



HAL
open science

Développement de nano-capteurs épigénétiques amplifiés par la plasmonique UV

Marion Castilla

► **To cite this version:**

Marion Castilla. Développement de nano-capteurs épigénétiques amplifiés par la plasmonique UV. Optique / photonique. Université de Technologie de Troyes, 2021. Français. NNT : 2021TROY0045 . tel-03810755

HAL Id: tel-03810755

<https://theses.hal.science/tel-03810755v1>

Submitted on 11 Oct 2022

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'UTT

Marion CASTILLA

Développement de nano-capteurs épigénétiques amplifiés par la plasmonique UV

Champ disciplinaire :
Sciences pour l'Ingénieur

2021TROY0045

Année 2021

THESE
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR
de l'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE TROYES
en SCIENCES POUR L'INGENIEUR

Spécialité : MATERIAUX, MECANIQUE, OPTIQUE, NANOTECHNOLOGIE

présentée et soutenue par

Marion CASTILLA

le 16 décembre 2021

**Développement de nano-capteurs épigénétiques amplifiés
par la plasmonique UV**

JURY

Mme Emmanuelle LACAZE	DIRECTRICE DE RECHERCHE CNRS	Président
M. Éric FINOT	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	Rapporteur
Mme Mona TRÉGUER-DELAPIERRE	PROFESSEURE DES UNIVERSITES	Rapporteure
Mme Sophie CAMELIO	PROFESSEURE DES UNIVERSITES	Examinatrice
M. Jérôme WENGER	DIRECTEUR DE RECHERCHE CNRS	Examineur
M. Jérôme PLAIN	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	Directeur de thèse
M. Julien PROUST	ENSEIGNANT CHERCHEUR UTT	Directeur de thèse

Table des matières

1	La nanotechnologie pour la biologie	9
I	ADN et épigénétique	9
I.1	Structure et composition d'un brin d'ADN	9
I.2	Le mécanisme d'expression des gènes	10
I.3	Le phénomène d'épigénétique	13
II	La fluorescence	14
II.1	Le diagramme de Jablonski	14
II.2	Fonctionnement des fluorophores	15
II.3	Application à la biologie	17
III	Plasmonique et exaltation de fluorescence	18
III.1	Définition de la plasmonique	18
III.2	Exaltation de fluorescence par un métal : MEF	21
III.3	Application pour les capteurs	24
IV	Le cœur du projet : la plasmonique UV	25
IV.1	Le choix d'un fluorophore UV	26
IV.2	Le choix de l'aluminium	26
IV.3	Objectif du projet	28
V	La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence : FCS	29
V.1	Histoire de la technique	30
V.2	Modèle théorique	31
V.3	Applications	32
2	Nouvelle synthèse de nanoparticules d'aluminium colloïdales	35

I	La lithographie électronique et ses limites	36
I.1	L'utilisation de la lithographie électronique	36
I.2	Stabilisation et espoir	37
I.3	Le passage en solution	39
II	Notre nouvelle méthode	39
II.1	Introduction aux techniques de sonochimie et solvochimie	39
II.2	Première étape : Création des précurseurs par la sonochimie	42
II.3	Seconde étape : Croissance par solvochimie	43
II.4	Dernière étape : purification et stabilisation	45
III	Caractérisation des objets obtenus	46
III.1	Étude topographique	46
III.2	Caractéristique structurale	48
III.3	Étude plasmonique	49
IV	Conclusion et perspective	49
IV.1	Utilisation dans les nouveaux carburants	50
IV.2	Possibilité de changement de forme	51
IV.3	Possibilité d'autres synthèses	51
3	Microscope confocal UV pour la détection de particules uniques	53
I	Introduction aux méthodes de spectroscopie	54
I.1	Technique de microscopie pour la plasmonique	54
I.2	Microscope confocal	55
I.3	La détection dans l'UV	56
II	Développement d'un microscope optique confocal pour l'UV	57
II.1	Contrainte et première forme	57
II.2	Modification des composants	60
II.3	Forme actuelle	64
III	Étude de nanoparticules uniques d'aluminium	65
III.1	Plot d'aluminium unique	66
III.2	Nanoparticule d'aluminium colloïdale unique	67

IV	Conclusion et perspective	71
IV.1	Amélioration du montage	71
IV.2	Dimères d'aluminium	72
4	Mesure de Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence dans le visible	75
I	Présentation du montage et d'une sonde de référence	76
I.1	Le montage	76
I.2	Les paramètres de corrélation	79
I.3	Le système à 5 niveaux	81
II	Fabrication et physique du système	85
II.1	Fabrication des échantillons	85
II.2	Présentation de la sonde	87
II.3	Modèle Reverse Inter System Crossing	87
III	Étude des paramètres du système	89
III.1	Spectres d'absorption et de fluorescence	89
III.2	Brillance	92
III.3	Autres paramètres photophysiques	92
III.4	Temps de vie	94
IV	Conclusion et ouverture	95
IV.1	Interprétation des résultats	95
IV.2	Expériences complémentaires	97
IV.3	Ouverture sur l'UV	97
5	Conception et phase de test du nano-capteur	99
I	La fonctionalisation ADN-Aluminium	100
I.1	Définition d'un plan d'action	100
I.2	Stabilisation de l'Aluminium lithographié	101
I.3	Mise en place du protocole	102
II	Mesure de fluorescence exaltée	104
II.1	Imagerie de fluorescence	104
II.2	Vers la molécule unique	105

II.3	Caractérisation	106
III	Perspective du projet	109
III.1	Mesure avec la ThG	109
III.2	Fonctionalisation en solution	109
III.3	Optimisation du capteur : perspectives	111

Remerciements

Je débute cette page de remerciements par exprimer ma profonde gratitude envers mes deux directeurs de thèse, Jérôme Plain et Julien Proust, qui m'ont fait confiance pour réaliser ce projet de thèse et qui m'ont grandement soutenu et aidé tout au long de ces trois années.

Je remercie l'Université de technologie de Troyes, et en particulier mon équipe d'accueil, le Laboratoire Lumière, nanomatériaux, nanotechnologie (L2n), ainsi que les organismes de financement qui nous permettent d'avoir un environnement de travail propice à l'innovation : la plateforme Nano'mat, le CNRS et la région Grand Est. J'inclus également ici l'Agence National de Recherche (ANR) qui a financé ce projet.

Mes remerciements vont également à tous les participants du projet, notamment l'équipe partenaire du projet, le LBP à l'Université de Strasbourg, sous la direction de M. Yves Mély. À M. Ropolphe Jaffiol, pour son implication dans la partie FCS du projet, et pour tout le savoir qu'il a su me transmettre avec patience et gentillesse. Aux ingénieurs de la plateforme, Jérémie Beal et Serguei Kochtcheev pour leur aide à toute épreuve et particulièrement Régis Detruche, avec qui les matinées de travail débutaient dans la bonne humeur. À tous les enseignants-chercheurs qui ont suivi de près ou de loin cette thèse : M. Jérôme Martin, M. Davy Gérard, M. Cyrille Vezy et Mme Anne Laure Baudrion. Enfin, à notre directeur d'équipe, Christophe Couteau, qui s'implique quotidiennement dans la vie du laboratoire pour rendre notre parcours plus agréable, tant d'un point de vue professionnel que d'un point de vue privé.

J'envoie mes remerciements à M Eric Finot, de l'université de Bourgogne, et Mme Mona Tréguer-Delapierre, de l'université de Bordeaux, pour avoir accepté d'être mes rapporteurs, ainsi que les autres membres du jury, Mme Sophie Camelio, de l'université de Poitiers, Mme. Emanuelle Lacaze, de l'INSP et M. Jérôme Wenger, de l'institut Fresnel.

Et que seraient des remerciements sans inclure tous mes collègues, qu'ils aient fini leurs thèses ou non, et qui ont tous participé à la réussite de ce projet, en me transmettant des encouragements réguliers. Je remercie Aurélie Broussier, qui est là depuis mes débuts dans la recherche, pour son soutien infaillible et nos pauses thés qui m'ont aidé à supporter les journées difficiles. A William d'Orsonnens, pour sa bonne humeur, sa disponibilité à toute heure et sa force de caractère extraordinaire. Merci à Thinhinane Aoudjit, pour tous nos moments partagés. Je remercie aussi Florian Lamaze, et son binôme Thomas Simon, pour toutes nos discussions et les journées d'expériences partagées. Et à tous les autres doctorants que je n'ai pas cités mais qui se reconnaîtront, pour tous les sourires et les moments d'entraides. Enfin, j'exprime une nouvelle fois une grande gratitude pour avoir partagé mon bureau avec Sarabjeet Kaur, une doctorante formidable sans qui les journées de travail n'auraient pas été les mêmes, et bien sûr Sambhav Kumar par la même occasion. À eux deux, ils m'ont fait découvrir avec tant de gentillesse une autre culture et ces trois années de moments partagés conduiront je l'espère, à une belle et longue amitié.

Du côté de mes proches, je remercie tout d'abord mon compagnon de vie, Ovidiu State, qui m'a accompagné durant mes longues heures de travail, même le week-end et qui m'a conseillé et épaulé tout au long de ces onze dernières années. Merci à mes parents et à ma petite sœur, pour leur soutien infaillible et avec qui le télétravail en confinement était merveilleux. À mes grands-parents, qu'ils soient encore de ce monde ou non, pour m'avoir transmis le goût des études. Merci aussi au reste de la famille et tout particulièrement à ma tante Isabelle, pour m'avoir permis de loger dans son appartement de Troyes. Enfin, je tiens à remercier en particulier mon oncle Arnaud, pour son sourire et sa bonne humeur à toute épreuve, qui continueront de m'inspirer dans tous mes grands moments de vie.

La tâche des remerciements se termine et j'exprime à nouveau toute ma gratitude envers chacune des personnes qui auront croisé ma route un jour et qui ont fait de cette thèse une réalité. J'espère n'avoir oublié personne et je garderais en mémoire les bons moments partagés avec chacun d'entre vous.

Introduction

Ce projet ANR est né d'une collaboration entre l'équipe du Laboratoire de Bio-imagerie et Pathologie (LPB) de l'Université de Strasbourg et l'équipe Lumière, nanomatériaux et nanotechnologie (L2n) de l'Université de Technologie de Troyes afin de soutenir les découvertes récentes en biologie par les nanotechnologies. Le LPB travaille sur la meilleure compréhension des phénomènes d'épigénétique, science émergente qui concerne l'expression des gènes de l'ADN, et qui demande de travailler à petites échelles avec des limites technologiques encore importantes. En effet, l'ADN est un composé biologique de quelques nanomètres, qui, pour être observé, doit contenir un marqueur fluorescent et rester dans un milieu biologiquement stable. Afin d'augmenter le signal de détection, l'option de l'exaltation de la sonde fluorescente par la proximité d'un objet nanométrique métallique est envisagée par les deux équipes. Le projet a pour objectif la fabrication de nano-capteurs, constitués d'ADN fluorescent relié à une nanoparticule métallique. Pour des raisons de compatibilité biologique, la contrainte majeure est la gamme spectrale d'étude, qui devra concerner le domaine UV.

Par conséquent, ce manuscrit présente les différentes étapes de conception du capteur. Le premier chapitre introduit tous les phénomènes scientifiques du projet, la biologie de l'ADN, la fluorescence exaltée et la plasmonique, ainsi que la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) permettant l'étude photo-physique de nano-capteurs fluorescents. Le deuxième chapitre présente le développement d'une nouvelle synthèse de nanoparticules d'aluminium colloïdales, avec l'utilisation de la sonochimie et de la solvochimie. Dans le troisième chapitre, nous développons la construction d'un microscope confocal, adapté à la plasmonique UV, et permettant l'observation à l'échelle de la molécule unique. Le quatrième chapitre utilise la FCS sur un nano-capteur visible, pour mieux comprendre les phénomènes d'exaltation de la fluorescence par les métaux. Enfin, le cinquième et dernier chapitre présente la fabrication du capteur, en liant l'ADN et l'aluminium par voie chimique, ainsi que la première phase de test.

Chapitre 1

La nanotechnologie pour la biologie

Sommaire

I	ADN et épigénétique	9
I.1	Structure et composition d'un brin d'ADN	9
I.2	Le mécanisme d'expression des gènes	10
I.3	Le phénomène d'épigénétique	13
II	La fluorescence	14
II.1	Le diagramme de Jablonski	14
II.2	Fonctionnement des fluorophores	15
II.3	Application à la biologie	17
III	Plasmonique et exaltation de fluorescence	18
III.1	Définition de la plasmonique	18
III.2	Exaltation de fluorescence par un métal : MEF	21
III.3	Application pour les capteurs	24
IV	Le cœur du projet : la plasmonique UV	25
IV.1	Le choix d'un fluorophore UV	26
IV.2	Le choix de l'aluminium	26
IV.3	Objectif du projet	28
V	La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence : FCS	29
V.1	Histoire de la technique	30
V.2	Modèle théorique	31
V.3	Applications	32

I ADN et épigénétique

I.1 Structure et composition d'un brin d'ADN

L'Acide DésoxyriboNucleique, ou plus couramment ADN, est une célèbre macromolécule présente à l'intérieur de l'organisme de tout être vivant et indispensable à la vie. Elle a été découverte dans les années 1870 par un biologiste nommé Friedrich Miescher, lorsqu'il a réussi à l'extraire du noyau d'un globule blanc [1]. Elle est composée de deux brins antisymétriques, dont le squelette est en sucre et phosphate, enroulés en structure hélicoïdale (figure 1.1). Ils sont appareillés par des ensembles moléculaires fonctionnant en binôme, nommés nucléotides ou bases azotées. Les deux brins possèdent à leurs extrémités deux terminaisons, 3' et 5', schématisées dans la figure 1.1 A, toujours associées en configuration antisymétrique. Les nucléotides sont aux nombres de quatre : Adénine (A) et Thymine

(T) : les purines ; Cytosine(C) et Guanine (G), les pyrimidines. L'adénine se lie à la thymine par deux liaisons hydrogène et la cytosine, à la guanine par trois, selon les règles d'appariement de Waston-Crick [2]. Dans sa configuration classique, l'hélice de l'ADN fait un tour complet avec 10,5 paires de nucléotides et la distance estimée entre deux paires de nucléotides est de 0,34 nanomètre. La configuration de l'ADN dépend grandement de son milieu, il peut être linéaire ou en boucle. C'est pourquoi il est souvent conservé *in vitro* dans un tampon salin neutre, le PBS (Phosphate Buffer Saline), dont le taux de sel et le pH lui sont idéaux pour sa conservation. Par ailleurs, de nombreuses expériences ont démontré sa destruction partielle ou complète lorsqu'il est immergé dans des alcools ou autres solvants non aqueux [3]. Les deux brins peuvent être séparés, en brisant les liaisons hydrogène liant les nucléotides, par la chaleur ou l'exposition prolongée aux rayons ultraviolets [4]. On parle alors de dénaturation de l'ADN et de la formation de deux monobrins.

Depuis le premier protocole de Sanger et Coulson en 1975, l'ADN peut être fabriqué en laboratoire, selon des méthodes précises de séquençage génétique, soit en répliquant des fragments d'ADN existant, soit en associant chimiquement les nucléotides entre eux [5].

L'enchaînement des nucléotides définit le code génétique, une séquence unique à chaque être vivant et qui régit tout le fonctionnement du corps humain. Certains enchaînements de bases azotés sont en réalité des codes pour la transcription, comme nous le verrons dans la partie suivante. Dans le corps humain, la longueur de l'ADN est estimée à 143 milliards de mètres, dont 1,9 mètres à l'intérieur d'une seule cellule. Il est donc en réalité compacté par des protéines, nommées histones, sous forme de chromosomes (figure 1.1 B). L'ADN vient s'enrouler en bobine autour des histones, puis les histones se relient entre elles en formant des nucléosomes qui formeront à leur tour, un chromosome.

Aujourd'hui, bien que longuement étudié, il existe toujours des zones d'ombre sur le fonctionnement de l'ADN, et les recherches continuent, comme nous le verrons avec le phénomène d'épigénétique, présenté en troisième sous partie.

I.2 Le mécanisme d'expression des gènes

Nous avons vu ci-dessus comment fonctionne un brin d'ADN. Nous allons voir ici les mécanismes d'expression des gènes de l'ADN, dans le cadre du corps humain [6]. L'expression des gènes, c'est la transcription des séquences d'ADN, par l'ARN messenger en outre, sous forme de protéines. Ces mécanismes étant assez complexes, ils comportent une multitude d'étapes et d'intervenants protéiques, le modèle présenté sera donc un modèle simplifié.

La transcription commence dans le noyau lorsqu'un complexe de protéines va venir lire la séquence du brin d'ADN en glissant dessus. Elle détecte alors un promoteur, soit un enchaînement précis de nucléotides assez court, étant perçu comme un feu vert par le corps humain. Par exemple, l'enchaînement TATA est un déclencheur majoritaire. Ensuite, une protéine nommée ARN polymérase va venir ouvrir l'ADN, le séparer en deux brins, et copier la séquence (figure 1.2). Ce mécanisme fait intervenir d'autres protéines pour contrôler, corriger et fournir l'énergie nécessaire. À la suite de cette première étape, un ARN prémessager est formé. On parle ici de séquence immature puisque la réplication est exacte et que le brin contient aussi bien les séquences correspondants aux gènes (exons) que les séquences d'initiations ou de terminaisons (introns). C'est à ce niveau que certains nucléotides sont méthylés pour être exclus lors de la transcription. Nous verrons par la suite que cette étape est importante pour l'épigénétique.

Il y a une deuxième étape, toujours dans le noyau, qui va permettre de fabriquer l'ARN messenger

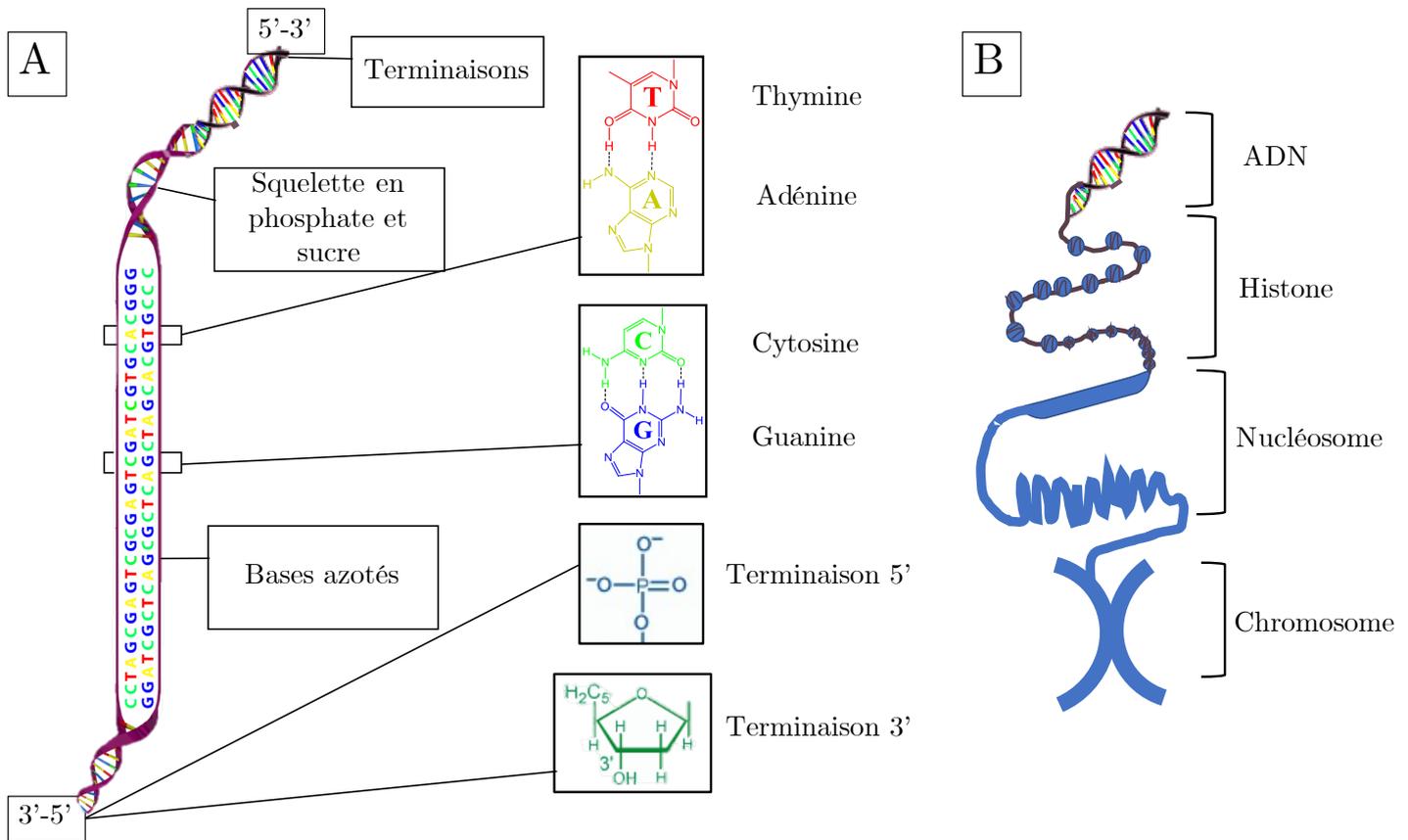


FIGURE 1.1 – Schéma sur la structure de l'ADN. En A, illustration de la composition d'un double brin et en B, compactage de l'ADN en chromosome.

final, nommée maturation. Cette étape comporte trois sous étapes : l'épissage, le coiffage et la polyadénylation. L'épissage clive la séquence pour extraire les introns et rassembler les exons, afin de conserver seulement la partie codante du code génétique (figure 1.2). Le coiffage est l'action d'ajouter une séquence de terminaison à l'extrémité du brin (du côté 5') et la polyadénylation ajoute seulement des adénines, au bout de la terminaison 3'. Ces deux dernières étapes ont plusieurs fonctions : la protection de l'ARN messager, l'aide au recrutement de protéines pour la suite du processus ou encore l'aide à la mobilité.

À la suite de cela, l'ARN messager est prêt et va migrer en dehors du noyau pour initier l'expression des gènes. Il y a trois acteurs principaux dans cette traduction : l'ARN messager, les ARN T et les ribosomes. La figure 1.3 illustre cette étape : l'ARN messager va être lu par le ribosome, qui va recruter l'ARN T correspondant à la séquence donnée, afin qu'il puisse se fixer sur l'ARN messager avec un système codon/anticodon. L'acide aminé correspondant au code sera alors libéré et attaché aux autres dans le ribosome. C'est la combinaison des différents acides aminés qui forment une protéine. Les acides aminés primaires du corps humain sont au nombre de 20 (dont 9 provenant de notre alimentation) ce qui permet de former une très large diversité de protéines. Et c'est ainsi que se termine la transcription de l'ADN. Les protéines formées vont définir la fonction de la cellule dans laquelle elles ont été formées.

L'assemblage de l'ADN sous forme de chromosomes n'est en réalité pas réalisé au hasard. Selon les cellules, certains gènes seront davantage disponibles pour la transcription. Ainsi, un globule rouge

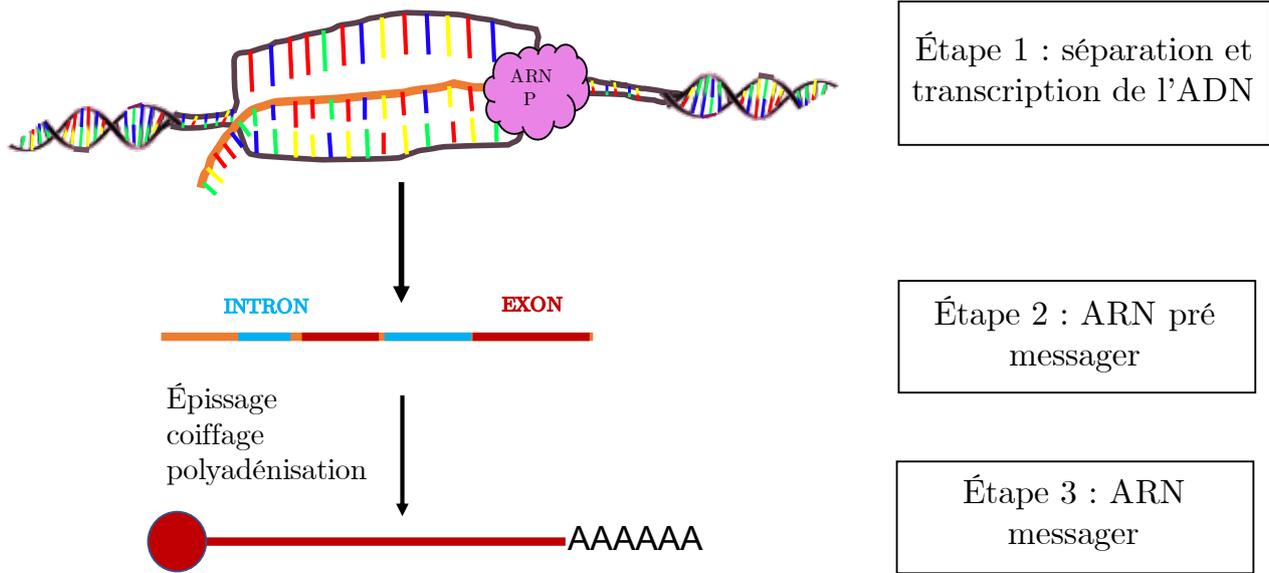


FIGURE 1.2 – Schéma sur la réplication de l’ADN. En 1, illustration de la séparation et réplication de l’ADN par la protéine ARN polymérase. En 2, structure de l’ARN prémessager avec des exons et des introns et les séquences non codantes en orange. En 3, structure de l’ARN messager, avec seulement les exons, et les coiffes en 5’ et 3’.

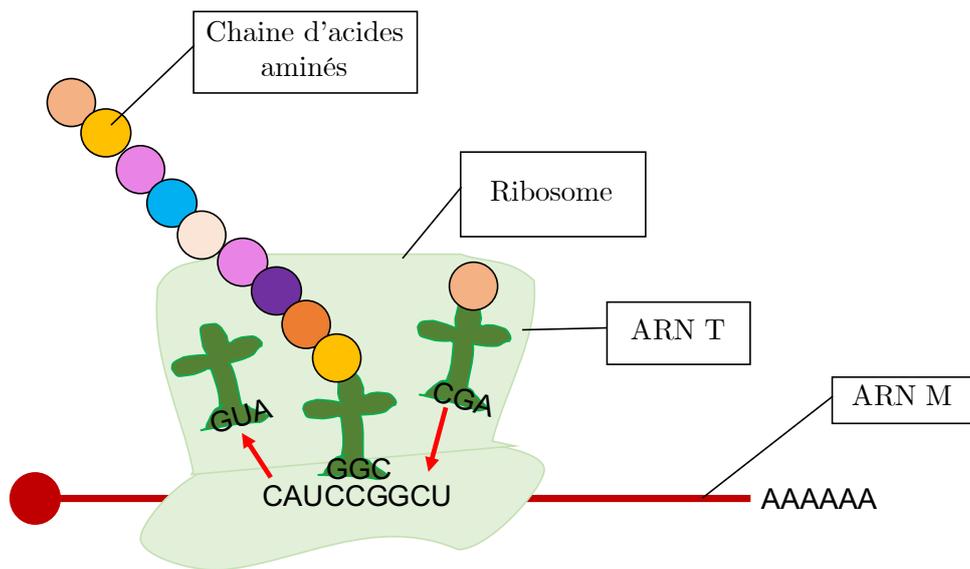


FIGURE 1.3 – Schéma sur la transcription de l’ARN messager par le ribosome et les ANR T. Le ribosome lit la séquence, recrute le bon ARN T qui vient se fixer sur l’ARN messager avec son codon et libérer l’acide aminé correspondant. Le ribosome assemble les acides aminés en chaîne et forme une protéine.

et un neurone ont le même ADN dans leur noyau, mais l’expression des gènes en protéines sera différente. Le globule rouge aura pour rôle de transporter l’oxygène dans le corps humain tandis que le neurone devra transmettre des informations avec des impulsions électriques. C’est ce point que l’on appelle l’épigénétique, un phénomène particulier, expliqué dans la partie suivante, qui est au cœur de notre projet.

