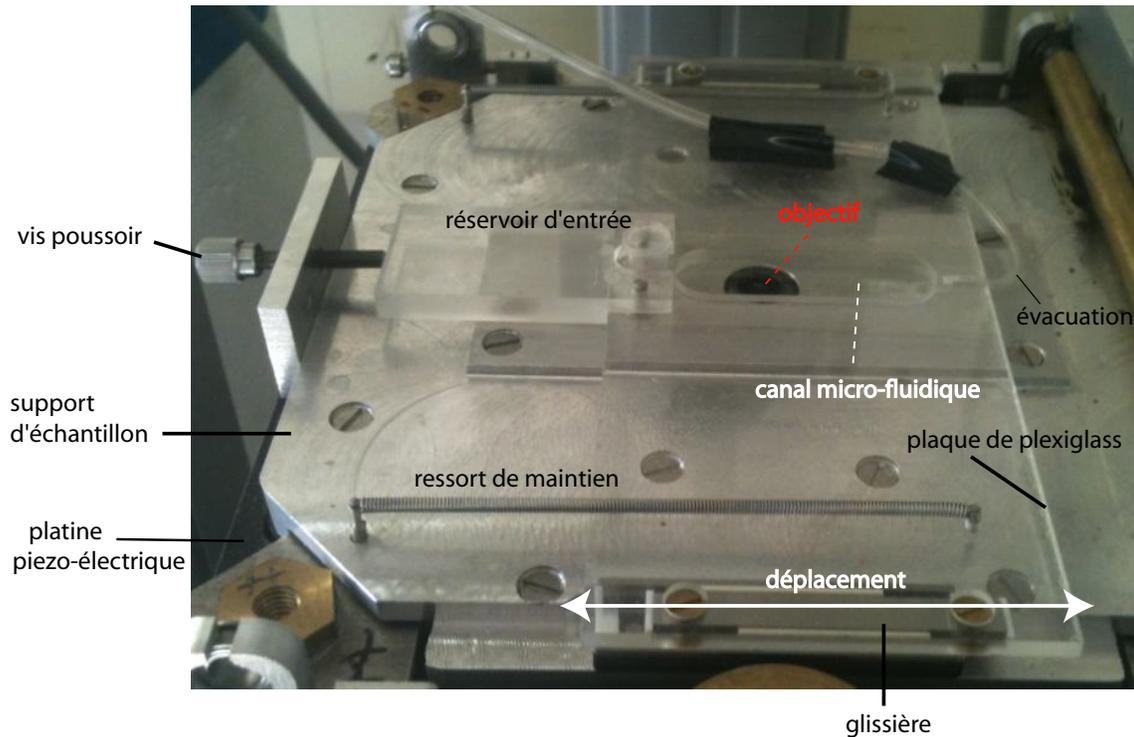


FIG. 2.2 – **Photo de l'échantillon.** La cellule microfluidique est fixée à une plaque de plexiglass montée sur un système de glissières, solidaires du support d'échantillon. La plaque ainsi que la cellule sont ainsi libres de se translater pour imager différentes régions de la micro-chambre à l'aide de l'objectif. Le déplacement cellule/objectif est obtenu à l'aide d'une vis poussoir, le maintien en butée de cette vis contre la plaque est assuré par des ressorts. Des déplacements plus fins dans les trois directions sont obtenus à l'aide d'une platine piezo-électrique (cf 2.3.3), le support d'échantillon est en effet fixé à la partie mobile de cette platine, située en dessous du support. Un réservoir d'entrée permet l'injection des solutions dans la micro-chambre alors que l'évacuation est assurée par un tube souple.

Notons que l'épaisseur de la chambre adhésif/mylar impose une distance minimale aimants-bille de $100 \mu\text{m}$. Pour la partie supérieure de la cellule, on a choisi un film de mylar plutôt qu'une lame de verre d'épaisseur standard $130 \mu\text{m}$ pour réduire la distance aimants-bille. En effet, la dépendance non-linéaire entre le gradient du champ et la distance aimants-bille impose une force qui croît fortement avec la proximité des aimants, les aimants doivent donc être placés au plus près des billes pour optimiser le couplage entre billes et champ magnétique. Le but recherché est de pouvoir exercer les forces les plus importantes avec des billes les plus petites possibles pour augmenter la résolution en position. Cela permet d'exercer des forces de 25 pN sur des billes de diamètre $1 \mu\text{m}$ (MyOne, Dynal).

2.3.3 Contrôle actif de la position de l'échantillon

La microchambre est montée sur une platine piezo-électrique de nano-positionnement (Physics Instruments PI-E561), fixée au bâti. A l'aide de deux glissières et d'un système de poussoir, solidaires de la platine, on peut déplacer la plaque de plexi-glass et la cellule sur une course de plusieurs centimètres, on explore ainsi l'intégralité de la chambre dans sa longueur (figure 2.2). La platine piezo-électrique permet un ajustement plus fin de la position relative objectif-échantillon avec une course de 100 μm dans les trois directions (x,y,z).

Dans ce montage, nous avons fait le choix d'un déplacement vertical de l'échantillon pour le contrôle de la focalisation, la distance objectif-échantillon le long de l'axe optique est asservie avec une résolution nanométrique par la platine piezo-électrique. L'objectif du microscope est fixe et solide du bâti.

2.3.4 Optique

2.3.4.1 Cohérence des sources

La microchambre précédemment décrite est placée sur un microscope inversé. L'éclairage doit être optimisé afin de former les anneaux d'interférence utilisés lors de la détection de la position de la bille. Il doit être suffisamment parallèle et monochromatique pour former des anneaux bien contrastés, mais l'utilisation d'une source hautement monochromatique et cohérente spatialement –comme un laser– produit des figures d'interférences aléatoires appelées speckle, l'image est alors caractérisée par une forte granulosité qui détériore la régularité des anneaux de diffraction et diminue la qualité d'imagerie.

La solution adoptée est d'utiliser des sources peu cohérentes comme des diodes électroluminescentes monochromatique, de largeur spectrale de quelques dizaines de nanomètres. La surface inférieure de la chambre est imagée via un objectif à immersion à huile ($60\times$, N.A. = 1.45; Olympus) et conjuguée sur une caméra CCD. Cet objectif à forte ouverture numérique permet l'imagerie des billes magnétiques par anneaux d'interférence ainsi que leur imagerie simultanée par onde évanescente (cf Ichap4).

2.3.4.2 Optimisation de l'éclairage

Pour augmenter la bande passante de détection optique, nous avons développé l'acquisition haute-fréquence sur caméra CCD (> 200 Hz). Dans les microscopes commerciaux de nombreux éléments optiques (miroirs et diaphragmes) sont à la source de pertes lumineuses le long du trajet optique produisant l'imagerie. Dans ce type d'application, le niveau de lumière était insuffisant en utilisant un microscope classique. Le montage optique de notre microscope présente donc une version épurée pour limiter ces pertes : l'image est formée par une lentille de tube sur le détecteur CCD qui est positionné dans son plan focal image, et cette lentille est placée à une faible distance de la sortie de l'objectif (typiquement quelques centimètres).

Pour remplacer les LED conventionnelles de faible émission, nous avons opté pour une variante de diodes électro-luminescentes à rendement élevé et forte luminance : les RC-LED (Resonant Cavity LED) pour lesquelles la zone active d'émission est placée au sein d'une cavité optique résonante du type Fabry-Pérot [103]. Leur courant d'alimentation ($i_{\text{max}} = 50$ mA pour une différence de potentiel de 3V dans le cas d'une RC-LED L10762 Hamamatsu) reste faible, avec une puissance totale d'émission de 5 mW, leur rendement de 3% est en fait de très bonne qualité.

Le fort niveau d'émission pour un courant d'alimentation faible limite l'échauffement du matériau semi-conducteur émetteur et est idéal pour générer des pulses de lumière à forte intensité crête. Pour des applications de modulation lumineuse, il permet aussi d'atteindre des fréquences de modulation élevées de 250 kHz (cf IIchap1), l'électronique étant souvent limitée en pratique par le rapport

intensité-fréquence de modulation, i-e le basculement rapide de grandes quantités de charges.

Le deuxième avantage présenté par ce type de LED est la forte luminance. Le nombre de photons collectés sur chaque pixel CCD en fin de chaîne optique est directement proportionnel à la densité d'illumination imposée dans le plan d'observation de l'échantillon. En formant l'image de la source lumineuse directement sur l'échantillon, cette densité est optimisée par l'utilisation d'une LED à forte luminance.

Dans le cas d'une RC-LED, cette qualité est assurée par le confinement de l'émission sur une zone active de $80 \mu\text{m}$ de diamètre. On forme l'image de cette zone émettrice à l'aide d'une lentille convergente sur l'échantillon. On choisit un montage d'encombrement $4f$: distance lentille-source et lentille-image égale au double de la distance focale (f), il assure un grandissement voisin de l'unité et une zone éclairée homogènement de $100 \mu\text{m}$ par $100 \mu\text{m}$ sur l'échantillon. Ce grandissement de la source optimise ainsi la luminance effective sur un champ de vue typique pour des expériences en molécules uniques ($100 \mu\text{m}$ par $100 \mu\text{m}$). La focale de cette lentille de champ (de diamètre standard 25.4 mm) est de 50 mm : on combine ainsi une bonne efficacité de collection lumineuse (ici de 20%) avec une focalisation modérée qui maintient un contraste suffisant des anneaux d'interférences.

Cette optimisation de l'éclairage permet d'atteindre une densité d'illumination de l'ordre de 1 mW sur $100 \mu\text{m}$ par $100 \mu\text{m}$: soit $0.1 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. Avec ce niveau d'intensité lumineuse nous pouvons produire une imagerie vidéo à fort éclairage à la fréquence du kHz.

Pouvons nous quantifier cet ordre de grandeur pour la luminance nécessaire? D'une part, on connaît le flux de photons incidents par unité de surface : pour une longueur d'onde de 650 nm son ordre de grandeur est de $10^{11} \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. D'autre part, en fin de chaîne optique, la calibration de la caméra utilisée (Pulnix TM-6740-GE voir 2.5.2.1) permet d'établir le nombre de photons collectés et d'estimer l'efficacité de collection de notre montage optique. Sur chaque pixel le nombre de photons collectés est de $20\,000$ dans des conditions de fort éclairage (et à gain minimal), soit un flux de $2 \cdot 10^7 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1}$ par pixel à une fréquence de 1 kHz . La calibration du grandissement du microscope fixe la taille équivalente d'un pixel dans le plan d'observation : $0.1 \mu\text{m}$ par $0.1 \mu\text{m}$, soit un flux total par unité de surface de $2 \cdot 10^9 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. L'efficacité de collection du microscope en transmission est donc de l'ordre du pourcent en nombre de photons, les pertes peuvent être de plusieurs natures : angle de collection de l'objectif limité par son nombre d'ouverture, perte en transmission par absorption des multiples lentilles qui composent l'objectif et pertes de flux lumineux lors de la formation de l'image sur la matrice CCD par la lentille de tube.

2.3.5 Bâti

Les techniques de micromanipulation de molécule unique nécessitent la mesure de déplacements relatifs de l'ordre du nanomètre. La plupart des microscopes classiques n'ont pas été conçus pour ce type d'utilisation, et sont peu stables mécaniquement. Le manque de stabilité s'explique d'une part par le nombre important de dispositifs mécaniques permettant d'assurer une grande versatilité au microscope (inutile dans notre cas), et surtout par le fait que les problèmes de stabilité ont sans doute été ignorés lors de la conception.

Les montages de pinces magnétiques bâtis sur des microscopes commerciaux ont donc été progressivement remplacés dans l'équipe par des microscopes spécialement conçus. L'optique et la mécanique ont été simplifiées au maximum.

L'obstacle majeur à la stabilité du microscope est posé par les dérives thermiques : les fluctuations de température dilatent ou contractent les pièces mécaniques différemment selon leur nature, ce qui génère de grandes dérives dans les basses fréquences. La figure 2.4.A illustre cet effet pour une modulation périodique de température sur un microscope non-thermalisé. Dans cet exemple, l'environnement régulé en température présente néanmoins des fluctuations résiduelles de température d'une amplitude mesurée de $0.03 \text{ }^\circ\text{C}$ (par une sonde LM35) et d'une période de 400 s . On retrouve une amplitude de fluctuations caractéristique de 30 nm en amplitude pour les dérives de position d'une

bille fixée sur la surface de la microchambre. Face à ce problème, l'approche en général utilisée est de réguler la température du dispositif. Cela permet de limiter le problème, mais pas suffisamment: un objectif se dilate de $1 \mu\text{m}$ par $^\circ\text{C}$. Même ramenées à une variation de $0.01 \text{ }^\circ\text{C}$ par une régulation efficace, les fluctuations restent de l'ordre de 10 nm . Un système permettant de fortement réduire cet effet a été conçu dans notre groupe. Le principe est simple : il s'agit de maintenir l'objectif par une pièce mécanique qui permet de compenser la dilatation de celui-ci (voir figures 2.3 et 2.4).

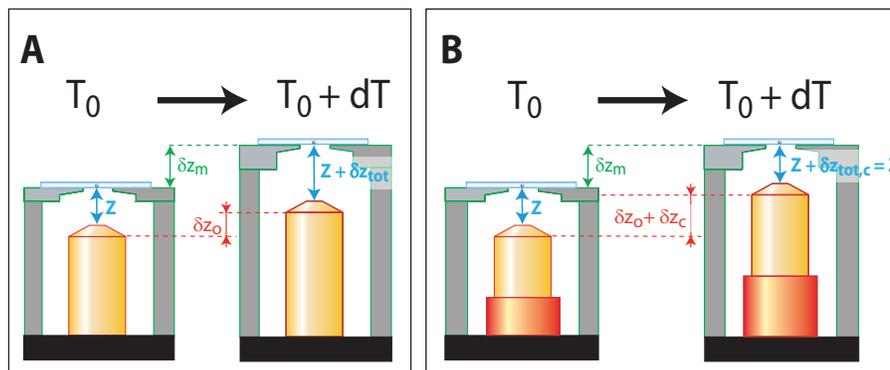


FIG. 2.3 – Principe du montage permettant la compensation thermique des dérives. **A: Microscope non compensé.** Suite à une fluctuation de température dT , le bloc contenant l'objectif (jaune) et les montants du bâti du microscope (gris) se dilatent respectivement de δz_o et δz_m . Comme les coefficients de dilatation sont différents, la distance entre l'objectif et la bille change d'une quantité $\delta z_{tot} = \delta z_m - \delta z_o$, typiquement $1 \mu\text{m}$ pour une dérive d'un $^\circ\text{C}$. **B: Microscope compensé.** L'ajout d'une pièce mécanique (rouge) spécialement conçue de manière à compenser la différence de dilatation entre l'objectif et les montants permet de limiter les dérives dues aux fluctuations thermiques.

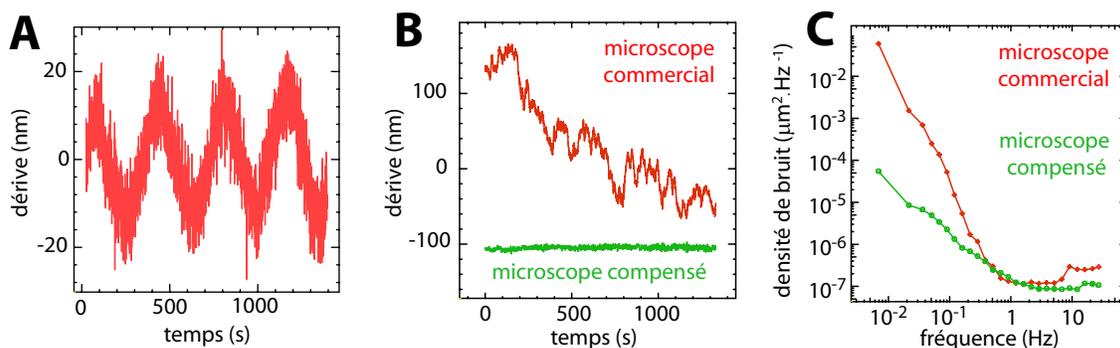


FIG. 2.4 – Effet de la compensation thermique sur les dérives. **A:** Microscope non-régulé en température mais compact par conception et dérives de position en z par une modulation lente de température de 0.03 K . **B:** Mesure de la dérive d'une bille fixée sur la surface de la microchambre au cours du temps, sur un montage construit à partir d'un microscope commercial (rouge) et sur le montage avec compensation des dérives thermiques (vert). **C:** Spectre de puissance des dérives de la figure B. La remontée des spectres dans le domaine des basses fréquences correspond aux dérives thermiques.

2.4 Génération de force et torsion

2.4.1 Aimants

Un couple d'aimants permanents positionné au-dessus de l'échantillon permet de générer un champ magnétique. Ces aimants peuvent générer des forces de l'ordre du pN sur une bille magnétique et orienter la bille selon la direction du champ magnétique.

Pour optimiser la force magnétique appliquée, le gradient vertical du champ doit être maximisé. L'utilisation d'aimants permanents (NdFeB) à fort champ rémanent, typiquement de 1 Tesla, permet d'augmenter le gradient. A distance constante du couple d'aimants, le gradient est ensuite renforcé en réduisant l'entrefer et en choisissant des aimants de faible taille [71]. Dans la configuration choisie, les aimants sont des parallélépipèdes de $2 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ séparés par un entrefer de 0.2 mm. Le champ magnétique ainsi généré dans l'entrefer est homogène sur zone de 0.2 mm par 1.5 mm qui contient l'intégralité du champ de vue de $100 \mu\text{m}$ par $100 \mu\text{m}$. L'axe Nord-Sud de chacun des aimants est parallèle à l'axe optique du microscope, il est inversé entre aimants de manière à produire un champ magnétique orienté horizontalement. L'orientation de la bille — et donc le degré de torsion dans la molécule qui y est accrochée — est choisie en tournant les aimants, la force est contrôlée en réglant la distance des aimants à l'échantillon. Le couple d'aimants est donc monté sur un support motorisé en translation selon la direction z et en rotation autour de cet axe.

2.4.2 Billes paramagnétiques

2.4.2.1 Composition magnétique

Les billes magnétiques utilisées sont constituées d'un matériau super-paramagnétique, il combine une forte susceptibilité magnétique à une aimantation rémanente nulle. En pratique, les billes sont constituées d'un ensemble de nanocristaux ferromagnétiques immobilisés dans une matrice non-magnétique [94]. Après une première aimantation sous l'effet d'un champ extérieur, ce matériau ne conserve pas d'ordre magnétique à température ambiante, les nanodomains sont suffisamment petits pour perdre leur aimantation rémanente sous l'effet des fluctuations thermiques. Par contre, aux basses températures, ces nanodomains seront ferromagnétiques, ce qui explique leur grande susceptibilité.

2.4.2.2 Réponse en aimantation

Lorsqu'un champ magnétique est appliqué à la bille, celle-ci acquiert un moment magnétique. La courbe d'aimantation des billes utilisées (MyOne, Dynal) suit alors une loi de Langevin, classique pour un matériau paramagnétique (figure 2.5A). L'interaction entre le dipôle magnétique ainsi formé et le champ magnétique résulte d'une part en une force verticale, orientée vers les champs forts $\vec{F} = (\vec{M} \cdot \vec{\nabla})\vec{B}$, et en un couple $\vec{\Gamma} = \vec{M} \times \vec{B}$ qui tend à aligner l'axe du moment magnétique avec le champ. Ce couple s'explique par la présence d'une direction d'aimantation préférentielle fixée par rapport à la bille, elle est due à une légère anisotropie dans l'orientation des nanodomains qui composent le matériau magnétique. Ce couple (de l'ordre de 10^4 pN.nm) dépasse de quelques ordres de grandeurs tous les couples en jeu dans nos expériences (de l'ordre du pN.nm). On pourra donc considérer dans la suite que l'application d'un champ magnétique suffit à déplacer la bille *en bloc* pour aligner sa direction d'aimantation avec le champ et fixer le degré de torsion d'une molécule.

On peut calculer simplement en fonction de la distance aimants-échantillon la force exercée sur une bille en utilisant la courbe d'aimantation de la bille – fournie par le fabricant – et la mesure de la variation du champ magnétique avec la distance (figure 2.5B). Notons que pour estimer la valeur de la force, la composante "isotrope" du moment magnétique, i-e alignée le long du champ, suffit. En

effet de l'ordre de 10^{-11} e.m.u. = 10^{-14} A.m², elle est beaucoup plus importante que la contribution anisotrope de de l'ordre de 10^{-13} e.m.u. = 10^{-16} A.m².

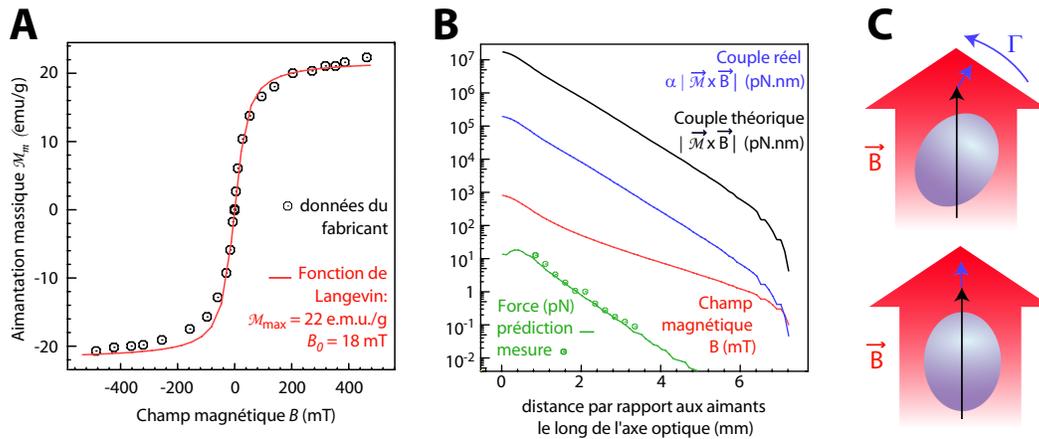


FIG. 2.5 – **Propriétés magnétiques des billes utilisées.** **A:** Aimantation \mathcal{M} des billes MyOne (Dyna). Le rayon et la masse d'une bille valent respectivement $1 \mu\text{m}$ et 10^{-12}g . Les données sont ajustées à une fonction de Langevin: $\mathcal{M} = \mathcal{M}_{max}(\coth(B/B_0) - B_0/B)$. **B:** Champ magnétique B , force F et couple Γ générés sur une bille MyOne. A partir de l'aimantation d'une bille et de la variation spatiale du champ magnétique créé par les aimants (courbe rouge), il est possible de calculer la valeur de la force en fonction de la distance aux aimants (courbe verte, en bon accord avec les points correspondant aux données expérimentales). La valeur théorique du couple pour une aimantation uniaxe (courbe noire $\Gamma_{th} = \vec{M} \times \vec{B}$) est deux ordres de grandeur au-dessus des valeurs typiques exercées sur les billes. La valeur réelle du couple est inférieure du fait de la faible anisotropie de l'aimantation de la bille. Un ordre de grandeur du couple maximum réellement subi par la bille est donné ici par la courbe bleue où l'on a pris $\alpha = 0.01$. Les valeurs de ce couple restent quelques ordres de grandeur au-dessus des couples en jeu dans les molécules biologiques (quelques pN.nm). **C Aimantation de la bille.** La bille magnétique possède une légère anisotropie, ce qui lui confère en première approximation une direction privilégiée d'aimantation (indiquée par le grand axe de l'ellipse). Lorsque l'on applique un champ magnétique \vec{B} (haut), l'aimantation de la bille est orientée majoritairement le long de la direction du champ (noire), mais possède une petite composante (environ 100 fois plus faible) le long de la direction d'aimantation privilégiée (bleue). C'est cette seconde composante qui est à l'origine d'un couple Γ forçant la bille à s'orienter le long de l'axe du champ (bas). Reproduit de [69].

2.5 Mesure de position

2.5.1 Suivi vidéo utilisant les anneaux d'interférences

Le suivi en position d'une bille repose sur la formation d'anneaux concentriques qui viennent décorer l'image de chaque bille [93]. Elle résulte de la configuration particulière de l'éclairage : au niveau de l'échantillon l'illumination quasi-parallèle est qualifiée de critique, un objet diffusant produit une image qui peut être interprétée comme l'interférence de la lumière directe avec la lumière diffusée par l'objet. L'étendue des anneaux est associée à la longueur de cohérence l_c de la source lumineuse : pour une LED de longueur d'onde 650 nm et de largeur spectrale typique 30 nm , la longueur de cohérence vaut $l_c = \lambda^2/\Delta\lambda = 14 \mu\text{m}$ et fixe l'étendue maximale des anneaux.

2.5.1.1 Pointé en (x,y)

Pour le suivi de position, nous définissons dans un premier temps une région d'intérêt pour chaque bille. Ses dimensions, typiquement 128 pixels par 128 pixels (soit environ $13 \mu\text{m}$ avec le grandissement choisi), permettent d'intégrrer la totalité de l'information contenue dans l'image de chaque bille.

Nous établissons ensuite les profils d'intensité selon les directions x et y. Le profil selon la direction x est moyenné sur 16 lignes de la région d'intérêt centrées sur la bille, le même type de moyennage spatial est appliqué selon la direction y.

Le principe de pointé du centroïde des anneaux repose alors sur leur symétrie centrale. Supposons une bille positionnée en $x=0$ à l'instant t et en δx à l'instant $t+dt$, i-e à l'image suivante. Pour un profil P centro-symétrique en $t+dt$ tel que $P(x) = P(2\delta x - x)$, le maximum de son produit d'auto-convolution $C(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} P(x_0)P(x - x_0)dx_0$ se produit naturellement pour $x_{max} = 2 \delta x$. L'algorithme de suivi de position en (x,y) consiste donc en une mesure du déplacement produit à chaque image par auto-convolution des profils et détermination de leur maximum. Le produit de convolution est calculé par transformée de Fourier, son maximum est déterminé par interpolation polynômiale.

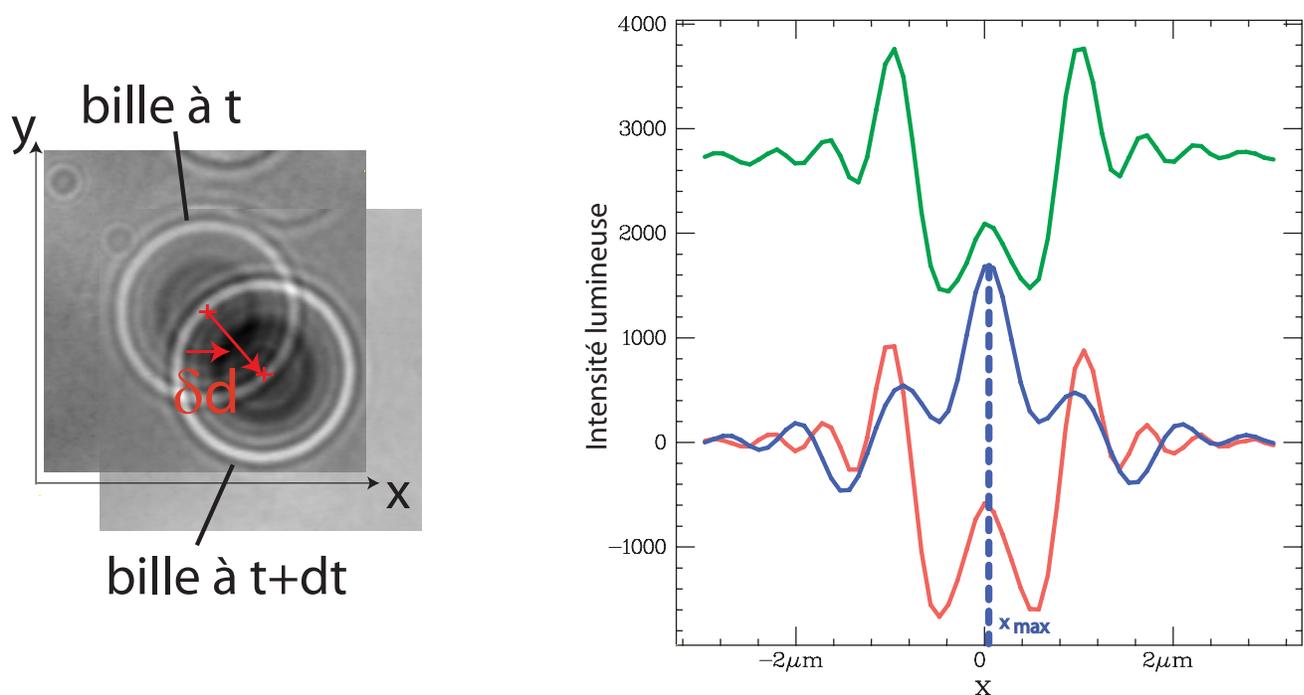


FIG. 2.6 – Principe du suivi de la position de la bille dans le plan (x,y). A gauche, images successives d'une bille en déplacement. En comparant la position du maximum de l'auto-convolution du profil à $t + dt$ avec celui à t , on obtient le déplacement (δd) de la bille dans le plan (x,y). Le graphe (à droite) présente les profils d'intensité de la bille selon x en $t+dt$: profil d'intensité après moyenne spatiale (en vert), profil différentiel (en rouge), et produit d'auto-convolution du profil différentiel (en bleu). On établit en fait un profil moyen autour de chaque bille, et on le soustrait au profil initial pour extraire un profil différentiel. Cette stratégie limite les inhomogénéités du fond d'éclairage qui peuvent induire des dissymétries dans les profils. Le maximum du produit d'auto-convolution, noté x_{max} , mesure le déplacement δx entre t et $t+dt$.

2.5.1.2 Pointé en z

L'exploitation des propriétés de la figure de diffraction permet d'extraire de l'image à deux dimensions l'information sur la troisième dimension. En effet, le rayon des anneaux augmente lorsque la bille s'éloigne du plan focal de l'objectif. Schématiquement, ce rayon fournit donc une mesure indirecte de la position relative bille-plan focal de l'objectif.

Chaque bille considérée nécessite une calibration dont le protocole est le suivant : on exerce une force élevée sur la bille, ce qui étire l'ADN et surtout réduit les fluctuations browniennes de la bille qui garde une position fixe. On déplace ensuite l'objectif sur une gamme de positions le long de l'axe optique. Pour chacune de ces positions, on enregistre quelques images de la bille afin d'obtenir une image moyenne. On obtient donc un jeu d'images, appelée *image de calibration*, à partir duquel on extrait le profil radial des anneaux en fonction de la position relative bille-plan focal de l'objectif (figure 1.7).

Une fois cette étape réalisée, il suffit ensuite de fixer la position de l'objectif et d'enregistrer en temps réel le profil des anneaux. La détermination de la distance bille-plan focal repose alors sur le positionnement du profil actuel dans l'image de calibration.

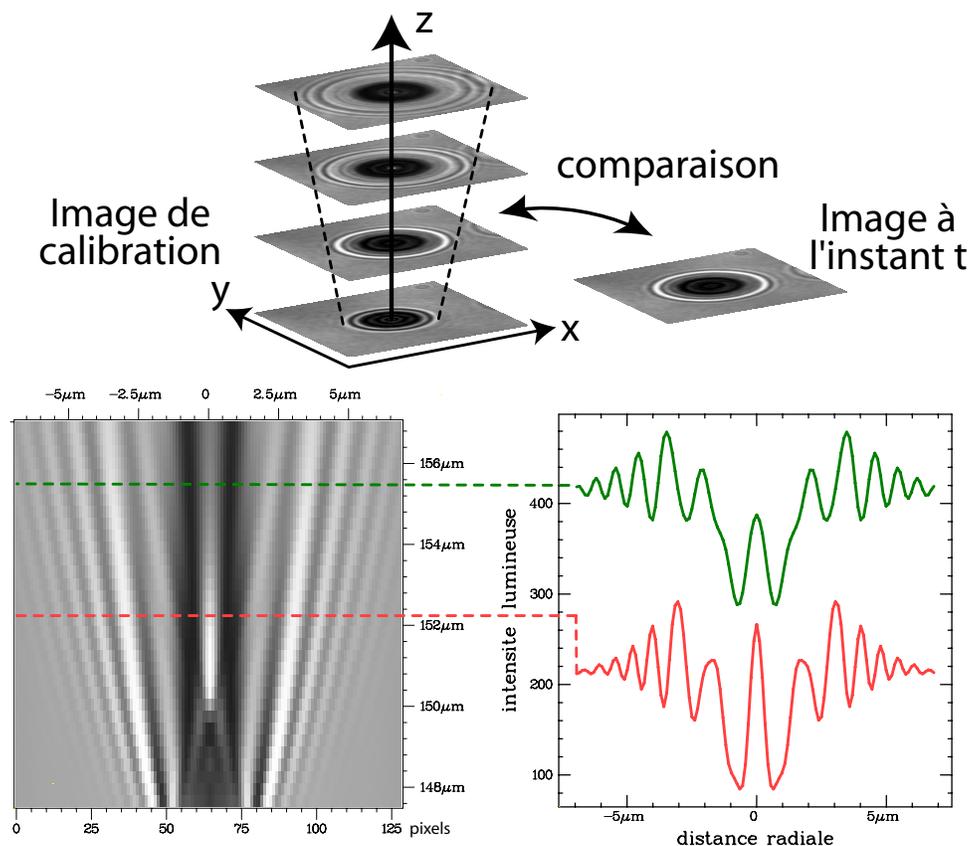


FIG. 2.7 – **Mesure de position le long de l'axe optique.** Au début de l'expérience, on varie la distance relative bille-plan focal en maintenant la bille immobile et en déplaçant l'objectif le long de l'axe optique. Un profil radial est enregistré pour chaque position relative bille-plan focal, formant ainsi un jeu de profils de calibration. Au cours de l'expérience, le profil radial de la bille est comparée en temps réel aux profils de calibration ce qui permet, connaissant la position de l'objectif, de remonter à la position de la bille. Les profils radiaux (en vert et rouge à droite) obtenus pour deux focalisations distinctes ont été décalés pour plus de clarté, initialement leur valeur moyenne est identique.

Ce positionnement est établi en prenant en compte les aspects ondulatoires de l'imagerie qui déterminent la forme des anneaux. En effet, les modulations spatiales de chaque profil sont interprétées en terme d'interférences entre lumière directement transmise (d'incidence quasi-parallèle à l'axe optique) et lumière diffusée par la bille, interférences se produisant dans le plan focal de l'objectif (figure 2.8). Elles sont donc caractérisées par une phase spatiale ϕ qui dépend de deux paramètres : la distance bille-plan focal (z) et la position radiale (r). Elle s'exprime simplement en fonction de la différence de marche d entre les deux rayons lumineux (figure 2.8):

$$\phi(r,z) = \frac{2\pi n_{eau}}{\lambda} d = \frac{2\pi n_{eau}}{\lambda} (\sqrt{z^2 + r^2} - z^2) \quad (2.1)$$

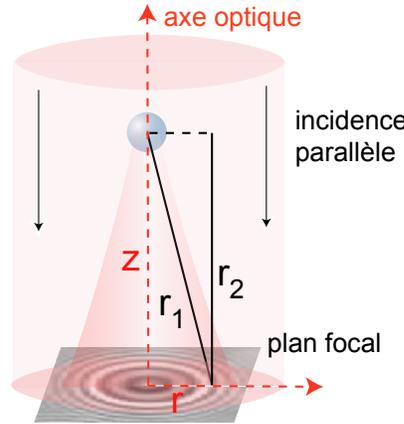


FIG. 2.8 – **Illustration des interférences entre lumière diffusée par la bille et lumière incidente.** La différence de marche entre les deux rayons lumineux est égale à $r_1 - r_2 = \sqrt{z^2 + r^2} - z^2$ où r définit la distance radiale dans le plan d'observation et z la distance bille-plan focal.

Dans nos conditions de travail, la défocalisation est suffisante pour établir une expression approchée des variations de la phase selon z , telle que:

$$\partial\phi/\partial z = \frac{2\pi n_{eau}}{\lambda} (1 - 2z + \Theta((r/z)^2)) \text{ pour } z \gg r \quad (2.2)$$

Cette relation linéaire entre les variations locale de phase (pour des profils voisins) et la distance bille-plan focal permet alors d'interpôler finement la position de la bille entre les deux profils de référence les plus proches. Notons que la variation de phase entre profils est calculée pixel par pixel après transformée de Hilbert.

Toutefois le déplacement de l'objectif Δz_{obj} ne correspond pas à celui du point focal Δz . Il existe une relation de proportionnalité simple entre les deux due à la réfraction lors du passage de l'interface verre/eau, telle que :

$$\frac{\Delta z}{\Delta z_{obj}} = \frac{n_{eau}}{n_{verre}} = 0.875 \quad (2.3)$$

Remarquons d'autre part que la mesure ainsi obtenue est *relative* et ne donne pas accès à la valeur de l'extension *absolue* de l'ADN. On peut toutefois estimer cette dernière en mesurant dans un premier temps la position relative de la bille à force nulle, et en soustrayant ensuite cette valeur des mesures de position ultérieures. Cette méthode induit une incertitude de l'ordre de 10 à 100 nm sur l'extension absolue de la molécule, due au potentiel d'interaction avec la surface. En général, la mesure de l'activité d'une protéine ne nécessite une grande précision que sur des variations relatives de la molécule d'ADN et cette limitation ne pose donc pas de problème majeur.

Finalement, le temps de calcul global associé aux mesures de position en trois dimensions vaut typiquement 0.5 milli-seconde par bille associée à une région d'intérêt de 128 pixels par 128 pixels. Cette méthode de calibration, totalement parallélisable, couplée à un temps de calcul rapide, permet donc le suivi en temps réel d'un nombre élevé de billes et notre groupe a démontré le suivi simultané de plus de 60 billes pour une acquisition à 30 Hz.

2.5.2 Bruit de pointé

2.5.2.1 Calibration absolue des photo-détecteurs CCD en nombre de photons

Principe de détection vidéo par CCD

Le principe de détection des photo-détecteurs CCD (Charge Coupled Device ou dispositif à transfert de charge) repose sur l'effet photo-électrique. Lorsqu'on éclaire la surface photo-sensible du capteur constitué d'une jonction de silicium dopé, le flux incident de photons génère des charge électriques de part et d'autre de la jonction. Le nombre de photo-électrons ainsi créés est proportionnel au flux de photons pour une longueur d'onde donnée. Le taux de conversion photons/électrons est appelé le rendement quantique. Il varie fortement avec la longueur d'onde et définit le domaine spectral de sensibilité du CCD (de 400 nm à 900 nm de longueur d'onde la plupart du temps). Dans la région du spectre où le CCD est le plus sensible (dans le jaune vers 500 nm), le rendement quantique est de l'ordre de 40 à 50% pour les CCD courants, mais peut atteindre jusqu'à 95% avec des détecteurs particulièrement optimisés.

Pour convertir l'image lumineuse en image électrique, la matrice CCD est constituée de photosites individuels. Ils sont polarisés par un réseau d'électrodes pour former des micro-condensateurs distincts, capables d'accumuler un grand nombre d'électrons lorsqu'ils sont exposés. Ces éléments de l'image sont appelés des pixels ("picture element"), leur taille varie entre quelques microns et quelques dizaines de microns. Les photosites de faible taille présenteront la meilleure résolution spatiale. Actuellement, les matrices CCD hautement parallèles sont constituées de plusieurs millions de pixels.

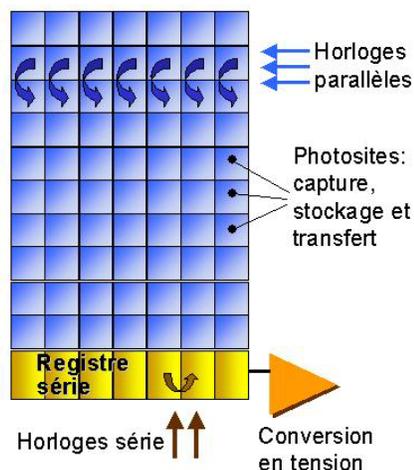


FIG. 2.9 – Illustration du transfert de charge pour un détecteur CCD. Le transfert vertical est assuré par des horloges parallèles, le transfert horizontal par des horloges série.

Une fois le signal intégré dans les photosites, l'information qu'ils contiennent doit être transférée jusqu'à un étage d'amplification qui réalise la conversion charges/tension, pour finalement délivrer une information électrique. Ce transfert est assuré par des signaux de polarisation (ou signaux d'hor-

loge) qui déplacent les charges par application d'un champ électrique périodique (figure 2.9). Les lignes sont d'abord décalées séquentiellement par transfert vertical (d'une unité par période). La dernière ligne courante de la matrice est alors enregistrée dans un registre série horizontal. Celui-ci est ensuite décalé horizontalement pixel par pixel, les charges contenues pour chaque pixel sont ainsi transférées vers le circuit électronique d'amplification qui opère la conversion en tension. Finalement, un convertisseur analogique/numérique connecté à la sortie de l'amplificateur retranscrit l'intensité lumineuse intégrée sur chaque pixel en signal binaire. Ce processus est répété pour chaque ligne et colonne. Le signal numérisé est ensuite adressé à l'utilisateur via une communication à bande passante élevée.

Le fréquence d'acquisition de ce type de détecteur apparaît donc liée au temps nécessaire pour réaliser la lecture d'une trame entière de la matrice. Pour une caméra standard, disposant d'une fréquence d'horloge de 65 MHz et caractérisée par une matrice grand champ de 1.4 Mpixels, la fréquence d'acquisition peut atteindre 31 Hz. Un moyen d'augmenter la vitesse d'acquisition est de sélectionner une sous-région de la matrice. En comparaison, les détecteurs CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) sont aussi formés par une matrice de pixels qui collectent un signal électrique proportionnel au flux lumineux. L'électronique d'amplification est directement intégrée sur chaque pixel et permet une lecture individuelle. Ce type de capteur ne demande pas de transfert délicat entre photosites et autorise des acquisitions plus rapides.

Calibration du bruit de détection

L'obtention du signal vidéo nécessite une série de conversion de signaux physiques et les sources de bruit sont nombreuses : bruit thermique, bruit d'amplification électronique (souvent appelé bruit de lecture), bruit de corrélation entre pixels voisins (et sensibilité à l'éclairage différent entre pixels), bruit de numérisation par repliement spectral lors de la conversion analogique/numérique (limité par le filtrage préalable du signal analogique).

Le bruit thermique par exemple est la manifestation de charges parasites produites par l'agitation thermique du réseau cristallin du silicium. Même si la matrice CCD est plongée dans l'obscurité, le bruit thermique se manifeste par un signal électrique additif, le signal d'obscurité. Chaque pixel étant assimilé à une photo-diode polarisée en inverse, le bruit est alors interprété comme un bruit de grenaille du courant de fuite, qui varie exponentiellement avec la température. Une solution pour réduire ce bruit d'obscurité consiste donc à refroidir le détecteur CCD lors de son utilisation. Notons que les charges thermiques comme les photocharges sont produites avec un taux qui est proportionnel au temps d'intégration.

Cependant, une qualité appréciable des circuits CCD et de l'électronique associée est qu'ils ajoutent un bruit minimal au signal vidéo pour un niveau de lumière élevé. Le bruit de la chaîne de détection comprenant le bruit d'obscurité n'est notable qu'à bas niveau de lumière, les fluctuations d'intensité mesurée sur chaque pixel sont alors principalement liées à l'effet photo-électrique et à la nature corpusculaire de la lumière. Elles sont directement déduites des fluctuations statistiques du nombre de photons reçus par chaque élément du détecteur. Si la source observée émet des photons de manière totalement désordonnée (événements non-corrélés), la distribution du nombre de photons reçus suit une loi poissonnienne et le bruit de photons se traduit par un bruit de Schottky, dit de grenaille ou "shot noise". Considérons un flux de photons n_{ph} arrivant sur le détecteur, pendant un temps d'intégration τ ce flux génère un nombre moyen de photons $N_{ph} = n_{ph}\tau$, la probabilité poissonnienne de détecter N photons pendant cet intervalle de temps s'écrit alors:

$$P(N_{ph}) = e^{-n_{ph}\tau} \frac{(n_{ph}\tau)^{N_{ph}}}{N_{ph}!} \quad (2.4)$$

Le nombre moyen de photons reçus pendant cet intervalle de temps est alors égal à la variance de la statistique $\sigma_{ph}^2 = n_{ph}\tau = N_{ph}$.

Notons que selon le théorème central limite, cette distribution peut être approchée par une loi gaussienne pour un nombre élevé de photons reçus pendant le temps d'exposition, caractérisé par une variance égale au nombre total de photons reçus.

Pour déterminer le nature exacte du bruit de détection dans nos conditions d'imagerie, nous avons donc calibré différentes caméras CCD, utilisées au laboratoire. Nous avons suivi un protocole expérimental utilisant un échantillon statistique de 100 pixels par 100 pixels pour lesquels nous enregistrons le niveau d'intensité au cours d'un film de 128 images. Nous quantifions alors la statistique en intensité : la variance en intensité est calculée pour chaque pixel sur ces 128 images, ensuite moyennée sur le nombre total de pixels considérés. Le bruit de détection est relevé pour des niveaux d'illumination couvrant la gamme totale de sensibilité, de 0 à 255 niveaux de gris pour un signal lumineux codé en 8 bits. Notons que nous avons utilisé une source de lumière incohérente pour s'assurer d'une émission initiale de photons décorrélée.

Considérons un niveau moyen d'intensité noté $\langle I \rangle$ et un nombre total de photo-électrons N créé par pixel, on peut alors écrire $N = a \langle I \rangle$ où a représente le nombre de photo-électrons par niveau d'intensité. En notant σ^2 la variance, la statistique en intensité est caractérisée par :

$$\sigma_I^2 = \frac{\sigma_N^2}{a^2} = \frac{N}{a^2} = \frac{\langle I \rangle}{a} \quad (2.5)$$

où nous faisons l'hypothèse d'une statistique poissonnienne pour le nombre de photo-électrons créés qui est proportionnel au nombre de photons reçus. Ce résultat indique que la variance en intensité est proportionnelle à la valeur moyenne de l'intensité.

Les calibrations confirment cette dépendance sur la totalité de la gamme de sensibilité des détecteurs CCD, le bruit de détection est donc principalement dominé par le bruit de photons (figure 2.10). A partir de la pente de la courbe $\sigma_I^2 = f(\langle I \rangle)$, on extrait le nombre absolu de photo-électrons créés pour un niveau moyen de lumière. A fort niveau de lumière, il vaut typiquement 15 000 à 25 000 photo-électrons par pixel (voir tableau). Ce nombre de photo-électrons fixe la capacité maximale de stockage pour chaque photosite avant saturation (ou "well depth"). Finalement, le rapport signal sur bruit RSB de détection est égal à :

$$RSB = \frac{\langle I \rangle}{\sigma_I} = \sqrt{N} \quad (2.6)$$

En valeur absolue le bruit augmente avec le niveau de lumière mais le signal varie plus rapidement que le bruit si bien que le rapport signal sur bruit est minimal à fort éclaircissement, de l'ordre de 100 pour le niveau d'un pixel, soit une fluctuation relative (égale à $1/\sqrt{N}$) de l'ordre de 1%.

Notons que pour obtenir précisément le nombre de photons reçus, il suffit alors de multiplier le nombre de photo-électrons par le rendement quantique.

Pour quantifier le niveau de bruit de photons après amplification, nous avons aussi évalué l'influence du niveau de gain pour chaque caméra. Le gain g est modélisé par une simple multiplication du niveau de lumière pour chaque photo-électron créé (par rapport au gain de référence $g=1$). La relation entre nombre de photo-électrons et niveau de lumière devient : $g N = a \langle I \rangle$, la statistique est maintenant décrite par :

$$\sigma_I^2 = \frac{g \langle I \rangle}{a} \quad (2.7)$$

Le nombre de photo-électrons créés diminue donc lorsque le gain est augmenté comme le rapport signal sur bruit, proportionnel à l'inverse de la racine carrée du gain.

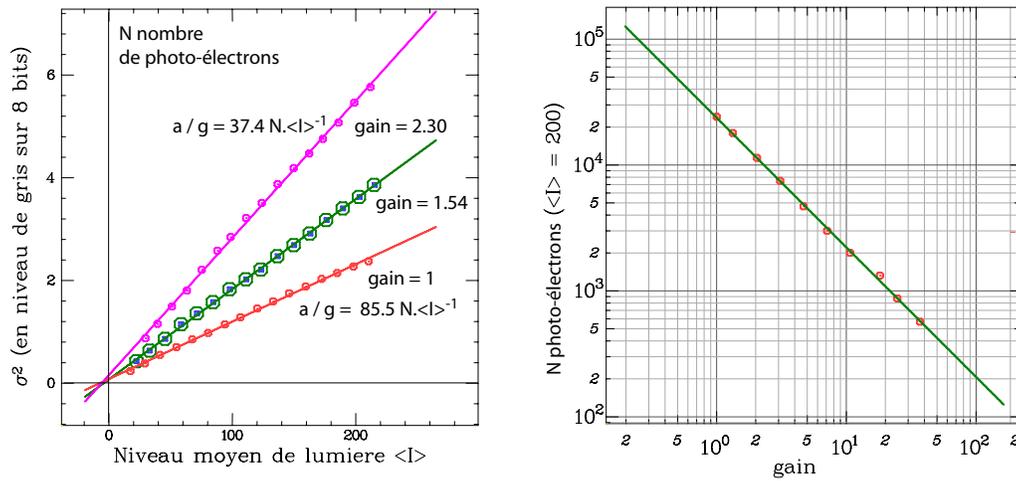


FIG. 2.10 – **Calibration absolue d'une caméra CCD en nombre de photo-électrons.** Fluctuations d'intensité mesurées par variance en fonction du niveau de lumière pour différents gains (à gauche, caméra CCD JAI-BM141GE). On obtient une variance proportionnelle à l'intensité moyenne pour la statistique en intensité. Les défauts de détection comme le bruit d'obscurité sont négligeables, le bruit est dominé par le bruit de photons. Nous avons illustré l'évaluation du bruit pour 3 gains distincts, pour le même niveau de lumière on observe une augmentation nette de la variance, proportionnelle au gain. Pour tester d'éventuelles corrélations spatiales entre pixels voisins, nous avons procédé à la même mesure de variance en formant des pixels équivalents de taille plus élevée, de 8 pixels par 8 pixels (points cerclés pour un gain de 2.05). Nous ne constatons pas de corrélations évidentes sur ces mesures. En répétant le procédé de calibration pour la gamme de gains accessibles pour une caméra donnée, on trace la courbe finale de calibration d'une caméra en nombre de photo-électrons par pixel en fonction du gain (à droite). Elle est caractérisée par une pente de -1.03 en échelle logarithmique.

A partir de la courbe de calibration $\sigma_I^2 = f(\langle I \rangle)$, nous pouvons aussi évaluer le bruit d'obscurité. Pour la caméra BM141GE par exemple, le niveau d'obscurité à gain minimal est atteint pour $\langle I \rangle = 6$ (offset d'obscurité en intensité) et représente 513 photo-électrons ($a = 85.5 N \cdot \langle I \rangle^{-1}$). Actuellement, les caméras de haute qualité présentent un bruit d'obscurité de quelques électrons, largement inférieur à notre mesure pour une caméra standard.

Nous pouvons aussi comparer le bruit de photons au bruit intrinsèque de discrétisation du signal. Il dépend du nombre d'électrons à saturation et du nombre de bits de numérisation. Pour un échelon de quantification Δq , on considère une statistique d'erreur de densité uniforme sur l'intervalle $[-\Delta q/2; \Delta q/2]$ dont la variance est égale à $\sigma_q^2 = \int_{-\Delta q/2}^{\Delta q/2} x^2 dx = \Delta q^2/12$. D'autre part, le nombre de photo-électrons associé à un échelon vaut $\Delta q = N_{sat}/(2^8 - 1)$, soit 78 photo-électrons pour un niveau de saturation de 20 000 et un codage en 8 bits. Pour établir un critère de comparaison entre bruit de discrétisation et bruit de photons on peut alors former le rapport entre leur fluctuation relative respective :

$$\frac{\sigma_N}{N} / \frac{\sigma_q}{N} = \frac{\sigma_N}{\sigma_q} = \frac{(2^{N_{bit}} - 1)\sqrt{12N}}{N_{sat}} = \sqrt{\frac{12g \langle I \rangle}{a}} \quad (2.8)$$

Pour la caméra BM141GE par exemple, et un niveau de lumière de 200 (ce niveau correspond à nos conditions courantes d'imagerie), soit $N = 17\,100$ photo-électrons à gain minimal, la fluctuation relative due au bruit de photons est de 0.7%, celle due au bruit de discrétisation est environ 5 fois inférieure et vaut 0.13%. Dans des conditions de niveau de lumière élevé, le bruit de photons domine donc le bruit de numérisation, et un codage plus fin, en 10 bits par exemple, ne diminuera pas le bruit de détection. Nous avons confirmé ce résultat en enregistrant des courbes de calibration en 8 et 10 bits, le niveau de bruit demeure identique.

Le tableau suivant compare finalement les différents niveaux de bruit mesurés en photo-électrons à saturation N_{sat} pour un échantillon de caméras CCD monochromes. Pour chacune, la fréquence d'acquisition est désignée par f , le nombre total de pixels par N_{pix} et la dimension des pixels d_{pix} , le nombre de photo-électrons à saturation est indiqué à gain minimal.

caméra	f (Hz)	N_{pix}	d_{pix} (μm)	N_{sat}	$N.\mu m^{-2}$
Jai CM140GE	31	1392(h)*1040(v)	4.65*4.65	15280	707
Jai BM141GE	30.1	1392(h)*1040(v)	6.45*6.45	22880	549
Jai CM040GE	61	776(h)*582(v)	8.3*8.3	18500	267
Jai CVA10GE	60	767(h)*576(v)	8.3*8.3	23120	336
	250	767(h)*71(v)	8.3*8.3	23120	336
Pulnix TM6740GE	200	640(h)*480(v)	7.4*7.4	23150	423
	1250	224(h)*160(v)	7.4*7.4	23150	423
Hamamatsu Orca 2R	8.5	1344(h)*1024(v)	6.45*6.45	22600	543

Pour comparer la qualité de chaque détecteur nous avons normalisé le nombre de photo-électrons par la surface active d'un pixel, il varie entre 270 et 700 photo-électrons par micron carré pour les caméras calibrées. Nous notons une diminution d'un facteur 2 du nombre de photo-électrons par unité de surface pour les caméras possédant des pixels de grande dimension. D'autre part, nous observons qu'une réduction de la région de lecture pour une caméra donnée se traduit par une augmentation de la fréquence d'acquisition sans ajout de bruit supplémentaire, le bruit de photons restant le bruit dominant (figure 2.11).

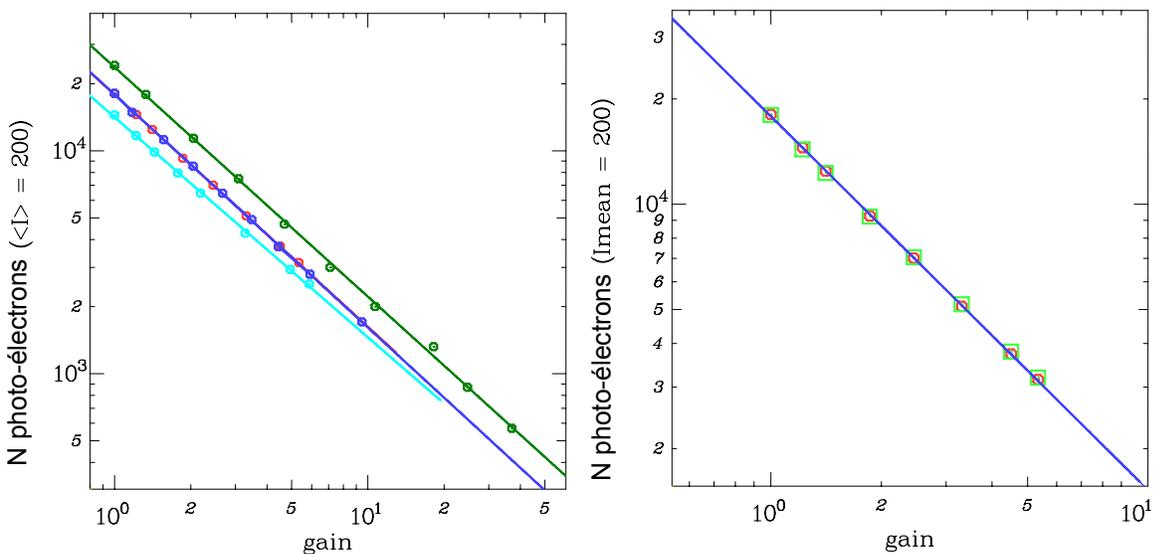


FIG. 2.11 – **Bruit de photons pour différentes caméras CCD et bruit par réduction de la région d'intérêt.** A gauche, nous avons reporté les courbes de calibration pour différentes caméras en fonction du gain. La pente des courbes de calibration vaut -1 ± 0.1 en échelle logarithmique. Pour augmenter la bande passante d'acquisition, on dispose de modes lectures à région d'intérêt réduite. A droite, nous présentons le bruit de détection dans deux modes (caméra Jai A10GE): un mode rapide à 250 Hz (points en vert) et un mode lent à 60 Hz (points en rouge). Dans les deux modes de lecture le bruit de photons est identique.

Conclusion : domaine d'utilisation des caméras

Dans des conditions d'imagerie où l'on utilise un niveau de lumière élevé, le bruit de photons est dominant. La limitation absolue du rapport signal sur bruit est alors fixée par le nombre de photo-électrons à saturation. Les résultats des calibrations absolues des caméras montrent que cette quantité maximale de photo-électrons n'est pas affectée par une augmentation de la fréquence d'acquisition. Une solution pour augmenter le rapport signal sur bruit est donc de réaliser des acquisitions haute fréquence pour accroître le nombre de photo-électrons créés, la contrainte expérimentale réside alors dans l'augmentation du niveau de lumière et du flux de photons incidents. Dans des conditions d'imagerie où l'on utilise un faible niveau de lumière, le bruit est dominé par le bruit d'obscurité, et l'utilisation de caméras spécialement optimisées est nécessaire (refroidissement de la matrice CCD, réduction du bruit d'amplification électronique).

2.5.2.2 Imagerie préliminaire à faibles dérives pour la caractérisation du bruit de photons

Après avoir montré que la détection vidéo était limitée par le bruit de photons, il s'agit maintenant de vérifier que le suivi de position demeure limité par cette source de bruit. Nous présentons donc une expérience préliminaire visant à établir la dépendance du bruit de pointé en (x,y) selon le bruit de photons.

Principe de l'imagerie

Pour limiter les dérives du système d'imagerie et clairement identifier la dépendance au bruit de photons, nous imageons un objet macroscopique fixe, un fil rigide de 0.1 mm de diamètre, à l'aide d'une lentille unique. Le grandissement du montage est égal à 4 et l'image du fil s'étend sur 50 pixels. Le rapport d'échelle entre cette imagerie macroscopique et l'imagerie microscopique des billes (d'un facteur 20) garantit une sensibilité plus faible aux déplacements de l'objet et réduit l'effet des dérives de position. En effet, la taille équivalente d'un pixel au niveau de l'échantillon vaut ici $2 \mu\text{m}$ alors qu'en imagerie microscopique elle vaut typiquement $0.1 \mu\text{m}$.

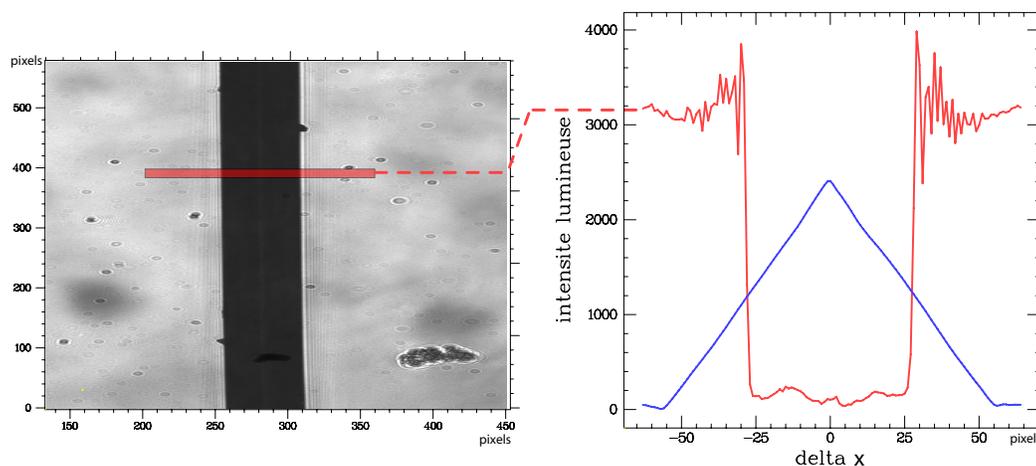


FIG. 2.12 – **Imagerie d'un objet macroscopique et suivi en position.** L'image du fil est reproduite à gauche. On en extrait un profil selon la largeur (en rouge à droite), il est moyenné verticalement sur une bande de 16 lignes (indiquée sur l'image), et ensuite traité par auto-convolution. La position du maximum du profil d'auto-convolution (en bleu) repère directement la position en x .

Nous appliquons ensuite l'algorithme de suivi de position transverse. Nous définissons une ré-

gion d'intérêt de 16 lignes sur une largeur de 128 pixels pour établir le profil d'intensité de cet objet unidimensionnel. Nous moyennons ce profil sur ces 16 lignes pour ensuite calculer sa fonction d'auto-convolution à chaque image (figure 2.12).

Confirmation d'une imagerie vidéo à faibles dérives et bruit de photons

Pour quantifier le bruit de position, nous calculons pour chaque enregistrement la densité spectrale des fluctuations de position (transformée de Fourier de la fonction d'auto-corrélation des fluctuations). Contrairement à l'évaluation dans l'espace temporel, elle permet d'estimer ce bruit indépendamment de la bande passante d'acquisition. Dans le cas d'une limitation par le bruit de photons, on s'attend à un bruit blanc auquel s'ajoute un bruit en $1/f^\alpha$ caractéristique des dérives de position dans le domaine basse fréquence.

Pour varier le nombre de photo-électrons reçus par unité de temps, nous réalisons des acquisitions pour un échantillon de fréquences comprises entre 60 Hz et 1.25 kHz, et le niveau de lumière est varié sur la totalité de la gamme de sensibilité pour chaque fréquence d'acquisition. Pour encore augmenter la dynamique de la mesure, nous explorons les gammes de gain disponibles pour les différentes caméras. Le flux de photo-électrons pour un niveau de lumière et un gain donnés est ensuite estimé à l'aide des courbes de calibration absolue en nombre de photo-électrons.

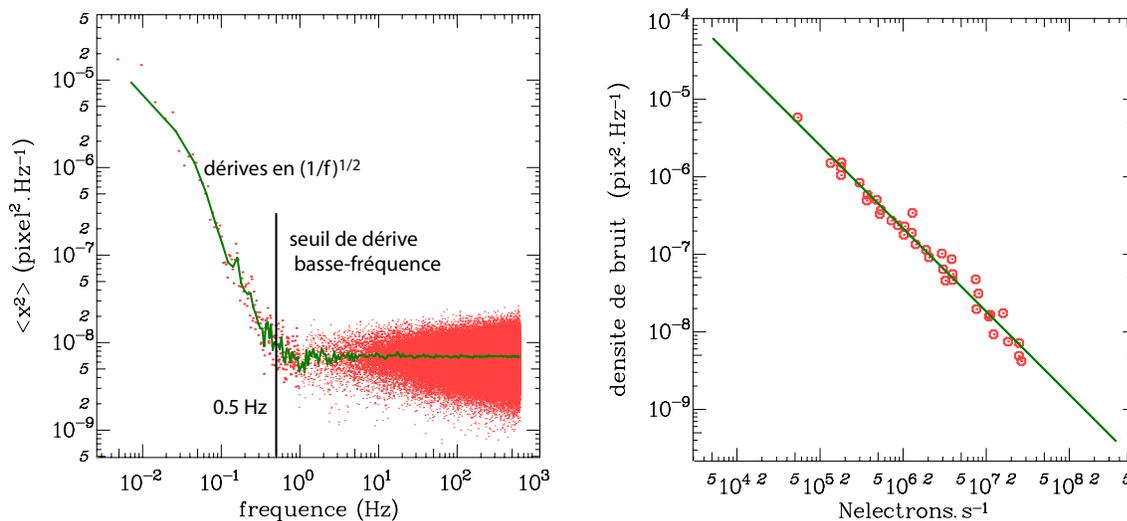


FIG. 2.13 – **Imagerie à faibles dérives et dépendance du bruit de position en fonction du flux de photo-électrons.** A gauche, nous illustrons une mesure de bruit de position par analyse spectrale. Le bruit est un bruit blanc de niveau $7 \cdot 10^{-9} \text{ pix}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$, l'enregistrement est réalisé pour une fréquence d'acquisition de 1.25 kHz. Les dérives basse fréquence sont caractérisées par une décroissance en $(1/f)^{1/2}$, et limitées à des fréquences inférieures à 0.5 Hz. A droite, nous reportons la courbe de niveau de bruit en fonction du flux de photo-électrons, caractérisée par une pente de -1.07 en échelle logarithmique. La densité de bruit est inversement proportionnelle au flux de photo-électrons sur plus de 3 décades.

Nos résultats démontrent finalement que le bruit de pointé est principalement limité par le bruit de photons: la densité de bruit de position est inversement proportionnelle au nombre de photo-électrons créés par unité de temps (figure 2.13). En augmentant le nombre de photons collectés et par conséquent de photo-électrons créés nous augmentons le rapport signal sur bruit pour chaque pixel du profil d'intérêt. Ainsi nous diminuons l'erreur commise sur le positionnement du maximum d'auto-convolution. Une stratégie simple pour augmenter la précision de pointé consiste donc à augmenter

simultanément le flux de photons et la fréquence d'acquisition.

Nous remarquons que l'imagerie réalisée présente de très faibles dérives limitées aux fréquences inférieures à 0.5 Hz.

Analyse théorique de la dépendance au bruit de photons

Pour comprendre comment le bruit de photons à l'origine des fluctuations d'intensité de chaque pixel intervient dans le bruit de pointé, nous allons prendre un exemple simple de profil et étudier formellement le bruit résultant du processus d'auto-convolution. Considérons un profil de largeur a et de forme rectangulaire tel que $P(x) = I(x) + \delta I_0$ avec $I(x) = I_0$ pour $-a/2 < x < a/2$ et $I(x) = 0$ ailleurs, où I_0 représente le niveau d'intensité du profil et δI_0 le niveau de bruit de photons associé à I_0 , homogène sur l'étendue du profil (figure 2.14).

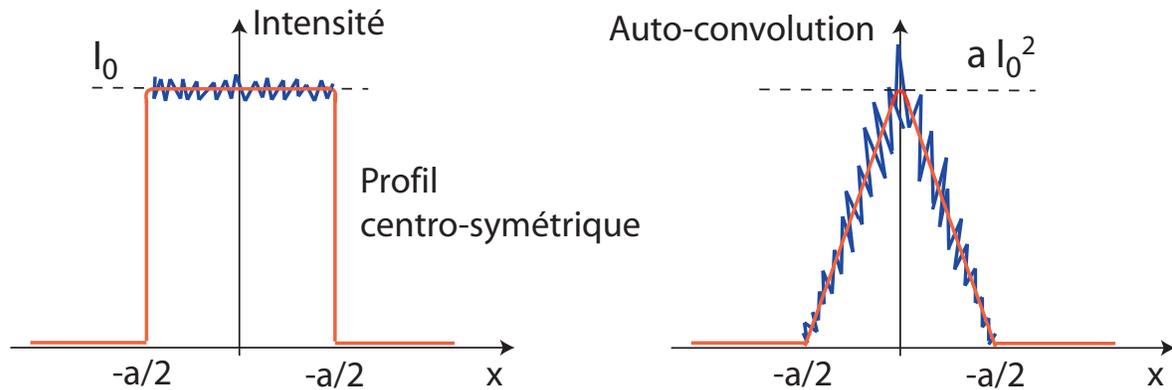


FIG. 2.14 – **Processus d'auto-convolution d'un profil centro-symétrique.** On considère un profil initial rectangulaire analogue au profil expérimental (à gauche) et affecté sur chaque pixel par un bruit de photons. On illustre sa fonction d'auto-convolution (à droite).

L'auto-convolution du profil d'intensité se calcule simplement par:

$$P * P' = \int_{-\infty}^{+\infty} [I(-x_0 + x) + \delta I_0] [I(x_0) + \delta I_0] dx_0 \quad (2.9)$$

Au premier ordre en δI , on peut écrire:

– pour $-a/2 < x \leq 0$

$$P * P' = (2I_0^2 + 4I_0 \delta I_0) (x + a/2) \quad (2.10)$$

– pour $0 \leq x < a/2$

$$P * P' = (2I_0^2 + 4I_0 \delta I_0) (-x - a/2) \quad (2.11)$$

La fonction d'auto-convolution est nulle en dehors de l'intervalle $[-a/2 ; a/2]$.

Le bruit augmente de manière monotonique entre $-a/2$ et 0 pour atteindre sa valeur maximale pour le maximum de la fonction d'auto-convolution et ensuite décroître de manière monotonique.

Connaissant le bruit associé à chaque point du profil, nous pouvons maintenant établir le lien entre fluctuations du maximum et bruit de photons. Le maximum du profil est défini par l'annulation de sa dérivée, ses fluctuations de position sont donc naturellement liées aux fluctuations de pente du profil au voisinage du maximum. Ces variations de pente locale δp se déduisent simplement de la somme des bruits affectant les deux pixels encadrant le maximum (déterminé par interpolation). On

exprime dans un premier temps ces niveaux de bruit en coordonnées discrètes, i -e en pixels. Pour le maximum (en $x=0$), il vient:

$$\delta(P * P')_{x_{max}} = 2I_0\delta I_0 a = 2I_0\delta I_0 n_{pix,a} d_{pix} \quad (2.12)$$

où $n_{pix,a}$ désigne la largeur du profil en nombre de pixels et d_{pix} la taille équivalente d'un pixel dans le plan d'observation.