I.3 Le phénomène d'épigénétique

Derrière le mot épigénétique, il existe tout un panel de définitions comportant le futur de la biologie, selon la publication de M. Adrian Bird [7].

Nous avons vu précédemment la structure de l'ADN et les phénomènes de sa retranscription en protéines, dans le cadre classique du corps humain. Cette retranscription est tellement bien organisée qu'elle permet de différencier les fonctions de nos cellules, bien qu'elles contiennent toutes un ADN identique.

Dans la nature, il y a aussi un autre exemple très parlant venant du même phénomène, la transformation d'une chenille en papillon. En effet, la chenille et le papillon ont le même ADN, puisqu'ils sont un seul et même être vivant. Pourtant, ils sont physiquement très différents. Cela est dû à la modification dans l'expression des gènes, qui intervient lors de la période chrysalide. L'ADN reste le même, mais son organisation au sein des chromosomes est modifiée, pour libérer de nouveaux gènes, codants par exemple, les protéines fabriquant les ailes. C'est un cas d'épigénétique : ce n'est pas une modification génétique de l'ADN mais un changement dans l'expression de l'ADN. Couramment, on appelle donc épigénétique tous les phénomènes entraînant des remaniements dans l'expression de l'ADN.

Certains scientifiques ajoutent une dimension supplémentaire, avec le côté environnemental du processus. Il ne s'agit plus de rester dans le cadre d'une modification classique comme le papillon, mais d'une modification imposée par l'environnement [7]. C'est ainsi que deux jumeaux, ayant le même ADN, vont développer des caractéristiques très distinctes s'ils sont élevés séparément, dans deux endroits du monde. L'un d'eux pourra développer une maladie telle que le diabète ou la dépression contrairement à l'autre[8].

Concrètement, la modification se fait à deux niveaux : dans le cadre du compactage de l'ADN en chromosomes, sur les histones, et dans le cadre de la méthylation de la cytosine. Pour la première option, il faut simplement retenir que tout l'ADN n'est pas disponible à la lecture lorsqu'il est compacté et que ce compactage peut être influencé par l'environnement. C'est ainsi que des gènes qui ne devraient pas être accessibles à la traduction le deviennent, entraînant par exemple des maladies génétiques. Pour la seconde option, celle qui nous intéresse, il s'agit de la modification d'un nucléotide par l'environnement. L'enchaînement cytosine méthylée et guanine, dit CpG, est une séquence qui lance la transcription (un promoteur, comme celle TATA, citée précédemment). En temps normal, cette séquence est présente avec un facteur de 1/100, mais l'environnement peut influencer cette méthylation et ramener le facteur à 1/10. Le marqueur méthyle entraîne une sortie du gène de la structure de l'ADN, ce qui provoque ici la traduction de séquence d'ADN supplémentaire, non souhaitée.

Cette thèse a pour objectif final la visualisation de l'impact environnemental sur ce procédé. Pour cela, un brin d'ADN contenant une séquence CpG sera étudié, avec la sortie du nucléotide méthylée de l'ADN par une combinaison de protéines spécifiques : SRA et UHRMF1. La figure 1.4 présente un schéma simplifié de ce processus, en localisant l'action de chacune des protéines. Comme ce phénomène est difficile à observer, il est indispensable d'ajouter des fluorophores dans l'ADN pour le rendre plus visible. C'est pourquoi nous présenterons dans la partie suivante, la définition de la fluorescence et le fonctionnement des sondes fluorescentes.

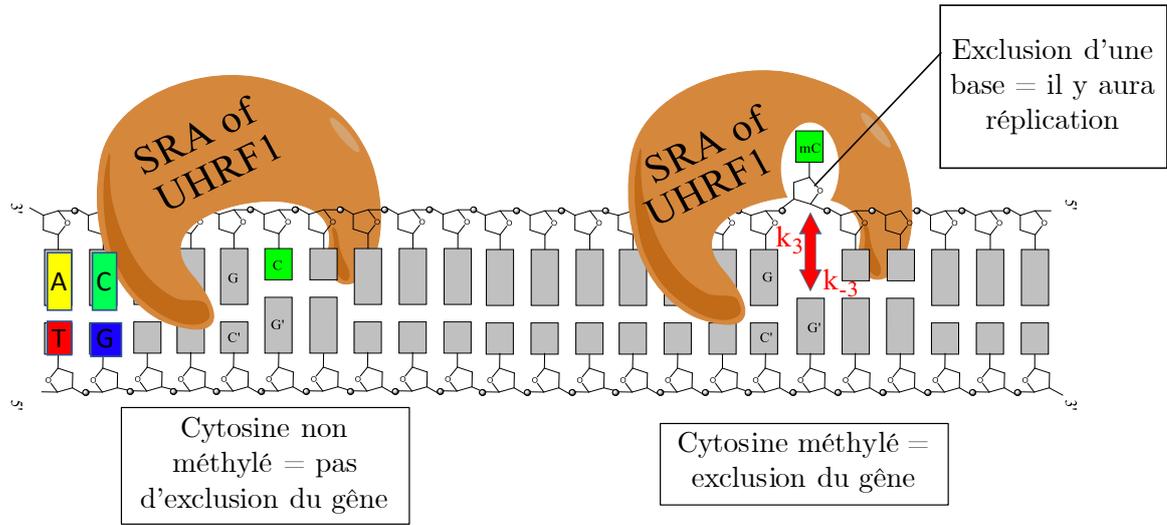


FIGURE 1.4 – Schéma de l'exclusion de la cytosine méthylée par l'ensemble protéique SRA - UHRF1.

II La fluorescence

Nous avons vu précédemment la structure de l'ADN et sa réplication. En biologie, pour observer l'ADN et les différents processus biologiques associés, il est nécessaire de rajouter un fluorophore. Cette partie traitera donc de la définition de la fluorescence et du fonctionnement des molécules fluorescentes.

II.1 Le diagramme de Jablonski

La fluorescence est incluse dans un panel de terme concernant l'émission de photons, regroupés sous le terme général de luminescence. Il s'agit d'une émission de photons en réponse à une excitation moléculaire non engendrée par une énergie thermique [9]. Par exemple, dans cette catégorie se trouve également la sonoluminescence, produite lors de la génération d'ultrasons en solution, comme décrit dans le chapitre 2. Pour la fluorescence, cette excitation est d'origine lumineuse, souvent apportée par un laser.

Dans les années 30, un physicien polonais nommé Aleksander Jablonski [10] propose un diagramme pour décrire physiquement ce phénomène de fluorescence, pouvant intervenir dans certaines molécules organiques. Ce diagramme est composé d'au minimum trois niveaux, représentant les états énergétiques des électrons de la molécule : l'état initial S_0 (initialement N), l'état excité singulet S_1 (initialement F) et l'état excité triplet T_1 (initialement appelé M pour métastable).

Il définit ainsi le mécanisme cyclique de la fluorescence où un électron excité par un photon, va passer dans l'état excité S_1 pour redescendre par la suite à l'état initial S_0 , en émettant un photon provoquant la fluorescence de la molécule. Cette transition est associée à une durée temporelle précise dépendant de la nature de la molécule. Une autre voie de désexcitation est également possible, en passant par l'état triplet. Cette voie est plus longue temporellement, car elle induit un changement

d'orientation du spin de l'électron, dit changement de multiplicité des spins. Le spin est utilisé en chimie quantique pour définir les transitions électroniques autorisées ou interdites [11]. Pour le niveau triplet, deux électrons de valence sont dans un état parallèle sur T1 (figure 1.5, case verte). Lors de la relaxation d'un électron de l'état triplet vers l'état singulet S0, il n'y a pas d'émission de photon (dans les molécules organiques). On parle alors de transition non radiative.

La figure 1.5 présente une schématisation du diagramme de Jablonski, avec toutefois des données complémentaires au diagramme initial, ajoutées au fil du temps par d'autres photo-physiciens ayant poursuivi son travail [12]. Le diagramme comporte deux niveaux supplémentaires, S_n et T_n, correspondant à des niveaux d'énergies supérieurs. Le nombre de niveaux n pouvant varier d'une molécule à l'autre. Aussi, chacun des niveaux comporte en réalité plusieurs sous niveaux, correspondant à des états vibrationnels où l'électron peut subir plusieurs pertes d'énergie sous forme de relaxation non radiative. Sur la figure 1.5, les transitions non radiatives sont en pointillées et les transitions radiatives sont en traits pleins. Pour la relaxation de l'état triplet T1 vers l'état singulet S0, une transition supplémentaire radiative peut être ajoutée pour certains types de composants, comme les oxydes métalliques : c'est la phosphorescence.

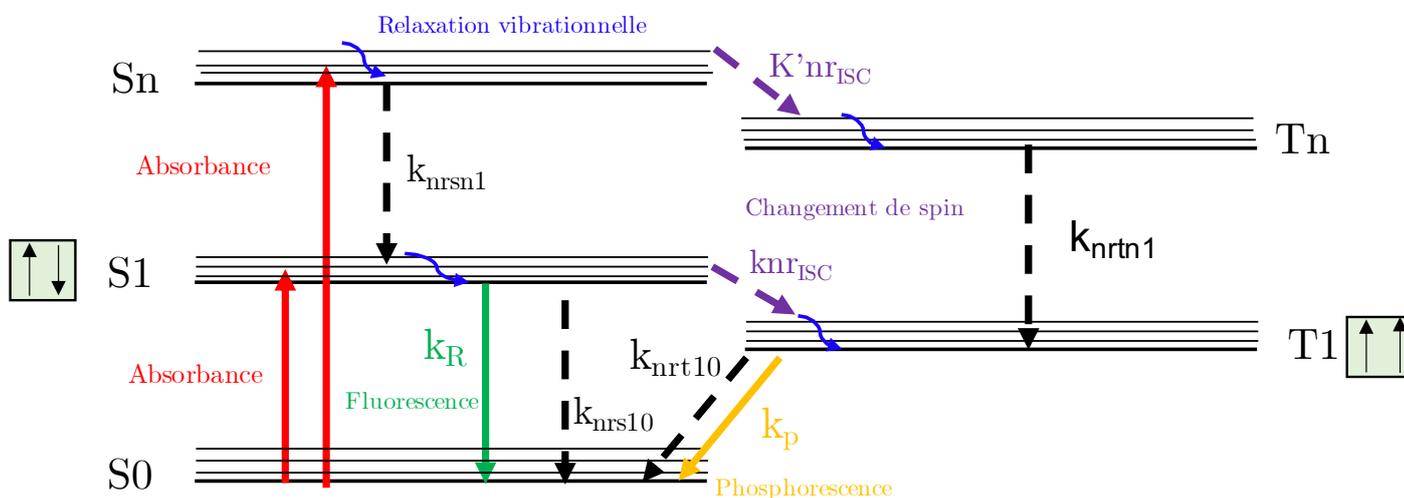


FIGURE 1.5 – Schéma du diagramme de Jablonski.

C'est à partir de ce diagramme définissant toutes les transitions électroniques possibles que les molécules fluorescentes sont décrites, comme nous allons le voir dans la partie suivante. Ce processus de fluorescence ne se fait pas uniquement pour un électrons, mais pour plusieurs électrons et continus de manière cyclique si la source d'excitation est toujours présente, jusqu'à la photo-dégradation de la molécule.

II.2 Fonctionnement des fluorophores

Les premières observations de la fluorescence ont eu lieu bien avant le travail de Jablonski puisque la nature contient un nombre important de molécules fluorescentes. Par exemple, en 1845, l'observation de la fluorescence bleutée d'une solution de quinine par Sir Herschel entrainera les premiers questionnements sur le sujet. Plus tard, en 1979, l'isolation de la GFP, protéine fluorescente verte produite par la méduse *Aequorea Victoria*, permettra au scientifique O. Shimomura d'obtenir un prix Nobel de chimie en 2008 [13]. En effet, l'utilisation de ces molécules en biologie est devenue rapidement incontournable, permettant de visualiser des phénomènes jusqu'alors invisibles avec les

techniques de l'époque.

Les molécules fluorescentes organiques contiennent en majorité des cycles aromatiques et des liaisons de type π permettant la délocalisation des électrons. Elles sont regroupées en deux familles : les fluorophores intramoléculaires, comme la chlorophylle et les fluorophores extrinsèques. Ils peuvent être liés à toutes molécules non fluorescentes pour les rendre visibles et sont regroupés par similitude morphologique, comme les cyanines, rhodamines ou encore xanthènes. Il existe également des molécules fluorescentes non organiques, comme les boîtes quantiques, qui ont un fonctionnement légèrement différent et dont nous ne parlerons pas dans ce manuscrit [9].

Un fluorophore est défini dans un premier temps par ses spectres d'absorption et d'émission de fluorescence (figure 1.6 A). Le profil des pics est associé aux transitions électroniques entre les états d'énergie, comme présenté sur le diagramme de Jablonski [12]. Le décalage entre les deux pics dominants, appelé déplacement de Stokes, est dû au principe de Franck-Condon [12]. Lorsque la molécule est excitée, elle subit un déséquilibre énergétique qui entraîne l'interdiction de certaines voies de relaxations. Sans cette interdiction, les profils d'absorption et d'émission auraient été parfaitement symétriques.

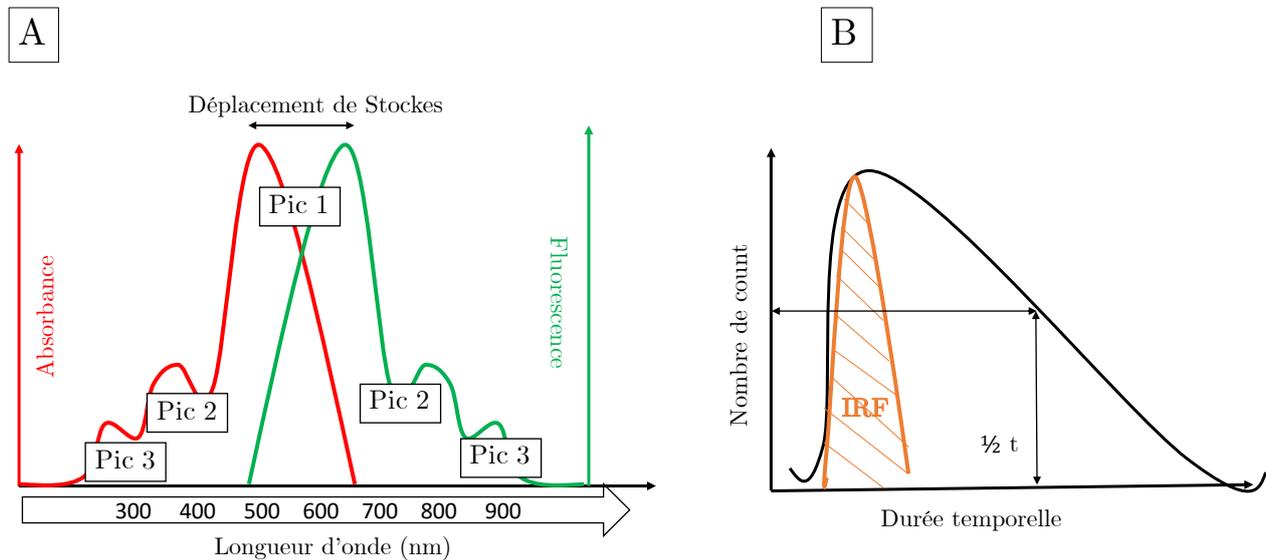


FIGURE 1.6 – En A, schéma des courbes d'absorbance en rouge et de fluorescence en bleu d'un fluorophore. En B, illustration d'un profil de durée de vie

En exprimant le spectre d'absorbance en fonction de l'extinction molaire à l'aide de la loi de Beer Lambert, il est possible de remonter à la section efficace ε du fluorophore, selon la formule 1.1. N_a représente le nombre d'Avogadro, C la concentration en mol/cm^3 , l la longueur de la cuve en cm et A l'absorbance. Pareillement, en modélisant le spectre de fluorescence, il est possible d'obtenir la section efficace de fluorescence du fluorophore.

$$\sigma_{abs} \approx \frac{2303}{N_a} \times \varepsilon \approx \frac{2303}{N_a} \frac{A}{C \times l} \quad (1.1)$$

Ces données permettent de remonter à un terme caractérisant la probabilité de la transition électronique S1-S0 : le rendement quantique ϕ . La formule 1.2 définit ce terme avec des notations des transitions du diagramme de Jablonski. k_r est la transition radiative de S1 vers S0. k_{nr} représente les transitions non radiatives, soit la somme de la transition non radiative de S1 vers S0 (figure 1.5,

knrs10) et de S1 vers S0 en passant par T1 (figure 1.5, knrisc et knrt10). C'est un paramètre important pour caractériser un fluorophore puisqu'il permet d'évaluer l'efficacité de la fluorescence. Par exemple, le fluorophore Rhodamine 6G à un rendement quantique proche de 100%, d'où sa fréquente utilisation dans les recherches [14] [15] .

$$\phi = \frac{kr}{kr + knr} \quad (1.2)$$

$$\tau = \frac{1}{kr + knr} \quad (1.3)$$

Enfin, on ajoute une autre caractéristique, temporelle, le temps de vie τ , donné par la formule 4.16. Pour obtenir cette valeur, le nombre de photons émis après une impulsion lumineuse est mesuré sur une durée temporelle. Graphiquement, on observe alors une courbe telle que représentée dans la figure 1.6 B, qui assimile le temps de vie comme le demi-temps d'émission [16]. Pour mesurer précisément cette donnée, des logiciels retirent la partie dite IRF (pour Instrument Response Function en anglais), soit le signal du pulse laser en orange sur le schéma, et modélisent l'aire de la courbe. Ces temps de vie sont en général de quelques nanosecondes : la rhodamine 6G à un temps de vie d'environ 4 nanosecondes dans l'alcool tandis que le temps de vie de la GFP est d'environ 3 nanosecondes à pH=8.

Immanquablement, le comportement des électrons d'une molécule étant fortement influencé par l'environnement, tous ces paramètres sont uniques à une situation. Dès lors que le solvant change ou que le fluorophore est greffé à une autre molécule, tout est modifié [17]. Par exemple, dans la publication de Magde et al. [17] qui étudient la fluorescence de la Rhodamine 6G dans neuf solvants, le temps de vie passe de 4,3 nanosecondes dans l'eau dopée au deutérium à 3,8 nanosecondes dans l'octanol. Dans la littérature, l'objectif de nombreuses recherches est d'optimiser la fluorescence des molécules organiques en obtenant un rendement quantique maximal et souvent un temps de vie minimal, tout en conservant une excellente stabilité. Tout cela à pour but de pouvoir utiliser un fluorophore comme marqueur d'expérience pour des capteurs ou de l'imagerie, comme nous le verrons dans la partie suivante [18].

II.3 Application à la biologie

L'intérêt premier des fluorophores est leur utilisation dans le domaine de la biologie.

Ils ont été utilisés initialement pour faire de l'imagerie cellulaire pour déterminer le fonctionnement interne des cellules. Par exemple, une publication dans le journal Nature de 1988 par Paul J. Sammak et Gary G. Borisy [19] démontre par imagerie de fluorescence le rôle des microtubules, des constituants participant à la reproduction cellulaire. Pour cela, ils ont attaché de la Rhodamine à des microtubules, puis les ont réinjectés dans une cellule . Les spécificités chimiques des fluorophores permettent également de marquer plusieurs composants cellulaires à la fois, pour obtenir une imagerie avec plusieurs couleurs, comme dans la publication de C.D Hu et T.K. Kerppola [20]. Ils ont réussi à marquer simultanément 12 protéines dans une seule cellule et ainsi à permettre l'observation des interactions entre ces protéines .

Le plus intéressant pour notre projet concerne les études de fixation de fluorophores sur l'ADN. En effet, comme préalablement démontré, l'ADN est une macromolécule complexe et difficile à observer seule. En y ajoutant un fluorophore, de nombreuses expériences sont devenues possibles, allant de la simple observation des mécanismes de son fonctionnement à l'utilisation de sa structure pour faire des

nanorobots. La thèse de C. Allain [21] présente les différents types de marquages de l'ADN par des sondes fluorescentes, que ça soit de manière non covalente ou covalente. Concernant les techniques de greffage non covalent, la méthode la plus courante est l'utilisation de sondes fluorescentes aromatiques, qui en raison de leurs structures, vont venir s'intercaler dans l'ADN, au niveau du squelette, en formant des ponts hydrogènes (liaisons π). Une molécule bien connue de ce type est le bromure d'éthydiu. Pour les techniques de greffage covalent, les agents alkyles ou sels de platine font office de ponts entre le fluorophore et les nucléotides. Il existe aussi des nucléotides artificiels modifiés pouvant agir comme fluorophore. Actuellement, les entreprises qui fabriquent de l'ADN proposent de multiples combinaisons fluorophore-ADN en utilisant les sites de fixations présents à l'extrémité des brins, au niveau des terminaisons 3' et 5'.

Aujourd'hui, pour soutenir les marquages en biologie avec des fluorophores, la microscopie de fluorescence s'est développée. La technique de corrélation de fluorescence, dite FCS en est un exemple (partie 5 de ce chapitre). Cependant, le marquage utilisant un unique fluorophore a rapidement démontré ses limites. Les fluorophores ne sont pas assez stables pour maintenir des expériences sur le long terme ou même assez lumineux pour distinguer clairement les paliers d'intensité. C'est pourquoi, lorsque les scientifiques ont observé que les sondes fluorescentes pouvaient être facilement exaltées à proximité des métaux, tout un nouveau domaine d'étude s'est créé. Il relie biophysique et plasmonique et est désigné sous le nom de MEF, soit Metal Enhanced Fluorescence en anglais. La partie suivante aborde cette question : la plasmonique des nano-objets métalliques et leurs capacités à stimuler la fluorescence.

III Plasmonique et exaltation de fluorescence

Nous avons vu précédemment le fonctionnement des molécules fluorescentes organiques et leurs rôles dans l'observation des mécanismes de l'ADN. Cependant, la fragilité de ces fluorophores ne permet pas d'obtenir un signal suffisant pour les expériences les plus poussées. C'est là qu'intervient la plasmonique et le lien entre la nanotechnologie et la biologie. Un métal, à l'échelle nanométrique, en raison de sa capacité à former des plasmons sous excitation lumineuse, va venir exalter la fluorescence, ce qu'on appelle couramment MEF. C'est avec cette technique que les études sur le fonctionnement de l'ADN se sont aujourd'hui considérablement multipliées, conduisant à une meilleure compréhension de la biologie des cellules.

III.1 Définition de la plasmonique

En réduisant les métaux massifs à l'échelle du nanomètre, de nouvelles propriétés physiques apparaissent, et notamment la formation de plasmons. Par exemple, l'or qui est classiquement de couleur dorée, va devenir visuellement rouge lorsqu'il est sous forme nanométrique, témoignant d'une interaction différente avec la lumière. Intrinsèquement, ce phénomène s'explique par l'absorption d'une partie des ondes électromagnétiques incidentes par le métal, entraînant une oscillation collective de ses électrons, responsable de la formation du plasmon [22]. La première explication de ce phénomène d'oscillation des électrons a été apportée par les scientifiques Tonks et Langmuir, en 1929, qui vont assimiler les métaux à un plasma [23]. À travers le modèle de gaz d'électrons libres, de Drude-Lorrenz, ils définiront la capacité des électrons libres des métaux à osciller à travers le terme de pulsation plasma ω_p , dont l'équation est décrite dans la formule 1.4, N représente la densité des électrons, m leur masse, e leur charge élémentaire et ε_0 , la constante diélectrique du vide. Ensuite, pour relier cette pulsation à une onde incidente électromagnétique, on définit un nouveau terme, la permittivité

diélectrique du métal $\varepsilon(\omega)$, donnée par la formule 1.5 où ω concerne la pulsation (fréquence) de l'onde lumineuse incidente et γ les collisions entre électrons [24] [25]. Cette permittivité est la somme de deux facteurs représentant une partie réelle et une partie imaginaire, qui décrivent les propriétés métalliques d'un matériau (équation 1.5).

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m\varepsilon_0}} \quad (1.4)$$

$$\varepsilon(\omega) \approx 1 + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\gamma} \quad \rightarrow \quad \varepsilon(\omega) = \varepsilon_{réel} + \varepsilon_{im} \quad (1.5)$$

Ces deux termes ont permis de définir le comportement des électrons, mais c'est plus tard dans l'histoire, dans les années 50, que ce phénomène est relié à l'optique. Le lien entre l'indice optique n et la permittivité du métal est introduit par la formule suivante $n = \sqrt{\varepsilon}$ [26]. Ce qui implique que la formation des plasmons est dépendante du rapport entre la permittivité du métal ω_p et la fréquence ω de l'onde incidente. Dans le cas où ω est inférieur à ω_p , la lumière incidente est réfléchiée par le métal. Dans l'autre configuration, lorsque ω est supérieur à ω_p , l'onde entre alors dans le métal avec deux options : soit l'énergie apportée est très grande et l'onde traverse le métal sans interagir avec lui, comme dans le vide; soit elle entre en résonance avec les électrons pour former un plasmon de volume.

Nous allons ici décrire les conditions d'obtention d'un plasmon en faisant la distinction entre deux catégories : le plasmon propagatif dit SPP (pour Surface Plasmon Polariton en anglais) apparaissant à l'interface entre un film métallique 2D et un diélectrique; et le plasmon localisé LSPR (Localised Surface Plasmon Resonance en anglais) apparaissant dans les nanostructures en trois dimensions, notamment les nanoparticules métalliques [22].

Historiquement, les études les plus anciennes concernent le SPP. Des scientifiques tel que A. Otto [27], Raether et Kretschmann [28] ont étudié les différentes configurations permettant d'obtenir une onde propagative à la surface d'un métal. Lorsque l'on souhaite exciter des plasmons polaritons, il faut se placer dans le cadre d'une onde électromagnétique capable de se former à l'interface entre le métal et le verre. C'est seulement possible pour une onde évanescente, exprimée d'après les équations de Maxwell selon la formule 1.6. On peut réécrire alors ω_p et ω en fonction d'un seul et même vecteur d'onde k pour respecter la conservation d'énergie selon la formule 1.7, où le terme ε_p correspond à la permittivité du milieu diélectrique environnant la nanoparticule.