Pour le voisinage du maximum, on écrit :

$$\delta(P * P')_{V(x_{max})} = 4I_0\delta I_0(-dx + a/2) = 4I_0\delta I_0(-1 + n_{pix,a}/2) d_{pix} \approx 2I_0\delta I_0 n_{pix,a} d_{pix} \quad (2.13)$$

L'approximation est valide pour $n_{pix,a} \gg 1$. On peut maintenant expliciter les fluctuations de pente locale au voisinage du maximum :

$$\delta p = \frac{\delta(P * P')_{x_{max}} + \delta(P * P')_{V(x_{max})}}{d_{pix}} = 4I_0\delta I_0 n_{pix,a} \quad (2.14)$$

Le bruit de pointé δx est égal aux fluctuations de la position du maximum et se déduit simplement des variations relatives de pente $\delta p/p$ au voisinage du maximum:

$$\delta x = \left(\frac{\delta p}{p}\right) d_{pix} = \frac{4aI_0}{p} \delta I_0 \quad (2.15)$$

La pente du profil d'auto-convolution est une donnée géométrique qui est directement déterminée par le profil initial. Dans le cas du profil choisi, on peut l'approcher par $p = 2I_0^2$ qui représente la pente dans un voisinage étendu du maximum. On peut généraliser cette situation en écrivant simplement la pente telle que $p = CI_0^2$ où C est un facteur de forme sans dimension qui tient compte du contraste du profil initial. Le bruit de pointé se formule alors par:

$$\delta x = \frac{a}{C} \frac{\delta I_0}{I_0} = \frac{a}{C} \frac{1}{\sqrt{N}} \quad (2.16)$$

où N représente le nombre de photo-électrons associé au niveau de lumière I_0 .

La variance du bruit de pointé est donc inversement proportionnelle au nombre de photons reçus. Chaque photon reçu dans la région d'intérêt donne une mesure de la position de l'objet avec une erreur égale à sa taille a (divisée par le facteur de forme), le cumul de ces photons permet alors de déterminer cette position avec une erreur relative proportionnelle à $1/\sqrt{N}$.

Le théorème de Parseval établit que la variance de la variable position est égale à l'intégrale de sa densité spectrale $S(f)$ sur la totalité du domaine spectral. Pour un bruit blanc dont la densité est uniforme sur l'ensemble du spectre expérimental de bande passante $\Delta f = f_{ac}/2$ (où f_{ac} désigne la fréquence d'acquisition), la densité spectrale (en $pix^2.Hz^{-1}$) s'exprime directement en fonction de la variance et du flux de photo-électrons $n = Nf_{ac}$ (en photo-électrons.s⁻¹):

$$S(f) = \frac{\sigma x^2}{\Delta f} = \left(\frac{n_{pix,a}}{C}\right)^2 \frac{1}{N\Delta f} = \left(\frac{n_{pix,a}}{C}\right)^2 \frac{2}{n} \quad (2.17)$$

Ce résultat théorique est en accord avec les données expérimentales, la densité de bruit de pointé est inversement proportionnelle au flux de photo-électrons créés, donc au flux de photons collectés, le suivi de position est effectivement limité par le bruit de photons.

Confrontation avec l'expérience

Nous avons considéré un profil théorique qui se compare au profil expérimental après moyennage spatial sur 16 lignes, le nombre de photons associés à chaque pixel du profil expérimental doit donc être multiplié par 16, et on obtient finalement pour la densité spectrale: $S(f) = (\frac{n_{pix.a}}{C})^2 \frac{1}{8n}$. La dépendance expérimentale de la densité spectrale en fonction du flux de photo-électrons (figure 2.13) est décrite par une loi du type $\log S(f) = -0.24 - 1.07 \log(n)$, elle permet d'extraire la valeur expérimentale de C : C=23 et de confirmer la limitation par le bruit de photons avec une décroissance de la densité de bruit inversement proportionnelle au flux de photons.

2.5.2.3 Dépendance au bruit de photons pour l'imagerie des billes magnétiques

Pour quantifier la dépendance du bruit de pointé selon le bruit de photons, nous suivons la position de billes fixes, de diamètre 1 μm , collées non-spécifiquement à la surface de l'échantillon. Le flux de photons incidents est augmenté pour des acquisitions à fréquence élevée et nous estimons les fluctuations de position de chaque bille par leur densité spectrale, dont le niveau est mesuré dans le régime haute-fréquence ($> 5 \text{ Hz}$).

Pour augmenter la fréquence d'acquisition sur une large gamme, nous utilisons trois caméras différentes. Pour chaque caméra dont les pixels possèdent des tailles différentes, nous prenons soin d'ajuster le grandissement pour maintenir la même taille équivalente pour un pixel dans le plan d'observation, soit 0.11 μm par pixel (à 10 % près). Ainsi l'image d'une bille concerne toujours le même nombre de pixels quelque soit la caméra utilisée, et nous pouvons directement reporter la densité spectrale de bruit en fonction du flux de photo-électrons par pixel (extrait des courbes de calibration des caméras).

Nous avons montré que le traitement d'images pour le suivi en (x,y) était limité par le bruit de photons. Nous pouvons généraliser la formulation de la résolution établie pour le profil rectangulaire au profil des billes en supposant une hypothèse additionnelle selon laquelle la distribution du bruit est homogène sur l'étendue du profil des billes. Cette approximation demeure valide puisque les variations de niveau du profil autour de sa valeur moyenne sont relativement faibles (inférieures à 50%). On pourra donc écrire que la densité de bruit en position selon x s'exprime génériquement par : $S(f) = (\frac{a}{C})^2 \frac{1}{n}$ où a représente la largeur typique du profil, C le facteur de forme sans dimension et n le flux de photo-électrons.

Pour la résolution en z, le positionnement est établi par mesure de la différence de phase entre le profil radial d'intérêt et le profil radial de référence le plus proche, notée $\Delta\phi$, cette mesure est ensuite convertie en position par la relation linéaire entre la variation locale de phase et la distance au plan focal:

$$z_{mes} = z_{ref} + \Delta\phi/a \quad (2.18)$$

où $a = \partial\phi/\partial z$ désigne les variations locales de phase, calculées entre les deux profils de référence encadrant le profil d'intérêt, z_{ref} la position du profil de référence et z_{mes} la position mesurée.

Les fluctuations de position δz sont donc proportionnelles aux fluctuations de phase du profil d'intérêt, notées $\delta\phi$: $\delta z = \delta\phi/a$. On peut en effet négliger les fluctuations du profil de référence de l'image de calibration, moyenné sur un nombre élevé d'images.

En considérant un profil radial décrit par une intensité de la forme $I(z,r) = I_0 f(r,z) \cos\phi(z,r)$, où $f(r,z)$ représente l'enveloppe de modulation du profil (de fréquence spatiale largement supérieure à celle de la phase), nous pouvons relier le bruit de phase en chaque point du profil au bruit d'intensité $\delta\phi$: $\delta I = I_0 f \sin\phi \delta\phi$ d'où $\delta\phi \propto \delta I/I_0$. On s'attend donc à diminuer le bruit de phase et à améliorer la précision de pointé selon z en réduisant le bruit de photons $\delta I/I_0$.

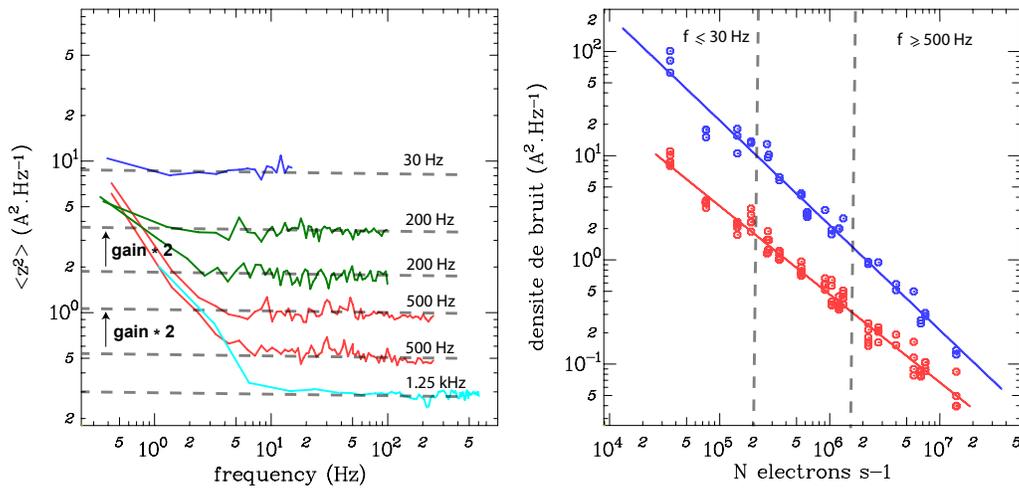


FIG. 2.15 – **Dépendance au bruit de photons pour le suivi d’une bille fixe.** *A gauche, illustration du bruit de pointé en z pour une série d’acquisition variant de 30 Hz à 1.25 kHz pour des gains variables. Une augmentation du gain se traduit par une élévation proportionnelle du niveau de bruit et dégrade la résolution. Le niveau de bruit blanc en z décroît d’un facteur 30 lorsqu’on augmente la fréquence d’acquisition de 30 Hz à 1.25 kHz. A droite, nous avons reporté les variations du niveau de bruit intrinsèque, en x,y (en rouge) et z (en bleu), en fonction du flux de photo-électrons. En échelle logarithmique, les relevés de densité de bruit (S) sont ajustés par une dépendance du type $\log S_0 - a \log(n)$ où n représente le flux de photo-électrons (courbes en rouge et bleu).*

Le suivi de billes fixes confirme la dépendance du bruit de pointé selon le bruit de photons. Selon les directions transverses (x,y), la densité spectrale de bruit diminue avec le flux de photons incidents selon une loi du type $\log S = \log S_{0,x,y} - 0.87 \log(n)$ (avec $\log S_0 = 4.8$). En exprimant la densité de bruit selon sa dépendance au bruit de photons : $S(f) = (\frac{a}{C})^2 \frac{1}{16n}$ (le profil initial étant moyenné sur 16 lignes), le préfacteur géométrique C vaut 10 pour une largeur typique du profil d’auto-convolution $a = 1 \mu\text{m}$ (obtenue pour des billes de $1\mu\text{m}$ de diamètre).

Pour une acquisition à 30 Hz et un nombre typique de photo-électrons créés par pixel de 10 000, on peut maintenant estimer la densité de bruit résultante en (x,y) : $(10^4/10)^2 / (16 * 10^3 * 30) = 2 \text{ Å}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$.

Selon la direction z la dépendance du bruit au flux de photons s’exprime par $\log S = \log S_{0,z} - 1.0 \log(n)$ avec $\log S_0 = 6.4$. On observe donc une décroissance moins rapide du bruit selon (x,y) avec le flux de photo-électrons cependant ce niveau de bruit demeure inférieur à celui mesuré en z .

Pour des acquisitions rapides ($\geq 500 \text{ Hz}$) les densités de bruit selon (x,y) et z atteignent des niveaux aussi faibles que quelques fractions de $\text{Å}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$ et garantissent une résolution sub-nanométrique selon les trois directions, comme nous allons le voir au paragraphe suivant.

2.5.3 Augmentation de la résolution spatiale par acquisition haute fréquence

Nous avons donc démontré que le bruit de pointé était limité par le bruit de photons et que l’atout des acquisitions haute fréquence à flux de photons élevé réside dans la diminution de la densité de bruit. Nous allons maintenant donner une estimation de la résolution dans l’espace temporel. Les mesures de position seront établies pour une bande passante fixée correspondant à une fréquence d’acquisition de 30 Hz qui représente la fréquence d’échantillonnage des caméras CCD standards. Nous pourrions ainsi évaluer le gain de résolution entre acquisition haute fréquence et acquisition standard.

Les dilatations thermiques de l’objectif induisent des fluctuations de la distance relative bille/plan

de focalisation et sont principalement à l'origine des dérives de position. Ces dérives sont donc fortement corrélées entre billes et un suivi de type différentiel permet de les réduire. Nous mesurons donc la position de plusieurs billes collées non-spécifiquement à la surface de l'échantillon et choisissons une bille comme référence de position pour soustraire sa position moyenne à celle de la bille d'intérêt. Nous appliquons cette stratégie au suivi de chaque bille avant d'évaluer la résolution intrinsèque du microscope.

2.5.3.1 Résolution intrinsèque transverse subnanométrique

Nous comparons deux suivis différentiels réalisés à haute et basse fréquence, pour 500 Hz et 30 Hz. La mesure de position enregistrée à haute fréquence est filtrée pour obtenir le signal équivalent à 30 Hz et comparer le bruit résultant sur la même bande passante. L'augmentation de la résolution est caractérisée par une diminution d'un facteur trois de l'écart type en position (figure 2.16). L'écart type obtenu résulte en effet de l'intégration d'un niveau de densité de bruit plus faible de $0.16 \text{ \AA}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$ pour l'acquisition haute fréquence, à comparer au niveau de bruit de $1.8 \text{ \AA}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$ pour l'acquisition à 30 Hz.

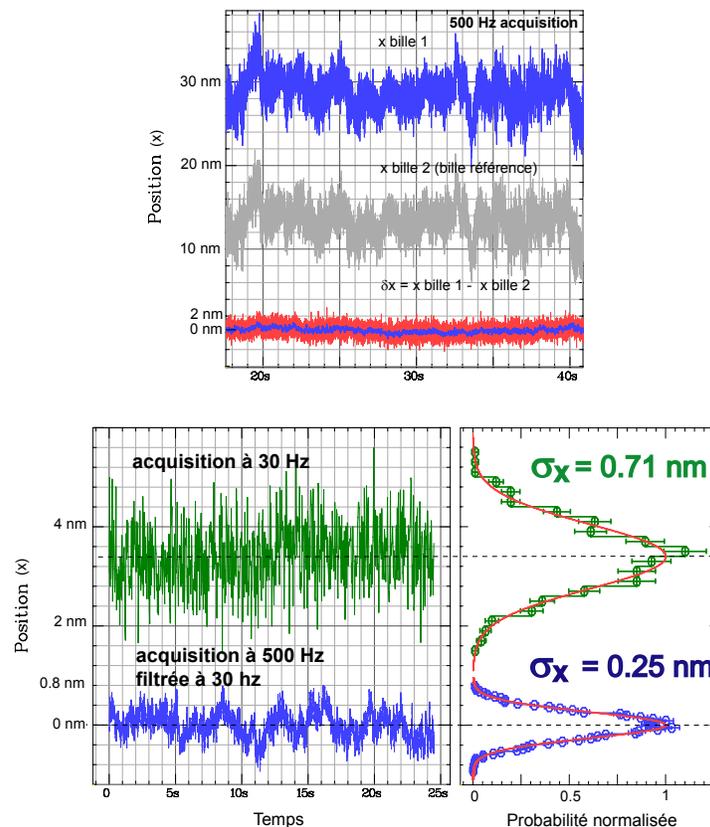


FIG. 2.16 – **Augmentation de la résolution transverse par acquisition haute fréquence.** Les dérives de position entre deux billes magnétiques fixes d' $1 \mu\text{m}$ de diamètre sont fortement corrélées (en haut). On soustrait donc la position de la bille d'intérêt (bille 1) à celle d'une bille de référence (bille 2) pour obtenir une mesure à faible dérive, le résultat est décalé selon z pour plus de clarté (position moyenne nulle en rouge). Celle-ci est ensuite filtrée à 30 Hz (en bleu). Nous présentons ensuite deux relevés de position enregistrés pour une acquisition à 30 Hz et pour une acquisition à 500 Hz filtrée à 30 Hz (en bas à gauche). Les histogrammes en position (à droite) sont établis pour une durée d'acquisition de 20 s et ajustés par des distributions gaussiennes d'écart type (σ).

Pour une fréquence d'acquisition multipliée par un facteur 16, on s'attend à une densité de bruit diminuée du même facteur et à une augmentation de la résolution d'un facteur $\sqrt{16} = 4$ en écart type. Cependant pour ces deux acquisitions, comparées pour des niveaux de lumière identiques, nous devons intégrer une correction qui prend en compte le nombre de photo-électrons créés par pixel : il est divisé par 1.75 pour les deux caméras utilisées (Jai CM140GE pour l'acquisition à 30 Hz et PULNIX TM6740GE pour l'acquisition à 500 Hz) et explique effectivement le gain d'un facteur $\sqrt{4/1.75} \approx 3$ en écart type. La résolution intrinsèque finalement obtenue à haute fréquence est caractérisée par un écart type de 0.25 nm et se compare très favorablement à l'état de l'art. Même à fréquence standard (30 Hz), elle est élevée et son écart type vaut 0.7 nm.

Nous tirerons profit de cette haute résolution transverse lors des mesures de hautes forces appliquées à des substrats courts (cf 3.4). Dans cette situation, la réduction du temps d'exposition imposée à chaque image permet d'estimer correctement les fluctuations browniennes transverses pour la mesure de la force. Malgré le faible niveau de lumière à exposition ultra-courte, nous pourrons maintenir la précision de pointé nécessaire.

2.5.3.2 Résolution intrinsèque axiale subnanométrique

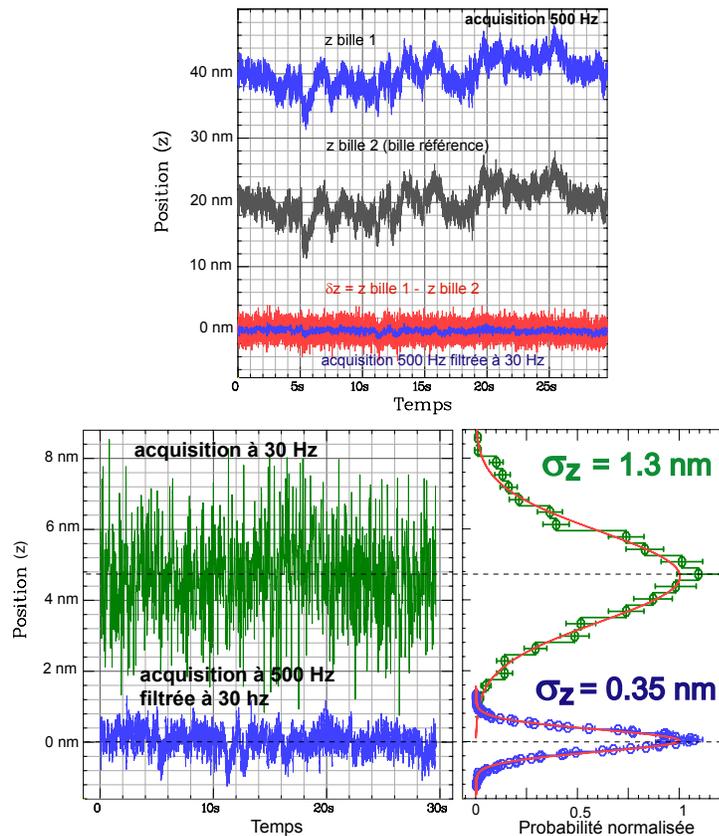


FIG. 2.17 – **Augmentation de la résolution axiale par acquisition haute fréquence.** Pour réduire les dérives de position, on soustrait la position de la bille d'intérêt (bille 1) à celle d'une bille de référence (bille 2), le résultat est décalé selon z pour plus de clarté (position moyenne nulle en rouge). Celle-ci est ensuite filtrée à 30 Hz (en bleu). Nous présentons ensuite deux relevés de position enregistrés pour une acquisition à 30 Hz et pour une acquisition à 500 Hz filtrée à 30 Hz (en bas à gauche). Les histogrammes en position (à droite) sont établis pour une durée d'acquisition de 30 s et ajustés par des distributions gaussiennes d'écart type (σ).

La résolution axiale intrinsèque représente une donnée cruciale des expériences en pinces magnétiques. Elle définit la précision avec laquelle on mesure la position de la bille et indirectement de toute protéine provoquant des changements d'extension du substrat.

Le résultat d'une acquisition haute fréquence (500 Hz) est une nette augmentation de la résolution caractérisée par un écart type aussi faible que 0.35 nm (pour une bille de $1\mu\text{m}$ de diamètre), soit l'extension d'une paire de base d'ADN double brin. Elle correspond à une densité spectrale de bruit à 500 Hz de $0.46 \text{ \AA}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$. Cette résolution s'approche de l'état de l'art actuel en pinces optiques à détection ponctuelle [1, 51, 83]. Dans nos conditions d'imagerie haute fréquence (grandissement de 80), cette résolution est applicable au suivi simultané de cinq billes en temps réel et à des essais biologiques pertinents. Ce niveau de résolution offrira donc la possibilité de caractériser, en pinces magnétiques, le mouvement de moteurs moléculaires se déplaçant le long de l'ADN avec la précision de la paire de base.

2.6 Conclusion

Nos principaux efforts pour améliorer le dispositif des pinces magnétiques se sont concentrés sur l'acquisition haute fréquence en temps réel et l'augmentation de la résolution du microscope optique. Ils attestent d'un principe de localisation optique simple : on peut détecter la position d'un objet avec une précision arbitrairement grande, pour peu que le nombre de photons émis par l'objet soit suffisant.

Ce principe de localisation a été démontré pour le suivi en (x,y) de molécules uniques fluorescentes et permet de déterminer la position de ces marqueurs avec une précision largement inférieure à leur taille apparente, limitée par la théorie de la diffraction [114, 126, 86]. Dans le cas de l'imagerie des billes magnétiques nous profitons d'une meilleure photo-stabilité par diffusion et le nombre de photons collectables est uniquement limité par les capacités des détecteurs CCD. Cet avantage nous permet finalement de localiser simultanément un nombre élevé de billes de faible taille ($1\mu\text{m}$ de diamètre) avec une précision sub-nanométrique selon les trois directions de l'espace.

En micromanipulation d'ADN particulièrement, les fluctuations browniennes du senseur de force constituent souvent le facteur limitant en précision. Dans la direction axiale, les fluctuations de position sont nettement plus rapides que l'acquisition vidéo et elles sont reliées aux fluctuations de la force de Langevin (introduite en I1.3.4) via la raideur du senseur k_z par la balance des forces (cf chapitre 3) : $k_z \langle \delta z^2 \rangle = 24\pi\eta r \Delta f$ où Δf désigne la bande passante de l'acquisition. Pour exploiter la haute résolution intrinsèque du dispositif, il faut donc travailler avec des raideurs conséquentes, i.e sur des substrats courts pour une force élevée et compatible avec une activité biologique. De même, la taille des billes doit être minimisée pour réduire l'amplitude des fluctuations. Au chapitre 4, nous démontrerons qu'une résolution sub-nanométrique est aujourd'hui accessible en pinces magnétiques sur des substrats ADN en épingle à cheveux de quelques centaines de nanomètres, liés à des billes de $1\mu\text{m}$ et étendus sous des forces modérées (10 pN). Nous envisageons donc d'appliquer l'acquisition haute fréquence et son degré de résolution à la caractérisation de l'activité de protéines sur de tels substrats [70, 78].

Chapitre 3

Mesures de force

3.1 Introduction

La force magnétique s'exprime simplement en fonction de la susceptibilité paramagnétique χ des billes et du gradient de champ dans le régime d'aimantation linéaire, sa norme vaut $F = \chi/(2\mu_0) \nabla B^2$ [57]. Cependant la relation non-linéaire entre le gradient du champ magnétique et la distance billes-aimants complique une calibration en force à partir de cette relation. De plus, la susceptibilité (donnée par le fournisseur) est fortement affectée par la variabilité naturelle en composition magnétique et en taille des billes (dans ce dernier cas la variabilité de susceptibilité résultante est triplée par la dépendance selon le volume).

On préfère donc adopter une solution générique et indépendante du champ magnétique, intégralement transposable aux autres systèmes de micromanipulation. Elle repose sur la quantification des fluctuations de position d'une particule piégée dans un potentiel harmonique et forcée hors de sa position d'équilibre par les fluctuations thermiques, le mouvement brownien est traité en tant que perturbation de l'équilibre mécanique imposé. La mesure de la force consiste alors en une mesure des fluctuations de position du senseur.

3.2 Mesurer la force magnétique

3.2.1 Dynamique du pendule moléculaire

Le système mécanique constitué par la bille liée au brin d'ADN peut-être assimilé à un pendule classique, inversé et amorti. La dynamique de la bille est gouvernée par un nombre limité d'interactions : la force magnétique, la tension du brin étiré, le frottement visqueux dissipatif et la force excitatrice de Langevin (introduite en I1.3.4).

Lorsque le pendule est forcé hors de sa position d'équilibre par l'agitation thermique, la résultante des forces exercées par l'ADN et les aimants fait apparaître une composante transverse de rappel F_r . Dans le régime des faibles déviations et selon la direction x , son module vaut $F_r = F/L \delta x = k_x \delta x$ avec $k_x = F/L$ la raideur du ressort équivalent, F la norme de la force magnétique (la force de gravité $< \text{fN}$ pour une bille magnétique micrométrique étant négligeable), et L l'extension moléculaire (figure 3.1).

Pour des déplacements à très faible nombre de Reynolds (et en ignorant la proximité de la surface de l'échantillon), le frottement visqueux F_v s'exprime par la traînée de Stokes: $F_v = 6\pi\eta r v$ où v désigne la vitesse de la bille, r son rayon et η la viscosité dynamique de l'eau. Dans ces conditions, les termes inertiels sont négligeables et l'équation du mouvement du pendule projeté sur la direction transverse x s'écrit:

$$6\pi\eta r \frac{\partial x}{\partial t} + k_x x = F_L \quad \rightarrow \quad \frac{\partial x}{\partial t} + \frac{x}{\tau} = \frac{F_L}{k_x} \quad (3.1)$$

où $\tau = \frac{6\pi\eta r}{k_x}$ représente le temps de réponse du système mécanique et F_L la force de Langevin.

Il s'agit de l'équation d'un pendule amorti à inertie négligeable. Cependant un forçage aléatoire supplémentaire est introduit par le mouvement brownien. Il complique nettement la résolution analytique du problème dans l'espace temporel direct. Dans l'espace réciproque des fréquences, l'expression élémentaire de la force de Langevin apporte une solution rapide et autorise une quantification directe de l'intégralité des paramètres mécaniques du système (cf 3.3).

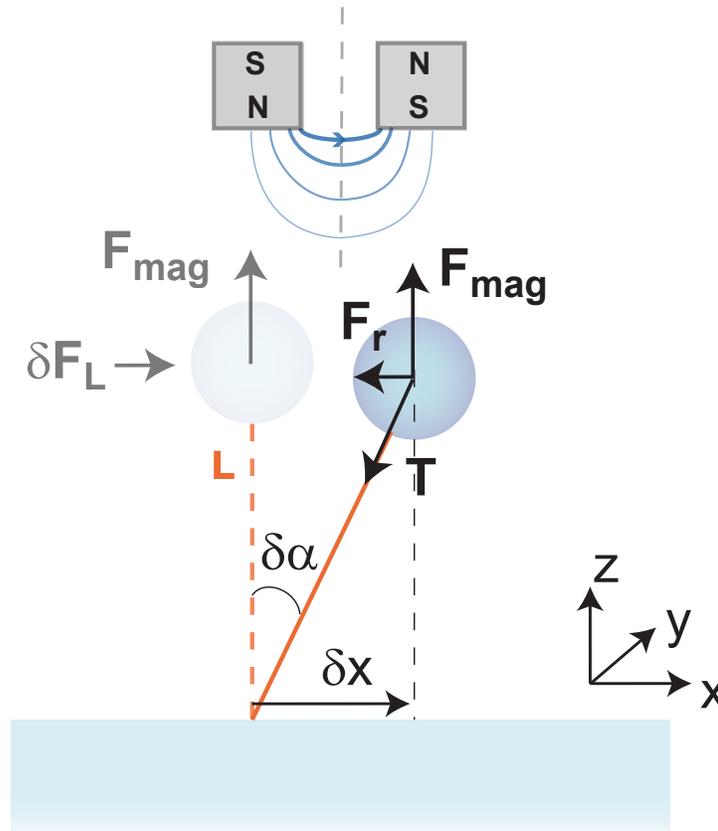


FIG. 3.1 – **Pendule moléculaire.** Sous l'effet d'une fluctuation thermique modélisée par δF_L , la bille initialement en position d'équilibre s'éloigne d'une amplitude δx de l'axe vertical, défini par le point d'application de la force et le point d'attache au sol. Le bilan des forces révèle alors une composante transverse dont le module selon la direction x vaut $F_r = T \sin \delta\alpha \approx F_{mag} \sin \delta\alpha \approx F_{mag} \delta x/L$. Cette force de rappel ramène la bille dans la configuration d'équilibre, elle est proportionnelle au déplacement en analogie avec un ressort mécanique de raideur F_{mag}/L .

3.2.2 Analyse des fluctuations transverses dans l'espace réel

Notre but est d'établir dans un premier temps une relation entre la force appliquée et la variance des fluctuations transverses de position.

La force de rappel introduite par la composante transverse de la force magnétique dérive d'une énergie potentielle $E_p(x) = 1/2 k_x \delta x^2$, elle traduit le piégeage de la bille dans un puits de potentiel harmonique. En condition d'équilibre thermodynamique, le théorème d'équipartition de l'énergie permet d'établir un rapport direct entre température et valeur moyenne de l'énergie potentielle distribuée sur chaque degré de liberté: $\langle E_p(x) \rangle = 1/2 k_B T$ ($1/2 k_B T$ pour chaque composante quadra-

tique de l'énergie). Les fluctuations transverses de position sont ainsi caractérisées par une variance inversement proportionnelle à la force, conformément à l'intuition l'amplitude moyenne des fluctuations est d'autant plus réduite que la force appliquée est importante (figure 3.2.A):

$$\sigma_x^2 = \langle \delta x - \langle \delta x \rangle \rangle^2 = \langle \delta x^2 \rangle = \frac{Lk_B T}{F} \quad (3.2)$$

où $\sigma_x^2 \equiv \langle \delta x^2 \rangle$ désigne la variance en position selon x . La quantification des fluctuations par la variance apporte donc une première estimation de la force :

$$F = \frac{k_B T L}{\langle \delta x^2 \rangle} \quad (3.3)$$

Usuellement la calibration en force des pinces magnétiques emploie une molécule de longueur de contour de $16 \mu\text{m}$, l'ADN- λ de 48.5 kB. Prenons donc cet exemple, illustré par la figure 3.2 : pour une extension $L = 12.98 \mu\text{m}$, la variance de $0.024 \mu\text{m}^2$ ($\pm 10\%$) permet de calculer une raideur de $1.69 \cdot 10^{-4} \text{pN.nm}^{-1}$ (à 25°C) et une force de $2.2 \text{pN} \pm 10\%$ pour une valeur attendue de 2.4pN (calculée à partir de l'aimantation des billes et du gradient de champ).

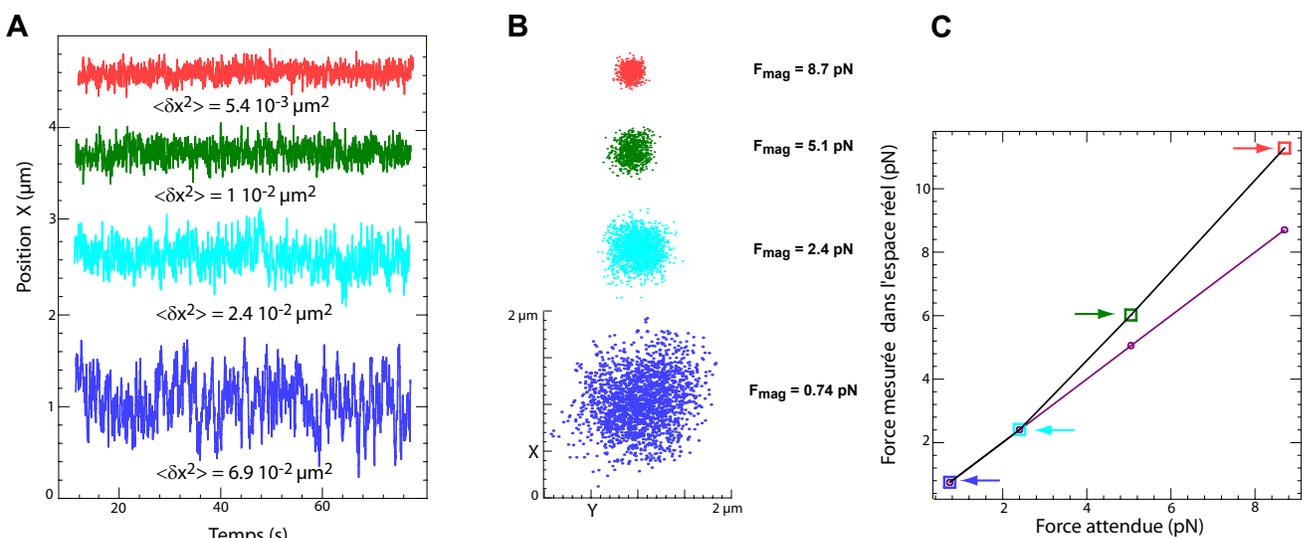


FIG. 3.2 – **A. Fluctuations browniennes de position.** La molécule d'intérêt est un ADN- λ de longueur variant de 12.98 à $14.74 \mu\text{m}$. La variance $\langle \delta x^2 \rangle$ des fluctuations est mesurée sur un enregistrement de 2048 images pour quatre forces distinctes. **B. Fluctuations transverses de position.** Enregistrement des fluctuations dans le plan transverse, la distribution des fluctuations suit une loi gaussienne dont la variance est inversement proportionnelle à la force. Les fluctuations sont isotropes et les forces indiquées sont les forces attendues. En A et B, les courbes ont été décalées selon la direction x pour plus de clarté. **C. Mesures de force dans l'espace réel.** La courbe en violet indique la force attendue établie à partir de l'aimantation des billes utilisées (MyOne Invitrogen) et du gradient de champ mesuré. Les flèches de couleur précisent les points de force correspondants aux traces temporelles. Pour $F = 5.1 \text{ pN}$ l'estimation des forces par analyse dans l'espace direct est robuste. Pour une force attendue de 8.7 pN , la force mesurée de 11.3 pN est sur-estimée de 30% , la variance est donc largement sous-estimée. L'acquisition est réalisée à 31 Hz .

Du point de vue de la mesure, une bande passante infinie permettrait d'échantillonner idéalement les fluctuations browniennes de position. Le suivi de la position d'une bille est cependant réalisé par microscopie vidéo de fréquence d'acquisition limitée. Les détecteurs optiques utilisés, essentiellement des caméra CCD, offrent une bande passante finie, couramment limitée à quelques dizaines de

hertz. Pour chaque image enregistrée, la position instantanée est intégrée sur une durée d'exposition finie. Ce filtrage temporel moyenne l'amplitude des fluctuations rapides et réduit mécaniquement la variance mesurée, conduisant au sous-échantillonnage des fluctuations.

Dans notre exemple, le temps caractéristique du pendule fluctuant est estimé à:

$$\tau = \frac{6\pi \cdot 10^{-3} \cdot 0.5 \cdot 10^{-6}}{1.69 \cdot 10^{-7}} = 55.7ms \quad (3.4)$$

pour une fréquence d'acquisition de 31 Hz, soit un temps d'exposition de 32 ms. L'effet de moyennage est faible et la mesure de force est acceptable.

Cependant, pour une même acquisition à 31 Hz et une analyse dans l'espace réel, la validité de la calibration en force est limitée à 5 pN (erreur < 10 %), au-delà le temps caractéristique devient supérieur au temps d'exposition. Pour une force attendue de 8.7 pN par exemple, le temps caractéristique mesuré est de 12.3 ms (figure 3.2.C) et l'erreur systématique sur la mesure de force dépasse 20 %. Dans cette situation, la variance est alors sous-estimée et la force sur-estimée.

Un temps d'exposition inférieur au temps caractéristique du pendule constitue donc une condition suffisante pour la mesure de force dans l'espace réel, cette condition limite cependant la gamme de mesure à 5 pN pour un ADN- λ et une acquisition standard à 31 Hz. Nous allons donc présenter une autre méthode d'analyse des fluctuations : l'analyse spectrale qui présente deux avantages principaux, la correction des dérives basse-fréquence de position et une première extension de la gamme de force mesurable par intégration des corrections d'échantillonnage.

3.2.3 Analyse spectrale des fluctuations transverses

3.2.3.1 Mise en pratique

Dans l'espace réciproque, la force de Langevin est décrite par un spectre de puissance à bruit blanc de niveau $|\tilde{F}_L(f)|^2 = 24\pi\eta r k_B T$ qui correspond à la transformée de Fourier de sa fonction d'auto-corrélation. Le mouvement brownien fournit donc une excitation mécanique uniformément distribuée sur l'ensemble du spectre.

Traduisons donc la réponse mécanique du pendule en terme de spectre de puissance $P(f)$ exprimé en $m^2 \cdot Hz^{-1}$, f désignant la fréquence. En opérant la transformée de Fourier de l'équation du mouvement (équation 3.1), on obtient dans un premier temps:

$$\tilde{x}(f) = \frac{\tilde{F}_L}{k_x} \frac{1}{1 + \frac{f}{2\pi\tau}j} \quad (3.5)$$

où $\tilde{x}(f)$ désigne la densité d'amplitude en position, exprimée en $m \cdot Hz^{-1/2}$.

On en déduit le spectre de puissance des fluctuations:

$$P(f) = |\tilde{x}(f)|^2 = \frac{24\pi\eta r k_B T}{k_x^2} \frac{1}{1 + (f/f_C)^2} = \frac{x_0^2}{1 + (f/f_C)^2} \quad (3.6)$$

La réponse du pendule est donc celle d'un filtre passe-bas de forme lorentzienne et de fréquence de coupure $f_C = 1/2\pi\tau = k_x/(12\pi^2\eta r)$.

Dans le régime des basses fréquences, i-e à une échelle de temps supérieure au temps caractéristique, le pendule répond efficacement et sans délais à l'excitation thermique, la composante de rappel domine le mouvement. Au delà de la fréquence de coupure, l'amplitude des fluctuations est amortie par la dissipation visqueuse.

Dans le cas d'une fréquence de coupure inférieure à $f_{Nyquist} = f_{acquisition}/2$, la variance des fluctuations égale à l'intégrale du spectre de puissance est correctement évaluée sur la bande passante finie d'acquisition, les composantes haute fréquence supérieures à $f_{Nyquist}$ sont fortement atténuées

par viscosité et naturellement négligeables par intégration. L'échantillonnage des fluctuations est donc robuste tant que $f_c \ll f_{Nyquist}$.

Après traitement des trajectoires transverses par transformée de Fourier, on ajuste une fonction lorentzienne aux spectres de puissance obtenus pour extraire la valeur de la densité spectrale d'amplitude x_0^2 au niveau du plateau basse-fréquence et la fréquence de coupure caractéristique f_c . Ces deux paramètres expérimentaux permettent alors de déterminer les raideurs transverses et la force appliquée par application du théorème d'équipartition. (figure 3.3.A).

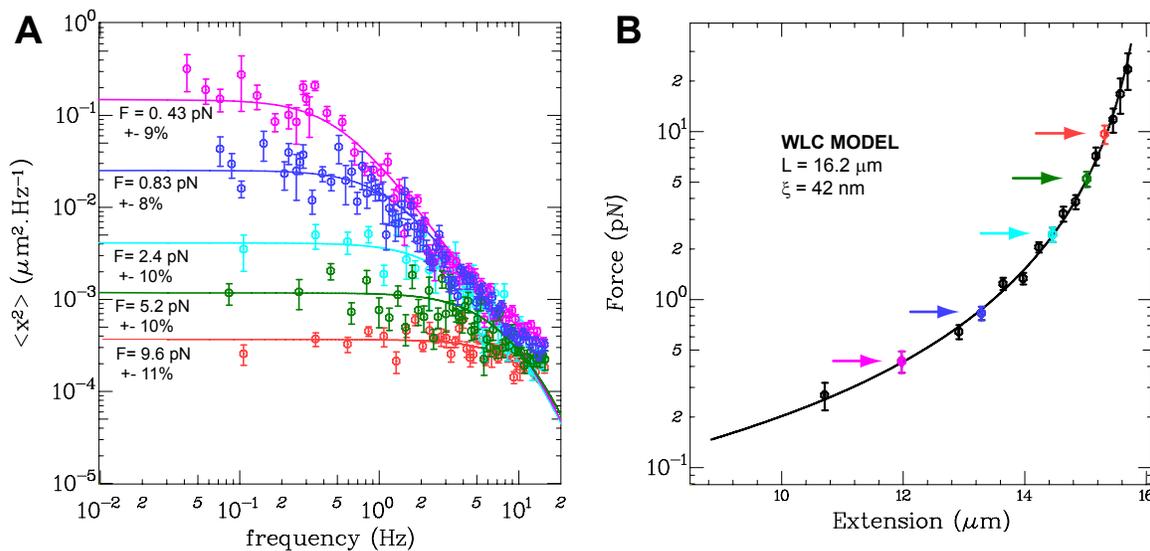


FIG. 3.3 – A: Mesures de force par analyse spectrale. Les données expérimentales représentent les spectres de puissance calculés selon la direction x , en traits pleins les spectres lorentziens ajustés permettent la mesure des paramètres mécaniques. L'échantillonnage est effectué via une acquisition vidéo à la fréquence de 31 Hz ($f_{Nyquist} = 15.5$ Hz). La molécule d'intérêt est un ADN double brin de 48.5 kB et de longueur de contour de $16.2 \mu\text{m}$ (λ -DNA) placée dans un tampon de passivation (PBS 1 \times , 5mM EDTA, 0.2 % BSA) à 25°C. Dans le régime de force visité, la grande taille du substrat garantit une erreur négligeable sur l'extension moléculaire et une limitation de la fréquence de coupure, qui reste inférieure à $f_{Nyquist}$: pour $F = 9.6 \text{ pN}$, $f_c = 8.7 \text{ Hz}$. Chaque point de force est obtenu après traitement spectral d'une trajectoire enregistrée sur une séquence de 1024 images successives à haute force ($\approx 30 \text{ s}$), à faible force la durée d'acquisition est nettement augmentée (8192 images). Dans ces conditions, la mesure de la force démontre une faible erreur relative de l'ordre de 10 %.

B: Comportement élastique de l'ADN double brin. La courbe de force-extension obtenue permet de tester l'accord au modèle WLC (worm-like-chain) ou modèle du ver. La longueur de persistance mesurée $\xi = 42 \text{ nm}$, en accord avec la valeur généralement citée (50 nm). Le report des forces mesurées en A. est indiqué par les flèches colorées (les fluctuations transverses de la figure 3.1 correspondent aux mêmes mesures).

3.2.3.2 Corrections des dérives basse fréquence

La mesure de position dans le plan (x,y) est souvent affectée par des dérives lentes de position. La stabilité mécanique du microscope est directement liée aux dérives thermiques différentielles des composantes de l'appareil, aux vibrations du bâti ou encore aux micro-flux générés par les contraintes de pression extérieure agissant sur la chambre micro-fluidique relativement élastique. Dans le plan (x,y), la position relative objectif-bille peut donc être soumise à des variations de plusieurs dizaines de nanomètres pour des temps d'acquisition de l'ordre de la minute.

Lors de l'enregistrement des fluctuations transverses pour la mesure de force, ces dérives se manifestent par une densité de bruit en $1/f^\alpha$ (avec $0.5 < \alpha < 2$) qui s'ajoute au spectre de puissance

attendu dans le domaine des basses fréquences (figure 3.4). Pour éviter une sur-estimation de la variance mesurée par intégration de cette composante artificielle, on supprime les premiers modes basse-fréquence lors de l'ajustement du spectre lorentzien au spectre expérimental.

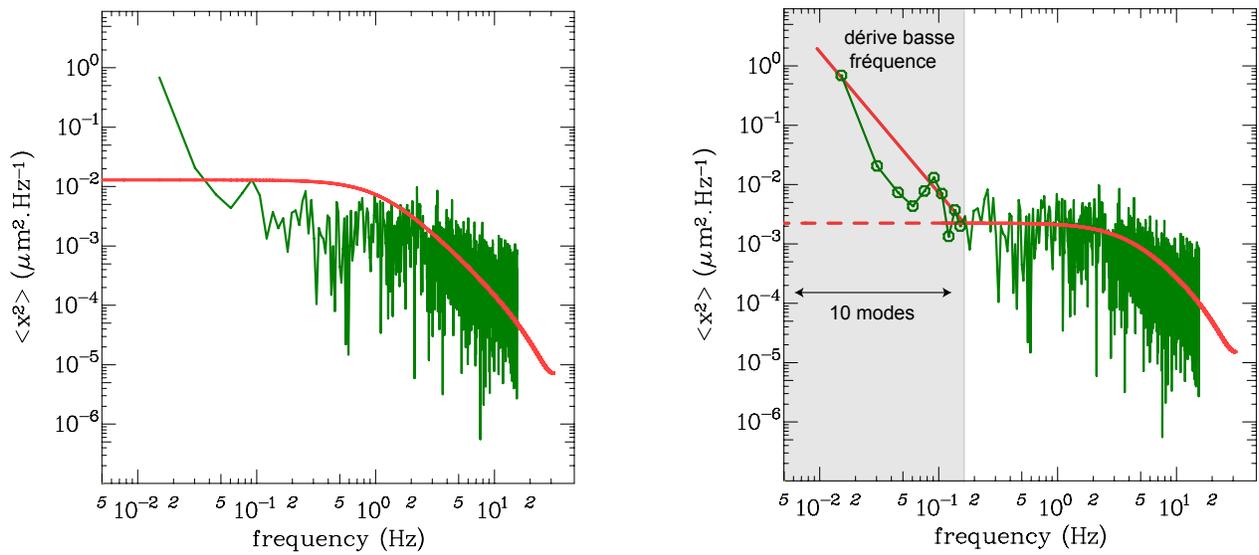


FIG. 3.4 – **Effet des dérives basse fréquence.** A gauche, le spectre lorentzien (courbe en rouge) est ajusté au spectre de puissance expérimental (en vert) sans correction des dérives, il est caractérisé par une densité de puissance à fréquence nulle $x_0^2 = 1.29 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$ et une fréquence de coupure $f_c = 1.15 \text{ Hz}$, soit une raideur de $1.723 \cdot 10^{-4} \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. A droite, le spectre est corrigé des dérives par suppression des 10 premiers modes, on obtient le nouveau jeu de paramètres : $x_0^2 = 2.25 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$, $f_c = 4.01 \text{ Hz}$, soit une raideur de $2.824 \cdot 10^{-4} \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. Sans correction des dérives, l'erreur sur la force (correspondant à l'erreur sur les raideurs) est donc de 40% et la force apparaît plus faible que sa valeur réelle. Notre exemple a été établi sur une trajectoire à forte dérive de l'ordre de $1 \mu\text{m} \cdot \text{mn}^{-1}$. Pour un microscope thermalisé, les plus faibles dérives introduisent potentiellement une erreur de 10%.

3.2.3.3 Corrections du spectre de puissance et extension du domaine de force mesurable

Les trajectoires obtenues par imagerie vidéo et analysées dans l'espace de Fourier peuvent être dégradées par le système d'acquisition. Les deux effets les plus délétères sont le repliement spectral et le moyennage temporel du signal.

Effet de la discrétisation

On suppose ici que le temps d'intégration est infiniment court pour négliger les effets de moyennage. Le signal de position étant échantillonné à la fréquence vidéo, la position mesurée $x_{mes}(t)$ s'écrit comme le produit d'un peigne de Dirac de période temporelle égale au temps d'échantillonnage $t_{ac} = 1/f_{acquisition}$ par la position réelle $x(t)$:

$$x_{mes}(t) = x(t) \times \sum_{n=-\infty}^{n=+\infty} \delta(t - nt_{ac}) \quad (3.7)$$

où n est entier. Par transformée de Fourier, la densité de position est convoluée par un peigne de Dirac de fréquence $f_{ac} = f_{acquisition}$:

$$\tilde{x}_{mes}(f) = \tilde{x}(f) * \sum_{n=-\infty}^{n=+\infty} \delta(f - n f_{ac}) \quad (3.8)$$

Le spectre de puissance obtenu après repliement spectral s'exprime donc:

$$P_{mes}(f) = P(f) * \sum_{n=-\infty}^{n=+\infty} \delta(f - n f_{ac}) = \sum_{n=-\infty}^{n=+\infty} \frac{x_0^2}{1 + (f - n f_{ac}/f_C)^2} \quad (3.9)$$

La discrétisation temporelle introduit une répétition périodique du spectre réel dans le spectre mesuré (figure 3.5). Ainsi lorsque la fréquence de coupure devient de l'ordre de la fréquence d'acquisition, les composantes hautes fréquences du signal sont artificiellement repliées dans la fenêtre spectrale d'analyse, comprise entre 0 et $f_{Nyquist}$.

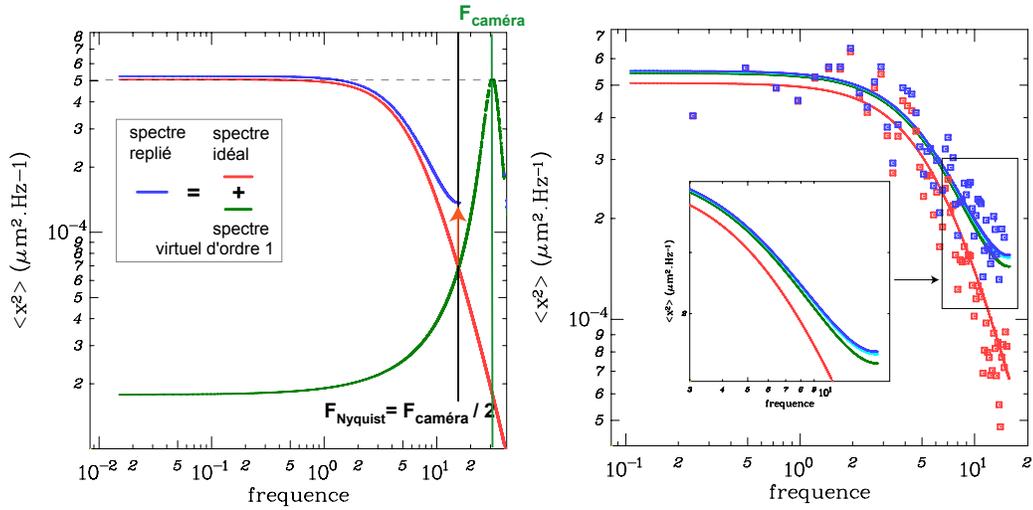


FIG. 3.5 – **Effet du repliement spectral.** A gauche, le spectre lorentzien initial de fréquence de coupure 6.2 Hz (en rouge) est répliqué par l'échantillonnage à 31 Hz. Nous avons représenté le premier ordre virtuel de convolution $n=1$ en vert et le résultat du repliement de cet ordre (en bleu) dans la fenêtre spectrale accessible. A droite, l'effet du repliement est traduit sur le spectre expérimental correspondant. Le spectre expérimental est représenté en bleu, le spectre corrigé du repliement en rouge de fréquence de coupure 6.2 Hz, en agrandissement l'effet du repliement est illustré avec intégration des repliements pour les ordres $n=(-1,1)$ en vert, puis $n=(-2,-1,1,2)$ en cyan et $n=(-3,-2,-1,1,2,3)$ en bleu. Pour le spectre expérimental initial, la fréquence de coupure estimée par ajustement lorentzien est de 8.7 Hz avec une raideur de $5.7 \cdot 10^{-4} \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$, pour le spectre corrigé on obtient le jeu de paramètres $f_C = 6.2 \text{ Hz}$ et $1.3 \cdot 10^{-3} \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$, sans correction du repliement l'erreur sur la force de 10.2 pN est supérieure à 50%.

Effet du temps d'intégration

L'effet de filtrage temporel a été évoqué comme une limitation des mesures de force dans l'espace réel, il affecte à la fois les deux types d'analyse, temporelle et spectrale. Dans l'espace de Fourier, il s'exprime simplement en fonction du temps d'exposition imposé à chaque image.

Dans ce but, nous modélisons la fonction de réponse $R(t)$ du détecteur CCD par une moyenne temporelle idéale de poids constant sur la durée d'intégration. Elle est exprimée par une fonction

"porte" unitaire de largeur temporelle W telle que $R(t) = 1/W$ pour $0 < t < W$ et $R(t) = 0$ ailleurs, avec $\int_t^{t+w} R(t)dt = 1$. Toute trajectoire mesurée $x_{mes}(t)$ résulte donc de la convolution de la position idéale $x(t)$ par la fonction de réponse :

$$x_{mes}(t) = x(t) * R(t) = \int_t^{t+w} R(t-t')X_{th}(t')dt' \quad (3.10)$$

Par transformée de Fourier, le spectre de puissance mesuré s'écrit alors:

$$P_{mes}(f) = |\tilde{x}(f)|^2 |\tilde{R}(f)|^2 = \frac{X_0}{1 + (f/f_C)^2} \left(\frac{\sin(\pi f/W)}{\pi f/W} \right)^2 \quad (3.11)$$

Le spectre expérimental peut donc être corrigé numériquement sur chaque mode par la fonction sinus cardinal, la durée d'exposition étant connue.

Reprenons notre exemple pour un ADN- λ étiré sous 5 pN, illustré par la figure 3.6. A partir du spectre expérimental, on corrige dans un premier temps l'effet d'intégration finie de l'acquisition vidéo puis on calcule la variance par intégration pour le spectre brut et le spectre corrigé. Cet effet introduit alors une erreur relative pour l'évaluation de la variance et de la force de 20%. On retrouve une erreur comparable avec celle commise par traitement des fluctuations dans l'espace réel, avec un temps d'exposition de 32 ms voisin du temps caractéristique $\tau = 1/(2\pi f_C) = 26$ ms (acquisition vidéo à 31 Hz).

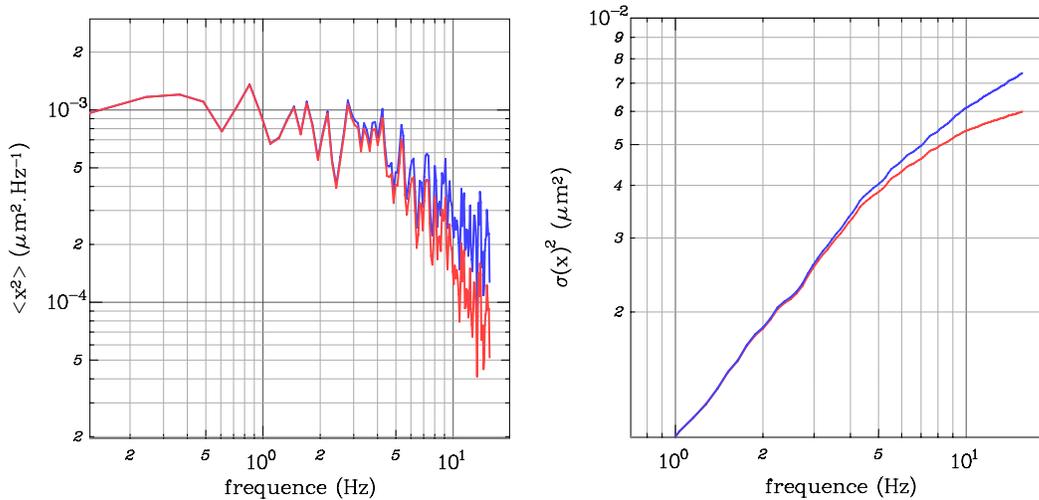


FIG. 3.6 – **Effet du temps d'intégration.** A gauche, nous représentons les spectres des fluctuations de position transverse, spectre expérimental brut en rouge et spectre corrigé de l'effet d'intégration en bleu. La correction intervient principalement dans la partie haute fréquence du spectre. A droite, nous calculons les deux variances associées aux spectres par intégration. L'effet d'intégration produit une sous-estimation de la variance initialement mesurée (en rouge).

Intégration globale des corrections

En intégrant les deux effets de distorsions intervenant dans l'analyse spectrale, le spectre des fluctuations mesurées s'expriment finalement par :

$$P_{mes}(f) = \sum_{n=-\infty}^{n=+\infty} \frac{x_0^2}{1 + (f - n f_{ac})/f_C)^2} \left(\frac{\sin(\pi(f - n f_{ac})/W)}{\pi(f - n f_{ac})/W} \right)^2 \quad (3.12)$$

En présumant la forme du spectre attendu, on peut donc expliciter numériquement ces artefacts et les corriger sur chaque spectre enregistré. Ce processus de correction permet alors d'augmenter le domaine de force mesurable pour un ADN- λ à 10 pN par analyse spectrale réalisée pour une acquisition à 31 Hz, alors que l'analyse temporelle ne permet pas de mesurer correctement des forces supérieures à 5 pN dans les mêmes conditions (erreur < 10%).

Comme nous l'avons vu au paragraphe 3.2.2, la condition pour une mesure précise de force par analyse temporelle est satisfaite pour un temps d'exposition inférieur au temps caractéristique du pendule : $W \leq \tau$. Dans le cas d'une exposition totale de chaque image vidéo, la fréquence d'acquisition est égale à l'inverse du temps d'exposition et cette condition se traduit dans l'espace réciproque par : $f_C \leq f_{ac}/2\pi \approx f_{Nyquist}/3$. L'extension du domaine de force mesurable par analyse spectrale correspond en fait à une nouvelle condition sur la fréquence de coupure : $f_C \leq 2f_{Nyquist}/3$. Le domaine de force mesurable est donc étendu d'un facteur 2 par analyse spectrale. Pour des forces plus hautes, le nombre de modes de fréquence supérieure à f_C est trop faible pour une estimation précise de la fréquence de coupure [119].

3.2.4 Validité des mesures à basse force

Pour une estimation robuste des fluctuations, le temps de mesure doit être largement supérieur au temps de corrélation des fluctuations. Par transformée de Fourier inverse, le spectre de puissance, de forme lorentzienne et de fréquence de coupure f_C , se traduit dans l'espace réel par une fonction d'auto-corrélation de forme exponentielle décroissante et de constante de temps $\tau = 1/(2\pi f_C)$: sur une échelle de temps inférieure à τ les fluctuations sont effectivement corrélées. L'interprétation physique est simple : la force de dissipation visqueuse introduit cette échelle temporelle de corrélation en gommant la réponse au mouvement brownien dans le domaine des hautes fréquences, i-e pour $f > f_C$. D'un point de vue qualitatif, on peut considérer que le nombre N d'échantillons temporels distincts et indépendants, enregistrés sur une durée d'acquisition t_{tot} , est tel que $N = t_{tot}/\tau$, l'erreur relative sur la variance est alors proportionnelle à $\sqrt{1/N} \approx \sqrt{t/t_{tot}}$, l'erreur sur la force suivant la même dépendance.

Du point de vue de l'analyse fréquentielle, on doit augmenter le nombre de modes utiles dans le domaine des basses fréquences pour une estimation valide de la variance.

Dans le cas des mesures à basse force, la fréquence de coupure est très inférieure à la fréquence d'acquisition (f_{ac}), la variance mesurée sur la bande passante expérimentale calculée à l'aide du théorème de Parseval s'exprime alors par :

$$\langle \delta x^2 \rangle = \int_0^{f_{ac}/2} P(f) df \approx \int_0^{+\infty} P(f) df = \int_0^{+\infty} \frac{x_0^2}{1 + (f/f_C)^2} df = \frac{\pi}{2} x_0^2 f_C \quad (3.13)$$

L'erreur commise sur la variance est donc liée aux indéterminations sur la densité spectrale des fluctuations basse-fréquence x_0^2 . Sa valeur est mesurée sur le spectre expérimental à partir des modes compris entre le mode 0 et le mode correspondant à f_C i-e $N * f_C/f_{ac}$ où N désigne le nombre total de modes (figure 3.7). Ces modes sont situés dans le domaine basse fréquence où l'amortissement par viscosité est négligeable et le bruit affectant la valeur de la densité spectrale y est correctement représenté par un bruit blanc. La distribution des valeurs de x_0^2 sur ces N_c modes suit donc une loi de Poisson et chaque mode peut-être considéré comme indépendant. Par conséquent, l'erreur relative sur x_0^2 est égale à $1/\sqrt{N_c} = \sqrt{\frac{f_{ac}}{N * f_C}} = 1/\sqrt{\frac{2 * \pi * \tau}{t_{tot}}}$. Pour une bonne précision sur la mesure de la force (< 10%), le spectre expérimental doit au moins contenir une centaine de modes pour les fréquences inférieures à f_C .

Ainsi les durées d'acquisition nécessaires pour ces mesures de faible force deviennent rapidement très longues. Pour une force typique de 0.01 pN, l'extension d'un ADN- λ est de 2 μm et le temps caractéristique du pendule est d'environ 2 s en utilisant une bille magnétique de diamètre 1 μm .

Pour atteindre une précision de 10% un temps d'acquisition d'environ 20 minutes est nécessaire. De plus, la correction des dérives de position, de poids important à long terme, est alors indispensable.

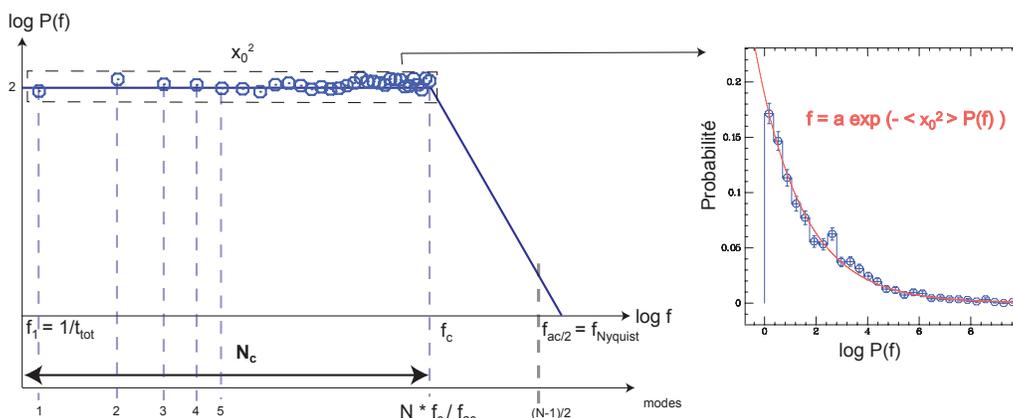


FIG. 3.7 – **Spectre de puissance asymptotique et évaluation l'erreur commise lors d'une mesure de basse force.** Lors d'une mesure de basse force, l'erreur sur la variance et la force est estimée à partir du nombre de modes de Fourier N_c assurant la mesure de la densité spectrale de puissance x_0^2 . A droite, l'histogramme des densités de puissance correspondant au plateau basse-fréquence est ajusté par une fonction exponentielle qui atteste d'une statistique de Poisson pour la distribution des densités de puissance $P(f)$ sur chaque mode. Chaque mode de Fourier peut donc être considéré comme indépendant.

3.2.5 Mesures à haute force sur brins courts par caméra rapide

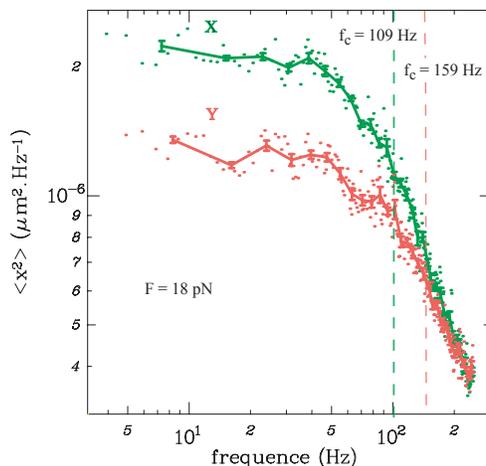


FIG. 3.8 – **Mesures à haute force 18 pN pour une molécule de 1.2 μm .** Dans le cas d'une molécule de 1.2 μm , après correction des artefacts liés à l'acquisition vidéo, on estime une fréquence de coupure de 109 Hz et de 159 Hz dans les deux directions transverses avec une raideur plus élevée dans la direction du champ. Nous détaillerons au paragraphe 3.3.3 cette anisotropie des fluctuations.

Pour augmenter la gamme de force mesurable, nous avons réalisé des mesures de fluctuations à l'aide d'une caméra rapide réalisant une acquisition à 500 Hz. Nous corrigeons ici les effets de repliement spectral et d'intégration vidéo pour une fréquence de coupure proche de la fréquence de Nyquist de l'acquisition. Les spectres de puissance mesurés sont lorentziens pour des fréquences de

coupure atteignant 160 Hz (figure 3.8). On est ainsi capable de mesurer une force de 18 pN appliquée à un brin d'ADN de seulement $1.2 \mu\text{m}$ (molécule en épingle à cheveux de 1.2 kb).

3.2.6 Limitations des mesures de force

Le traitement des fluctuations par analyse spectrale apporte une première amélioration des mesures de force en permettant de corriger les effets de moyennage temporel, il permet ainsi de dépasser la première limitation associée au traitement des fluctuations dans l'espace temporel.

Cependant, le domaine de validité de l'analyse fréquentielle est borné par la fréquence de Nyquist [5, 119, 16]. Dans le cas d'une fréquence de coupure très supérieure à $f_{Nyquist}$, le repliement spectral affecte la totalité de la bande passante. Pour un temps d'exposition égal à l'inverse de la fréquence d'acquisition, le moyennage temporel atténue dramatiquement l'amplitude des fluctuations conduisant à des composantes abérantes et sous-estimées. Le sous-échantillonnage pollue donc la mesure de la force qui apparaît faussement élevée. Prenons l'exemple d'une molécule de $1 \mu\text{m}$ accrochée à une bille de $1 \mu\text{m}$ de diamètre et soumise à une force de 10 pN, la fréquence de coupure résultante est de 160 Hz. Une fréquence d'acquisition de 400 Hz est nécessaire pour effectuer une analyse fréquentielle des fluctuations avec un échantillonnage pertinent et une discrimination de la fréquence de coupure. Couramment au laboratoire les détecteurs utilisés profitent d'une fréquence d'acquisition de quelques dizaines de Hz. D'un point de vue pratique, l'approche fréquentielle se révèle donc très vite inefficace pour mesurer de hautes forces appliquées à des substrats courts, la fréquence de coupure du système dépassant rapidement la fréquence d'acquisition vidéo.

3.3 Comment mesurer des hautes forces avec une caméra standard

3.3.1 Technique d'exposition modulée

Nous avons évoqué au paragraphe précédent les limitations dynamiques inhérentes à la détection vidéo et leurs implications dans l'analyse spectrale des fluctuations. Cependant pour les systèmes fluctuants autour d'un état d'équilibre la qualité d'échantillonnage n'est pas une fonction unique de la fréquence de détection. Pour s'affranchir de ces contraintes, Wong et al. [122, 123] ont proposé une technique d'exposition modulée qui permet d'augmenter la bande passante de détection et la résolution temporelle nécessaire pour des mesures de hautes forces. Sans modifier la fréquence d'acquisition mais en réduisant le temps d'exposition imposé à chaque image, on est en mesure de restaurer le niveau des fluctuations jusqu'à un échantillonnage exact. A condition d'atteindre une durée d'exposition inférieure au temps de réponse du pendule moléculaire, le filtrage temporel devient négligeable à l'échelle des mouvements de la bille, la variance n'est plus sous-estimée et la mesure de force ne souffre plus du sous-échantillonnage.

Cette technique présente aussi l'avantage de maintenir les capacités initiales de parallélisation de notre système. Le problème du sous-échantillonnage peut bien sûr être résolu en remplaçant la microscopie vidéo standard par une détection à grande bande passante par photodiode ou par caméra haute fréquence mais ces deux solutions conduisent à réduire fortement le nombre de billes et de molécules étudiées simultanément, sacrifiant le parallélisme de la détection.

Principe d'implémentation de la technique

Pour réaliser cette modulation, nous avons choisi de profiter des obturateurs électroniques directement implantés sur cellules CCD. A chaque cycle de lecture et conversion analogique-digitale, les photo-électrons créés au niveau de chaque pixel sont uniquement accumulés pendant le temps d'exposition désiré (l'électronique permet l'écoulement des charges pendant la durée d'obturation

choisie). Cette méthode d'obturation permet d'atteindre des temps d'exposition relativement courts: 64 μ s par exemple pour une caméra grand champ de 1.4 Mpixels rafraîchie à 31 Hz (JAI-140GE).

Une alternative est de piloter directement le courant des sources lumineuses (LED, RCLED). Nous avons donc testé la modulation d'exposition par une illumination sous forme d'impulsions courtes et répétées à la cadence vidéo. La durée minimale de ces flash lumineux à intensité élevée fixe la limite de résolution temporelle de cette méthode à quelques μ s. Le développement instrumental à venir reposera sur la synchronisation des impulsions avec l'obturation pour maximiser le flux de photons imposé à chaque image et optimiser le maintien de la résolution en position. En effet, la stratégie à durée d'exposition réduite est principalement limitée par le bruit de photons qui dégrade la résolution intrinsèque dans le cas d'une diminution du niveau d'intensité lumineuse imposé à chaque image.

En l'état actuel, la modulation est obtenue par obturation électronique.

3.3.2 Nouvelle analyse des fluctuations transverses dans l'espace réel en fonction de l'exposition

Pour tout système fluctuant au voisinage d'un état d'équilibre, on peut établir une forme étendue du théorème d'équipartition qui intègre les effets de moyennage temporel [122]. A partir de cette relation exacte, on peut alors caractériser la réponse mécanique du système par variation de la durée d'exposition.