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = E_0 e^{i(\omega t - \vec{k}\vec{r})} \quad (1.6)$$

$$k = \frac{\omega}{c} \times \sqrt{\frac{(\omega^2 - \omega_p^2)\varepsilon_d}{(1 + \varepsilon_d) \times \omega^2 - \omega_p^2}} \quad (1.7)$$

Graphiquement, on illustre ce phénomène avec les courbes de dispersion, comme présenté dans la figure 1.7. En traçant l'énergie d'une onde (contenant ω selon la formule $E = h\omega c^{-1}$) en fonction de son vecteur d'onde k , on obtient deux types de "courbes de lumière". Une droite pour la source lumineuse seule se propageant dans le milieu diélectrique (en bleu pour l'air et en rouge pour le verre) ou une courbe pour l'onde plasma du métal (en vert). Nous avons précisé précédemment que le plasmon apparait seulement lorsque ω est supérieur à ω_p , ce qui arrive graphiquement uniquement si le milieu diélectrique est du verre et pour une valeur de k petit. Cela s'explique par la possibilité de propager une onde lumineuse avec un angle dans du verre. En utilisant la méthode de réflexion interne totale obtenue avec un prisme, l'angle génère une onde évanescente à la surface du métal et excite le SPP [22]. Le schéma 1.8 reprend la configuration d'Otto en montrant comment le SPP est excité avec un prisme en verre sur un film métallique nanométrique.

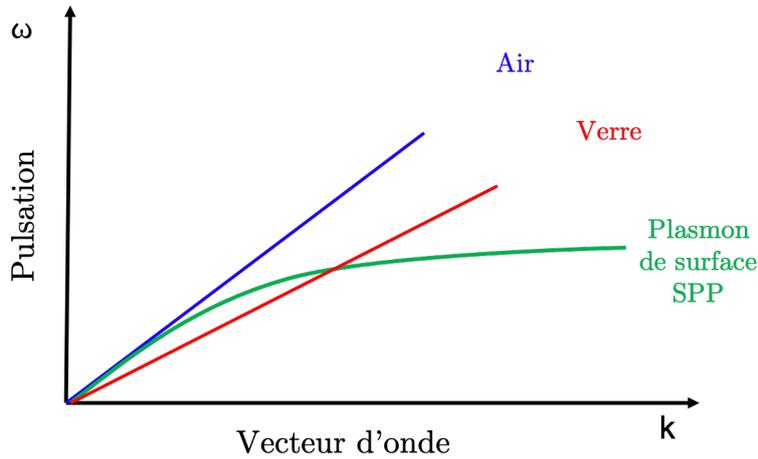


FIGURE 1.7 – Schéma des courbes de dispersion. Dispersion des photons dans l’air en bleu et dans le verre en rouge. Courbe de la dispersion plasma d’un métal lambda en verre, correspondant aux SPP

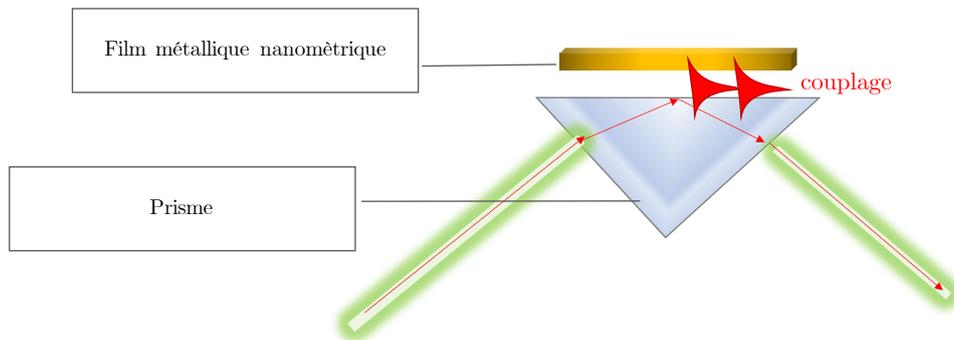


FIGURE 1.8 – Schéma de la configuration d’excitation des plasmon de surface, dit configuration OTTO. Le plasmon de surface se forme à l’interface film métallique/milieu diélectrique. L’angle d’éclairage ainsi que la distance verre-métal sont des paramètres cruciaux.

Dans les années 80, des scientifiques ont regroupé la théorie du scientifique Gustav Mie sur le comportement physique d’une nanosphère métallique et les travaux sur les ondes évanescentes pour démontrer un autre type de plasmon : le LSPR [29]. Cette fois ci, lorsqu’une onde électromagnétique arrive sur la nanoparticule, la longueur d’onde étant bien supérieure au diamètre, l’onde va être perçue par les électrons du métal comme quasiment uniforme. Il sera possible alors d’approximer l’onde incidente par une onde électrostatique (Mie utilise les équations de Maxwell pour une définition plus précise). Si les conditions sont remplies, les électrons vont alors osciller collectivement à la surface de la nanoparticule, entraînant la formation d’un dipôle électrique, comme présenté sur la figure 1.9. Un facteur de polarisabilité α de la nanoparticule est ensuite défini par l’équation 1.8, pour faire apparaître les permittivités du métal ϵ_m , du milieu diélectrique ϵ_d et du vide ϵ_0 .

$$\alpha = 4\pi\epsilon_0 r^3 \times \frac{\epsilon_m - \epsilon_d}{\epsilon_m - 2\epsilon_d} \tag{1.8}$$

Ici la génération de plasmons n’est possible que lorsque la partie réelle de la permittivité du métal est négative et que la partie imaginaire est proche de 0. La pulsation du métal ω_p se réécrit alors selon la formule 1.9, en faisant apparaître un nouveau terme de pulsation, la pulsation LSPR ω_{lspr} .

$$\omega_p = \omega_{lspr} \times \sqrt{1 + 2\epsilon_d(\omega)} \tag{1.9}$$

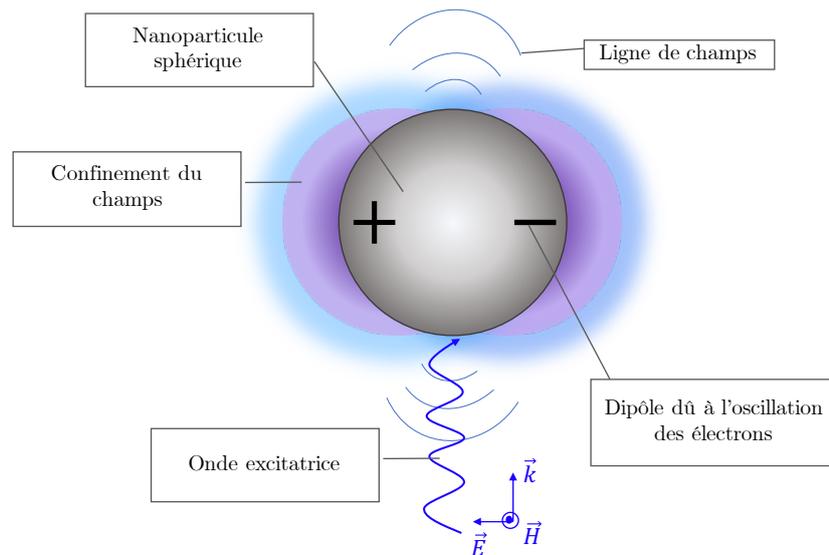


FIGURE 1.9 – Schéma du comportement d'une nanoparticule métallique sphérique face à une onde excitatrice. Les électrons vont osciller, créant un dipôle, qui va entraîner un confinement local du champs et la formation du plasmon de surface localisé LSPR.

À la suite du scientifique Gustav Mie, les études du LSPR ont été complétées pour inclure les particules ayant un diamètre supérieur à 100 nanomètres et d'autres géométries. Il a notamment été démontré dans une publication de Giannini et al. [30], le comportement du LSPR dans des nanobâtonnets d'or de 100 nanomètres de longueur sur 50 nanomètres de largeur. Le LSPR est alors confiné à des endroits précis du bâtonnet, amplifiant très localement le champ. La figure 1.10 représente un exemple de spectres d'extinction obtenu avec des nanoparticules d'aluminium de deux formes (sphères et bâtonnets) et de deux tailles (50 nm et 100 nm). Le changement de forme entraîne une modification de la réponse plasmonique et l'augmentation de taille entraîne un déplacement du pic LSPR vers le rouge.

L'avantage des nanoparticules métalliques réside dans la possibilité de générer un plasmon simplement par illumination, sans utiliser de prisme, ce qui facilite grandement son observation. De plus, le LSPR étant très sensible à la permittivité du milieu diélectrique ϵ_d entourant les nanoparticules et donc son indice optique, il est possible d'interpréter un déplacement des pics du spectre comme un signe de modification de l'environnement. Ce qui font d'elles des candidates idéales pour faire des capteurs, comme il sera présenté par la suite. Aussi, ces oscillations d'électrons engendrant un fort confinement du champ à proximité de la particule, il est possible d'utiliser la plasmonique pour exalter la fluorescence. On appelle alors ce phénomène l'exaltation de la fluorescence par un métal, dit MEF pour Metal Enhancement Fluorescence en anglais, dont le principe est développé dans la partie suivante.

III.2 Exaltation de fluorescence par un métal : MEF

C'est en 1968 que le scientifique Drexhage et ses collègues [31] vont observer le premier phénomène s'apparentant à l'exaltation de la fluorescence par le métal. En traçant des profils des temps de vie d'un complexe d'euporium à proximité d'un film métallique miroir, ils ont noté un changement remarquable dans la fluorescence. Ce changement est fortement lié à la distance entre le fluorophore et le miroir métallique. La décroissance exponentielle temporelle de la fluorescence conserve son comportement, mais se met à osciller à proximité de la surface. Lorsque cette oscillation coïncide

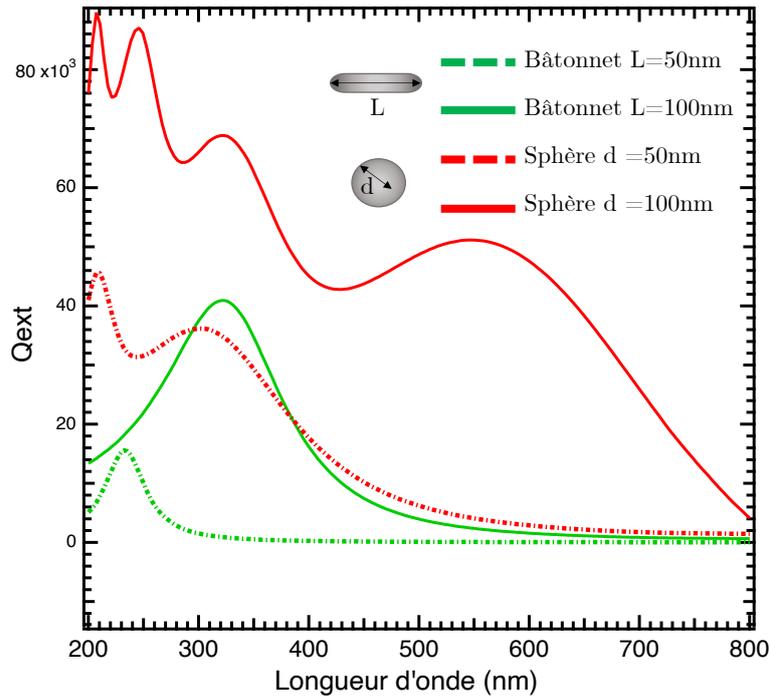


FIGURE 1.10 – Spectres d’extinction de sphère et batonnet d’aluminium, de deux tailles, 50 nm et 100 nm, simulés selon la théorie de Mie. La forme et la taille entraînent des modifications dans le spectre.

avec la pulsation plasmon du film, le temps de vie subit alors une forte diminution. Les observations de ce type vont continuer à se multiplier, sur des films ou des nanoparticules et c’est en 1998 que le scientifique Barnes [32] apporte une première explication physique en lien avec la plasmonique.

Physiquement, le phénomène MEF peut être expliquer en deux points [33] [34]. Premièrement, l’oscillation des électrons dans le métal suite à une excitation lumineuse entraine la formation d’un champ proche localisé à la surface du métal, comme expliqué précédemment. Lorsqu’un fluorophore va se trouver à proximité de cette zone, ses capacités d’absorption d’un photon vont considérablement augmenter. Ce phénomène peut être illustré via le diagramme de Jablonski, présenté dans la partie précédente. Une flèche d’absorption est ajoutée, correspondant à la contribution du métal, comme illustré sur la figure 1.11. La deuxième explication réside dans le couplage non radiatif entre le métal et le fluorophore, à des états excités. De nouvelles voies de désexcitation sont possibles, entraînant une augmentation de la probabilité de la fluorescence, autrement dit une augmentation du rendement quantique du fluorophore. La désexcitation radiative dans le diagramme de Jablonski doit alors être modifiée en tenant compte à la fois du fait qu’il y a plus d’absorption de photons incidents mais également que cette voie est favorisée par les échanges non radiatifs à haute énergie avec le métal. Cette modification est de nouveau illustrée dans la figure 1.11. Les formules de rendement quantique et de temps de vie du fluorophore présentées précédemment avec les équations 1.2 et 4.16 doivent être adaptées selon les équations 1.10 et 1.11.

$$\phi = \frac{kr + km}{kr + km + knr} \tag{1.10}$$

$$\tau = \frac{1}{kr + km + knr} \tag{1.11}$$

L’utilisation du MEF peut être réalisée sur des structures non homogènes comme dans la publication de Geddes [34], où l’exaltation est réalisée sur des îlots d’argent reposant sur un support en

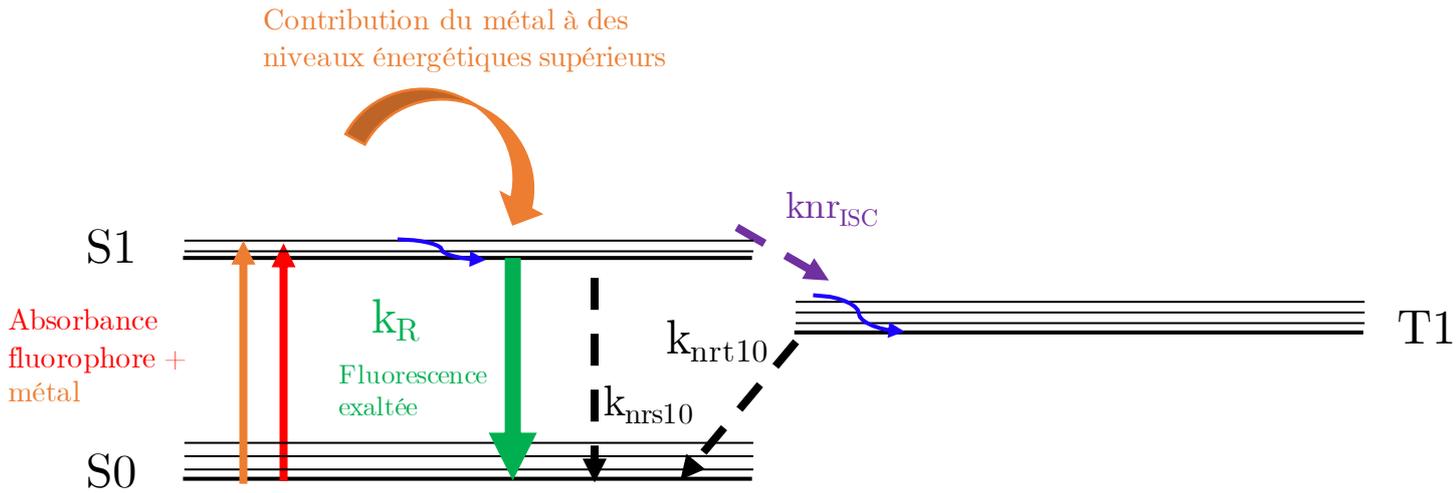


FIGURE 1.11 – Diagramme de Jablonski actualisé avec la contribution du métal. Deux phénomènes entraînent l'augmentation de la fluorescence : l'augmentation de l'absorption dû au confinement local du champs et les échanges électroniques à hauts niveaux d'énergie.

quartz de façon aléatoire. Ici, la plasmonique n'est pas optimisée puisque ni la taille, ni la position des nanoparticules d'argent ne sont contrôlées. En revanche, une exaltation est tout de même mesurée, avec un facteur de gain aux alentours de 1,2. Pour plus d'efficience, le MEF est réalisé sur des structures homogènes, comme des nanoparticules en solution ou des nanoparticules organisées sur substrat [35]. L'avantage ici est dans le contrôle de la morphologie et donc de la plasmonique, puisque la pulsation LSPR (formule 1.9) dépend fortement de ce paramètre via la polarisabilité α . Par exemple, la publication de Gabudean et al. [36] démontre une exaltation très forte de la fluorescence de la rose du Bengale lorsque celle-ci est reliée à des nanobâtonnets d'or. Ici, le facteur de gain n'est plus de 1,2 mais d'environ 2.

Aujourd'hui, deux points sont à prendre en compte pour réaliser dans les meilleures conditions du MEF : la distance entre la particule et le métal et la morphologie du métal. Il est couramment admis qu'il existe une distance "idéale" entre le métal et la sonde, entre 8 et 12 nanomètres, qui permet d'obtenir une exaltation maximale [37]. Lorsque le fluorophore est trop près (distance inférieure à 5 nanomètres) ou trop loin (distance supérieure à 20 nanomètres), il y a soit une diminution de la fluorescence, soit aucune modification [33]. Concernant la taille, les nanoparticules inférieures à 25 nanomètres auraient tendance à participer principalement à l'exaltation par l'absorption. En revanche, les nanoparticules supérieures à 25 nanomètres participeraient elles, davantage aux échanges non radiatifs à des niveaux excités dans le cas de l'or [34]. L'influence de la taille des nanoparticules est étudiée dans de nombreuses publications, comme celle de Stranik et al. [38], qui utilisent un couplage entre des nanoparticules bimétalliques or-argent et le fluorophore Rhuthénium. Ils concluent en une excitation maximale de la fluorescence pour une taille de nanoparticule de 20 nanomètres et une distance nanoparticule-métal de 8 nanomètres.

Nous avons vu précédemment comment un fluorophore pouvait être sensible à son environnement. Nous avons également démontré que le LSPR des particules est assez sensible à l'environnement proche de la nanoparticule du fait du rôle de l'indice optique dans la formule de polarisabilité α (formule 1.8). En combinant les deux par la technique du MEF, on obtient donc un ensemble très sensible aux modifications environnementales, ce qui rend ces objets idéaux pour en faire des capteurs. C'est ce qui est développé dans la partie suivante, avec notamment de nombreux exemples de capteurs

utilisant les ensembles nanoparticules-brin d'ADN.

III.3 Application pour les capteurs

Conformément à leurs sensibilités à leur environnement proche, les ensembles fluorophores-nanoparticules sont idéaux pour jouer le rôle de capteurs ultrasensibles. Un capteur est un objet qui transforme un signal physique en un autre, avec un transducteur. Par exemple, le thermomètre à mercure en est un : il transforme la variation de température (énergie thermique) en variation de pression interne (variation du volume du mercure). Dans le cas du MEF, la modification de la fluorescence est souvent due au changement d'indice de l'environnement, correspondant dans la majeure partie des cas à des greffages de molécules. Pour observer ces modifications, il est nécessaire d'utiliser des techniques de microscopie précises (confocal, FCS, raman...). Jusqu'ici, nous avons très peu développé les techniques de mesure de la fluorescence. Cette omission est volontaire puisqu'il existe de nombreuses techniques de microscopie et que seules celles qui seront pertinentes pour notre projet seront présentées par la suite, à travers les chapitres expérimentaux. Nous nous contenterons donc de présenter dans cette partie des exemples de capteurs fonctionnant avec le MEF, sans détailler les dispositifs de mesures .

En premier exemple, il est intéressant de remarquer comment le MEF a amélioré l'imagerie cellulaire, notamment dans le cadre des recherches sur les tumeurs cancéreuses. Par exemple dans la publication de Xing et al. [39], un complexe cœur-coquille comportant au cœur une nanoparticule métallique en or et en coquille, un ensemble polymères-anticorps fluorescents, a été injecté dans une souris atteinte d'un cancer. En se fixant sur les cellules cancéreuses, la protéine fluorescente va permettre de localiser les tumeurs. Quant à la présence du métal, il permet d'obtenir une augmentation par 2 du rapport signal sur bruit, permettant une meilleure qualité de détection.

À la place des anticorps, l'ADN peut être utilisé. Dans la publication de Zhou et al. [40], des nanoparticules de cuivre sont insérées dans un double brin d'ADN, permettant d'obtenir un signal fluorescent dans le visible. Cet ensemble va être utilisé pour détecter les molécules ATP, protéines participant à de nombreux mécanismes dans le corps humain. L'ATP va décrocher le brin complémentaire, annulant la fluorescence. Ainsi, en suivant le déclin de la fluorescence lorsque l'on injecte ce capteur dans une cellule ou un liquide biologique, la concentration d'ATP peut être calculée. Les expériences ont montré une efficacité de détection proche des 100% et surtout la capacité de pouvoir mesurer des concentrations très faibles, de l'ordre du picomolaire.

S'il est possible d'utiliser l'ADN comme capteur pour détecter une autre molécule, il est également possible de l'utiliser pour observer les mécanismes d'hybridation ou de dénaturation [41] [42]. Par exemple, en utilisant toutes les connaissances actuelles sur le MEF, Cheng et al. [43] ont expérimenté un dispositif mesurant l'hybridation de l'ADN via un système d'ADN hairpin. Schématiquement, cela correspond à une nanoparticule d'or reliée à un monobrin d'ADN fluorescent en forme de boucle (figure 1.12). Le monobrin d'ADN est recourbé sur la surface, donc les deux extrémités du brin sont accolées au métal. La proximité de la surface entraîne un déclin de la brillance du fluorophore présent sur l'une des extrémités. Lorsque le brin complémentaire va venir s'hybrider, le monobrin d'ADN prendra une forme linéaire rigide. Alors la fluorescence ne sera plus inactive, la sonde étant plus loin de la surface.

Toutes ces études utilisent des fluorophores extrinsèques à l'ADN, souvent greffées aux extrémités (cf partie sur les fluorophores dans la biologie). Or, lorsque l'on souhaite observer les phénomènes d'épigénétique se déroulant à l'intérieur de l'ADN, le suivi de la fluorescence intrinsèque à l'ADN est indispensable. Lakowicz et al. [44] dans une publication datant de 2001 expliquent comment ils ont

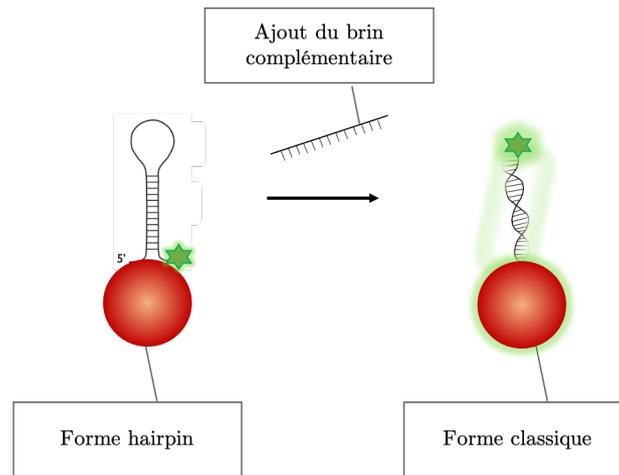


FIGURE 1.12 – *Fonctionnement d'un nanocapteur détectant l'hybridation de l'ADN, via un changement de configuration hairpin/classique.*

réussi à détecter la fluorescence naturelle des nucléotides, dans les Uvs, soit vers 280 nanomètres. Pour cela, ils ont injecté une solution d'ADN dans un micro-canal en quartz, recouvert à l'intérieur par des îlots de nanoparticules d'argent. En suivant l'intensité de la fluorescence, ils ont observé une augmentation de 80% de cette intensité. Cette publication démontre qu'il est possible d'observer la fluorescence intrinsèque de l'ADN en utilisant la plasmonique, et tout particulièrement la plasmonique UV. Or, rappelons que pour que le MEF soit optimal, il est nécessaire d'avoir un nanomatériau possédant des caractéristiques plasmoniques dans la même zone spectrale que le fluorophore [34]. L'argent qu'ils ont utilisé ici possède effectivement des propriétés plasmoniques dans le domaine des Ultraviolets.

Nous verrons alors comment utiliser la plasmonique UV en biologie pour faire du MEF. Dans un premier temps, la présentation de fluorophores UV intrinsèques à l'ADN ; dans un second temps, les métaux permettant de faire de la plasmonique UV et enfin les capteurs MEF UVs existant, ainsi que celui du projet.

IV Le cœur du projet : la plasmonique UV

Nous avons vu précédemment la définition de la plasmonique et son utilité dans l'exaltation de la fluorescence, par la technique de MEF. Les ensembles métal-fluorophore étant très sensibles à l'environnement, ils sont d'excellents capteurs pour la détection de phénomènes biologiques. Cependant, en restant dans le domaine spectral du visible, certains comportements de molécules, comme l'ADN, ne peuvent pas être entièrement décrits. C'est pourquoi de plus en plus de recherches se tournent vers la plasmonique UV, pour des applications interdisciplinaires croisant physique, chimie et biologie. C'est le cœur de ce sujet de thèse : observer les phénomènes d'épigénétique de l'ADN en étudiant un fluorophore UV intrinsèque à la molécule et une nanoparticule métallique d'aluminium.

IV.1 Le choix d'un fluorophore UV

Comme nous l'avons vu préalablement dans la publication de Lakowicz [44], l'ADN possède une fluorescence naturelle, dans le domaine des UVs aux alentours de 280 nanomètres. Cette fluorescence est difficilement mesurable, car son rendement quantique est très faible, estimé aux alentours de 10^{-5} . Même en ajoutant des nanoparticules métalliques d'argent, le rendement quantique, bien qu'amélioré par la plasmonique, reste aux alentours de 0.5. Or, on estime à 0,85 le rendement quantique d'un fluorophore idéal pour l'expérimentation [29].

Pour pouvoir tout de même observer les modifications internes de l'ADN, les scientifiques ont développé des versions modifiées de nucléotides : fluorescents et biocompatibles. La revue de W. Xu et al. [45] dans le journal Nature Communication reprend l'historique des expériences et les différents groupes de nucléotides fluorescents qui existent à ce jour. Nous décrivons ici le fluorophore UV qui est utilisé dans ce projet de thèse : le ThG.

Le ThG, de son nom complet ThienoGuanosine est une guanine modifiée par l'ajout d'un atome de soufre au sein du cycle aromatique 1. La figure 1.13 présente les deux molécules, côte à côte. Elles possèdent plusieurs configurations (tautomères), qui possèdent chacune des propriétés physiques distinctes, comme présentées dans l'article de Sholokh et al. [46]. La structure du ThG étant très proche d'une guanine non modifiée, sa biocompatibilité est excellente et le fonctionnement des cellules n'est pas impacté.

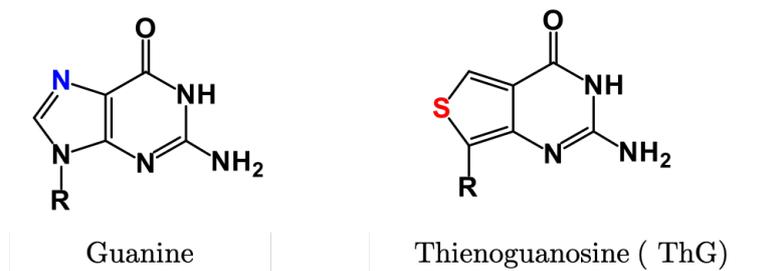


FIGURE 1.13 – Représentation d'une guanine à gauche et de son homologue fluorescent, la ThG, à droite.

Dans l'article du Killin et al. [47], dont les résultats ont permis l'écriture de ce projet, la ThG est décrite comme idéale dans le suivi des phénomènes d'épigénétiques. Notamment lorsque le suivi concerne l'exclusion de gènes au sein de l'ADN par la protéine UHRF1. Cependant, une limitation persiste, le faible rendement quantique de cette sonde fluorescence (0,54 dans une solution tampon acide) de , qui de plus, s'excite dans le domaine UV, à 320 nanomètres.

De ce point nait l'idée d'utiliser les propriétés plasmoniques de particules, et notamment de particules ayant des propriétés plasmoniques dans le domaine UV, pour exalter la fluorescence de la ThG. Ainsi, la section suivante développera notre choix de particules, qui s'est porté sur l'aluminium.

IV.2 Le choix de l'aluminium

Afin d'exalter la fluorescence de la ThG dans l'ADN, dont la longueur d'onde d'excitation se situe dans le domaine des Ultraviolets à 320 nanomètres, il était nécessaire de choisir des nanomatériaux possédant des caractéristiques plasmoniques dans l'UV.

Comme démontré précédemment, il est plus facile d'utiliser le LSPR pour des utilisations sur des capteurs en biologie. La condition pour obtenir une réponse plasmon dans les UVs est la négativité de la partie visible de la permittivité du métal $\varepsilon_{réel}$ combinée à une partie imaginaire proche de zéro. La figure 1.14 montre l'allure des courbes de permittivités réelles et imaginaires pour plusieurs métaux : l'or en rouge, l'argent en bleu, l'aluminium en vert, le cuivre en orange et le platine en rose. Ces courbes permettent de démontrer que dans le domaine des UVs, seul l'aluminium semble être un bon candidat. De plus, si l'on compare les pulsations plasma des métaux ω_p , l'aluminium est à environ 15 eV, une valeur beaucoup plus grande que l'or et l'argent qui sont aux alentours de 8 eV, ce qui confère à ce métal la possibilité de produire des plasmons sur une large gamme de longueurs d'onde d'excitation. Si l'on pense en termes de durabilité, l'aluminium a une forte durabilité et un faible coût, toujours en comparaison aux métaux nobles [48]. Enfin le dernier avantage de l'aluminium par rapport aux autres métaux, c'est sa stabilité dans le temps à l'oxydation. En effet, nativement, l'aluminium possède une fine couche d'alumine de quelques nanomètres à sa surface qui le protège et n'impacte que peu ses propriétés optiques [49] [50].

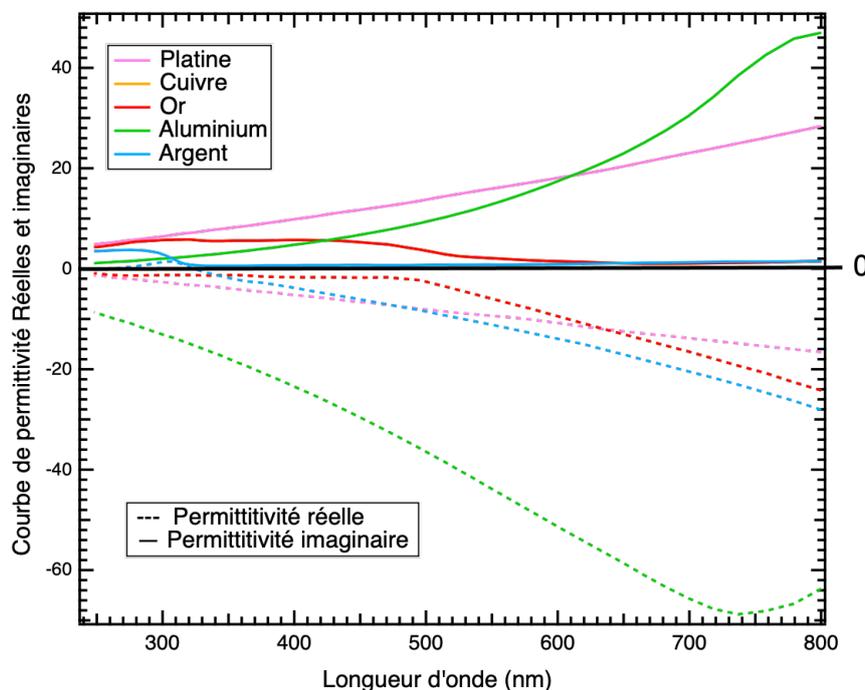


FIGURE 1.14 – Représentation des courbes de permittivités réelles et imaginaires de différents métaux : en rouge l'or, en bleu l'argent, en vert l'aluminium, en orange le cuivre et en rose le platine. L'aluminium a sa partie réelle négative et sa partie imaginaire proche de zéro uniquement dans le domaine des UVs.

La figure 1.15 illustre différentes courbes d'extinction de nanoparticules d'aluminium sphériques, obtenues avec la théorie de Mie dans l'eau. Toutes les particules ayant un diamètre inférieur à 110 nm résonnent dans le domaine des UV. Pour obtenir une résonance aux alentours de 320 nanomètres, il faudrait utiliser des particules dont le diamètre avoisine les 90 nm. Il est également possible d'obtenir ce résultat avec d'autres morphologies de particules. La publication de J. Martin et al. [51] propose une revue des différentes techniques de fabrication de l'aluminium nanométrique, avec différentes formes et résultats optiques, avec cependant une réserve sur l'utilisation de nanoparticule d'aluminium obtenues par lithographie électronique pour des expériences en biologie.

Pour finir cette partie, il est intéressant de remarquer le nombre croissant d'études s'intéressant à la plasmonique UV. Par exemple, la publication de McMahon [52] propose d'autres métaux résonnant dans l'UV, comme l'indium ou encore le palladium. Seulement, ces études restent encore purement

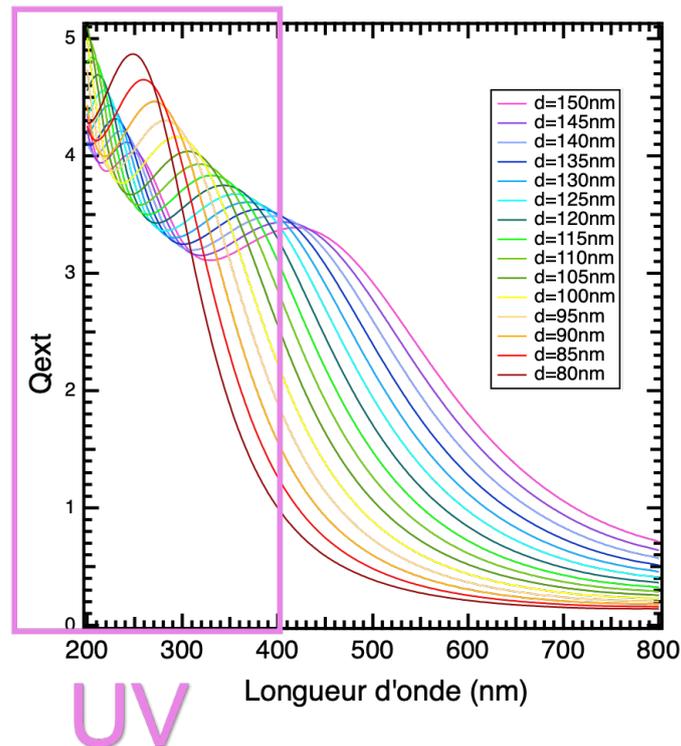


FIGURE 1.15 – Courbe d'extinction de nanoparticules d'aluminium sphériques de différents diamètres, obtenue avec la théorie de Mie

théoriques et il n'existe actuellement que très peu d'études expérimentales utilisant la plasmonique UV autrement qu'avec de l'aluminium.

IV.3 Objectif du projet

L'objectif de ce projet de thèse est de développer des nanostructures, en aluminium pour exalter la fluorescence de la ThG insérée dans l'ADN.

Dans la littérature, les publications évoquant le MEF avec de l'aluminium sont peu répandues [53]. En 2007, Ray et al. [54] démontrent l'exaltation de la fluorescence de deux nucléotides fluorescents dans l'UV, aminopurine modifiée et un dérivé du bleu courmarin, lorsqu'ils sont à proximité d'un film d'aluminium. Dans l'expérience, ce film de 10 nm est recuit et possède alors une rugosité de surface pouvant l'assimiler à des îlots, mais l'influence de la géométrie n'est pas étudiée en profondeur. En 2009 [55], la même équipe démontre l'intérêt d'utiliser des nanoparticules colloïdales pour exalter la fluorescence de ce même type de molécules à travers des simulations FDTD (finite-difference time-domain en anglais). Des résultats majeurs sont obtenus avec ces simulations. Tout d'abord, pour des longueurs d'onde de 300 à 350 nm, l'aluminium est plus efficace que l'argent. Ensuite, la taille de la nanoparticule joue un rôle important, puisque l'exaltation est plus importante avec des particules de 80 nanomètres que des particules de 20 nanomètres (un facteur de 12,5 contre 2,3). Enfin, l'orientation de la molécule fluorescente par rapport au dipôle de la particule est très importante. Dans le cadre d'une orientation parallèle, une exaltation est observée alors qu'une orientation perpendiculaire entraîne un quenching. Ils ont également démontré qu'en optimisant le confinement du champ induit

par les plasmons, par exemple en utilisant des dimères, il était possible d'exalter encore d'un niveau la fluorescence. Pour finir, dans une autre publication de 2012 [56], la distance fluorophore-aluminium est étudiée, et le maximum d'exaltation semble être obtenu à une distance de 9 nanomètres.

C'est en s'inspirant de toutes ces études et des connaissances théoriques sur le sujet que le design de notre capteur a été réalisé : une nanoparticule métallique d'aluminium, de préférence colloïdale, d'un diamètre de 80 nanomètres environ devra être reliée à un brin d'ADN fluorescent, afin que la distance fluorophore-sonde avoisine les 9 nanomètres. La figure 1.16 présente schématiquement de ce futur capteur, dont les étapes de fabrication et d'étude seront présentées au fur et à mesure des chapitres.

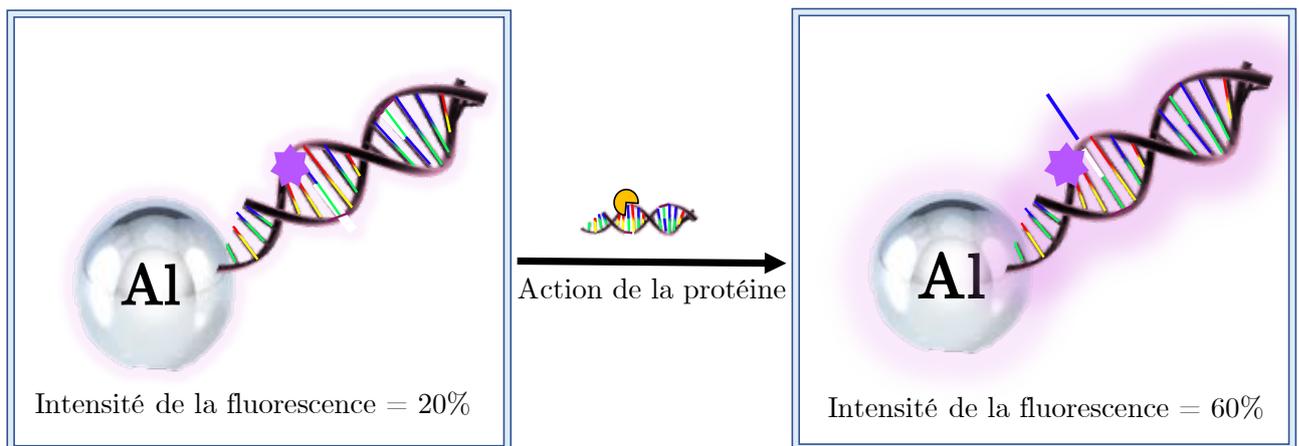


FIGURE 1.16 – Représentation du capteur : la nanoparticule d'aluminium est reliée à un brin d'ADN contenant la ThG. Lorsque le nucléotide est à l'intérieur de l'ADN, la fluorescence est légère (à gauche) et lorsque la protéine sort un nucléotide, l'intensité de la fluorescence augmente. Cette différence d'intensité est la signature du capteur.

Il reste des points méconnus dans le MEF, l'exaltation est démontrée mais la quantification de l'apport du métal dans cette exaltation est encore peu calculée. Il est nécessaire d'utiliser alors des techniques de microscopie de fluorescence adaptées à ce type de capteur. Une de ces techniques est la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) présentée dans la partie suivante et qui permet de remonter à la quantification des transitions électroniques d'un fluorophore, tout en travaillant sur de faibles volumes.

V La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence : FCS

Nous avons vu précédemment l'intérêt croissant dans les recherches actuelles pour l'étude de système impliquant des molécules biologiques et des nanoparticules. L'objectif étant d'aller toujours plus loin dans la compréhension du fonctionnement du corps humain en utilisant des capteurs précis permettant de détecter des données à l'échelle de la molécule unique. Une des techniques les plus efficaces est le suivi de la fluorescence par spectroscopie de corrélation de fluorescence FCS. Ce chapitre aborde donc l'historique et les différents montages optiques utilisant la FCS, la théorie et des exemples d'études.

V.1 Histoire de la technique

La première apparition de cette technique dans la littérature date de 1972, lorsque Madge et al. [57] ont démontré l'intercalation du bromure d'éthidium dans un brin d'ADN. L'échantillon était illuminé par un laser argon 514 nm et le signal était collecté par une photo-diode puis analysé par deux autocorrélateurs selon la méthode de corrélation développée dans la partie suivante. Cependant, la qualité de détection était mauvaise et le signal encore très bruité. Le montage a été amélioré par la suite par Rigler [58] dans les années 1990, qui a combiné FCS et microscopie confocale, permettant à la technique d'atteindre un niveau de détection à l'échelle de la molécule unique. Les objectifs sont multiples, il est possible à la fois d'analyser la photophysique des molécules en solution, par exemple la dynamique de l'état triplet d'une sonde fluorescente [59] mais aussi la chimie du milieu et notamment l'environnement hydrodynamique des molécules [60].

Classiquement, le montage est composé d'un microscope confocal, ayant pour source un laser (continu ou pulsé) et pour détecteur, un système décomptant les photons par unité de temps, comme illustré dans la figure 1.17. La technique de FCS étant étroitement liée à la microscopie, plusieurs des variantes de la technique dépendent du type de microscopie utilisé.

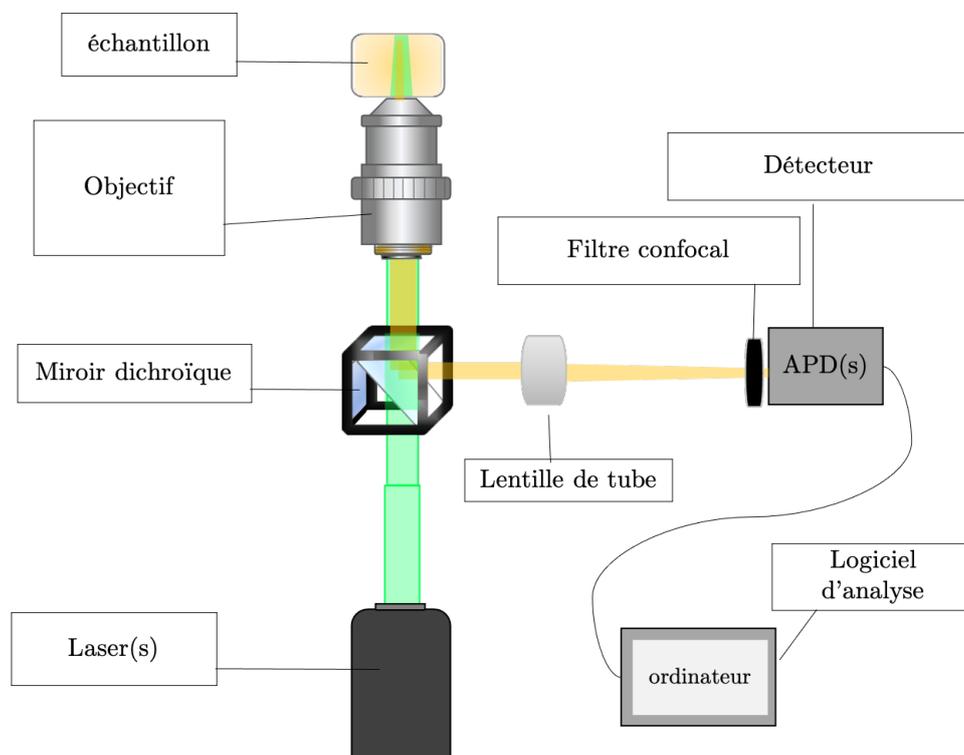


FIGURE 1.17 – Schéma type d'un montage FCS simple. Un ou plusieurs lasers sont envoyés sur un échantillon via un microscope confocal et le signal est collecté par un compteur de photons.

La FCCS, Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy en anglais, utilise par exemple deux lasers, permettant d'exciter deux fluorophores. Cette variante permet, en outre, d'étudier la signature de l'appareillage des deux monobrins d'une séquence d'ADN, en les reliant chacun à un fluorophore différent [61]. Leutenegger et al. [62] utilisent un montage TIRF-SCD-FCS, où l'illumination de l'échantillon est en FTIR, soit en réflexion totale interne, obtenue avec une illumination de type cône et un objectif adapté. Cette variante permet de diminuer le volume de mesure jusqu'à l'attolitre, soit 10^{-18} litres. Récemment, l'équipe de Moustouli et al. [63] a démontré qu'il est également possible d'obtenir des informations sur le rayon hydrodynamique de nanoparticules d'or, sans fluorophore,

avec la technique de SCS, soit Scattering Correlation Spectroscopy en anglais. Le montage optique est le même, à la différence que ce n'est pas la fluorescence qui est mesurée, mais la diffusion. Ainsi, il est possible d'obtenir des informations très précises sur la forme de nanoparticule d'or ou encore la dynamique de fixation de protéines sur celles-ci. Ce qui nous intéressera sur ce projet est la FCS de saturation, dit FCSS, permettant de mesurer précisément les transitions électroniques d'un fluorophore, en dépassant les premiers niveaux énergétiques (S1,T1). Le chapitre 4 de cette thèse présente cette variante plus en détail. Le montage est composé d'un microscope confocal classique, mais avec des roues de densité, permettant d'ajuster la puissance laser et ainsi d'enregistrer l'émission de fluorescence en fonction du flux de photon incident.

La partie suivante détaille le modèle théorique de la FCS, commun à toutes les configurations et qui permet de relier le nombre de photons mesurés aux paramètres photo-physiques de la molécule.

V.2 Modèle théorique

Le modèle théorique de la FCS est basé en premier lieu sur la mesure statistique de la fluctuation de la fluorescence dans un volume d'observation (figure 1.18 A), obtenue par un détecteur, le plus souvent, une Avalanche PhotoDiode (APD), qui offre une très grande sensibilité de détection. L'équation 3.1 reprend la mise en équation de la mesure temporelle de la fluorescence qui est la somme de l'amplitude de fluorescence et de sa valeur moyenne.



FIGURE 1.18 – Illustration de l'étude de la fluctuation de la fluorescence en FCS. En A, un schéma type du signal moyen de fluorescence mesuré par le détecteur et en B, la courbe de corrélation associée.

$$F(t) = \delta F(t) + \langle F \rangle \tag{1.12}$$

Cette équation donne lieu à une fonction d'autocorrélation, nommé $G(\tau)$, qui s'exprime sous la forme de l'équation 3.2, où τ représente le temps durant lequel le fluorophore diffuse dans le volume d'observation après l'impulsion laser.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \tag{1.13}$$

La courbe $G(\tau)$ est illustré dans la figure 1.18 B. La partie des temps les plus longs ($> 10^{-3}ms$) représente la diffusion du fluorophore dans le volume. À des temps plus courts (entre $10^{-3}et10^{-5}ms$), on observe un changement dans la pente, représentant la signature des états triplet et de la rotation

de la molécule. Puis aux temps les plus courts ($< 10^{-5}$), $G(\tau)$ décroît, illustrant le phénomène de dégroupement de photons. En général, la fenêtre temporelle imposée par le laser et la carte d'acquisition ne permettent pas d'accéder aux informations sur les temps les plus courts. Par conséquent, seule la partie de la courbe concernant la diffusion est étudiée. Il est possible de modéliser mathématiquement cette courbe, en admettant que le faisceau soit gaussien, en 2D selon l'équation 1.14 et en 3D selon l'équation 1.15. Cette modélisation donne accès à des informations importantes sur le fluorophore, notamment le nombre de molécules N dans le volume de détection, le temps de diffusion (τd) ou encore la dimension XY du volume de détection S .

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \times \left(1 + \frac{\tau}{\tau d}\right)^{-1} \quad (1.14)$$

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \times \left(1 + \frac{\tau}{\tau d}\right)^{-1} \times \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau d}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (1.15)$$

Il est nécessaire de prendre en compte tous les éléments photo-physiques concernant la fluorescence et notamment, la présence de l'état triplet, qui donne une autre voie de désexcitation non radiative (chapitre 1, figure 1.5). Alors, il est ajouté à $G(\tau)$ une partie supplémentaire, contenant un terme P , représentant la fraction de molécules qui sont dans l'état triplet et τP , le temps de résidence associé à cette composante (équation 1.16)

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \times \left(1 + \frac{\tau}{\tau d}\right)^{-1} \times \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau d}\right)^{-\frac{1}{2}} \times \left(1 + \frac{P}{1-p} \times e^{-\frac{\tau}{\tau P}}\right) \quad (1.16)$$

En ajoutant en dernière étape, la contribution du bruit de fond du système B, comprenant la signature du solvant, l'on obtient l'équation finale suivante :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \times (1 - B/F)^2 \times \frac{1 + \frac{P}{1-p} e^{-\frac{\tau}{\tau P}}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau d}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \tau d}}} \quad (1.17)$$

Cette équation finale est amenée à évoluer en fonction de la finalité de l'expérience. Les applications sont diverses et présentées dans la partie suivante.

V.3 Applications

Il existe de nombreux domaines utilisant cette technique, en commençant par la biologie. Initialement, il était approprié d'étudier l'ADN en présence d'un fluorophore, comme présenté dans la partie précédente [17]. Puis, l'étude s'est étendue aux cellules, marquées localement par des fluorophores. Par exemple, Schwille et al. [64] ont étudié des cellules membranaires bi-lipidiques d'un point de vue chimique, en utilisant la méthode de FCCS.

En microfluidique, la FCS permet d'avoir accès à des paramètres de mécanique des fluides, notamment les vitesses d'écoulement d'une solution dans les canaux. Par exemple, Gosh et al. [65]

cartographient en 2D, le profil des vitesses d'écoulement d'un fluide moléculaire, en scannant point par point, les fluorophores contenus dans les molécules.

Plus récemment, la plasmonique s'intéresse à cette technique, particulièrement pour démontrer la contribution des métaux dans l'exaltation de molécules fluorescentes. En 2011, Maffre et al. [66] démontrent la fixation de protéines sur des nanoparticules d'oxyde de fer en étudiant, par la FCCS, le rayon hydrodynamique de la particule. Lorsque les protéines se fixent à la surface, cette valeur augmente sensiblement. En 2015, Khatua et al. [67] observent en FCS une solution de cristal violet diluée dans du glycérol, en présence de nanobâtonnets d'or. Ils observent deux composantes de corrélation, une longue et une courte, faisant référence à deux phénomènes. Premièrement, l'agrégation de la sonde sur les nanobâtonnets qui correspond aux temps longs. Deuxièmement, pour les temps courts, la contribution de la plasmonique et du transfert de charge dans l'exaltation de la fluorescence.

Pour notre projet de capteur, l'utilisation de la technique de FCS devrait permettre de démontrer la contribution des nanoparticules d'aluminium sur la fluorescence de la ThG. Pour cela, des mesures seront réalisées, soit en solution, soit sur des particules sur substrat. La source devra être dans le domaine des Ultraviolets. Le chapitre 4 de ce manuscrit présente l'utilisation de cette technique sur des nanoparticules d'or reliées à de l'ADN.

Chapitre 2

Nouvelle synthèse de nanoparticules d'aluminium colloïdales

Afin de répondre à la demande croissante d'études dans le domaine de l'ultraviolet, concernant des disciplines diverses telles que la biologie, la chimie ou encore la physique, il est nécessaire de se tourner vers la fabrication de nanoobjets ayant des propriétés plasmoniques dans l'ultraviolet. Comme démontré dans le chapitre 1, l'aluminium est un métal qui convient parfaitement. Différentes techniques de fabrication de nanostructures en aluminium ont alors été publiées, notamment avec la méthode de la lithographie électronique qui permet de fabriquer des disques ou des triangles sur un substrat [51]. Cependant, ces nanostructures ne correspondent pas aux besoins spécifiques de notre projet de capteurs biologiques, puisque de tels échantillons ne sont pas stables en solution. Par conséquent, dans ce chapitre, nous exposerons nos propres méthodes de fabrication. Nous commencerons par la lithographie électronique et les améliorations que nous avons apportées à cette technique, puis, nous motiverons les raisons qui nous ont entraînés à fabriquer des nanoparticules directement en solution. Nous développerons notamment les différentes étapes d'une nouvelle synthèse colloïdale, utilisant deux méthodes connues : la sonochimie et la solvochimie. Enfin, nous justifierons la viabilité de nos structures par différentes techniques de caractérisation, comme l'imagerie MEB, MET ou les mesures par spectroscopie UV-visible. Nous concluons ce chapitre par quelques perspectives futures concernant l'utilisation de nos nanoparticules colloïdales et le détournement de la nouvelle méthode de synthèse pour d'autres objectifs.