En intégrant le spectre de puissance connu et modifié par l'effet d'intégration vidéo (équation 3.11), Wong et al. ont en effet démontré que la variance apparente du système fluctuant s'exprime simplement en fonction de la variable réduite $\alpha = W/\tau$ où W représente le temps d'exposition et τ le temps de réponse du système :

$$\langle \delta x^2 \rangle = \int_0^{+\infty} \frac{X_0}{1 + (f/f_C)^2} \left(\frac{\sin(\pi f/W)}{\pi f/W} \right)^2 df = \frac{2k_B T}{k_x \alpha} \left(1 - \frac{1 - e^{-\alpha}}{\alpha} \right) \quad (3.14)$$

Lorsque α tend vers 0, on retrouve pour la variance mesurée la valeur attendue en l'absence de moyennage: $k_B T/k_x$.

Pour chaque trajectoire, les valeurs expérimentales de la variance sont alors obtenues par calcul de l'écart quadratique moyen dans l'espace direct. On préfère cette méthode à un ajustement gaussien des distributions en position car elle permet de filtrer facilement les dérives basse-fréquence en adressant le calcul sur une fenêtre temporelle glissante de courte durée (échantillonnée sur $N=16$ points typiquement). On moyenne ensuite la variance sur la durée totale de l'acquisition t_{ac} :

$$\langle \delta x^2 \rangle = \left\langle \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (X_i - \langle X_i \rangle)^2 \right\rangle_{t_{ac}} \quad (3.15)$$

Lors d'une mesure de variance par modulation de l'exposition, on extrapôle aussi les valeurs de la variance pour des temps d'exposition supérieur à l'exposition maximale (égale à l'inverse de la fréquence d'acquisition) : les trajectoires enregistrées sont moyennées points à points pour simuler une exposition plus longue. Le temps caractéristique du système étant largement inférieur au temps d'échantillonnage, cette démarche n'introduit à priori aucune corrélation supplémentaire pour les fluctuations de position et propose une mesure correcte de la variance en étendant la gamme d'exposition. Les valeurs des paramètres mécaniques du système sont alors déterminés par ajustement des variations de la variance en fonction de l'exposition selon l'équation 3.14.

La figure 3.9 illustre l'application de la méthode dans la situation d'un substrat ADN court, du type épingle à cheveux, de longueur 1.24 μ m lorsqu'il est soumis à une force de 16.7 pN et lié à une bille de 1 μ m de diamètre.

Lors de la réduction de l'exposition, on observe une augmentation continue de la variance jusqu'à saturation entre 0.5 et 1 ms. Cette saturation, obtenue pour des temps d'expositions inférieurs au temps caractéristique du pendule, assure alors un échantillonnage exact des fluctuations browniennes. Nous observons que la variance est multipliée par un facteur 15 entre exposition minimale et exposition totale ($W = 1/f_{camera}$), par conséquent la mesure de force est totalement sur-estimée sans réduction de l'exposition.

La variance réelle de $304,2 \text{ nm}^2$ impose une raideur de $0.0135 \text{ pN.nm}^{-1}$ et une force de 16.7 pN ($\pm 10\%$). On obtient le temps caractéristique $\tau = 1.11 \text{ ms}$ qui permet d'estimer une fréquence de coupure de 143 Hz . La fréquence de coupure mesurée confirme les valeurs obtenues sur le même type de molécule par acquisition haute-fréquence ($f_c=159 \text{ Hz}$ pour $F=18 \text{ pN}$ paragraphe 3.2.5). Nous sommes donc capable de mesurer des fluctuations de fréquences très largement supérieures à la fréquence d'acquisition vidéo (31 Hz).

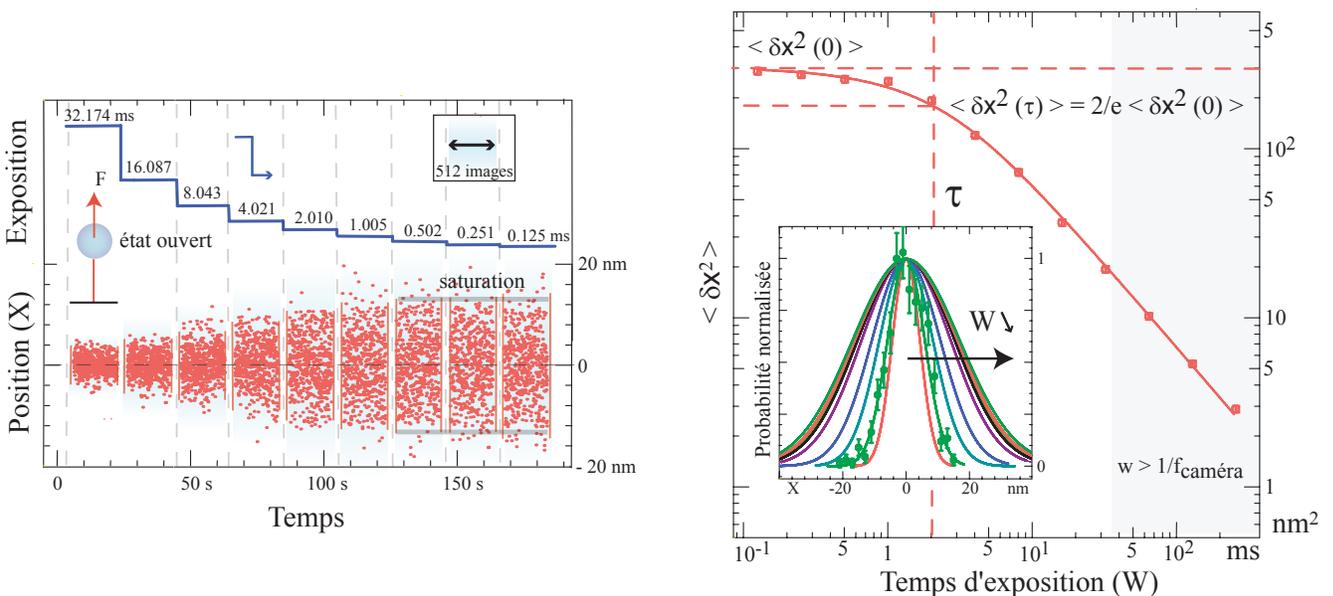


FIG. 3.9 – **Fluctuations de position et dépendance de la variance selon la durée d'exposition.** A gauche, on enregistre les fluctuations transverses de position dans la direction du champ magnétique lors de la réduction du temps d'exposition, ce temps est diminué d'un facteur deux à chaque étape (indiquée par la courbe en bleu). A droite, la variance mesurée pour chaque exposition est modélisée par l'équation 3.14 (courbe en rouge). Les distributions en position sont précisées en encart pour chaque valeur de l'exposition et ajustées par des distributions gaussiennes normalisées.

3.3.3 Mesure de forces pour des molécules de longueur nulle

Pour la manipulation de substrats très courts, on s'attend à des raideurs latérales très élevées. Cependant nous allons voir que l'anisotropie des fluctuations transverses confine systématiquement la raideur et la fréquence de coupure du pendule dans une direction privilégiée, orthogonale au champ magnétique.

Constamment contrainte dans la direction du champ magnétique, chaque bille magnétisée est limitée à un mouvement de translation selon cette direction. A contrario dans la direction orthogonale au champ, son mouvement compte un degré de liberté supplémentaire en rotation autour du moment magnétique induit (figure 3.10). Pour modéliser cet effet de balancement (ou "rocking"), on introduit dans l'expression de la raideur orthogonale au champ k_y un bras de levier effectif, égal à la somme

de l'extension moléculaire et du rayon de la bille : $k_y = F/(L + R)$ [111, 63, 29]. Dans la direction du champ, la raideur s'exprime toujours en fonction de l'extension moléculaire seule : $k_x = F/L$.

Dans le cas d'une extension moléculaire quasi-nulle, les fluctuations de la bille dans la direction du champ sont donc trop faibles pour être correctement mesurées. Par contre, dans la direction orthogonale au champ la raideur du système s'exprime par $k_y = F/R$. Le rayon de la bille étant faible mais de taille finie, le niveau des fluctuations dans cette direction peut être correctement estimé par réduction de l'exposition, la raideur du système comme sa fréquence de coupure y demeurent confinées à des valeurs mesurables par cette technique.

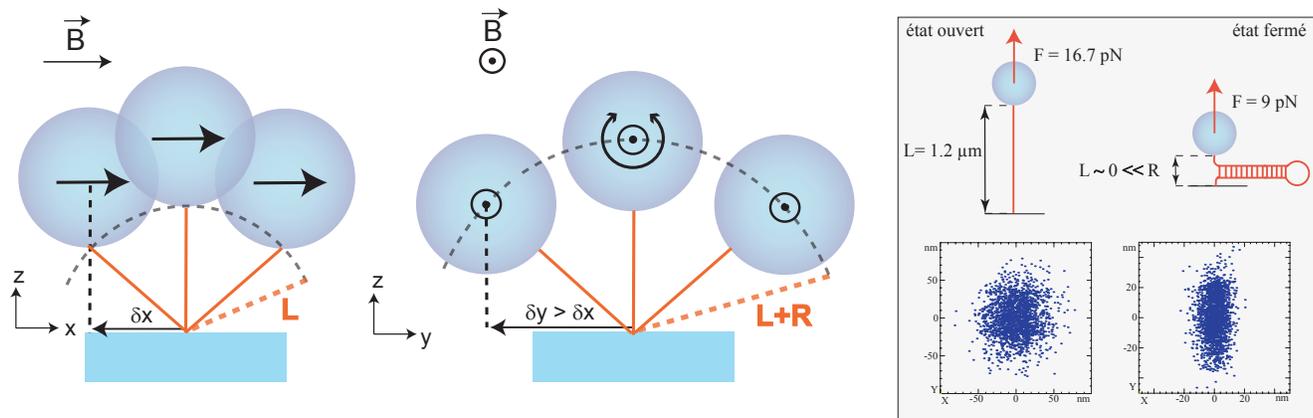


FIG. 3.10 – **Anisotropie des fluctuations transverses.** Le couple magnétique $\vec{M} \wedge \vec{B}$ impose l'alignement du moment induit \vec{M} selon la direction du champ. Pour les fluctuations de position dans le plan (\vec{e}_x, \vec{e}_z) , la bille est contrainte à un mouvement de translation lorsqu'elle est écartée de la position d'équilibre. Dans le plan (\vec{e}_y, \vec{e}_z) , la libre rotation autour de l'axe défini par le champ magnétique implique une nouvelle géométrie des fluctuations avec un rayon de gyration moyen augmenté du rayon de la bille. En encart, nous illustrons une situation fortement asymétrique rencontrée lors de la fermeture d'un substrat en épingle à cheveux dont la partie double brin compte 1.2 kB. La forte anisotropie des fluctuations y préserve la mesure de force en restreignant la fréquence de coupure selon la direction orthogonale au champ. Après ouverture de la molécule, le facteur d'anisotropie est fortement diminué par l'augmentation d'extension et vaut $k_y/k_x = \delta y^2/\delta x^2 = 1 + L/R = 1 + 1.1/0.6 = 1.55$ soit un faible ratio de 1.25 pour les déviations standards en position.

Dans la configuration de pinces magnétiques où les aimants constituent un dipôle magnétique, l'absence de composante verticale pour le champ magnétique autorise donc la libre rotation autour de l'axe transverse et constitue un avantage majeur pour les mesures de forces appliquées aux substrats ultra-courts. En revanche, pour les pinces magnétiques en configuration unipolaire [53, 28, 74], le champ magnétique essentiellement vertical (et parallèle au gradient) interdit cet effet. Au paragraphe 3.4.2.2, nous mettrons à profit ce résultat pour des mesures appliquées à une construction du type épingle à cheveux dont la longueur est de quelques dizaines de nanomètres pour une configuration fermée (figure 3.10).

3.4 Résultats : Premières mesures de hautes forces sur substrats courts

Dans le cas d'un ADN- λ de grande longueur de contour, la force est mesurée précisément sans traitement spécifique des fluctuations, sauf pour des forces supérieures à 5 pN où l'analyse spectrale est requise. Cependant cet avantage pour la mesure de force devient un inconvénient pour le suivi de l'activité enzymatique en molécule unique : les mesures d'extension présentent alors d'importantes

fluctuations browniennes, inadaptées à l'étude du mouvement de protéines en interaction avec le substrat. De nombreuses études en pinces magnétiques se sont donc reportées sur des molécules plus courtes et plus raides pour réduire ce bruit intrinsèque, des longueurs de substrat de $1\mu\text{m}$ (ou moins) sont communes [70, 78, 125, 47]. Dans de nombreux cas, la gamme de force étudiée est déterminée par l'enzyme étudiée et peut atteindre une valeur de 10 à 20 pN. De plus, les pinces magnétiques peuvent être utilisées pour tirer à haute force sur des protéines individuelles dont l'extension est quasi-nulle.

Nous avons donc testé la méthode de mesure de forces par réduction de l'exposition en l'appliquant à une molécule en épingle à cheveux de 1.2 kB. Cette molécule présente deux configurations typiques : pour des forces inférieures à 16 pN la molécule est fermée et l'extension est très réduite, au-dessus de 16 pN l'extension atteint $1.2\mu\text{m}$ et la force est élevée. Dans ces deux situations, la fréquence de coupure du système oscillant dépasse largement la fréquence d'acquisition d'une caméra standard. Pour illustrer le processus de mesure de force par modulation de l'exposition, nous avons donc construit une courbe de force pour cette molécule dans la gamme de 2 à 20 pN.

Nous allons donc présenter la validité du protocole suivi pour réaliser ce type d'expérience et les mesures de force obtenues dans les deux configurations typiques de la molécule. Nous présenterons aussi des mesures de hautes forces ($> 50\text{ pN}$) réalisées sur des brins d'ADN courts à l'aide de billes magnétiques de $1\mu\text{m}$ à forte réponse magnétique.

3.4.1 Validité du protocole de mesure de force par exposition réduite

3.4.1.1 Temps d'acquisition demandé pour la mesure de variance

La modulation du temps d'exposition présente une solution efficace à la mesure des fluctuations haute-fréquence avec une caméra réalisant une acquisition basse-fréquence. Dans ce mode d'utilisation, les composantes spectrales sont fortement repliées et le spectre de fluctuations obtenu est caractérisé par un bruit blanc. La corrélation entre images successives est négligeable et la variance des fluctuations est a priori caractérisée par une distribution de Poisson. L'erreur relative sur la variance devrait donc être égale à $1/\sqrt{N}$ où N représente le nombre de points échantillonnés pour la trajectoire d'intérêt (figure 3.11).

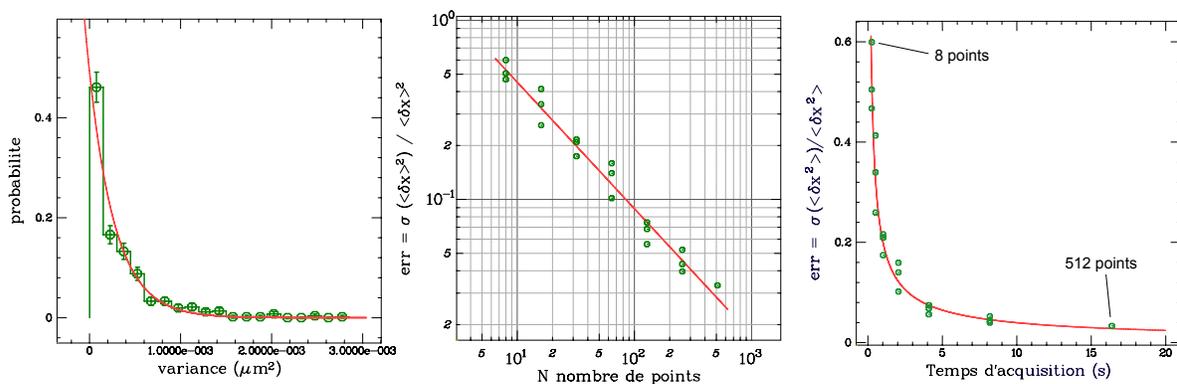


FIG. 3.11 – Erreur relative commise sur la variance en fonction du temps d'acquisition à 31 Hz. A gauche, à partir d'une trajectoire enregistrée pour un temps caractéristique τ de 1 ms, on établit la distribution de la variance. Elle est ajustée par une dépendance exponentielle, caractéristique d'une distribution de Poisson (courbe en rouge). Au milieu, on trace l'erreur relative mesurée sur la variance en fonction du nombre de points échantillonnés. L'erreur relative est alors caractérisée par une décroissance linéaire de pente -0.45 en échelle log-log (courbe en rouge) qui est en accord avec la statistique poissonnienne, à droite nous représentons l'erreur en fonction du temps d'acquisition.

Pour valider cette assertion, nous avons mesuré les fluctuations de la variance et l'erreur expérimentale associée. Cette mesure est obtenue par calcul de la variance sur une série de fenêtres temporelles indépendantes de N points appartenant à la même trajectoire, pour définir l'erreur sur la variance on calcule ensuite l'écart quadratique moyen sur la distribution des variances obtenues pour ces différentes portions de trajectoire. Nos mesures confirment une erreur relative en variance égale à $1/\sqrt{N}$. Pour obtenir une précision meilleure que 5%, l'échantillonnage de chaque trajectoire doit donc contenir un minimum de 400 points, soit un temps d'acquisition minimum de 13 s pour une acquisition à 31 Hz.

3.4.1.2 Contrôle du bruit de photons

Le technique de réduction de l'exposition autorise un échantillonnage exact des fluctuations, mais elle impose une réduction du nombre de photons collectés qui augmente le niveau du bruit de pointé, obtenu en l'absence de modulation d'éclairage. La mesure de force reposant justement sur une augmentation de l'amplitude des fluctuations, nous devons absolument vérifier que les fluctuations mesurées sont uniquement d'origine brownienne.

Dans cette optique, nous essayons dans un premier temps de maintenir le nombre de photons aussi haut que possible en utilisant la luminance élevée des LED. Il est ainsi possible de saturer l'image vidéo même à faible exposition. La réduction du temps d'exposition est donc compensée par une augmentation du flux lumineux pour les premières étapes de réduction de l'exposition, nous augmentons alors le courant qui pilote notre source lumineuse jusqu'à $W = 4$ ms (figure 3.12). Lorsque le flux disponible atteint sa valeur maximale, le niveau moyen d'illumination est maintenu constant par augmentation du gain du détecteur CCD, au prix d'une augmentation du bruit de photons. Une fois le gain maximal atteint, nous diminuons l'exposition sans compensation.

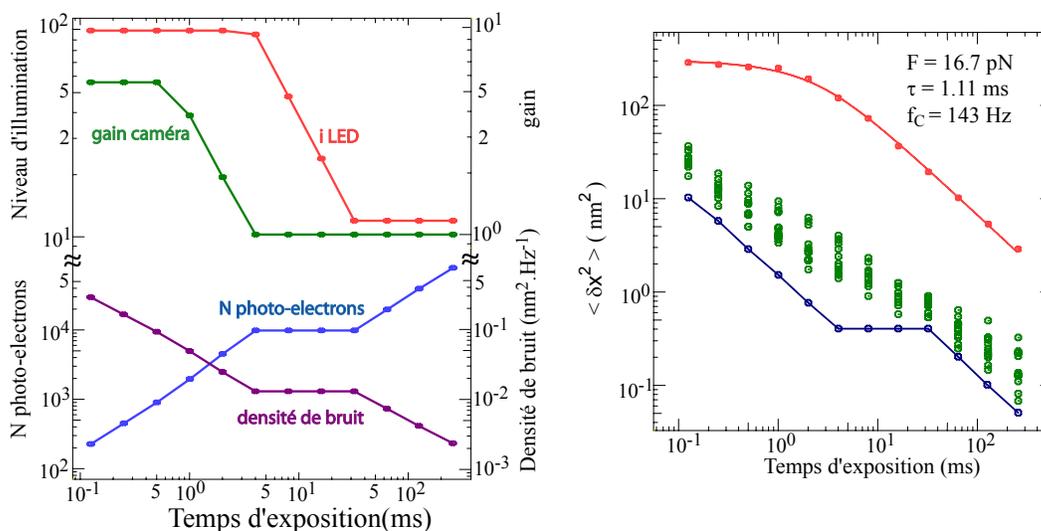


FIG. 3.12 – Paramètres de contrôle de l'illumination et dépendance au bruit de photons au cours d'une modulation complète d'exposition. A gauche, nous indiquons la variation des paramètres de contrôle de l'illumination lors d'une modulation de l'exposition. Nous y intégrons le nombre de photo-électrons créés pour la caméra utilisée et les conditions d'illumination, ainsi que la densité de bruit prédite par nos calibrations précédentes (I2.5.2.3). A droite, nous indiquons la mesure de variance obtenue pour une molécule en épingle à cheveux de 1.2 kB dans l'état ouvert et étirée sous la force maximale appliquée dans ce type d'expérience (courbe en rouge), ainsi que la mesure de variance pour un échantillon de billes fixes (points en vert) et la prédiction du bruit obtenu par calibration (courbe en bleu).

Dans un second temps, nous validons le protocole en enregistrant en parallèle la position de billes immobilisées non-spécifiquement sur la surface de l'échantillon. Dans ces mêmes conditions d'illumination, nous disposons donc du bruit de pointé intrinsèque du système. Dans la figure 3.12 nous rapportons la comparaison entre les fluctuations de position d'une molécule en épingle à cheveux de 1.2 kB et les fluctuations de position pour un échantillon de quelques billes fixes. Quelques unes de ces billes ne sont pas parfaitement attachées à la surface et montrent une dispersion non-négligeable du niveau de bruit, qui est par ailleurs légèrement supérieur à notre prévision établie par calibration (cf I 2.5.2.3). Ce bruit de référence augmente lors de la réduction de l'exposition mais sa variance demeure de plus d'un ordre de grandeur inférieure à celle mesurée pour la molécule.

3.4.2 Mesures de forces sur une molécule en épingle à cheveux

3.4.2.1 Mesures de hautes forces pour la molécule ouverte

La manipulation mécanique consiste dans l'ouverture de la molécule dans un premier temps, on réduit ensuite la force en éloignant les aimants de l'échantillon pour deux nouvelles positions.

Pour chaque position des aimants, on relève la variance des fluctuations transverses dans la direction du champ magnétique pour une série d'exposition (figure 3.13). Les temps caractéristiques τ des fluctuations sont inférieurs à la durée minimale d'exposition de 0.125 ms indiquant un échantillonnage exact et on observe une décroissance de la variance à saturation lorsque la force est augmentée. Les forces sont ensuite déduites des variances à exposition nulle et de l'extension de la molécule ($\approx 1.2\mu\text{m}$) par le théorème d'équipartition. On mesure une force caractéristique d'ouverture du substrat de 17 ± 1.9 pN. Cette transition constitue une référence mécanique bien établie [124, 77] et apporte un premier élément de validation de la mesure. Un deuxième élément est fourni par l'accord entre les valeurs mesurées par modulation de l'exposition et par calibration standard utilisant un ADN- λ , calibration réalisée dans une expérience préliminaire (figure 3.13).

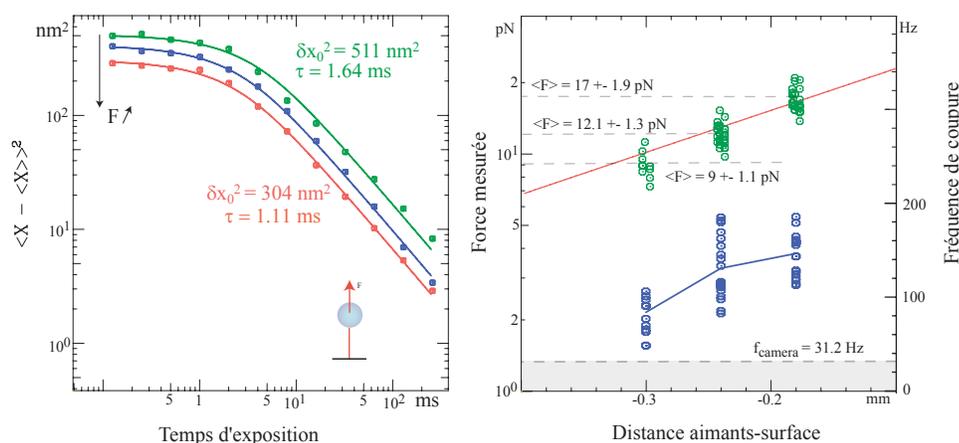


FIG. 3.13 – **Mesures de force entre 9 et 17 pN pour la molécule ouverte.** *A gauche, nous présentons les mesures de variance sous trois forces distinctes pour une molécule donnée (acquisition à 31 Hz). Les forces et fréquences de coupures associées sont présentées pour une mesure extensive sur 25 molécules. La courbe en rouge représente une calibration standard de la force en fonction de la position des aimants, réalisée sur le même microscope avec un ADN- λ . L'hystérésis de la transition ouverture↔fermeture permet de maintenir la molécule dans l'état ouvert après diminution de la force depuis 17 pN. Cet état persiste jusqu'à 9 pN par l'utilisation d'une solution à faible salinité, qui impose une faible force de refermeture.*

Le processus est finalement réalisé en parallèle sur un nombre élevé de molécules et permet d'es-

timer une faible dispersion des forces mesurées de 15%. Elle atteste d'une susceptibilité magnétique relativement homogène entre billes utilisées (MyOne Invitrogen de $1 \mu\text{m}$ de diamètre).

Finalement, les fréquences de coupure mesurées sont d'un ordre de grandeur supérieures à la fréquence caméra.

3.4.2.2 Mesures de force dans le cas d'une extension nulle pour la molécule fermée

Nous appliquons maintenant la technique de modulation de l'exposition à la mesure de force dans le cas d'une extension nulle.

Pour la molécule dans l'état fermé, la saturation de la variance dans la direction orthogonale au champ est obtenue pour des expositions modérément faibles, de quelques ms, et les fréquences mesurées sont comprises dans une gamme de 20 à 60 Hz pour des forces appliquées de 3 à 8 pN (figure 3.14). Le mouvement de balancier garantit donc une estimation valide de la variance par réduction des composantes haute-fréquence des fluctuations. Dans ce mode de mesure, la détermination de la force repose alors sur la connaissance du rayon de la bille ($0.5 \mu\text{m}$), introduit dans l'expression de la raideur $k_x = F/R$ (figure 3.15).

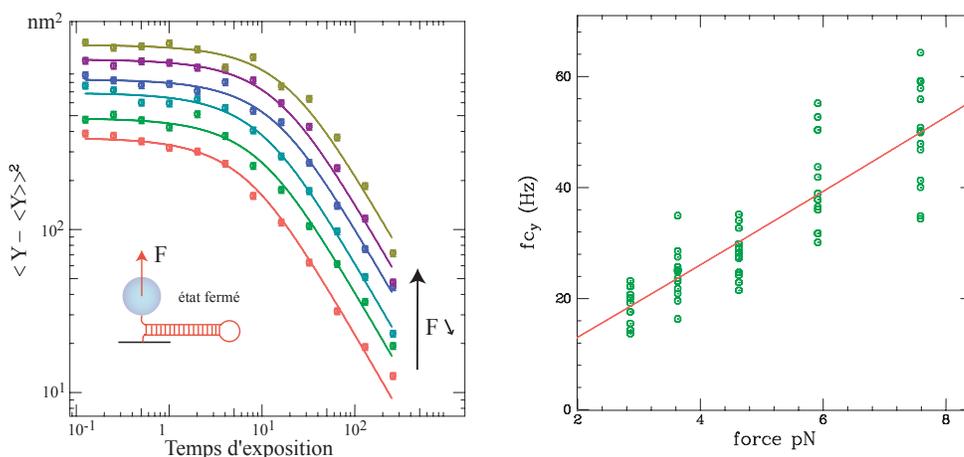


FIG. 3.14 – **Mesure des fluctuations transverses dans la direction orthogonale au champ magnétique pour une extension nulle.** A gauche, nous présentons les mesures de variance dans le cas d'une modulation de force entre 2 et 10 pN pour une molécule donnée (acquisition à 31 Hz). A droite, pour un échantillon d'une dizaine de molécules, nous avons reporté les fréquences de coupure correspondantes en fonction de la force. La courbe en rouge est un ajustement linéaire de la variation de la fréquence de coupure selon la force, sa pente $1/(12\pi^2\eta R_{hydro}R)$ permet d'estimer le rayon hydrodynamique apparent.

Nous devons d'autre part préciser le comportement hydrodynamique du système pour expliquer la valeur des fréquences de coupure mesurées. En effet pour une force de 8 pN et une bille de rayon de $0.5 \mu\text{m}$, on s'attend à une fréquence de coupure telle que $f_{C,y} = F/(12\pi^2\eta R^2) = 270 \text{ Hz}$ alors que la valeur mesurée est de 50 Hz. Pour expliquer cette réduction supplémentaire de la fréquence de coupure, nous devons prendre en compte l'augmentation de la viscosité apparente du milieu pour les fluctuations d'une bille au voisinage immédiat de la surface de l'échantillon. Nous introduisons alors une correction hydrodynamique dans l'expression de la fréquence de coupure : $f_{C,y} = F/(12\pi^2\eta R_{hydro}R)$ où R_{hydro} représente le rayon hydrodynamique apparent de la bille ($R_{hydro} \geq R$). Les variations de f_C en fonction de la force (figure 3.14) permettent de mesurer un rayon hydrodynamique de $2.6 \mu\text{m}$. Notons que la correction hydrodynamique ne modifie pas la mesure de la force.

3.4.2.3 Courbe de force entre 2 et 20 pN

Nous résumons ici les résultats des mesures de force obtenus sur la molécule en épingle à cheveux.

Nous avons donc construit une courbe de force dans la gamme de 2 à 20 pN intégrant les deux configurations typiques de la molécule. Les deux modes de mesure utilisés s'appuient sur la détermination de la raideur du système par réduction du temps d'exposition, elle est mesurée dans la direction du champ magnétique pour la molécule ouverte d'extension L : $k_x = F/L$ et dans la direction orthogonale pour la molécule fermée d'extension négligeable devant le rayon de la bille R : $k_y = F/R$.

L'hystérésis de la transition mécanique autorise les deux configurations de la molécule pour une force de 9 pN. La cohérence des deux modes de mesure est alors confirmée par la continuité de la courbe de force en ce point (figure 3.15). La courbe de force finale est caractérisée par une dépendance quasi-exponentielle selon la distance aimants/billes qui s'accorde finement avec la calibration réalisée à partir d'un ADN- λ . Une étude théorique du champ magnétique généré par un couple d'aimants permanents a récemment confirmé cette dépendance quasi-exponentielle [71].

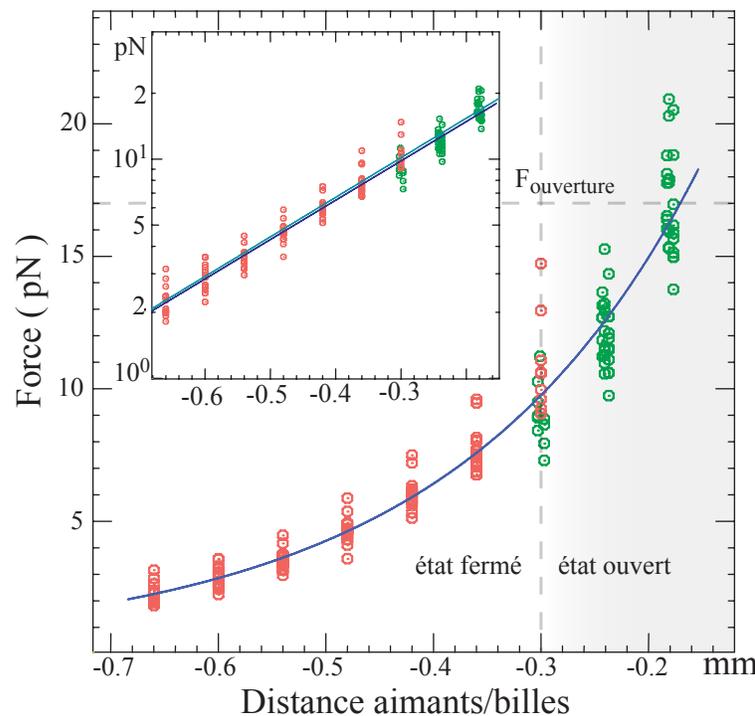


FIG. 3.15 – **Courbe de force et nouvelle gamme de force accessible pour une molécule en épingle à cheveux.** En encart, nous présentons les courbes de force en échelle log-lin. Elles sont ajustées à une variation exponentielle de la force en fonction de la distance aimants/billes (notée z) telle que $F = F_0 e^{-z/z_0}$, où F_0 représente la force appliquée pour des aimants au contact de la surface de l'échantillon et z_0 la distance caractéristique des variations du champ magnétique (égale à la distance de séparation des aimants). L'accord entre les mesures par modulation de l'exposition pour la molécule en épingle à cheveux ($F_0 = 33.8$ pN; $z_0 = 0.24$ mm) (en bleu foncé) et par analyse spectrale pour un ADN- λ ($F_0 = 35.2$ pN; $z_0 = 0.24$ mm) (en bleu clair) est très bon.

3.4.3 Stratégie de mesure rapide pour la mesure des très hautes forces (> 50 pN)

Nous avons démontré qu'il est possible de déterminer à la fois la raideur et le temps caractéristique du système fluctuant par modulation de l'exposition sur une large gamme (10 octaves). Ce protocole est efficace mais requiert un temps d'acquisition important pour la construction d'une courbe de force, on doit en effet moduler l'exposition pour chaque force proposant une fréquence de coupure élevée. Dans un premier temps, nous avons choisi cette procédure pour vérifier précisément sa validité. Elle peut être simplifiée en enregistrant les fluctuations pour l'exposition minimale accessible. Cependant cette solution présente un défaut majeur : il est alors impossible de vérifier que le temps d'ouverture choisi est inférieur au temps caractéristique τ et par conséquent de valider l'estimation de la raideur k . On perd de même l'information sur la valeur de τ qui peut être comparée à la valeur attendue, déduite à partir du rayon de la bille et de la traînée visqueuse. Nous avons donc opté pour une stratégie rapide où l'on enregistre les fluctuations pour chaque force sous deux valeurs de l'exposition, minimale et maximale. Cette procédure permet de déterminer τ et k , et de vérifier dans un second temps la pertinence du choix de l'exposition de plus courte durée. Elle permet alors de construire des courbes de très hautes forces où la rapidité de la mesure s'avère cruciale. Dans ce cas, on soumet en effet la liaison molécule/surface à des contraintes mécaniques élevées proches de sa force de rupture (la liaison molécule/bille étant nettement plus solide).

Nous avons donc appliqué cette stratégie à la construction de courbes de force dans une gamme de 0.5 à 60 pN pour une molécule d'ADN double-brin de longueur de contour de 3.6 μm . La molécule est spécialement fonctionnalisée pour assurer des points multiples d'ancrage à la surface. Les billes magnétiques utilisées pour ces expériences (Magsense de diamètre égal à 1 μm) sont caractérisées par une densité élevée de matériau magnétique permettant d'atteindre cette gamme de force.

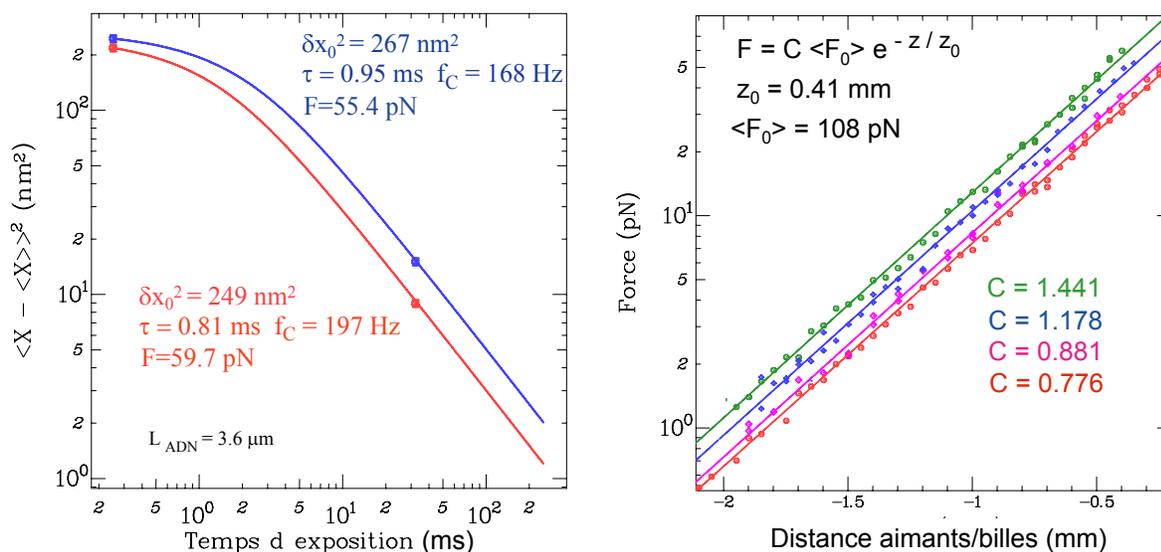


FIG. 3.16 – Mesures de forces > 50 pN par modulation rapide de l'exposition et courbes de force pour différentes billes. A gauche, nous présentons la stratégie de mesure rapide pour deux valeurs de l'exposition ($W=0.25$ ms et 32 ms), elle permet une estimation robuste des fluctuations pour des forces atteignant 60 pN (acquisition à 31 Hz). A droite, nous présentons les courbes de force obtenues pour un échantillon de 4 billes. Pour les forces inférieures à 2 pN ($f_C < f_{Nyquist}$), les points de force sont extraits par analyse spectrale, pour des forces supérieures on bascule dans le mode de mesure rapide par exposition. Les courbes de force sont ajustées selon la dépendance $F = C \langle F_0 \rangle e^{-z/z_0}$.

La figure 3.16 illustre les résultats obtenus sur cette molécule. L'exposition minimale choisie, de

0.25 ms, permet une mesure correcte de force jusqu'à 60 pN. Ceci constitue à ce jour les plus hautes forces mesurées pour des billes magnétiques de diamètre $1\mu\text{m}$ [71].

La force appliquée démontre d'autre part une variabilité importante entre billes, nettement supérieure à celle mesurée pour des billes MyOne (Invitrogen) de $1\mu\text{m}$ (15%). En échelle logarithmique, les courbes de force obtenues pour chaque bille sont ajustées selon une dépendance linéaire en fonction de la position des aimants. Ces droites parallèles indiquent que les forces mesurées pour chaque bille sont reliées par un simple facteur de proportionnalité. L'hétérogénéité en force peut alors être expliquée par une simple variabilité de moment magnétique entre billes [29]. En effet, pour les valeurs typiques de champ magnétique appliqué ($> 0.1\text{T}$), l'aimantation des billes est saturée [71] et la force appliquée s'exprime simplement par $F = 1/2 M \frac{\partial B}{\partial z}$ où M désigne le moment magnétique d'une bille et $\frac{\partial B}{\partial z}$ le gradient axial du champ magnétique. La variabilité en force est donc une fonction unique du moment magnétique généré pour chaque bille. On peut ainsi reformuler la relation entre force et position des aimants telle que $F = C \langle F_0 \rangle e^{-z/z_0}$ avec C est un facteur multiplicatif prenant en compte la dispersion des moments magnétiques, produite par des fluctuations de taille et de composition magnétique des billes.

3.5 Conclusion : nouvelle gamme de force accessible

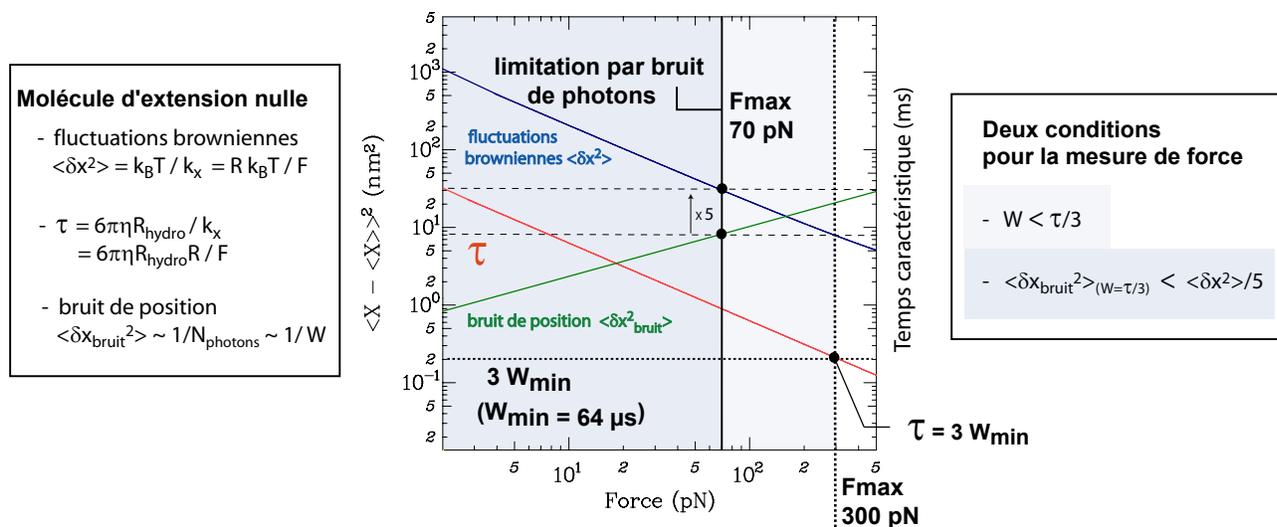


FIG. 3.17 – **Limitation des mesures de force appliquée à une molécule d'extension nulle attachée à une bille de faible taille ($1\mu\text{m}$).** Le temps minimal d'exposition pour la caméra utilisée est de 0.064 ms. Le bruit de position (en vert) est reporté pour un temps d'exposition égal à $\tau/3$ permettant une estimation valide des fluctuations pour chaque force, il est déduit des mesures réalisées sur billes fixes (cf 3.4.1.2). Le niveau des fluctuations browniennes dans la direction orthogonale au champ (en bleu) est calculé à partir du théorème d'équipartition où $k_x = F/R$ (R rayon de la bille), le temps caractéristique est déterminé par $\tau = 1/2\pi f_C$ où l'on a considéré un rayon hydrodynamique effectif de $2\mu\text{m}$ (cf 3.4.2.2), la longueur de la molécule demeure très inférieure au rayon de la bille dans toute la gamme de force.

Nous avons donc démontré que les limitations de mesure de force précédentes sont largement dépassées lorsqu'on utilise la modulation de l'exposition. Dans la pratique, les nouvelles limitations sont fixées par deux paramètres : le temps minimal d'exposition accessible et le bruit de position qui en découle. Pour déterminer la valeur de la force avec une erreur acceptable ($<20\%$) il suffit alors

de satisfaire deux conditions : $W \leq \tau/3$ et un ratio supérieur à 5 entre variance des fluctuations browniennes et du bruit de position convient.

En appliquant ce principe à la situation la plus contraignante d'une molécule d'extension nulle liée à une bille de $1\mu\text{m}$, la limitation de mesure de force est imposée par le bruit de position et non pas la valeur de la durée minimale d'exposition (figure 3.17), et elle est aussi élevée que 70 pN. En l'état actuel, le dispositif expérimental de modulation par exposition utilise des sources de luminance modérée, l'implémentation des nouvelles sources du type RC-LED permet d'envisager un gain substantiel en terme de photons collectés pour étendre la gamme de mesure à 100 pN et plus. Il est déjà possible de mesurer ce niveau de force pour des billes de taille plus élevée dont le bruit intrinsèque de position est moindre, et dont les fluctuations browniennes à force identique sont plus grandes et moins rapides. Cependant l'intérêt des billes de faible dimension réside dans la réduction du bruit de position.

Dans cette optique, de prochaines études expérimentales en pinces magnétiques pourront viser des transitions structurelles induites par application de hautes forces comme la transition de phase B-S de l'ADN double-brin à 65 pN qui n'est pas encore totalement comprise [108, 31, 35, 117, 47] ou le dépliement/repliement de protéines [29]. Finalement, l'estimation du bruit de position en fonction du nombre de photons collectés (cf 2.5.2) nous permet de valider ou d'invalider ce type de manipulations à haute force.

Chapitre 4

Imagerie par ondes évanescentes

Dans ce chapitre, nous présentons une technique d'imagerie en champ large de billes magnétiques par ondes évanescentes qui met en jeu une détection par diffusion, en opposition aux détections par fluorescence. Comme l'imagerie par anneaux d'interférences, cette technique offre l'avantage d'une mesure de position axiale (selon z) mais avec une plus grande précision.

Après avoir introduit le principe optique de l'imagerie par réflexion totale, nous détaillerons la configuration expérimentale mise en place, en portant une attention particulière à la méthode de calibration de l'onde évanescente et à la résolution spatiale de cette technique. Nous décrirons enfin une application de l'imagerie par ondes évanescentes à une méthode de séquençage d'ADN en molécules uniques, développée par Fangyuan Ding au sein de notre laboratoire.

4.1 Théorie de la détection optique

A la traversée d'une interface séparant deux milieux d'indices différents, un faisceau lumineux est divisé en deux composantes, l'une réfléchi et l'autre transmise. Dans le cas d'une propagation d'une région d'indice élevé vers une région d'indice plus faible, l'angle d'incidence formé par la normale à l'interface et la direction de propagation du faisceau incident est inférieur à l'angle transmis formé par la normale et la direction du faisceau transmis.

Par conséquent, lorsque l'on augmente l'angle d'incidence, le faisceau transmis est entièrement réfléchi avant d'atteindre l'angle d'incidence de $\pi/2$. Il se produit le phénomène de réflexion totale. Mais cela ne signifie pas qu'il n'y a pas d'onde lumineuse transmise dans le milieu de faible indice. La structure de cette onde est originale : son flux d'énergie au travers de la surface de séparation est nul en moyenne, toute l'énergie est réfléchi même s'il existe une onde transmise dite évanescente dans le milieu le moins réfringent.

Pour préciser le comportement ondulatoire, prenons le cas simple d'une onde plane, polarisée rectilignement et perpendiculairement au plan d'incidence, traversant un dioptre plan (figure 4.1) :

$$\vec{E}_i = E_{i,0} e^{i(\omega t - \vec{k}_i \cdot \vec{r})} \vec{e}_y \quad (4.1)$$

avec ω la pulsation lumineuse et \vec{k}_i le vecteur d'onde incident dans le plan (\vec{e}_x, \vec{e}_z) , de norme $k_i = \frac{2\pi}{\lambda} n_1$, λ étant la longueur d'onde associée dans le vide et $E_{i,0}$ l'amplitude réelle de l'onde incidente. On suppose la même structure d'onde plane dans le milieu le moins réfringent:

$$\vec{E}_t = E_{t,0} e^{i(\omega t - \vec{k}_t \cdot \vec{r})} \vec{e}_y \quad (4.2)$$

avec ω la même pulsation lumineuse, \vec{k}_t le vecteur d'onde incident de norme $\frac{2\pi}{\lambda} n_2$ et $E_{t,0}$ l'amplitude complexe du champ transmis. Pour plus de lisibilité la notation complexe des champs est implicite.

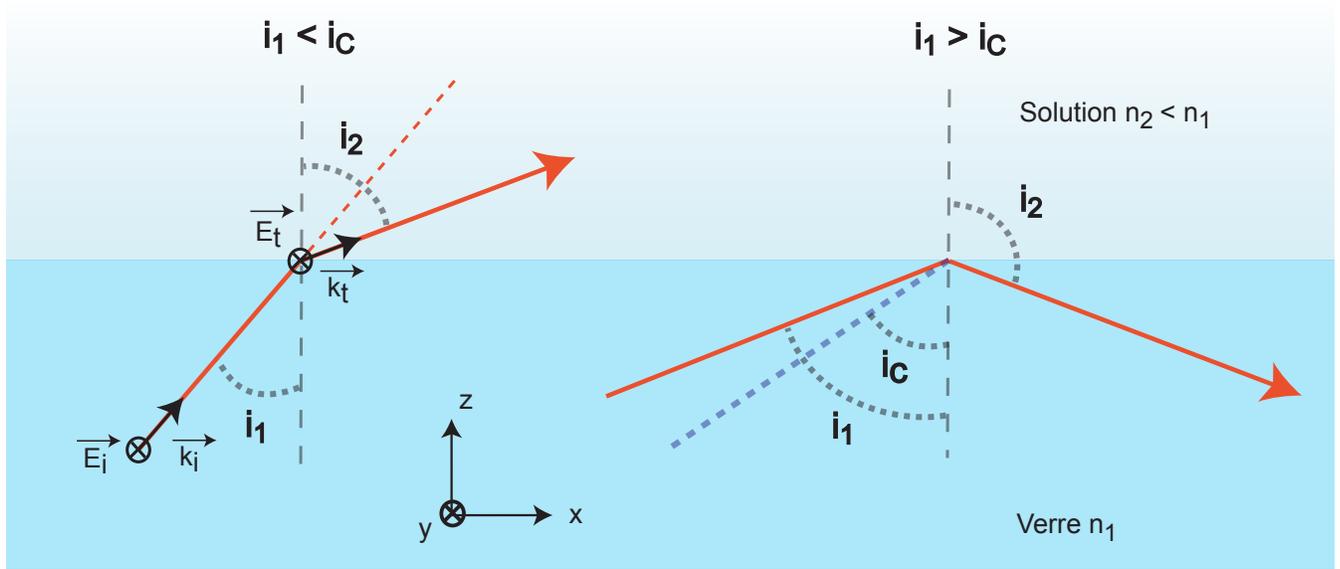


FIG. 4.1 – Transmission et réflexion totale à la traversée d'un dioptre plan.

La loi de Snell-Descartes exprimant la continuité de la composante tangentielle des vecteurs d'onde transmis et réfléchis à l'interface permet d'établir la valeur de l'angle critique i_c pour la réflexion totale en fonction du rapport des indices :

$$i_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1} = 62^\circ \quad (4.3)$$

dans le cas d'un dioptre verre/eau : $n_1 = 1.52$ et $n_2 = 1.33$. Pour des angles d'incidence supérieurs à i_c , l'angle réfracté est ainsi supérieur à $\pi/2$ et on peut toujours écrire :

$$\sin i_2 = \frac{n_1}{n_2} \sin i_1 > 1 \quad \rightarrow \quad \cos i_2 = \pm i \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2 i_1 - 1} = \pm i m \quad (4.4)$$

et

$$\vec{k}_t = \frac{2\pi}{\lambda} n_2 (\cos i_2 \vec{e}_z + \sin i_2 \vec{e}_x) = \frac{2\pi}{\lambda} n_2 (\pm m i) \vec{e}_z + \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin i_1 \vec{e}_x \quad (4.5)$$

La composante du vecteur d'onde transmis selon \vec{e}_z est purement imaginaire et l'onde lumineuse s'exprime alors :

$$\vec{E}_t = E_{t,0} e^{-\frac{2\pi}{\lambda} n_2 m z} e^{i(\omega t - \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin i_1 x)} \vec{e}_y \quad (4.6)$$

Pour éviter la divergence à l'infini en s'éloignant du dioptre, la solution d'amplitude décroissante est choisie.

Dans le milieu 2, il s'agit d'une onde se propageant parallèlement à la surface avec une phase imposée par le milieu 1 et l'onde incidente. En revanche, perpendiculairement à la direction de propagation de la phase, l'amplitude de l'onde subit une décroissance exponentielle selon la distance avec l'interface. Cette caractéristique la différencie fondamentalement d'une onde homogène dans un milieu absorbant dont l'amplitude décroît parallèlement à la direction de propagation.

Pour calculer la norme du champ électrique transmis et accéder à l'intensité lumineuse évanescente $I(z)$ dans le milieu le moins réfringent, nous explicitons le coefficient complexe de transmission en amplitude \tilde{t} à l'aide des formules de Fresnel en incidence oblique [95] :

$$E_{t,0} = \tilde{t} E_{i,0} = \frac{2k_i \cos i_1}{k_i \cos i_1 + k_{t,z}} E_{i,0} \quad (4.7)$$

$$I(z) \propto \|E_t\|^2 \propto E_{i,0}^2 \frac{4n_1^2}{n_1^2 - n_2^2} \cos^2 i_1 e^{-z/\delta} = I(z=0) e^{-z/\delta} \quad (4.8)$$

avec δ la profondeur de pénétration ou d'atténuation en intensité de l'onde dans le milieu "interdit".

$$\delta = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 i_1 - n_2^2}} \quad (4.9)$$

Notons que pour la polarisation appartenant au plan d'incidence, l'expression de la décroissance exponentielle de l'intensité est caractérisée par la même profondeur de pénétration avec un couplage $I(z=0)$ du même ordre de grandeur. Pour cette polarisation initialement rectiligne l'onde évanescente est cette-fois polarisée elliptiquement [10].

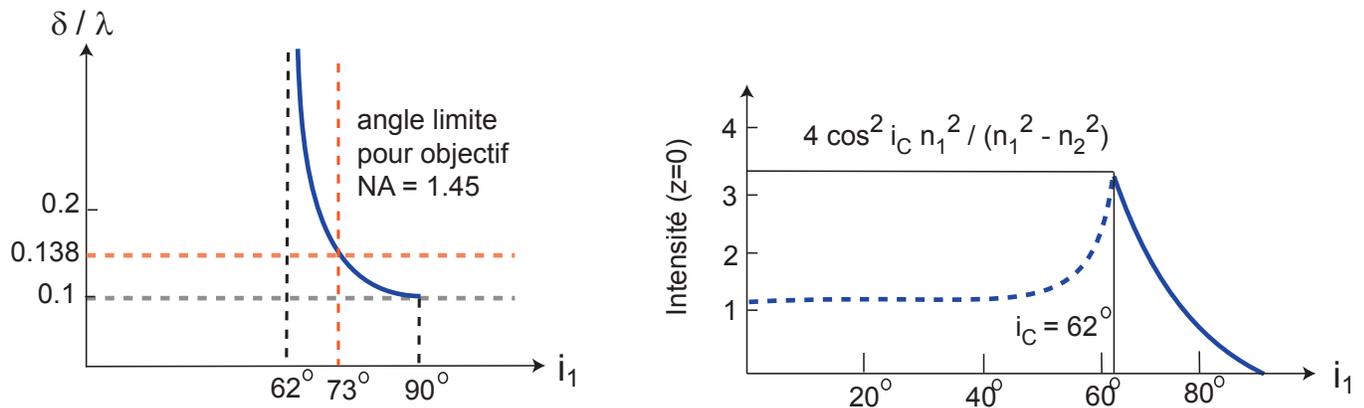


FIG. 4.2 – Dépendance de la profondeur de pénétration et de l'intensité lumineuse selon l'angle d'incidence à l'interface verre/eau. A gauche, nous présentons les variations de la profondeur de pénétration (normalisée par la longueur d'onde lumineuse λ) en fonction de l'angle d'incidence. Comme nous le verrons dans la configuration utilisant un objectif à grande ouverture numérique (NA), l'angle maximal d'admission fixe le minimum de profondeur de pénétration atteignable dans cette configuration. La deuxième courbe (à droite) illustre la variation de l'intensité de l'onde évanescente, elle est normalisée par $E_{i,0}^2$ et comparée à l'intensité se propageant dans le milieu 1 pour des angles inférieurs à l'angle critique.

La profondeur de pénétration de l'onde dans le milieu de faible indice dépend uniquement de l'angle d'incidence et du rapport des indices. Dans des conditions pratiques, son ordre de grandeur est celui de la longueur d'onde (figure 4.2). A angle d'incidence maximal, elle est minimale et vaut 10 % de la longueur d'onde lumineuse dans le cas de l'interface verre/eau. Le coût d'une courte profondeur de pénétration est une diminution de l'intensité excitatrice globale qui s'annule pour une incidence de 90° , l'efficacité du couplage énergétique avec l'onde évanescente diminue donc pour les faibles pénétrations. Au voisinage de l'angle critique (angle $< 70^\circ$), le couplage évanescent reste efficace, l'intensité de l'onde évanescente est comparable à l'intensité de l'onde se propageant dans le milieu de fort indice (figure 4.2).

Tout diffuseur placé au voisinage immédiat de la surface interagit avec l'onde évanescente pour émettre un signal lumineux dont l'intensité décroît exponentiellement avec la distance à la surface. Par conséquent, une fois la profondeur de pénétration connue, la détection par réflexion totale rapporte automatiquement le positionnement du diffuseur en trois dimensions.

Pour caractériser l'onde évanescente, nous nous sommes particulièrement intéressés à des diffuseurs micrométriques liés à un substrat ADN du type épingle à cheveux qui fournit un système auto-calibré pour la détermination de position et de longueur (figure 4.3). Par modulation de force entre états ouvert et fermé de la molécule, on dispose d'un étalon de longueur qui permet de calibrer

à tout instant la décroissance exponentielle du signal d'onde évanescente et d'évaluer la qualité de détection (dérives aux temps longs, homogénéité de l'excitation entre molécules distinctes).

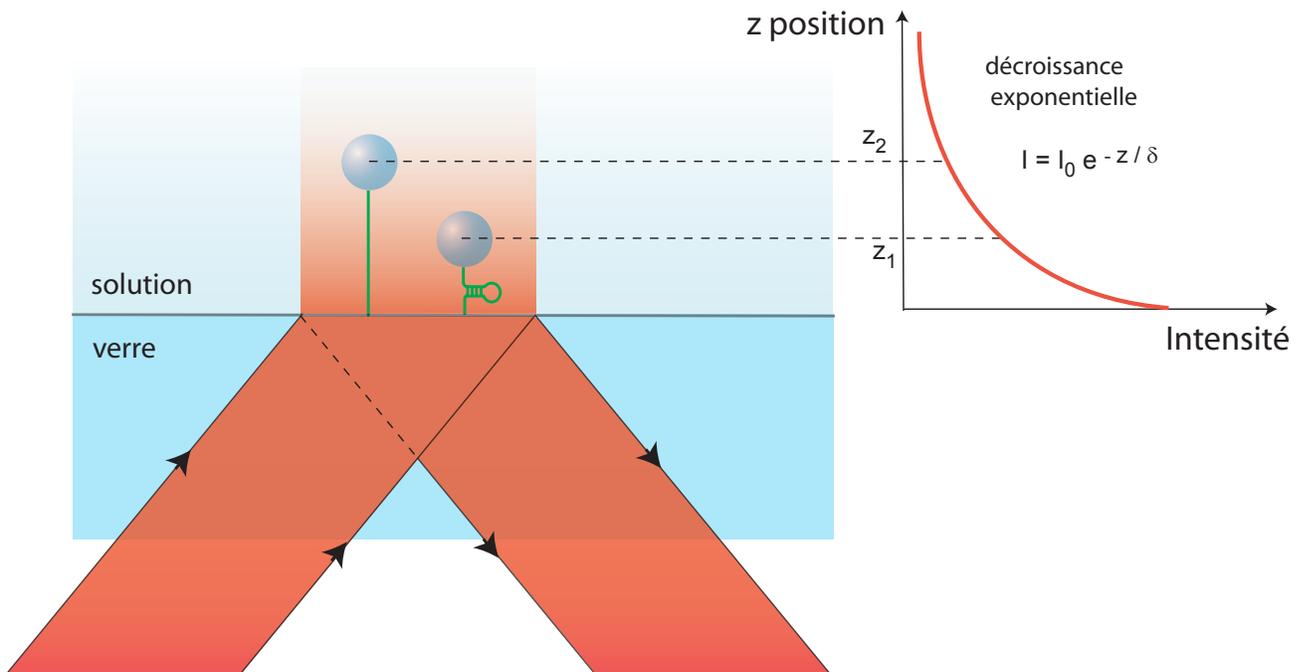


FIG. 4.3 – **Décroissance exponentielle et changement d'extension d'une molécule du type épingle à cheveux.** La succession d'ouverture et fermeture de la molécule entre deux forces fixées produit un changement d'extension hautement répétable. Cet étalon à deux points de référence permet de définir avec précision le champ d'onde évanescente caractérisé par les deux paramètres $I_0 = I(z = 0)$ l'intensité à l'interface et δ la profondeur de pénétration. Nous verrons que cette méthode autorise la mesure de positions relatives avec une précision sub-nanométrique.

4.2 Motivations pour une imagerie par réflexion totale

La détection par ondes évanescentes est largement utilisée pour la visualisation de molécules uniques par microscopie de fluorescence : le confinement de l'excitation dans une région de l'échantillon limitée à une tranche de quelques centaines de nanomètres réduit fortement les émissions de sources parasites situées hors du plan focal, conduisant à une imagerie à faible bruit de fond (et à exposition limitée pour des échantillons biologiques sujets à la photo-destruction).

Pour l'imagerie de diffuseurs de taille nettement supérieure à des fluorophores uniques, comme des billes magnétiques de $1\mu m$, on profite d'une plus forte émission lumineuse par couplage à l'onde évanescente et les contraintes de bruit de fond sont diminuées.

Plusieurs équipes ont proposé de suivre la position d'une bille par sa fluorescence excitée par ondes évanescentes [74, 92]. Cependant les billes magnétiques émettent un signal de fluorescence modéré qui impose l'utilisation de caméras intensifiées (du type EMCCD "electron-multiplying charge-coupled device") pour leur visualisation en fluorescence. Nous proposons une technique différente d'imagerie en ondes évanescentes par diffusion, i-e avec excitation et collection du signal lumineux à longueur d'onde identique. Elle présente l'avantage d'un nombre élevé de photons diffusés pour chaque bille. Dans notre configuration, le niveau élevé de lumière impose un bruit de détection dépendant uniquement du bruit de photons, et une caméra CCD standard suffit pour la visualisation

des billes magnétiques. L'imagerie par ondes évanescentes en diffusion présente donc un intérêt majeur en terme de résolution (notée Δz), celle-ci dépend de la profondeur de pénétration et du nombre de photons collectés. Elle est fixée par la dépendance exponentielle de l'intensité avec la distance à la surface :

$$I(z) = I_0 e^{-z/\delta} \rightarrow \Delta z = \frac{\Delta I}{I} \delta \quad (4.10)$$

Typiquement pour une caméra CCD réalisant une acquisition à la fréquence de 30 Hz, le nombre de photons collectés par pixel à fort éclairage (10 000 photo-électrons) impose un bruit de 1% pour l'intensité de chaque pixel. Pour une image typique d'une bille par ondes évanescentes étalée sur 10 pixels par 10 pixels, le bruit associé à l'intensité totale pour chaque bille varie comme la racine du nombre de pixels considérés, il est donc de l'ordre de $\frac{\Delta I}{I} = 0.1\%$. Sur une gamme de longueur égale à la profondeur de pénétration, de 200 nm par exemple, l'intensité décroît faiblement, le bruit de pointé en z est quasi-constant et vaut $\Delta z = 0.001 * 200 = 0.2 \text{ nm}$. La résolution intrinsèque de ce type d'imagerie apparaît donc sub-nanométrique.

En plus d'une haute résolution intrinsèque, la détection par ondes évanescentes repose sur une mesure différentielle de la position du diffuseur par rapport à la surface de l'échantillon. Comme nous l'avons vu lors de la caractérisation des dérives de position associées à l'imagerie par diffraction, les dérives basse-fréquence de ce type d'imagerie sont principalement liées aux fluctuations de position relative entre l'échantillon et le plan focal de l'objectif. Dans son principe, l'imagerie par ondes évanescentes supprime cet effet délétère puisque l'intensité émise lors de l'interaction avec le champ évanescent dépend uniquement de la distance à la surface, indépendamment de la distance relative échantillon-objectif. Nous verrons en effet que les dérives basse-fréquence sont fortement diminuées lors du suivi de position par réflexion totale, même en l'absence de thermalisation du microscope (cf 4.3.4.3).

De plus, en comparaison de l'imagerie par diffraction, le suivi en position selon z est fortement simplifié en réflexion totale : il ne requiert pas d'image de calibration préalable et positionne chaque bille selon la direction z par un traitement d'image rapide, qui repose uniquement sur le calcul de l'intensité totale émise par chaque bille. Intervenant sur des images individuelles de faible taille, typiquement de 10 pixels par 10 pixels, ce traitement réduit le temps de calcul pour la détermination de la position en z . Pour comparaison, en imagerie par diffraction une opération par transformée de Hilbert de chaque profil radial est nécessaire pour calculer la phase à chaque instant et la comparer aux valeurs enregistrées lors de calibration.

Enfin, cette nouvelle imagerie offre la possibilité d'un multiplexage renforcé pour le suivi simultané d'un nombre élevé de billes. Pour l'imagerie par anneaux, l'information spatiale caractérisée par le rayon des anneaux est essentielle pour le suivi de position selon z , sa résolution dépend donc fortement de l'étendue de l'image associée à chaque bille [96]. Pour l'imagerie par ondes évanescentes, on mesure seulement un niveau d'intensité intégré sur des images de faible taille, une haute résolution selon z ne requiert qu'un nombre limité de pixels pour l'image d'une bille. Cette imagerie permet donc de travailler avec des objectifs de faible puissance optique sans dégradation notable de la résolution spatiale. On augmente ainsi le champ de vue et le nombre potentiel de billes d'intérêt. En imageant un champ de vue de $140 \mu\text{m}$ par $100 \mu\text{m}$ à l'aide d'un objectif $\times 60$ sur une caméra de 1.4 Mpixels (pour un grandissement de $\times 60$) et en séparant idéalement chaque billes par $6 \mu\text{m}$ soit 60 pixels (ce qui permet de limiter les interactions dipôles-dipôles entre billes à une force inférieure à 0.1 pN pour des billes de $1 \mu\text{m}$ [96]), les images individuelles sont facilement discernables et le nombre potentiel de billes à suivre atteint la valeur de 400. Nous pensons pouvoir utiliser des objectifs $\times 40$ ou $\times 20$ pour encore augmenter les capacités de parallélisme.

4.3 Caractérisation optique de la configuration étudiée

4.3.1 Réflexion totale à l'aide d'un objectif à grande ouverture numérique

L'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique apporte une solution simple à la réalisation expérimentale d'une illumination d'incidence supérieure à l'angle critique. Un faisceau lumineux entrant par l'arrière de l'objectif est décalé par rapport à l'axe optique, en l'éloignant de cet axe l'angle d'incidence à l'interface lamelle de verre/solution augmente progressivement jusqu'à atteindre l'angle critique pour produire la réflexion totale et le champ évanescent en solution.

La capacité d'un objectif à collecter une émission à grand angle depuis la solution est identique à sa capacité à générer des rayons obliques dirigés sur l'interface verre/solution par chemin inverse, elle se mesure par le nombre d'ouverture NA ("numerical aperture") qui traduit aussi l'ouverture de son diaphragme arrière. Le nombre d'ouverture est ainsi défini par :

$$NA = n_1 \sin i_1 \quad (4.11)$$

où n_1 désigne classiquement l'indice de l'huile pour les objectifs à immersion à huile, celui-ci est ajusté sur celui de la lamelle en verre d'indice standard 1.52. La condition d'un angle d'incidence supérieur à l'angle critique s'exprime alors par :

$$n_1 \sin i_1 > n_2 \sin \pi/2 \rightarrow NA > 1.33 \quad (4.12)$$

Ces objectifs à grande ouverture numérique, et spécialement conçus pour l'imagerie par réflexion totale, sont disponibles commercialement. Nous nous sommes donc équipés d'un objectif possédant un nombre d'ouverture $NA = 1.45 (\times 60)$, satisfaisant la condition nécessaire à la réalisation de l'onde évanescente.

Le nombre d'ouverture de l'objectif utilisé fixe la longueur de pénétration minimale de l'onde évanescente pour une longueur d'onde donnée :

$$\delta_{min} = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{NA^2 - n_2^2}} \quad (4.13)$$

Le montage permet de faire varier facilement l'angle d'incidence et la profondeur de pénétration en ajustant le décalage du faisceau exciteur par rapport à l'axe optique.

Dans notre configuration expérimentale, avec une longueur d'onde d'excitation de 650 nm (émission dans le rouge par diode laser) et un nombre d'ouverture de 1.45, la profondeur de pénétration minimale est limitée à 90 nm. Elle est obtenue pour un angle d'incidence de 73° (cf figure 4.2). Cependant le montage optique doit être soigné pour obtenir une courte profondeur de pénétration.

D'abord le faisceau d'excitation doit être focalisé sur le plan focal arrière de l'objectif de manière à produire un pinceau de lumière collimaté en sortie de l'objectif, ainsi ces rayons parallèles arrivent avec la même incidence sur l'interface et génèrent sur la zone éclairée un champ d'onde évanescente le plus homogène possible en profondeur de pénétration. D'un point de vue pratique, ce réglage est obtenu en alignant le faisceau avec l'axe optique de l'objectif puis en imageant la source à l'infini en sortie de l'objectif, dans la pratique à quelques mètres. Le point de focalisation sera par la suite décalé de l'axe optique pour augmenter l'angle d'incidence et produire la réflexion totale.

Ensuite notons que la qualité de focalisation (figure 4.4) dépend du jeu de lentilles choisies pour focaliser le faisceau et de la taille initiale de la source lumineuse. Dans notre montage, une diode laser est initialement couplée à une fibre monomode de $5 \mu m$ de cœur, le point de focalisation formé est donc caractérisé par une taille réelle : $L_3/L_2 \times 5 \mu m = 25 \mu m$. Cette faible taille nous a permis de générer des ondes évanescentes de faible profondeur : 150 à 200 nm au mieux.