Sommaire

I	La lithographie électronique et ses limites	36
I.1	L'utilisation de la lithographie électronique	36
I.2	Stabilisation et espoir	37
I.3	Le passage en solution	39
II	Notre nouvelle méthode	39
II.1	Introduction aux techniques de sonochimie et solvochimie	39
II.2	Première étape : Création des précurseurs par la sonochimie	42
II.3	Seconde étape : Croissance par solvochimie	43
II.4	Dernière étape : purification et stabilisation	45
III	Caractérisation des objets obtenus	46
III.1	Étude topographique	46
III.2	Caractéristique structurale	48
III.3	Étude plasmonique	49
IV	Conclusion et perspective	49
IV.1	Utilisation dans les nouveaux carburants	50
IV.2	Possibilité de changement de forme	51

I La lithographie électronique et ses limites

I.1 L'utilisation de la lithographie électronique

La lithographie électronique est une technique qui s'est illustrée dès les années soixante, avec l'évolution technologique des microscopes électroniques [68]. Il s'agit de déposer sur un substrat, une couche de résine polymère, qui est sensible aux électrons. Il y a deux types de résines : négative et positive. Le faisceau d'électrons produit par un microscope électronique à balayage est dirigé sur la résine selon un schéma préalablement défini. Pour la résine négative, les zones exposées au faisceau vont se polymériser et rester sur le substrat . Pour la résine positive, la résine exposée se fragmente et est éliminée par une étape d'immersion dans un solvant, appelée développement. Selon la résine choisie, le motif sera révélé en positif ou en négatif, et le substrat comportera des zones avec et sans résine. Ensuite, il suffit de déposer une couche métallique sur le substrat par évaporation sous vide ou pulvérisation plasma dans le cas des oxydes, et de dissoudre la résine restante, ce qu'on appelle couramment l'étape de lift-off. Le métal adhère uniquement sur les parties où la résine n'était plus présente et forme le dessin souhaité. La figure 2.1 présente cette technique sous forme de schémas, dans le cadre d'une résine positive.

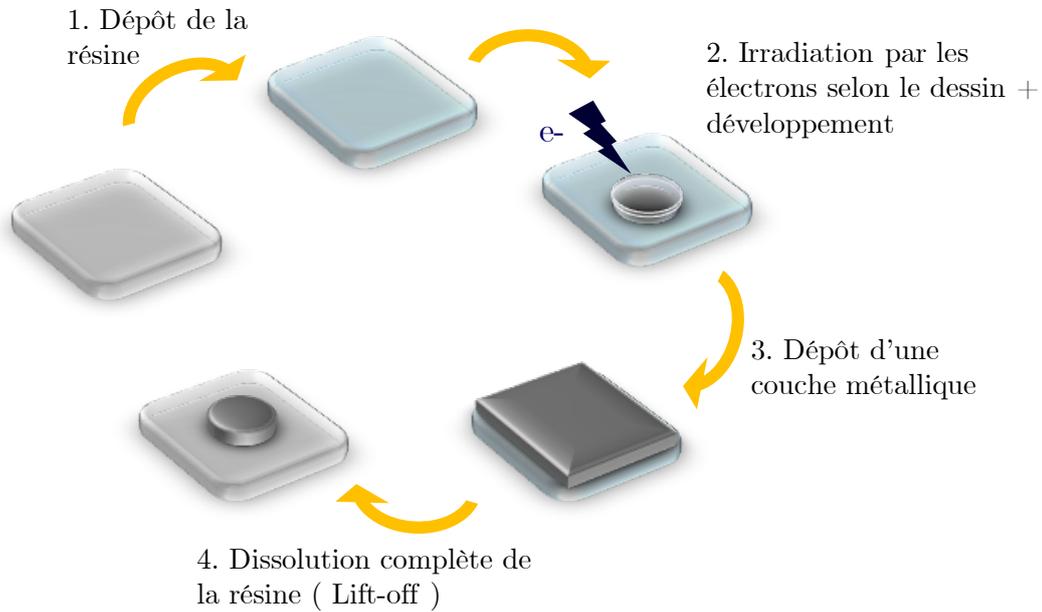


FIGURE 2.1 – Illustration des étapes de la technique lithographie. En 1, la résine est déposée sur le substrat. En 2, l'échantillon est irradié par un faisceau d'électrons aux endroits définis par le dessin sélectionné puis le dessin est révélé par développement. En 3, une couche métallique nanométrique est déposée sur l'échantillon par sublimation du métal massif dans une chambre sous vide. En 4, l'étape du lift-off, laissant apparaître le dessin sur l'échantillon, formé par le métal.

La lithographie est utilisée pour fabriquer toutes sortes de structures en aluminium : plots, triangles ou encore arbre de cayllee [51][69]. Par exemple, dans l'étude de Knight et al. [70], la réponse plasmonique de disque d'aluminium de différents diamètres est mesurée par spectroscopie de champ

sombre. Pour les diamètres les plus faibles (inférieurs à 100 nanomètres), les spectres montrent une réponse dans le domaine UV, ce qui nous intéresse pour notre projet.

Cette étude met également en lumière l'oxydation de l'aluminium. En effet, lorsque l'on fabrique des nanostructures en aluminium par lithographie électronique, il y a formation d'une couche native d'alumine par oxydation spontanée de la surface. C'est un paramètre important à caractériser car cette couche va changer considérablement la réponse plasmonique de l'aluminium non oxydé pur. Plusieurs publications montrent l'évolution de l'épaisseur de cette couche dans le temps. Knight et al. [70] expliquent que le taux d'oxygène lors de l'étape d'évaporation sous vide modifie la réponse spectrale et supprime totalement les propriétés plasmoniques des structures si le taux atteint les 50%. En revanche, si les conditions de fabrication sont idéales, le spectre reste inchangé après 3 semaines, même en laissant l'échantillon au contact de l'air. Langhammer et al. [71] illustrent que lors d'une exposition à l'air après fabrication, une couche d'oxyde native va se former rapidement en quelques heures autour de la structure et se stabiliser à une épaisseur de 3 nanomètres, en entraînant un léger déplacement vers le rouge du pic LSPR. Cette couche est caractérisée par spectrométrie photoélectronique X. L'étude de Zhang et al. [72] confirme ce résultat et montre même que pour des cylindres de 100 nanomètres de diamètre et de 50 nanomètres de hauteur, la stabilité dépasse les 250 jours. De plus, contrairement aux précédentes études, cette dernière étudie également la stabilité des lithographies d'aluminium en solution dans l'eau. Or, en quelques heures, l'échantillon est grandement endommagé et les propriétés plasmoniques des structures disparaissent. Il est donc impossible d'utiliser ces structures pour la biologie.

Pour notre projet, nous avons tout de même utilisé la lithographie électronique pour fabriquer des cylindres espacés de plusieurs μm en aluminium avec un diamètre donnant une réponse plasmonique dans l'ultraviolet et proche visible. Puisque le travail en solution est un paramètre important pour l'utilisation de ces structures en biologie, il est indispensable d'améliorer leur durée de vie dans l'eau. C'est pourquoi, la section suivante présente une étude de stabilisation de ces structures en solution.

I.2 Stabilisation et espoir

Afin d'augmenter la durée de vie en solution de nanostructures en aluminium obtenues par lithographie électronique, nous avons alors initié une étude de stabilisation. L'instabilité de l'aluminium en solution provient de la porosité de la couche d'alumine native formée en surface. En effet, l'aluminium est fréquemment déposé par sublimation dans une chambre sous vide à canon à électrons. Or, selon la vitesse de dépôt et la qualité du vide à l'intérieur de la chambre, la couche formée est plus ou moins rugueuse. Ainsi, lorsque l'échantillon est exposé à l'air, l'oxygène va s'adsorber de façon non homogène sur la surface et engendrer un oxyde poreux.

Dans la littérature, il existe des articles qui présentent des méthodes de densification de la couche d'oxyde par oxydation forcée. L'article de Canaleas-tejero et al. [73], utilise un plasma oxygène qui va densifier la couche d'alumine, tout en préservant les propriétés plasmoniques de l'aluminium. Un autre article de zhang et al. [72], démontre que l'utilisation d'un four pour recuire des disques en aluminium obtenus par lithographie électronique augmente la stabilité de l'échantillon. La montée en température rapide va permettre une réorganisation cristalline, une diminution des joints de grains et une meilleure cristallinité. En complément, la chimie de l'aluminium et de l'alumine est importante, il s'avère que le pH de la solution a un impact important sur la stabilité de l'aluminium en solution [74][75].

Un protocole de stabilisation a été défini avec comme objectif de rendre possible l'utilisation en

solution des nanostructures lithographiées. Le protocole est appliqué sur des films d'aluminium d'une épaisseur de 100 nanomètres. Le dépôt est réalisé sur un substrat en verre, avec la technique de dépôt sous vide. La première étape utilise trois différentes méthodes de densification de l'alumine, le plasma O_2 dans un appareil de gravure ionique directive (RIE), le recuit à haute température dans un four sous vide et le plasma air non directif dans une enceinte qui est utilisé couramment pour nettoyer des échantillons (plasma cleaner). La seconde étape concerne l'immersion dans des solutions tampons à pH variables pendant 24 heures. Ces solutions sont nécessairement compatibles avec l'utilisation d'ADN. Pour déterminer l'efficacité du protocole, trois caractérisations sont réalisées : la technique des angles de contact, l'utilisation d'un profilomètre et l'observation. Les différentes données obtenues sont récapitulées dans le tableau 2.2

Type de traitement	Contrôle avant immersion		Après immersion
	Angle de contact (moyen)	Épaisseur du profilomètre (nm)	Photographie
Référence (sans traitement)	68,22	98	
Plasma O_2 en RIE (40 min)	35,75	/	
Four sous vide	64,38	97	
Plasma air	65,35	98	

FIGURE 2.2 – Tableau regroupant les tests de stabilisation de film d'aluminium. Pour chaque type de traitement indiqué dans la première colonne, il y a 3 caractérisations : deux avant immersion (mesure d'angle de contact et d'épaisseur) et une après immersion (photographie)

Nous avons rapidement éliminé la technique de densification par plasma O_2 : l'échantillon est régulièrement contaminé par des résidus dans la chambre et le temps de l'expérience est supérieur à 6 heures entre la préparation de la chambre et l'exposition de l'échantillon au plasma. Les deux autres techniques donnent des résultats similaires, le plasma air a donc été privilégié dans l'intention de choisir la méthode la plus rapide. En effet, pour cette technique, l'échantillon est exposé à un plasma air non directif de force moyenne pendant 10 minutes et la préparation initiale de la chambre est inférieure à 5 minutes.

Pour l'immersion, la solution tampon à pH 5 a été choisie, l'aluminium se dissolvant automatiquement dans les autres tampons plus basiques, laissant seulement le substrat. Dans le chapitre 5, nous présenterons plus en détail ce protocole, qui a été appliqué sur nos plots d'aluminium et nous donnerons de plus amples informations sur le choix des solvants.

I.3 Le passage en solution

Pour faciliter le travail en solution, la technologie des colloïdes est intéressante. En effet, synthétiser des particules colloïdales par la chimie permet non seulement d'obtenir des nanoparticules stables en solution, mais également un meilleur taux de cristallinité, et par conséquent une meilleure résonance plasmon. En effet, les particules cristallines possèdent moins de joints de grains. Chaque joint agrandit de façon anarchique le mouvement d'oscillation des électrons, créant de multiples fréquences plasmon. Les synthèses chimiques de nanoparticules colloïdales font l'objet de plusieurs études : historiquement les premiers essais concernent les synthèses de colloïdes d'or [76]. Cependant, en raison de la difficulté de trouver des ligands adaptés, les synthèses de nanoparticules d'aluminium colloïdales sont peu étudiées.

Lu et al. [77] publient en 2018 une méthode permettant de synthétiser des nanoparticules d'aluminium en passant par un polymère, qui a le rôle du ligand. Cette synthèse produit des objets allant de 130 nanomètres de diamètre à 200 nanomètres, avec différentes topologies (sphériques et hexagonales). Cependant, les tailles obtenues par cette technique donnent des résonances plasmoniques dans le visible.

Une autre technique existe et consiste à réduire des sels de chlorure d'aluminium par de l'aluminohydrure de lithium [51]. Cette méthode permet d'obtenir des particules de tailles convenables pour le projet, mais présente une dangerosité importante puisque le mélange est très réactif et s'enflamme lors du procédé.

Enfin, dans la littérature, des méthodes d'ablations laser permettent d'obtenir des nanoparticules d'aluminium en solution. Les diamètres obtenus sont de l'ordre de 20 à 60 nanomètres de diamètre [78]. Le choix de ce type de protocole ne peut s'appliquer dans le cadre de notre projet puisque la polydispersité des tailles est trop importante, la quantité obtenue très faible et la cristallinité est quasiment absente. De plus, les nanoparticules formées avec cette méthode sont très sensibles à l'oxygène et elles se dégradent au bout d'un mois seulement.

Nous avons par conséquent choisi de développer une nouvelle méthode de synthèse. L'objectif est de pouvoir obtenir des nanoparticules d'aluminium sphériques, avec un diamètre de 80 nanomètres et une résonance autour de 325 nanomètres, avec une cristallinité importante.

II Notre nouvelle méthode

II.1 Introduction aux techniques de sonochimie et solvochimie

Dans l'intention de trouver une nouvelle méthode de synthèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la sonochimie. Cette science se rapporte à la génération d'ultrasons en solution, c'est-à-dire d'ondes sonores ayant une fréquence supérieure à 16 kHz. Le générateur est immergé dans un réceptacle contenant un solvant, le plus souvent, une cuve remplie d'eau. En jouant sur la fréquence et la puissance du générateur, les ondes formées dans la cuve entraînent l'apparition d'un phénomène physique très énergétique, nommé cavitation. Il y a alors formation de bulles, renfermant un gaz, contenant une pression moyenne de 1800 bar et une température interne pouvant atteindre les 5000 Kelvin. Ces bulles vont croître jusqu'à explosion, libérant un puissant jet d'énergie. La figure 2.4 A illustre ce phénomène en 5 phases. Dans son livre sur la sonochimie, Jean Louis Luche [79] précise même que l'ampleur du phénomène est tel que l'énergie libérée lors de la cavitation peut

émettre une lumière perceptible à l'œil nu dans le noir.

La cavitation peut apparaître dans n'importe quel solvant, sous réserve de fournir suffisamment d'énergie pour dépasser un certain seuil. Ce seuil est relié à la physique de nucléation, étudiée par Blake en 1949 [80]. Lorsque l'on induit une onde dans un liquide, il devient momentanément instable à cause du surplus d'énergie. Une partie du liquide va alors se sublimer, formant une interface liquide/solide, sous forme de bulle pour réduire au maximum l'énergie de surface. Ce seuil dépend de l'énergie acoustique, du rayon de la bulle et de la pression hydrostatique. Plus tard, l'étude sera complétée en tenant compte de la viscosité du solvant et de l'inertie, permettant de réaliser des calculs de seuils pour tous les types de solvant. Il a été également démontré que l'ajout d'une phase au système, par exemple un solide, facilite le phénomène en réduisant le seuil de cavitation. Ainsi, pour les milieux non homogènes, les fréquences inférieures à 50 kHz fonctionnent parfaitement. En revanche, pour des milieux contenant un seul liquide, avec une grande viscosité, le seuil peut atteindre des valeurs supérieures au mégahertz. Lorsque le seuil de cavitation est dépassé, il est possible d'atteindre une efficacité maximale du procédé en jouant sur la puissance et la température apportée au système. La figure 2.3 représente deux graphiques, correspondant à l'évolution de la fréquence de cavitation du système en fonction de l'énergie acoustique (puissance par unité de surface) et de la température. Pour les deux paramètres, la fréquence augmente, passe par un maximum et diminue. Cette dynamique est encore une fois reliée à la physique de nucléation, l'augmentation de la température modifiant la pression de vapeur et l'augmentation de l'énergie acoustique modifiant la pression externe appliquée sur la bulle. Si l'on prend l'exemple de l'eau, la température permettant d'atteindre l'intensité maximale de cavitation est de 35 °Celsius, pour une fréquence de 45 kHz et une puissance de 300 W.

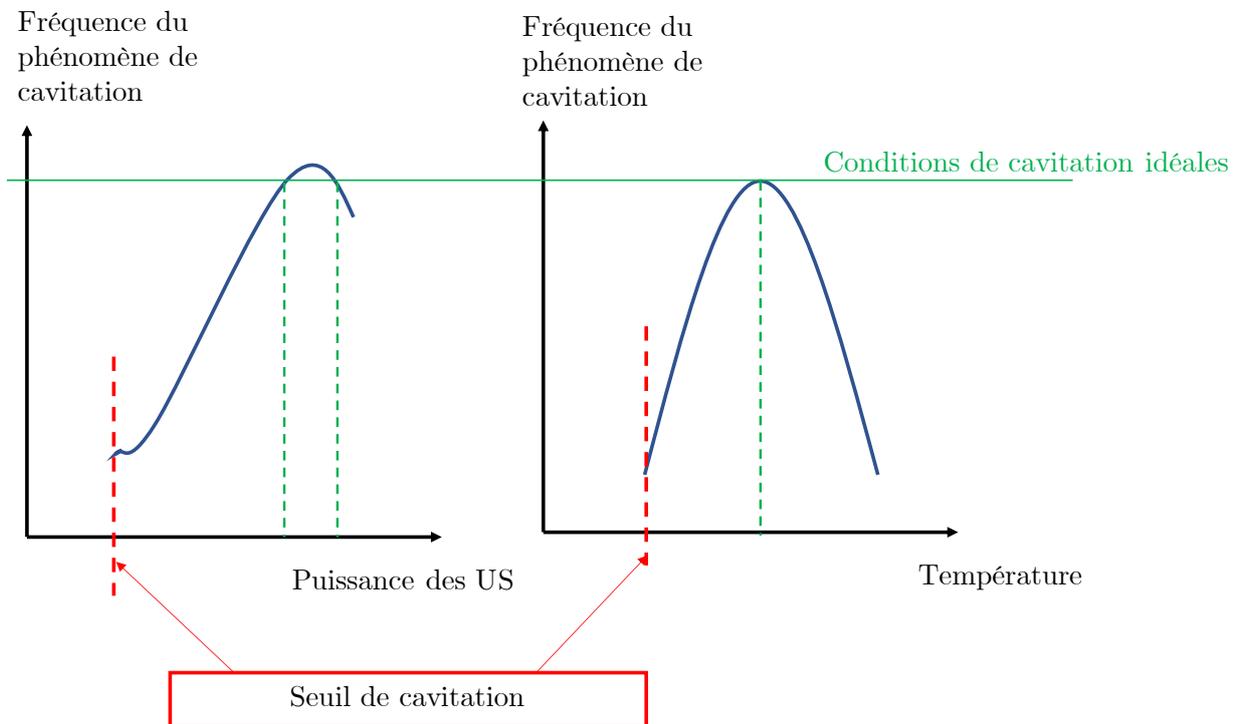


FIGURE 2.3 – Courbe représentant l'influence de la puissance des ultrasons et de la température sur la fréquence du phénomène de cavitation. Les deux courbes ont un profil différent, mais une conclusion similaire : après le seuil de cavitation, il y a augmentation de la fréquence jusqu'à un maximum, suivi d'une diminution. Les valeurs dépendent du milieu où l'on induit les ultrasons. Les paramètres sont donc à ajuster pour obtenir le rendement idéal. Schéma inspiré de courbes du livre [79])

Si l'échantillon comporte un solide, l'énergie libérée par la cavitation entraîne sa destruction [79]. Cette destruction est illustrée dans la figure 2.4 C où l'on y voit deux flacons : avant la sonochimie, le flacon contient de l'aluminium et un solvant ; après la sonochimie, la majorité de l'aluminium est détruit et la solution est devenue grisâtre. S'il n'y a pas de solide en solution, la puissance du phénomène peut tout de même entraîner des réactions chimiques en modifiant les solvants. Plusieurs études attestent notamment que la cavitation provoque la destruction de liaisons chimiques covalentes [81][82]. L'étude de Suslick et al. [83] est un bon exemple. Ils illustrent les différentes étapes de déstructurations de chaînes d'alcane durant la sonochimie en composés primaires, comme le méthane.

En nanotechnologie, ce procédé est utilisé pour fabriquer des nanoparticules, en partant de pré-curseurs chimiques. En ajoutant en solution des ligands, des agents de croissances ou des agents catalyseurs, différentes formes de nanoparticules sont obtenues [84][85][86][87]. Par exemple, la publication de Yang G.W. et Li H. [88] propose une synthèse de nanoparticules d'argent avec la sonochimie. Un flacon contenant du mercaptotoluène et l' AgNO_3 dans l'éthanol selon un ratio 2 :1, est exposé aux ultrasons pendant 1,5 heure (200KHz, 200 W, 20°C). À la fin du procédé, le flacon contient des nanoparticules d'argent de 10 nanomètres de diamètre en moyenne.

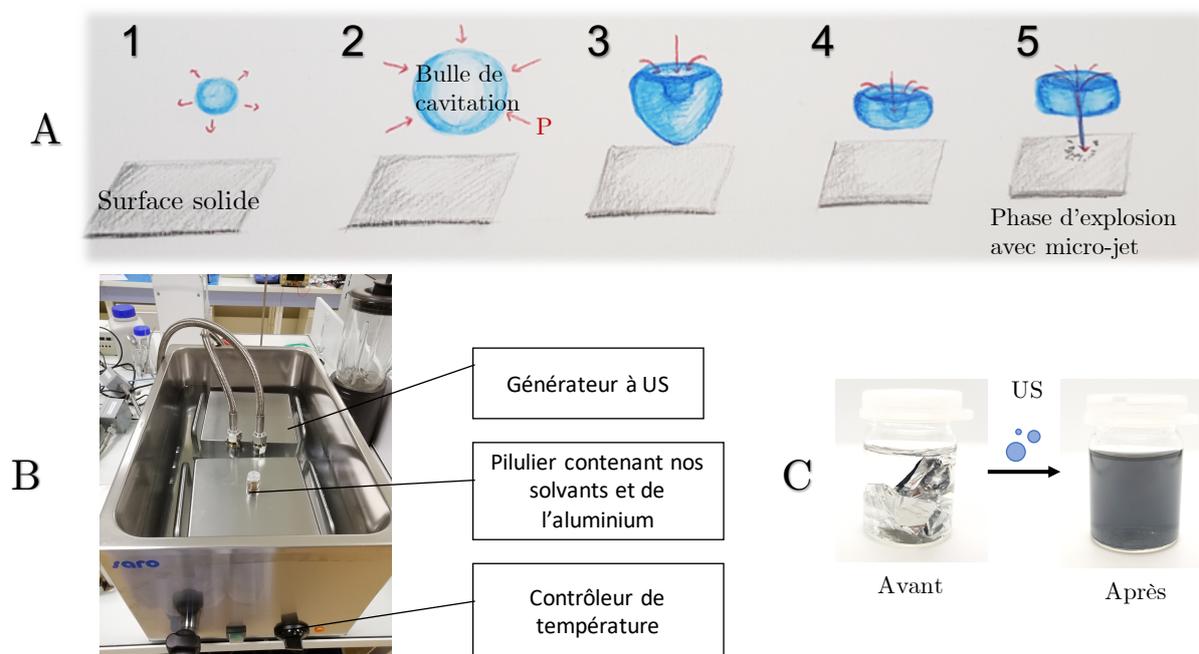


FIGURE 2.4 – Schéma du principe de cavitation. En A, illustration des étapes de la cavitation. En B, la photographie de notre cuve, avec deux générateurs immergés. En C, la photographie de notre flacon contenant de l'aluminium.

Dans la littérature, aucune publication ne présente la synthèse de nanoparticules d'aluminium par cette méthode. Nous avons donc utilisé cette science pour tenter de fabriquer des nanoparticules d'aluminium, comme le présente la partie suivante. En revanche, nous verrons que la sonochimie seule n'était pas suffisante pour la synthèse. Nous nous sommes alors tournés vers une méthode complémentaire, la solvochimie.

Ce procédé consiste à se placer au point d'ébullition d'un solvant, dans un système fermé et sous pression, appelé autoclave. Ces conditions engendrent la création d'un système hautement énergétique et instable. Cette méthode permet en outre la synthèse de différentes nanoparticules métalliques, selon les précurseurs et les additifs utilisés. Par exemple, la publication de Lai et al. [89] présente une revue complète sur cette technique, montrant les diverses formes de nanoparticules qu'il est possible de synthétiser : dodécaèdre de palladium, nanofils de platine, cubes d'argent, nanofleurs de cobalt...

L'aluminium reste toutefois encore absent des études.

C'est en étudiant les paramètres de ces deux méthodes et en les combinant que nous avons développé une nouvelle synthèse de nanoparticules colloïdales d'aluminium pour notre projet. Cette méthode se décompose en deux étapes : premièrement la sonochimie qui permet de fabriquer des précurseurs d'aluminium et deuxièmement, la solvochimie qui fait transformer ces précurseurs en nanoparticules.

II.2 Première étape : Création des précurseurs par la sonochimie

La première étape de notre synthèse utilise la sonochimie pour la fabrication de précurseurs, en partant d'aluminium massif. La matière première utilisée est un simple papier aluminium alimentaire. L'absence de revêtement ainsi que la composition sont définies par les normes NF EN 601 et NF EN 602. Nous avons sélectionné le produit ayant la plus faible épaisseur, soit $50\mu\text{M}$. Le feuillet est découpé en bande régulière et placé dans un flacon de manière à limiter l'empilement et conserver une grande surface disponible. Deux solvants sont introduits dans le même flacon : l'éthanol qui facilite la formation de la cavitation du fait de sa basse viscosité et l'éthylène glycol qui stabilise le mélange, selon un ratio 2 :1 en volume. La cavitation est également facilitée par le nombre de phases, au nombre de trois dans notre cas avec deux solvants formant une émulsion et un solide.

Un équipement spécifique de sonochimie a été fabriqué pour l'occasion, avec une cuve de neuf litres et trois générateurs de 900 W correspondant à trois fréquences : 28, 40 et 100kHz, de la marque Nextgen. Après plusieurs essais d'ajustement, le générateur de 28 kHz a été sélectionné, permettant une meilleure qualité de cavitation. Concernant les autres paramètres, nous avons choisi la puissance maximum, soit 900 W, une température de cuve de 50°C et une durée temporelle de six heures. Durant le processus, les bulles de cavitations et la destruction de l'aluminium s'observent distinctement. Le flacon qui contenait à l'origine visuellement des feuillets argentés dans un liquide transparent se transforme après le procédé en une solution grisâtre avec des reflets argentés, comme le présentent les photographies de la figure 2.5 A.

À défaut d'avoir pu observer la formation directe de cluster d'aluminium, nous avons réalisé un suivi conductimétrique de notre solution durant le temps d'exposition aux ultrasons et dans les heures suivant l'expérience. Par intervalle de 15 minutes, une sonde de conductimétrie a été plongée dans le flacon contenant l'aluminium, et également dans un second flacon de référence, contenant uniquement l'émulsion des deux solvants. Les courbes de la figure 2.5 B montrent clairement que lorsque le flacon contient de l'aluminium (courbe rouge), il y a une nette augmentation de la conductivité du système, de $0.7\mu\text{S}/\text{cm}$ à $4\mu\text{S}/\text{cm}$. Pour le flacon qui contient seulement les solvants (courbe violette), l'augmentation est plus faible.