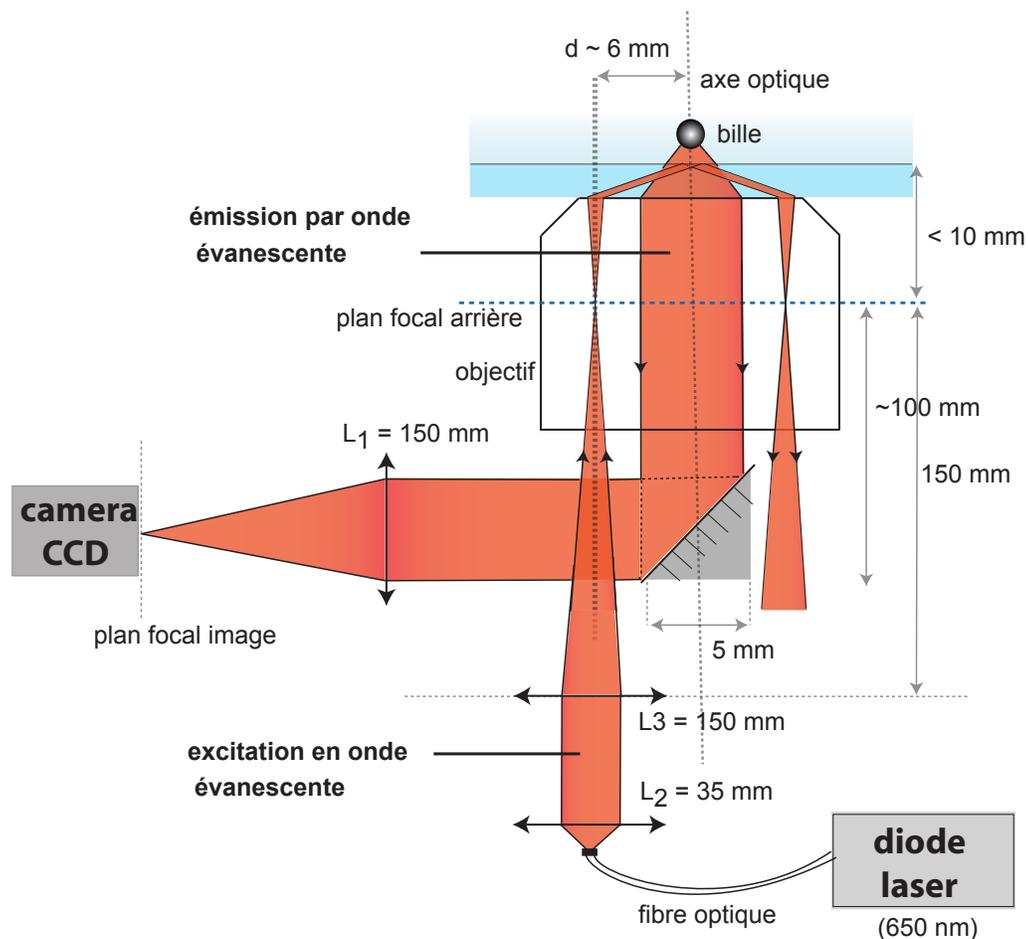


FIG. 4.4 – **Configuration pour la détection en réflexion totale par diffusion.** A partir de la relation liant l'angle d'incidence au décalage d par rapport à l'axe optique, $f_{obj} = 3\text{ mm}$ étant la focale de l'objectif (donnée du constructeur), on peut évaluer le décalage minimum pour obtenir l'angle critique : $d = f_{obj} \tan i_C = 5.6\text{ mm}$. Un iris situé à la sortie de la lentille L_3 règle la divergence du faisceau d'excitation et l'étendue de la zone d'excitation par réflexion totale. L'intensité de la source laser est régulée par asservissement à l'aide d'une mesure directe de l'intensité émise par une photodiode implantée sur le substrat d'émission et d'une électronique maison (régulation à 0.1% sur plusieurs dizaines de minutes). On a choisi de coupler la source lumineuse à une fibre monomode pour disposer d'un point source de taille minimale et de forme régulière.

En remplaçant la source laser par une RC-LED nous avons testé la possibilité de la réflexion totale par objectif à grande ouverture numérique utilisant une source incohérente. Le but visé était l'utilisation d'une source à faible bruit ne présentant pas de phénomènes d'interférences multiples ("speckle" cf paragraphe 4.3.4.4). Dans ce cas, la focalisation de la source est obtenue par une seule lentille, la contrainte d'encombrement liée à la distance minimale d'approche de cette lentille à l'arrière de l'objectif (environ 10 cm) impose alors de travailler avec un grandissement supérieur à l'unité pour maintenir une puissance lumineuse collectée suffisante (de l'ordre de 0.1 mW). La taille du point de focalisation atteint donc plusieurs centaines de microns, chaque point de cette source large située dans le plan focal arrière de l'objectif produit alors son propre angle d'incidence et donne lieu à une excitation en onde évanescente à profondeurs de pénétration multiples. Finalement, le couplage étant plus fort pour les faibles angles, l'onde évanescente ainsi générée présentait une profondeur de pénétration de 600 nm au minimum.

Du point de vue de la collection de l'émission en ondes évanescentes, nous avons fait le choix

d'utiliser un simple miroir aligné avec l'axe optique de l'objectif, avec 5 mm de côté il permet d'imager la surface de l'échantillon sur une caméra CCD avec un nombre d'ouverture équivalent tel que $NA = 1.52 \sin i_1 = 1.52 \times 2.5 / \sqrt{2.5^2 + f_{obj}^2} \approx 1$. Par construction, le rayon réfléchi par réflexion totale est ainsi séparé du chemin optique de collection.

Finalement, ce dispositif permet d'imager en grand champ un nombre important de billes en parallèle, plus d'une centaine (figure 4.5), tout en permettant le couplage à la micromanipulation. La partie supérieure du montage est laissée libre pour l'ajout des aimants.

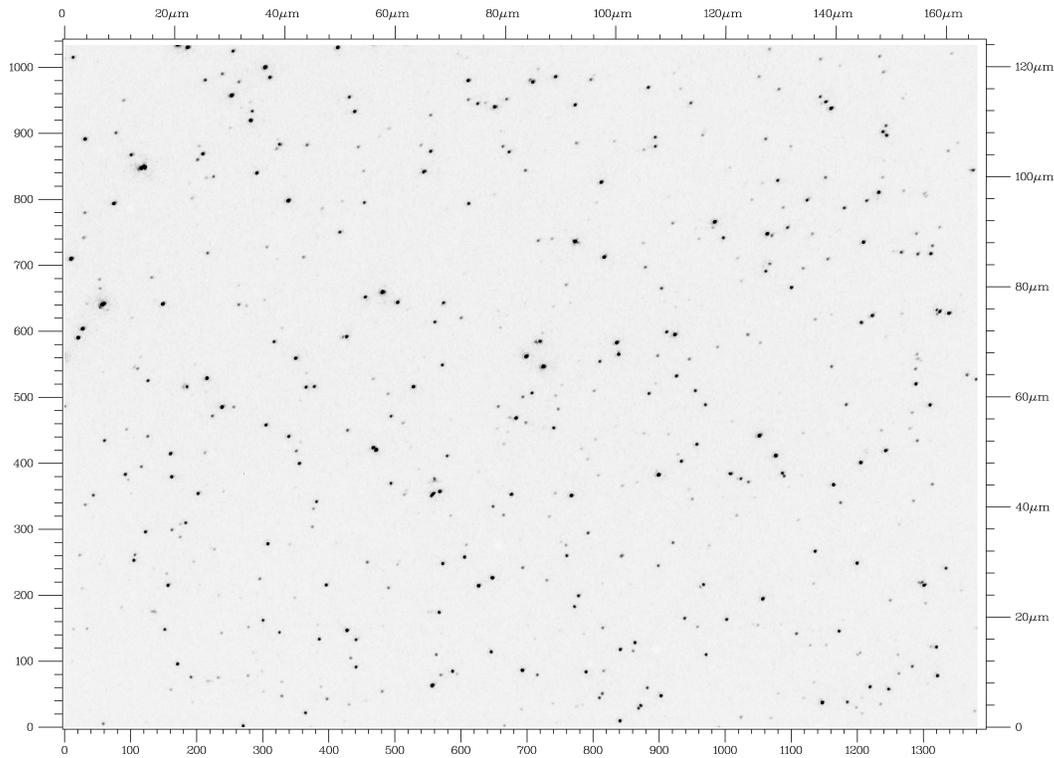


FIG. 4.5 – **Imagerie grand champ par onde évanescente.** L'imagerie produite peut être qualifiée d'imagerie sur fond noir (le contraste est ici inversé) et facilite l'identification rapide des billes. Plus de trois cent billes sont visualisées simultanément par ondes évanescentes, illustrant les possibilités de multiplexage renforcé par ondes évanescentes.

4.3.2 Suivi de position

Pour le suivi de position en (x,y) , nous utilisons toujours le procédé d'auto-convolution des profils selon x et y qui rapporte une résolution nanométrique. A partir de ce pointé, on calcule à chaque image le profil radial d'intensité de chaque bille après soustraction de la valeur de l'intensité de champ noir, mesurée au voisinage de chaque bille, et principalement égale au niveau de bruit électronique de la caméra. Pour le suivi en z , l'intensité totale émise par bille est enfin obtenue par intégration du profil, légèrement apodisé (illustration des profil radiaux au paragraphe 4.3.4.2). On enregistre la position en z pour une profondeur de pénétration δ et une intensité I_0 données, telle que $z = -\delta \ln(I/I_0)$.

4.3.3 Calibration de la profondeur de pénétration

4.3.3.1 Principe de calibration

Pour calibrer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente et vérifier, dans un premier temps, la décroissance exponentielle de l'intensité, nous profitons du système d'imagerie par anneaux développé au sein du laboratoire. Notre montage couple les deux systèmes d'imagerie qui sont interchangeables à tout instant, on établit ainsi la correspondance entre position mesurée par anneaux de diffraction et intensité émise par réflexion totale.

D'autre part, nous avons choisi de manipuler préférentiellement des molécules du type épingle à cheveux, caractérisées par une portion double brin de taille variable. Ce type de molécule fournit une première référence de longueur intrinsèque entre deux états stables: épingle à cheveux dégraiffée et fermée (figure 4.6). On peut ainsi se donner un étalon de longueur variable qui soit adapté à la calibration de différentes profondeurs de pénétration.

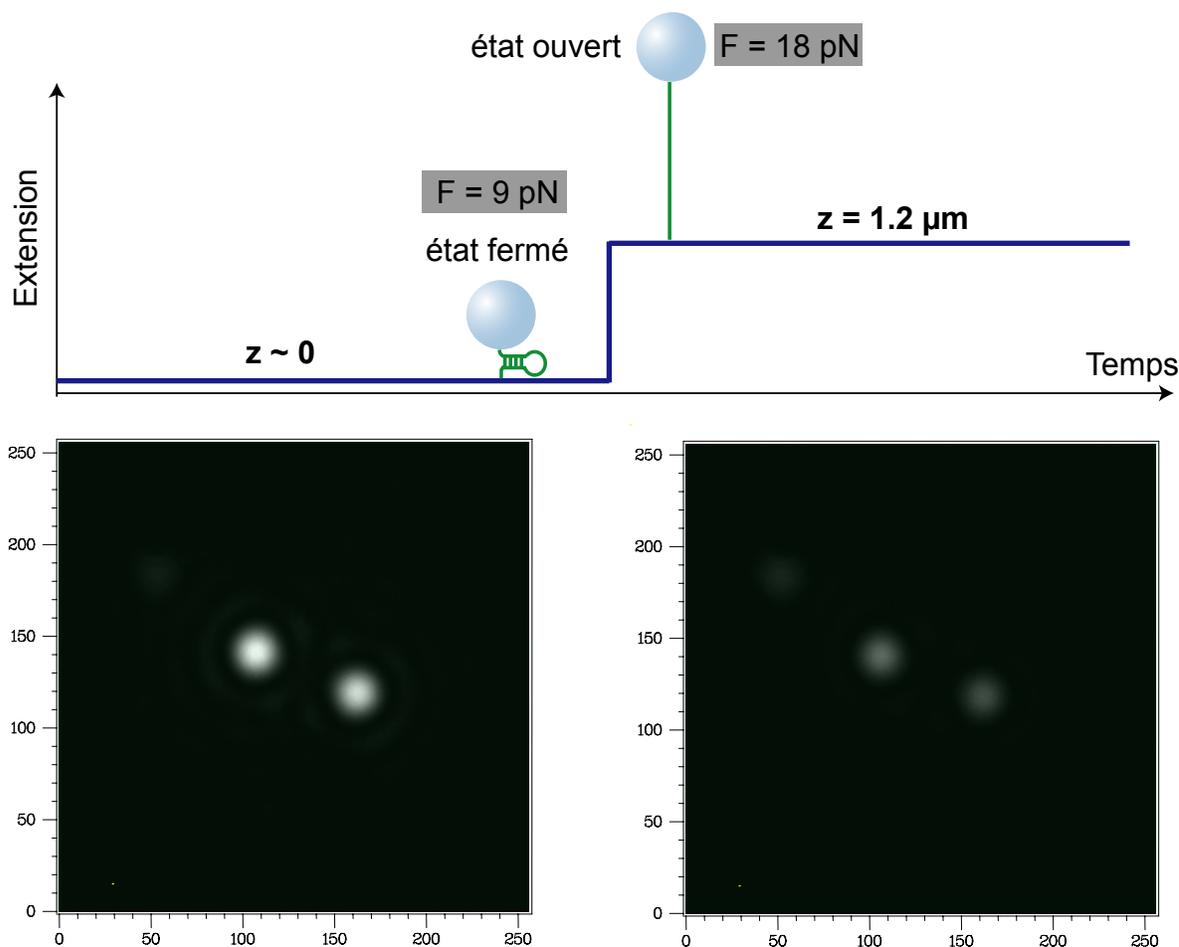


FIG. 4.6 – Imagerie par onde évanescente de deux billes accrochées à une molécule en épingle à cheveux de 1.2 kB. Les deux images présentent l'émission par réflexion totale de deux billes magnétiques, pour un changement d'extension de 1.2 μm entre état fermé et ouvert de la molécule (modulation de la force entre 18 et 9 pN). La profondeur de pénétration est ici ajustée à 600 nm. L'unité des axes est indiquée en pixels.

Pour réaliser finement cette calibration, nous avons utilisé un protocole expérimental mis au point au sein du laboratoire par Maria Manosas et Fangyuan Ding : une molécule du type boucle à cheveux est ouverte puis fermée en présence d'oligonucléotides. Ces fragments d'ADN sont choisis pour

être complémentaires à une, ou plusieurs, séquence de bases contenue dans la région double-brin de la molécule. Après ouverture mécanique, les oligonucléotides libres en solution ont donc accès à leurs sites complémentaires et s'hybrident à la molécule ouverte. On diminue ensuite la force pour provoquer la fermeture du substrat, les oligonucléotides hybridés bloquent transitoirement et partiellement la fermeture de la séquence double brin et révèlent les positions de blocage associées aux différents sites d'hybridation (figure 4.7). On répète enfin plusieurs cycles d'ouverture/fermeture entre deux points de force identiques pour repérer toutes les positions de blocage. Pour caractériser l'onde évanescente, on soumet alors un ensemble de molécules à ce processus mécanique en imagerie par anneaux d'interférences puis en imagerie par réflexion totale.

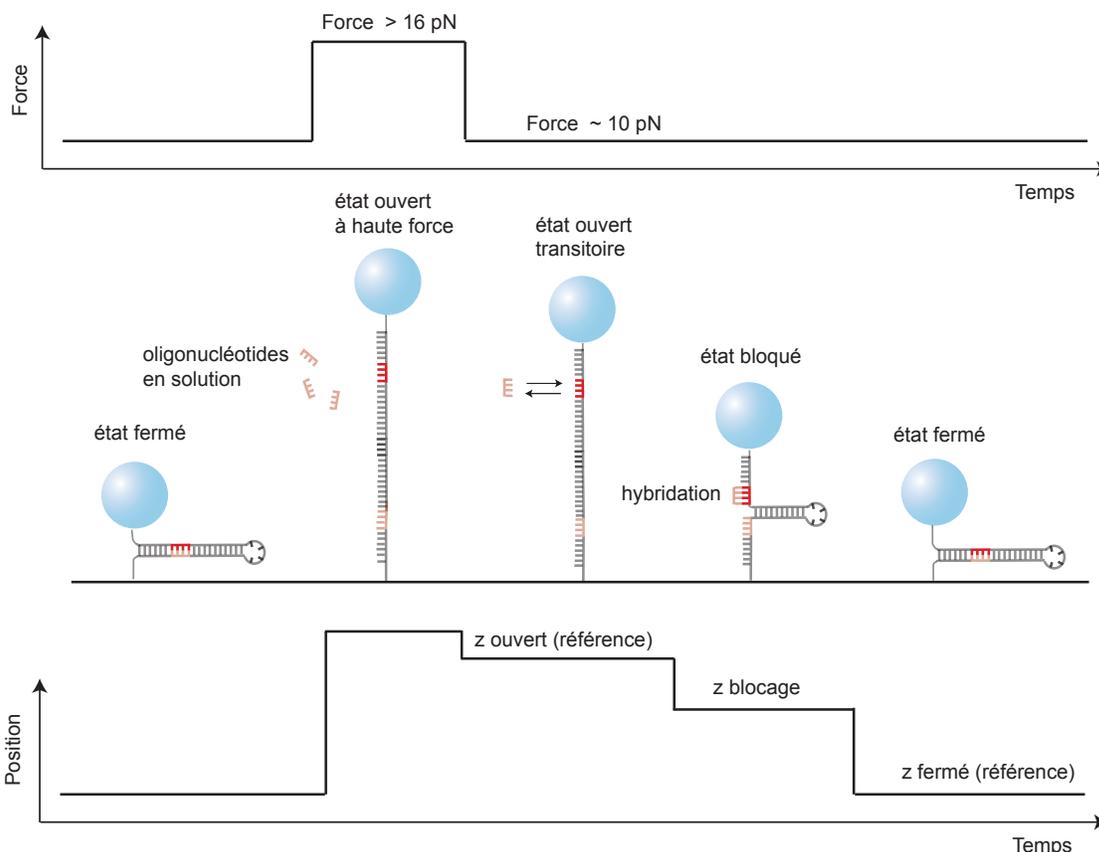


FIG. 4.7 – **Principe de détection des positions de blocage par hybridation d'oligonucléotides.** L'illustration représente un cycle d'ouverture/fermeture d'une molécule en épingle à cheveux avec hybridation d'un oligonucléotide (constitué ici de 4 nucléotides), et blocage transitoire. Le signal d'extension repère les positions de blocage. La comparaison entre le signal d'extension en imagerie par anneaux d'interférences et le signal d'intensité en onde évanescente, obtenu sur les mêmes molécules pour des paramètres mécaniques identiques, permettra la calibration de la détection par réflexion totale.

Pour être en mesure d'identifier clairement les positions de blocage par détection vidéo à bande passante limitée, les temps de blocage doivent raisonnablement être supérieurs à quelques fractions de seconde. Les facteurs physiques qui contrôlent la stabilité de l'hybridation sont principalement la température, la force, la longueur des oligonucléotides et les conditions salines. La valeur de la force est ajustée autour de 10 à 12 pN, pour des forces plus hautes la transition mécanique ouverture → fermeture présente des états métastables et des positions de blocages supplémentaires, signature de la structure de la molécule. Les expériences sont réalisées à température ambiante dans un tampon

contenant des sels de magnésium et potassium dans des concentrations milli-molaires (cf figure 4.8). Dans ces conditions, des oligonucléotides de 8 bases produisent des durées de blocage de quelques fractions de secondes à plusieurs secondes.

Notons qu'à l'extrémité de la molécule, la boucle de l'épingle à cheveux contient une séquence de bases non appariées (thymine (T)). Après ouverture de la molécule et réduction de la force, cette boucle impose un premier état transitoire dont la durée varie avec le nombre de bases non appariées.

L'intérêt de cette boucle est d'établir une référence de position pour la molécule encore totalement ouverte à faible force. A cette force de test, le changement d'extension entre molécule ouverte et fermée fournit ainsi une première calibration de longueur en fonction du nombre de bases ouvertes. Pour repérer chaque site d'hybridation au sein de la séquence de l'épingle à cheveux, on mesure ensuite la différence d'extension entre les états de blocage et l'état molécule fermée à la force de test, elle est convertie en nombre de bases par proportionnalité (voir paragraphe 4.4.1). Sans cette boucle, on dispose toujours d'une référence pour la molécule ouverte mais pour une force différente de la force de test. L'extension d'une base est alors modifiée par le changement de force et le positionnement exact des points de blocage devient plus difficile.

4.3.3.2 Calibration pour différentes profondeurs de pénétration

Nous avons calibré la dépendance exponentielle de l'intensité de l'onde évanescente sur deux molécules en épingle à cheveux de 1200 paires de base et 179 paires de bases. Le protocole consiste en l'ouverture du hairpin à haute force dans un premier temps, on repère ensuite les différentes étapes transitoires de blocages provoquées par la présence de la boucle "homologue" en bout de molécule et les hybridations d'un oligonucléotide lors de la fermeture.

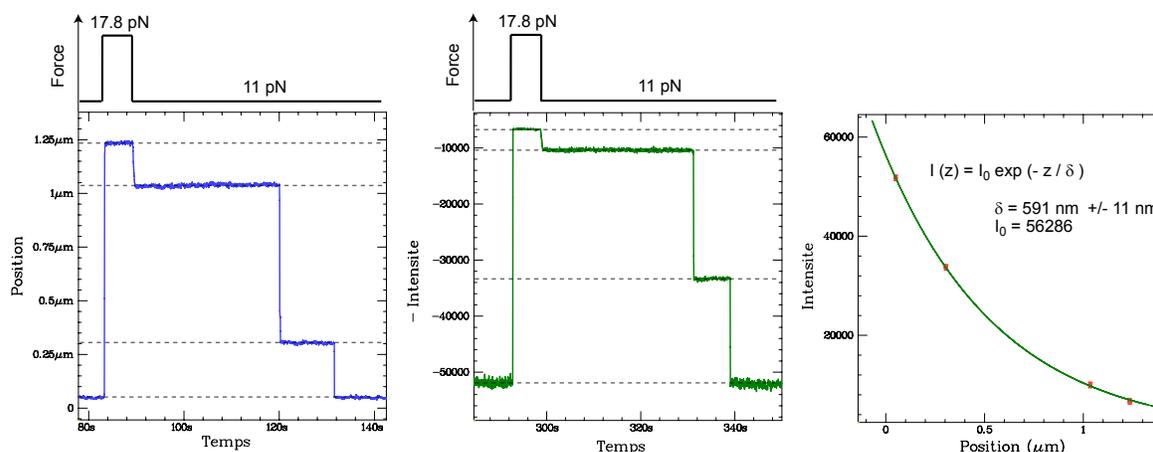


FIG. 4.8 – Calibration pour une profondeur de pénétration de 600 nm. Relevé de position en imagerie par anneaux (à gauche) et enregistrement des variations d'intensité émise par onde évanescente (au milieu) pour la même molécule, quelques instants plus tard. A partir de ces deux mesures, on construit la courbe des variations d'intensité en fonction de la distance à la surface (à droite), elle démontre une dépendance exponentielle de l'intensité émise selon la distance avec une profondeur de pénétration de 591 ± 11 nm. Le tampon utilisé est une solution acétate de pH = 7.5 (Tris Acétate 25 mM) contenant des sels de potassium (KOAc 150 mM) et de magnésium (MgOAc₂ 10 mM), il optimise la durée des blocages par hybridation.

Dans le cas de la molécule de 1.2 kb, on obtient une position de blocage dû à la présence d'un unique site d'hybridation, pour la molécule de 179 paires de base on dispose de quatre sites d'hybridation et d'autant de positions de blocage. On enregistre successivement l'extension de la molécule

en imagerie par anneaux et les valeurs de l'intensité détectée par imagerie en réflexion totale pour ces positions.

Nos résultats démontrent que l'intensité émise par une bille magnétique placée dans le champ évanescent suit une dépendance mono-exponentielle selon la distance à la surface (figure 4.8 et figure 4.9). Avec une longueur d'onde d'excitation de 650 nm et dans la configuration à objectif à grande ouverture numérique, nous sommes capables d'ajuster la profondeur de pénétration sur une gamme de 600 à 200 nm.

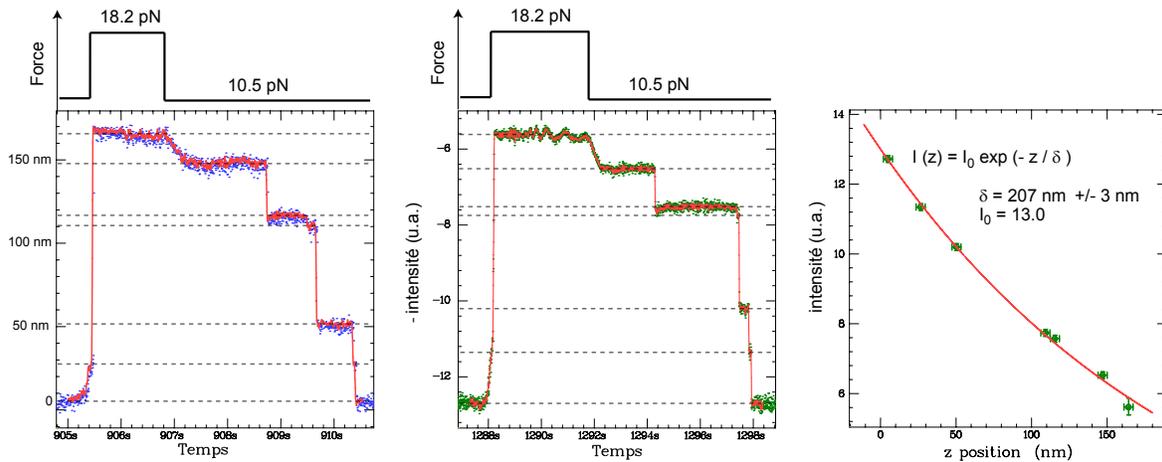


FIG. 4.9 – **Calibration pour une profondeur de pénétration de 200 nm.** Le suivi en imagerie par anneaux (à gauche) comme le relevé des intensités en imagerie par réflexion totale (au milieu) indiquent quatre blocages successifs par hybridation à la fermeture du substrat. Pour les deux types d'imagerie, l'enregistrement est réalisé à 200 Hz puis filtré à 30 Hz pour plus de clarté. Le tampon utilisé est celui décrit à la figure précédente. La dépendance exponentielle de l'intensité émise avec la distance à la surface (à droite) révèle une profondeur de pénétration de 207 ± 3 nm. A l'ouverture de la molécule, on observe une oscillation résiduelle de quelques nanomètres, principalement sur le relevé d'intensité émise par réflexion totale, elle est attribuée à des défauts d'asservissement de la position des aimants qui provoquent des variations d'extension de la molécule par fluctuation de la force.

4.3.4 Qualités et défauts de l'imagerie par réflexion totale

4.3.4.1 Résolution sub-nanométrique pour une molécule de 200 nm

Après calibration de la profondeur de pénétration, on inverse simplement la relation $I = I_0 e^{-z/\delta}$ pour convertir le signal d'intensité lumineuse en signal de position. La valeur de l'intensité au niveau de l'échantillon introduit un simple décalage de position et joue un rôle secondaire, seules les mesures de changement d'extension sont prises en compte en manipulation par pinces magnétiques.

Pour évaluer la résolution obtenue en imagerie par réflexion totale, le procédé appliqué à la calibration de l'onde évanescente est idéal, il fournit sur toute la gamme d'extension de la molécule des échantillons de résolution, déterminés pour chaque position de blocage. Il permet de plus de comparer les deux techniques d'imagerie dans des conditions de manipulation identiques.

Dans l'exemple illustré par la figure 4.10, la profondeur de pénétration de l'onde évanescente (200 nm) est équivalente à l'extension de la molécule totalement ouverte, la force appliquée vaut 18 pN pour la force d'ouverture et 10 pN pour la force de test. Le suivi de position en ondes évanescentes présente une résolution sub-nanométrique, augmentée par rapport à la détection par anneaux d'interférences. Elle est caractérisée par un écart quadratique moyen compris entre 0.6 et 1 nm, dans le meilleur cas le gain de résolution est d'un facteur 2. Dans le cas du suivi par réflexion totale, on

remarque que le bruit de pointé est systématiquement plus élevé lorsque l'extension est augmentée à force constante (à la force de test). La résolution peut être limitée par le bruit brownien ou par les capacités intrinsèques de détection (diminution de l'intensité émise par la bille). Dans le cas du suivi par anneaux, le bruit diminue faiblement jusqu'à un niveau de 1.2 nm pour l'écart quadratique moyen.

Nous observons aussi que la première étape transitoire liée à la boucle "homologue" en extrémité de molécule démontre une stabilité mécanique plus faible que les états d'hybridation transitoires, et des fluctuations plus grandes d'écart quadratique moyen de 1.5 nm.

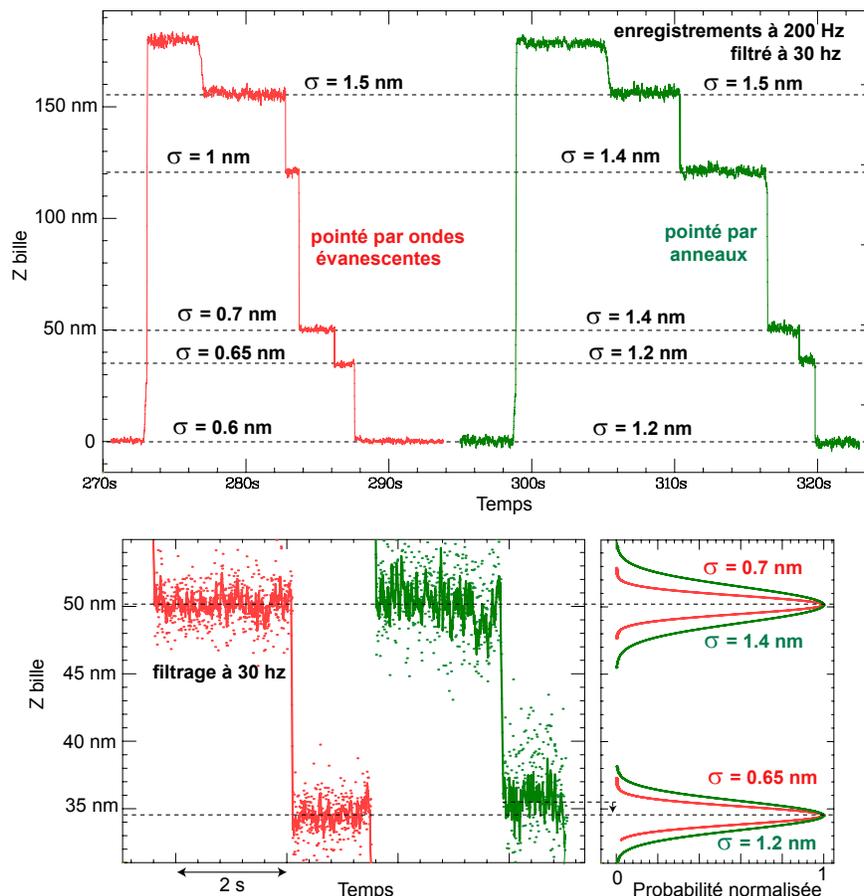


FIG. 4.10 – **Résolution comparée pour l'imagerie par ondes évanescentes et l'imagerie par anneaux.** Nous présentons deux trajectoires enregistrées à des temps différents, par détection en ondes évanescentes (en rouge) puis par imagerie en anneaux (en vert, en haut). Pour l'onde évanescente la profondeur de pénétration vaut ici 200 nm. Une molécule en épingle à cheveux est ouverte sous 18 pN puis refermée en présence d'oligonucléotides. La résolution est évaluée sur chaque position de blocage par son écart quadratique moyen (σ). La comparaison des niveaux de bruit entre les deux mesures est mise en évidence par l'agrandissement des trajectoires pour deux positions de blocage à faible extension (en bas), les ajustements gaussiens des histogrammes de position y sont figurés.

Lors de l'ouverture/fermeture de la molécule, chaque base est convertie par un signal d'extension double (extension et réduction équivalente de deux bases), la résolution nécessaire au positionnement des blocages est donc divisée par deux. A 10 pN, l'extension d'une base pour l'ADN simple brin vaut typiquement 0.42 nm, et le changement d'extension provoqué par l'ouverture d'une base est de 0.85 nm. Pour résoudre deux positions séparées par une distance d , l'écart quadratique moyen

en position requis doit être inférieur à $d/2$. L'imagerie par ondes évanescentes offre donc un degré de résolution qui permet de résoudre des positions distantes de deux paires de base.

4.3.4.2 Insensibilité de l'intensité de l'onde évanescente à la position de focalisation

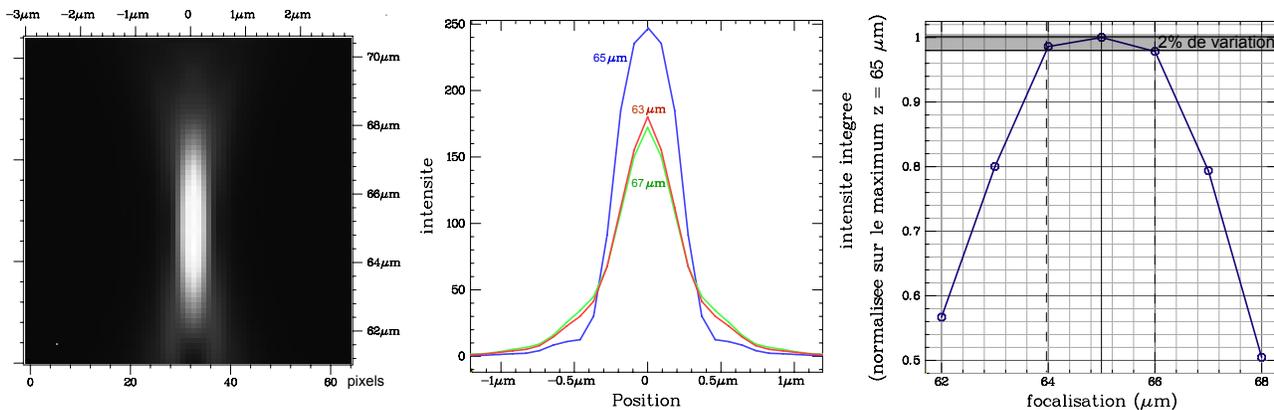


FIG. 4.11 – **Image de calibration obtenue par translation de l'objectif le long de l'axe optique.** Une bille de $1 \mu\text{m}$ de diamètre attachée à un ADN est située à une distance de 100 nm de la surface de l'échantillon, elle est imagée pour une onde évanescente de profondeur de pénétration de 400 nm . On enregistre une image de calibration (à gauche). Les profils radiaux sont représentés pour trois valeurs de la focalisation (au milieu). La courbe de droite représente l'intensité totale émise pour différentes positions relatives échantillon-surface, l'intensité est intégrée sur le profil et normalisée par sa valeur au point de focalisation. Au voisinage du point de focalisation l'intensité émise par onde évanescente varie faiblement, elle est quasiment indépendante de la position relative échantillon-surface.

Pour évaluer d'éventuels défauts de focalisation dans l'imagerie par ondes évanescentes, nous enregistrons pour différentes focalisations les profils d'intensité émise par une bille magnétique liée à un brin d'ADN et soumise à une force constante (figure 4.11), la distance bille-surface est donc constante pendant la translation de l'objectif le long de l'axe optique.

Dans une région de $2 \mu\text{m}$ autour du point de focalisation ($z \approx 65 \mu\text{m}$), l'intensité émise par onde évanescente varie de 2%, soit une variation maximale de l'intensité émise dans cette région de $1\% \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Par conséquent, en imageant par ondes évanescentes au voisinage du point de focalisation, les dérives de position en z dues à des fluctuations thermiques de 1 K (soit une dilatation de $1 \mu\text{m}$) seront de l'ordre de 1% de l'intensité totale, soit d'une amplitude de 2 nanomètres pour une détection caractérisée par une profondeur de pénétration de 200 nm . On donne donc ici un premier élément de validation de la qualité d'imagerie en terme de fidélité des mesures de position aux temps longs, nous caractériserons d'une manière directe les dérives basse fréquence au paragraphe suivant.

4.3.4.3 Dérives de position aux temps longs

Nous allons caractériser ici les dérives de position de l'imagerie par réflexion totale, selon la direction z . Pour cette estimation, nous produisons des cycles d'ouverture/fermeture successifs d'une molécule en épingle à cheveux de 180 bp et mesurons les variations d'extension à l'aide d'une onde évanescente de profondeur de pénétration de 200 nm (figure 4.12). A l'échelle de plusieurs dizaines de minutes, on constate de très faibles dérives, inférieures à 4 nm . Bien que le microscope ne soit pas thermalisé dans cette évaluation, l'imagerie par réflexion totale propose donc un suivi de position très fidèle aux temps longs et répond idéalement aux contraintes de répétabilité de la mesure (cf 4.4).

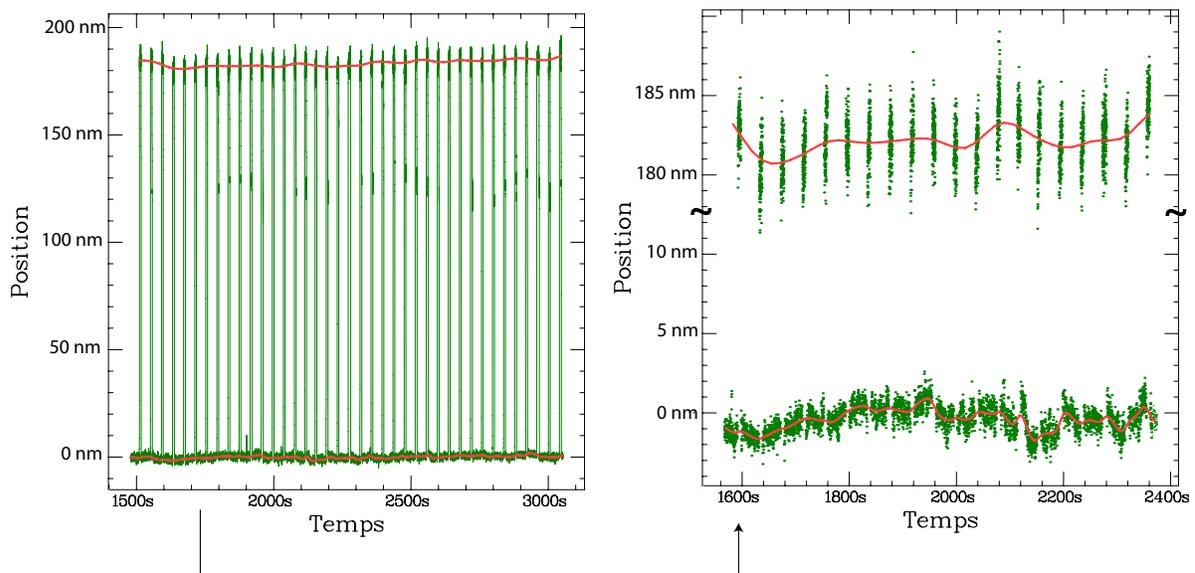


FIG. 4.12 – **Dérives de position aux temps longs pour une modulation à deux états d’extension.** Une molécule en épingle à cheveux est séquentiellement ouverte et fermée pour une modulation de force entre 11 et 20 pN. La profondeur de pénétration de l’onde évanescente est de 200 nm. Les dérives de position sont inférieures ou égales à 4 nm aux temps longs (plusieurs dizaines de minutes). La figure de droite présente une échelle plus adaptée à la visualisation des dérives.

4.3.4.4 Dégradation éventuelle de la qualité d’imagerie par speckle

Lorsqu’on éclaire avec un laser un écran diffusant, on constate que la partie éclairée de l’écran est formée d’une multitude de petites taches brillantes, de formes diverses et réparties de manière désordonnée. Cet aspect granuleux est communément appelé speckle ou tavelures. On obtient ce même aspect lorsqu’on éclaire l’échantillon à l’aide d’un laser pour imager des billes micrométriques par transmission classique [30]. De façon générale, le speckle apparaît chaque fois qu’une onde lumineuse spatialement cohérente rencontre un milieu diffusant. On l’interprète par l’interférence multiple des ondes cohérentes émises par les différents points du diffuseur, aléatoires en position et en forme. Cette interférence donne lieu à des variations spatiales rapides et aléatoires de l’intensité, liées aux variations de phase entre diffuseurs. Avec une source incohérente spatialement, les diffuseurs sont considérés comme des sources secondaires incohérentes, on ajoute donc les intensités issues de ces points qui ne varient que très lentement sur la région éclairée.

Dans la configuration en ondes évanescentes avec illumination par source laser, cet effet se traduit par une distribution spatialement chaotique de l’excitation évanescente sur la zone éclairée (figure 4.13). Par conséquent, il est préférable de calibrer la profondeur de pénétration pour chaque bille indépendamment.

D’autre part, l’intensité émise par une bille magnétique est ainsi couplée aux éventuelles variations de position transverse (x,y). Nous avons évalué ce couplage en enregistrant les variations d’intensité émise par une bille magnétique de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre lors de son déplacement dans le plan de l’échantillon par incréments de 50 nm. Ces variations spatiales sont aléatoires et rapides : on calcule une dérivée locale de l’intensité (normalisée par sa propre valeur), de l’ordre de 20 % par micron. Dans notre système de micromanipulation, les variations de position en (x,y) liées aux dérives basse-fréquence n’excèdent pas 100 nm sur plusieurs dizaines de minutes, elles conduisent donc à des variations de l’intensité lumineuse de 2%, soit 4 nm de dérive en z pour une profondeur de pénétration de 200 nm. Cet effet apparaît donc modéré dans notre montage, aux temps très longs (supérieurs

à l'heure) il introduira cependant des corrections inévitables de l'ordre de plusieurs nanomètres. En produisant une ouverture/fermeture de la molécule, on peut alors corriger la calibration précédente pour la nouvelle position obtenue après dérive.

Notons ici qu'une stratégie de correction des dérives d'émission et donc de position en z , référencée sur une bille fixe, s'avère inefficace puisque le profil d'intensité est fortement inhomogène suivant la position en (x,y) , et donc variable entre billes.

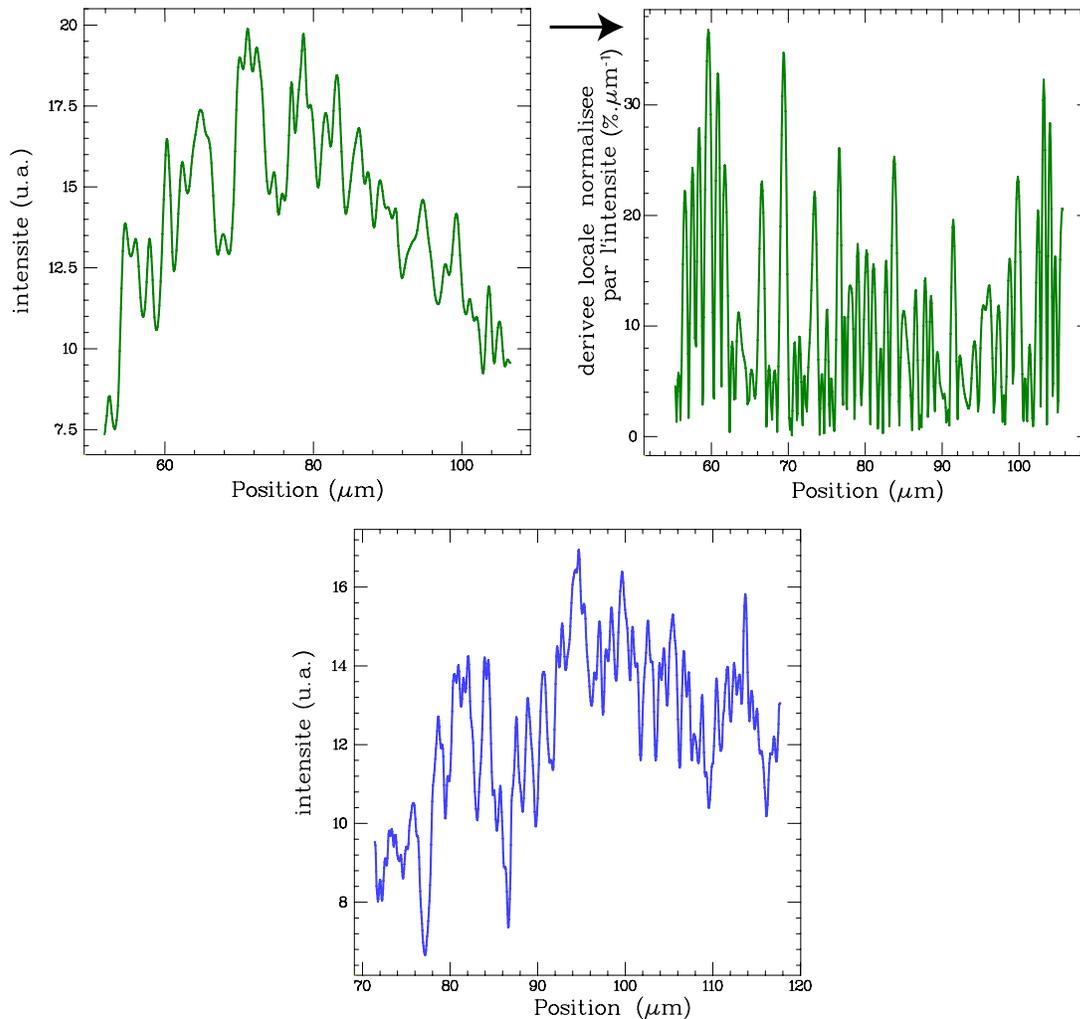


FIG. 4.13 – **Enregistrement des variations d'intensité de l'onde évanescente lors d'un déplacement dans le plan (x,y) .** Le profil de l'intensité émise par une bille de $1\mu\text{m}$, liée à un ADN et placée au voisinage de la surface, est établi par translation selon x (en haut, à gauche). Nous calculons la dérivée du profil en chaque point et la normalisons par l'intensité locale (en haut, à droite). Nous reproduisons cette évaluation pour une poussière diffusante de taille inférieure, liée à la surface de l'échantillon (en bas). On observe que les variations spatiales de l'intensité sont convoluées par la taille du diffuseur, une bille de $1\mu\text{m}$ lisse partiellement les variations les plus rapides.

Pour s'affranchir de cet effet, nous envisageons d'utiliser un modulateur de phase lumineuse pour diminuer la cohérence spatiale de l'émission laser. En imposant une modulation temporelle de la phase lumineuse, plus rapide que l'acquisition vidéo, nous serons en mesure de brouiller ce phénomène d'interférences. Ce type de matériel est actuellement à l'essai au laboratoire. Au paragraphe 4.5, nous décrirons aussi un dispositif en cours de développement qui permet de coupler la

visualisation par réflexion totale aux pinces magnétiques, avec excitation en lumière incohérente.

4.4 Application à la détermination de positions d'hybridation

4.4.1 Motivation : principe de séquençage d'ADN par hybridation

Cette application de l'imagerie par réflexion totale fait suite aux travaux de Fangyuan Ding sur le séquençage mécanique de l'ADN en molécule unique, travaux développés au sein de notre laboratoire.

Il est possible par un processus biochimique de recoder un fragment d'ADN, en le transformant en une nouvelle séquence où chaque nucléotide (A,T,G ou C) est remplacé par une séquence spécifique de quelques nucléotides [81]. Par expansion, chaque nucléotide de la séquence initiale est donc converti en une séquence plus étendue.

Le principe de séquençage repose alors dans l'analyse d'une séquence connue d'ADN double brin qui recode une séquence initiale par oligonucléotides de 8 bases, notés A_8 , T_8 , G_8 , C_8 (figure 4.14). Cette séquence est insérée dans une molécule en épingle à cheveux. La séquence initiale est ensuite identifiée par manipulation mécanique : on injecte successivement en solution les oligonucléotides spécifiques d'expansion, et on produit des cycles d'ouverture/fermeture de la molécule d'intérêt accrochée à une bille magnétique. Après chaque ouverture, les oligonucléotides introduits peuvent s'hybrider à la molécule qui contient par construction les sites d'hybridation complémentaires. Ils produisent alors des blocages transitoires à la fermeture de la molécule, le relevé de ces positions permet donc de repérer chaque oligonucléotide dans la séquence intégrée à la molécule. Si la résolution est suffisante pour distinguer tous les blocages (séparés par une distance minimale égale à la longueur de chaque oligonucléotide), on décode complètement le fragment initial après repositionnement des quatre oligonucléotides.

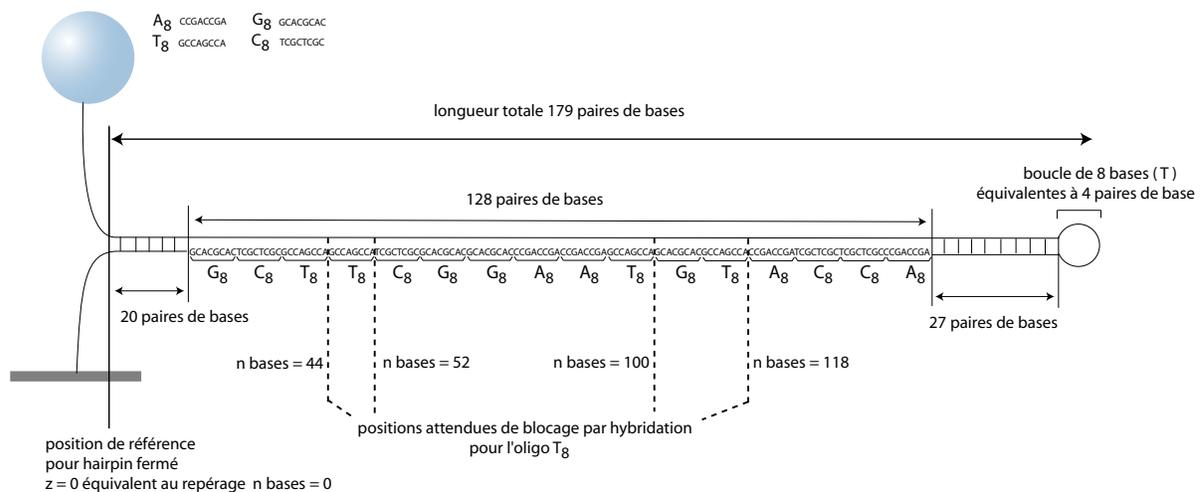


FIG. 4.14 – Description d'une séquence de 16 bases, étendue et intégrée au sein d'une molécule en épingle à cheveux. La partie étendue, placée au sein d'une molécule en épingle à cheveux, recode une séquence de 16 bases initiales par oligonucléotides de 8 bases (soit 128 bases pour la séquence étendue). La molécule compte finalement 179 paires de bases dans sa partie double brin. Au cours de chaque enregistrement, l'état molécule fermée est utilisé comme référence de position, équivalente à $z=0$ ou $n_{bases} = 0$. La première position de blocage attendue pour l'oligonucléotide T_8 , par exemple, correspond à une séparation de 44 bases par rapport à cette référence. Le rapport de conversion extension/paire de base est établi en utilisant la référence de 179 paires de base pour la molécule totalement ouverte et étendue sous la même force.

Par expansion du code initial, on diminue donc la résolution requise pour ce type de séquençage par hybridation. La résolution de l'onde évanescente (deux paires de base dans le cas d'une molécule en épingle à cheveux) offre alors une possibilité de séquençage mécanique par mesure des positions d'hybridation.

4.4.2 Résultats expérimentaux

4.4.2.1 Exemple pour l'oligonucléotide T_8

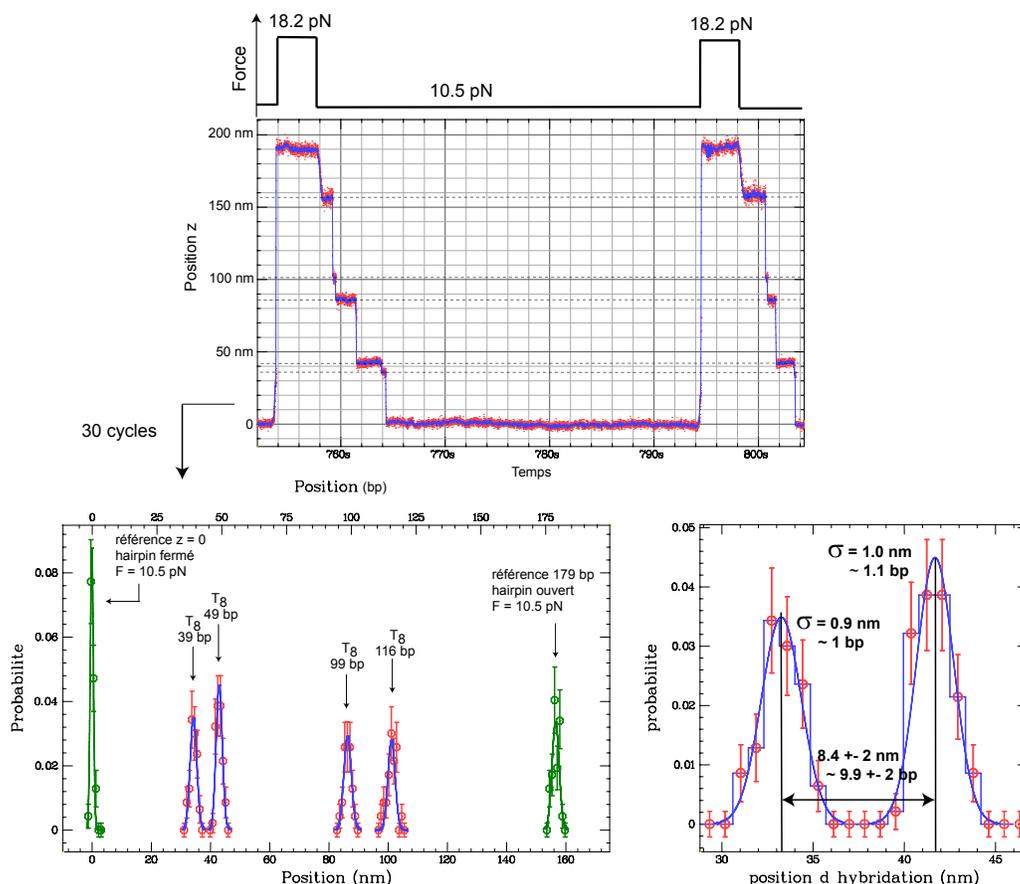


FIG. 4.15 – Trajectoire enregistrée en réflexion totale lors de la manipulation mécanique et identification des positions de blocage. Trajectoire originale à 200 Hz (en rouge), filtrée à 30 Hz (en bleu), la profondeur de pénétration vaut ici 200 nm. On observe idéalement 4 positions de blocage à la fermeture de la molécule. Après répétition de 30 cycles d'une durée de quelques dizaines de seconde, on établit les histogrammes des positions de blocage, ils sont ajustés par des distributions gaussiennes, les positions mesurées en paires de base sont indiquées pour chaque gaussienne. Le détail pour deux positions de blocage séparées de 8 paires de base est présenté en bas, à droite. Un ajustement gaussien des histogrammes révèle une précision sur la détermination des positions de 1 nm ou mieux, soit environ une paire de base.

Pour l'oligonucléotide T_8 , on s'attend à quatre positions de blocage. On établit donc la statistique des positions de blocage pour identifier clairement chaque site d'hybridation. On enregistre plusieurs cycles, typiquement 20 à 30. Ils permettent notamment de distinguer et d'éliminer des hybridations parasites. Il peut s'agir simplement d'hybridations provenant d'un oligonucléotide de nature différente, introduit dans la chambre micro-fluidique lors d'une étape précédente d'identification. En ce sens,

une attention particulière doit être prêtée à chaque rinçage, les rinçages à faible flux demandent plusieurs dizaines de minutes avec le système de micro-fluidique actuel, et il est conseillé d'effectuer des contrôles après chaque rinçage, au risque d'augmenter le temps de manipulation et perdre les molécules sur lesquelles on tire. Pour valider chaque rinçage, on vérifie l'absence des événements de blocage précédents sur quelques cycles d'ouverture/fermeture.

Le nombre d'événements de blocage est ensuite optimisé par une concentration relativement élevée en oligonucléotides (100 nM) pour obtenir un taux maximal d'occupation des sites d'hybridation, tout en gardant une durée de rinçage courte. Cependant ce nombre d'événements obéit à une loi des événements rares et à une statistique de Poisson (décroissance exponentielle du nombre moyen d'événements en fonction du nombre de sites d'hybridation), la situation idéale de 4 hybridations successives n'est pas rencontrée à chaque fermeture mécanique, on obtient en moyenne 2 à 3 blocages par fermeture.

Pour limiter les dérives de position et minimiser cette erreur de mesure sur chaque cycle d'ouverture/fermeture, on réinitialise à chaque nouveau cycle l'étalon de longueur constitué par l'extension totale de la molécule à la force de test (≈ 10 pN), cet étalon est mesuré différenciellement entre les états molécule totalement ouverte et molécule fermée (cf figure 4.7), il est ensuite converti en nombre de bases (179 bp pour la molécule d'intérêt). Chaque position de blocage est alors repérée par rapport à la référence molécule fermée (notée $z=0$) puis convertie en mesure par cet étalon. Cette méthode de conversion, par nature proportionnelle, permet donc de s'affranchir de la calibration exacte de la profondeur de pénétration. Pour le positionnement des blocages, il suffit alors de supposer une dépendance exponentielle de la position avec l'intensité émise.

Finalement, nous sommes capables d'identifier sans ambiguïté les positions de blocage pour des oligonucléotides de 8 bases, avec une précision caractérisée par un écart quadratique moyen de 1 nm ou mieux, soit environ une paire de base. Nous remarquons que la résolution obtenue sur chaque cycle de 0.7 nm est légèrement dégradée par la répétition de la mesure (cf paragraphe 4.3.4.1). Nous attribuons cette dégradation aux dérives de position inhérentes au système de visualisation.

4.4.2.2 Positions d'hybridation

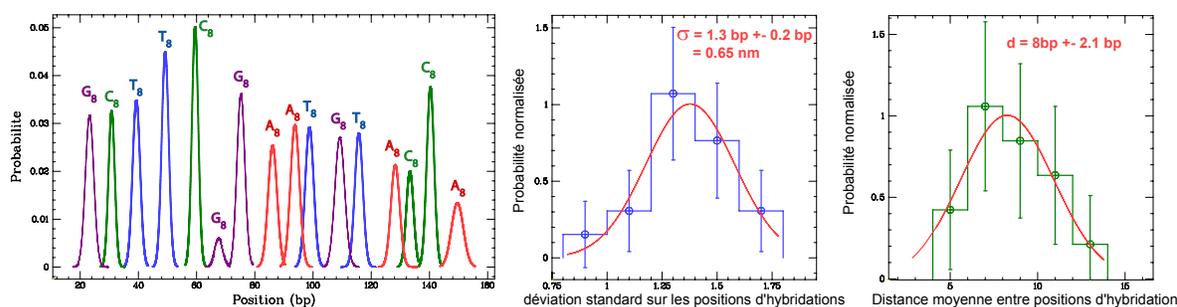


FIG. 4.16 – **Positions d'hybridation déterminées pour la séquence analysée.** Les positions de blocage pour chaque oligonucléotide sont clairement identifiées et séparées par construction des histogrammes, ajustés à des distributions gaussiennes (à gauche). La distance moyenne mesurée entre deux positions d'hybridation successives est de 8 paires de base (à droite). Sur la totalité des positions, chaque position est mesurée avec une précision de 1.3 paires de base.

Après introduction du jeu complet d'oligonucléotides, on repère les différentes positions d'hybridation. L'ajustement gaussien des histogrammes présente un écart quadratique moyen quasi-identique pour les différentes positions de blocage (figure 4.16). En moyenne sur la totalité des 16 hybridations, il vaut 1.3 paires de base, soit 1 nanomètre. La position moyenne entre deux hybrida-

tions adjacentes est mesurée à 8 paires de base, plus ou moins 2 paires de base. Le relevé complet des positions d'hybridation confirme donc la faisabilité d'un séquençage mécanique de l'ADN par hybridation, avec détection par réflexion totale.

4.5 Perspectives : autres configurations possibles pour l'imagerie par OE couplée aux pinces magnétiques

Nous proposons deux configurations alternatives pour l'imagerie par réflexion totale couplée aux pinces magnétiques. Elles visent toutes deux à améliorer la résolution intrinsèque de la détection en adaptant la profondeur de pénétration à des molécules plus courtes, typiquement les molécules ciblées seront de quelques dizaines de base, et associées à une profondeur de pénétration de 50 à 100 nm. Dans la configuration à objectif à grande ouverture numérique, la profondeur de pénétration est limitée par l'angle maximal d'admission. Il existe des objectifs à plus grande ouverture numérique ($NA = 1.65$) mais ils imposent de travailler avec des lames de microscope spéciales (à fort indice $n = 1.78$) et une huile volatile, inadaptée aux durées typiques des expériences (plusieurs heures).

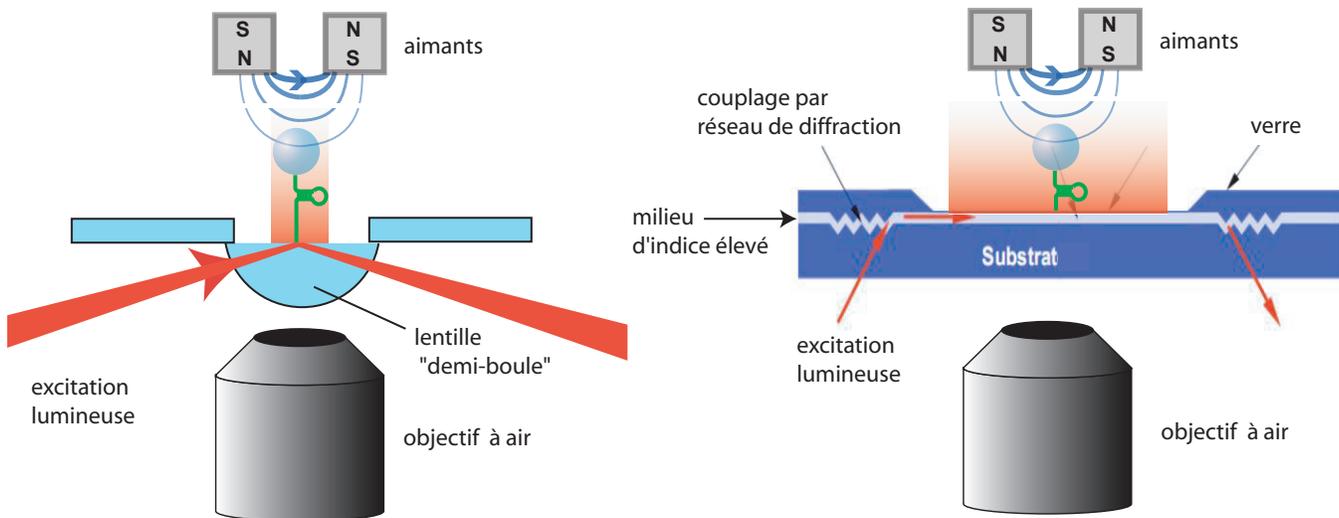


FIG. 4.17 – Configurations alternatives pour l'imagerie par réflexion totale en diffusion couplée aux pinces magnétiques. La première configuration utilise une lentille demi-boule adaptée à des angles d'incidence élevés, la deuxième un guide d'onde pour générer un champ d'excitation étendu.

La première alternative utilise une lentille demi-boule, on focalise le faisceau à l'aide d'une première lentille sur le centre de cette lentille hémisphérique. Ainsi les rayons lumineux pointant le centre arrive sur la surface de la lentille avec une incidence selon la normale et ne sont pas déviés à la traversée de cette interface. On peut donc atteindre des angles d'incidence rasants, supérieurs à l'angle limite de 73° pour un objectif d'ouverture numérique de 1.45. Contrairement à la configuration par objectif à grande ouverture, ce dispositif paraît mieux à la génération d'ondes évanescentes de faible profondeur de pénétration. La dispersion en angles d'incidence (et en profondeurs de pénétration générées) est ici liée à la focalisation du faisceau incident, autrement dit à son ouverture indépendamment de la taille du point source. Nous pensons donc qu'il sera possible de produire une excitation à faible profondeur de pénétration avec une excitation par source incohérente.

La partie supérieure du montage est entièrement disponible pour positionner un couple d'aimants. L'imagerie est réalisée à l'aide d'un objectif à air à longue distance de travail et nombre d'ouverture réduit (typiquement 0.6 ou 0.4). En imageant des billes en solution, situées au centre de la

lentille hémisphérique, les rayons lumineux émis sont peu déviés par la présence de la lentille demi-boule, et les aberrations résultantes limitées.

Le deuxième dispositif utilise un guide d'onde d'indice élevé ($n=2.6$ typiquement) [87], la lumière est naturellement guidée au coeur du dispositif par réflexion totale et produit à l'interface entre indice élevé et milieu extérieur une onde évanescente de longueur de pénétration typique de 100 nm. Le couplage lumineux est facilité par la présence d'un réseau de diffraction intégré au sein du substrat. Ce dispositif présente l'avantage d'un champ d'excitation évanescent étendu de plusieurs millimètres carrés, cependant le champ d'ondes évanescentes produit est affecté par les phénomènes d'interférences multiples (ou "speckle"), dues à la cohérence spatiale du mode électromagnétique guidé. On peut classiquement imager les billes avec un objectif à air, corrigé pour l'épaisseur de verre traversée.

4.6 Conclusion

Nous avons donc développé une imagerie de billes magnétiques par réflexion totale qui offre une résolution sub-nanométrique et de très faibles dérives aux temps longs. Ces résultats confirment la qualité des mesures de distance effectuées par "nanométrie" évanescente sur des molécules uniques [105, 100]. Elle permet le suivi des billes en trois dimensions, essentiel dans le cas des pinces magnétiques où l'extension de la molécule est une observable indispensable. Par la rapidité et la simplicité du calcul de pointé en z , ce type d'imagerie paraît particulièrement adapté au suivi en temps réel d'un grand nombre de molécules.

Nous avons aussi proposé une stratégie originale pour calibrer l'imagerie par réflexion totale couplée aux pinces magnétiques, elle permet une mesure absolue de longueur et est indépendante de la configuration optique choisie.

Seconde partie

**Microscopie et signaux optiques
périodiques**

Chapitre 1

Imagerie photothermique de nanoparticules métalliques

Dans cette partie, nous proposons d'évaluer différentes approches expérimentales permettant la détection optique en champ large et en temps réel de détecteurs photothermiques métalliques pour le marquage de moteurs moléculaires uniques. Dans un premier temps, nous présentons le principe de détection optique en champ large du signal photothermique et son application à la visualisation d'un objet thermique micrométrique. Nous abordons ensuite l'imagerie photothermique rapide de nano-objets métalliques excités par voie optique et présentons finalement une approche prometteuse pour le chauffage de nanoparticules métalliques par couplage aux champs électromagnétiques radiofréquences.

1.1 Détection de nanoparticules métalliques

L'utilisation de nanoparticules métalliques a été motivée par les limitations des techniques traditionnelles de marquage optique par sondes fluorescentes ou nanocristaux semi-conducteurs de CdSe/ZnS.

Les sondes fluorescentes présentent une faible taille ($\leq 1nm$) mais leur photophysique implique des transitions entre des états électroniques très sensibles à leur environnement. Le couplage quantique de l'état d'excitation des fluorophores à l'état de spin triplet du dioxygène dissous en solution est par exemple à l'origine d'un photoblanchiment irréversible qui limite le temps d'observation à des durées typiquement inférieures à la minute [126, 127].

Les nanocristaux semi-conducteurs sont caractérisés par une brillance élevée qui autorise une grande précision de pointé [76, 82] mais leur émission est affectée par un phénomène de clignotement erratique [66, 73], des phénomènes quantiques de couplage entre les niveaux d'énergie du cristal et des défauts de structure sont évoqués pour expliquer ce clignotement intrinsèque. Ce clignotement permet de discerner deux nanocristaux par leurs propriétés statistiques d'émission [22] mais il oblige à reconnecter des segments de déplacement et perturbe potentiellement le suivi de molécules uniques.

En comparaison, la détection optique de nanoparticules métalliques par simple diffusion implique des processus physiques compatibles avec un environnement biologique et profite d'une photo-stabilité réelle.

Cependant les particules métalliques de taille nanométrique présente une faible réponse optique en dépit d'une forte aptitude à réfléchir la lumière. L'intensité diffusée par une particule de dimension inférieure à la longueur d'onde optique varie en effet selon sa taille élevée à la puissance six et s'effondre très rapidement à l'échelle nanométrique [115, 116]. En microscopie classique sur fond clair, le signal de diffusion d'une nanoparticule devient ainsi indiscernable du bruit de fond de détection.

Une première solution pour limiter le niveau de bruit de fond est de travailler sous fond noir en séparant spatialement le faisceau excitateur du faisceau diffusé, cas de la microscopie de champ noir [109], ou en imageant les nanoparticules par ondes évanescentes. Les plus petites nanoparticules détectées par ces méthodes ont des diamètres de l'ordre de 20 nm [104, 110].

Une deuxième solution pour augmenter la sensibilité de détection repose sur l'interférence entre le champ diffusé par la nanoparticule et un champ de référence, cette détection hétérodyne restitue alors une dépendance du signal selon le volume de la particule essentielle pour la détection ultrasensible des nano-objets. Le champ de référence peut être constitué par le champ incident lui-même [6], par sa réflexion avec l'interface eau/lamelle de verre (imagerie sur fond clair, [68, 58]), ou par séparation du faisceau incident dans un interféromètre de Michelson [56] ou de Mach-Zender [9, 40]. Parmi ces techniques d'interférométrie où le champ diffusé est directement produit par le dipôle électrique associé à la nanoparticule, les plus performantes ont permis de visualiser des particules aussi petites que 10 nm.

Finalement les méthodes reposant sur l'absorption plutôt que la diffusion sont les plus sensibles car l'énergie absorbée varie selon le volume de la particule, alors que l'énergie diffusée varie comme son volume au carré. Le couplage d'une méthode interférentielle à une excitation par absorption a donc démontré la plus grande sensibilité de détection en permettant la visualisation de nanoparticules de quelques nanomètres de diamètre [34, 32, 14, 15] et plus récemment de molécules organiques uniques [48, 27]. Le gain en sensibilité résulte ici d'une absorption optique résonante bien plus efficace que la diffusion élastique pour des particules métalliques de très faible taille. Cette absorption est convertie en chaleur et le champ diffusé est alors produit par une inhomogénéité d'indice induite par le gradient de température localisé autour de la particule, le champ de référence étant généré par un second faisceau sonde.

D'autre part, l'imagerie photothermique suscite un grand intérêt car le couplage thermique des nanoparticules est hautement spécifique et permet de distinguer les sondes métalliques des diffuseurs parasites. On retrouve une qualité analogue aux détections par fluorescence où l'on dispose d'un canal d'émission spécifique.

Nous nous sommes donc investis dans le développement de cette technique d'imagerie dite photothermique que nous allons maintenant présenter.

1.2 La détection photothermique

Pour la détection de nanoparticules métalliques, l'approche photothermique initiée à l'ESPCI par C. Bocarra et D. Fournier [21, 45] et développée au CPMOH par B.Lounis a fourni des résultats essentiels.

Dans le dispositif photothermique classique [13], la température d'une nanoparticule couplée à son environnement est modulée de quelques centaines de kHz à quelques MHz. Cette modulation induit une variation périodique d'indice du milieu qui reste localisée autour du nano-objet et produit une image thermique dont la taille est de l'ordre d'une centaine de nanomètres à un micron (en milieu aqueux). Cet objet thermique est en effet détectable dans le domaine visible, lorsqu'on l'éclaire il produit une modulation d'intensité faible mais périodique qui est clairement identifiée par détection synchrone.

Dans sa version usuelle, la détection optique réalisée avec une photodiode limite l'observation en un seul point. Nous avons mis au point une méthode de détection champ large qui utilise une caméra CCD comme photo-détecteur et nous avons implémenté le principe de détection synchrone sur caméra en modulant la fréquence de l'éclairage sonde.

1.3 Démodulation synchrone

1.3.1 Principe : démodulation par battement

Pour la source d'éclairage, nous avons choisi d'utiliser une diode électroluminescente (LED) dont nous modulons l'intensité et dont nous pouvons ajuster la phase par saut de 90 degrés, précisément la phase du signal modulant peut être renouvelée à chaque image. Ainsi, pour chaque image vidéo, on est en mesure d'imposer un déphasage déterminé entre modulation lumineuse et modulation thermique.

En intégrant cette lumière modulée durant une image, la caméra enregistre le battement hétérodyne entre le champ référence du faisceau sonde et le champ diffusé par l'objet thermique. Le signal photothermique est donc démodulé par battement avec un champ de référence lui-même modulé temporellement (figure 1.1).

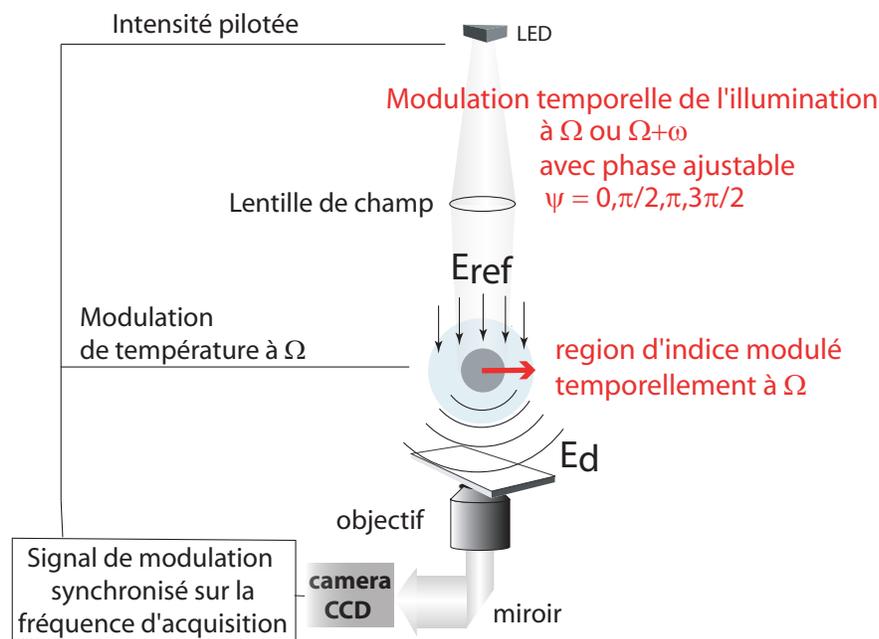


FIG. 1.1 – **Principe de démodulation par battement sur caméra.** Les signaux de modulation sont initialement synchronisés avec la fréquence d'acquisition vidéo. La température d'une nanoparticule est modulée à la pulsation Ω alors que l'éclairage est modulé à une pulsation égale ou proche de Ω pour les modes de détection synchrone ou asynchrone, avec possibilité d'un déphasage ajustable entre modulations. Le battement est obtenu entre le champ de référence E_{ref} et le champ diffusé E_d intégrant le signal photothermique.

Nous avons validé deux modes de démodulation par battement. Le premier est qualifié d'asynchrone, nous imposons une différence de quelques Hertz entre les fréquences de modulation de l'éclairage et du chauffage (sans déphasage), et nous récupérons après battement entre ces deux fréquences l'image photo-thermique d'intensité modulée à quelques Hertz. Le deuxième mode est synchrone, chauffage et éclairage sont modulés à la même fréquence avec un déphasage réglable, l'image photo-thermique est extraite par soustraction d'images successives éclairées pour des déphasages distincts, multiples de 90 degrés. Il est ainsi possible de démoduler un signal optique périodique de fréquence largement supérieure à la cadence d'acquisition CCD.

1.3.2 Calcul de l'intensité collectée par battement

Considérons un champ de référence désigné par E_{ref} dont l'amplitude est modulée à la pulsation ω' avec un déphasage ajustable Ψ entre modulations lumineuse et thermique tel que :

$$E_{ref} = E_0(1 + \cos(\omega't + \Psi)) \cos(\omega_{ref}t) = E_0(1 + \cos\Phi) \cos(\omega_{ref}t) \quad (1.1)$$

où ω_{ref} représente la pulsation lumineuse du champ sonde. Le champ diffusé E_d par l'objet thermique contient le signal photothermique d'amplitude S qui induit une modulation de lumière à la pulsation de chauffe Ω et introduit un déphasage ϕ_S , il s'exprime en fonction du champ de référence par :

$$E_d = E_{ref} S \cos(\Omega t + \phi_S) \quad (1.2)$$

où nous négligeons la composante continue de température qui ne produit pas de modulation lumineuse. L'intensité I collectée est égale à la moyenne sur le temps de réponse du détecteur CCD du champ total élevé au carré :

$$I = \langle (E_{ref} + E_d)^2 \rangle = \frac{E_0^2}{4} (3 + S^2 \left(\frac{5}{2} + \langle \cos^2(\Phi - \Omega t - \phi_S) \rangle \right)) + \frac{E_0^2}{2} S \langle \cos(\Phi - \Omega t - \phi_S) \rangle \quad (1.3)$$

Le premier terme représente l'intensité détectée dans un schéma homodyne où les deux champs seraient considérés comme incohérents (somme des intensités individuelles), le deuxième terme représente le battement cohérent entre le champ sonde et le champ diffusé. Le battement convertit donc la variation de phase périodique produite par la modulation thermique en variation d'intensité. La modulation de température comprend une composante continue qui ne produit aucune modulation de phase et n'est pas intégrée dans notre calcul.

1.3.3 Imagerie par détection asynchrone

Dans le cas d'une détection asynchrone où $\Phi = (\Omega + \omega)t$, on obtient pour l'intensité collectée $I_{asynchrone}$, en notant $I_{ref} = E_0^2/2$ l'intensité de la sonde :

$$I_{asynchrone} \approx I_{ref} (3/2 + S \cos(\omega t - \phi_S)) \quad (1.4)$$

La composante homodyne à 2ω est négligeable pour une modulation de phase faible et un signal photothermique modéré ($S \ll 1$). Par battement, l'image photothermique modulée à une fréquence $f = \omega/2\pi$ de quelques Hz est correctement échantillonnée par le détecteur CCD.

1.3.4 Imagerie par détection synchrone en temps réel

Dans le cas d'une détection synchrone où $\Phi = \Omega t + \Psi$, on obtient pour l'intensité collectée $I_{synchrone}$ (en négligeant les termes en S^2):

$$I_{synchrone} \approx I_{ref} (3/2 + S \cos(\Psi - \phi_S)) \quad (1.5)$$

L'image photothermique est alors obtenue par un programme de traitement d'images qui calcule en temps réel la fonction de détection synchrone, nous projetons de façon cyclique l'image de la caméra sur les quatre phases du signal de référence (figure 1.2). La partie réelle du signal photo-thermique $\Re(S) = S \cos\phi_S$ est obtenue par différence entre les composantes 0° et 180° :

$$I_{synchrone}(\Psi = 0) - I_{synchrone}(\Psi = \pi) = 2I_{ref}\Re(S) \quad (1.6)$$

Sa partie imaginaire $\Im(S) = S \sin\phi_S$ s'obtient avec les déphasages à 90° et 270° :

$$I_{synchrone}(\Psi = \pi/2) - I_{synchrone}(\Psi = 3\pi/2) = 2I_{ref}\Im(S). \quad (1.7)$$

Par ailleurs, nous pouvons moyenniser ces signaux sur un nombre variable d'images afin d'augmenter le rapport signal sur bruit. La contrepartie réside dans la diminution de la résolution temporelle.

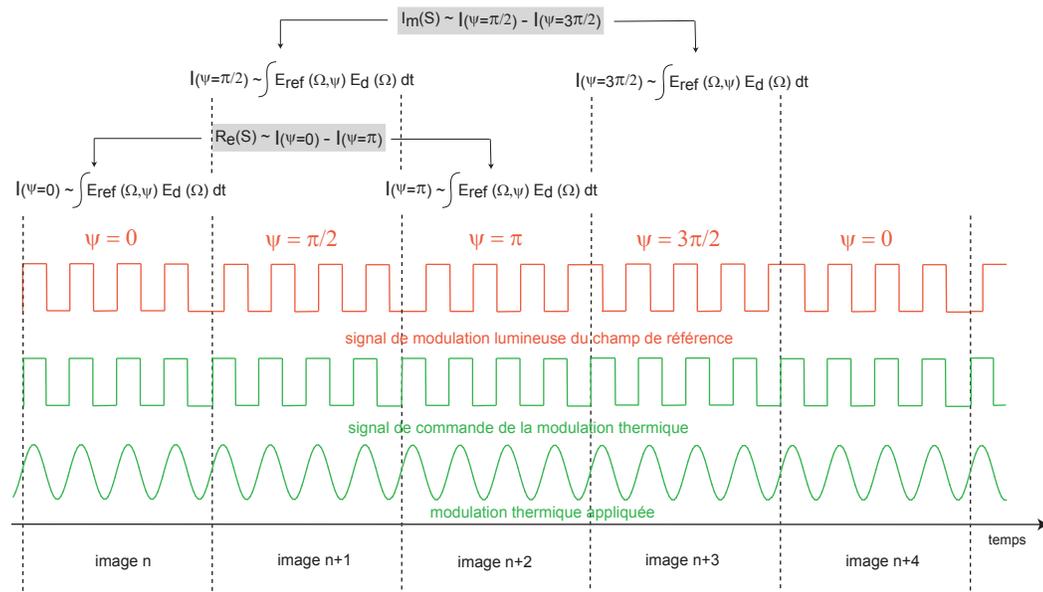


FIG. 1.2 – Chronogramme des signaux de détection synchrone. Le déphasage entre modulations thermique et lumineuse est cycliquement ajusté à chaque image, selon la série $(0, \pi/2, \pi, 3\pi/2)$. Après battement enregistré à chaque image, une simple soustraction d'intensité entre images permet d'extraire l'image photothermique réelle et l'image photothermique imaginaire. La modulation de température est sinusoïdale alors que la modulation lumineuse est réalisée en tout ou rien.

1.3.5 Synthèse des signaux de modulation

Nous avons construit une carte électronique permettant de synthétiser les différentes fréquences et phases des signaux de modulation. Pour assurer une détection optique efficace, l'intensité du champ sonde intégrée à chaque image doit être constante, nous avons donc synchronisé la fréquence de modulation lumineuse à celle de l'acquisition d'images selon deux variantes : en mode basse fréquence (inférieure à la fréquence de synchronisation horizontale soit 31,4 kHz en format vidéo NTSC) le verrouillage sur un multiple de la fréquence caméra fournit un signal TTL pour piloter l'intensité de la source lumineuse, en mode haute fréquence l'accrochage d'un multiple de la fréquence d'horloge horizontale remplit cette fonction (figure 1.3). La conversion du signal de commande lumineux en intensité est réalisée par une électronique d'amplification à transistors. Une modulation optique efficace est maintenue jusqu'à 250 kHz en utilisant des courants de modulation lumineuse modérés (amplitude inférieure à 0.1 A).

La modulation thermique est générée par cette même carte. Elle est synchronisée à la modulation lumineuse avec un déphasage de $0, \pi/2, \pi$ ou $3\pi/2$ ajustable à chaque image.

Le dispositif est interfacé à un programme de traitement d'images qui identifie le déphasage imposé à chaque image et calcule en temps réel la fonction de détection synchrone. Le traitement en temps réel a été principalement développé pour la détection synchrone qui autorise un calcul rapide par soustraction de l'intensité collectée sur chaque pixel et un traitement en champ large du signal photothermique (calcul effectué en quelques ms pour une caméra de 1.4 Mpix avec un codage d'intensité en 8 bits). Pour une fréquence d'acquisition de 60 Hz, la visualisation des composantes réelle et imaginaire de l'image photothermique est cadencé à une fréquence de 15 Hz au mieux.

Dans le cas de la détection asynchrone, on impose à l'aide du générateur de fonction de synthèse

sinusoïdale une différence de quelques Hz entre les modulations thermique et lumineuse en phase. L'image photothermique est alors extraite d'un enregistrement par un filtrage temporel centré sur la fréquence de battement.

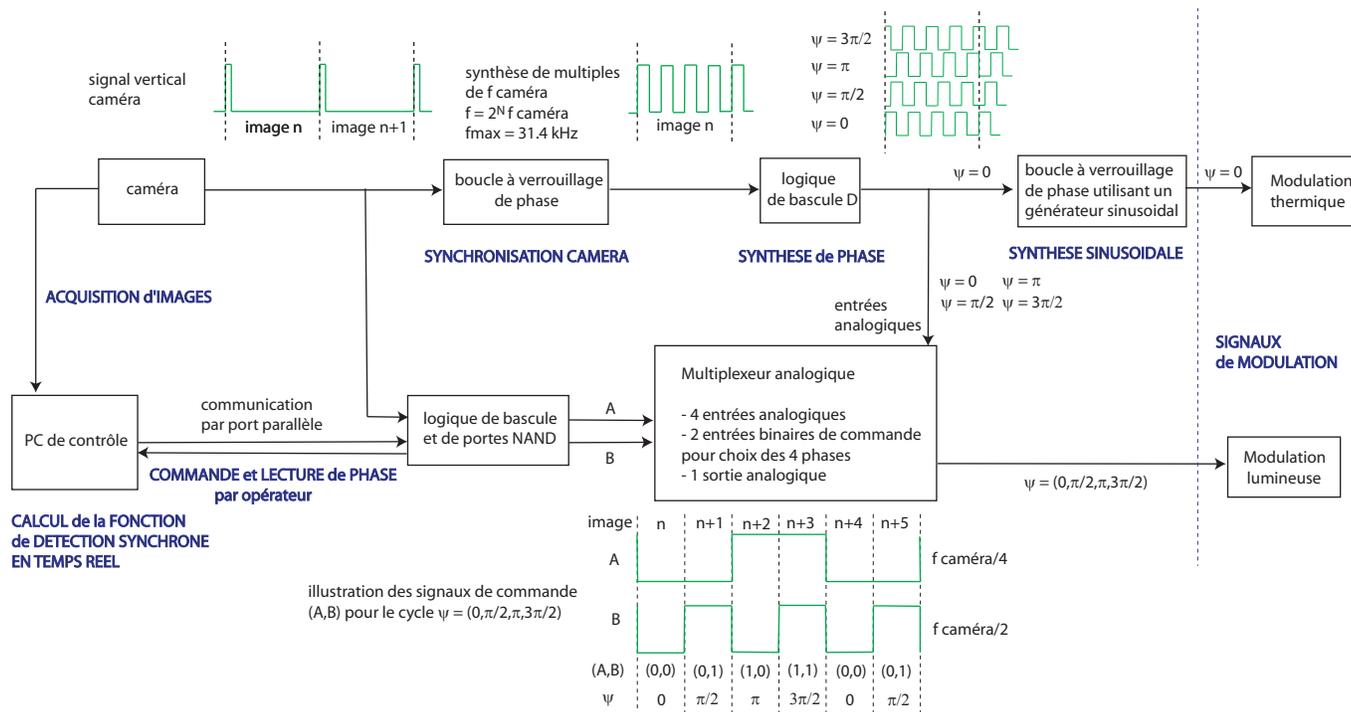


FIG. 1.3 – Schémas de principe de l'électronique de modulation pour la détection synchrone. Nous pouvons générer des signaux de modulation de fréquences comprises entre quelques centaines de Hz et quelques centaines de kHz selon deux modes de synchronisation caméra. Nous présentons ici le principe de génération dans le cas du mode basse fréquence où le signal d'horloge vertical constitue la commande vidéo. Le déphasage entre modulations thermique et lumineuse peut être choisi pour 4 valeurs distinctes $0, \pi/2, \pi$ ou $3\pi/2$, il est maintenu constant à chaque image ou changé cycliquement. Nous avons illustré le cas d'une série répétée selon $(0, \pi/2, \pi, 3\pi/2)$.

Notons ici que le calcul de l'intensité collectée par battement (paragraphe 1.3.2) a été conduit pour une modulation sinusoïdale du champ de référence, alors que la modulation est effectivement réalisée en tout ou rien. Le développement harmonique de ce signal de modulation révèle en effet des harmoniques impaires d'ordres supérieurs (d'amplitudes décroissantes en $1/(2n+1)$). Cependant le battement entre ces harmoniques et l'harmonique de modulation thermique produit des modulations multiples, de fréquences largement supérieures à la fréquence d'acquisition, leur moyenne est nulle par intégration sur chaque image, seule l'harmonique fondamentale de modulation lumineuse produit un signal d'intensité mesurable par battement et l'approximation d'une modulation sinusoïdale est valide.

1.4 Validation de l'imagerie plein champ

1.4.1 Chauffage ohmique d'un fil microscopique

En modulant la température d'un micro-objet nous avons testé les deux modes de détection par battement à l'échelle d'une image vidéo (768 x 494 pixels). Nous avons choisi un micro-fil de carbone pour deux raisons principales : sa taille est adaptée à la détection photothermique de nanoparticules

dont l'image thermique est de l'ordre du micron et sa température est mesurable par variation de sa résistance ohmique. Dans l'absolu, il est en effet difficile de mesurer directement l'élévation locale de température d'un nano-objet métallique par acquisition vidéo. Baffou et al. [11] ont récemment proposé une détection optique reposant sur l'anisotropie de diffusion induite par variation de température, mais cette technique utilise des détecteurs ponctuels (photodiodes à avalanches) qui permettent d'obtenir un rapport signal sur bruit élevé. D'autres techniques à sonde locale fluorescente (nanoparticule à fluorescence thermosensible liée à une pointe) ont permis de caractériser les flux thermiques au voisinage de nano-objets [98] mais demandent l'utilisation d'un microscope à force atomique. Le chauffage par effet Joule d'un micro-fil de carbone de 7 microns de diamètre a donc permis de calibrer simplement la sensibilité de détection en température.

Pour produire la modulation de température, on applique une tension sinusoïdale aux bornes de la cellule ohmique intégrant le micro-fil, elle est placée sur le microscope et imagée sur une caméra CCD à l'aide d'un objectif à immersion ($\times 100$ $NA = 1.25$) (figure 1.4). La fréquence du signal électrique de modulation thermique est ici ajustée à la moitié de la fréquence de modulation lumineuse. La résistance de la cellule est mesurée par ohmmètre à quatre fils (résistance et dissipation des fils de cuivre négligeables). Pour éviter les phénomènes d'électrolyse ce micro-fil est immergé dans un milieu isolant (huile de microscope).

La détection en champ large a ainsi permis de caractériser spatialement la réponse photothermique : par la décroissance et le déphasage de l'onde thermique au voisinage du micro-fil nous avons mesuré le coefficient de diffusion thermique du milieu.

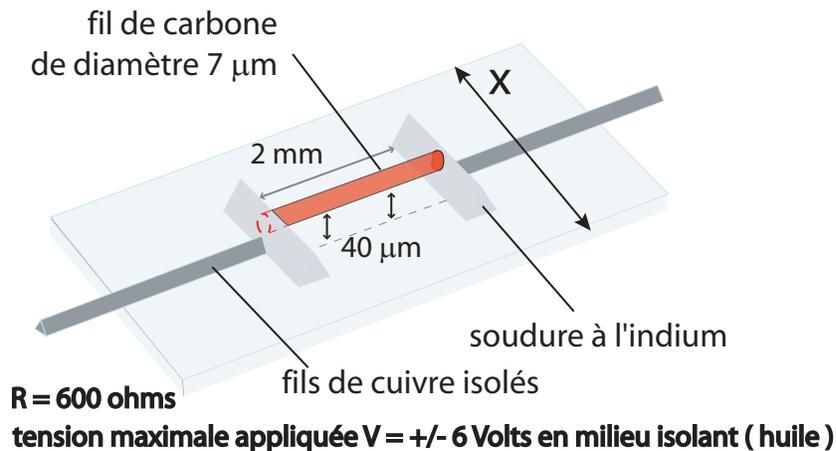


FIG. 1.4 – **Cellule de chauffage d'un fil de carbone immergé dans de l'huile.** Les fils de cuivre isolés de diamètre de 100 μm sont représentés selon une échelle arbitraire. Les franges d'interférences produites par l'éclairage au voisinage du micro-fil disparaissent lorsque la mise au point est à hauteur de l'objet, elles permettent d'estimer la distance micro-fil/surface de verre.

1.4.2 Caractérisation de l'onde thermique au voisinage du fil

1.4.2.1 Extraction de la phase thermique

L'équation pilote de diffusion d'une onde thermique $T(r,t)$ dans un milieu continu s'écrit :

$$\frac{\partial^2 T(r,t)}{\partial t^2} = D\Delta T(r,t) + S_{th} \quad (1.8)$$

où S_{th} représente un terme source et $D = \lambda_{th}/\rho C = 6.1 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ désigne le coefficient de diffusion du milieu, avec $\lambda_{th} = 0.11 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ la conductivité thermique de l'huile, $\rho = 10^3 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ sa densité et $C = 1800 \text{ J} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ sa capacité thermique massique.

La géométrie unidimensionnelle du micro-fil autorise une modélisation simple de la réponse thermique à une excitation périodique, produite par une source de chaleur dont on module la puissance :

$$T(x,t) - T_0 = \Delta T(x,t) = \Delta T_0(P,\Omega) \cos\left(\Omega t - \frac{x}{x_{th}}\right) e^{-\frac{x}{x_{th}}} \quad (1.9)$$

où $T_0 = T(\infty,t)$ représente la température du milieu à une distance très éloignée de la source de chaleur ΔT_0 , la température à la surface du micro-fil qui dépend de la puissance de chauffe P et de la fréquence de modulation Ω , x la distance à la surface du micro-fil et x_{th} désigne la longueur caractéristique de diffusion thermique dans l'huile. Nous avons exprimé uniquement la composante de température modulée, la composante continue ne produisant aucune modulation lumineuse.

On obtient donc la solution classique de l'équation de diffusion à une dimension: une onde dont l'amplitude décroît exponentiellement avec la distance à la source de chaleur et dont la phase varie linéairement avec cette distance. La distance caractéristique de pénétration de l'onde thermique dans le milieu x_{th} s'écrit :

$$x_{th} = \sqrt{\frac{2D}{\Omega}} \quad (1.10)$$

L'élévation de température au voisinage du micro-fil se traduit par une perturbation périodique du système d'interférences par modulation de l'indice. Lorsqu'on éclaire cet objet, on observe en effet un déplacement périodique des franges d'interférences qui bordent son image (figure 1.5). La perturbation de phase $\Delta\Psi$ du système d'interférences peut alors être exprimée par :

$$\Delta\Psi \propto \frac{\partial n}{\partial T} \Delta T = \Delta\Psi_0(P,\Omega) \cos\left(\Omega t - \frac{x}{x_{th}}\right) e^{-\frac{x}{x_{th}}} \quad (1.11)$$

où $\Delta\Psi_0(P,\Omega) \propto \frac{\partial n}{\partial T} \Delta T_0(P,\Omega)$ avec $\frac{\partial n}{\partial T}$ le coefficient de variation d'indice de réfraction du milieu en fonction de la température (typiquement 10^{-4} K^{-1}). Pour une démodulation asynchrone à la pulsation $\Omega + \omega$, la perturbation de phase devient:

$$\Delta\Psi = \Delta\Psi_0(P,\Omega) \cos\left(\omega t - \frac{x}{x_{th}}\right) e^{-\frac{x}{x_{th}}} \quad (1.12)$$

La dépendance spatiale de la phase lumineuse permettra donc d'identifier clairement la nature thermique de l'onde se propageant au voisinage du fil.

A partir d'un enregistrement de la figure d'interférences, on extrait pour chaque image le profil d'intensité selon x , moyenné localement selon la longueur du micro-fil. Pour découpler les variables temps et position, on construit alors une image en deux dimensions de ce profil évoluant au cours du temps (figure 1.5.A). Un filtrage spatial de cette image par transformée de Hilbert permet ensuite de calculer la phase en chaque point du profil lumineux et de décrire la modulation temporelle de la phase.

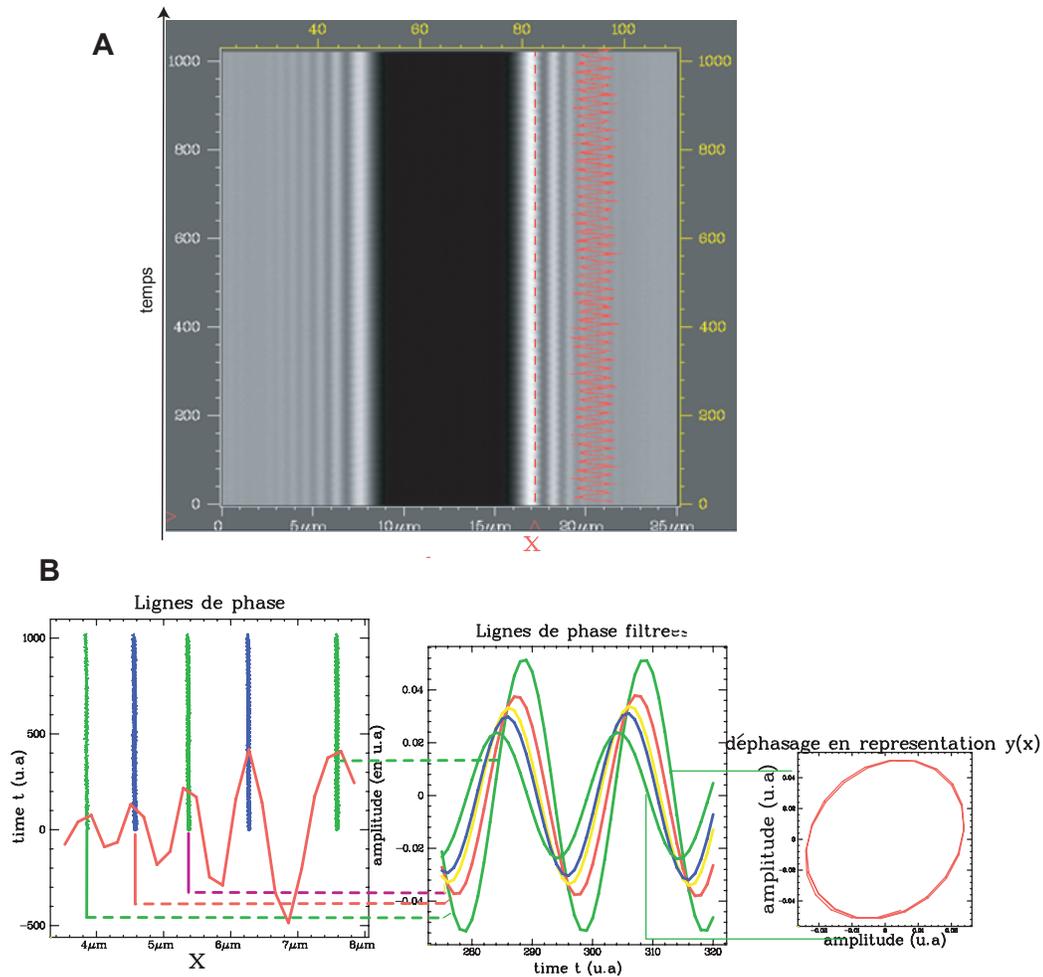


FIG. 1.5 – **Evolution temporelle de la figure d'interférences par modulation thermique.** A. Evolution du profil lumineux (après moyenne longitudinale sur 64 pixels) d'un film de 1024 images (en ordonnées). La courbe rouge indique le profil temporel d'intensité à x donné (ligne rouge en pointillés). B. Lignes de phase extraites par détection asynchrone à 3 Hz pour une modulation thermique à 1.2 kHz. A gauche, les lignes de phase correspondent aux variations temporelles de la phase le long du profil des franges (en rouge). En encart (au milieu), on observe avec plus de clarté la modulation temporelle des lignes de phase après filtrage fréquentiel à 3 Hz, on note bien une décroissance de l'amplitude et un déphasage progressif de l'onde thermique lorsqu'on s'éloigne du micro-fil. A droite, nous reportons le déphasage entre les deux lignes de phase les plus distantes en représentation $x(y)$.

1.4.2.2 Réponse fréquentielle et détermination du coefficient de diffusion

Nos résultats expérimentaux confirment une décroissance exponentielle en amplitude pour la phase de l'onde lumineuse, et une variation linéaire du déphasage lorsque l'on s'éloigne de la source de chaleur (figure 1.6). Le système d'interférences est perturbé par la propagation d'une onde thermique atténuée, le déplacement des franges d'interférences est de nature thermique, le micro-fil demeurant immobile.

La réponse fréquentielle à la modulation thermique donne alors accès au coefficient de diffusion du milieu. Pour une gamme de fréquences comprises entre 0.6 et 1.8 kHz, on démodule le signal optique par détection asynchrone et on détermine le coefficient de diffusion par la dépendance fréquentielle de la longueur de diffusion (x_{th}). La faible étendue des franges ($4\mu\text{m}$) limite en effet notre

investigation à cette gamme de fréquences. Aux fréquences inférieures à 0.6 kHz ($x_{th} \approx 6\mu m$) on observe une onde très faiblement atténuée, au delà de 1.8 kHz ($x_{th} \approx 3\mu m$), la décroissance rapide de la modulation thermique et la forte localisation du signal rendent la caractérisation spatiale difficile.

Finalement, on mesure un coefficient de diffusion de $7.4 \pm 0.8 \cdot 10^{-8} m^2.s^{-1}$, en accord avec la valeur attendue pour l'huile de microscope utilisée $D = 6.1 \cdot 10^{-8} m^2.s^{-1}$.

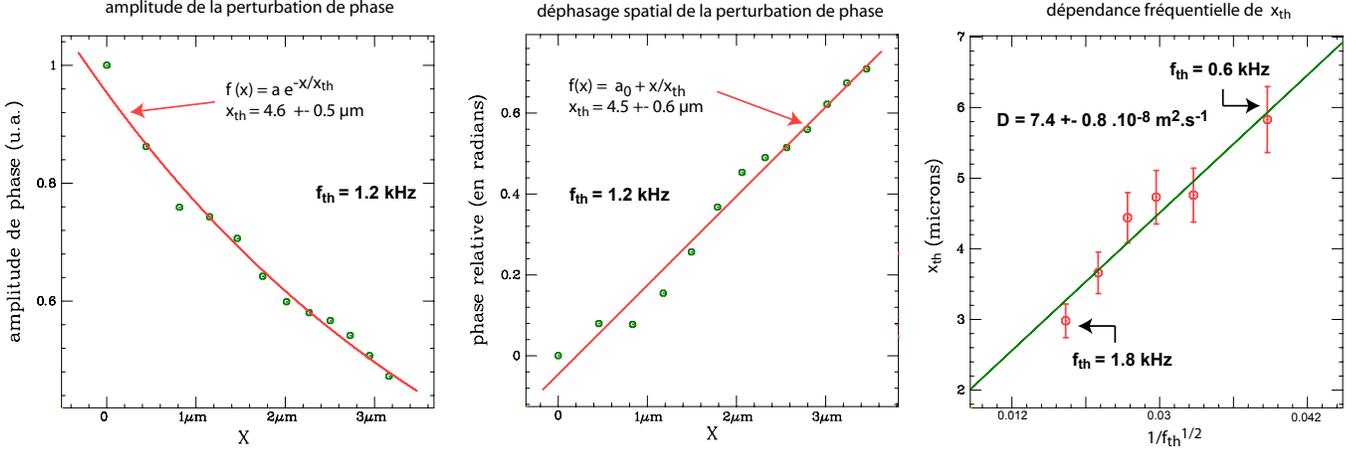


FIG. 1.6 – **Caractérisation fréquentielle de la perturbation de phase lumineuse induite par l'onde thermique.** La position $x=0$ indiquée en abscisses de chaque courbe correspond à un bord du micro-fil repéré par le premier maximum du profil.

1.4.2.3 Calibration de l'efficacité du chauffage

Pour calibrer la modulation de température du micro-fil, nous mesurons la variation de sa résistance induite par chauffage. Pour relier les variations de résistance à la modulation de température ΔT , nous exprimons la tension U aux bornes du micro-fil de résistance $R(T)$ lorsqu'il est soumis à une excitation en intensité $i_0 \cos\Theta t$ avec $\Theta = \Omega/2$:

$$U = R(T) i_0 \cos\Theta t = R_0(1 + \alpha\Delta T) i_0 \cos\Theta t \quad (1.13)$$

où $\alpha = \frac{1}{R} \frac{\partial R}{\partial T}$ représente le coefficient de variation de résistance en fonction de la température et R_0 sa résistance à courant nul.

L'élévation de température est constituée d'une composante continue et d'une composante modulée à la pulsation 2Θ par effet Joule, elle s'exprime par $\Delta T = \Delta T_{DC} + \Delta T_0 \cos 2\Theta t$. Pour la tension aux bornes de la résistance il vient donc :

$$U = R_0 i_0 \left(1 + \alpha \left(\Delta T_{DC} + \frac{\Delta T_0}{2}\right)\right) \cos\Theta t + R_0 i_0 \frac{\alpha \Delta T_0}{2} \cos 3\Theta t = R_\Theta i_0 \cos\Theta t + R_{3\Theta} i_0 \cos 3\Theta t \quad (1.14)$$

avec $R_\Theta = R_0 \left(1 + \alpha \left(\Delta T_{DC} + \frac{\Delta T_0}{2}\right)\right)$ la résistance à la composante Θ et $R_{3\Theta} = R_0 \frac{\alpha \Delta T_0}{2}$ la résistance à la composante 3Θ .

Lorsque la température du micro-fil est modulée à la pulsation 2Θ , la variation de sa résistance donne donc naissance à une composante à 3Θ . Cette composante, proportionnelle à l'amplitude de modulation thermique ΔT_0 , autorise alors la calibration en température.

Dans un premier temps, nous avons donc mesuré le coefficient de variation de résistance en fonction de la température, en plaçant la cellule dans une étuve thermostatée. Nos mesures confirment le comportement semi-conducteur pour la conduction d'un micro-fil en carbone (graphite): sa résistance diminue avec l'élévation de la température selon une loi linéaire dans la gamme de température

explorée (de 20 à 90°C). Nous mesurons un coefficient de variation de résistance $\alpha = -5.38 \cdot 10^{-4} K^{-1}$ (figure 1.7).

Dans un second temps, nous mesurons la composante résistive à 3Θ en utilisant un pont de Wheatstone, qui permet d'annuler la composante prédominante à Θ lorsqu'il est équilibré. Un amplificateur différentiel entre les deux points d'équilibre du pont de Wheatstone permet de mesurer la composante à 3Θ . Nous observons une décroissance de l'amplitude de modulation en température ΔT_0 , cette décroissance suit une loi en $1/f^{0.3}$ (avec $f = 2\pi\Omega$) proche de la dépendance attendue en $1/f^{1/2}$ pour une loi de diffusion. A partir d'une fréquence de modulation de quelques Hz, la puissance dissipée n'est plus intégralement transmise par conduction dans le fluide, lorsque la fréquence est ensuite augmentée l'énergie stockée dans le fil augmente rapidement.

Notons que la composante continue en température est estimée par le déséquilibre du pont, elle n'est pas modifiée lorsqu'on varie la fréquence d'excitation et elle est proportionnelle à la puissance Joule.

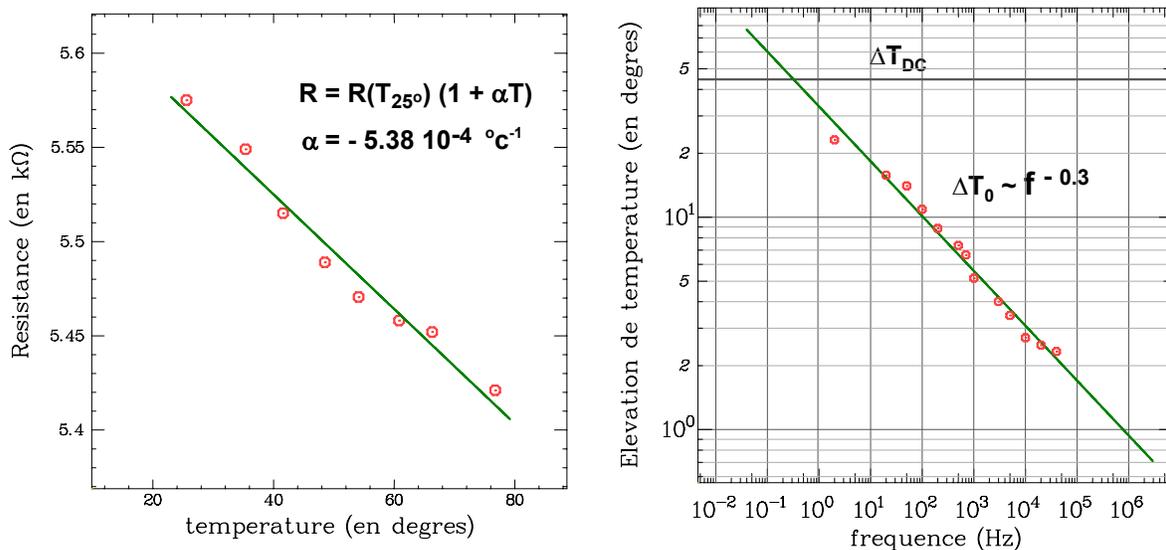


FIG. 1.7 – **Calibration de l'efficacité de modulation thermique.** A gauche, variation de résistance en fonction de la température pour un micro-fil de résistance de 5.5 kΩ à température ambiante. A droite, dépendance fréquentielle de l'amplitude de modulation thermique pour un micro-fil de résistance 600 Ω soumis à une différence de potentiel de 3V en amplitude.

La calibration en température permet finalement d'estimer la sensibilité de détection optique : on est capable de clairement détecter le signal photothermique pour des modulations d'amplitude de 1K, le signal étant moyenné sur plusieurs secondes (figure 1.8). Dans ce cas la différence de potentiel appliquée au micro-fil de résistance 600 Ω est de 5V en amplitude et la puissance dissipée par effet Joule est de 50 mW, il nous permet d'estimer la puissance nécessaire pour la détection d'une nanoparticule de 100 nm en intégrant le rapport d'aspect entre micro-fil et nanoparticule, il est égal au rapport entre la longueur du fil (2mm) et le diamètre de la nanoparticule, soit $2 \cdot 10^4$ pour une nanoparticule de 100 nm. L'ordre de grandeur de la puissance nécessaire à la détection d'une nanoparticule de 100 nm est donc de 1 μW, nous verrons qu'il est en accord avec les résultats expérimentaux obtenus pour la détection photothermique des nanoparticules d'or (cf paragraphe 1.5.3.4).

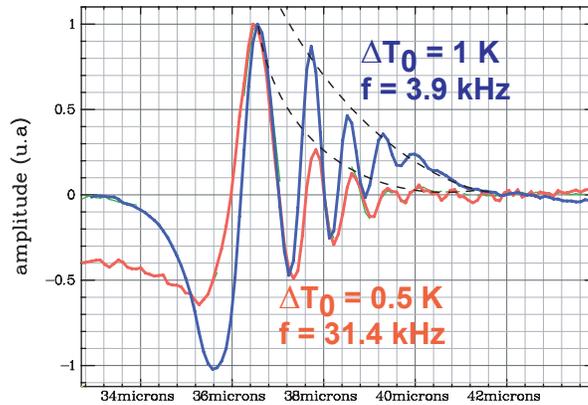


FIG. 1.8 – **Profil photothermique démodulé par détection synchrone.** Le signal photothermique est démodulé après accumulation sur 17 secondes (1024 images à 60 Hz), avec alternance des phases selon le cycle $(0, \pi/2, \pi, 3\pi/2)$, les profils résultants sont ensuite normalisés.

1.5 Détection par excitation plasmonique

Nous avons validé le dispositif de démodulation optique pour la détection d'un objet photothermique pour lequel nous avons profité d'une large taille apparente de diffusion (rayon thermique de plusieurs microns). Nous allons maintenant évaluer l'efficacité de détection optique pour des nanoparticules d'or excitée thermiquement par voie optique.

1.5.1 Chauffage ponctuel par absorption de lumière

Plusieurs équipes ont démontré l'efficacité du couplage thermique entre nanoparticules métalliques et champ électromagnétique dans le domaine optique. En choisissant une longueur d'onde optique accordée à la résonance plasmon, on provoque une oscillation résonante des électrons de conduction de la nanoparticule. Le résultat est une large augmentation de la section efficace d'absorption : à 532 nm, la section efficace d'absorption d'une nanoparticule d'or de 10 nm de diamètre vaut environ 50 nm^2 , en comparaison celle d'une molécule fluorescente à température ambiante est de l'ordre de 0.01 nm^2 [116]. Pour ce type de nanoparticules, la désexcitation par processus radiatifs, ou luminescence, est négligeable [41] et l'énergie absorbée est principalement convertie en chaleur. Les nanoparticules d'or se comportent donc comme des sphères très absorbantes à la résonance plasmon.

Une source laser à 532 nm est donc focalisée sur l'échantillon pour produire une densité de champ électromagnétique élevée, typiquement 10 kW.cm^{-2} dans nos expériences, et assurer le couplage thermique. L'intensité du faisceau d'excitation est modulée temporellement pour générer l'oscillation périodique de température, et respectivement d'indice, autour de la nanoparticule. La taille des nanoparticules étant inférieure au diamètre du faisceau focalisé, l'intensité au voisinage de la nanoparticule est considérée comme uniforme et la puissance absorbée s'écrit :

$$P = I_0 \sigma(1 + \cos\Omega t) = P_0(1 + \cos\Omega t) \quad (1.15)$$

où σ désigne la section efficace d'absorption, I_0 la densité de puissance du faisceau de lumière, Ω la pulsation de modulation et P_0 la puissance moyenne absorbée.

La source de chaleur utilisée est maintenant quasi ponctuelle et on s'attend à un couplage thermique "parfait" entre nanoparticule et milieu extérieur. Contrairement au cas du micro-fil dont les

échanges thermiques apparaissent limités dès les basses fréquences de modulation, la puissance thermique transférée est ici indépendante de la fréquence de modulation (pour $f < 1$ GHz [13]).

En symétrie sphérique, la solution de l'équation de diffusion thermique pour une source de chaleur ponctuelle dont on module la puissance à la pulsation Ω s'écrit [26]:

$$T(r,t) - T_0 = \Delta T(r,t) = \Delta T_0(P,r) \cos(\Omega t - \frac{r}{r_{th}}) e^{-\frac{r}{r_{th}}} \quad (1.16)$$

où $T_0 = T(\infty,t)$ représente la température du milieu à une distance très éloignée de la source de chaleur, $\Delta T_0(P,r) = \frac{P}{4\pi\lambda_{th}r}$ l'amplitude de modulation thermique, r la distance radiale à la source et $x_{th} = \sqrt{\frac{2D}{\Omega}}$ la longueur caractéristique de diffusion thermique dans le milieu. Nous noterons $\Delta T_s = \frac{P}{4\pi\lambda_{th}a}$ l'élévation de température à la surface de la nanoparticule.

L'extension spatiale du gradient de température autour de la nanoparticule est égale à la longueur de diffusion thermique et l'objet thermique peut être assimilé à une sphère de rayon r_{th} dont l'élévation moyenne de température est égale à [13]:

$$\langle \Delta T \rangle = \frac{P}{4\pi\lambda_{th}} \frac{\int_0^{+\infty} \Delta T d^3r}{\int_0^{r_{th}} d^3r} \approx 0.6 \frac{P}{4\pi\lambda_{th}r_{th}} \quad (1.17)$$

Nous pouvons maintenant quantifier les ordres de grandeur du couplage thermique. Nous prenons l'exemple d'une nanoparticule d'or de 100 nm de diamètre qui absorbe une puissance typique de $1 \mu\text{W}$. Pour l'environnement des nanoparticules, nous choisissons de l'huile de silicone comme milieu hôte plutôt qu'un milieu aqueux, meilleur conducteur thermique. La conductivité thermique de l'huile est six fois plus faible que celle de l'eau, $0.11 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour l'huile à comparer à $0.6 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour l'eau, elle impose une élévation de température plus élevée et permet augmenter l'amplitude du signal photothermique. Pour une fréquence de modulation thermique de 100 kHz, le rayon de l'objet thermique est défini par la longueur de diffusion dans l'huile et vaut 440 nm. Pour une puissance absorbée de $1 \mu\text{W}$, on obtient donc une élévation moyenne de température de 1 K pour une élévation de la température de surface de 15 K.

1.5.2 Montage optique pour la modulation de chauffage

Pour assurer la modulation temporelle de l'intensité du faisceau optique, nous utilisons un modulateur acousto-optique constitué d'un cristal piézo-électrique. L'application d'une tension radio-fréquence aux bords du cristal produit une onde acoustique stationnaire en son sein. Cette onde mécanique de pression se traduit en une modulation spatiale d'indice qui joue alors le rôle de réseau de diffraction. La quantité de lumière diffractée dépend alors de l'intensité de l'onde acoustique et la modulation d'intensité lumineuse est simplement obtenue par modulation d'amplitude de l'onde acoustique. Le signal de modulation est généré par la carte électronique précédemment décrite.

D'un point de vue pratique, remarquons qu'en sortie du modulateur optique le faisceau incident est séparé angulairement selon plusieurs ordres de diffraction. Nous prenons donc soin de choisir un ordre de diffraction qui produit une modulation lumineuse en phase avec le signal de commande de modulation thermique. D'autre part, pour obtenir un taux de modulation proche de 80% pour des modulations à haute fréquence nous diminuons la largeur du faisceau avant son entrée dans le cristal. En effet, l'efficacité du modulateur est liée au temps mis par l'onde acoustique pour traverser le faisceau selon sa largeur (d), il doit donc être très inférieure au temps typique de modulation, soit $d/c \ll 1 \mu\text{s}$ pour des fréquences de modulation de quelques centaines de kHz, ce qui implique $d \ll 1$ mm (avec c la vitesse de propagation acoustique de l'ordre de 1500 m.s^{-1}).

Le montage optique est donc composé d'un premier système télescopique placé en sortie du laser de chauffe, il assure la réduction de la largeur du faisceau avant son entrée dans le modulateur acousto-optique. Le faisceau est ensuite fortement focalisé sur l'échantillon à l'aide d'un objectif à

immersion. Un second système télescopique permet d'élargir le faisceau à la sortie du modulateur pour remplir la pupille arrière de l'objectif et permettre cette forte focalisation (figure 1.9).

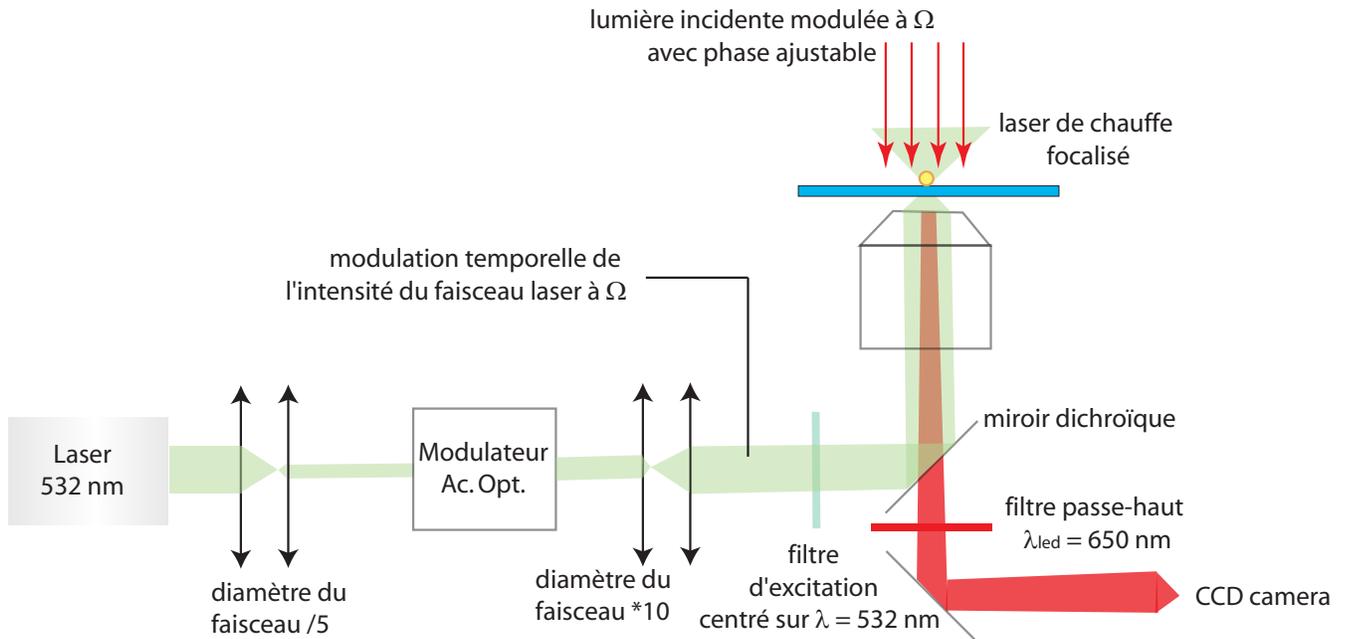


FIG. 1.9 – **Montage optique pour la modulation du couplage thermique.** Le transfert thermique est obtenu par absorption optique à la résonance plasmon ($\lambda = 532 \text{ nm}$), à l'aide d'un modulateur acousto-optique on module l'intensité du faisceau d'excitation pour produire le signal photothermique. Un jeu de filtres de fluorescence supprime la réflexion du faisceau d'excitation sur l'échantillon et les diffusions parasites à cette longueur d'onde, le faisceau sonde pour l'imagerie photothermique est intégralement transmis.

1.5.3 Résultats expérimentaux

Nous avons choisi de visualiser des nanoparticules de taille supérieure ou égale à 100 nm qui sont visibles en transmission optique. Nous pouvons ainsi identifier une dégradation éventuelle des nanoparticules suite à leur chauffage excessif, et nous profitons d'une élévation de température conséquente pour des densités d'illumination modérées.

1.5.3.1 Préparation des échantillons

Une goutte de quelques centaines de micro-litres d'une solution colloïdale de nanoparticules d'or est déposée sur une lamelle de microscope préalablement nettoyée par une solution de soude concentrée. Le solvant utilisé est une solution aqueuse de poly-vinyl alcool (PVA) à 1% en masse. La goutte est ensuite étalée à la tournette (spin coating) durant environ une minute à 500 tours/min. Après évaporation de l'eau, l'échantillon contient finalement les nano-objets déposés sur la lamelle et insérés dans une fine matrice de polymère, dont l'épaisseur ($\approx 100 \text{ nm}$) est en général plus faible que la longueur typique de diffusion thermique. On intègre cette lamelle à une cellule microfluidique disposée sur le porte échantillon du microscope, et on injecte finalement l'huile de silicone au sein de la microchambre.

1.5.3.2 Détection vidéo en mode asynchrone à l'échelle nanométrique

Nous avons démodulé le signal photothermique par détection asynchrone pour vérifier la validité du battement hétérodyne à l'échelle nanométrique (figure 1.11). Typiquement, nous traitons un enregistrement du battement lumineux en supprimant le fond continu d'éclairement pour identifier la modulation sur fond noir. En repérant le centre de la particule, nous pouvons reconstruire l'évolution temporelle du profil d'intensité associé à chaque nanoparticule. La fréquence de modulation du signal photothermique est alors clairement identifiée, elle est égale à la différence de fréquence imposée entre les modulations thermique et lumineuse (f) (figure 1.11). On ne retrouve pas de composante à $2f$ caractéristique d'un battement homodyne.

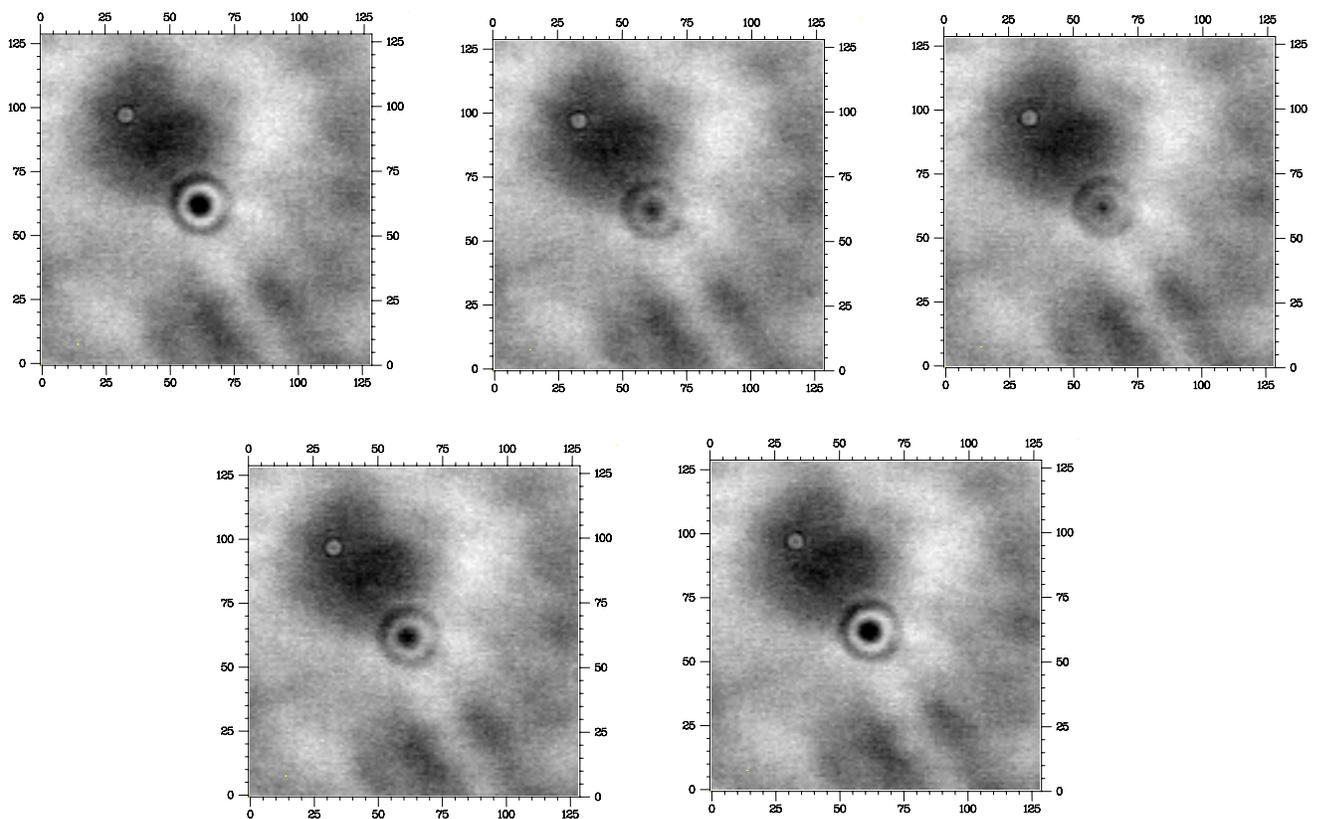


FIG. 1.10 – **Modulation temporelle de l'image photothermique d'une nanoparticule de 100 nm par détection asynchrone.** Nous présentons le battement lumineux sur une période de modulation, par une série de 5 images correspondants aux temps ($t=0, t=T/4, t=T/2, t=3T/4, t=T$). La fréquence de modulation thermique est de 31 kHz, la démodulation asynchrone est réalisée à 3Hz. On remarque la présence des anneaux d'interférences au voisinage de la nanoparticule qui sont modulés par effet photothermique.

Pour une nanoparticule de 100 nm de diamètre, nous pouvons obtenir un taux de modulation lumineuse de 10 à 20% qui permet d'imager le signal photothermique avec un rapport signal sur bruit élevé (> 100) pour un temps d'acquisition court de 2s (figure 1.11).

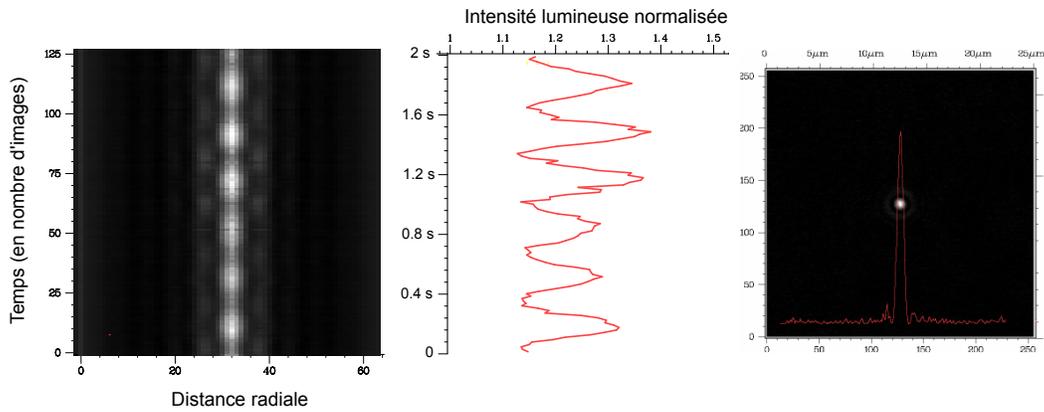


FIG. 1.11 – Profil temporel du signal photothermique et image photothermique démodulée. A gauche, nous présentons une image construite à partir de l'évolution des profils radiaux pour l'enregistrement de la figure 1.10, un profil temporel pour une distance radiale donnée est précisé en rouge (au milieu), on observe une modulation de l'intensité lumineuse à la fréquence de 3 Hz. A droite, l'enregistrement de 128 images en détection asynchrone est filtré à 3 Hz pour obtenir l'amplitude de l'image photothermique démodulée, un profil d'intensité est superposé à l'image.

1.5.3.3 Caractérisation du signal photo-thermique par détection synchrone

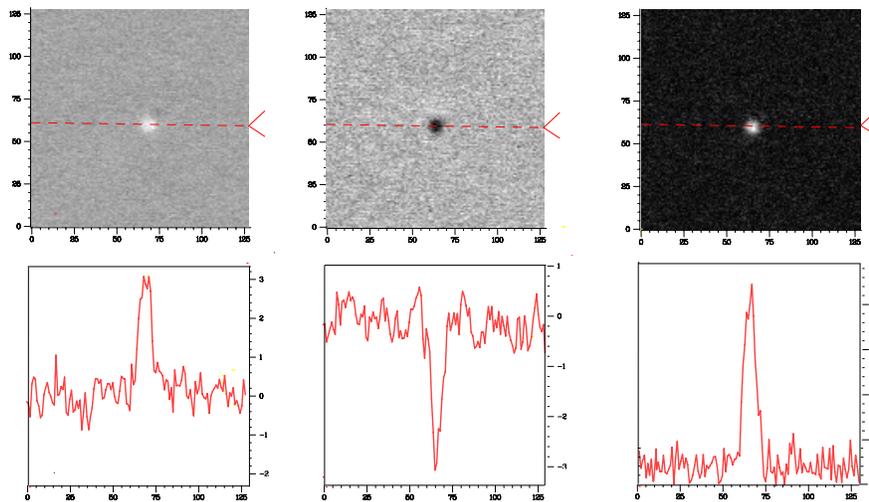


FIG. 1.12 – Images photothermiques d'une nanoparticule de 100 nm par détection synchrone. De gauche à droite, images photothermiques réelle, imaginaire, et en amplitude pour une modulation thermique à 125 kHz. Les profils d'intensité sont indiqués pour chaque image, les coordonnées sont exprimées en pixels (1 pixel équivalent à $0.1\mu\text{m}$).

Pour caractériser le signal photothermique, nous utilisons la méthode de détection synchrone pour laquelle nous démodulons l'image photothermique en temps réel. Nous déterminons ainsi les parties réelles et imaginaires du signal photothermique.

La figure 1.12 présente le signal photothermique extrait en temps réel pour une nanoparticule de 100 nm. La fréquence d'acquisition vidéo est de 60 Hz et l'image photothermique est obtenue après

une moyenne du signal sur 8 images. Le calcul en temps réel est donc réalisé à une fréquence effective de 7.5 Hz qui correspond à un temps d'intégration de 130 ms. Dans ces conditions d'imagerie rapide, nous détectons l'objet thermique avec un rapport signal supérieur à 4 et le signal photothermique reste stable sur des durées maximales d'acquisition que nous avons testées (plusieurs dizaines de minutes). La phase du signal est mesurée à $-\pi/4$, elle correspond au déphasage entre la modulation du laser exciteur et le signal photothermique, les amplitudes des parties réelle et imaginaire sont équivalentes. La puissance absorbée est estimée $5 \mu\text{W}$, elle est obtenue en mesurant la densité d'illumination au niveau de l'échantillon ($50 \text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour cette expérience), la section efficace d'absorption étant théoriquement connue.

Calibration de la focalisation transverse

Pour déterminer la densité d'illumination au niveau de l'échantillon, nous devons mesurer le profil spatial du faisceau d'excitation et la puissance totale transmise par l'objectif. Le profil spatial est déterminé par relevé de l'amplitude photothermique lors du déplacement transverse d'une nanoparticule de 100 nm dans la tache de focalisation.

Dans le plan de l'échantillon, la distribution transverse d'intensité est correctement décrite par un profil gaussien de largeur: $1.3 \pm 0.03 \mu\text{m}$ en x et $1.32 \pm 0.02 \mu\text{m}$ en y (figure 1.13). On obtient donc un profil de largeur supérieure à la taille minimale imposée par la diffraction ($1.22\lambda/NA = 1.22 \cdot 650/1.25 \approx 650 \text{ nm}$). L'imagerie est produite pour une défocalisation volontaire de quelques microns qui explique cet écart et permet de visualiser correctement les nanoparticules par leurs anneaux d'interférences en transmission.

Du point de vue de la résolution spatiale transverse, l'imagerie grand champ autorise une précision de pointé nettement supérieure à la détection ponctuelle. En détection ponctuelle il faut scanner l'échantillon pour localiser une nanoparticule et la résolution est limitée par la taille du faisceau d'excitation qui est au mieux de l'ordre de λ/NA soit environ 500 nm. En imagerie par détection CCD, la résolution spatiale est principalement limitée par le nombre de photons collectés par nano-objet (N). Typiquement pour un objet sub-lambda, la résolution est égale à $\lambda/(NA\sqrt{N})$ [114] et le gain en résolution est d'un facteur \sqrt{N} , une résolution nanométrique est donc obtenue pour un nombre de photons supérieur à 10^4 .

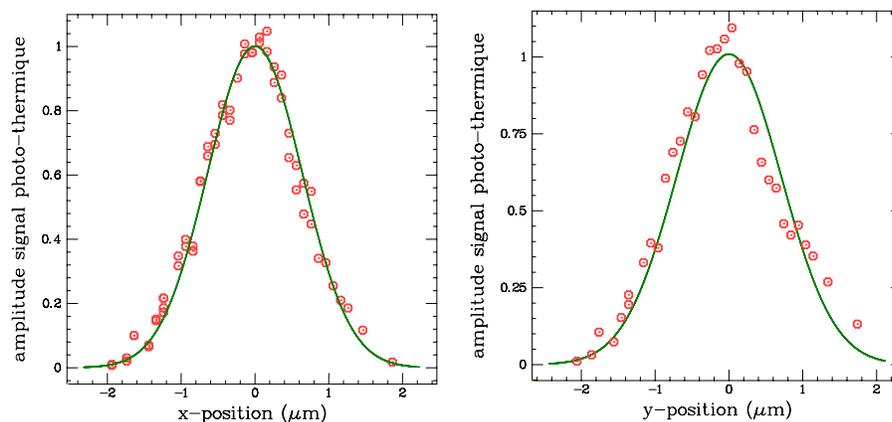


FIG. 1.13 – Calibration de la focalisation transverse du faisceau de chauffe.

Amplitude du signal photothermique

Le signal photothermique est proportionnel à la puissance absorbée par une nanoparticule, son amplitude varie donc linéairement en fonction de l'intensité du faisceau d'excitation (figure 1.14). Sur

la gamme de puissance explorée, on ne constate pas de saturation du signal. Pour une densité de 300 kW.cm^{-2} et une section efficace d'absorption théorique de 10^4nm^2 [116], la puissance absorbée par une nanoparticule de 100 nm de diamètre est estimée à $30 \mu\text{W}$ et l'élévation moyenne de température de l'objet thermique approche 30K pour une élévation de température de surface de 450 K (cf paragraphe 1.5.1), pour des puissances d'excitation supérieures on constate une détérioration irréversible de l'image en transmission de la nanoparticule.

Une deuxième propriété majeure du signal photothermique est sa dépendance à l'intensité du faisceau sonde: il croît linéairement avec ce niveau de lumière sur la gamme dynamique de détection CCD (figure 1.14). Pour obtenir un signal fort, on ajuste donc le niveau du faisceau sonde pour être à la limite de saturation du détecteur.

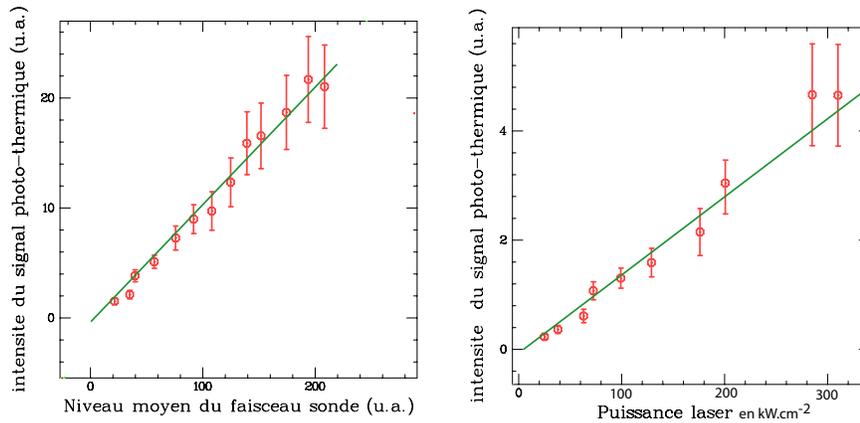


FIG. 1.14 – **Dépendance du signal photo-thermique avec l'intensité du faisceau sonde et la puissance du laser de chauffe.** Ces résultats sont obtenus par détection photothermique d'une nanoparticule de 100 nm dont la température est modulée à la fréquence de 125 kHz.

1.5.3.4 Rapport signal sur bruit de détection pour une particule de 100 nm

Dans les deux modes de détection par battement, l'intensité lumineuse collectée est de la forme: $I \approx I_{ref}(1 + S \cos\phi)$, elle résulte de la contribution de deux termes: le premier représente le fond continu d'éclairage I_{ref} qui est la source dominante de bruit, le second terme représente la modulation lumineuse locale d'origine photothermique, le taux de modulation étant défini par l'amplitude du signal photothermique S qui dépend principalement de la puissance dissipée par couplage thermique et de la fréquence de modulation. Le rapport signal sur bruit (RSB) s'exprime donc par :

$$RSB = \frac{I_{ref}S}{\sigma(I_{ref})} \quad (1.18)$$

Pour les détecteurs CCD classiques que nous avons calibrés, le bruit de détection est dominé par le bruit de photons, son niveau correspond typiquement à un nombre de photo-électrons créés par pixel $N = 15000$ à 20000 dans des conditions optimales d'utilisation (faible gain et forte illumination). Dans ces mêmes conditions ce bruit représente donc 1% du signal moyen collecté par image. Ceci fixe la limite de détection d'une modulation optique sous fond clair par détection CCD, un objet photothermique produisant une modulation d'intensité lumineuse supérieure à quelques pourcents ($S > 0.01$) sera identifiable en quelques images, avec un rapport signal sur bruit $RSB = \sqrt{N}S \approx 100 S > 1$.