Nous concluons que l'augmentation pour le flacon contenant de l'aluminium provient de la destruction du métal. Il y a création d'aluminium sous forme ionique, venant de la décomposition de nos feuillets d'aluminium par la cavitation. Pour le solvant, l'augmentation de la conductivité, même si elle est moins importante, illustre la destruction du solvant par la sonochimie. Les outils présents au laboratoire ne nous permettent pas d'identifier clairement les espèces ioniques présentes dans le flacon. Cependant, la littérature nous permet d'émettre des hypothèses solides : l'aluminium est sous forme Al^{+n} avec une prédominance pour l'espèce ayant $n=3$ et les solvants sont décomposés partiellement en espèces primaires volatiles comme du méthane, CH_4 , ou en espèce radicalaire instable, comme les différents types de carbénium, correspondant à des espèces où le carbone est trivalent [83][90]. Par la suite, nous considérerons que les produits des solvants par la sonochimie n'interviennent plus dans la

réaction, ils seront considérés comme solvants résiduels et éliminés à la prochaine étape de synthèse.

La stabilisation du système est également étudiée, après l'arrêt des ultrasons pendant 24 heures. Nous observons une légère descente de la courbe de conductimétrie, d'environ $0,5 \mu\text{S}/\text{cm}$ pour les deux flacons, laissant présager une recombinaison de certaines espèces. Nous supposons qu'il y a formation d'hydroxyde d'aluminium ou encore de triméthylaluminium. Cependant, la solution reste suffisamment stable pour permettre l'utilisation des précurseurs ioniques d'aluminium dans les 24h après l'étape d'ultrason. Ce délai permet à la solution de décanter, en laissant tomber au fond du flacon les macro-feuillets d'aluminium non détruits par les ultrasons.

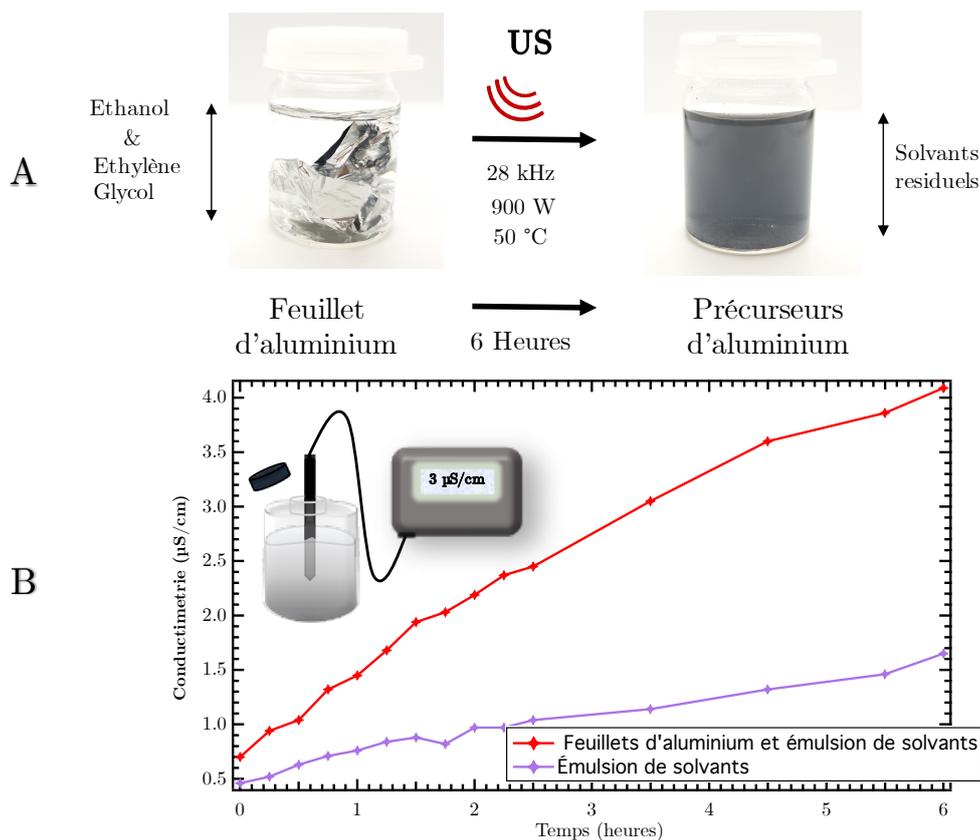


FIGURE 2.5 – Illustration de l'étape de sonochimie. En A, la photographie de la solution au début et à la fin de l'étape avec un résumé des paramètres choisis. En B, les deux courbes de suivi conductimétrique en fonction du temps de sonochimie : en violet, la référence contenant l'émulsion de solvants et en rouge, la courbe pour le flacon contenant de l'aluminium.

II.3 Seconde étape : Croissance par solvochimie

Pour transformer en nanoparticules les produits de la sonochimie identifiés comme des précurseurs d'aluminium, nous avons utilisé la solvochimie. Une décantation de notre flacon pendant 12 heures permet d'éliminer les macro-feuillets d'aluminium restant en solution (figure 2.7 A). Puis, nous avons construit un système d'autoclave maison, schématisé dans la figure 2.6. Le ballon est fermé par deux septums et relié par l'un des cols à un refroidisseur à air, qui est lui-même relié à une double colonne vide/argon. Un procédé de purification est réalisé afin d'éliminer toutes traces d'oxygène. Il consiste en un cycle où l'on fait le vide dans le système pendant 5 minutes, puis où l'on injecte de l'argon pendant 5 minutes (c'est le même procédé qui est utilisé dans les sas des boîtes à gants, pour introduire ou sortir des échantillons). Ce cycle est répété 3 fois, avant d'injecter à nouveau de

l'argon en légère surpression. Notre solution de précurseurs est donc injectée dans un système fermé, isolé de toute contamination à l'oxygène. Ainsi l'oxydation de l'aluminium est évitée. La pression est contrôlée par un manomètre et un système de bulleur. La température est augmentée et stabilisée par un contrôleur branché à un chauffe ballon et une sonde de température. Le refroidisseur à air permet également de condenser les vapeurs induites lors du chauffage, ce qui garantit l'étanchéité de l'enceinte. La solution peut être mélangée par un agitateur magnétique.

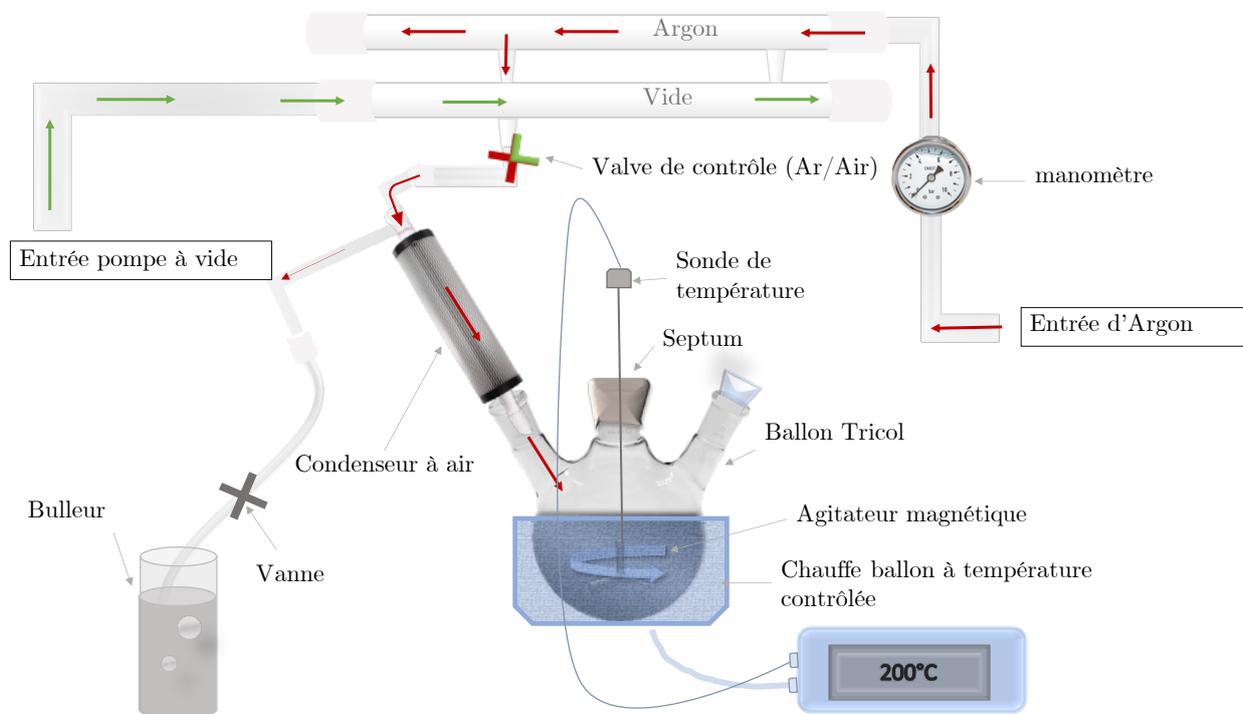


FIGURE 2.6 – Schéma du montage autoclave maison pour la solvochimie. La double colonne permet d'insérer successivement du vide et de l'argon pour purifier le système de toutes traces d'oxygène. La solution est maintenue en température par un chauffe ballon associé à une sonde. Le condenseur à air permet de conserver les vapeurs et d'obtenir un système fermé. La solution est agitée par un agitateur magnétique.

Après injection des produits de la sonochimie, le système est dans un premier temps chauffé à 110 °C, afin d'éliminer les solvants résiduels inutiles pour la suite de la synthèse. Ainsi, les restes d'éthanol sont évaporés et aussi les résidus volatils comme le méthane ou encore les composés volatils de l'aluminium, s'ils existent, comme le triméthylaluminium [91]. La vapeur est évacuée en piquant régulièrement le septum à l'aide d'une aiguille. Lorsque le volume a réduit de moitié et que la température remonte légèrement, la majorité des résidus ont été éliminés. Il reste alors dans le ballon de l'éthylène glycol d'origine non détruit par les ultrasons et les ions d'aluminium. Ensuite, on ajoute de l'éthylène glycol neuf et le système est monté à 197 °C (la température d'ébullition de l'éthylène glycol), avec une stabilisation de la pression (figure 2.6 B).

Nous observons au bout du 4^{ème} jours de recuit l'apparition de premières nanoparticules d'aluminium sphériques, ayant un diamètre de 10 nanomètres en moyenne. Au fil des jours de synthèse, ces mêmes particules vont continuer à grossir pour atteindre les 100 nanomètres de diamètre en moyenne au 14^{ème} jour. Visuellement, la colorimétrie de la solution appuie la réaction, passant d'un gris à un liquide transparent au deuxième jour, puis à un liquide jaune à la fin des quatorze jours de synthèse. (figure 2.6 C)

La réaction qui entraîne la transformation de nos précurseurs en nanoparticules d'aluminium est due à l'oxydation de l'éthylène glycol, comme illustré dans la figure 2.6 et présenté dans l'équation

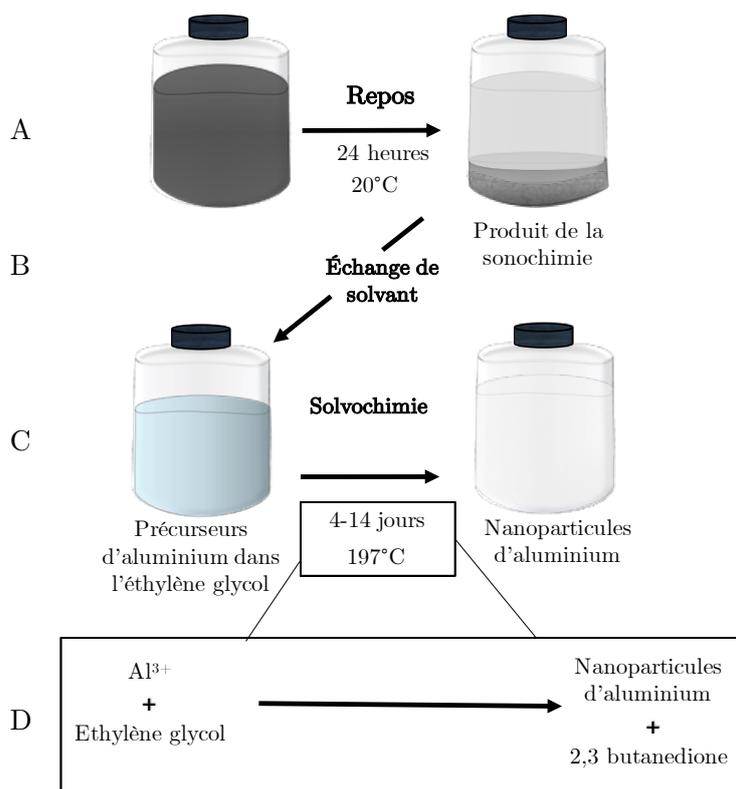


FIGURE 2.7 – Schéma explicatif de l'étape de solvochimie. En A, la phase de repos permettant d'éliminer les résidus d'aluminium massifs. En B, la phase de substitution des résidus de solvant par de l'éthylène glycol propre. En C, le résumé du recuit. En D, l'équation chimique de la réaction de recuit qui permet la synthèse des nanoparticules d'aluminium.

2.1. En effet, à sa température d'ébullition et sous argon, l'éthylène glycol va perdre de l'eau et se transformer en sa forme oxydée qui va réduire les ions d'aluminium en aluminium neutre [90]. La forme résultante de l'éthylène glycol s'appelle butanédione et va agir par la suite comme agent de croissance. Les clusters d'aluminium vont grossir au fils des jours et il y aura formation de nanoparticules.



II.4 Dernière étape : purification et stabilisation

Pour finir, il est nécessaire de purifier les solutions obtenues afin d'éliminer les résidus de solvants de la synthèse, soit l'éthylène glycol ou sa forme oxydée, le butanédione. L'aluminium étant peu dense, les nanoparticules ne peuvent pas être purifiées comme pour la plupart des autres nanoparticules métalliques[92]. La centrifugation prolongée dans le temps et à basse température semble être la meilleure option : les solvants résiduels denses vont tomber au fond du tube et également les plus grosses particules ou les restes d'aluminium massifs, les nanofeuillets.

Un volume de 500 μL de la solution obtenue à la fin de la synthèse est placée dans un tube Eppendorf, avec 1 mL d'éthanol absolu. Les tubes sont centrifugés une première fois pendant 60 minutes à 9000 tours/minutes, avec une température maintenue à 15°C. Puis l'on réinjecte le surnageant de ces tubes dans un autre Eppendorf, préalablement remplis à nouveau d'éthanol absolu. Une seconde cen-

trifugation avec les mêmes paramètres est effectuée. Le surnageant contient désormais des particules d'aluminium de même diamètre, dispersées dans de l'éthanol.

Après cette étape, nous obtenons alors un flacon contenant des nanoparticules colloïdales d'aluminium dans de l'éthanol avec une polydispersité inférieure à 10 nanomètres (voir caractérisation topographique). Avec un flacon étanche, la stabilité des nanoparticules est supérieure à 6 mois.

III Caractérisation des objets obtenus

III.1 Étude topographique

Pour caractériser les nanoparticules obtenues, un prélèvement a été pratiqué quotidiennement durant la synthèse de solvochimie (pendant 14 jours), et observé au MEB. Une goutte de chaque solution était déposée et séchée sur un substrat en silicium pour faciliter la conduction des électrons. L'observation est à 5kV avec une distance de travail très faible, puisque l'aluminium est un matériau peu conducteur et peu dense. Pour chaque échantillon et sur plusieurs synthèses, cinquante images ont été enregistrées. Elles sont traitées par la suite avec un logiciel de traitement d'images, Image J, afin d'obtenir des statistiques sur les diamètres des particules observées.

La figure 2.8 présente les résultats de cette étude et démontre la présence de nanoparticules d'aluminium sphériques à partir du 4^{ème} jour de solvochimie. La première colonne de la figure 2.8 A, correspond aux images MEB obtenues à même échelle pour les jours pairs de 4 à 14. La seconde colonne présente la répartition des diamètres mesurés pour chaque échantillon, sous forme d'histogramme. La répartition est associée à une courbe gaussienne afin d'extraire une valeur de diamètre moyen ainsi qu'un facteur de dispersion. La courbe en B reprend les données extraites des statistiques et représente le diamètre moyen et la dispersion de chaque échantillon en fonction du temps. Au 4^{ème} jour, les nanoparticules d'aluminium formées font en moyenne 15 nanomètres de diamètre, avec une dispersité de 9 nanomètres. Puis elles vont croître au début lentement puis avec une accélération au jour 10, jusqu'à obtenir en jour 12, un diamètre moyen de 88 nanomètres, avec une dispersité de 22 nanomètres. Au jour 14, le diamètre moyen atteint les 94 nanomètres, et la polydispersité augmente, puisque l'on trouve une valeur de 32 nanomètres. Nous avons choisi de ne pas poursuivre la synthèse au-delà de ces 14 jours, puisque la polydispersité et le diamètre moyen sont moins intéressants et ne correspondent plus aux besoins du projet. L'augmentation du diamètre au fil des jours démontre que malgré la diminution des réactifs (ions d'aluminium et éthylène glycol), il existe un phénomène de recomposition des particules. La probabilité de rencontre de deux particules d'aluminium augmente avec la taille, et elles vont fusionner entre elles pour former une particule d'un diamètre supérieur. Cette constatation est confirmée par l'étude de la concentration des nanoparticules (figure 2.8 C)

Pour avoir une idée de la concentration des nanoparticules d'aluminium obtenues, nous avons réalisé un calcul en utilisant la loi de Beer-Lambert, présenté dans la publication de Ayala-Orozco et al.[93], qui calculent la concentration de nanomatricochkas d'or. La formule est la suivante :

$$Concentration(part/mL) = \frac{2,303 \times ABS}{Q_{ext} \times \pi \times r^2 \times L} \quad (2.2)$$

L'absorbance choisie (ABS) est celle mesurée expérimentalement par spectroscopie UV-visible dans la partie étude plasmonique. Le rayon r est calculé à partir du diamètre moyen mesuré à partir des photographies MEB. Enfin, L correspond à la longueur de la cuve et vaut 1 cm. Pour déterminer le Q_{ext} de nos nanoparticules d'aluminium en tenant compte de la couche naturelle d'alumine qui se

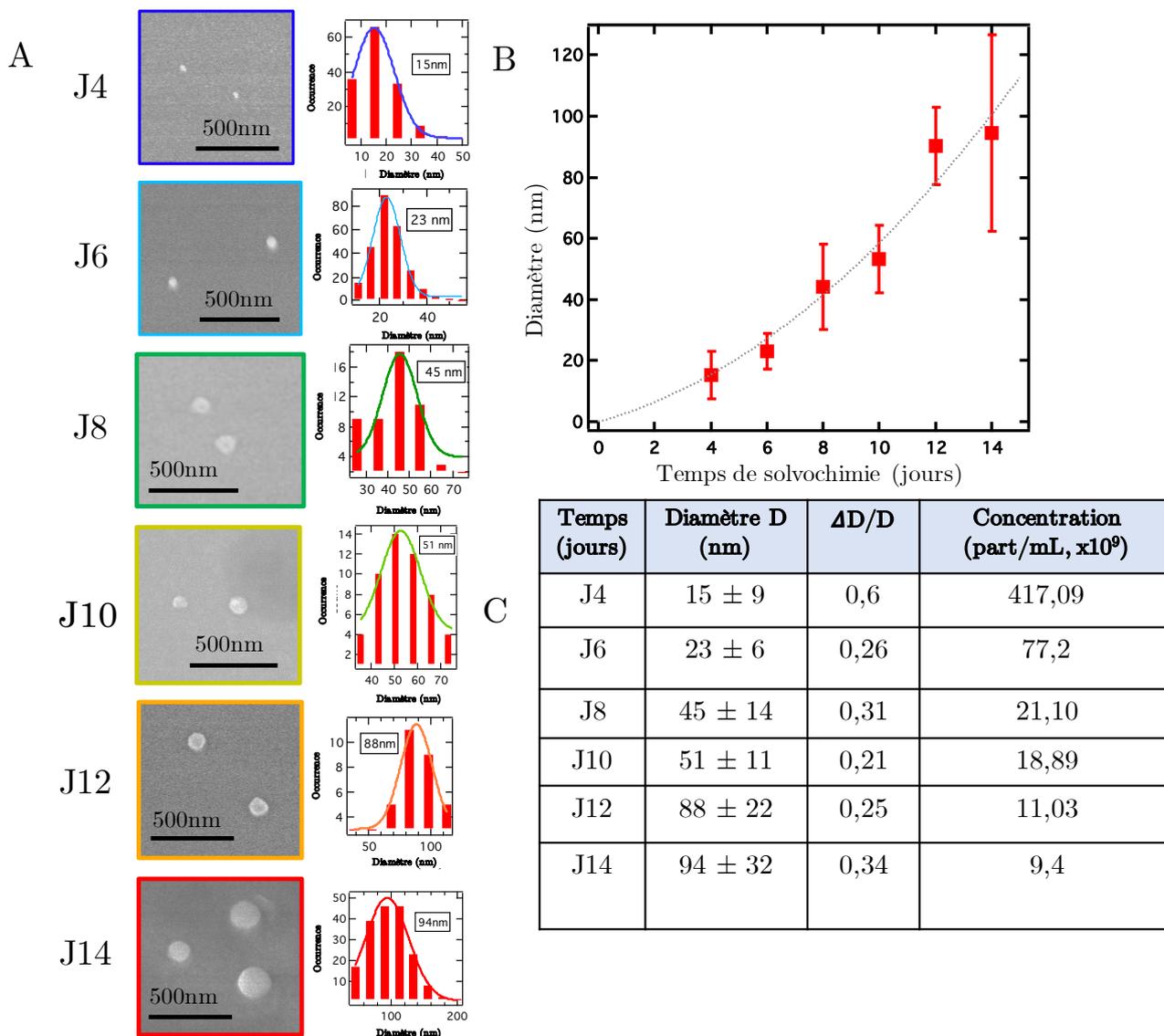


FIGURE 2.8 – Caractérisation de la croissance des nanoparticules d'aluminium pendant la solvochimie. La partie A montre une image MEB associée à un histogramme représentant les diamètres des particules observées pour chaque échantillon, du jour de synthèse 4 au jour de synthèse 14. La partie B montre l'évolution du diamètre moyen de chaque échantillon en fonction du temps de solvochimie. Enfin, la partie C associe une estimation de la concentration des particules pour les 6 échantillons.

forme en surface, nous avons utilisé un logiciel gratuit proposé par le Prof. Javier Garcia de Abajo (ICFO, Spain) [94][95].

Les résultats sont regroupés dans la partie C de la figure 2.8, montrant un ordre de grandeur de 10^{10} part /mL. Cette concentration est comparable à d'autres synthèses[96]. La diminution de la concentration observée au fur et à mesure des jours de synthèse prouve la croissance ou fusion des nanoparticules, sans nouvelle synthèse ou nucléation de nanoparticules.

Pour résumer, l'étude topographique nous permet de caractériser les tailles et la forme de nos nanoparticules d'aluminium formées durant la solvochimie. Ces tailles varient de 15 nanomètres au 4^{ème} jour à 95 nanomètres au 14^{ème} jours avec une polydispersité inférieure à 32 nanomètres. Nous avons également calculé une estimation de la concentration, avec un ordre de grandeur de

10^{10} part/mL. Néanmoins, une étude topographique isolée n'est pas suffisante pour affirmer que les objets étaient en aluminium. En effet, ces particules pourraient être composées uniquement d'oxyde d'aluminium. Nous avons donc entrepris d'utiliser d'autres méthodes de caractérisation.

III.2 Caractéristique structurale

L'une des méthodes qui permet de différencier les métaux est l'étude des plans cristallins. Pour obtenir cette information, nous avons collaboré avec l'équipe du Prof. Gil Markovich de l'Université de Tel-Aviv afin d'obtenir des images de microscopie électronique de transmission à haute résolution (MET HR) pour nos nanoparticules. Déposées sur une grille MET en nitrure de silicium d'une épaisseur de 10 nanomètres, nos particules vont être traversées par un faisceau d'électrons dont l'analyse permet d'obtenir 3 sortes d'images. La première fonction équivaut à une image obtenue en transmission avec un MET classique. La seconde option mesure la diffraction des électrons après interaction avec les plans cristallins et permet de déduire une première information d'organisation des atomes. Enfin, en utilisant la fonction haute résolution, l'image est reconstruite à partir d'une figure d'interférence et l'on observe clairement les plans cristallins de la matière et les différents joints de grains.

La figure 2.9 présente les résultats obtenus sur nos nanoparticules colloïdales au premier stade de la synthèse, avec de petits diamètres. En A, l'image MET classique montre une nanoparticule d'un diamètre de 18 nanomètres, entourée d'une coque correspondant selon notre postulat initial, à la couche d'alumine native qui entoure l'aluminium. L'épaisseur est bien de 2-3 nanomètres et nous garderons cette valeur pour toutes les études qui suivront. En B, l'image de diffraction met en lumière deux orientations cristallines différentes : 200 et 111, confirmées en C avec l'image de haute résolution où les plans apparaissent clairement. Ces deux plans sont caractéristiques de l'aluminium et leur présence confirme la réussite de notre synthèse.

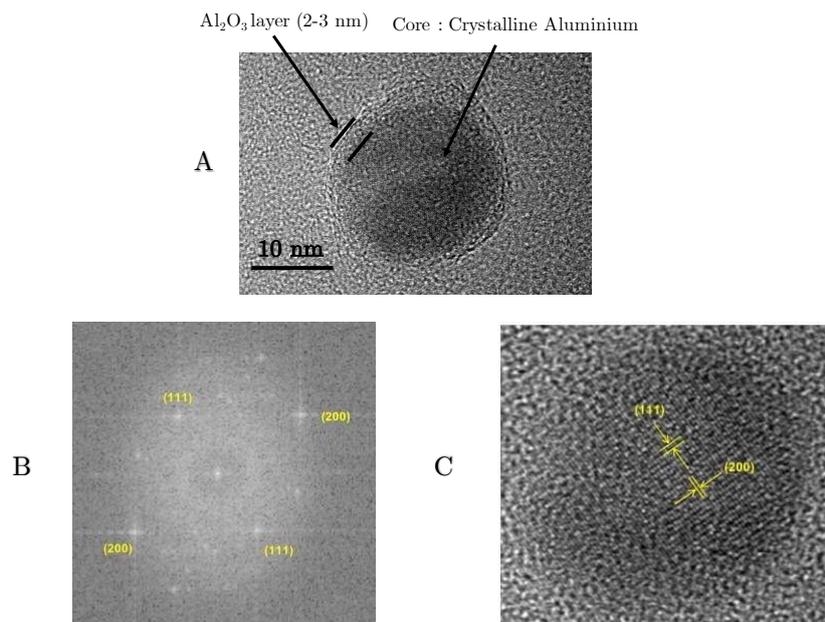


FIGURE 2.9 – Image MET et MET HR. En a, une image MET d'une particule d'aluminium avec sa coquille d'alumine. En B, l'image de diffraction avec les repères des plans. En C, l'image haute résolution montrant les plans cristallins.