Nous pouvons alors estimer la cohérence des résultats obtenus par démodulation synchrone du signal photothermique pour une nanoparticule de 100 nm. Pour une puissance absorbée de $5 \mu\text{W}$ et

une modulation à la fréquence de 125 kHz, l'élévation moyenne de température au voisinage de la nanoparticule est d'environ 5K (cf 1.5.1), il est alors possible d'estimer la variation de phase lumineuse ϕ induite par cet objet thermique et d'en déduire l'amplitude de modulation photothermique S . Nous avons défini S par la relation entre le champ diffusé et le champ de référence tel que $E_d = E_{ref} S \cos(\Omega t + \phi_S)$ (cf 1.3.2). Nous pouvons réexprimer cette relation dans le cas d'une faible variation de phase ($\phi \ll 1$):

$$E_d = E_{ref} e^{i\phi} \approx E_{ref} (1 + i\phi) = E_{ref} \left(1 + \frac{2\pi r_{th}}{\lambda} \frac{\partial n}{\partial T} \langle \Delta T \rangle \cos(\Omega t + \phi_S)\right) \quad (1.19)$$

où nous considérons en première approximation que le déphasage induit par l'objet thermique est équivalent à la traversée d'un milieu de taille r_{th} affecté par une variation d'indice proportionnelle à la température moyenne de l'objet thermique (ϕ_S intégrant le déphasage du profil de température). Dans l'expression initiale du champ diffusé le terme constant peut être supprimé car il n'est pas démodulé par battement.

Par identification, on obtient finalement $S \approx \frac{2\pi r_{th}}{\lambda} \frac{\partial n}{\partial T} \langle \Delta T \rangle = 2\pi \frac{440}{650} 10^{-4} 5 = 0.002$, soit $S=0.2\%$. On retrouve l'ordre de grandeur nécessaire pour la visualisation rapide de l'objet photothermique. Expérimentalement le rapport signal sur bruit est de 4 pour une moyenne du signal sur 8 images, soit un temps d'intégration de 130 ms.

A ce stade du développement de la technique de démodulation synchrone, la sensibilité de détection vidéo demeure largement inférieure à la sensibilité de détection ponctuelle démontrée par Berciaud et al. [14]. La puissance requise pour détecter ponctuellement une nanoparticule d'or de 10 nm avec un rapport signal sur bruit de 100 et un temps d'intégration de 10 ms est de 100 nW seulement, le taux de modulation ainsi détecté apparaît plus faible de deux ordres de grandeur ($S = 4.10^{-5}$). Le bruit de détection étant aussi limité par le bruit de photons dans ce schémas, nous pouvons estimer le nombre de photons collectés sur une fenêtre de 10 ms (qui correspond au temps d'intégration d'une image pour acquisition à 60 Hz): $N = \left(\frac{RSB}{S}\right)^2 \approx 10^{13}$. Ce nombre de photons est de plusieurs ordres de grandeur supérieur aux capacités dynamiques des détecteurs CCD et illustre un avantage majeur de la détection ponctuelle à l'aide de photodiode en terme de sensibilité.

D'autre part, dans le cas de la détection ponctuelle, le signal photothermique est d'abord filtré spécifiquement autour de la fréquence de modulation thermique (filtrage passe bande), il est ensuite mixé au signal de modulation thermique pour réaliser la détection synchrone. En sélectionnant une bande spectrale réduite au voisinage de la fréquence de modulation on diminue donc le bruit affectant la réponse photothermique. En détection synchrone vidéo, nous n'appliquons pas de filtrage préalable au signal photothermique avant son mixage avec la modulation lumineuse, la totalité du bruit de photons est détectée et le rapport signal sur bruit est donc plus faible.

Le faible rapport signal sur bruit a donc limité notre détection photothermique, en temps réel et en champ large, à des tailles de nanoparticules de 100 et 80 nm. Plusieurs améliorations restent à produire pour la visualisation de marqueurs photothermiques nanométriques (>40 nm) adaptés aux applications biologiques. Récemment, l'équipe de M. Gross (ENS) en collaboration avec G. Tessier (ESPCI) a démontré la possibilité d'une imagerie photothermique en champ large de nanoparticules de 10 nm de diamètre [2]. Ils ont proposé un schémas de détection optique hétérodyne utilisant un interféromètre de Mach-Zender. Le champ sonde est évanescent et le champ de référence est incliné par rapport à l'axe optique pour réduire le fond continu d'illumination après filtrage spatial de la composante hors axe de l'image (filtrage numérique dans l'espace des fréquences spatiales) [9, 8]. Le signal photothermique est alors extrait par battement asynchrone entre les deux bras de l'interféromètre, comprenant respectivement le champ sonde et le champ de référence, tous deux modulés temporellement. Le gain en sensibilité de cette méthode peut être expliqué par la réduction du fond continu d'éclairement qui constitue la principale source de bruit. Pour atteindre ce niveau de sensibilité avec un montage optique simplifié, nous proposons le développement d'un nouveau type d'imagerie reposant sur un traitement d'images par filtrage spatial analogique que nous allons rapidement présenter.

1.5.3.5 Perspective pour l'amélioration du rapport signal sur bruit: la strioscopie optique

La strioscopie microscopique, i-e la réalisation pratique d'un nouveau type d'objectif, constitue un défi expérimental poursuivi dans le but d'accroître la sensibilité de détection, par suppression du fond continu d'éclairage. Par filtrage spatial direct, obturation sur l'image réciproque formée par l'objectif (seul ou accompagné par deux lentilles, figure 1.15), nous pouvons réduire le niveau moyen de lumière pour imager sous fond sombre, et diminuer le bruit de photons qui limite intrinsèquement notre traitement d'images synchrone sous fond clair. Le compromis réel entre filtrage spécifique des fréquences spatiales nulles (fond continu) et diminution du signal de battement sera à estimer pour valider l'efficacité de cette imagerie en champ sombre.

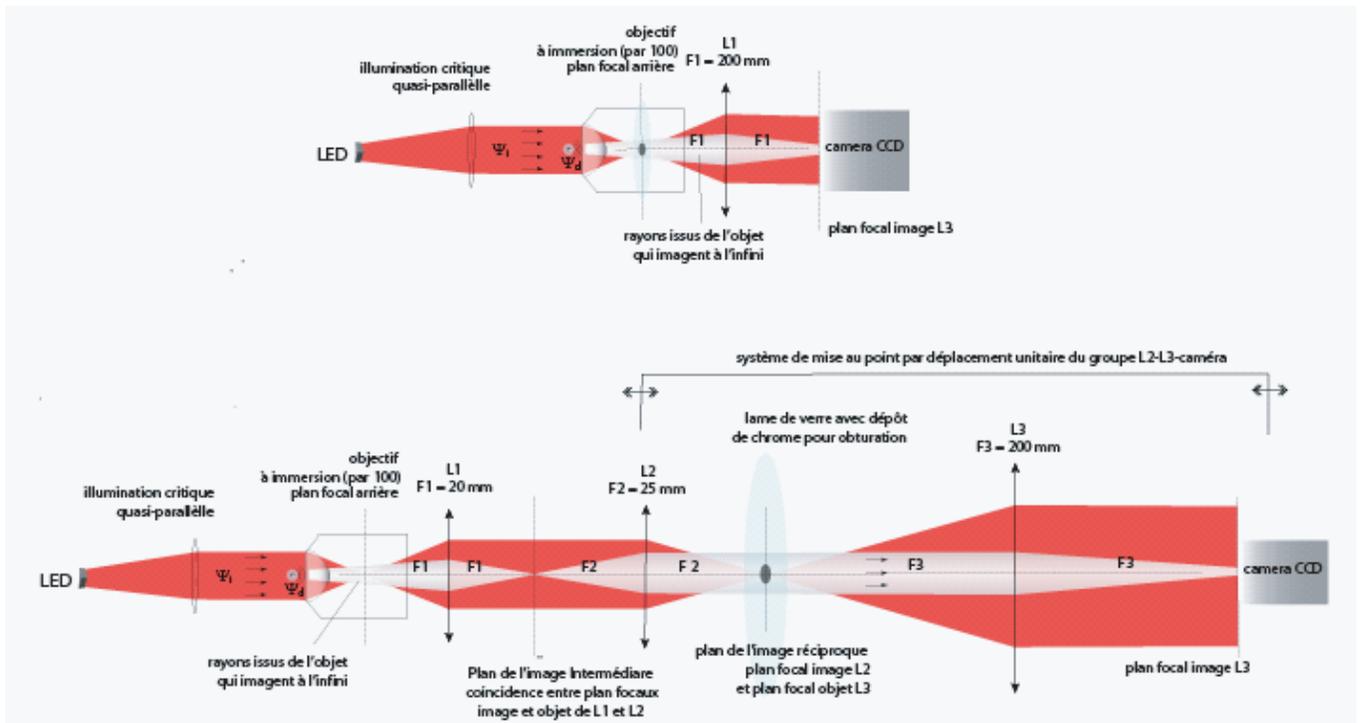


FIG. 1.15 – **Dispositifs optiques pour la strioscopie.** Dans le premier dispositif (en haut), le filtrage spatial est directement réalisé dans le plan focal image de l'objectif. Les rayons lumineux issus de l'objet diffusant (couleur pâle) et les rayons issus de la source lumineuse, qui définissent le fond continu d'éclairage (couleur rouge), empreignent des chemins optiques partiellement différenciés et autorisent le filtrage spatial dans le plan focal image de l'objectif. L'accès physique au plan focal image de l'objectif peut s'avérer difficile lorsqu'il est très proche de la lentille frontale. Nous proposons donc un deuxième dispositif où le filtrage est réalisé en sortie de l'objectif, toujours dans le plan de l'image réciproque reformé en sortie du système afocal (L1,L2). Notons que dans ce scénario, le dispositif optique règle la mise au point sans déplacement de l'objectif, et permet de réduire potentiellement la nuisance des dérives thermiques dont souffre l'imagerie microscopique.

1.6 Couplage aux champs radio-fréquence

1.6.1 Introduction

Nous avons testé une approche intéressante pour l'imagerie photothermique de nanoparticules métalliques fondée sur leur couplage à des champs radio-fréquence. Par excitation plasmonique, la

focalisation limite spatialement l'efficacité du couplage thermique, la densité nécessaire pour une visualisation rapide de nanoparticules de 100 nm est de l'ordre de 10 kW.cm^{-2} . En revanche, le couplage radiofréquence autorise une excitation spatialement étendue, adaptée à la détection en champ large et au suivi potentiel de marqueurs photothermiques multiples en trois dimensions.

Le couplage radiofréquence entre champ électromagnétique et nanoparticules métalliques n'est pas encore bien caractérisé. Pour expliquer le chauffage de nanoparticules d'or Hamad-Shifferli et al. [52] évoquent un couplage inductif, produisant des courants de Foucault au sein des nanoparticules métalliques. Mais leurs données ne permettent pas de confirmer cette assertion (cf 1.6.4.3). Nous proposons donc d'étudier la nature des interactions entre champ radiofréquence et nanoparticule métallique en séparant les composantes magnétique et électrique. Dans ce but, nous avons mesuré l'absorption d'énergie sur des ensembles de nanoparticules d'or en solution aqueuse et en interaction avec des champs oscillants de 1 MHz à 100 MHz. Nous avons donc comparé l'efficacité d'un couplage électromagnétique indirect (inductif) en plaçant les nanoparticules au sein d'une bobine et celle d'un couplage direct (capacitif) au sein d'un micro-condensateur.

1.6.2 Circuit électrique optimisé pour l'excitation RF

En électrocinétique, pour générer des champs électromagnétiques les plus intenses possibles il est fortement recommandé d'utiliser des circuits résonants. La résonance en intensité permet d'exhalter l'intensité qui parcourt une bobine pour obtenir une composante magnétique élevée, la résonance en tension exhale la tension appliquée aux bornes d'un condensateur pour obtenir une composante électrique maximale.

Dans les deux cas, une bobine et un condensateur constitueront les motifs élémentaires du circuit résonant. Ce circuit permettra de séparer les effets magnétique et électrique lorsque nous plaçons des nanoparticules métalliques soit dans la bobine, soit dans le condensateur.

Le choix de la fréquence de résonance est ensuite déterminante, comme nous le détaillerons par la suite le couplage entre champ RF et nanoparticule métallique dépend fortement de la fréquence d'excitation. Nous avons choisi de nous placer dans la gamme radiofréquence de 10 à 100 MHz qui assure une fréquence suffisante et simplifie l'approche électronique. Pour atteindre la fréquence de résonance désirée f , l'inductance de la bobine L est de l'ordre du μH et la capacité du condensateur C de l'ordre de quelques dizaines de pF, un rapide calcul d'ordre de grandeur le confirme : avec $L=1\mu\text{H}$ et $C=10\text{pF}$, $f = 1/2\pi \sqrt{LC} \approx 50\text{MHz}$. Avec ce choix de paramètres, i-e une capacité faible et une inductance élevée, le facteur de qualité Q du circuit dont la valeur est $Q = L\omega/R = 1/RC\omega$ ($\omega = 2\pi f$) est maximal, la résonance étant plus forte et plus aigüe (la résistance R représente la résistance équivalente du circuit).

D'une manière générale, par résonance on entend réaliser le meilleur accord entre résonateur et exciteur en terme de transfert énergétique. Nous avons donc choisi d'utiliser un circuit résonant qui permet de réaliser simultanément la résonance et l'adaptation d'impédance, toutes deux nécessaires pour cette optimisation. Il est formé par un circuit LC "bouchon" auquel on ajoute un condensateur de couplage (figure 1.16).

Les générateurs haute-fréquence sont adaptés au câbles et lignes électriques, leur impédance de sortie est donc fixée au standard de 50Ω . Pour obtenir l'adaptation d'impédance à la résonance, il faut $\Re(Z) = 50\Omega$ et $\Im(Z) = 0$ pour $\omega^2 = 1/LC$. L'impédance du circuit s'exprime par :

$$Z = \frac{1}{j\Gamma\omega} + \frac{R + jL\omega}{1 - LC\omega^2 + jRC\omega} \quad (1.20)$$

La condition d'adaptation d'impédance est alors satisfaite au voisinage immédiat de la résonance pour une valeur de Γ :

$$\left(\frac{\Gamma}{\Gamma + C} \right)^2 = \frac{R}{R_g} \quad (1.21)$$

L'ordre de grandeur de la capacité de couplage est de quelques picofarads, expérimentalement cette dernière sera ajustable (capacité variable de 1 à 10pF).

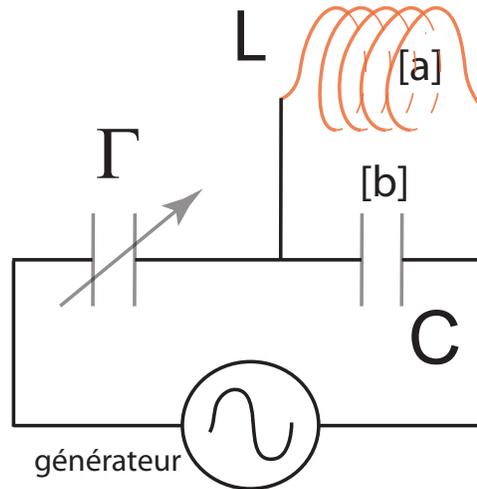


FIG. 1.16 – **Circuit électrique résonnant pour une adaptation approchée.** La capacité de couplage est ajustable pour réaliser l'adaptation d'impédance entre générateur et circuit. En introduisant une solution colloïdale de nanoparticules au centre de la bobine L (a) on évalue le couplage inductif alors qu'en introduisant la solution entre les armatures du condensateur C on évalue le couplage capacitif (b).

1.6.3 Principe de la mesure du couplage thermique par champ radiofréquence

Pour déterminer l'absorption d'énergie par couplage radiofréquence, nous mesurons le facteur de qualité du circuit qui quantifie sa dissipation globale. Lorsque les nanoparticules interagissent avec le champ radiofréquence, elles dissipent l'énergie électromagnétique absorbée sous forme de chaleur et cette conversion se traduit par une chute du facteur de qualité.

Dans un premier temps, on réalise l'adaptation d'impédance du circuit par variation de la capacité de couplage. Pour ce réglage, on utilise un coupleur directionnel qui permet de comparer l'impédance du circuit à une résistance étalon de 50 Ω. En effet, la tension réjectée par ce coupleur est proportionnelle au coefficient de réflexion r produit par les impédances comparées, cette tension V nous fournit donc une image fidèle de l'impédance du circuit. Avec V_i la tension incidente en entrée du coupleur et Z l'impédance du circuit, nous pouvons exprimer la tension de sortie par :

$$V = \alpha V_i r = \alpha V_i \frac{Z - 50}{Z + 50} \quad (1.22)$$

Lorsque l'accord est réalisé, la tension en sortie est donc quasiment nulle et loin de la résonance la tension est constante, égale à $V_0 = \alpha V_i$ ($r=1$). On peut d'ailleurs se donner un critère de validité du réglage : au voisinage de la résonance, $r \approx \delta Z/2R$ et $V/V_0 = \delta Z/2R$. Ainsi l'atténuation A (en dB) entre V_i et la tension de sortie est directement liée à la précision de l'accord : $A = 20 \log \frac{\delta Z}{2R}$. Lors du réglage, nous avons atteint une atténuation de -30 à -40 dB qui correspond à une erreur relative de quelques pourcents.

Dans un second temps, nous introduisons une solution colloïdale de nanoparticules métalliques au sein du circuit et conservons le coupleur directionnel qui permet une mesure non-perturbative des propriétés électriques du circuit. Pour quantifier l'absorption par couplage, nous modélisons la réponse en tension au niveau de la sortie du coupleur directionnel. Notre modèle de programmation à trois paramètres ajustables permet de mesurer les variations du facteur de qualité du circuit

caractérisé par la résistance équivalente du circuit (terme dissipatif), ainsi que les valeurs des éléments passifs (C,Γ). L'inductance de la bobine est déterminée par la valeur de la fréquence de résonance d'un circuit "bouchon", où elle figurait avec un condensateur de capacité connue (48pF).

Pour s'affranchir de l'absorption éventuelle du solvant (ici de l'eau), on effectue un réglage intermédiaire de la capacité Γ pour obtenir l'adaptation d'impédance en présence de solvant uniquement et on mesure la chute du facteur de qualité après ce réglage.

L'énergie dissipée se déduit de la valeur de R et de la tension qui lui est appliquée, celle-ci étant déterminée par la tension appliquée à l'entrée du circuit et la valeur des paramètres électriques du circuit (figure1.17).

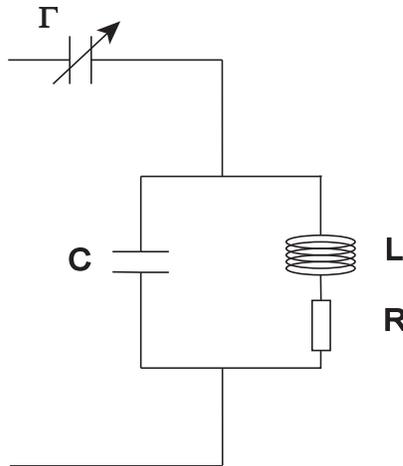


FIG. 1.17 – Modélisation du circuit électrique résonant.

1.6.4 Interaction avec la composante magnétique : couplage inductif

1.6.4.1 Présentation du couplage inductif

Lorsqu'on soumet un métal à un champ magnétique oscillant, on provoque un déplacement de charges par l'intermédiaire du champ électromoteur induit. Le couplage thermique résulte ainsi de l'échauffement du matériau produit par dissipation des courants de Foucault. Quelque soit le type d'induction, on est alors confronté au phénomène d'effet de peau qui contrôle la profondeur de pénétration du champ électromagnétique au sein du conducteur. Cette réduction du domaine d'application des champs et des courants est par exemple mise à profit dans le domaine des hyperfréquences: la partie conductrice de nombreux câbles et guides d'ondes est simplement assurée par un dépôt micro-métrique de métal précieux. En revanche, pour le chauffage par induction, l'épaisseur de peau doit être largement supérieure à la taille caractéristique de l'objet, le transfert thermique devient plus quantitatif. L'épaisseur de peau δ s'exprime par :

$$\delta = \sqrt{\frac{1}{\pi \mu \sigma f}} = 10.7 \mu m \quad (1.23)$$

- perméabilité magnétique: $\mu = \mu_0 \mu_r = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{USI}$ ($\mu_r = 1 + \chi_m \approx 1$ et $\chi_m = -3.410^{-6}$ légèrement diamagnétique)
- résistivité électrique: $\rho = 2.24 \cdot 10^{-8} \Omega.m$, la conductivité sera désignée par σ .
- f fréquence de 50 MHz

On bénéficie donc d'une épaisseur de peau nettement supérieure à la taille caractéristique des nanoparticules, la distribution du champ électromagnétique à l'intérieur d'un nano-objet est à priori uniforme et on profite d'un chauffage massif.

1.6.4.2 Résultats expérimentaux: un couplage faible

La bobine de diamètre $d = 1.65 \text{ cm}$ et de longueur $l = 1.3 \text{ cm}$ est constituée par un enroulement de $N = 9$ spires jointives. On estime son inductance $L = \mu_0 N^2 S/l = 1.57 \cdot 10^{-6} \text{ H}$ en accord avec la valeur expérimentale déterminée au préalable. Le circuit utilisé comprend une capacité de 33 pF et on place au centre de la bobine un échantillon de $100 \mu\text{l}$ de solution colloïdale de nanoparticules d'or de diamètres compris entre 5 nm et 250 nm (de concentrations comprises entre 83 nM et 0.6 pM respectivement).

Lorsqu'on introduit la solution colloïdale de nanoparticules d'or au sein de la bobine (figure 1.18), on observe une faible diminution de l'inductance apparente qui provoque un accroissement de la fréquence de résonance, le champ propre créé par les nanoparticules diminue le champ exciteur conformément à loi modératrice de Lentz. L'absorption se traduit par une très faible augmentation de la résistance équivalente du circuit ($R=1.239 \Omega$ à $R=1.259 \Omega$).

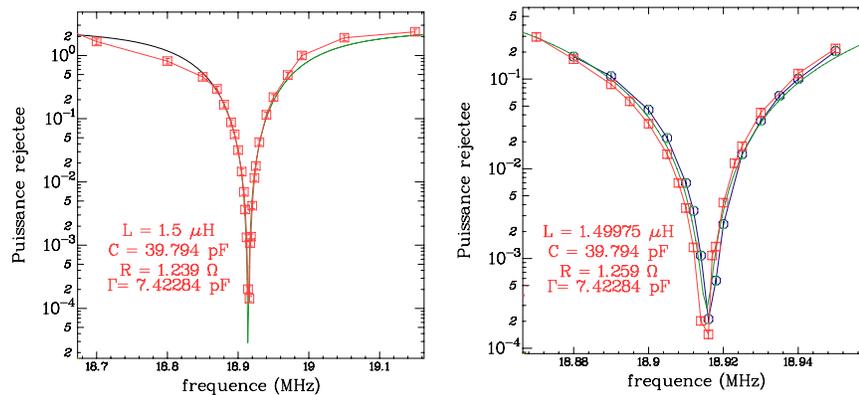


FIG. 1.18 – Modélisation de la puissance réjectée par le coupleur pour le couplage inductif de nanoparticules de 41 nm de diamètre. A gauche, à partir de la puissance mesurée en l'absence de nanoparticules en solution (points expérimentaux en rouge), on extrait les paramètres électrocinétiques du circuit correspondant au modèle (courbe verte). A droite on superpose la puissance mesurée en présence de nanoparticules (points expérimentaux en bleu et modélisation en vert) à la réponse obtenue pour le solvant (en rouge), la fenêtre affiche les nouveaux paramètres en présence de nanoparticules, ils sont quasiment identiques dans les deux situations.

Le tableau suivant regroupe les résultats expérimentaux obtenus à la fréquence de $18,915 \text{ MHz}$. La puissance absorbée par nanoparticule est notée P_{NP} .

échantillon	R	Q	$P_{NP} \text{ (nW)}$
eau	1,239	143.88	–
NP 5 nm	1,257	141.79	$9,25 \cdot 10^{-8}$
NP 41 nm	1,259	141,58	$5,59 \cdot 10^{-5}$
NP 100 nm	1,255	141,03	$7,26 \cdot 10^{-4}$

Nous mesurons une très faible puissance dissipée. Pour l'échantillon de nanoparticules de 41 nm de diamètre qui comprend $9 \cdot 10^9$ particules, la puissance absorbée est de 0.5 mW , soit $5.59 \cdot 10^{-5} \text{ nW}$ par particule.

1.6.4.3 Confrontation avec un modèle théorique simple

Nous proposons ici un modèle théorique simple pour quantifier la puissance dissipée par courants de Foucault.

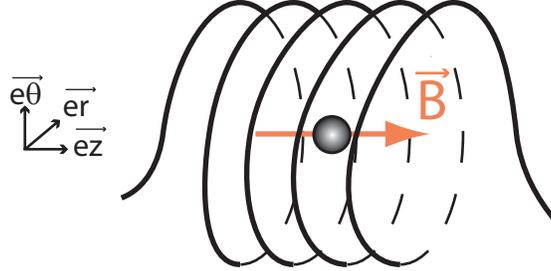


FIG. 1.19 – **Nanoparticule soumise à un champ magnétique oscillant.** La nanoparticule est placée au centre d'une bobine parcourue par un courant alternatif de fréquence f qui génère le champ magnétique oscillant \vec{B} .

Le champ magnétique créé dans l'espace intérieur de la bobine est supposé uniforme, il a la forme suivante $\vec{B} = B_0 \cos \omega t \vec{e}_z$. Par induction statique (variation temporelle du flux magnétique à travers une bobine fixe i-e induction du type Neumann), la variation temporelle du potentiel vecteur \vec{A} induit le champ électromoteur \vec{E}_m , en un point de l'espace repéré par $\vec{r} = (r, \theta, z)$ en coordonnées cylindriques nous pouvons exprimer ces champs :

$$\vec{A} = \frac{\vec{B} \wedge \vec{r}}{2} \quad (1.24)$$

et

$$\vec{E}_m = - \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \quad (1.25)$$

Le champ électromoteur est porté par la direction orthoradiale, les lignes de courant de Foucault ainsi produites sont des cercles concentriques centrés sur la NP et appartenant aux plans perpendiculaires à la direction du champ magnétique.

$$\vec{E}_m = -r/2 B_0 \omega \sin \theta \sin \omega t \vec{e}_\theta \quad (1.26)$$

La puissance volumique P_v cédée par le champ aux charges est liée au vecteur densité de courant \vec{j} et au champ électromoteur par la relation :

$$P_v = \vec{j} \cdot \vec{E}_m = \sigma \cdot E_m^2 \quad (1.27)$$

La puissance instantanée $P(t)$ cédée par nanoparticule s'en déduit aisément par une intégrale sur le volume :

$$P(t) = \int_{V_{NP}} \sigma \cdot E_m^2 dV \quad (1.28)$$

En désignant le rayon de la nanoparticule par r_{NP} , la puissance moyenne par nanoparticule $\langle P_{NP} \rangle = \int_t^{t+T} P(t) dt$ vaut :

$$\langle P_{NP} \rangle = (2\pi/15) \sigma B_0^2 \omega^2 r_{NP}^5 \quad (1.29)$$

Il est alors essentiel de retenir que la puissance de chauffe est fortement dépendante de la fréquence en ω^2 et de la taille de la particule. On comprend clairement le choix de la gamme de fréquence.

Il existe cependant une limite supérieure à la valeur de la fréquence qui optimise le couplage magnétique : en explorant les hyperfréquences, la distance caractéristique de pénétration des champs s'effondre, il faut alors prendre en compte les phénomènes d'auto-induction. En se comportant comme une association de boucles de courant, chaque nanoparticule crée son champ propre qui va s'opposer à l'établissement du champ magnétique initial, il y a expulsion des champs vers la périphérie du volume. A notre échelle (r_{NP} de 1 à 250 nm) et pour des fréquences inférieures à la dizaine de GHz ($f = 50 \text{ GHz}$ et $\delta \approx 1 \mu\text{m} \gg r_{NP}$) nous considérerons le modèle simple où l'effet de peau est négligeable.

Intégration des paramètres expérimentaux

Pour confronter les résultats expérimentaux au modèle théorique, nous avons mesuré l'intensité traversant la bobine d'inductance connue (0,318 A) et calculé la valeur du champ magnétique appliqué $B=0.274 \text{ mT}$. A la fréquence de 18.9 MHz la puissance transférée à une nanoparticule individuelle est comprise entre $5.9 \cdot 10^{-17} \text{ nW}$ à $1.9 \cdot 10^{-10} \text{ nW}$ pour des tailles comprises entre 5 et 100 nm. Le modèle proposé est donc en désaccord avec l'absorption mesurée et il n'autorise a priori qu'une très faible absorption.

Dans une expérience menée avec des champs oscillants au GHz, Hamad-Schifferli et al. [52] ont évalué une élévation locale de température de 13 K pour des nanoparticules d'or de 1.4 nm. Le couplage thermique y est estimé par les propriétés d'hybridation d'une molécule d'ADN en épingle à cheveux fonctionnalisée avec ces nanoparticules, celle-ci est successivement ouverture puis fermée par modulation du champ magnétique radiofréquence. Cependant d'après notre modèle, on ne peut attribuer ce transfert thermique à un couplage inductif par courants de Foucault comme ils l'ont supposé, l'estimation de la puissance absorbée pour cette taille de nano-objet et des champs magnétiques physiquement acceptables de 0.1T (à cette fréquence de modulation) est de 10^{-11} nW , et l'élévation de température est totalement négligeable. L'effet observé par application du champ radiofréquence semble donc provenir d'un autre mécanisme de couplage [62].

1.6.5 Interaction avec la composante électrique : couplage capacitif

1.6.5.1 Présentation du couplage capacitif

Le couplage par induction peut-être qualifié d'indirect : le champ électrique appliqué à la nanoparticule est généré par l'intermédiaire d'un champ magnétique oscillant. Pour augmenter l'efficacité du couplage, nous générons directement ce champ à l'aide d'un condensateur. Le transfert d'énergie est alors a priori gouverné par l'établissement de courants de polarisation au sein des nanoparticules, ils produisent potentiellement l'échauffement par effet Joule.

Les résultats expérimentaux permettrons d'analyser la dépendance fréquentielle du couplage pour proposer un modèle classique d'interaction champ/nanoparticules. La variation de l'absorption selon la taille à une fréquence donnée fournira un autre critère de discussion.

1.6.5.2 Micro-condensateur pour la génération d'un champ intense

La première cellule de mesure mise au point était constituée d'un condensateur à air de quelques pF et d'un capillaire contenant la solution colloïdale de nanoparticules. La tension effectivement appliquée en solution était fortement diminuée par l'interface verre/eau : le capillaire est en effet assimilable à une association de deux condensateurs en parallèle, d'épaisseurs e_v pour le verre et e_e

pour l'eau. Le facteur de correction en tension f s'exprime alors en fonction des permittivités relatives des milieux et de leurs épaisseurs respectives :

$$f = \frac{1}{1 + \frac{\epsilon_e \epsilon_v}{\epsilon_v \epsilon_e}} \quad (1.30)$$

Pour les permittivités considérées $\epsilon_e = 81$, $\epsilon_e = 1.33$ et $e_e/e_v \approx 1$, la tension et donc le champ effectif appliqué dans le solvant était divisé par 100 par rapport à celui appliqué à l'extérieur du capillaire.

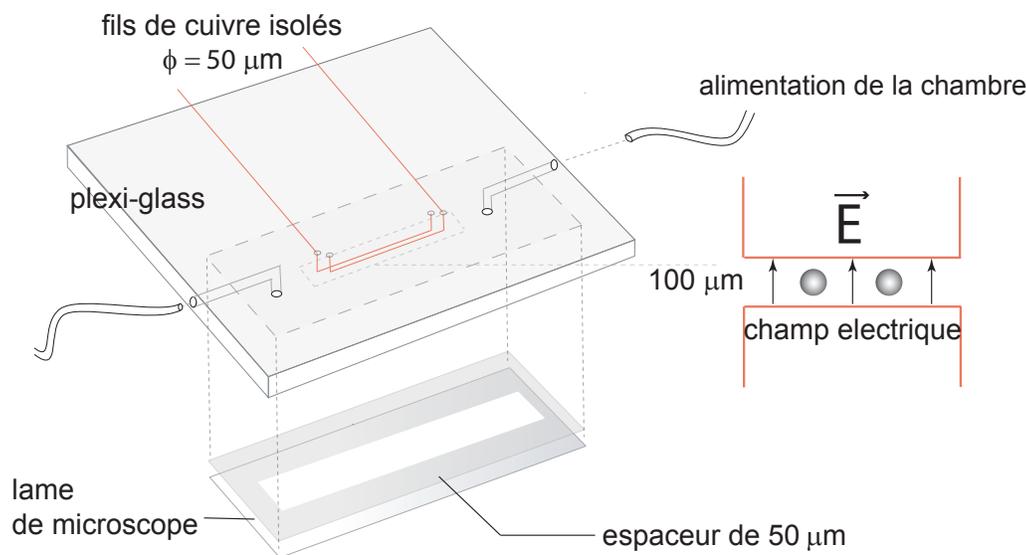


FIG. 1.20 – Cellule micro-fluidique intégrant un condensateur de faible taille. Le dispositif s'intègre aisément sur le microscope, la cellule de plexiglass est transparente et permet d'imager la région d'excitation radiofréquence.

Pour éliminer cette interface et réduire la distance entre les armatures, nous avons élaboré une cellule microfluidique munie d'un micro-condensateur, il est formé à partir de deux fils conducteurs mis en regard sur une longueur de 2 cm pour un espacement de 100 μm (figure 1.23). Ils sont isolés par un vernis pour se prémunir de tout phénomène d'électrolyse. L'épaisseur de la cellule est égale au diamètre des fils 50 μm, la capacité d'un tel condensateur à eau est de l'ordre de quelques pF. Ce micro-condensateur est intégré au circuit résonant en parallèle du condensateur C pour permettre un réglage fin de la capacité variable.

1.6.5.3 Un couplage plus efficace

Le tableau suivant rassemble les résultats obtenus à la fréquence de 48.4 MHz, pour une amplitude du générateur de 5V appliquée à l'entrée du circuit et une capacité fixe de 33 pF en parallèle de la cellule capacitive. La tension U représente la tension effective appliquée aux bornes de la cellule capacitive.

échantillon	R (Ω)	Q	$ U (eV)$	P_{NP} (nW)
NP 5 nm	1.55	40.8	16.2	$9,25 \cdot 10^{-2}$
NP 41 nm	0.94	67.8	22.6	2.01
NP 100 nm	0.914	69.7	23.2	29.7

Sous l'influence du couplage radiofréquence, l'adaptation d'impédance initiale est perdue (figure 1.21). L'absorption diminue le facteur de qualité du circuit et la valeur de la tension appliquée aux bornes du micro-condensateur : en présence du solvant uniquement, la tension appliquée est telle que $|U| = 27.4 V$ avec un facteur de qualité $Q=93$ et $R = 0.689 \Omega$. Les niveaux de puissance absorbée sont de l'ordre du nW par nanoparticule et l'efficacité du couplage capacitif est largement supérieure à celle mesurée pour le couplage inductif.

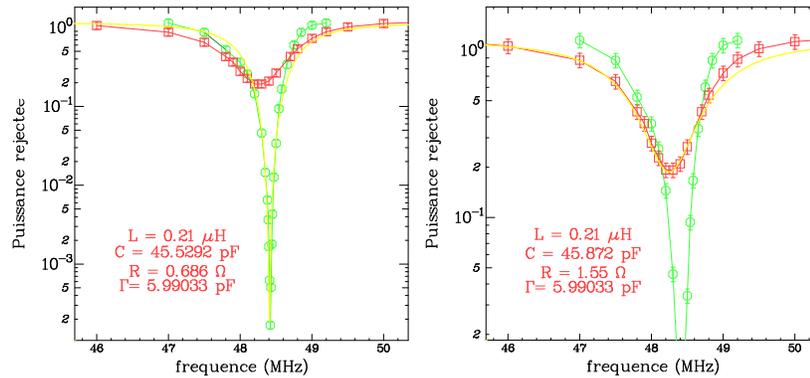


FIG. 1.21 – **Modélisation de la puissance réjectée par le coupleur pour le couplage capacitif de nanoparticules de 5 nm de diamètre.** A gauche, à partir de la puissance mesurée en l'absence de nanoparticules en solution (points expérimentaux en rouge), on extrait les paramètres électrocinétiques du circuit correspondant au modèle (courbe jaune). On superpose la puissance mesurée en présence de nanoparticules (points expérimentaux en vert) à la réponse obtenue pour le solvant uniquement. A droite, nous présentons un agrandissement des courbes, la fenêtre affiche les nouveaux paramètres en présence de nanoparticules. On constate une nette augmentation de la résistance équivalente du circuit qui traduit une absorption notable par couplage capacitif, la capacité varie faiblement sous l'effet du champ de réaction produit par la polarisation du métal.

1.6.5.4 Mesures d'absorption en fonction de la taille des nanoparticules et de la fréquence d'excitation

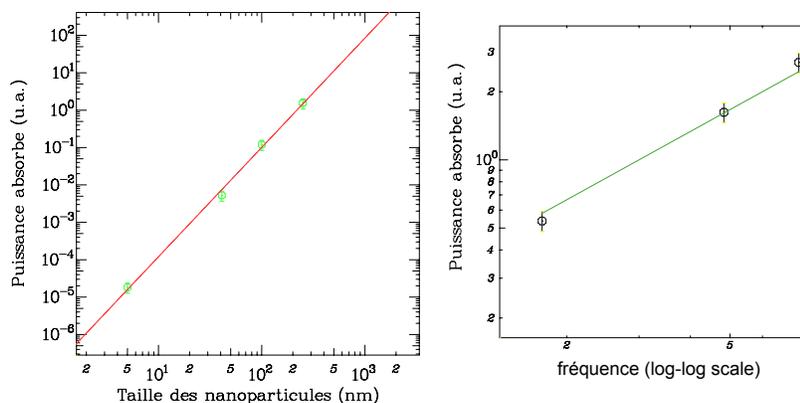


FIG. 1.22 – **Dépendance de la puissance absorbée par couplage selon la taille des nano-objets et la fréquence d'excitation.**

Pour des échantillons de nanoparticules de diamètre compris entre 5 nm et 250 nm, nous avons mesuré une puissance absorbée par nanoparticule qui varie selon le volume de la particule et semble confirmer un chauffage massif à l'échelle nanométrique (figure 1.22). La dépendance en fréquence a été mesurée entre 80 MHz et 18 MHz, sur cette gamme l'absorption suit une loi de puissance en $f^{1.5}$.

1.6.5.5 Proposition d'un modèle simple de polarisation d'un milieu conducteur

Nous abordons ce problème par un exemple simple d'un conducteur parfait de géométrie cubique placé dans l'air (de côté a). Par hypothèse d'un écrantage parfait, le champ électrique à l'intérieur du conducteur est annulé par la création d'une distribution de charge entre les deux faces perpendiculaires au champ (figure 1.23). L'excès de charge δQ localisé sur les armatures de ce condensateur artificiel s'exprime en fonction de sa capacité et du potentiel V_e qui permet l'annulation du champ interne :

$$\delta Q = CV_e = \epsilon_0 a E a \tag{1.31}$$

En régime sinusoïdal, l'excès de charge se déplace périodiquement avec un courant $i = \dot{\delta Q}$, la puissance moyenne P dissipée par effet Joule à travers la particule de résistance $R = \rho/a$ avec ρ la résistivité de l'or massif est :

$$P = 1/2 \epsilon_0^2 \rho a^3 \omega^2 E^2 \tag{1.32}$$

Les principales dépendances du couplage peuvent être analysées à partir de ce modèle élémentaire : l'absorption est proportionnelle au volume de la particule, à la puissance électrique fournie ($\propto E^2$) et varie selon la fréquence élevée au carré.

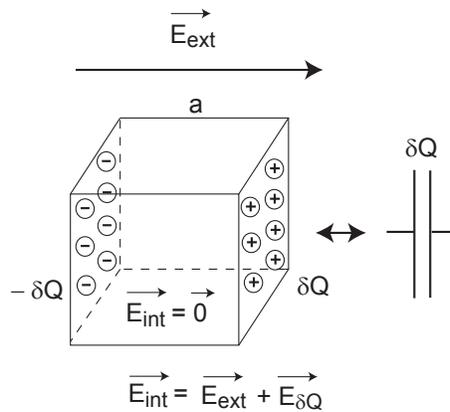


FIG. 1.23 – **Modèle élémentaire de polarisation d'une particule métallique.**

Nous allons maintenant nous intéresser au modèle classique de polarisation d'une sphère conductrice. Pour déterminer la réponse d'un milieu à un champ électromagnétique, nous établissons en premier lieu une relation phénoménologique de milieu.

Dans le cadre du modèle de Drude, inspiré de la théorie cinétique des gaz, les électrons de conduction du métal se déplacent librement et subissent des collisions aléatoires avec d'autres particules (phonons, défauts, ions du réseau...) qui se traduisent par un temps de relaxation électronique τ . D'un point de vue microscopique, ce temps moyen de collisions est relié au libre parcours moyen (lpm) du gaz d'électrons par la vitesse de Fermi v_f : $\tau = lpm/v_f$. Pour l'or massif, ce temps moyen vaut 3.10^{-14} s. Le modèle de Drude qui n'explique par la nature des collisions les assimile à une force de frottement fluide de constante d'amortissement τ . L'équation fondamentale de la dynamique appliquée à un électron de conduction de masse m et de charge $-e$ soumis à un champ électrique \vec{E}

s'exprime donc par :

$$m \frac{d\vec{v}}{dt} - m/\tau \vec{v} = -e\vec{E} \quad (1.33)$$

La réponse en polarisation \vec{P} à l'excitation électrique est caractérisée par la permittivité diélectrique relative du matériau massif ϵ de densité électronique n :

$$\vec{P} = -n e\vec{r} = \epsilon_0(\epsilon - 1)\vec{E} \quad (1.34)$$

En régime forcé, elle s'exprime donc par:

$$\epsilon = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i/\tau)} \quad (1.35)$$

où $\omega_p^2 = ne^2/(m\epsilon_0)$ représente la pulsation plasma du métal massif, la constante de temps τ est reliée à la conductivité du métal par $\sigma = ne^2\tau/m$. Aux fréquences du MHz, l'expression de la permittivité diélectrique se simplifie en :

$$\epsilon \approx 1 + (\omega_p^2\tau/\omega)i \approx \sigma/(\epsilon_0\omega)i \gg i \quad (1.36)$$

Nous pouvons maintenant évaluer la puissance absorbée par l'intermédiaire des courants de polarisation. Sous l'action du champ électrique, une sphère métallique de permittivité relative ϵ et de rayon r , placée dans un milieu aqueux de constante diélectrique $\epsilon_m = 79$ acquiert la polarisation \vec{p} [57] :

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_0 r^3 \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \vec{E} \quad (1.37)$$

Dans le domaine radio-fréquence la longueur d'onde est de l'ordre de quelques mètres, les nanoparticules de diamètre largement inférieur à la longueur d'onde sont donc considérées comme des dipôles ponctuels, et la puissance moyenne absorbée par nano-objet s'exprime par :

$$\langle P \rangle = \langle \dot{\vec{p}} \cdot \vec{E} \rangle = 2\pi\epsilon_0 r^3 \Im\left(\frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m}\right) \omega E^2 = 6\pi\epsilon_m\epsilon_0^2 \rho r^3 \omega^2 E^2 \quad (1.38)$$

Ce modèle exact apporte un résultat comparable au modèle simple de polarisation cubique au facteur géométrique près. Nous pouvons maintenant intégrer nos données expérimentales au modèle. Pour l'absorption d'une nanoparticule de 41 nm de diamètre à la fréquence de 48.4 MHz, la tension appliquée est de 22.6 V pour une distance entre armatures du condensateur de 100 μm , soit un champ électrique de 226 $\text{kV}\cdot\text{m}^{-1}$. La puissance absorbée par nanoparticule est alors de 10^{-13}nW à comparer avec une valeur expérimentale de 2 nW.

Le modèle classique de polarisation d'un métal est donc en accord avec les dépendances expérimentales du couplage (volume et taille) mais il n'explique pas les niveaux de puissance mesurés expérimentalement. L'absorption étant proportionnelle au volume, nous pouvons exclure des effets de charges surfaciques par interactions électrostatiques particule/solvant pour expliquer l'augmentation de polarisabilité apparente. D'autre part, nous avons effectué des mesures d'absorption par dilution pour des échantillons de nanoparticules de diamètres variant de 250 à 5 nm et de concentrations de l'ordre du nM au pM. Pour une taille donnée, l'absorption est proportionnelle à la concentration en nanoparticules et confirme une absorption massive, selon le volume des nanoparticules. Enfin, pour des échantillons de nanoparticules de taille de 250 et 100 nm discernables par l'optique, nous n'avons pas observé de formation d'agrégats métalliques lors de l'application du champ électrique. Un modèle exact des processus de couplage radiofréquence à l'échelle d'une nanoparticule unique reste donc à établir.

1.6.6 Conclusion

Nos mesures indiquent que le couplage radiofréquence paraît plus efficace par la composante électrique que la composante magnétique. Dans la configuration du couplage direct et dans la gamme de fréquence de 10 à 100 MHz, nous avons mesuré une puissance absorbée du nW pour une nanoparticule d'or de 40 nm, absorption proportionnelle au volume de la particule augmentant fortement avec la fréquence d'excitation. L'élévation de température associée à cette absorption est de l'ordre de 3 mK (température de surface de la particule) et reste insuffisante pour permettre une détection photothermique. Nous pensons que l'exploration de la totalité des gammes VHF et UHF (jusqu'à 1GHz) permettra d'accroître l'intensité du couplage par augmentation de la fréquence d'excitation pour effectivement visualiser des nanoparticules métalliques par cette méthode. Par ailleurs, l'efficacité du couplage capacitif a été récemment confirmée à 13.56 MHz pour des nanoparticules d'or absorbant 380 kW/g soit 0.5 nW pour une nanoparticule de 40 nm [85]. Dans ces évaluations expérimentales, l'amplitude du champ électrique appliqué de 10 kV.m^{-1} est comparable à l'amplitude générée par notre dispositif et fournit une puissance thermique qui est en accord avec nos mesures d'absorption.

Notre projet ouvre aussi la perspective d'une application dans le traitement destructif par voix thermique et souligne l'importance d'un accès direct aux propriétés physiques d'un nano-marqueur spécifiquement adressable. Le chauffage radiofréquence de nanoparticules d'or *in vivo* dépasse les limites majeures associées aux méthodes optiques de chauffage par nano-objets absorbants [54, 61], la bonne pénétration des champs radiofréquence permet de cibler des cellules spécifiques en volume, des cellules cancéreuses ont été traitées avec succès par cette méthode d'hyperthermie [49, 33].

Chapitre 2

Démodulation optique en microscopie de fluorescence

Nous présentons ici une application du principe de démodulation optique utilisé pour la photothermie à l'identification d'espèces biochimiques spécifiques. Dans une configuration originale proposée par l'équipe de Ludovic Jullien (Chimie des Systèmes ENS) avec lequel nous collaborons, l'espèce chimique cible, un oligonucléotide, est présent en solution dans deux états régulés par un équilibre chimique d'hybridation, le premier est fortement fluorescent contrairement au second. La modulation lumineuse est obtenue par déplacement thermique et périodique de cet équilibre. La résonance stochastique de ce système chimique et sa démodulation optique permettent alors l'identification de l'espèce cible sans séparation des espèces en solution, ainsi que sa titration précise.

Dans ce chapitre, nous présentons d'abord la méthode analytique développée pour l'adressage spécifique de l'espèce cible, puis l'outil physique conçu pour le contrôle thermique de la perturbation de l'équilibre, et la lecture optique de la dynamique du système chimique impliqué. Nous concluons enfin par les résultats expérimentaux qui ont donné lieu à une publication dans *Analytical Chemistry*.

2.1 Adressage cinétique de l'espèce cible

Pour analyser qualitativement et quantitativement un mélange biologique complexe, i-e constitué d'une grande variété de molécules présentes en solution dans une large gamme de concentrations, il est nécessaire de développer des méthodes d'analyse hautement spécifiques. En analyse spectroscopique par exemple, les critères d'identification reposent sur les propriétés fonctionnelles des espèces cibles comme la présence de chromophores. Cependant, dans le cas d'un mélange de bio-polymères partageant des motifs fonctionnels similaires, la difficulté réside alors dans une signature spectrale commune qui empêche la quantification individuelle des différentes espèces.

Traditionnellement, une solution simple consiste à discriminer l'espèce cible par sa réactivité. En présence d'une molécule sonde, l'identification résulte alors des propriétés thermodynamiques de l'équilibre de la réaction cible-sonde. La spécificité doit être assurée par des constantes d'affinités nettement différentes entre sonde et espèces potentiellement interférentes. Dans le cas d'échantillons biologiques, mélange de composants structurellement proches, cette condition est néanmoins peu robuste [39]. Un adressage plus spécifique de la molécule cible est alors obtenu en exploitant les propriétés cinétiques de la réaction de titration mise en jeu : en augmentant le nombre de paramètres chimiques de contrôle par les deux constantes cinétiques de la réaction, on accroît nettement la sélectivité réactionnelle. De plus, les constantes cinétiques d'un mélange multi-espèces diffèrent plus largement que leurs constantes d'associations. L'approche cinétique permet donc de dépasser les limitations thermodynamiques. Elle a été appliquée avec succès à la séparation d'espèces par l'équipe de Ludovic Julien [60, 4, 3, 18], et nous proposons de l'utiliser maintenant pour l'analyse chimique

quantitative au sein de mélanges biologiques complexes.

2.1.1 Perturbation périodique d'un équilibre chimique par excitation thermique

Pour révéler la dynamique d'une réaction chimique, nous avons choisi de maintenir le système dans un état hors d'équilibre par une perturbation périodique qui déplace continuellement l'équilibre de la réaction. La cinétique chimique est alors caractérisée par le couplage entre l'excitation et le système, dont la réponse dépend fortement de la fréquence d'excitation. On peut ainsi exciter sélectivement les "fréquences moyennes" de la réaction définies par les constantes cinétiques pour provoquer une résonance stochastique et optimiser la sélectivité de la réponse. Dans notre dispositif, la température a été retenue comme paramètre de forçage périodique de l'équilibre [19, 17]. Ce type de déplacement thermique s'applique à une majorité de processus biologiques dont les enthalpies de réaction sont non-nulles, et comprises entre 20 et 200 kJ.mol⁻¹ [99, 121]. Pour des modulations thermiques de faible amplitude, cette méthode présente l'avantage d'être non-invasive, compatible avec une imagerie in vivo [102], et facilement mise en pratique [24, 12].

Pour illustrer la réponse cinétique d'un système chimique à l'excitation thermique, nous considérons maintenant une réaction modèle de titration, formée par une espèce A_1 réagissant avec une sonde P pour donner le produit de réaction A_2 :



où k_+^P et k_- désignent les constantes cinétiques, respectivement d'association et de dissociation de la réaction. On suppose que l'espèce P est introduite en large excès et que sa concentration est constante au cours du temps. La réaction décrit alors un échange entre les deux états A_1 et A_2 :



avec $k_+ = k_+^P[P]$ la nouvelle constante cinétique. La température du milieu T est soumise à une oscillation sinusoïdale de pulsation ω autour de la température moyenne T_0 et de faible amplitude βT_0 :

$$T = T_0(1 + \beta \sin \omega t) \quad (\beta \ll 1) \quad (2.3)$$

Les constantes cinétiques obéissent à une loi d'activation du type Arrhenius et s'expriment par : $k_{\pm}(T) = r_{\pm} \exp(-E_{\pm}/RT)$, R étant la constante des gaz parfaits. Sous l'effet d'une modulation de température modérée, le préfacteur exponentiel comme l'énergie d'activation ne sont pas modifiés. Selon une démarche analogue aux méthodes de relaxation en cinétique chimique [46], un développement perturbatif au premier ordre des constantes cinétiques permet de mettre en évidence les composantes oscillantes du système :

$$k_{\pm}(t) = k_{\pm}^0 [1 + \beta \epsilon_{\pm}^0 \sin(\omega t)] \quad (2.4)$$

avec $k_{\pm}^0 = r_{\pm} \exp(-\epsilon_{\pm}^0)$ and $\epsilon_{\pm}^0 = E_{\pm}/RT_0$.

A partir de l'expression des nouvelles constantes cinétiques, on calcule les concentrations $A_i(t)$ résultantes en régime permanent [18]:

$$A_i(t) = A_i^0 + \beta(A_i^{sin} \sin \omega t + A_i^{cos} \cos \omega t) \quad (2.5)$$

avec A_i^0 les concentrations à l'équilibre initial à T_0 :

$$A_1^0 = A - A_2^0 = \frac{A}{1 + K^0} \quad (2.6)$$

où A représente la concentration totale en (A_1, A_2) , et $K^0 = k_+^0/k_-^0$ la constante d'équilibre à T_0 .

Les amplitudes des composantes oscillantes en phase (A_i^{sin}) et en opposition de phase (A_i^{cos}) s'expriment en fonction des paramètres thermodynamiques et cinétiques :

$$A_1^{sin} = -A_2^{sin} = -\frac{\Delta H}{RT_0} \frac{K^0}{(1+K^0)^2} \frac{1}{1+(\tau\omega)^2} A \quad (2.7)$$

$$A_1^{cos} = -A_2^{cos} = \frac{\Delta H}{RT_0} \frac{K^0}{(1+K^0)^2} \frac{\tau\omega}{1+(\tau\omega)^2} A \quad (2.8)$$

où $\Delta H = E_+ - E_-$ est l'enthalpie standard de la réaction d'échange et $\tau = 1/(k_+^0 + k_-^0)$ désigne le temps de relaxation du système, i-e le temps nécessaire pour atteindre le régime stationnaire.

2.1.2 Conditions de résonance en quadrature

La dépendance des amplitudes d'oscillation en fonction des paramètres thermodynamiques et cinétiques (figure 2.1) révèle un comportement singulier du système chimique en régime harmonique : la réponse en quadrature présente un maximum absolu pour un couple unique de constantes cinétiques tel que :

$$K^0 = 1 \quad \text{et} \quad \tau\omega = 1 \quad (2.9)$$

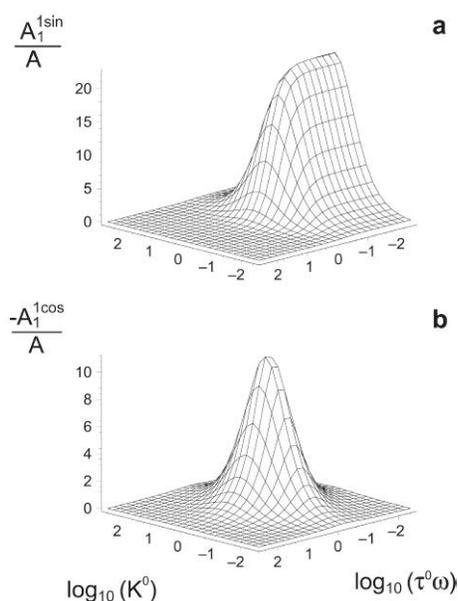


FIG. 2.1 – Réponse théorique d'une réaction d'échange $A_1 \rightleftharpoons A_2$ soumise à une excitation thermique périodique. Les amplitudes des oscillations en phase (a) et en opposition de phase (b) pour la concentration en espèce A_1 sont représentées en fonction de la constante d'équilibre K_0 et du temps de relaxation adimensionné $\tau\omega$ (pour $\Delta H/RT_0 = -90$).

La première condition de résonance ($K^0 = 1$) apparaît lorsque les constantes cinétiques sont égales: $k_+^0 = k_-^0$. Les deux espèces A_1 et A_2 sont alors présentes en proportions identiques et la modulation de température maximise les variations relatives de concentrations (pour les deux composantes en phase et en opposition de phase). La seconde condition impose une période d'excitation égale au temps de relaxation de la réaction. Aux temps courts $\omega \gg 1/\tau$, la réaction d'échange,

plus lente que les variations de température, n'a plus le temps de répondre à l'excitation. Les amplitudes des composantes en phase comme en quadrature s'effondrent pour atteindre une valeur nulle. Aux temps longs $\omega \ll 1/\tau$, la réaction d'échange répond efficacement et sans délais à la sollicitation périodique : la réponse en phase atteint une valeur constante et maximale, alors que la réponse en quadrature s'annule. Finalement, il existe un régime intermédiaire où la réaction d'échange présente une réponse en quadrature non-nulle et maximale pour $\omega = 1/\tau$. On qualifie cette réponse en quadrature de résonance stochastique de la réaction d'échange à deux états. Les actes élémentaires impliqués dans la réaction d'échange ($\overset{+}{\rightleftharpoons}$; $\overset{-}{\rightleftharpoons}$) sont associés à des processus aléatoires au niveau moléculaire. La réponse en quadrature est optimisée pour un couple unique des paramètres cinétiques caractérisant les processus stochastiques mis en jeu : $k_+^0 = k_-^0 = \omega/2$ [4].

2.1.3 Lecture optique pour une réaction d'échange entre espèces fluorescentes

Pour valider le principe de discrimination cinétique par modulation de température et résonance en quadrature, nous avons choisi de titrer un oligonucléotide fluorescent, impliqué dans une réaction d'hybridation, et mis en présence d'espèces fluorescentes et interférentes. L'espèce cible A_1 est donc constituée d'une séquence d'ADN simple brin conjuguée au fluorophore rhodamine-green, qui forme un duplex A_2 par hybridation à une sonde ADN complémentaire non marquée P . Lorsque l'oligonucléotide fluorescent s'apparie au brin sonde complémentaire, le rendement de fluorescence diminue fortement (il est divisé par 10). Le fluorophore est quasiment éteint par interaction avec la base la plus proche, le nucléotide G étant le meilleur "quencheur". On dispose ainsi d'une réaction d'échange à deux états de fluorescence. Cette asymétrie permet alors de mesurer optiquement les variations de concentration produites par déplacement périodique de l'équilibre d'hybridation. Elle sera aussi mise à profit pour mesurer la constante d'équilibre de la réaction d'hybridation lors d'une expérience classique de dénaturation, suivie par fluorescence (cf 2.3.4).

2.2 Détection optique synchrone à faible fréquence

Le système chimique choisi pour la réaction de titration est relativement lent, pour une concentration en espèce sonde P de l'ordre du μM il est caractérisé par un temps de relaxation compris entre 0.1 s et 0.05 s, dans une gamme de température de 20 à 40 °C (cf 2.3.4). En effet, la valeur des constantes cinétiques d'hybridation peut être estimée a priori avec des moyens techniques simples [43]. La valeur de k_+^P est principalement fixée par les conditions salines et vaut entre 10^4 et $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, tandis que k_-^0 dépend essentiellement de la séquence et de la température avec un domaine de valeurs plus large (k_-^0 vaut typiquement quelques s^{-1} dans notre cas).

Pour caractériser la réponse fréquentielle du système chimique et titrer l'espèce cible à la résonance en quadrature, les modulations de fluorescence produites par forçage thermique de l'équilibre se situent dans le domaine des basses fréquences. En effet pour des fréquences très supérieures à $1/\tau$ les amplitudes d'oscillation en concentration seront négligeables. Ces modulations lumineuses sont donc directement identifiables par une caméra CCD standard, de fréquence d'acquisition typique de 30 Hz. Par imagerie en champ large, on sera ainsi en mesure d'analyser plusieurs mélanges complexes en parallèle.

Nous avons donc mis au point une technique de détection synchrone entre acquisition vidéo et excitation thermique, dédiée à l'analyse des signaux optiques modulés à faible fréquence.

2.2.1 Synchronisation de l'excitation thermique avec l'acquisition vidéo

La technique de détection synchrone repose sur la synchronisation de la fréquence de modulation thermique avec celle de l'acquisition vidéo. Par ce principe, on obtient un nombre fixé d'images vidéo (nf) pendant une période d'oscillation de température, le but étant d'accumuler le signal optique

sur ce même nombre d'images pour chaque nouvelle oscillation. Ce procédé supprime toutes les composantes spectrales qui ne sont pas des harmoniques de la fréquence de modulation thermique, et permet de distinguer la modulation de fluorescence d'origine thermique du bruit de fond avec un rapport signal sur bruit élevé.

Nous avons donc construit une carte électronique pour piloter l'excitation thermique et la synchroniser au signal vidéo. Cette carte, analogue à celle réalisée pour la détection photothermique, consiste dans son principe en une boucle à verrouillage de phase commandée par l'acquisition vidéo. Le signal de référence utilisé est le signal caméra de synchronisation verticale (VD), dont la fréquence (30.1 Hz) est divisée par le nombre d'images nf par période d'oscillation thermique. La sortie du comparateur de phase alimente un filtre intégrateur qui pilote l'oscillateur contrôlé en tension (VCO). Un signal triangulaire de fréquence contrôlée par le VCO est associé à pont de diodes pour générer le signal sinusoïdal de modulation thermique à faible distorsion dont la fréquence est synchronisée à la référence par comparaison de phase (figure 2.2). Ce dispositif produit donc des modulations thermiques dont les fréquences sont des sous-multiples de la fréquence caméra : $f_{th} = f_{vidéo}/nf$.

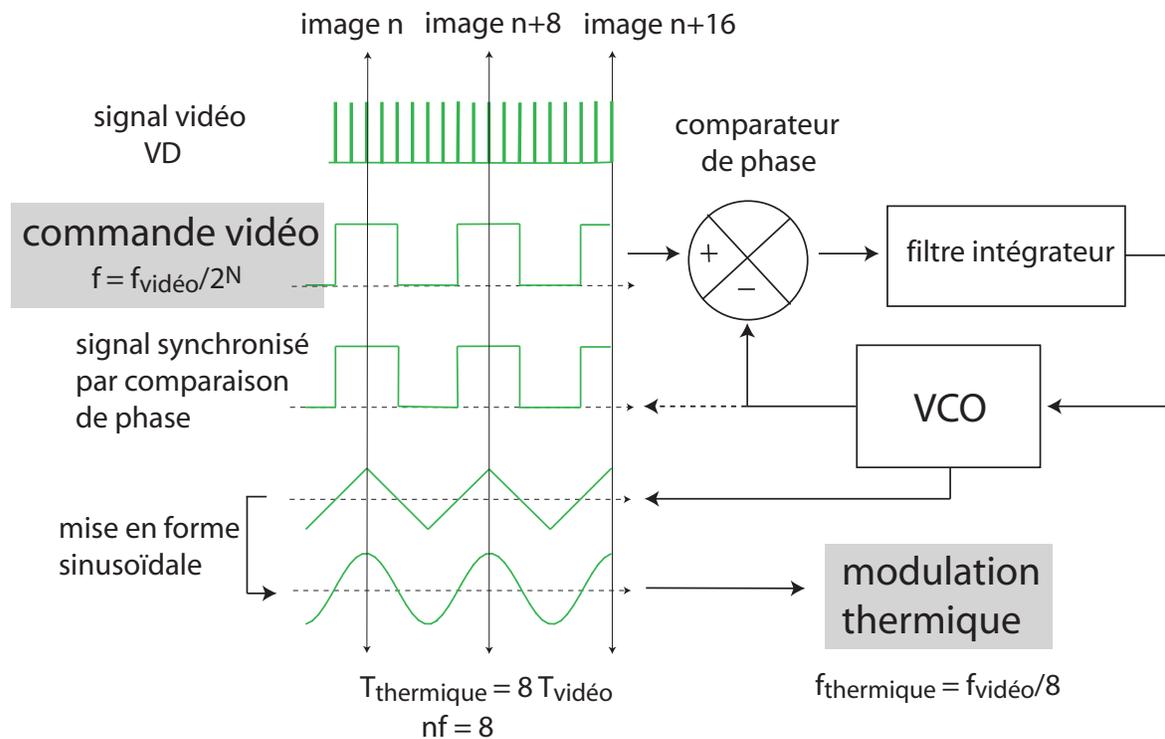


FIG. 2.2 – Schémas de principe de l'électronique de synchronisation de l'excitation thermique avec l'acquisition vidéo. Nous présentons ici le principe de synchronisation pour $nf=8$, le module électronique autorise la synchronisation pour différents sous-multiples de la fréquence caméra avec $f_{thermique} = f_{vidéo}/2^N$. Les signaux triangulaire et sinusoïdal après mise en forme sont synchrones avec le signal TTL inclus dans la boucle de rétroaction et générés par le même circuit intégré (MAX038).

2.2.2 Accumulation du signal de fluorescence périodique induit par chauffage

Le dispositif électronique est interfacé à un programme de traitement d'images qui moyenne en temps réel l'image vidéo, il construit un film de nf images à partir d'un nombre défini et entier d'oscillations de température. Ce programme réalise donc une accumulation périodique du signal dans un mode de détection synchrone (figure 2.3). Le traitement d'images en temps réel est effectué

pour un codage d'intensité en 32 bits sur l'intégralité de la matrice CCD (1.4 Mpix). Nous pouvons ainsi moyenner le signal sur un temps arbitrairement long, et un nombre d'oscillations très élevé.

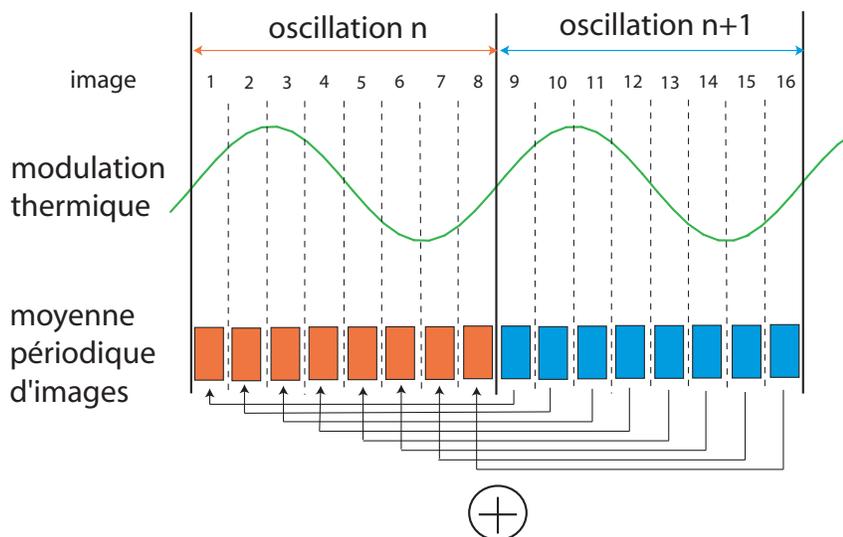


FIG. 2.3 – Principe d'accumulation périodique du signal optique ($nf=8$).

2.3 Résultats : titration d'oligonucléotides

2.3.1 Imagerie en quadrature de phase

Pour la détection en quadrature de phase, nous imageons en parallèle de l'espèce titrée un thermomètre moléculaire, soumis lui aussi à la modulation de température. Il est constitué par une molécule en épingle à cheveux marquée en fluorescence. Ce système chimique à deux états de fluorescence, entre molécule ouverte et fermée, est ici utilisé pour sa cinétique rapide ($\tau = 10^{-5}$ s). Il répond instantanément aux variations de température dans le domaine de fréquences d'excitation de la réaction titration. Le signal de fluorescence associé à la modulation de cet équilibre rapide est émis dans un canal distinct situé dans le rouge. Sa réponse, en phase avec la modulation thermique, fournit la base de décomposition des harmoniques pour extraire les signaux de fluorescence ciblés en quadrature : on enregistre un film de nf images accumulé sur plusieurs oscillations de température, à partir duquel on extrait la modulation thermique, proportionnelle au signal de fluorescence du thermomètre. Elle est alors modélisée par une fonction sinusoïdale du type $\sin \omega t$. On projette ensuite chaque image de ce film sur la composante en quadrature $\sin(\omega t - \pi/2) = \cos(\omega t)$ pour démoduler le signal de fluorescence d'intérêt (dans le canal vert).

L'imagerie à deux couleurs est réalisée en épifluorescence, avec un objectif de faible puissance optique ($\times 10$, $NA=0.5$). La modulation thermique est produite par effet Joule et autorise un chauffage compatible avec l'imagerie. Le dispositif est constituée de résistances multiples, chacune étant formée par un film mince et transparent d'oxyde d'indium de $350 \mu\text{m}$ par $350 \mu\text{m}$ déposé sur un substrat de verre (figure 2.4). Une microfluidique multi-canal en PDMS permet la visualisation simultanée de différents mélanges, chauffés par une même résistance lorsque celle-ci est parcourue par l'excitation sinusoïdale en courant. L'amplitude thermique résultante, à une fréquence double de la fréquence électrique, est mesurée par le thermomètre moléculaire [12]. Aux fréquences de modulation appliquées (< 30 Hz), l'élévation de température est spatialement homogène sur la hauteur de la chambre

microfluidique ($10\ \mu\text{m}$).

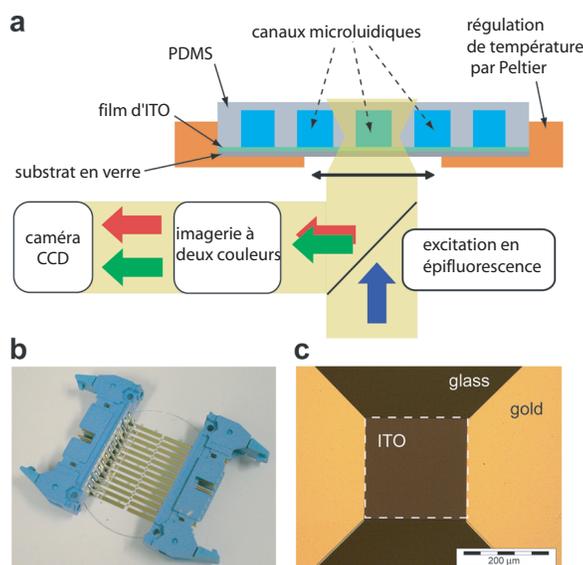


FIG. 2.4 – **Dispositif expérimental pour l'imagerie en quadrature.**(a)Description de l'ensemble du dispositif.(b)Vue spécifique du dispositif de chauffage formé par 13 résistances.(c)Vue agrandie d'une micro-résistance.