III.3 Étude plasmonique

Le bon fonctionnement de notre capteur dépend des propriétés optiques de nos nanoparticules. Par conséquent, nous devons également soumettre nos échantillons à la technique de spectroscopie UV-visible. Dans une cuvette en quartz qui est transparente aux UVs, nous avons mesuré l'absorption de nos solutions de nanoparticules, pour chaque jour de synthèse. La plage optique allait de 200 nanomètres à 800 nanomètres avec un intervalle fin de 0,5 nanomètres.

La figure 2.10 A présente les résultats obtenus : il y a présence d'un large pic aux alentours de 290 nanomètres, qui augmente d'intensité au fil des jours de synthèse et un épaulement aux alentours des 330 nanomètres. Le premier pic est un mélange de la réponse plasmonique de nos nanoparticules d'aluminium et de la signature du solvant. En effet, bien que le solvant (l'éthanol) soit utilisé comme référence et soustrait en baseline, il est possible que sa faculté d'absorption à 290 nanomètres joue un rôle. L'épaulement quant à lui correspond à la fabrication de nanoparticule de plus grande taille, il est d'ailleurs particulièrement marqué pour la courbe rouge du jour 14, du fait de la plus grande polydispersité de cet échantillon.

Pour mieux comprendre ce spectre, nous avons réalisé une modélisation des pics sur le logiciel Igor Pro (pack multipeak). Nous avons trouvé deux pics pour chaque courbe et un troisième à partir du jour 12. Nous avons alors tenté de mesurer trois grandeurs caractéristiques pour chaque pic : l'absorbance maximale (au sommet du pic) , la largeur à mi-hauteur et la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance. La figure 2.10 B représente la modélisation du premier pic et la figure 2.10 C, le graphique de ces trois paramètres tracés en fonction du jour de recuit pour ce premier pic. Cependant, comme le démontre l'aspect des courbes, il est difficile d'en extraire une conclusion. La polydispersité des solutions, même faible, entraîne une largeur du pic plasmonique trop importante et une incapacité de voir un quelconque déplacement vers le rouge, comme cela est attendu lorsque l'on augmente le diamètre d'une nanoparticule sphérique. De plus, même en tenant compte de la polydispersité de nos échantillons pour associer la théorie à l'expérience, cette caractérisation reste insuffisante.

Par conséquent, la suite du projet concernera le montage d'un microscope confocal UV, dans le but d'obtenir une réponse optique plus précise, notamment en utilisant l'observation de particules uniques. Ce travail a demandé plusieurs années de développement et est présenté en détail dans le chapitre 3.

IV Conclusion et perspective

Nous avons conçu pour ce projet, une nouvelle méthode permettant de fabriquer des nanoparticules d'aluminium sphériques, allant de 10 à 100 nanomètres de diamètre, dans de l'éthanol et avec une bonne concentration. Cette synthèse utilise dans un premier temps la sonochimie, qui avec la puissance des bulles de cavitation, transforme des feuillets d'aluminium en ions d'aluminium. Ces mêmes ions vont être utilisés dans un second temps comme précurseurs dans une étape de recuit, utilisant la solvochimie pour les transformer en nanoparticules. Le protocole nous permet d'obtenir des particules qui ont des propriétés optiques adaptées pour notre projet, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

La science ne se limitant pas à un seul projet, nous pouvons envisager d'utiliser les nanoparticules obtenues pour d'autres axes de recherche, comme le domaine des carburants verts [97] . Il est éga-

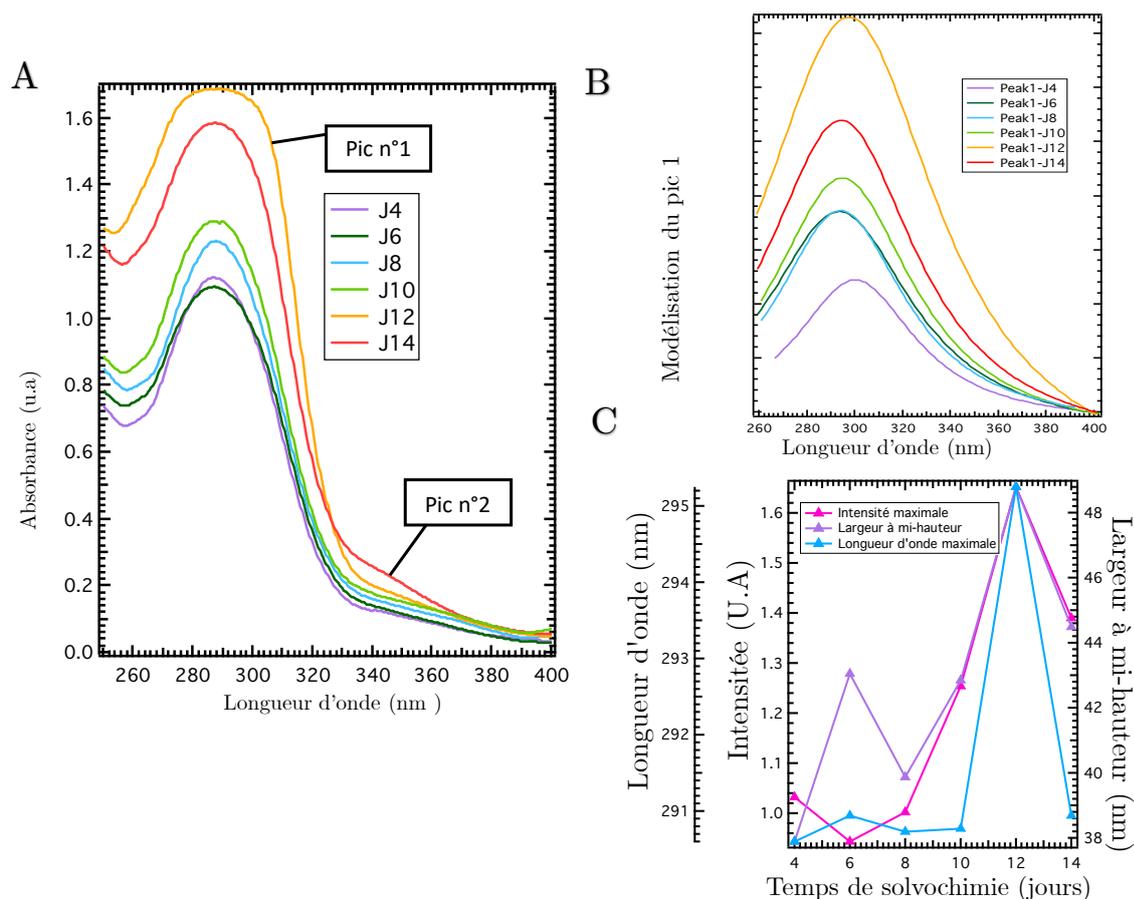


FIGURE 2.10 – Mesure de l'absorbance de nos solutions de particules par spectroscopie UV-visible. En A, les spectres obtenus pour chaque échantillon de la synthèse. En B, le premier pic modélisé avec le logiciel Igor Pro. En C, quelques statistiques sur le premier pic obtenu, tracées en fonction du temps de recuit.

lement possible de détourner notre nouvelle méthode pour obtenir d'autres formes de particules ou d'autres métaux. Ces ouvertures sont présentées ci-dessous.

IV.1 Utilisation dans les nouveaux carburants

La fabrication de nanoparticules d'aluminium possède de nombreux intérêts qui ne sont pas uniquement reliés aux projets concernant la nanotechnologie. L'industrie utilise, à raison de 200 kilotonnes par an, des poudres d'aluminium obtenues à partir de déchet de la métallurgie. Ces poudres sont composées de particules micrométriques et servent d'additif dans les carburants ou les explosifs. En effet, l'aluminium possède une impressionnante capacité d'explosion, en plus d'avoir une couche d'oxyde native qui le rend stable, même en contact d'hydrocarbure [97][98].

Li and al. [99] ont étudié l'explosivité de différentes poudres d'aluminium en utilisant un système de vidéo corrélé à un modèle physique. Ils ont notamment conclu sans détour que lorsque la taille des particules d'aluminium diminue, la capacité d'explosion augmente, avec un idéal pour des poudres contenant des nanoparticules de 75 nanomètres de diamètre. D'autres études démontrent comment les nanoparticules d'aluminium augmentent la portée et les temps de combustion pour les carburants de fusées. Dans le cas du diesel, elles réduisent même la consommation et les émissions de carbones des moteurs [100].

Pour aller encore plus loin, en modifiant la surface des nanoparticules d'aluminium par la chimie, l'efficacité des poudres pourrait être accentuée. C'est ce que démontre Gottfried et al. [101], avec des nanoparticules d'aluminium entourées d'une coquille d'iodate d'aluminium hexahydrate (AlH), qui améliore de 30 pour cent la détonation du TNT .

Notre nouvelle synthèse nous permet de produire en masse et à faible coût des nanoparticules d'aluminium qui pourront être utilisées pour la fabrication de carburant vert. Les tailles obtenues sont optimales. De plus, en ajoutant des additifs dans le recuit, nous pouvons imaginer modifier la surface de celle-ci assez facilement. Il serait donc intéressant d'envisager des études sur la portée des explosions de nos nanoparticules.

IV.2 Possibilité de changement de forme

Durant ces trois années de thèse, nous souhaitons modifier la forme de nos nanoparticules. Plusieurs essais ont été conduits avec différents additifs, ajoutés dans le recuit. Les particules obtenues étaient observées au MEB. En ajoutant du TOP (trioctylphosphine), un additif qui est utilisé dans d'autres synthèses, nous avons obtenu des premiers résultats. Ce composé dispose d'affinité importante avec certaines organisations cristallines et permet d'agir sur la croissance en favorisant un plan et donc une orientation [102][103]. La figure 2.11 montre des nanoparticules de forme d'octaèdre tronqué, avec des facettes bien distinctes, d'un diamètre de 100 nanomètres en moyenne. Nous avons à l'origine exclu ces résultats et classé ces particules dans la case de déchets organiques. Or, la publication de Lu et al.[77] montre le même type de structure, avec le même ordre de grandeur . Il pourrait donc être intéressant de reproduire ce résultat et de caractériser les particules avec d'autres appareils, comme le MET HR. La littérature sur les synthèses chimiques de nanoparticules propose aussi d'autres additifs, qui pourraient également être testés pour l'aluminium.

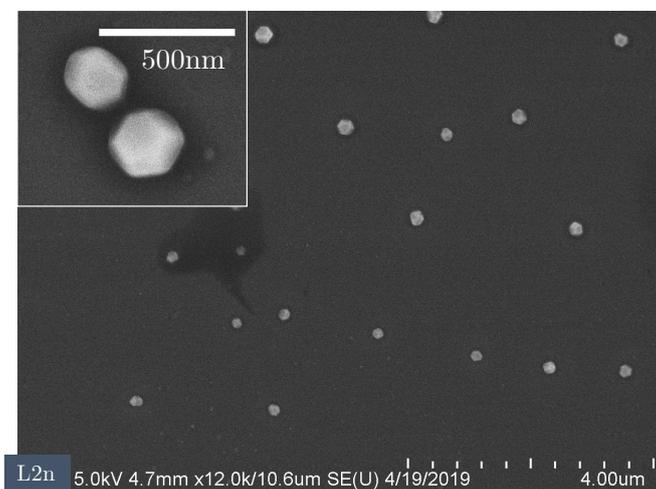


FIGURE 2.11 – Photographies MEB d'un échantillon de nanoparticules d'aluminium hexagonales obtenues durant une synthèse contenant un additif.

IV.3 Possibilité d'autres synthèses

Nous avons proposé une nouvelle méthode de synthèse, combinant deux étapes, la sonochimie et la solvochimie. Nous pourrions envisager de transférer cette technique pour la synthèse d'autres

métaux. Par exemple, les déchets de la métallurgie pourraient remplacer les feuillets d'aluminium et ainsi être valorisés, ce qui donnerait lieu à la synthèse de nanoparticules de fer ou de cuivre. De plus, en choisissant par exemple des sels naturels ou des algues, la fabrication de nanoparticules de magnésium ou d'iode est hypothétiquement envisageable. Ces études demanderont cependant un travail approfondi pour modifier les paramètres de la synthèse, étape par étape.

Chapitre 3

Microscope confocal UV pour la détection de particules uniques

Le projet de cette thèse consiste en la fabrication d'un capteur plasmonique dans le domaine des ultra-violetts pour la biologie. En raison des nombreux arguments appuyant les performances de l'aluminium pour la plasmonique UV, comme présenté dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons fabriqué des nanoparticules d'aluminium colloïdales. Les détails de cette synthèse ont été présentés dans le chapitre 2. Or, pour prouver la performance optique de ces nano-objets, il est indispensable de connaître leurs réponses plasmoniques.

Actuellement, il existe plusieurs méthodes de détection du plasmon, que ça soit pour le plasmon de surface SPR ou pour le plasmon localisé LSPR. Le choix de la méthode dépend du type d'objet à observer, de la gamme spectrale d'observation et de la précision souhaitée. Par exemple, mesurer la réponse plasmonique d'un ensemble de nanoparticules sera moins délicat que pour une nanoparticule seule, puisque la forte densité de nanoparticules dans la surface de mesure amplifie le signal et augmente le rapport signal sur bruit (SNR).

Nous souhaitons ici mesurer la réponse plasmonique de nos nanoparticules d'aluminium via des mesures d'extinction. Nous avons alors choisi d'utiliser la microscopie confocale. Cette technique offre de nombreux avantages : simplicité, précision et large gamme spectrale de détection. Cependant, il n'existe que très peu de microscopes confocaux dans le domaine UV sur le marché et les coûts d'acquisition sont très importants. Nous avons donc développé notre propre microscope optique confocal dans l'UV pour la détection de nanoparticules uniques.

Dans ce chapitre, nous développerons dans un premier temps les différentes techniques existantes pour mesurer la réponse plasmonique de nanoobjets. Nous justifierons ainsi notre choix pour la technique de microscopie confocale en présentant différentes études utilisant cette méthode. Dans un deuxième temps, nous exposerons les étapes du développement de notre montage optique et les obstacles que nous avons pu rencontrer. Dans un troisième temps, nous illustrerons la caractérisation de différents échantillons en aluminium et particulièrement la mesure optique de nos nanoparticules d'aluminium colloïdales. Enfin nous conclurons sur les pistes d'amélioration de ce microscope ainsi que les possibles ajouts de matériel pour intégrer d'autres techniques de détection sur le même montage.

Sommaire

I	Introduction aux méthodes de spectroscopie	54
I.1	Technique de microscopie pour la plasmonique	54
I.2	Microscope confocal	55

I.3	La détection dans l'UV	56
II	Développement d'un microscope optique confocal pour l'UV	57
II.1	Contrainte et première forme	57
II.2	Modification des composants	60
II.3	Forme actuelle	64
III	Étude de nanoparticules uniques d'aluminium	65
III.1	Plot d'aluminium unique	66
III.2	Nanoparticule d'aluminium colloïdale unique	67
IV	Conclusion et perspective	71
IV.1	Amélioration du montage	71
IV.2	Dimères d'aluminium	72

I Introduction aux méthodes de spectroscopie

I.1 Technique de microscopie pour la plasmonique

Lorsque l'on souhaite observer la réponse plasmonique d'un objet, la première distinction à faire est sur le type de plasmon à observer : est-il sur une surface (2 dimensions) ? (*Surface Plasmon Resonance* SPR) ? Est-il à la surface d'un objet en 3 dimensions ? (*Localized Surface Plasmon Resonance* LSPR). Ces deux types de résonances sont développées en détail dans le chapitre 1 du manuscrit, dans la partie plasmonique. Pour la première solution, un prisme est intégré au montage optique afin d'illuminer l'échantillon avec un grand angle permettant de coupler la lumière au film métallique. La mesure provient ici de l'amplitude de la lumière réfléchiée. Cette technique est utilisée dans le cadre de capteurs plasmoniques pour la biologie mais elle nécessite d'immobiliser les composants sur une surface, notamment un film d'or et est encore peu utilisée dans le domaine des UVs[104][105]. Avec les nanoparticules d'aluminium en solution, nous sommes dans la configuration d'un plasmon de surface localisé, autour des nanoparticules. Deux grandeurs physiques sont alors mesurables, l'absorption et la diffusion, ou la somme des deux composantes : l'extinction. La méthode de spectroscopie la plus accessible dans un premier temps est la spectroscopie d'absorbance UV-visible. Cette méthode consiste à envoyer une source polychromatique sur un échantillon, liquide (en cuvette) ou solide, et de mesurer la différence entre l'intensité émise et celle mesurée après l'échantillon, selon la loi de Beer-Lambert (figure 3.1 A et B). L'on obtient alors un spectre d'extinction, avec un pic caractéristique du plasmon de surface localisé des particules (figure 3.1 C). Cette méthode est simple, cependant, l'extinction est grandement influencée par le diamètre des particules dans la solution et l'environnement [29]. Ainsi, pour nos nanoparticules d'aluminium, il est difficile d'obtenir une conclusion précise sur les spectres obtenus dû à la polydispersité en taille des échantillons et à l'absorption des solvants organiques dans l'UV (chapitre 2, caractérisation optique).

Nous avons alors élargi les mesures à d'autres techniques de microscopie, permettant de mesurer l'extinction. Les microscopes classiques permettent d'obtenir des images des nanoparticules mais l'obtention d'un spectre optique précis est limitée par la résolution de ces montages, les zones d'illumination et d'observation étant trop importantes pour pouvoir détecter le pic LSPR parmi le bruit. Or, il existe un moyen d'augmenter grandement la résolution dans la limite de la résolution de Rayleigh : la microscopie confocale. Cette technique est présentée dans la partie suivante, nous l'avons sélectionnée pour le projet. Sur ce type de microscope, la résolution est telle qu'il est possible d'obtenir le spectre d'extinction d'une seule particule et donc d'obtenir précisément la relation entre le diamètre de la particule et son pic plasmonique.

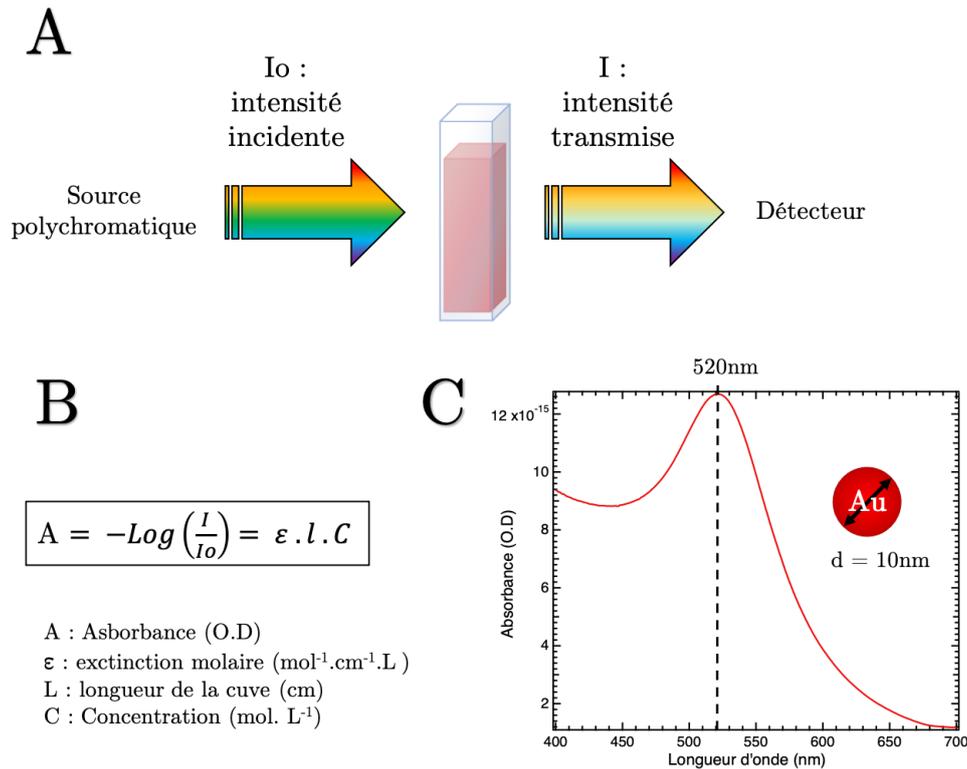


FIGURE 3.1 – Illustration en A de la technique de spectroscopie d'absorbance UV-visible. En B, loi de Beer-Lambert associée à la méthode. En C, exemple d'un spectre d'absorbance d'une solution de nanoparticules d'or colloïdales de 10 nanomètres de diamètre.

I.2 Microscope confocal

Le tout premier microscope optique confocal a été pensé par le chercheur Marvin Minsky en 1953 [106]. En souhaitant observer des coupes de cellules neuronales au microscope, il s'est aperçu que la densité des tissus provoquait beaucoup de diffusion et donnait une image floue. Il a donc modifié le microscope en deux points pour limiter la diffusion : ne plus éclairer en totalité l'échantillon en favorisant plutôt l'observation par zone avec une platine de translation et utiliser un pinhole juste avant le plan image. La figure 3.2 représente le schéma d'un montage confocal classique, avec un pinhole et une source laser. L'échantillon est illuminé point par point et déplacé par une platine de translation. Le miroir dichroïque vient filtrer la signature du laser en ne laissant passer que le signal de l'échantillon, réceptionner sur un détecteur. Devant le détecteur, le pinhole filtre les faisceaux qui ne sont pas dans l'axe optique (en rouge sur le schéma). Le nom confocal du microscope est dû au fait que le pinhole est placé sur le plan image de l'échantillon, il est donc confocal à celui-ci. Avec ce dispositif, il est également possible d'utiliser un système permettant de reconstruire une image en 3 dimensions d'un échantillon en jouant sur le plan de détection en z.

Ce système a été implémenté et développé par la suite pour différentes applications, allant de la biologie aux nanotechnologies. Dans le chapitre 4 de ce manuscrit, nous avons notamment utilisé un montage confocal pour faire des mesures de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), avec un laser comme source et un système de photodiodes à avalanche (APD) en détecteur. Le système confocal ici permet d'observer avec précision la fluorescence d'un objet unique transversant un volume de détection. La publication de A.D. Dinsmore et al. [107] présente un autre exemple d'utilisation d'un montage confocal, où l'on reconstruit en 3 dimensions, un échantillon composé de

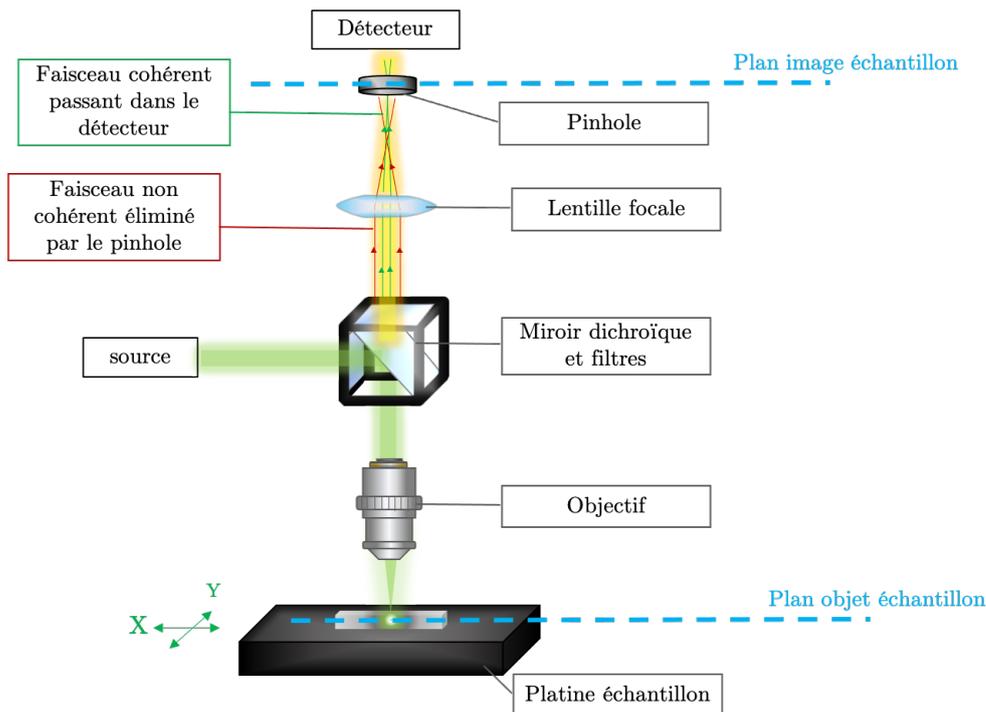


FIGURE 3.2 – Illustration d'un montage confocal classique : une source laser, un objectif qui illumine et collecte à la fois et un pinhole juste avant le détecteur pour éliminer les faisceaux non cohérents.

nanoparticules emprisonnées dans une matrice polymère. Pour détecter la réponse plasmonique de nano-objets métalliques, la microscopie confocale est également intéressante, comme le démontre la publication de S. Klein et al. [108], où les auteurs sont capables de compter et de mesurer optiquement, particule par particule, des nanoparticules d'or à l'intérieur d'une cellule bovine.

La version la plus aboutie de ce système est le modèle 4-Pi, où l'on utilise deux objectifs semblables pour l'illumination et la collection, afin d'augmenter encore plus la résolution (ici axiale) en utilisant le phénomène d'interférence. Il existe trois configurations avec laser et trois autres configurations similaires lorsque la source n'est pas un laser [109]. La différence entre ces configurations dépend surtout du chemin optique de la source : l'échantillon est éclairé par les deux objectifs ou l'un des deux. Le schéma de la figure 3.3 reprend l'exemple simplifié d'un microscope confocal 4-Pi en configuration C (les deux objectifs font en même temps l'illumination et la collection). Ce montage peut être associé à différentes sources à la fois (laser argon, laser multiphoton...), en ajoutant des filtres, permettant ainsi un grand panel d'observation sur une large gamme spectrale (380-1100 nm).