2.3.2 Titration sélective en présence d'espèces interférentes

Pour évaluer la sélectivité de l'approche cinétique, l'oligonucléotide à titrer (A_t) est mélangé à deux espèces interférentes émettant dans le même canal de fluorescence (figure 2.5) : la première est non réactive (notée A_{NR}), il s'agit d'un oligonucléotide conjugué à la rhodamine-green qui ne peut s'hybrider avec la sonde impliquée dans la réaction de titration. La deuxième est une molécule en épingle à cheveux (notée A_{MB}) qui constitue un système compétitif d'échange à deux états, de constante thermodynamique proche de la réaction ciblée mais de cinétique plus rapide. La molécule est marquée par une sonde fluorescéine.

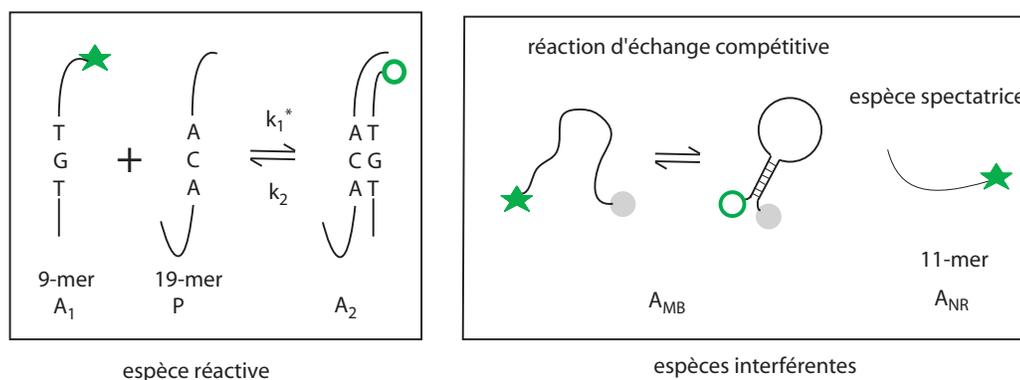


FIG. 2.5 – **Espèces cible et interférentes du protocole de titration sélective.**

A partir de mesures préalables des constantes thermodynamiques et cinétiques, on identifie les conditions de résonance en quadrature de la réaction de titration. L'expérience de titration est alors

réalisée pour une température $T_0 = 306\text{ K}$, une amplitude de modulation de quelques K ($\beta = 0.002$) et une fréquence de 3.7 Hz ($nf=8$). La concentration en sonde est fixée à $7\ \mu\text{M}$.

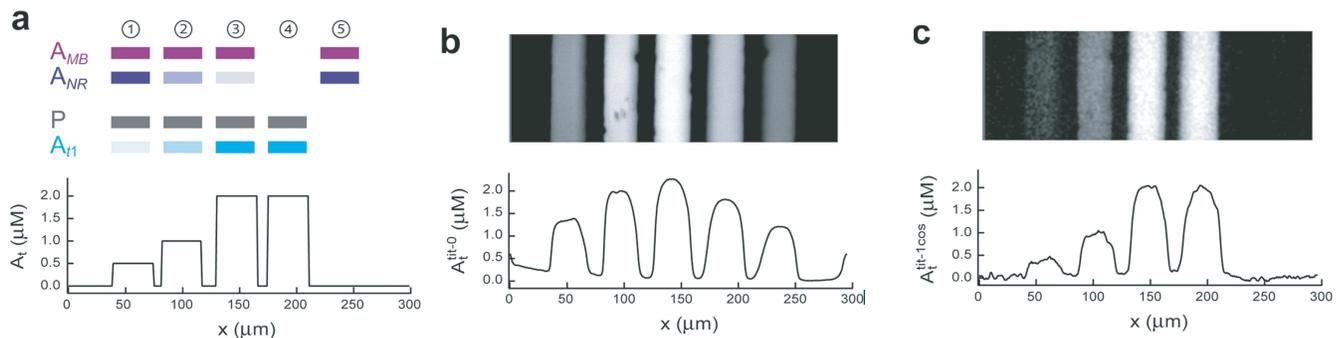


FIG. 2.6 – **Titration de l'espèce cible A_t dans un mélange de deux composants interférents.** (a) Représentation des compositions initiales des différents canaux d'analyse (description complète dans (2.3.4)). (b) Emission de fluorescence à l'équilibre thermodynamique et profil de titration correspondant. (c) Amplitude de la réponse en quadrature par modulation thermique et profil de titration mesuré.

La figure 2.6 présente le résultat de la détection en quadrature pour différents mélanges introduits dans la chambre microfluidique. Les canaux 1 à 3 contiennent l'espèce cible A_t en concentration croissante (de 0.5 à 2 μM) à laquelle on a ajouté les deux composants interférents dans des concentrations comparables. Le quatrième canal contient l'espèce à titrer (à 2 μM) en présence de la sonde, et constitue un étalon de calibration pour la conversion du signal de fluorescence en concentration. Le thermomètre moléculaire y est ajouté pour assurer le contrôle en température et la détection en quadrature. Le dernier canal (5) contient les seules espèces interférentes.

Sans modulation de température, les niveaux de fluorescence observés dans les différents canaux sont équivalents et la titration de l'espèce cible est alors largement sur-estimée. Ce résultat illustre le défaut majeur des méthodes classiques de titration réalisées à l'équilibre thermodynamique.

En appliquant la modulation thermique et la détection en quadrature, on révèle alors des niveaux de fluorescence distincts pour les cinq canaux, le signal correspondant aux espèces interférentes étant totalement éteint. Les niveaux des canaux 3 et 4 qui contiennent la même quantité d'espèce cible sont identiques et confirment la haute spécificité de détection. Enfin l'analyse quantitative du signal atteste d'une sensibilité élevée de détection pour des titrations de 0.38, 0.95 et $2 \pm 0.1\ \mu\text{M}$.

Nous avons donc démontré l'efficacité du protocole de modulation en température et détection en quadrature, qui élimine complètement la contribution des espèces non-résonantes et dépasse clairement les limitations des méthodes de titration à l'équilibre chimique. Cette nouvelle approche ne nécessite aucune séparation d'espèces et repose uniquement sur un filtrage thermo-cinétique de la réponse chimique. Elle a été démontrée génériquement dans une application de microscopie de fluorescence et peut-être étendue aux autres techniques de spectroscopie UV ou IR.

La suite du développement expérimental consiste en la titration sélective d'espèces biochimiques de cinétique plus rapide. Dans ce but, nous avons adapté le système de modulation lumineuse synchrone créé pour la photothermie, qui permet la démodulation des signaux périodiques de fréquence supérieure à l'acquisition vidéo. Par démodulation du signal de fluorescence émis par le thermomètre moléculaire, il a déjà permis de valider une évolution récente du dispositif de chauffage ohmique, visant à augmenter sa fréquence de coupure et améliorer l'efficacité de l'excitation thermique dans le domaine des hautes fréquences (de 100 Hz à quelques kHz).

2.3.3 Article "Temperature Modulation and Quadrature Detection for Selective Titration of Two-State Exchanging Reactants"

Les résultats détaillés sont présentés sous la forme d'un article publié dans le journal Analytical Chemistry.

Temperature Modulation and Quadrature Detection for Selective Titration of Two-State Exchanging Reactants

K. Zrelli,[†] T. Barilero,[†] E. Cavatore,[‡] H. Berthoumieux,[†] T. Le Saux,^{*,†} V. Croquette,[†] A. Lemarchand,^{*,§} C. Gosse,^{*,||} and L. Jullien^{*,†}

[†]Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, UMR CNRS-ENS-UPMC Paris 06 8640 Pasteur, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France

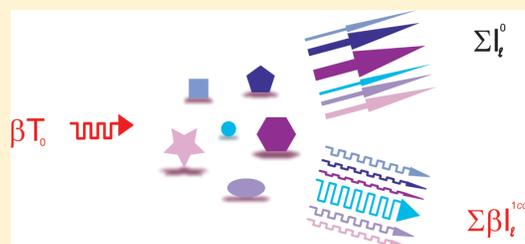
[‡]Laboratoire de Physique Statistique, Département de Physique, Ecole Normale Supérieure, UMR CNRS 8550, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France

[§]Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée, Université Pierre et Marie Curie Paris 06, UMR CNRS-UPMC 7600, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

^{||}Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, route de Nozay, 91460 Marcoussis, France

Supporting Information

ABSTRACT: Biological samples exhibit huge molecular diversity over large concentration ranges. Titrating a given compound in such mixtures is often difficult, and innovative strategies emphasizing selectivity are thus demanded. To overcome limitations inherent to thermodynamics, we here present a generic technique where discrimination relies on the dynamics of interaction between the target of interest and a probe introduced in excess. Considering an ensemble of two-state exchanging reactants submitted to temperature modulation, we first demonstrate that a compound has its concentration oscillating out-of-phase with a maximum amplitude if it is involved in a reaction whose equilibrium constant is equal to unity and whose relaxation time is equal to the inverse of the excitation angular frequency. Taking advantage of this feature, we next devise a highly specific detection protocol and validate it using a microfabricated resistive heater and an epifluorescence microscope, as well as labeled oligonucleotides to model species displaying various dynamic properties. As expected, quantification of the sought-for strand is obtained even if interfering reagents are present in similar amounts. Moreover, our approach does not require any separation and is compatible with imaging. It could then benefit some of the numerous binding assays performed every day in life sciences.



INTRODUCTION

Quantifying a given species in a complex medium of living origin is currently encountered in many medical and pharmaceutical activities such as molecular diagnosis^{1,2} and drug screening.³ Moreover, extensive characterization of cellular content is the workhorse of scientific fields such as genomics, proteomics, and metabolomics. Yet these analytical tasks represent a tremendous challenge, as crude biological samples typically contain 10^4 – 10^6 components of the same kind (e.g., RNAs, proteins) at concentrations covering up to 10 orders of magnitude.^{1,4,5} Improvement in assay selectivity is therefore required to avoid as much as possible the cumbersome pretreatments today necessary prior to any specific detection.

Directly “counting” intrinsic labels such as functional groups is not appropriate to investigate the considered mixtures because they are mostly made of biopolymers that share the same building blocks in the same proportions. In fact, this type of approach results in spectral crowding, and unambiguous species identification can be achieved only through coupling with methods emphasizing physicochemical criteria (e.g., separation

for mass spectrometry⁶ or correlation analysis for IR absorption^{7,8}). Besides such complicated multidimensional analyses, titration is then a valuable strategy because one just has to observe a single reagent selectively probing the compound of interest. Furthermore, in the present context there is a benefit from the high specificity that characterizes molecular recognition in biology.⁹

Binding assays, which rely on thermodynamics for discrimination, are actually widespread. Whereas “mix-and-read” tests are homogeneous and consequently convenient, the advent of microarrays has yielded unprecedented multiplexing capabilities, with thousands of titrations being performed in parallel.^{10–14} However, species concentrations are often overestimated because labeling reagents are insufficiently rinsed away or because nonspecific adsorption onto solid supports is poorly controlled.^{9,12,14,15} Additionally, in a mixture of similar components, a single probe is anticipated to display close affinities for several targets.¹¹ Thus,

Received: October 2, 2010

Accepted: January 16, 2011

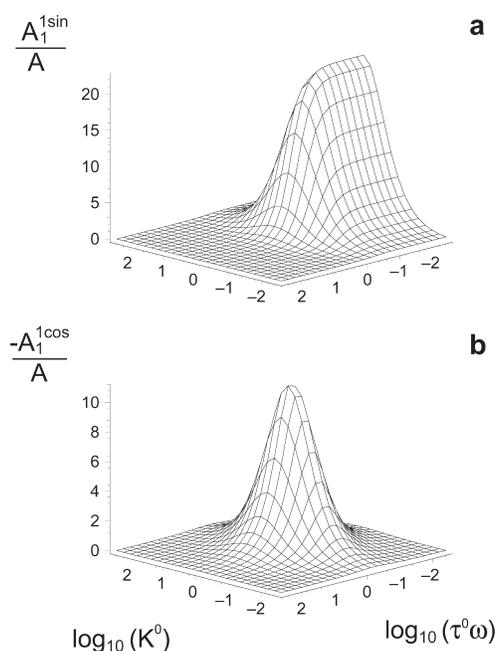


Figure 1. Theoretical computation of the response of a two-state exchanging reactant $A_1 \rightleftharpoons A_2$ submitted to thermal harmonic forcing. The normalized amplitudes of the in-phase and out-of-phase oscillations in A_1 concentration, $A_1^{1\sin}/A$ and $-A_1^{1\cos}/A$, respectively, are plotted versus the equilibrium constant K^0 and the adimensional relaxation time $\tau^0\omega$ for $\Delta H/RT_0 = -90$. See eqs 5 and 6.

67 to overcome such limitations, detection selectivity has to be
 68 improved. We here propose to increase the number of dis-
 69 criminating parameters by relying on kinetics:¹⁶ for instance, at
 70 least two independent rate constants, instead of the sole
 71 thermodynamic one, are associated with every titration reac-
 72 tion. We have already implemented such an approach to devise
 73 highly efficient separative protocols^{17–21} and we shall now
 74 demonstrate its relevance for quantitative analysis.

75 To reveal chemical dynamics, we have retained the principle of
 76 a perturbation that periodically forces the system out-of-equilib-
 77 rium. This strategy provides rate constants and mechanisms in
 78 relaxation methods,^{22,23} whereas it is used to resolve overlapping
 79 bands in spectroscopy^{23–25} and to enhance the signal-to-noise ratio
 80 in biodetection.^{26,27} More practically, we have chosen temperature
 81 as the most versatile parameter for periodic excitation.^{28–30} As a
 82 matter of fact, thermodynamic and kinetic constants of biologically
 83 relevant processes significantly depend on it—namely, the values of
 84 the reaction enthalpies typically lie in the 20–200 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
 85 range.^{31–33} In addition, temperature modulations of weak ampli-
 86 tude are noninvasive, compatible with *in vivo* imaging,³⁴ and easy to
 87 implement, either globally (at the scale of a microsystem)^{26,34–37} or
 88 locally (in the close surroundings of a nanoparticle).^{38–40}

89 ■ THEORY

90 We consider a titration in which an analyte A_1 reacts with a
 91 probe P to form a product A_2 , the forward and backward rate
 92 constants being respectively denoted k_+ and k_- . If the concen-
 93 tration P is such that P is in great excess, we can model the

reaction as a two-state exchange:



with $k_+ = k_+^P$. A sinusoidal modulation of the temperature T is then applied around T_0 , at angular frequency ω and with a small amplitude βT_0 :

$$T = T_0[1 + \beta \sin(\omega t)] \quad (\beta \ll 1) \quad (2)$$

Following Arrhenius, we have $k_{\pm}(T) = r_{\pm} \exp(-E_{\pm}/RT)$, where R is the ideal gas constant. As both the pre-exponential factors r_{\pm} and the activation energies E_{\pm} are here assumed to not vary with T , a first-order expansion in the perturbation yields $k_{\pm}(t) = k_{\pm}^0 [1 + \beta \varepsilon_{\pm}^0 \sin(\omega t)]$ with $k_{\pm}^0 = r_{\pm} \exp(-\varepsilon_{\pm}^0)$ and $\varepsilon_{\pm}^0 = E_{\pm}/RT_0$.^{23,29} Beyond the relaxation time $\tau^0 = 1/(k_+^0 + k_-^0)$, one enters the forced and permanent regime where the concentration $A_i(t)$ in each species A_i obeys²⁸

$$A_i(t) = A_i^0 + \beta [A_i^{1\sin} \sin(\omega t) + A_i^{1\cos} \cos(\omega t)] \quad (3)$$

In the latter equation, A_i^0 is the A_i concentration at chemical equilibrium at T_0 :

$$A_1^0 = A - A_2^0 = \frac{A}{1 + K^0} \quad (4)$$

where A is the total concentration in the $\{A_1, A_2\}$ couple and $K^0 = k_+^0/k_-^0$ is the reaction 1 equilibrium constant at T_0 . Moreover, the amplitudes of the oscillating terms at angular frequency ω , in-phase and out-of-phase with the temperature, are respectively given by eqs 5 and 6:

$$A_1^{1\sin} = -A_2^{1\sin} = -\frac{\Delta H}{RT_0} \frac{K^0}{(1 + K^0)^2} \frac{1}{1 + (\tau^0\omega)^2} A \quad (5)$$

$$A_1^{1\cos} = -A_2^{1\cos} = \frac{\Delta H}{RT_0} \frac{K^0}{(1 + K^0)^2} \frac{\tau^0\omega}{1 + (\tau^0\omega)^2} A \quad (6)$$

where $\Delta H = E_+ - E_-$ is the standard enthalpy of the exchange reaction.

Figure 1 displays, for a fixed value of ΔH , the dependence on K^0 and $\tau^0\omega$ of $A_1^{1\sin}/A$ and $-A_1^{1\cos}/A$. Interestingly, the amplitude in quadrature exhibits a single maximum centered on

$$K^0 = 1 \quad \text{and} \quad \tau^0\omega = 1 \quad (7)$$

with full widths at half-maximum $4\sqrt{2}$ along K^0 and $2\sqrt{3}$ along $\tau^0\omega$. Due to the symmetry of the sinusoidal forcing, a first condition for this “resonance” to occur is that A_1 and A_2 are in equal proportions. Indeed, the temperature modulation then causes the largest relative variations of their concentrations. Second, the reaction relaxation time has to match the oscillation period. In fact, in the $1/\tau^0 \ll \omega$ regime, the exchange is slow compared to the temperature variations because the $\{A_1, A_2\}$ couple has not enough time to respond: both $A_1^{1\sin}$ and $A_1^{1\cos}$ vanish. Conversely, in the $1/\tau^0 \gg \omega$ regime, the A_1 concentration keeps pace with the thermal excitation: $A_1^{1\sin}$ plateaus at its highest values, whereas $A_1^{1\cos}$ cancels.

The existence of a peaked response for $A_1^{1\cos}$ is significant to quantify a given targeted couple $\{A_{i1}, A_{i2}\}$ in an unknown mixture of reactive compounds $\{A_{j1}, A_{j2}\}$ associated with different values of equilibrium constants K_j^0 , relaxation times τ_j^0 , and total concentrations A_j .⁴¹ As an illustration, we shall provide some calculations for titrations performed in a simplified case

Analytical Chemistry

ARTICLE

137 where we assume that (i) only the A_{l1} species participate in the
 138 overall signal, for instance, because fluorescence emission is
 139 quenched in A_{l2} ; (ii) the output contribution of each compound
 140 linearly depends on its concentration A_{l1} with a proportionality
 141 factor unique to all the A_{l1} ; and (iii) all exchanges have a similar
 142 $\Delta_l H$ value: the latter parameter is indeed expected to vary just
 143 over 1–2 orders of magnitude, whereas K_l^0 and τ_l^0 can typically
 144 span 10 orders of magnitude because of their exponential
 145 dependence on the reaction enthalpy. In the absence of any
 146 information about the composition, the target concentration has to
 147 be evaluated by presuming that the signal from the whole sample
 148 is solely due to the sought for reactant. Therefore, the titration
 149 result A_t^{titr} is always an overestimate of A_t . For example, a protocol
 150 relying on equilibrium at constant temperature T_0 leads to

$$A_t^{\text{titr-0}} = A_t + \sum_{l \neq t} \frac{(A_{l1}^0/A_t)}{(A_{l1}^0/A_t)} A_l = A_t + \sum_{l \neq t} \frac{(1 + K_l^0)}{(1 + K_l^0)} A_l \quad (8)$$

151 Noteworthy, the second component of the right term can
 152 hardly be made negligible, which means that the contribution
 153 of the species of interest cannot be maximized among those of
 154 the interfering compounds. In contrast, looking at the out-of-
 155 phase response to a thermal excitation yields

$$A_t^{\text{titr-1cos}} = A_t + \sum_{l \neq t} \frac{(A_{l1}^{1\text{cos}}/A_t)}{(A_{l1}^{1\text{cos}}/A_t)} A_l \quad (9)$$

156 Provided the eq 7 resonant conditions are satisfied for $\{A_{t1}, A_{t2}\}$,
 157 we have $(A_{t1}^{1\text{cos}}/A_t) \gg (A_{l1}^{1\text{cos}}/A_t)$ whenever $l \neq t$ (Figure 1b and
 158 Table 1S in the Supporting Information). Thus, the signal issued
 159 from the targeted couple can now dominate the one from the
 160 other couples. Figure 2 illustrates for various equimolar mixtures
 161 the superiority of this second strategy over equilibrium measure-
 162 ments: whereas all the $A_t^{\text{titr-0}}$ values are several times larger than
 163 the actual A_t concentration, the discrepancy between $A_t^{\text{titr-1cos}}$
 164 and A_t becomes vanishingly small as soon as the $\{A_{l1}, A_{l2}\}$ depart
 165 from $\{A_{t1}, A_{t2}\}$ in the $(K^0, \tau^0\omega)$ plane.

■ EXPERIMENTAL SECTION

167 **Reagents and Solutions.** Solutions were prepared using
 168 water purified through a direct-Q5 system (Millipore, Billerica,
 169 MA). 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes),
 170 $\text{Mg}(\text{OH})_2$, and NaOH were purchased from Sigma–Aldrich (St.
 171 Louis, MO).

172 Poly(dimethylacrylamide) (PDMA) of average molecular Mass
 173 ~ 3 MDa, was given by J. Weber (Institut Curie, Paris, France).
 174 This polymer was introduced in all solutions to prevent, thanks
 175 to dynamic coating, biomolecules adsorption onto the micro-
 176 device walls.

177 The oligonucleotides were synthesized on the 1 μmol scale,
 178 conjugated, and double-HPLC-purified by IBA (Göttingen,
 179 Germany). With a 5'–3' orientation, boldface capitals to desig-
 180 nate the bases involved in hybridization, and bhq, fam, rhg, and tex
 181 to respectively designate the black hole quencher 2, fluorescein,
 182 rhodamine green, and Texas red labels, the single-stranded
 183 sequences read $A_{t1} = \text{rhg-CTTTGTTTG}$; $P = \text{AGAGGCCA-}$
 184 TAAACAAAGGA ; $A_{NR} = \text{rhg-T}_{11}$; $A_{MB} = \text{fam-T}_7\text{GATAGT}_{16}\text{C-}$
 185 TATC-tex ; and $M = \text{tex-T}_7\text{GATAGT}_{16}\text{CTATC-bhq}$. The con-
 186 centration of the stock solutions was estimated by measuring
 187 their absorption at 260 nm on a Uvikon-940 spectrophotometer
 188 (Kontron, Zürich, Switzerland). This determination was performed

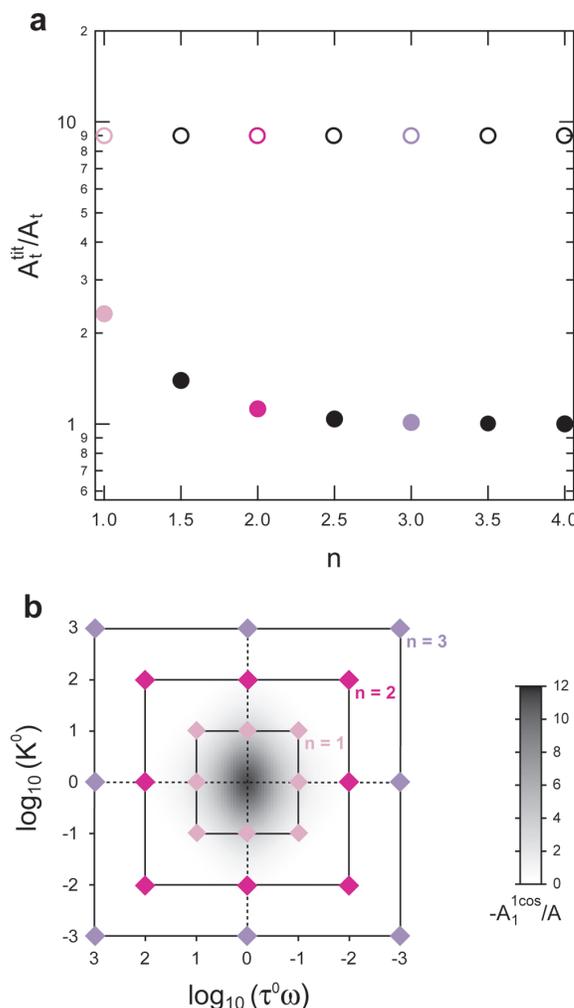


Figure 2. Theoretical computation of the ratio between the titration outcome A_t^{titr} (which assumes that only the sought-for reactant is present) and the effective target concentration A_t . (a) Results for both (○) “equilibrium” and (●) “temperature modulation and quadrature detection” methods are compared for seven different equimolar mixtures, which include the targeted two-state exchanging reactant plus eight other interfering couples. In each sample labeled n , the latter species correspond to the eight $(K_l^0, \tau_l^0\omega)$ sets placed on the outer nodes of a 3×3 grid centered on $(K_t^0, \tau_t^0\omega) = (1, 1)$ and whose mesh size is n in decimal logarithmic units. (b) Graphical representation in the $(K^0, \tau^0\omega)$ plane of some of the preceding mixtures. Each set of colored diamonds corresponds to a sample with a given n value. Gray levels figure the peak associated with the out-of-phase resonance.

at 20 °C and we relied on the molar absorption coefficients provided by the manufacturer.

Thermal Control. To generate temperature oscillations in the solution to be analyzed, we made use of a previously described resistor.³⁵ This heater, 340 $\mu\text{m} \times 340 \mu\text{m}$ large, was micro-machined in a 400 nm indium tin oxide (ITO) film of resistivity 10 Ω/\square that had been deposited on a 550 μm thick glass wafer (Figure 3). More precisely, the fabrication was a three-step process: (i) the hot plate feature was defined by optical lithography and

C

dx.doi.org/10.1021/ac1026034 | Anal. Chem. XXXX, XXX, 000–000

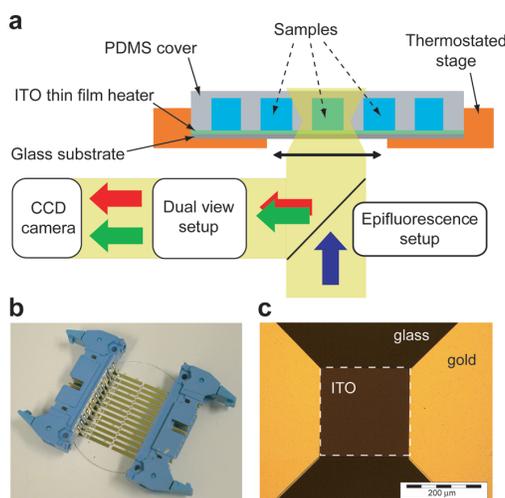


Figure 3. Experimental setup and microsystem used to impose on the sample a temperature modulation of controlled frequency, amplitude, and average value, as well as to observe both the green-emitting analytes and the red-emitting molecular thermometer. (a) General layout. (b) Large-scale view of a 50 mm diameter glass wafer on which 13 ITO resistors of different sizes have been fabricated. (c) Detailed view of a square microheater.

198 transferred into the thin film semiconductor by ion beam
 199 etching; (ii) a second photolithography followed by a standard
 200 lift-off procedure yielded gold leads that enabled contact between
 201 the active zone and the macro-world; (iii) the whole heater was
 202 encapsulated in a 800 nm thin layer of silica to prevent any
 203 electrochemical degradation of the sample. Once electrical
 204 connectors had been welded, the device was completed by
 205 assembling the fluidic system: a PDMS stamp including 35 μm
 206 large and 10 μm high channels, separated by 20 μm walls.

207 In operation, the bottom glass surface of the microchip was
 208 placed on a 0.4 mm thick copper disk in which a 3 mm large slit
 209 had been opened for observation with the objective. This metal
 210 holder was itself mounted on an aluminum block thermostated at
 ± 0.2 K with thermoelectric Peltier devices (CP 1.0-63-05
 L-RTV; Melcor, Trenton, NJ). The stage temperature was
 212 monitored with a TCS610 thermistor (Wavelength Electronics,
 213 Bozeman, MT) and the feedback loop was driven by a MPT1000
 214 temperature controller (Wavelength Electronics), which re-
 215 ceived instructions from the computer through a usb-1208 fs
 216 I/O board (Measurement Computing, Norton, MA).

217 For experiments where thermal excitation was required, we
 218 injected a sinusoidal current of peak amplitude 18 mA in the ITO
 219 resistor using a function generator, either a DS360 (Stanford
 220 Research Systems, Sunnyvale, CA) or a 33220A, 20 MHz
 221 (Agilent, Santa Clara, CA). It resulted in a 0.6–2.4 K modulation
 222 in the microfluidic chamber, at a frequency twice the applied
 223 electrical one. Actually, a precise calibration of β has been per-
 224 formed for each pulsation ω between 0.54 and 59 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$: on one
 225 hand the current was monitored by measuring with a 54600B, 100
 226 MHz oscilloscope (Hewlett-Packard, Santa Clara, CA) the voltage
 227 drop across a 47 Ω power resistance (RLP 1%, Vishay-Serfnice,
 228 Selb, Germany) connected in series with the device; on the other
 229 hand, the amplitude of the temperature oscillations was determined
 230 thanks to the ratiometric molecular thermometer MB and to the
 231 dual-view epifluorescence setup, as described in Barilero et al.⁴²
 232

233 Furthermore, to control the homogeneity of the thermal
 234 response over the area that corresponded to the video acquisition
 235 window, we employed the red temperature probe M. The
 236 microplate heater was driven with 18 mA AC current at various
 237 frequencies from 0.02 to 2 Hz and the fluorescence signal was
 238 recorded over time with a charge-coupled device (CCD) camera.
 239 Then, by applying data treatment procedures similar to the ones
 240 used for detection in quadrature (vide infra), we obtained images
 241 where the gray levels were directly related to the average
 242 temperature as well as to the thermal excitation amplitude and
 243 phase (see Supporting Information). From the measurements
 244 displayed in Figure 4S in the Supporting Information, the three
 245 latter quantities could be assumed even over both the considered
 246 observation area and the investigated frequency range.

247 **Fluorescence Microscopy and Video Acquisition.** Imaging
 248 was achieved on the previously reported homemade dual-view
 249 epifluorescence microscope,⁴² whose optics were arranged as
 250 follows. The source light was first passed through a multiband
 251 filter for selective excitation of both rhodamine green and Texas
 252 red (FF01-479/585–25; Semrock, Rochester, NY). A multiedge
 253 dichroic mirror (FF505/606-Di01; Semrock) and a 10 \times objec-
 254 tive (Fluar NA 0.5; Zeiss, Le Pecq, France) were then used to
 255 perform epifluorescence illumination. The emitted light was
 256 subsequently collected and divided in two by a first S85DCXR
 257 dichroic mirror (Chroma Technology, Rockingham, VT). The
 258 resulting optical rays associated with the green (g) and red (r)
 259 channels were next filtered by relying respectively on FF01-525/
 260 30–25 and FF01-628/32–25 band-pass filters (Semrock).
 261 Finally, with the help of a second S85DCXR dichroic mirror,
 262 the two-color image was reconstructed on the chip of a CCD
 263 camera, either a BM-141 GE (JAI, Copenhagen, Denmark) or a
 264 Luca-R (Andor Technology, Belfast, U.K.). The field of view was
 265 ~ 0.5 mm for each color channel. We could also estimate that, at
 266 similar dye concentrations, rhodamine green contamination
 267 accounted for less than 10% of the Texas red signal in the red
 268 acquisition window.

269 To derive an expression for the intensity of the images
 270 collected with the camera in each color channel c of the dual-
 271 view system, we consider a two-state exchange like that in eq 1.
 272 Fluorescence being emitted by both A_i species, after subtraction
 273 of the background signal, it yields

$$F^c(x, y, T) = E(x, y) C^c(x, y) \left[Q_{A_1}^c A_1(T) + Q_{A_2}^c A_2(T) \right] \quad (10)$$

274 where $E(x, y)$ is the illumination intensity arriving on the sample
 275 and $C^c(x, y)$ is the instrumental transfer function accounting for
 276 the collection of photons and their conversion in electrical
 277 signal.⁴² Noticeably, E and C^c vary with the pixel coordinates,
 278 whereas concentration profiles in both reagent and product are
 279 here assumed to be homogeneous. In eq 10 the $Q_{A_i}^c$ brightnesses
 280 are introduced, defined as

$$Q_{A_i}^c = \left[\int_{\lambda} 2.3e(\lambda) \varepsilon_{A_i}(\lambda) d\lambda \right] \left[\int_{\lambda} \phi_{A_i}(\lambda) c^c(\lambda) d\lambda \right] \quad (11)$$

281 where ε_{A_i} and ϕ_{A_i} are the A_i molar absorption coefficient and
 282 fluorescence quantum yield, respectively. On the other hand, the
 283 two functions e and c^c , whose integrals are equal to 1, hold for the
 284 variation with λ of the excitation and of the detection efficiencies,
 285 respectively. Finally, the 2.3 factor corresponds to $\ln 10$; it
 286 originates from developing at first order the Beer–Lambert

Analytical Chemistry

ARTICLE

287 law to retrieve the intensity of light absorbed by the sample.⁴³ As
288 demonstrated in a previous paper, E , C^c , and Q_A^c , as well as the
289 total concentration $A = A_1 + A_2$, depend only weakly on T .⁴²

290 In the case where a temperature modulation of small ampli-
291 tude, $\beta T_0 \sin(\omega t)$, is applied around T_0 , eq 10 can further be
292 developed by use of eqs 3, 5, and 6. It is here important to remark
293 that, as proved by the measurements reported in Figure 4S in the
294 Supporting Information, both T_0 and β are even over the heater
295 surface under study. Similarly, the thermal excitation shows no
296 phase shift whatever the values of x and y . Thus, for experimental
297 conditions that minimize photobleaching,⁴⁴ the temporal varia-
298 tion of the signal from each pixel is

$$F^c(x, y, t) = F^{c,0}(x, y) + \beta F^{c,1}(x, y) \sin(\omega t + \varphi^c + \phi) \quad (12)$$

299 with the angle ϕ reflecting the fact that the present setup does not
300 allow us to precisely phase CCD recording and Joule heating.
301 After $Z_A^{c,0}$ and $Z_A^{c,1}$ are introduced as⁴⁵

$$Z_A^{c,0} = Q_{A_1}^c \frac{1}{(1 + K_A^0)} + Q_{A_2}^c \frac{K_A^0}{(1 + K_A^0)} \quad (13)$$

$$Z_A^{c,1} = \left(Q_{A_2}^c - Q_{A_1}^c \right) \frac{\Delta_A H}{RT_0} \frac{K_A^0}{(1 + K_A^0)^2} \frac{1}{\sqrt{1 + (\tau_A^0 \omega)^2}} \quad (14)$$

302 the other terms of eq 12 are given by

$$F^{c,0}(x, y) = E(x, y) C^c(x, y) Z_A^{c,0} A \quad (15)$$

$$F^{c,1}(x, y) = E(x, y) C^c(x, y) Z_A^{c,1} A \quad (16)$$

$$\varphi^c = -\arctan(\tau^0 \omega) \quad (17)$$

304 In practice, video acquisition speed is restricted only by the
305 frequency of the camera: $f_{\text{video}} = 30.1$ and 36 Hz for the present
306 BM-141 GE and Luca-R models, respectively. However, we
307 chose to transfer at a constant rate only $2n$ frames per tempera-
308 ture oscillation, thus limiting the amount of data to be subse-
309 quently processed. For $\omega/2\pi \leq 0.375$ Hz, we typically set n at 8 ,
310 yet its value had to be lowered in the case of faster modulations
311 (for instance, down to 4 at $\omega_{\text{res}}^{\text{res}}/2\pi = 3.76$ Hz). Furthermore, to
312 improve the signal-to-noise ratio, recording was carried on over
313 several periods; the number of collected images was ~ 250 for
314 relaxation time measurements and ~ 5000 for quadrature detec-
315 tion. All the frames having the same index modulus $2n$ were next
316 averaged together to yield a single oscillation-long movie. There-
317 fore, thanks to eq 12, the intensity profile corresponding to the
318 k th image is now given by

$$F^c(x, y, k) = F^{c,0}(x, y) + \beta F^{c,1}(x, y) \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \varphi^c + \phi\right) \quad (18)$$

319 Incidentally, because an even number of images was regularly
320 sampled over a period, one also has $\langle F^c(x, y, k) \rangle_k = F^{c,0}(x, y)$.

321 Using such a data collection protocol implied two experi-
322 mental constraints. First, the camera and the temperature
323 excitation frequencies had to be commensurable. More precisely,
324 with an image pickup rate of $1/p$, two successive acquisitions
325 were separated by a time lapse of p/f_{video} seconds. Thus, as $2n$
326 video frames were transferred per period of $2\pi/\omega$ seconds, it
327 resulted in $\omega = \pi f_{\text{video}}/np$. The values accessible for the heating
328 pulsation were in limited number and the function generator that

drove the current flowing through the ITO resistor then had to
be tuned accordingly. The second constraint was for the acquisi-
tion system to be able to collect and process a large number of
video frames. We here relied on a homemade electronic setup,
associated with a dedicated program written in C, to sort and
average in real time the images sent by the CCD camera.

Relaxation Time Measurement. The $A_{t1} + P \rightleftharpoons A_{t2}$ dy-
namics was investigated by studying how a mixture of the
corresponding molecules responds to small temperature oscilla-
tions. As we worked with an excess of probe,⁴⁶ the fluorescence
signal collected in the green channel of the microscope, $F^g(x, y, k)$,
thus obeyed the expressions derived for a two-state isomeriza-
tion, that is, eqs 12–18. In this experiment, artifacts related to
thermal transfer caused us to also introduce in solution the
molecular thermometer M (vide infra). It then provided in the
red video channel a response, $F^r(x, y, k)$, that similarly follows eqs
(12–18).

Renormalizing the one-period-long movies by $\langle F^c(x, y, k) \rangle_k$
first enabled us to correct them from defects associated with
inhomogeneous illumination and photon collection.

$$F_{\text{norm}}^c(k) = 1 + \beta \frac{Z_A^{c,1}}{Z_A^{c,0}} \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \varphi^c + \phi\right) \quad (19)$$

Spatial averaging over a 125×150 pixels area resulted in two
curves that could subsequently be fitted to sinusoids in order to
provide the $\beta Z_A^{c,1}/Z_A^{c,0}$ amplitudes (Figure 2S, Supporting In-
formation). Next, to get rid of the experimental bias linked to the
variation of β with ω , we computed $\rho^{g/r}$ as the ratio between the
green and red modulation depths: $\rho^{g/r} = (\beta Z_{\text{F}}^{g,1}/Z_{\text{F}}^{g,0})/(\beta Z_{\text{M}}^{r,1}/Z_{\text{M}}^{r,0})$.
Indeed, this operation allowed us to obtain a function whose
dependence on the angular frequency is contained only in a
 $1/[1 + (\tau_A^0 \omega)^2]^{1/2}$ term (see Supporting Information). Finally,
the relaxation time τ_A^0 was easily extracted by fitting the $\rho^{g/r}(\omega)$
transfer function (Figure 4b).

Quadrature Imaging. For the titration, the red-emitting
molecular thermometer M was still added to the green-emitting
sample to be analyzed. It therefore permitted access to the phase
 ϕ in a distinct color channel.

Adding the fluorescence issued from the various A_{ij} species
yields an oscillating signal, $F^g(x, y, k)$, whose amplitude in
quadrature, $\beta F^g \cos(x, y)$, is proportional to the sum of all the
individual out-of-phase contributions, $(Q_{A_1}^g - Q_{A_2}^g) A_{ij} \cos(x, y)$. To
emphasize A_{t1}^{cos} , we demodulated a one-period-long movie with
a $-\pi/2$ phase delay.^{24,25} More specifically, we first subtracted
 $\langle F^g(x, y, k) \rangle_k$ to the entire video. Then, we divided the resulting
frames by a flat-field one, $F^g_{\text{ff}}(x, y)$, in order to correct them from
optical artifacts; see Supporting Information for details. Finally,
each image was multiplied by $\sin[(k\pi/n) + \phi - (\pi/2)]$ and the
whole movie was averaged to give

$$F_{\text{quad}}^g(x, y) \propto \sum_i (Q_{A_2}^g - Q_{A_1}^g) A_{ij}^{\text{cos}}(x, y) \quad (20)$$

Under the assumptions of similar concentrations, standard
enthalpies of reaction, and brightness differences for all the
reactive couples, the previous equation could further be trans-
formed in $F_{\text{quad}}^g(x, y) \propto A_{t1}^{\text{cos}}(x, y)$. Indeed, resonance conditions
had been selected to selectively stress on $\{A_{t1}, A_{t2}\}$ and the
interfering species were here such that $A_{ij}^{\text{cos}}(x, y)$ was vanishing
for $l \neq t$. Each pixel of the image then exhibited an intensity
directly proportional to the A_t concentration and an absolute

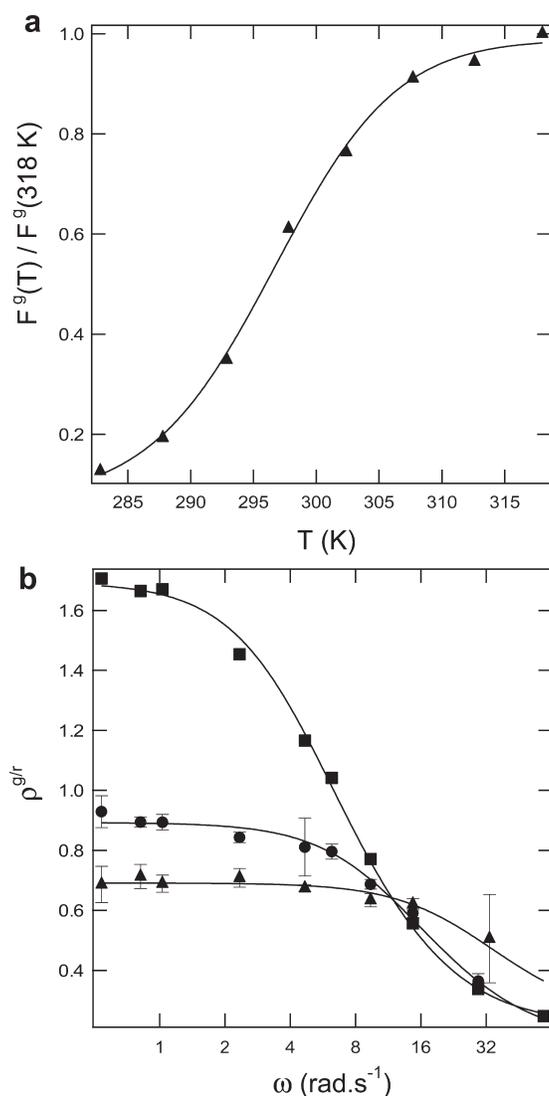


Figure 4. Thermokinetic characterization of the hybridization reaction between the A_{t1} target and the P probe. The fluorescence signal was collected in the green channel of the dual-view setup ($\lambda_{\text{exc}} = 479 \pm 19$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525 \pm 15$ nm) and measurements were performed on a solution obtained by mixing A_{t1} at $1 \mu\text{M}$ and P at $3 \mu\text{M}$ in $1.25 \text{ mM Mg}(\text{OH})_2$, 25 mM NaOH , and 55 mM Hepes buffer, pH 7.5 at 20°C , supplemented with 0.1% PDMA. (a) Temperature dependence of the fluorescence emission after normalization by its value at 318 K . (\blacktriangle) Experimental data; (—) fit to eqs 21 and 22. (b) Dependence on the angular frequency of ρ^{gr} , the ratio between the amplitudes of the green and red fluorescence signal modulations. M was here added in solution at $2 \mu\text{M}$ for normalization purposes and its emission was acquired in the red channel of the microscope ($\lambda_{\text{exc}} = 585 \pm 14$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 628 \pm 16$ nm). Symbols correspond to the experimental points collected at various T_0 : (\blacksquare) 296 K , (\bullet) 301 K , and (\blacktriangle) 306 K . Solid lines are fits to $\propto 1/[1 + (\tau_t^0 \omega)^2]^{1/2}$.

383 estimate for the latter could be obtained by relying on the channel 4
 F5 384 calibration standard (Figure 5).
 385 **Thermodynamic Parameters Measurement.** The standard
 386 enthalpy and entropy of hybridization between the target and

its probe, $\Delta_t H^{\text{P}}$ and $\Delta_t S^{\text{P}}$, were determined via a thermal
 denaturation experiment in which the temperature of the
 microscope stage was ramped from 10 to 45°C and the green
 fluorescence emission from an $A_{t1} + \text{P}$ mixture was accordingly
 recorded. The two species being at respective initial concentra-
 tions A_t and yA_t , one can solve the mass action equation to
 obtain

$$\frac{F^8(T)}{F^8(318 \text{ K})} = 1 + \left(\frac{Q_2^8}{Q_1^8} - 1 \right) \frac{[(y+1)K_t^{\text{P}} A_t + 1] - \sqrt{[(y+1)K_t^{\text{P}} A_t + 1]^2 - 4y(K_t^{\text{P}} A_t)^2}}{2K_t^{\text{P}} A_t} \quad (21)$$

The signal was here normalized by its value at 318 K where no
 A_2 is present (see Supporting Information). In the latter
 equation K_t^{P} is the $A_{t1} + \text{P} \rightleftharpoons A_{t2}$ equilibrium constant:

$$K_t^{\text{P}} = \exp\left(\frac{-\Delta_t H^{\text{P}} - T \Delta_t S^{\text{P}}}{RT} \right) \quad (22)$$

Consequently, fitting the experimental data yielded the two
 sought-for thermodynamic parameters (Figure 4a).

RESULTS AND DISCUSSION

To experimentally evaluate the “temperature modulation and
 quadrature detection” approach for detection in a mixture, we
 chose to selectively titrate a fluorescent oligonucleotide using a
 hybridization reaction, this analysis being performed in the
 presence of other compounds similarly labeled. More precisely,
 we targeted a rhodamine green-conjugated sequence, A_{t1} , which
 forms a much less fluorescent duplex, A_{t2} , with the unlabeled
 probe, P. As putative interfering species, we adopted two green-
 emitting oligonucleotides: A_{NR} , a labeled poly(thymidine) strand
 that can be considered as a representative nonreactive sequence,
 and A_{MB} , a molecular beacon presently envisaged as a reagent
 engaged in an exchange faster than the targeted one, that also
 yields a paired structure with a similar stability. Indeed, in the
 considered temperature range the opening–closing relaxation
 time of the latter species, τ_{MB}^0 , has been measured below 1 ms ⁴²
 and its equilibrium constant, K_{MB}^0 , lies between 0.5 and 5 .⁴⁷ As we
 will see in the following, when P varies between 3 and $7 \mu\text{M}$, the
 corresponding values for the probe–target couple are $\tau_t^0 \sim 30$ –
 300 ms and $K_t^0 \sim 0.3$ – 6 (see Table 2S in the Supporting
 Information).

The samples to be analyzed were injected in the PDMS
 channels, $35 \mu\text{m}$ wide and $10 \mu\text{m}$ high, of a dedicated device
 (Figure 3).³⁵ Although thermal excitation can be obtained by IR
 laser heating,^{26,34} we here relied on the Joule effect^{36,37} since
 adequate resistor design easily allows one to both vary and monitor
 the temperature at the second time scale.^{35,48} Moreover, as heat is
 dissipated in a transparent ITO film (a $340 \mu\text{m}$ large square
 feature microfabricated on the bottom glass substrate), our chip
 is fully compatible with epifluorescence imaging. Using a dual-
 view optical setup,⁴⁹ we could selectively titrate green-labeled
 species while mapping the temperature field with M, a red-emitting
 molecular thermometer that was designed after the previously
 published MB⁴² and that responds instantaneously to any of the
 thermal excitations applied in the present work. The average
 temperature as well as the oscillation amplitude and phase were
 proved uniform over the $100 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ observation area

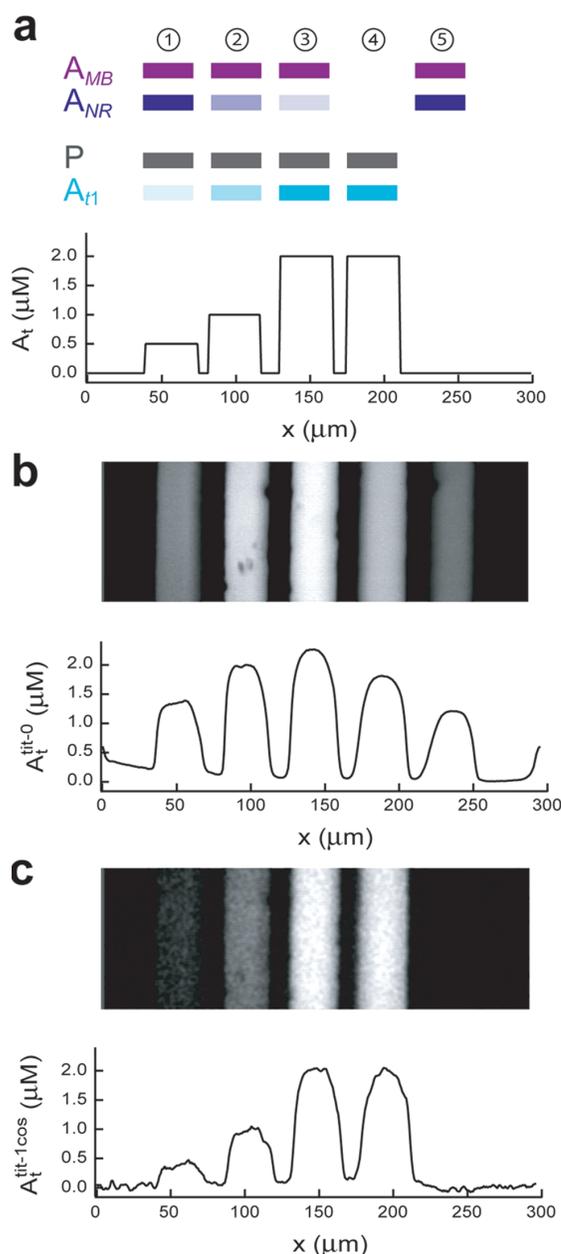


Figure 5. Titration of the A_{t1} target by the P probe in a mixture containing two interfering compounds, the nonreactive A_{NR} and the fast-exchanging A_{MB} . (a) Schematic representation of the various samples' initial composition and corresponding A_t profile; the complete set of concentration values is available in Table 3S in the Supporting Information. (b) Fluorescence emission at equilibrium at $T_0 = 306$ K and corresponding $A_t^{\text{tit-0}}$ trace. (c) Amplitude of the out-of-phase response upon harmonic forcing around T_0 and corresponding $A_t^{\text{tit-1cos}}$ trace. The temperature oscillations amplitude at $\omega_t^{\text{res}} = 23.65 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ was $\beta T_0 = 0.6$ K and the probe concentration was $P_t^{\text{res}} = 7 \mu\text{M}$. Samples were prepared in 1.25 mM $\text{Mg}(\text{OH})_2$, 25 mM NaOH, and 55 mM Hepes buffer, pH 7.5 at 20 °C, supplemented with 0.2% PDMA. Traces were computed by signal averaging along the image vertical axis and normalization by the channel 4 result.

(Figure 4S, Supporting Information), demonstrating that thermal transfer can be satisfactorily engineered when this kind of resistive element is utilized in combination with a holder acting as a heat reservoir.

We first performed a series of preliminary measurements devoted to identify the resonance conditions associated with the $A_{t1} + P \rightleftharpoons A_{t2}$ titration. In fact, in the context of a bimolecular reaction and according to the criteria given in eq 7, we had to look for an angular frequency and a probe concentration that respectively verify $\omega_t^{\text{res}} = 1/\tau_t^0$ and $P_t^{\text{res}} = 1/K_t^{P,0}$, where $K_t^{P,0}$ is the pairing equilibrium constant at T_0 . By employment of the microscope and its thermostated stage, the standard enthalpy $\Delta_t H^P$ and entropy $\Delta_t S^P$ of hybridization were extracted from the temperature dependence of the fluorescence issued from a solution containing the investigated complementary strands (Figure 4a). In 1.25 mM $\text{Mg}(\text{OH})_2$, 25 mM NaOH, and 55 mM Hepes buffer, pH 7.5 at 20 °C and 0.1% PDMA, we derived $\Delta_t H^P = -170 \pm 20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta_t S^P = -460 \pm 60 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ between 283 and 318 K. Since $K_t^P = \exp[-(\Delta_t H^P - T\Delta_t S^P)/RT]$, these two thermodynamic parameters provide hybridization constants in the 10^5 – 10^6 range. Incidentally, from the same experiment we also retrieved the relative brightness of the duplex with respect to the oligonucleotide: $Q_{\text{F}_2}^0/Q_{\text{F}_1}^0 = 0.12 \pm 0.02$. In a second step, we determined the corresponding association and dissociation rate constants by studying the response to a modulated temperature excitation of a $A_{t1} + P$ solution.^{22,23,26,34} We relied on the microheater to generate a harmonic forcing of weak amplitude ($\beta = 0.002$ – 0.008) with ω between 0.54 and $59 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$. After fluorescence signal oscillations at various pulsations were recorded (Figure 2S, Supporting Information), the relaxation time τ_t^0 was extracted from fitting the amplitude of the chemical system transfer function plotted in the frequency domain (Figure 4b). As $K_t^{P,0}$ could be derived from the results of the previous denaturation experiment, $k_{+t}^{P,0}$ and k_{-t}^0 were next simply computed thanks to $K_t^{P,0} = k_{+t}^{P,0}/k_{-t}^0$ and $\tau_t^0 = 1/(k_{+t}^{P,0}P + k_{-t}^0)$. The whole process was iterated at different average temperatures T_0 , and the data were subsequently analyzed according to the Arrhenius law (Table 2S and Figure 3S, Supporting Information). In the 295–305 K range, τ_t^0 varies between 0.04 and 0.2 s and we found the following values for the activation energies and for the logarithms of the pre-exponential factors: $E_{+t} = 48 \pm 11 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $E_{-t} = 218 \pm 11 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\ln r_{+t}^P = 33.4 \pm 4.4$, and $\ln r_{-t} = 88.7 \pm 4.4$. Now equipped with eq 7 and all the necessary kinetic parameters, we could look for conditions enabling the selective detection of A_{t1} . For various T_0 , we estimated the resonant complementary strand concentration and excitation pulsation using $P_t^{\text{res}} = k_{-t}^0/K_t^{P,0}$ and $\omega_t^{\text{res}} = k_{+t}^{P,0}P_t^{\text{res}} + k_{-t}^0$, respectively. Thereafter, we selected an average temperature that results in a large enough excess of probe with respect to the species to be titrated and in an angular frequency accessible to our experimental setup. At $T_0 = 306$ K, we could satisfactorily work with $P_t^{\text{res}} = 7 \mu\text{M}$ and $\omega_t^{\text{res}} = 23.65 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$.⁵⁰

Figure 5a presents the different mixtures we injected in the microfluidic chip. Channels 1–3 contained increasing concentrations of the A_{t1} target, from 0.5 to $2 \mu\text{M}$, at constant resonant concentration in the P complementary strand, $7 \mu\text{M}$ here. We also added in these solutions the two interfering compounds, the A_{NR} nonreactive sequence and the A_{MB} fast-exchanging beacon (their concentrations were in the micromolar range). In channel 4, we introduced the sole A_{t1} at $2 \mu\text{M}$ and P at $7 \mu\text{M}$. In particular, this mixture was prepared to subsequently serve as a calibration standard, allowing the conversion into concentrations of the

436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497

498 channels 1–3 responses. Yet we filled channel 5 with A_{NR} and
499 A_{MB} only, in order to control the selectivity of our protocol.
500 Importantly, we supplemented sample 4 with $2\ \mu\text{M}$ of the red-
501 emitting molecular beacon M to monitor the amplitude and
502 phase of the temperature modulation.

503 The titration experiment was performed at $T_0 = 306\ \text{K}$ and
504 with a $\beta = 0.002$ thermal forcing at angular frequency 23.65
505 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. Using a camera synchronized to the current generator,
506 we recorded the fluorescence intensity variations in both green
507 and red colors during 625 oscillations (166 s). Then, we
508 converted the collected movie in a one-period-long video. First,
509 complete time-averaging of the latter yielded the green image
510 displayed in Figure 5b. It corresponds to the result that would be
511 obtained without any thermal modulation, that is, when an
512 equilibrium titration is performed at constant temperature T_0
513 (see Experimental Section). As expected from the close amounts
514 of fluorescent label in solution, the emissions from the five
515 channels were nearly similar. Furthermore, the extracted $A_t^{\text{titr-0}}$
516 values were clearly larger than the various target concentrations
517 A_t . Subsequently, taking advantage of the knowledge of the
518 temperature phase measured on the red image and relying on a
519 phase-sensitive detection scheme,^{23–25,51,52} we extracted for
520 each pixel the amplitude of the green fluorescence oscillations
521 in quadrature with the thermal excitation (see Experimental
522 Section).⁵³ As shown in Figure 5c, the out-of-phase responses
523 arising from the five channels were now different. The signal from
524 sample 5, which did not include the sought-for reactant, was
525 completely extinguished. This observation agreed with the
526 identical responses from channels 3 and 4, which contained the
527 same amount of $A_{t1} + P$ but with and without interfering
528 compounds. In addition, the signal increased from samples 1
529 to 3, in line with the A_{t1} concentration variation. Thanks to the
530 channel 4 standard, these data could even be quantitatively
531 analyzed: we titrated 0.38 ± 0.1 , 0.95 ± 0.1 , and $2.03 \pm 0.1\ \mu\text{M}$
532 in target whereas 0.5, 1, and $2\ \mu\text{M}$ had been introduced in solution.⁵⁴
533 Thus, the “temperature modulation and quadrature detection”
534 protocol completely eliminated the contribution of the nonre-
535 sonant species: in marked contrast with the results obtained
536 upon titration at chemical equilibrium, it led to $A_t^{\text{titr-1cos}} \approx A_t$.

537 ■ CONCLUSIONS

538 Acquiring with a $\pi/2$ phase delay the signal originating from a
539 mixture of two-state exchanging reactants submitted to a periodic
540 thermal excitation allows one to discriminate—without any
541 separation or washing step—a species of interest among various
542 interfering compounds. Application to titration of what can be
543 considered as a “thermokinetic band-pass filter” holds promises
544 for selective and quantitative analyses. This approach has here
545 been demonstrated by use of fluorescent microscopy, but it is
546 generic. Whatever the observable (e.g., UV–vis or IR absor-
547 bance, refractive index), both limit-of-detection and dynamic
548 range are at least the ones of the considered spectroscopy.
549 Moreover, the present strategy will certainly be valuable when
550 one has to look for minor components, a situation often
551 encountered in biology.^{1,5,11} Resonant conditions are robust
552 and easy to achieve as far as in vitro assays are concerned. In
553 particular, an implementation to sensors and microarrays could
554 particularly benefit the development of label-free detection
555 techniques, the latter being presently hampered by experimental
556 drifts and by a lack of selectivity with respect to nonspecifically
557 adsorbed species.^{12,14,27} Finally, compatibility with optical

microscopy might be profitable in cell imaging, where contrast
maps based on some specific biomolecule concentration should
help to investigate reaction networks in vivo.

■ ASSOCIATED CONTENT

561 **S Supporting Information.** Four figures, three tables, and
562 additional text and equations describing response of a two-state
563 exchanging reactant submitted to a temperature modulation;
564 measurement of thermodynamic parameters $\Delta_t H^P$ and $\Delta_t S^P$;
565 measurement of relaxation time τ_t^0 and associated kinetic para-
566 meters; quadrature imaging; and temperature mapping with the
567 molecular thermometer M. This material is available free of
568 charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.
569

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

571 * E-mail: Thomas.Lesaux@ens.fr (T.L.); anle@lptmc.jussieu.fr
572 (A.L.); charlie.gosse@lpn.cnrs.fr (C.G.); Ludovic.Jullien@ens.fr
573 (L.J.).
574

■ ACKNOWLEDGMENT

575 This work was supported by two research fellowships from the
576 Ministère de la Recherche et de la Technologie (to H.B. and
577 E.C.) as well as Grants “T-Wave” from the ANR blanche 2006
578 program and “T-ModSync” from the Cnano IdF 2008 program.
579 We thank the LPN clean room and workshop staff for technical
580 assistance.
581

■ REFERENCES

- 582 (1) Anderson, N. L.; Norman, N. G. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*,
583 845–867.
- (2) Gingeras, T. R.; Higuchi, R.; Kricka, L. J.; Lo, Y. M. D.; Wittwer,
584 C. T. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 661–671.
- (3) *Modern Methods of Drug Discovery*; Hillisch, A., Hilgenfeld, R.,
585 Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 2003.
- (4) Velculescu, V. E.; Zhang, L.; Zhou, W.; Vogelstein, J.; Basrai,
586 M. A.; Bassett, D. E., Jr.; Hieter, P.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. *Cell*
587 **1997**, *88*, 243–251.
- (5) Holland, M. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14363–14366.
- (6) *Proteome Research*, 2nd ed.; Wilkins, M. R., Appel, R. D.,
588 Williams, K. L., Hochstrasser, D. F., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 2007.
- (7) Noda, I.; Ozaki, Y. *Two-Dimensional Spectroscopy: Applications in*
589 *Vibrational and Optical Spectroscopy*; Wiley: Chichester, U.K., 2004.
- (8) Muller, M.; Buchet, R.; Fringeli, U. P. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*,
590 10810–10825.
- (9) de Jong, L. A. A.; Uges, D. R. A.; Franke, J. P.; Bischoff, R.
591 *J. Chromatogr. B* **2005**, *829*, 1–25.
- (10) Sassolas, A.; Beca-Bouvier, B. D.; Blum, L. J. *Chem. Rev.* **2008**,
592 108, 109–139.
- (11) Draghici, S.; Khatri, P.; Eklund, A. C.; Szallasi, Z. *Trends Genet.*
593 **2006**, *22*, 101–109.
- (12) Ramachandran, N.; Larson, D. N.; Strak, P. R. H.; Hainsworth,
594 E.; LaBaer, J. *FEBS J.* **2005**, *272*, 5412–5425.
- (13) Ma, H.; Horiuchi, K. Y. *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 661–
595 668.
- (14) Bally, M.; Halter, M.; Vörös, J.; Grandin, H. M. *Surf. Interface*
596 *Anal.* **2006**, *38*, 1442–1458.
- (15) Eads, B.; Cash, A.; Bogart, K.; Costello, J.; Andrews, J. *Methods*
597 *Enzymol.* **2006**, *411*, 34–49.
- (16) Winkler-Oswatitsch, R.; Eigen, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1979**,
598 18, 20–49.

- (17) Jullien, L.; Lemarchand, A.; Lemarchand, H. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 8293–8301.
- (18) Alcor, D.; Croquette, V.; Jullien, L.; Lemarchand, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8276–8280.
- (19) Alcor, D.; Allemand, J.-F.; Cogné-Laage, E.; Croquette, V.; Ferrage, F.; Jullien, L.; Kononov, A.; Lemarchand, A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 1318–1328.
- (20) Lemarchand, A.; Jullien, L. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5770–5776.
- (21) Berthoumieux, H.; Jullien, L.; Lemarchand, A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2045–2051.
- (22) Eigen, M.; de Mayer, L. In *Relaxation Methods in Techniques of Organic Chemistry*, 2nd ed.; Friess, S. L., Lewis, E. S., Weissberger, A., Eds.; Wiley: New York, 1963; Vol. 8, Part 2, pp 895–1054.
- (23) Fringeli, U. P.; Baurecht, D.; Günthard, H. H. In *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*; Gremlich, H.-U., Yan, B., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2000; pp 143–191.
- (24) Baurecht, D.; Fringeli, U. P. *Rev. Sci. Instrum.* **2001**, *72*, 3782–3792.
- (25) Urakawa, A.; Bürgi, T.; Baiker, A. *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63*, 4902–4909.
- (26) Braun, D.; Libchaber, A. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 5554–5556.
- (27) Williams, L. D.; Ghosh, T.; Mastrangelo, C. H. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6025–6031.
- (28) Berthoumieux, H.; Jullien, L.; Lemarchand, A. *Phys. Rev. E* **2007**, *76*, No. 056112.
- (29) Berthoumieux, H.; Antoine, C.; Lemarchand, A. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, No. 084106.
- (30) Berthoumieux, H.; Antoine, C.; Jullien, L.; Lemarchand, A. *Phys. Rev. E* **2009**, *79*, No. 021906.
- (31) SantaLucia, J.; Allawi, H. T.; Seneviratne, P. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3552–3562.
- (32) Strazewski, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *124*, 3546–3554.
- (33) Weber, P. C.; Salemme, F. R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 115–121.
- (34) Schoen, I.; Krammer, H.; Braun, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 21649–21654.
- (35) Barilero, T.; Chapuis, P.-O.; Pujade, D.; Guilet, S.; Croquette, V.; Jullien, L.; Volz, S.; Gosse, C. Digest of the Technical Papers, Transducers '07 & Eurosensors XXI: 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Lyon, France, June 10–14, 2007; pp U933–U934.
- (36) Verpoorte, E.; de Rooij, N. F. *Proc. IEEE* **2003**, *91*, 930–953.
- (37) Gosse, C.; Bergaud, C.; Löw, P. In *Thermal Nanosystems and Nanomaterials*; Volz, S., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2009; pp 301–341.
- (38) Kato, H.; Nishizaka, T.; Iga, T.; Kinoshita, K.; Ishiwata, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9602–9606.
- (39) Hamad-Schifferli, K.; Schwartz, J. J.; Santos, A. T.; Zhang, S.; Jacobson, J. M. *Nature* **2002**, *415*, 152–155.
- (40) Stehr, J.; Hrelescu, C.; Sperling, R. A.; Raschke, G.; Wunderlich, M.; Nichtl, A.; Heindl, D.; Kürzinger, K.; Parak, W. J.; Klar, T. A.; Feldmann, J. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 619–623.
- (41) Actually, discrimination between two-state exchanging reactants is nearly impossible if the response exhibits no absolute extremum. Such a situation is encountered, for instance, when one considers the in-phase term A_1^{sin} , the equilibrium one A_1^0 , as well as the amplitude $A_1^{\text{I}} = (A_1^{\text{sin}2} + A_1^{\text{cos}2})^{1/2}$ and phase $\varphi = -\arctan(\tau^0\omega)$ of the concentration modulation (see Figure 1a and Figure 1S in the Supporting Information).
- (42) Barilero, T.; Le Saux, T.; Gosse, C.; Jullien, L. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7988–8000.
- (43) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley–VCH, Weinheim, Germany, 2002.
- (44) We did not notice any significant decrease in the amplitude of the fluorescent oscillations during the course of the measurements. The photochemical half-life associated with the present illumination settings and the present chromophores is thus several times larger than the duration of our longest acquisition, that is, ~ 390 s.
- (45) Contrary to what has been done for the sake of readability in the Theory section, we here clearly indicate with a subscript A that the thermokinetic parameters are the ones associated with the $A_1 \rightleftharpoons A_2$ reaction. More concise notations will be adopted when several $\{A_{1i}, A_{2i}\}$ reactive couples will be mixed together. For instance, Z_i^0 will be used instead of Z_{Ai}^0 and Q_{i1} instead of Q_{Ai1} .
- (46) Although P is here introduced at a concentration just 3 times higher than A_{1i} , the “large excess” assumption holds because it yields no significant discrepancy with respect to the exact τ_i^0 computation. More precisely, the present simplification, that is, $\tau_i^0 = 1/(k_{+i}^0 P + k_{-i}^0)$ with $P = 3 \mu\text{M}$, introduces a systematic error that has been estimated to be less than $\sim 5\%$; conversely, uncertainties on experimental data can be up to 20% (see Table 2S in the Supporting Information for examples).
- (47) This estimate is based on $\Delta_{\text{MB}}H = -136 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta_{\text{MB}}S = -450 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, values for the standard enthalpy and entropy of folding which are given in Barilero, T. *Imagerie de la Cinétique Chimique par Modulation de Température: Conception, Validation et Mise en Œuvre*. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2009.
- (48) Arata, H. F.; Rondelez, Y.; Noji, H.; Fujita, H. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4810–4814.
- (49) Kinoshita, K.; Itoh, H.; Ishiwata, S.; Hirano, K.; Nishizaka, T.; Hayakawa, T. *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 67–73.
- (50) These experimental conditions are not exactly equal to the resonance ones. Indeed, the kinetic data extracted from Figure 3S in the Supporting Information leads to $P_t^{\text{res}} = 1/K_t^{\text{P},0} = 10.2 \mu\text{M}$ and $\omega_t^{\text{res}} = 1/(k_{+t}^0 P_t^{\text{res}} + k_{-t}^0) = 37.72 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ at 306 K. Thus, rigorously, we should have used the latter probe concentration and excitation pulsation. However, only a limited number of frequencies are accessible to our video acquisition setup (see Experimental Section) and we were obliged to retain slightly different settings. Nevertheless, selective titration could be achieved thanks to the nonzero bandwidth of the filter function displayed in Figure 1b.
- (51) McGown, L.; Bright, F. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1400A–1417A.
- (52) Scofield, J. H. *Am. J. Phys.* **1994**, *62*, 129–133.
- (53) Phase-sensitive detection (PSD) is recognized to be a narrow-band technique allowing the elimination of noise at frequencies that are distinct from the excitation one.^{24–27} However, it is here implemented numerically by use of a limited sampling rate in the time domain; thus, we do not know to what extent we still benefit from the latter advantage. We are presently developing an analogical PSD relying on a modulated illumination, as described by Braun and Libchaber,²⁶ and we will therefore soon be able to compare the signal-to-noise ratios provided by both approaches.
- (54) The precision of the titration can be estimated by computing the standard deviation of the pixel intensity over the microfluidic channel surface. Even if values around $0.01 \mu\text{M}$ were found, we have decided to display 10 times larger error bars. Indeed, we noticed that sometimes measurement accuracy was degraded by experimental issues such as the presence of dust or imperfect matching between the titration image and the flat-field one.

2.3.4 Informations supplémentaires pour l'article "Temperature Modulation and Quadrature Detection for Selective Titration of Two-State Exchanging Reactants"

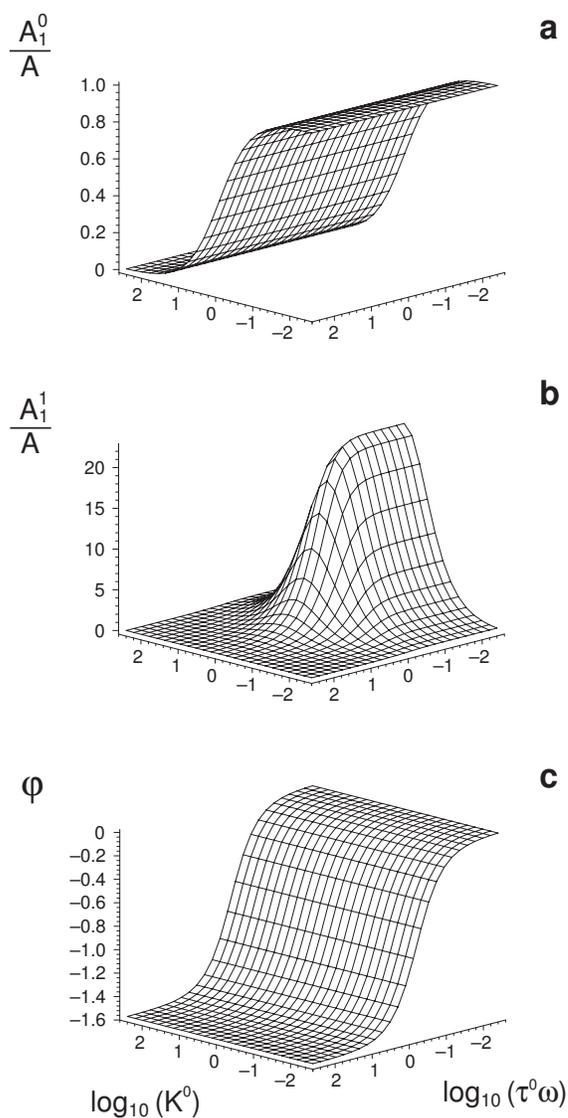


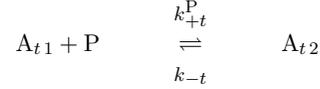
Figure 1S. Theoretical computation of the response of a two-state exchanging reactant $A_1 \rightleftharpoons A_2$ submitted to thermal harmonic forcing. For the A_1 species, the normalized equilibrium concentration, A_1^0/A , as well as the normalized amplitude and phase of the concentration oscillations, A_1^1/A and φ respectively, are plotted versus the equilibrium constant K^0 and the adimensional relaxation time $\tau^0\omega$ taking $\Delta H/RT_0 = -90$. Note that A_1^0/A does not depend on $\tau^0\omega$ and φ does not depend on K^0 – see the Main Text Eq. (4) and the Supporting Information Eqs. (1) and (2).

Table 1S. Theoretical computation of the response in quadrature of a two-state exchanging reactant $A_1 \rightleftharpoons A_2$ submitted to thermal harmonic forcing. The normalized amplitude of the out-of-phase oscillations in A_1 concentration, $-A_1^{1\cos}/A$, is calculated for various values of $(K^0, \tau^0\omega)$ taking $\Delta H/RT_0 = -90$ – see the Main Text Eq. (6). More precisely, this evaluation is given for $(10^{+m}, 10^{+m})$, $(10^{+m}, 1)$, and $(1, 10^{+m})$ with m between 0.5 and 5.0. Note that the expression of $-A_1^{1\cos}/A$ does not vary when $K^0 = 10^{+m}$ is changed for $K^0 = 10^{-m}$. A similar property also holds for $\tau^0\omega$. Therefore, the present data yield the quadrature response for all the $\{A_{\ell 1}, A_{\ell 2}\}$ described in Figure 2, i.e. the couples which $(K_\ell^0, \tau_\ell^0\omega)$ are placed on the outer nodes of 3×3 grids of center $(1, 1)$ and mesh size m , in decimal logarithmic units. Incidentally, the targeted species corresponds to $m = 0$.

m	$(10^{+m}, 10^{+m})$	$(10^{+m}, 1)$	$(1, 10^{+m})$
0.0	11.25	11.25	11.25
0.5	4.72	8.21	6.47
1.0	0.736	3.72	2.23
1.5	0.084	1.34	0.71
2.0	$9 \cdot 10^{-3}$	0.44	0.22
2.5	$9 \cdot 10^{-4}$	0.14	$7 \cdot 10^{-2}$
3.0	$9 \cdot 10^{-5}$	0.045	$2 \cdot 10^{-2}$
3.5	$9 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$7 \cdot 10^{-3}$
4.0	$9 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
4.5	$9 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$
5.0	$9 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$

Measurement of the Thermodynamic Parameters $\Delta_t H^P$ and $\Delta_t S^P$

The standard enthalpy and entropy of reaction were inferred from a thermal denaturation experiment where the extent of



was studied as a function of T . Practically, we recorded the Rhodamine Green fluorescence emission from a $A_{t1} + P$ solution while scanning the thermostated stage setting from 10 to 45 °C at ~ 0.5 °C/min. Following this protocol, the curves obtained while increasing and decreasing the temperature could be superimposed, proving that the data were collected under both thermal and thermodynamic equilibrium conditions.

Respectively denoting A_t and yA_t the total concentrations in the $A_{t1} + A_{t2}$ and $P + A_{t2}$ species, the equilibrium concentrations in the A_{t1} and P reactants and in the A_{t2} product obey

$$A_{t1} = A_t - \xi_t, \quad P = yA_t - \xi_t, \quad \text{and} \quad A_{t2} = \xi_t \quad (3)$$

with

$$\xi_t = \frac{[(y+1)K_t^P A_t + 1] - \sqrt{[(y+1)K_t^P A_t + 1]^2 - 4y(K_t^P A_t)^2}}{2K_t^P A_t} A_t. \quad (4)$$

K_t^P is here the equilibrium constant associated with the hybridization reaction: $K_t^P = k_{+t}^P/k_{-t}$. At T , it is also given by

$$K_t^P = \exp\left(-\frac{\Delta_t H^P - T\Delta_t S^P}{RT}\right), \quad (5)$$

where both the standard enthalpy and entropy of reaction, $\Delta_t H^P$ and $\Delta_t S^P$ respectively, are supposed to be constant over the considered temperature range.

The fluorescence signal collected on the green channel of the epifluorescence dual-view microscope originates from both the A_{t1} and A_{t2} species. According to the Main Text Eq. (10), one has

$$F^g(x, y, T) = E(x, y) C^g(x, y) \times [Q_{t1}^g A_{t1}(T) + Q_{t2}^g A_{t2}(T)]. \quad (6)$$

Next we introduce T_{ref} , a reference temperature above which one can consider that A_{t2} is absent from the mixture, so as to have $F^g(x, y, T_{ref}) = E(x, y) C^g(x, y) Q_{t1}^g A_t$. Therefore, normalizing the fluorescence emission at T by the one recorded at T_{ref} results in

$$\frac{F^g(x, y, T)}{F^g(x, y, T_{ref})} = 1 + \left(\frac{Q_{t2}^g}{Q_{t1}^g} - 1\right) \frac{A_{t2}(T)}{A_t}. \quad (7)$$

Figure 4a displays the A_{t2} duplex thermal denaturation curve acquired on our home-made microscope. The solution contained in the microsystem was homogeneously thermostated using the Peltier devices and, at each temperature T , the signal from 250 successive frames was accumulated. After normalization by the fluorescence image measured at $T_{ref} = 318$ K and spatial averaging over a 125×150

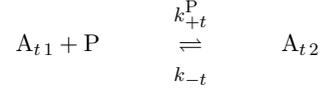
pixels window, it yielded $\langle F^g(x, y, T)/F^g(x, y, 318 \text{ K}) \rangle_{x,y}$. This data set, denoted $F^g(T)/F^g(318 \text{ K})$, was finally nonlinearly fitted using

$$\frac{F^g(T)}{F^g(318 \text{ K})} = 1 + \left(\frac{Q_{t2}^g}{Q_{t1}^g} - 1 \right) \frac{[(y+1)K_t^P A_t + 1] - \sqrt{[(y+1)K_t^P A_t + 1]^2 - 4y(K_t^P A_t)^2}}{2K_t^P A_t} \quad (8)$$

and the above Eq. (5): we extracted $\Delta_t H^P = -170 \pm 20 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta_t S^P = -460 \pm 60 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$, and $Q_{t2}^g/Q_{t1}^g = 0.12 \pm 0.02$.

Measurement of the Relaxation Time τ_t^0 and of the Associated Kinetic Parameters

The relaxation time associated with the hybridization reaction



can be determined at T_0 by submitting a mixture of A_{t1} , P, and A_{t2} to small temperature modulations, $\beta T_0 \sin(\omega t)$, and analyzing the amplitude of the resulting concentration oscillations as a function of the angular frequency ω [1, 2, 3, 4]. In our experiment, we relied on the microfabricated ITO resistor to thermally excite the sample and on the Rhodamine Green fluorescence emission to measure the extent of the pairing between the labeled oligonucleotide and its target.

Assuming that the reactant P is in excess with regard to A_{t1} and A_{t2} , the variation of the CCD signal intensity along the heating period is obtained by simple application of the Main Text Eqs. (12–17):

$$F^g(x, y, k) = F^{g,0}(x, y) + \beta \left[F^{g,1}(x, y) \sin \left(\frac{k\pi}{n} + \varphi^g + \phi \right) \right] \quad (9)$$

with

$$F_t^{g,0}(x, y) = E(x, y) C^g(x, y) \times \left(Q_{t1}^g \frac{1}{1 + K_t^0} + Q_{t2}^g \frac{K_t^0}{1 + K_t^0} \right) A_t \quad (10)$$

$$= E(x, y) C^g(x, y) \times Z_t^{g,0} A_t \quad (11)$$

$$F_t^{g,1}(x, y) = E(x, y) C^g(x, y) \times (Q_{t2}^g - Q_{t1}^g) \frac{\Delta_t H}{RT_0} \frac{K_t^0}{(1 + K_t^0)^2} \frac{1}{\sqrt{1 + (\tau_t^0 \omega)^2}} A_t \quad (12)$$

$$= E(x, y) C^g(x, y) \times Z_t^{g,1} A_t \quad (13)$$

$$\varphi^g = -\arctan(\tau_t^0 \omega). \quad (14)$$

Then, to correct these images from the various artefacts introduced by inhomogeneous illumination and inhomogeneous photon collection, the $F^g(x, y, k)$ are divided by $\langle F^g(x, y, k) \rangle_k$. As an even number of video frames has been regularly sampled over the temperature oscillation, we have $\langle F^g(x, y, k) \rangle_k = F^{g,0}(x, y)$ and consequently the normalized data obey

$$F_{norm}^g(x, y, k) = \frac{F^g(x, y, k)}{\langle F^g(x, y, k) \rangle_k} = 1 + \beta \frac{Z_t^{g,1}}{Z_t^{g,0}} \sin \left(\frac{k\pi}{n} + \varphi^g + \phi \right). \quad (15)$$

Thereafter, in order to improve the signal-to-noise ratio, spatial averaging is performed over a 125×150 pixels window. It yields the $\langle F_{norm}^g(x, y, k) \rangle_{x,y}$ curves, denoted $F_{norm}^g(k)$ in the following, from which sinusoidal fits provide $\beta Z_t^{g,1}/Z_t^{g,0}$ at various angular frequencies (Figure 2S). However, because β depends on ω , a second normalization step has to be undertaken before being able to extract the relaxation time τ_t^0 from the variation of the fluorescence modulation amplitude with the excitation pulsation.

To get rid of the β contribution to the observed signal, we mixed the red-emitting molecular thermometer M to the oligonucleotides solution under study. In fact, as this probe instantaneously reports on any temperature change in the investigated range of angular frequencies ($\tau_M^0 \simeq 0$), the information acquired in the red channel of the dual-view setup reveals the transfer function associated with the microsystem thermal response. More practically, implementing a data treatment procedure similar to the one described above leads to ¹

$$F_{norm}^r(k) = 1 + \beta \frac{Z_M^{r,1}}{Z_M^{r,0}} \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \phi\right) \quad (16)$$

with

$$Z_M^{r,0} = \left(Q_{M_1}^r \frac{1}{1 + K_M^0} + Q_{M_2}^r \frac{K_M^0}{1 + K_M^0} \right) \quad (17)$$

$$Z_M^{r,1} = (Q_{M_2}^r - Q_{M_1}^r) \frac{\Delta_M H}{RT_0} \frac{K_M^0}{(1 + K_M^0)^2} M. \quad (18)$$

Likewise, we can hence extract $\beta Z_M^{r,1}/Z_M^{r,0}$ from the oscillations of the fluorescence emitted by M (Figure 2S). Thereafter, the ratio of the green sinusoid amplitude to the red one, $\rho^{g/r}$, is computed. From the above Eqs. (10–13) and (17–18), it results in a function which dependence on ω is only included in the square root of a Lorentzian:

$$\rho^{g/r} = \frac{\beta Z_t^{g,1}/Z_t^{g,0}}{\beta Z_M^{r,1}/Z_M^{r,0}} \quad (19)$$

$$= \frac{(Q_{t2}^g - Q_{t1}^g)(Q_{M_1}^r + Q_{M_2}^r K_M^0)}{(Q_{M_2}^r - Q_{M_1}^r)(Q_{t1}^g + Q_{t2}^g K_t^0)} \times \frac{\Delta_t H}{\Delta_M H} \times \frac{K_t^0(1 + K_M^0)}{K_M^0(1 + K_t^0)} \times \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega\tau_t^0)^2}}. \quad (20)$$

Thus, appropriate fitting easily allowed us to retrieve τ_t^0 (see Figure 4b and Table 2S).

Finally, using the $\Delta_t H^P$ and $\Delta_t S^P$ values obtained from the thermal denaturation experiment, we are able to compute $K_t^{P,0}$ for the three T_0 temperatures at which the relaxation time was measured. Next, thanks to $K_t^{P,0} = k_{+t}^{P,0}/k_{-t}^0$ and $\tau_t^0 = 1/(k_{+t}^{P,0}P + k_{-t}^0)$ the corresponding $k_{+t}^{P,0}$ and k_{-t}^0 are calculated (Table 2S). As presented in Figure 3S, subsequent analysis according to the Arrhenius law provides the following values for the activation energies and for the logarithms of the pre-exponential factors: $E_{+t} = 48 \pm 11$ kJmol⁻¹, $E_{-t} = 218 \pm 11$ kJmol⁻¹, $\ln r_{+t}^P = 33.4 \pm 4.4$, and $\ln r_{-t} = 88.7 \pm 4.4$. It is worth noting that the present data enable to reevaluate the $k_{+t}^{P,0}$, k_{-t}^0 , and $K_t^{P,0}$ parameters; it gives estimates which are all within the error bars of the Table 2S results. Actually, one has $k_{+t}^{P,0} = 2.20 \cdot 10^6$ M⁻¹s⁻¹, $k_{-t}^0 = 22.35$ s⁻¹, and thereafter $K_t^{P,0} = 9.82 \cdot 10^4$ M⁻¹ at $T_0 = 306$ K. Furthermore, the difference between the extracted energies of activation, $E_{+t} - E_{-t} = -170 \pm 22$ kJmol⁻¹, is in good agreement with the standard enthalpy of reaction obtained by fitting the Figure 4a curve, $\Delta_t H^P = -170 \pm 20$ kJmol⁻¹.

¹A consistent nomenclature is used throughout the paper. M holds for M concentration, the index M identifies parameters characterizing the $M_1 \rightleftharpoons M_2$ reaction, and the index M_i report on properties of the M_i species.

Table 2S. Thermodynamic and kinetic parameters characterizing the pairing of A_{t1} with P. The hybridization thermodynamic constant $K_t^{P,0}$ (computed from the $\Delta_t H^P$ and $\Delta_t S^P$ values extracted from Figure 4a), the relaxation time τ_t^0 (as determined from the Figure 4b fits), as well as the corresponding association and dissociation rate constants, $k_{+t}^{P,0}$ and k_{-t}^0 respectively, are given at various temperatures T_0 . Measurements were performed in 1.25 mM $Mg(OH)_2$ 25 mM NaOH 55 mM HEPES buffer, pH 7.5 at 20 °C, supplemented with 0.1 % PDMA. The τ_t^0 values correspond to an excess concentration in probe set at $P = 3 \mu M$.

T_0 (K)	$K_t^{P,0}$ ($10^5 M^{-1}$)	τ_t^0 ($10^{-3} s$)	$k_{+t}^{P,0}$ ($10^6 M^{-1}s^{-1}$)	k_{-t}^0 (s^{-1})
296	9.37 ± 1.23	220 ± 20	1.12 ± 0.21	1.19 ± 0.16
301	2.97 ± 0.38	90 ± 15	1.75 ± 0.38	5.87 ± 1.04
306	0.98 ± 0.20	36 ± 8	2.10 ± 0.65	21.46 ± 4.88

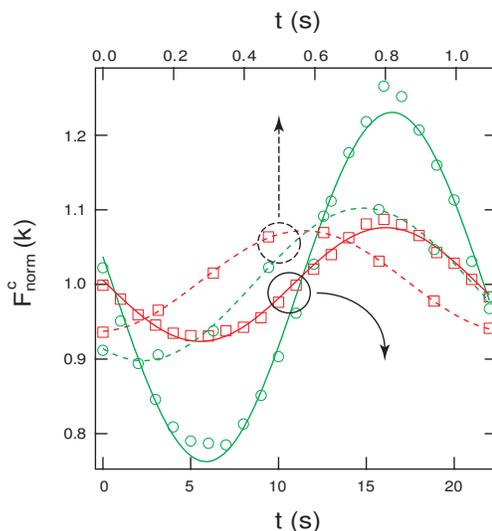


Figure 2S. Normalized oscillations of the fluorescence intensity obtained upon modulating the temperature of a solution containing A_{t1} and P at respective initial concentrations 1 and 3 μM , M at 2 μM . Green circles correspond to the Rhodamine Green emission, i.e. the $A_{t1} + P$ pairing reaction; red squares correspond to the Texas Red emission, i.e. the M folding. The data for two different excitation pulsations are presented: the solid fit-lines and the lower time scale hold for $\omega = 0.25 \text{ rad.s}^{-1}$ ($\beta T_0 = 2.4 \text{ K}$); the dashed fit-lines and the upper time scale hold for $\omega = 5.0 \text{ rad.s}^{-1}$ ($\beta T_0 = 0.7 \text{ K}$). This experiment was performed at $T_0 = 296 \text{ K}$ in 1.25 mM $Mg(OH)_2$ 25 mM NaOH 55 mM HEPES buffer, pH 7.5 at 20 °C, supplemented with 0.1 % PDMA. Measurements were acquired on the dual-view setup using band-pass filters such as $\lambda_{exc} = 479 \pm 19 \text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 525 \pm 15 \text{ nm}$ for the green color channel, $\lambda_{exc} = 585 \pm 14 \text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 628 \pm 16 \text{ nm}$ for the red one.

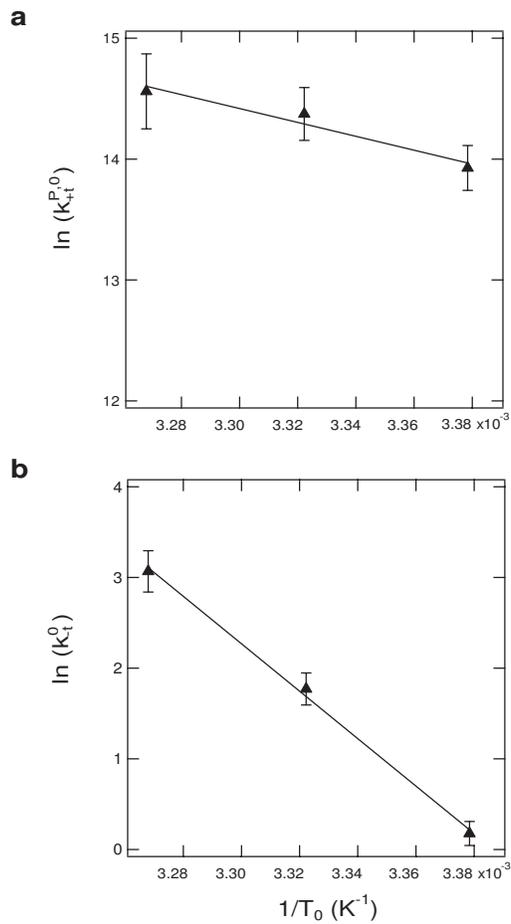


Figure 3S. Arrhenius plots for the $A_{t1} + P$ association and the A_{t2} dissociation. The respective rate constants, $k_{+t}^{P,0}$ and k_{-t}^0 , were computed using the $K_t^{P,0}$ and τ_t^0 values extracted from Figure 4 (see Table 2S).

Quadrature Imaging

For selective titration relying on temperature oscillations and out-of-phase detection, several green-emitting reactive couples $\{A_{\ell 1}, A_{\ell 2}\}$ were mixed in solution and injected in our analytical chip – the probe P, complementary to the targeted oligonucleotide, was introduced in excess, at the resonant concentration P_t^{res} . Then, the temperature of the samples was modulated at the resonant angular frequency ω_t^{res} and CCD images were processed as follows.

In this experiment, the temporal variation of the fluorescence signal is simply derived by considering that the various species contributions add to each other. From the Main Text Eqs. (3 – 6) and (12 – 17), we have

$$F^g(x, y, k) = F^{g,0}(x, y) + \beta \left[F^{g,1\sin}(x, y) \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \phi\right) + F^{g,1\cos}(x, y) \cos\left(\frac{k\pi}{n} + \phi\right) \right] \quad (21)$$

with

$$F^{g,0}(x, y) = E(x, y) C^g(x, y) \sum_{\ell} Z_{\ell}^{g,0} A_{\ell}(x, y) \quad (22)$$

$$F^{g,1\sin}(x, y) = E(x, y) C^g(x, y) \sum_{\ell} Z_{\ell}^{g,1\sin} A_{\ell}(x, y) \quad (23)$$

$$F^{g,1\cos}(x, y) = E(x, y) C^g(x, y) \sum_{\ell} Z_{\ell}^{g,1\cos} A_{\ell}(x, y) \quad (24)$$

and

$$Z_{\ell}^{g,0} = \left(Q_{\ell 1}^g \frac{1}{1 + K_{\ell}^0} + Q_{\ell 2}^g \frac{K_{\ell}^0}{1 + K_{\ell}^0} \right) \quad (25)$$

$$Z_{\ell}^{g,1\sin} = (Q_{\ell 2}^g - Q_{\ell 1}^g) \frac{\Delta_{\ell} H}{RT_0} \frac{K_{\ell}^0}{(1 + K_{\ell}^0)^2} \frac{1}{1 + (\tau_{\ell}^0 \omega)^2} \quad (26)$$

$$Z_{\ell}^{g,1\cos} = -(Q_{\ell 2}^g - Q_{\ell 1}^g) \frac{\Delta_{\ell} H}{RT_0} \frac{K_{\ell}^0}{(1 + K_{\ell}^0)^2} \frac{\tau_{\ell}^0 \omega}{1 + (\tau_{\ell}^0 \omega)^2}. \quad (27)$$

Note that A_{ℓ} here depends on x and y because different reactive mixtures have been introduced in the different microfluidic channels.

Acquisition in quadrature is subsequently achieved through phase sensitive detection [2, 5, 6, 7, 8]. The $\langle F^g(x, y, k) \rangle_k$ average signal, equal to $F^{g,0}(x, y)$, is first subtracted from all the $F^g(x, y, k)$. Second, to correct from spatial variations in illumination power and detection yield, we divide the obtained images by $F^{g,ff}(x, y) = E(x, y) C^g(x, y) Q_{\ell 1}^g A_{1,ff}$, a flat field profile acquired with a device filled with A_{t1} only, at the concentration $A_{1,ff}$, and with no thermal excitation applied. Third, to emphasize on the response out-of-phase with the temperature modulation, the resulting video frames are multiplied by $-\cos\left(\frac{k\pi}{n} + \phi\right)$ and averaged over the whole duration of the single period-long movie.² It gives³

$$F_{quad}^g(x, y) = - \left\langle \frac{F^g(x, y, k) - \langle F^g(x, y, k) \rangle_k}{F^{g,ff}(x, y)} \times \cos\left(\frac{k\pi}{n} + \phi\right) \right\rangle_k, \quad (28)$$

²As indicated in the Main Text, the phase lag ϕ was here determined thanks to the red-emitting and instantaneously responding molecular thermometer M.

³For display on Figure 5, we have performed a sliding spatial averaging over a 3×3 pixel area, in order to attenuate the noise that has been introduced by the numerous arithmetical constitutive operations of the data reduction process.

which further develops in

$$F_{quad}^g(x, y) = -\frac{\beta}{2 Q_{t1}^g A_{1,ff}} \times \left[\left\langle \sin \left(2 \frac{k\pi}{n} + 2\phi \right) \right\rangle_k \sum_{\ell} Z_{\ell}^{g,1sin} A_{\ell}(x, y) + \left\langle \cos \left(2 \frac{k\pi}{n} + 2\phi \right) + 1 \right\rangle_k \sum_{\ell} Z_{\ell}^{g,1cos} A_{\ell}(x, y) \right] \quad (29)$$

and finally

$$F_{quad}^g(x, y) = -\frac{\beta}{2 Q_{t1}^g A_{1,ff}} \sum_{\ell} Z_{\ell}^{g,1cos} A_{\ell}(x, y). \quad (30)$$

To retrieve the concentration in target present in each sample, we shall now take into account the resonant conditions that were selected for the contribution of $\{A_{t1}, A_{t2}\}$ to overcome the ones of the other couples – see the Main Text Eqs. (6) and (7). Under the assumption of unique $(Q_{\ell 2}^g - Q_{\ell 1}^g)$ and ΔH_{ℓ} values for all the $\{A_{\ell 1}, A_{\ell 2}\}$, and taking advantage of the fact that the concentrations in interfering species are within the same order of magnitude than A_t , the above Eq. (30) transforms in

$$F_{quad}^g(x, y) \approx \frac{\beta (Q_{t2}^g - Q_{t1}^g)}{16 Q_{t1}^g} \frac{\Delta_t H}{RT_0} \frac{A_t(x, y)}{A_{1,ff}}. \quad (31)$$

Eventually, relying on the calibration solution injected in channel 4, a good approximation for the $A_{t1} + A_{t2}$ concentration in channel j is provided by

$$A_t^{\text{tit-1cos}}(j) = \frac{\left\langle F_{quad}^g(x, y) \right\rangle_{x,y \in j}}{\left\langle F_{quad}^g(x, y) \right\rangle_{x,y \in 4}} A_t(4). \quad (32)$$

Spatial averaging over each channel surface is here undertaken to improve the signal-to-noise ratio, the precision of our measurement been given by the corresponding standard deviation.

Importantly, thanks to the standard our results are free of errors that could be attached to the experimental evaluation of parameters such as β , Q_{ti}^g , or $\Delta_t H$. It also allows us to bypass any of the problems that could be related to the use of conditions differing a little from the resonant ones – see the note (50) in the Main Text.

Table 3S. Species concentrations (μM) introduced in the various channels of the heating device in order to perform the titration experiments displayed on Figure 5.

Oligonucleotide	①	②	③	④	⑤
A_{MB}	1	1	1		1
A_{NR}	4	3	1		4.5
P	7	7	7	7	
A_{t1}	0.5	1	2	2	
M				2	

Temperature Mapping Using the Molecular Thermometer M

As explained in the Experimental Section, we relied on the red-emitting beacon to investigate the spatial homogeneity of the thermal excitation. Writing the Main Text Eq. (18) for M while presuming that the average temperature T_0 as well as the modulation parameters β and ϕ vary with x and y , we have

$$F^r(x, y, k) = F^{r,0}(x, y) + \beta(x, y) \left[F^{r,1}(x, y) \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \phi(x, y)\right) \right] \quad (33)$$

as an expression for the one period-long movie.

Then, each video frame is divided by $F_{ff}^r(x, y)$, a flat field profile that was recorded without any temperature oscillations, the microscope stage being thermostated at temperature T_{ff} :

$$F^{r,ff}(x, y) = E(x, y) C^r(x, y) Z_M^{r,ff} M_{ff} \quad (34)$$

with

$$Z_M^{r,ff} = \left(Q_{M_1}^r \frac{1}{1 + K_M(T_{ff})} + Q_{M_2}^r \frac{K_M(T_{ff})}{1 + K_M(T_{ff})} \right). \quad (35)$$

In the above expression, $Q_{M_i}^r$, K_M , and M_{ff} designate the respective brightnesses of the open and closed M_i states, the thermodynamic folding constant, and the overall M concentration. Interestingly, both T_{ff} and M_{ff} are homogeneous; therefore, the normalization allows us to correct the data from inhomogeneous illumination and inhomogeneous photon collection. It yields

$$\frac{F^r(x, y, k)}{F^{r,ff}(x, y)} = \frac{Z_M^{r,0}(x, y) M}{Z_M^{r,ff} M_{ff}} + \frac{\beta(x, y) Z_M^{r,1}(x, y) M}{Z_M^{r,ff} M_{ff}} \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \phi(x, y)\right) \quad (36)$$

where $Z_M^{r,0}$ and $Z_M^{r,1}$ possibly depend on space through the variation of K_M^0 with T_0 – see the Main Text Eqs. (13) and (14).

First, averaging of the latter images over the heating period results in

$$F_{T_0}^r(x, y) = \left\langle \frac{F^r(x, y, k)}{F^{r,ff}(x, y)} \right\rangle_k = \frac{Z_M^{r,0}(x, y) M}{Z_M^{r,ff} M_{ff}}. \quad (37)$$

From the similar $\langle F_{T_0}^r(x, y) \rangle_y$ values found for the five sample positions in Figure 4Sa, we can accordingly conclude that $Z_M^{r,0}$, and thus T_0 , are constant in space. Next, after having multiplied the ratio defined in the above Eq. (36) by two sinusoidal functions with arbitrary phases δ and δ' , we compute

$$F_\phi^r(x, y) = \frac{\left\langle \frac{F^r(x, y, k)}{F^{r,ff}(x, y)} \times \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \delta\right) \right\rangle_k}{\left\langle \frac{F^r(x, y, k)}{F^{r,ff}(x, y)} \times \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \delta'\right) \right\rangle_k} = \frac{\cos(\phi(x, y) - \delta)}{\cos(\phi(x, y) - \delta')}. \quad (38)$$

Once more, the nearly identical $\langle F_\phi^r(x, y) \rangle_y$ profiles obtained in the five channels imply no phase lag over the observation area (see Figure 4Sc). Finally, after having extracted ϕ as the delay associated with the $\langle F^r(x, y, k) \rangle_{x,y}$ movie, we plot

$$F_\beta^r(x, y) = \left\langle \frac{F^r(x, y, k)}{F^{r,ff}(x, y)} \times \sin\left(\frac{k\pi}{n} + \phi\right) \right\rangle_k = \beta(x, y) \times \frac{Z_M^{r,1} M}{2 Z_M^{r,ff} M_{ff}}. \quad (39)$$

Because $Z_M^{r,1}$ is uniform in x and y (thanks to the flat average temperature field), the Figure 4Sb trace leads to an equal excitation amplitude for the five oligonucleotide solutions.

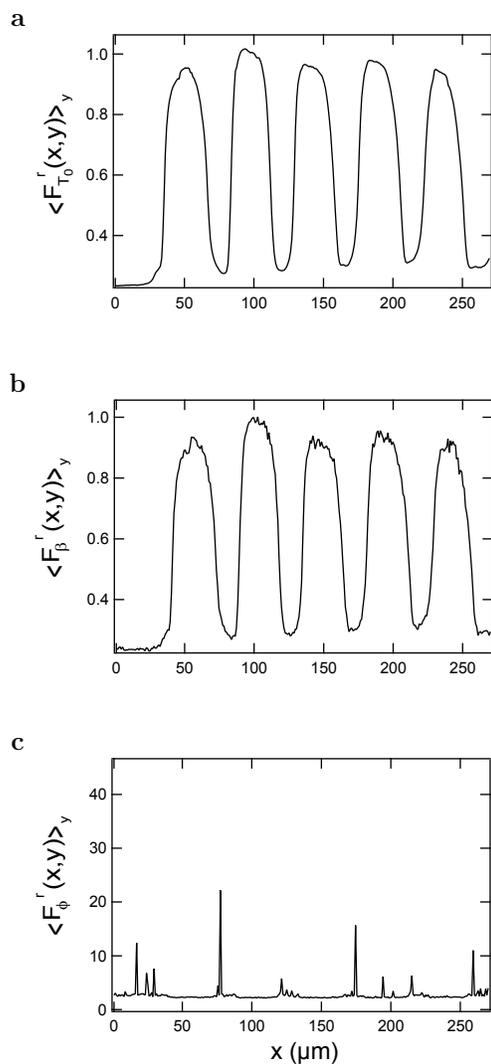


Figure 4S. Temperature field homogeneity check using the red-emitting molecular thermometer M, dissolved at $2 \mu\text{M}$ in 1.25 mM Mg(OH)_2 , 25 mM NaOH , 55 mM HEPES buffer, $\text{pH}=7.5$ at $20 \text{ }^\circ\text{C}$, supplemented with 0.2% PDMA. Traces were computed by spatial averaging, along y , of images that report on (a) the average temperature T_0 , (b) the amplitude β of the thermal excitation, and (c) its phase ϕ (see the corresponding part of the Supporting Information for details – The first and second curves were normalized to 1). The fluorescence signal was collected with the dual-view setup using band-pass filters such as $\lambda_{exc} = 585 \pm 14 \text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 628 \pm 16 \text{ nm}$. The temperature modulation settings were $T_0 = 306 \text{ K}$, $\beta T_0 = 0.6 \text{ K}$, and $\omega = 23.65 \text{ rad.s}^{-1}$.

References

- [1] M. Eigen, L. de Mayer in *Relaxation Methods in Techniques of Organic Chemistry, Vol. 8, Part 2, 2nd ed.* (Eds.: S. L. Friess, E. S. Lewis, A. Weissberger), Wiley, New York, **1963**, pp. 895–1054.
- [2] U. P. Fringeli, D. Baurecht, H. H. Günthard in *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials* (Eds.: H.-U. Gremlich, B. Yan), Marcel Dekker, New-York, **2000**, pp. 143–191.
- [3] I. Schoen, H. Krammer, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21649–21654.
- [4] D. Braun, A. Libchaber, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 5554–5556.
- [5] D. Baurecht, U. P. Fringeli, *Rev. Sci. Inst.* **2001**, *72*, 3782–3792.
- [6] A. Urakawa, T. Bürgi, A. Baiker, *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63*, 4902–4909.
- [7] L. McGown, F. Bright, *Anal. Chem* **1984**, *56*, 1400A–1417A.
- [8] J. H. Scofield, *Am. J. Phys.* **1994**, *62*, 129–133.

Conclusion

Rappel des résultats obtenus

Dans un premier temps, cette thèse a permis d'améliorer le dispositif des pinces magnétiques en perfectionnant la mesure des deux observables essentielles au système de manipulation, la force appliquée et l'extension de la molécule sous investigation.

Tout d'abord, une étude du bruit sur la position de la bille utilisée a montré que la précision de pointé est essentiellement limitée par le bruit de photons de la détection optique. Pour augmenter cette précision, les améliorations que nous apportons sont de deux natures : en augmentant la fréquence d'acquisition de la caméra et le flux de lumière nous obtenons un meilleur rapport signal sur bruit. Cette stratégie appliquée au suivi des billes par anneaux d'interférences a permis d'atteindre une résolution intrinsèque d'une paire de base. Nous avons aussi développé une imagerie originale de billes magnétiques par ondes évanescentes en diffusion. Cette technique permet d'accroître la fidélité de la mesure aux temps longs aussi bien que les capacités de parallélisme de la détection. Nous l'avons appliquée à un nouveau principe de séquençage d'ADN en molécule unique, cette mise en pratique a démontré une résolution sub-nanométrique, d'une paire de base, dans des conditions de travail compatibles avec une activité biologique sur un substrat du type épingle à cheveux. Ce niveau de résolution a permis de valider le principe de séquençage par manipulation mécanique en reconstruisant une séquence d'ADN de 16 bases.

Nous avons ensuite mis au point un protocole de mesure de force par modulation de l'exposition vidéo qui a permis de dépasser les limitations des méthodes de mesure précédentes, contraintes par la faible résolution temporelle de la microscopie par acquisition vidéo. Nous avons appliqué avec succès cette méthode à des situations où une contrainte mécanique élevée est imposée à une molécule de faible extension. Nous avons pu réaliser un échantillonnage exact des fluctuations browniennes du senseur de force, même lorsque ces fluctuations sont beaucoup plus rapides que l'acquisition, et ainsi augmenter la gamme de force mesurable en pinces magnétiques.

Dans un second temps, nous avons proposé différentes approches pour l'imagerie photothermique, en champ large et en temps réel, de nanoparticules métalliques. Nous avons démontré la possibilité d'imager rapidement des nanoparticules d'or uniques par effet photothermique. Cependant, en l'état actuel, le faible rapport signal sur bruit de détection ne permet pas de répondre aux contraintes biologiques puisque nous sommes incapables d'imager clairement des nanoparticules de taille inférieure à 100 nm. Nous avons aussi calibré un nouveau mode de chauffage périodique : les interactions électromagnétiques entre champ radiofréquence et nanoparticules métalliques. Nos résultats indiquent que le couplage capacitif entre nanoparticule et composante électrique des champs radiofréquences est nettement plus efficace que le couplage inductif. Toutefois, la compréhension des modèles exacts de couplage doit être approfondie.

Enfin, une collaboration avec l'équipe de Ludovic Jullien a permis d'appliquer le principe de démodulation des signaux optiques périodiques à l'identification sélective d'espèces biochimiques au sein de mélanges complexes.

Perspectives

Les différentes directions abordées durant cette thèse peuvent toutes trouver des prolongements pour encore améliorer les évolutions techniques apportées, et les appliquer à des problématiques biologiques.

Tout d'abord, l'acquisition haute-fréquence, en imagerie par anneaux d'interférences comme par réflexion totale, permet d'atteindre une résolution axiale de la paire de base idéale pour l'étude du mouvement des moteurs moléculaires en interaction avec un brin d'ADN. Des caractéristiques fondamentales de ces moteurs comme leur pas élémentaire pourront être mesurées.

L'augmentation des capacités de parallélisme de la détection apportée par l'imagerie en ondes évanescentes apparaît particulièrement favorable au développement des méthodes de séquençage

d'ADN en molécule unique développées au sein de notre groupe. De plus, cette méthode optique a récemment permis d'imager des nanoparticules d'or de 40 et 20 nm avec une très bonne sensibilité et nous permet d'envisager le marquage de moteurs moléculaires pour observer le couplage entre leur déplacement et l'action mécanique qu'elles exercent : génération de force ou de torsion.

Le nouveau protocole de mesure de forces permet d'étendre la caractérisation mécanique apportée par les pinces magnétiques à de nouveaux substrats. Combinées à une haute résolution, des expériences en pinces magnétiques impliquant le dépliement/repliement de protéines uniques pourront apporter des éclairages nouveaux sur leur relation fonction/structure, tout en profitant d'une analyse hautement parallèle en comparaison aux manipulations actuelles par microscopie à force atomique ou pinces optiques.

Pour la détection photothermique de nanoparticules métalliques, une évolution de la détection optique fondée sur la strioscopie optique permet d'envisager une amélioration du rapport signal sur bruit de détection pour imager des marqueurs photothermiques de taille adaptée à des applications biologiques. L'efficacité du couplage thermique par champ radiofréquence a été récemment confirmée et cette méthode offre la possibilité nouvelle d'une détection photothermique en grand champ. Il ouvre aussi la perspective d'une application dans le traitement destructif par voix thermique et souligne l'importance d'un accès direct aux propriétés physiques d'un nano-marqueur spécifiquement adressable.

Annexes

Nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or que nous avons étudiées sont toutes issues d'échantillons commerciaux distribués par British Biocell International. Il s'agit de solutions aqueuses colloïdales de nanoparticules d'or synthétisées par voie chimique selon la méthode de Turkevitch modifiée. La croissance de nanoparticules s'effectue à partir de la réduction d'ions or (issus de la dissolution de HAuCl_4) par une solution de citrate ou de borohydrure de sodium. La réduction des ions Au^{3+} provoque la formation de nano-agrégats par coalescence, leur taille et leur forme finale dépendent de la température et de l'agent réducteur utilisé. De l'acide tannique en faible concentration est utilisé afin de stabiliser les agrégats par répulsion électrostatique.

Préparation des cellules d'écoulement pour l'ancrage d'une molécule d'ADN

La surface inférieure de la cellule d'écoulement (lamelle de microscope, 24 mm \times 65 mm) est tout d'abord rincée à la soude 5 M et séchée par un flux d'azote. Elle est ensuite rendue hydrophobe par 30 s d'incubation dans la solution SigmaCote (Sigma). La lamelle est séchée à l'azote, puis placée sur plaque chauffante (typiquement 100°C) pendant 30 min afin d'assurer un séchage optimal. A ce stade, la surface est intégrée à la cellule d'écoulement (scotch double-face et surface de Mylar). Elle est ensuite recouverte d'antidigoxigénine pour permettre l'accrochage des molécules. L'antidigoxigénine se fixe spontanément par interactions hydrophobes avec la surface. La lamelle est incubée une nuit à 37°C en présence d'une solution d'antidigoxigénine dans le PBS. Des billes de polystyrène (diamètre 1 μm , Biovalley) sont ensuite fixées non-spécifiquement par écoulement dans la cellule dans de l'eau pure (typiquement 1 minute), puis rincée avec du tampon de passivation. La surface est passivée (afin de limiter l'ancrage non spécifique des billes magnétiques) par incubation en présence du tampon de passivation.

Analyse de données

Tous les programmes de traitement d'images en temps réel, ainsi que les programmes d'analyse ont été écrits en C et intégrés dans XV, le programme d'interface et d'acquisition écrit par Vincent Croquette.

Bibliographie

- [1] E. A. Abbondanzieri, W. J. Greenleaf, J. W. Shaevitz, R. Landick, and S. M. Block. Direct observation of base-pair stepping by rna polymerase. *Nature*, 438(7067):460–5, 2005.
- [2] A. Absil, G. Tessier, M. Gross, M. Atlan, N. Warnasooriya, S. Suck, M. Coppey-Moisán, and D. Fournier. Photothermal heterodyne holography of gold nanoparticles. *Opt. Express*, 18(2):782, 2010.
- [3] D. Alcor, J.-F. Allemand, E. Cogne-Laage, V. Croquette, F. Ferrage, L. Jullien, L.A. Kononov, and A. Lemarchand. Stochastic resonance to control diffusive motion in chemistry. *J.Chem.Phys.*, 109(3):1318–28, 2005.
- [4] D. Alcor, V. Croquette, L. Jullien, and A. Lemarchand. Molecular sorting by stochastic resonance. *PNAS USA*, 101(22):8276–80, 2004.
- [5] J.F. Allemand. *Micro-manipulation de molécules d'ADN isolées*. PhD thesis, Université Paris 6, 1997.
- [6] A. Arbouet, D. Christofilos, F. Del Fatti, N. and Vallee, J. R. Huntzinger, L. Arnaud, P. Billaud, and M. Broyer. Direct measurement of the single-metal-cluster optical absorption. *Phys. Rev. Lett.*, 93(12):127401, 2004.
- [7] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 11(5):288–290, 1986.
- [8] M. Atlan, E. Absil, and M. Gross. Accurate phase-shifting digital interferometry. *Opt. Lett.*, 32(11):1456–60, 2007.
- [9] M. Atlan, M. Gross, P. Desbiolles, E. Absil, G. Tessier, and M. Coppey-Moisán. Heterodyne holographic microscopy of gold particles. *Opt. Lett.*, 33(5):500–02, 2008.
- [10] Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2:764–74, 2001.
- [11] G. Baffou, M. P. Kreuzer, F. Kulzer, and R. Quidant. Temperature mapping near plasmonic nanostructures using fluorescence polarization anisotropy. *Opt. Express*, 17(5):3291–98, 2009.
- [12] T. Barilero, T. Le Saux, C. Gosse, and L. Jullien. Fluorescent thermometers for dual-emission-wavelength measurements: molecular engineering and application to thermal imaging in a microsystem. *Anal. Chem.*, 81(19):7988–00, 2009.
- [13] S. Berciaud. *Détection photothermique et spectroscopie d'absorption de nano-objets individuels : nanoparticules métalliques, nanocristaux semiconducteurs, et nanotubes de carbone*. PhD thesis, Université Bordeaux 1, 2006.
- [14] S. Berciaud, L. Cognet, G. A. Blab, and B. Lounis. Photothermal heterodyne imaging of individual nonfluorescent nanoclusters and nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.*, 93(25):257402, 2004.
- [15] S. Berciaud, D. Lasne, G.A. Blab, L. Cognet, and B. Lounis. Photothermal heterodyne imaging of individual metallic nanoparticles : Theory versus experiments. *Physical Review B*, 73:045424, 2006.
- [16] K. Berg-Sorensen and H. Flyvbjerg. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.*, 75(3):594–612, 2004.
- [17] H. Berthoumieux, C. Antoine, L. Jullien, and A. Lemarchand. Resonant response to temperature modulation for enzymatic dynamics characterization. *Phys. Rev. E*, 79(2):021906–09, 2009.

- [18] H. Berthoumieux, L. Jullien, and A. Lemarchand. Temporal modulation of a spatially periodic potential for kinetically governed oriented motion. *J.Phys.Chem.B*, 111(8):2045–51, 2007.
- [19] H. Berthoumieux, L. Jullien, and A. Lemarchand. Response to a temperature modulation as a signature of chemical mechanisms. *Phys. Rev. E*, 76(5):056112, 2009.
- [20] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930–933, 1986.
- [21] A. C. Boccara, D. Fournier, and J. Badoz. Thermo-optical spectroscopy : detection of the "mirage effect". *Appl. Phys. Lett.*, 36(2):130–32, 1980.
- [22] S. Bonneau, M. Dahan, and L.D. Cohen. Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatiotemporal volume. *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society*, 14(9):1384–95, 2005.
- [23] C. Bouchiat, M. D. Wang, J. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophysical J.*, 76:409–13, 1999.
- [24] D. Braun and A. Libchaber. Lock-in by molecular multiplication. *Appl. Phys. Lett.*, 83(26):5554–56, 2003.
- [25] C. Bustamante, Y. R. Chemla, N. R. Forde, and D. Izhaky. Mechanical processes in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 73:705–48, 2004.
- [26] H.S. Carslaw and J.C. Jaeger. *Conduction of heat in solids*. Oxford University Press, Oxford (2nd edition), 1959.
- [27] M. Celebrano, P. Kukura, A. Renn, and V. Sandoghdar. Single-molecule imaging by optical absorption. *Nature Photonics*, 5:95–98, 2011.
- [28] A. Celedon, I.M. Nodelman, B. Wildt, R. Dewan, P. Searson, D. Wirtz, G.D. Bowman, and S.X. Sun. Magnetic tweezers measurement of single molecule torque. *Nano Lett.*, 9(4):1720–25, 2009.
- [29] H. Chen, H. Fu, X. Zhu, P. Cong, F. Nakamura, and J. Yan. Improved high-force magnetic tweezers for stretching and refolding of proteins and short dna. *Biophysical J.*, 100(2):517–23, 2011.
- [30] F.C. Cheong, B.J. Krishnatreya, and D.G. Grier. Strategies for three-dimensional particle tracking with holographic video microscopy. *Optics Express*, 18(13):13563–73, 2010.
- [31] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. Dna: an extensible molecule. *Science*, 271:792–94, 1996.
- [32] L. Cognet, C. Tardin, D. Boyer, D. Choquet, P. Tamarat, and B. Lounis. Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(20):350–55, 2003.
- [33] S. A. Curley, P. Cherukuri, C. R. and Upton M. Briggs, K. and Patra, E. Dolson, and P. Mukherjee. Noninvasive radiofrequency field induced hyperthermic cytotoxicity in human cancer cells using cetuximab-targeted gold nanoparticles. *J. Exp. Ther. Oncol.*, 7:313–26, 2008.
- [34] A. Maali B. Lounis D. Boyer, P. Tamarat and M. Orrit. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science*, 297(5584):1160–63, 2002.
- [35] C. Danilowicz, C. Limouse, and M. Prentiss. Dna overstretched from the 5'5' ends differs from the structure of dna overstretched from the 3'3' ends. *PNAS USA*, 106(32):13196–201, 2009.
- [36] M. Daune. In *Molecular Biophysics: Structure in Motion*. Oxford University Press, 1999.
- [37] A. H. B. de Vries, R. Krenn, B. E. and van Driel, and J.S. Kanger. Micro-magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells. *Biophysical J.*, 88(3):2137–44, 2005.
- [38] C. Deufel, S. Forth, C. Simmons, S. Dejgosh, and M. D. Wang. Nanofabricated quartz cylinders for angular trapping: Dna supercoiling torque detection. *Nat. Meth.*, 4(3):223–25, 2007.
- [39] S. Draghici, P. Khatr, A.C. Eklund, and Z. Szallasi. Reliability and reproducibility issues in dna microarray measurements. *Trends Genet.*, 22(2):101–109, 2006.

- [40] F. Dubois and P. Grosfils. Dark-field digital holographic microscopy to investigate objects that are nanosized or smaller than the optical resolution. *Opt. Lett.*, 33(22):2605–07, 2008.
- [41] E. Dulkeith, T. Niedereichholz, T. Klar, J. Feldmann, G. Von Plessen, D. I. Gittins, K.S. Mayya, and F. Caruso. Plasmon emission in photoexcited gold nanoparticles. *Phys. Rev. B*, 70:205424, 2004.
- [42] A. Einstein. Uber die von dermolekularkinetischen theorie der warme geforderte bewegung von in ruhenden flussigkeiten suspendierten teilchen. *Ann. Phys. Lpz*, 17:549–61, 1905.
- [43] A. Esteves Torrez. *Un microlaboratoire electrophoretique pour l'etude du couplage entre transport et cinetique chimique : application a la reaction d'hybridation d'oligonucleotides*. PhD thesis, Universite Paris 6, 2007.
- [44] E. L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264(5157):415–417, 1994.
- [45] D. Fournier, A. C. Boccara, N. M. Amer, and R. Gerlach. Sensitive in situ trace-gas detection by photothermal deflection spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 37(6):519–21, 1980.
- [46] U. P. Fringeli, D. Baurecht, and H. H. Gunthard. In infrared and raman spectroscopy of biological materials. *Marcel Dekker Eds: New York*, pages 143–191, 2000.
- [47] H. Fu, H. Chen, X. Zhang, Y. Qu, J.F. Marko, and J. Yan. Transition dynamics and selection of the distinct s-dna and strand unpeeling modes of double helix overstretching. *Nucleic Acids R.*, 39(8):3473–81, 2011.
- [48] A. Gaiduk, M. Yorulmaz, P. V. Ruijgrok, and M. Orrit. Room-temperature detection of a single molecule's absorption by photothermal contrast. *Science*, 330(6002):353–56, 2010.
- [49] C.J. Gannon, C.R. Patra, R. Bhattacharya, P. Mukerjee, and S.A. Curley. Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells. *J. Nanobiotechnol.*, 6(2), 2008.
- [50] C. Gosse and V. Croquette. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophysical J.*, 82(6):3314–29, 2002.
- [51] W. J. Greenleaf, M. T. Woodside, E. A. Abbondanzieri, and S. M. Block. Passive all-optical force clamp for high-resolution laser trapping. *Phys. Rev. Lett.*, 95(20):208102, 2005.
- [52] K. Hamad-Schifferli, J.J. Schwartz, A.T. Santos, and J.M. Zhang, S. and Jacobson. Remote electronic control of dna hybridization through inductive coupling to an attached metal nanocrystal antenna. *Nature*, 415(6868):152–55, 2002.
- [53] Y.W. Han, T. Tani, M. Hayashi, T. Hishida, H. Iwasaki, H. Shinagawa, and Y. Harada. Direct observation of dna rotation during branch migration of holliday junction dna by escherichia coli ruva-ruvb protein complex. *PNAS USA*, 103(31):11544–48, 2006.
- [54] L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N.J. Halas, and J.L. West. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *PNAS USA*, 100(23):13549–54, 2003.
- [55] H. Huang, C. Y. Dong, H. S. Kwon, J. D. Sutin, R. D. Kamm, and P. T. C. So. Three-dimensional cellular deformation analysis with a two-photon magnetic manipulator workstation. *Biophysical Journal*, 82(4):2211–2223, 2002.
- [56] F. V. Ignatovich and L. Novotny. Real-time and background-free detection of nanoscale particles. *Phys. Rev. Lett.*, 96(1):13901, 2006.
- [57] J.D. Jackson. *Classical Electrodynamics*. 3rd Ed. John Wiley and Sons, New York, NY, 1999.
- [58] V. Jacobsen, P. Stoller, C. Brunner, V. Vogel, and V. Sandoghdar. Interferometric optical detection and tracking of very small gold nanoparticles at a water-glass interface. *Opt. Express*, 14(1):405–14, 2006.
- [59] J. Jean Perrin. L'agitation moleculaire et le mouvement brownien. *Compte rendu Academie Sciences Paris*, 146.

- [60] L. Jullien, A. Lemarchand, and H. Lemarchand. Diffusion of reactive species tuned by modulated external field: application to high performance chromatography. *J.Chem.Phys.*, 112(19):8293–301, 2000.
- [61] N.W.S. Kam, M. O’Connell, J.A. Wisdom, , and H. Dai. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *PNAS USA*, 102(33):11600–05, 2005.
- [62] P. Koblinski, D.G. Cahill, A. Bodapati, C.R. Sullivan, and T.A. Taton. Limits of localized heating by electromagnetically excited nanoparticles. *J. of Appl. Phys.*, 100(5):054305, 2006.
- [63] D. Klaue and R. Seidel. Torsional stiffness of single superparamagnetic microspheres in an external magnetic field. *Phys. Rev. Lett.*, 102(2):028302, 2009.
- [64] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando. Video imaging of walking myosin v by high-speed atomic force microscopy. *Nature*, 468(7320):72–76, 2010.
- [65] R. Kubo, Toda M., and Hashitsume N. *Statistical Physics II: Nonequilibrium Statistical Mechanics*. Springer, Berlin, 1991.
- [66] M. Kuno, D.P. Fromm, H.F. Hamann, A. Gallagher, and D.J. Nesbitt. Nonexponential "blinking" kinetics of single cdse quantum dots: a universal power law behavior. *J. of Chem. Phys.*, 112(7):3117–20, 2000.
- [67] A. La Porta and M. D. Wang. Optical torque wrench: Angular trapping, rotation, and torque detection of quartz microparticles. *Phys. Rev. Lett.*, 92(19), 2004.
- [68] K. Lindfors, T. Kalkbrenner, P. Stoller, and V. Sandoghdar. Detection and spectroscopy of gold nanoparticles using supercontinuum white light confocal microscopy. *Phys. Rev. Lett*, 93(3):37401, 2004.
- [69] L. Lionnet. *Mecanique de l’ADN et etude des helicases en molecule unique*. PhD thesis, Universite Paris 6, 2006.
- [70] T. Lionnet, M.M. Spiering, S.J. Benkovic, and V. Bensimon, D.and Croquette. Real-time observation of bacteriophage t4 gp41 helicase reveals an unwinding mechanism. *PNAS USA*, 104(50):19790–95, 2007.
- [71] J. Lipfert and N. H. Hao, X.and Dekker. Quantitative modeling and optimization of magnetic tweezers. *Biophysical J.*, 96(12):5040–49, 2009.
- [72] J. Liphardt, B. Onoa, S.B. Smith, I. Tinoco, and Bustamante C. Reversible unfolding of single rna molecules by mechanical force. *Science*, 292(5517):733–37, 1997.
- [73] M. Lippitz, F. Kulzer, and M. Orrit. Statistical evaluation of single nano-object fluorescence. *Chemphyschem*, 6(5):770–89, 2005.
- [74] R. Liu, S. Garcia-Manyes, A. Sarkar, C.L. Badilla, and J.M. Fernandez. Mechanical characterization of protein l in the low-force regime by electromagnetic tweezers/evanescent nanometry. *Biophysical J.*, 96(9):3810–21, 2009.
- [75] H.P. Lu, L. Xun, and X.S. Xie. Single molecule enzymatic dynamics. *Science*, 282(5395):1877–81, 1998.
- [76] C. Luccardini P. Rostaing B. Riveau M. Dahan, S. Levi and A. Triller. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science*, 302(5644):442–45, 2003.
- [77] M. Manosas, A. Meglio, M.M. Spiering, F. Ding, S.J. Benkovic, FX. Barre, O.A. Omar A. Saleh, JF. Allemand, and V. Bensimon, D.and Croquette. Magnetic tweezers for the study of dna tracking motors. *Meth. in Enzymology*, 475:297–320, 2010.
- [78] M. Manosas, M. M. Spiering, Z. Zhuang, S.J. Benkovic, and V. Croquette. Coupling dna unwinding activity with primer synthesis in the bacteriophage t4 primosome. *Nat. Chem. Bio.*, 5(12):904–12, 2009.

- [79] P.E. Marszalek, H. Lu, L. Hongbin, M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, K. Schulten, and J.M. Julio M. Fernandez. Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature*, 402(6757):100–03, 1999.
- [80] Barry R. Masters. *History of the optical microscope in cell biology and medicine*. John Wiley and Sons, Encyclopedia of Life Sciences (ELS), 2008.
- [81] A. McNally, B. Singer, Z. Yu, Y. Sun, Z. Weng, and A. Meller. Optical recognition of converted dna nucleotides for single-molecule dna sequencing using nanopore arrays. *Nano Letters*, 10(6):2237–44, 2010.
- [82] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. L A Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, and S. Weiss. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307(5709):538–44, 2005.
- [83] J.R. Moffitt, Y.R. Chemla, D. Izhaky, and C. Bustamante. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers. *PNAS USA*, 103(24):9006–11, 2006.
- [84] J. E. Molloy and M. J. Padgett. Lights, action: optical tweezers. *Contemporary Physics*, 43(4):241–258, 2002.
- [85] S.M. Moran, C.H. and Wainerdi, T.K. Cherukuri, C. Kittrell, N.W. Wiley, B.J. Nicholas, S.A. Curley, J.S. Kanzius, and P. Cherukuri. Size-dependent joule heating of gold nanoparticles using capacitively coupled radiofrequency fields. *Nano Research*, 2(5):400–405, 2009.
- [86] K.I. Mortensen, L.S. Stirling Churchman, J.A. Spudich, and H. Flyvbjerg. Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. *Nat. Methods*, 7(5):377–83, 2010.
- [87] H. Mukundan, A.S. Anderson, W.K. Grace, K.M. Grace, N. Hartman, J.S. Martinez, and B.I. Swanson. Waveguide-based biosensors for pathogen detection. *Sensors*, 9:5783–809, 2009.
- [88] P. Nelson. *Biological Physics. Energy, Information, Life*. Freeman, New York, 2004.
- [89] K. C. Neuman and S. M. Block. Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*, 75(9):2787–2809, 2004.
- [90] K.C. Neuman, E.A. Abbondanzieri, R. Landick, J. Gelles, and S.M Block. Ubiquitous transcriptional pausing is independent of rna polymerase backtracking. *Cell.*, 115(4):437–47, 2003.
- [91] K.C. Neuman, E.H. and Liou G.F. Chadd, K. Bergman, and S.M. Block. Characterization of photodamage to escherichia coli in optical traps. *Biophysical J.*, 77(5):2856–63, 1999.
- [92] P.M. Oliver, J.S. Seon Park, and D. Vezenov. Quantitative high-resolution sensing of dna hybridization using magnetic tweezers with evanescent illumination. *Royal Society of Chemistry/ Nanoscale*, 3:581–91, 2011.
- [93] B. Ovrzyn and S. H. Izen. Imaging of transparent spheres through a planar interface using a high-numerical-aperture optical microscope. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 17(7):1202–1213, 2000.
- [94] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36(13):R167–R181, 2003.
- [95] Perez. *Optique*. Masson Sciences, Paris, 2002.
- [96] N. Ribeck and O.A. Saleh. Multiplexed single-molecule measurements with magnetic tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 79(9):094301, 2008.
- [97] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, and H.E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by afm. *Science*, 276(5315):1109–12, 1997.
- [98] B. Samson, L. Aigouy, P. Low, C. Bergaud, B. J. Kim, and M. Mortier. Ac thermal imaging of nanoheaters using a scanning fluorescent probe. *Appl. Phys. Lett.*, 92:023101, 2008.
- [99] J. SantaLucia, H. T. Allawi, and P. A. Seneviratne. Improved nearest-neighbor parameters for predicting dna duplex stability. *Biochemistry*, 35(11):3552–62, 1996.

- [100] A. Sarkar and J.M. Robertson, R.B. and Fernandez. Simultaneous atomic force microscope and fluorescence measurements of protein unfolding using a calibrated evanescent wave. *PNAS USA*, 101(35):12882–86, 2004.
- [101] M.J. Schnitzer and S.M. Block. Kinesin hydrolyses one atp per 8-nm step. *Nature*, 388(6640):386–90, 1997.
- [102] I. Schoen, H. Krammer, and D. Braun. Hybridization kinetics is different inside cells. *PNAS*, 106(51):21649–54, 2009.
- [103] E. F. Schubert, Y.H. Wang, L.W. Cho, A.Y. and Tu, and G.J. Zydzik. Resonant cavity light-emitting diode. *Appl. Phys. Lett.*, 60(8):921–23, 1992.
- [104] S. Schultz, D.R. Smith, J.J. Mock, and D.A. Schultz. Single-target molecule detection with non-bleaching multicolor optical immunolabels. *PNAS USA*, 97(3):996–1001, 2000.
- [105] M. Singh-Zocchi, S. Dixit, V. Ivanov, and G. Zocchi. Single-molecule detection of dna hybridization. *PNAS USA*, 100(13):7605–10, 2003.
- [106] D. E. Smith, S.J. Tans, S.B. Smith, Grimes. S., D.L. Anderson, and C. Bustamante. The bacteriophage phi 29 portal motor can package dna against a large internal force. *Nature*, 413(6857):748–52, 2001.
- [107] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single dna molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085):1122–6, 1992.
- [108] S.B. Smith, Y Cui, and C. Bustamante. Overstretching b-dna: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded dna molecules. *Science*, 271(5250):795–99, 1996.
- [109] A.P. Sonnichsen, C. and Alivisatos. Gold nanorods as novel nonbleaching plasmonbased orientation sensors for polarized single-particle microscopy. *Nano Lett.*, 5(2):301–04, 2005.
- [110] C. Sonnichsen, S. Geier, N.E. Hecker, G. Von Plessen, J. Feldmann, H. Ditlbacher, B. Lamprecht, J.R. Krenn, F.R. Aussenegg, V.Z.H. Chan, J.P. Spatz, and M. Muller. Spectroscopy of single metallic nanoparticles using total internal reflection microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 77(19):2949–51, 2000.
- [111] T. Strick. *Enroulement mecanique de l'ADN et relaxation par les topoisomereses*. PhD thesis, Universite Paris 6, 1999.
- [112] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled dna molecule. *Science*, 271(5257):1835–7, 1996.
- [113] K. Svoboda, C.F. Schmidt, B.J. Schnapp, and S.M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365(6448):721–27, 1993.
- [114] R.E. Thompson, D.R. Larson, and W.W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical J.*, 82(5):2775–83, 2002.
- [115] M.A. van Dijk, M. Lippitz, and M. Orrit. Far-field optical microscopy of single metal nanoparticles. *Acc. Chem. Res.*, 38(7):594–601, 2005.
- [116] MA. van Dijk, A.L. Tchebotareva, M. Orrit, M. Lippitz, S. Berciaud, D. D. Lasne, L. Cognet, , and B. Lounis. Absorption and scattering microscopy of single metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8(30):3846–95, 2006.
- [117] J. van Mamerena, P. Grossa, G. Fargea, P. Hooijmana, M. Modestib, M. Falkenbergc, G.J.L. Wuitea, and E.J.G. Petermana. Unraveling the structure of dna during overstretching by using multicolor, singlemolecule fluorescence imaging. *PNAS USA*, 106(43):18231–36, 2009.
- [118] A. Van Oijen, P. Blainey, D.J. Crampton, C.C. Richardson, T. Ellenberger, and X.S. Xie. Single-molecule kinetics of exonuclease reveal base dependence and dynamic disorder. *Science*, 301(5637):1235–38, 2003.
- [119] A.J.W Velthuis, J.W.J. Kerssemakers, J. Lipfert, and N.H. Dekker. Quantitative guidelines for force calibration through spectral analysis of magnetic tweezers data. *Biophysical J.*, 99(4):1292–302, 2010.

- [120] M. B. Viani, T. E. Schaffer, A. Chand, M. Rief, H. E. Gaub, and P. K. Hansma. Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules. *Journal of Applied Physics*, 86(4):2258–2262, 1999.
- [121] P. C. Weber and F. R. Salemme. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Curr. Opin. in Struct. Biol.*, 13(1):115–21, 2003.
- [122] W.P. Wong and K. Halvorsen. The effect of integration time on fluctuation measurements: calibrating an optical trap in the presence of motion blur. *Opt. Express*, 14(25):12517–31, 2006.
- [123] W.P. Wong and K. Halvorsen. Beyond the frame rate: measuring high-frequency fluctuations with light-intensity modulation. *Opt. Lett.*, 34(3):277–79, 2009.
- [124] M.T. Woodside, W.M. Behnke-Parks, K. Larizadeh, K. Travers, D. Herschlag, and S. M. Block. Nanomechanical measurements of the sequence-dependent folding landscapes of single nucleic acid hairpins. *PNAS USA*, 103(16):6190–95, 2006.
- [125] J. Yan and J. F. Marko. Effects of dna-distorting proteins on dna elastic response. *Phys. Rev. E.*, 68:011905, 2003.
- [126] A. Yildiz and P. R. Selvin. Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: application to molecular motors. *Acc. Chem. Res.*, 38(7):574–82, 2005.
- [127] A. Yildiz, M. Tomishige, R.D. Vale, and P. R. Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303(5658):676–8, 2004.
- [128] J. Yu, J. Xiao, X. Ren, K. Lao, and X.S. Xie. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science*, 311(5767):1600–03, 2006.

Résumé

Dans ce travail, nous avons d'abord développé de nouveaux outils pour la micromanipulation d'ADN en pinces magnétiques. Cet appareil permet d'appliquer une force contrôlée à une molécule d'ADN tout en mesurant son extension. Nous avons amélioré la résolution spatiale du dispositif, limitée par le bruit de photons affectant la détection optique, et la mesure de force, limitée par la résolution temporelle de la microscopie vidéo.

Nous avons couplé une imagerie haute-fréquence par ondes évanescentes aux pinces magnétiques et l'avons appliqué à un nouveau principe de séquençage d'ADN démontrant une résolution sub-nanométrique. Pour mesurer de hautes forces, nous avons mis au point un protocole de modulation de l'exposition vidéo qui permet d'échantillonner correctement les fluctuations browniennes du senseur de force au-delà de la fréquence de coupure du système d'acquisition.

Nous proposons ensuite une imagerie photothermique, en champ large et en temps réel, de nanoparticules métalliques pour le marquage de moteurs moléculaires. Nous avons démontré la possibilité d'imager rapidement des nanoparticules d'or uniques par effet photothermique, des améliorations restent à produire pour visualiser des nanoparticules de taille adaptée aux applications biologiques. Nous avons aussi exploré un nouveau mode de chauffage périodique et spatialement étendu: les interactions électromagnétiques entre champ radio-fréquence et nanoparticules métalliques.

Nous avons enfin appliqué le principe de démodulation optique utilisé pour la photothermie à l'identification sélective d'espèces biochimiques, visualisées en microscopie de fluorescence.

Mots clés: molécule unique, pinces magnétiques, ADN, microscopie haute-fréquence, imagerie-TIR, haute résolution spatiale, mesure de hautes forces, nanoparticules métalliques, photothermie champ large, couplage électromagnétique radio-fréquence, démodulation optique.

Abstract

In this work, we first developed new tools for DNA manipulation with magnetic tweezers. This apparatus allow one to apply a controled force to a DNA molecule while measuring its extension. We improved both the spatial resolution of the device, limited by the photon noise affecting the optical detection, and the force measurement technique, limited by the temporal resolution of video microscopy.

Therefore we coupled a high-frequency imaging by evanescent waves to magnetic tweezers and applied it to a new principle of DNA sequencing revealing a sub-nanometer resolution. For high forces measurement, we developed a protocol of video-shutter modulation that allows to accurately sample the Brownian fluctuations of the magnetic sensor linked to DNA and restore their level beyond the cut-off frequency of the acquisition system.

Then we propose a wide-field, and real-time, photothermal imaging of metal nanoparticles for molecular motors labeling. We demonstrated the ability to rapidly image single gold nanoparticles by photothermal detection, however we still need signal-to-noise improvements to image nanoparticles of suitable size for biological application. In this context, we also explored an original method for periodic heating in wide-field excitation : interactions between radio-frequency electromagnetic fields and metal nanoparticles.

Finally, we applied the principle of optical demodulation used for photothermal detection to the selective identification of biochemical species, imaged by fluorescence microscopy.

Key words: single molecule, magnetic tweezers, DNA, high-frequency video microscopy, TIR-imaging, high spatial resolution, high force measurement, metallic nanoparticles, wide-field photothermal imaging, radio-frequency electromagnetic coupling, optical demodulation.