I.3 La détection dans l'UV

La diversification des projets de recherche en nanotechnologie incluant aujourd'hui plusieurs disciplines scientifiques (chimie, biologie, biotechnologie) entraîne de nouveaux besoins optiques, notamment dans le domaine de l'Ultraviolet. Dans la littérature, l'intérêt de ce domaine optique est plutôt récent [52]. Or le microscope confocal présenté précédemment a principalement été développé pour le visible. En effet, dans le visible, les composants optiques sont performants et il existe un large panel de matériaux ou de revêtements. Il est plus facile et peu coûteux de trouver une source. De plus, en nanotechnologie et plus particulièrement en plasmonique, l'or est un matériau de référence pour son excellente réponse plasmonique dans le visible. Dans la gamme spectrale UV, il est nécessaire

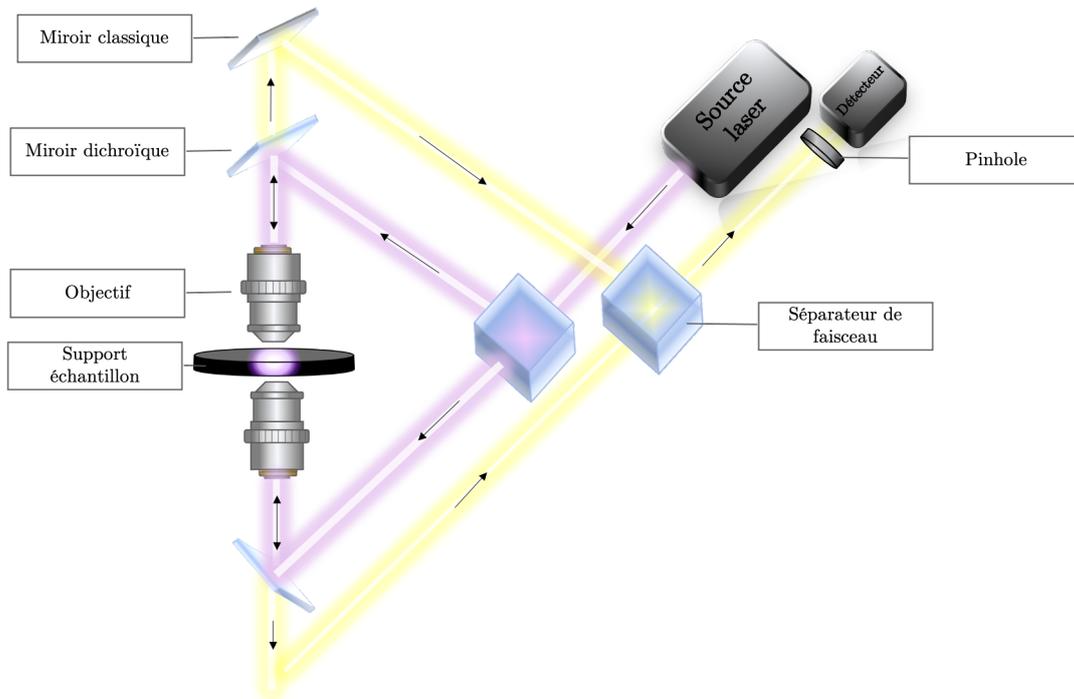


FIGURE 3.3 – Illustration d'un montage confocal 4-Pi, en configuration C.

d'utiliser du verre de quartz (ou silice fondue) puisque le verre classique absorbe les longueurs d'onde en dessous de 350 nm. De plus, là où dans le visible, les aberrations géométriques pourront être corrigées par un revêtement, dans les UVs, ces mêmes revêtements absorberaient également les longueurs d'onde inférieures à 400 nm. La fluorescence des objets dans les UVs est aussi un facteur à prendre en compte, par exemple, de nombreuses huiles d'indice utilisées en microscopie sont fluorescentes et génèrent du bruit optique. L'optique pour l'ultraviolet s'est donc développé petit à petit, en tenant compte de ces limitations. Aujourd'hui, quasiment toutes les gammes de composants optiques ont une référence produit pour le domaine des UVs. De plus, de plus en plus de nouveaux métaux pour la plasmonique UV (aluminium, indium, magnésium...) sont étudiés [52].

Pour ce projet avec l'aluminium, nous avons donc construit notre propre montage optique, un microscope optique confocal pour l'UV puisqu'il n'existe encore aucun dispositif commercial sur le marché. Nous nous sommes procuré des éléments optiques conçus pour l'UV chez différents fournisseurs et nous avons, étape par étape, perfectionné le montage.

II Développement d'un microscope optique confocal pour l'UV

II.1 Contrainte et première forme

Lors de la première réflexion sur le montage, nous avons défini un cahier des charges avec certaines contraintes à respecter :

- Avoir une source à large spectre couvrant la majeure partie des UVs et une partie du visible
- Limiter le coût total du montage
- Présenter le montage selon un axe vertical

Les deux premiers points sont couramment étudiés lors de la fabrication d'un nouveau montage optique. En revanche, pour le troisième point, nous avons ajouté cette contrainte supplémentaire dans l'objectif de réutiliser des éléments pour un autre montage. En effet, plutôt que de multiplier le matériel et engendrer des frais supplémentaires, il est plus judicieux de combiner les montages lorsque cela est possible. Pour ajouter une autre source, comme un laser, le montage n'a pas besoin de modifications majeures, il suffit d'ajouter des miroirs et d'incorporer la nouvelle source sur le chemin optique existant. À l'inverse, pour des techniques éloignées de la microscopie confocale, comme la technique de TIRF présentée dans la dernière partie de ce chapitre, il est nécessaire de changer tout le système d'illumination. Par conséquent, nous avons fait le choix de construire le montage verticalement en plaçant la partie détection sur un tableau coulissant, pour pouvoir la réutiliser sur un autre montage. De plus, pour des applications en biologie, il est plus intéressant d'être dans une configuration verticale.

La première partie d'un montage optique concerne la source. Le choix de la source dépend de son spectre optique, de sa puissance et de sa stabilité. La détection de molécule unique demande une puissance suffisamment importante pour avoir un bon rapport signal sur bruit sans pour autant dégrader l'échantillon. Aussi, lorsque la source traverse différents composants optiques comme un objectif, la puissance est impactée et elle peut rapidement diminuer. Pour notre projet, il est donc préférable de sélectionner une source avec une grande puissance qui pourra être diminuée en utilisant des densités optiques. Nous avons alors sélectionné une lampe à plasma, stabilisée par laser, dit lampe LDSL en anglais, de la marque Energetic. Un laser est envoyé sur une lentille et est focalisé sur un système nommé ampoule qui génère alors un plasma Xénon. Le spectre obtenu avec cette lampe est très large, allant de 190 nanomètres à 2400 nanomètres, la partie la plus intense se trouvant dans le domaine UV.

Pour obtenir un faisceau de qualité, nous avons utilisé un collimateur réfléchissant Thorlabs (référence RC08FC-F01). Il est composé d'une entrée pour fibre adaptative et d'une sortie sphérique au diamètre personnalisable. À l'intérieur, un miroir parabolique permet de collecter la lumière arrivant de la fibre et de collimater le faisceau, c'est à dire, d'obtenir en sortie un faisceau "parfaitement" parallèle. Ensuite, le faisceau passe par trois miroirs en aluminium pour l'UV (référence PF10-03-F01 chez Thorlabs), afin de créer un chemin optique vertical. Il peut être utile de notifier que le miroir permettant le changement d'axe, de l'horizontal à la vertical, est le plus délicat à manipuler. Pour faciliter l'alignement, ce miroir a été monté sur une platine de translation micrométrique (figure 3.4). Autre commentaire utile lors d'un montage vertical, la hauteur initiale du faisceau est importante puisqu'il est nécessaire d'anticiper la distance entre le tableau vertical et le faisceau. En effet, un chemin optique trop proche de la table optique, donc trop proche du tableau vertical, entraînera une difficulté pour placer correctement les éléments optiques verticaux mais un chemin optique trop éloigné de la table optique, donc trop loin du tableau vertical, entraînera une instabilité (vibration).

La seconde partie d'un montage optique se concentre sur le positionnement de l'échantillon et la technique d'illumination de celui-ci. Dans le cadre du projet, nous avons choisi d'utiliser un porte-échantillon vertical fait maison qui était déjà en notre possession (figure 3.5, vue de haut). Il est composé d'un grand support rectangulaire en acier, fixé sur deux plateformes de translation micrométrique, de la marque Newport. Le système était accompagné de différentes lames d'aluminium, percées au centre par des disques de différents diamètres, comme schématisé dans la figure 3.5. Le premier avantage de ce support est la possibilité de déplacer facilement l'échantillon par translation selon les axes X et Y, à une échelle micrométrique. Le second avantage est la possibilité de personnalisation offerte par les lames d'aluminium. En effet, en choisissant la forme et la taille du perçage au centre, il est possible de déposer toutes sortes d'échantillons au-dessus, même les plus petits, comme les grilles pour le MET qui sont millimétriques. La fabrication de ce support et de ces accessoires a

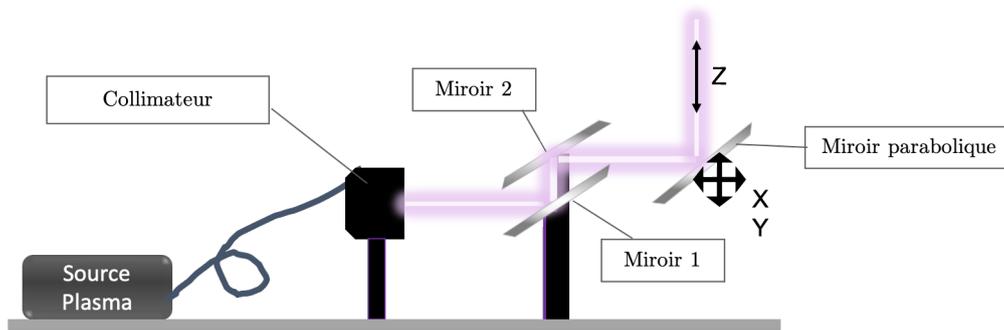


FIGURE 3.4 – Schéma de la mise en place de la source. Le collimateur permet d'obtenir un faisceau parallèle, les deux premiers miroirs permettent de régler le trajet optique et le troisième miroir permet le changement d'axe de la verticale à l'horizontale.

été confiée au centre technique de l'université, qui possède un grand nombre de machines permettant la conception de pièces sur mesure, comme une fraiseuse à commande numérique. Concernant l'illumination de l'échantillon, nous avons choisi un éclairage par le dessous. Pour concentrer le faisceau sur l'échantillon, nous avons utilisé dans cette première version une lentille focale conçue pour l'UV (référence LA4148-ML chez Thorlabs), placée encore une fois sur une platine de translation en Z dans le but d'ajuster le diamètre de la zone d'illumination, en jouant sur la distance focale. Le diamètre le plus petit est obtenu à la distance focale de la lentille, soit 43,2 mm.

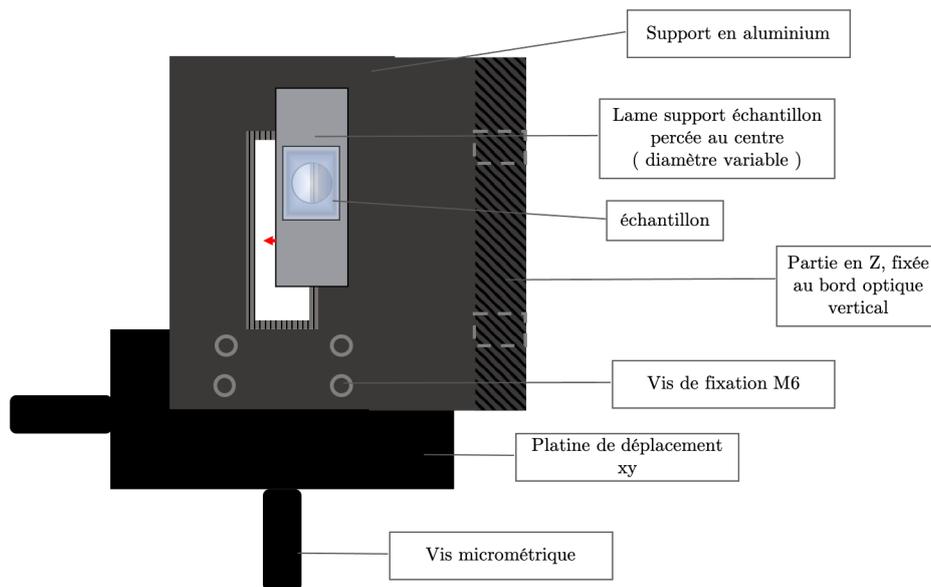


FIGURE 3.5 – Illustration du support échantillon en coupe, vu de haut, avec la lame et la platine de déplacement.

La troisième et dernière partie d'un montage optique se rapporte à la partie détection, composée généralement d'un ou plusieurs objectifs et d'un appareil de mesure ou d'une caméra. Dans le cadre d'un microscope, une seconde lentille, dite lentille de tube, est ajoutée après l'objectif, pour focaliser le plan image de l'échantillon sur l'appareil de détection. De plus, pour un montage confocal, un pinhole est placé juste avant la détection, pour une meilleure résolution, comme présenté précédemment.

Pour notre microscope, une tour d'objectifs est fixée, juste après l'échantillon, comme sur un microscope classique. Ces objectifs sont adaptés au domaine du visible et ont différents grossissements, allant de x20 à x100. La détection de molécules uniques étant complexe, un essai concluant dans le

visible permettait une première validation du montage, d'où l'utilisation de ces objectifs pour cette première version. Nous pouvions alors successivement changer d'objectif, pour obtenir un grossissement croissant. Les trois objectifs proviennent de chez Olympus, gamme plan fluorite et ils ont respectivement les caractéristiques suivantes : x20 NA 0,5 ; x40 N.A 0,75, x100 N.A 0,9.

Concernant la suite du montage, une lentille focale standard pour l'UV focalise le faisceau sur les deux appareils de détection : une caméra pour l'image et une fibre reliée à un spectromètre dont le cœur joue le rôle de pinhole. Pour diviser le chemin optique en deux parties arrivant sur ces appareils, nous utilisons un séparateur de faisceau. La caméra provient de chez Nikon (modèle DSFi3) et permet d'obtenir une image résolue de l'échantillon (capteur à 5,9 mégapixels). Elle est reliée par USB à un ordinateur. Ainsi, les paramètres d'acquisition de la caméra tels que le temps d'exposition, la colorimétrie ou encore le pourcentage de binning sont modifiables en direct avec un logiciel. Pour le spectromètre, nous utilisons pour cette première version un appareil avec un réseau de détection large, allant de 350 nanomètres à 800 nanomètres (référence USB4000-UV-VISIBLE chez OceanOptics).

La partie détection est celle qui a subi le plus d'évolution dans le temps puisque la résolution du signal dépend surtout des éléments la composant. Le point qui suit abordera donc plus en détail l'évolution du séparateur de faisceau et de la seconde lentille focale.

L'ensemble de ce premier montage optique est schématisé dans la figure 3.6. La source lumineuse contenant des UVs traverse plusieurs miroirs et est focalisée sur l'échantillon par une lentille focale. Ensuite, un objectif collecte la lumière renvoyée par l'échantillon et une seconde lentille focale vient imager l'échantillon sur la caméra et sur une fibre. Pour obtenir ces deux images, le faisceau est divisé en deux par un séparateur de faisceau. La fibre de collecte est reliée à un spectromètre et l'on peut à la fois imager l'échantillon et visualiser son spectre. Notons que nous avons la possibilité d'ajouter un polariseur et un analyseur comme sur le schéma pour obtenir une source polarisée voir une polarisation circulaire et éventuellement faire du champ sombre en croisant polariseur et analyseur.

L'élément permettant de faire de la microscopie confocale est représenté dans notre montage par une fibre. En effet, plutôt que de placer un pinhole à l'entrée du spectromètre, nous avons placé une fibre au point focal de la seconde lentille. Ainsi, seule la lumière provenant de l'échantillon était collectée. Aussi, lorsque l'on injecte une source lumineuse à l'autre extrémité de la fibre, on image le diamètre de la fibre sur l'échantillon. Le foyer objet de l'échantillon est superposé au foyer image de la fibre. Par conséquent, sur la caméra, la zone d'analyse est apparente, il est alors possible de placer la zone d'intérêt de l'échantillon dans cette zone précise de collecte. Pour mieux comprendre ce phénomène, la figure 3.7 présente un schéma explicatif du système.

II.2 Modification des composants

La seconde lentille

Dans un microscope, un objectif est toujours associé à une lentille de tube, dans la zone de collecte. Sur notre montage (figure 3.6), cette lentille correspond à la seconde lentille focale. Dans un objectif d'amélioration, nous avons modifié plusieurs fois ce composant. Le schéma de la figure 3.8 représente les trois composants que nous avons utilisés et les différences optiques qu'ils apportent. Le miroir parabolique (référence MPD269-F01 chez Thorlabs) permet d'obtenir un point focal très fin et par conséquent limiter les pertes au niveau de la fibre. Il offre aussi la possibilité de changer d'axe pour le

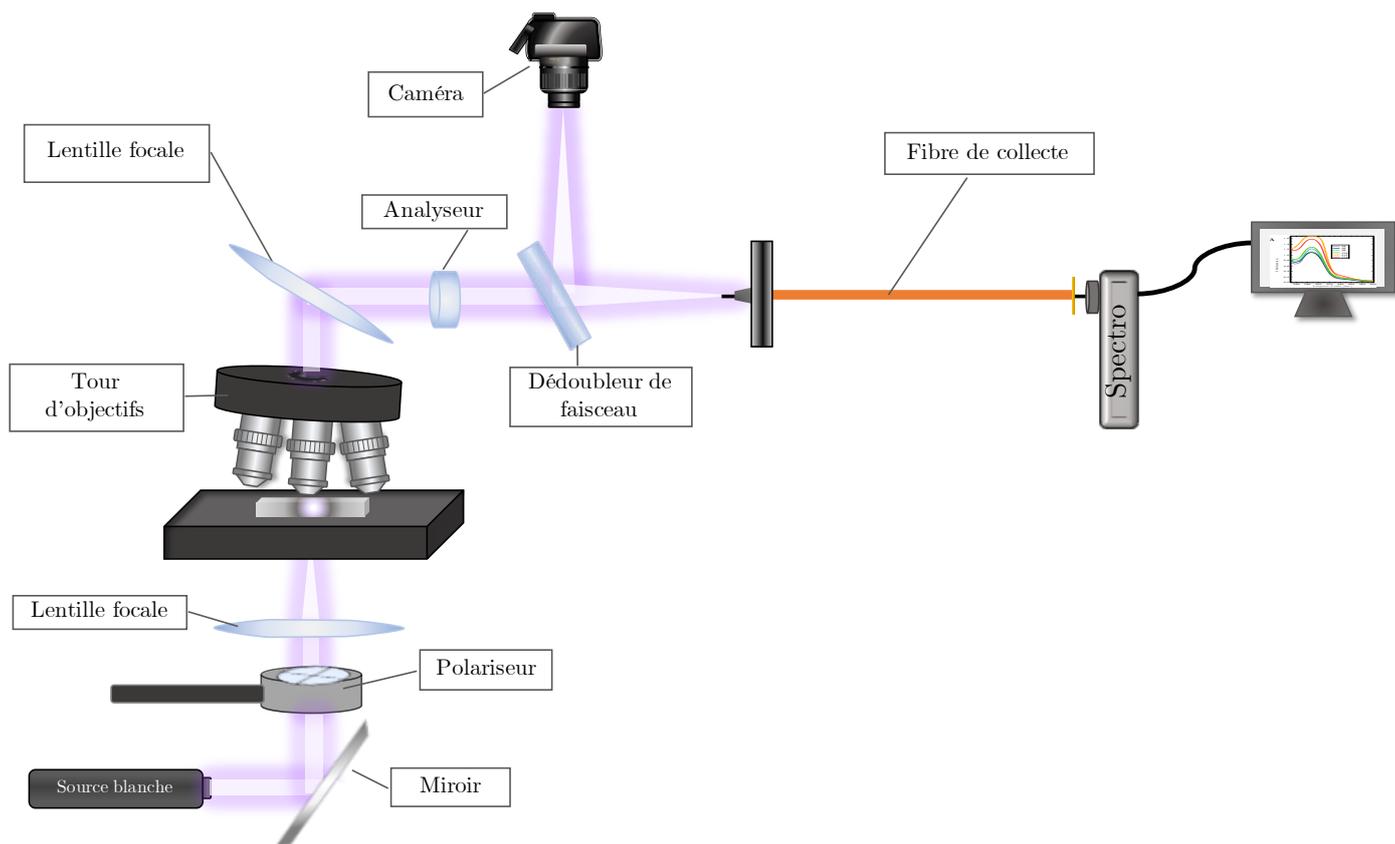


FIGURE 3.6 – Schéma de la première version du microscope optique confocal UV

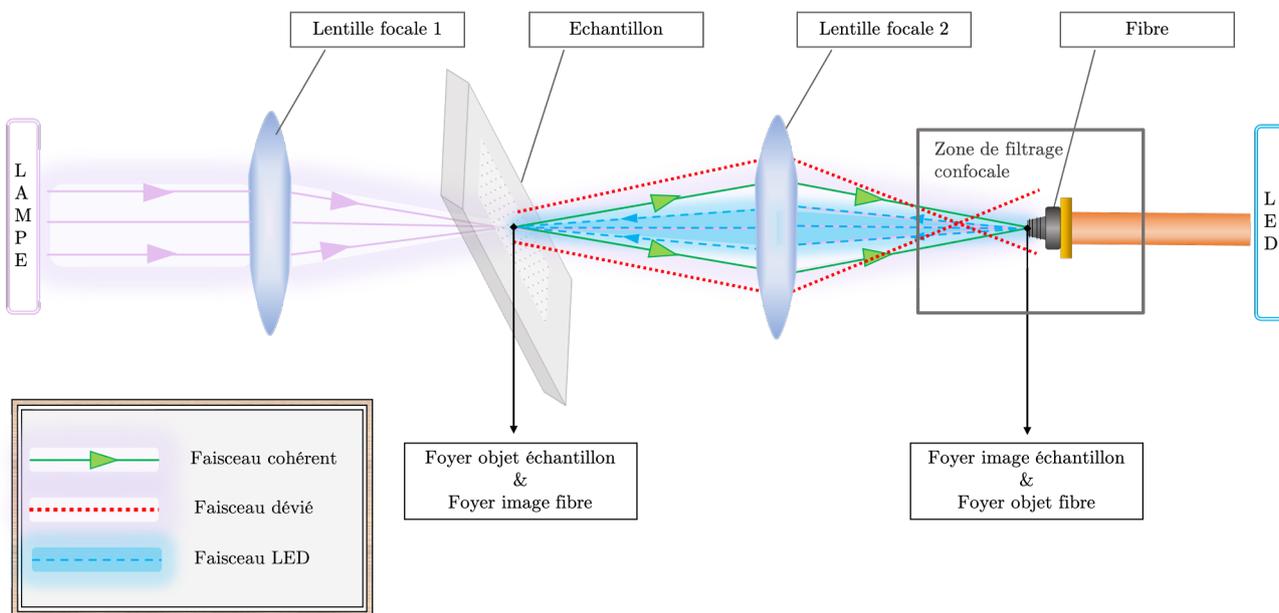


FIGURE 3.7 – Illustration de la partie confocale du montage : la fibre de collecte filtre les faisceaux qui ne sont pas dans l'axe (en rouge) et remplace le classique pinhole.

chemin optique et de faciliter la disposition des éléments de collecte. En revanche, le positionnement d'un tel miroir est un désavantage vu que la verticalité complexifie le placement. De plus, nous avons observé de l'astigmatisme sur le faisceau. Le choix finalement s'est porté sur un doublet achromatique.

Composé de deux lentilles au design spécifique espacées par de l'air, ce composant permet de focaliser assez précisément le faisceau tout en limitant les aberrations sphériques et chromatiques. C'est un point important puisque dans le domaine UV, les revêtements corrigeant ce type d'aberration ne sont pas fréquents.

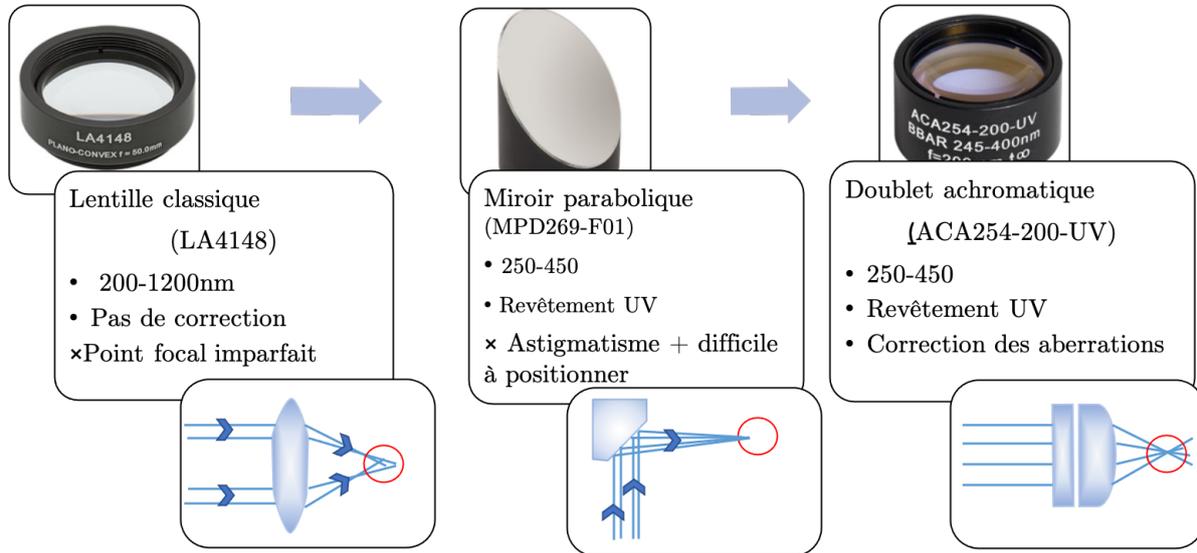


FIGURE 3.8 – Schémas des composants optiques utilisés pour la lentille de tube. La première ligne correspond aux photographies Thorlabs, la seconde reprend les caractéristiques optiques et la troisième ligne correspond au schéma du trajet optique pour chacun des composants.

Le choix de la fibre

Un paramètre important du montage est la fibre de collection. Elle doit avoir un diamètre de cœur suffisamment petit pour filtrer correctement le signal et obtenir une zone de collecte minimale, tout en délivrant un maximum de signal et en minimisant les pertes. Il est également indispensable d'utiliser une fibre ayant une résistance importante à la solarisation, c'est-à-dire qu'il faut que la transmission de la fibre ne se détériore pas ou peu dans l'ultraviolet. En plus de ces paramètres spécifiques à notre montage, il est important de prendre en compte les autres facteurs définissant une fibre optique : le mode de transmission, le revêtement externe, la longueur, le type de sortie, le clivage et le facteur d'atténuation.

Nous avons testé différents types de fibres, venant de plusieurs fournisseurs avec des diamètres de cœur allant de 50 micromètres à 250 micromètres. Au début, nous avons privilégié un cœur de 50 μm pour obtenir une zone de collecte très faible. Finalement, les pertes de signal et l'instabilité du signal avec les vibrations se sont révélées trop importantes. De même, les fibres avec des cœurs de plus de 200 μm affichent une zone de collecte trop importante pour faire de la détection sur nanoparticules uniques. Nous avons également expérimenté deux types de transmission du mode multimodale : le profil d'indice rectangulaire (step index en anglais) et le profil d'indice courbé (graded index en anglais). La différence se trouve dans la fabrication du cœur : en changeant brutalement d'indice pour l'un ou graduellement pour l'autre, la transmission du faisceau se fait différemment. Comme le

montre la figure 3.9 B, dans le mode rectangulaire, le faisceau se propage en se réfléchissant sur la surface avec un angle. En revanche, dans le mode à indice gradué (figure 3.9 A), le faisceau forme une courbe, ce qui limite la perte à longue distance. Le mode courbe est beaucoup plus coûteux que le mode classique rectangulaire. Finalement pour notre montage, ce paramètre n'a pas eu un grand impact et nous sommes restés sur le mode classique rectangulaire.

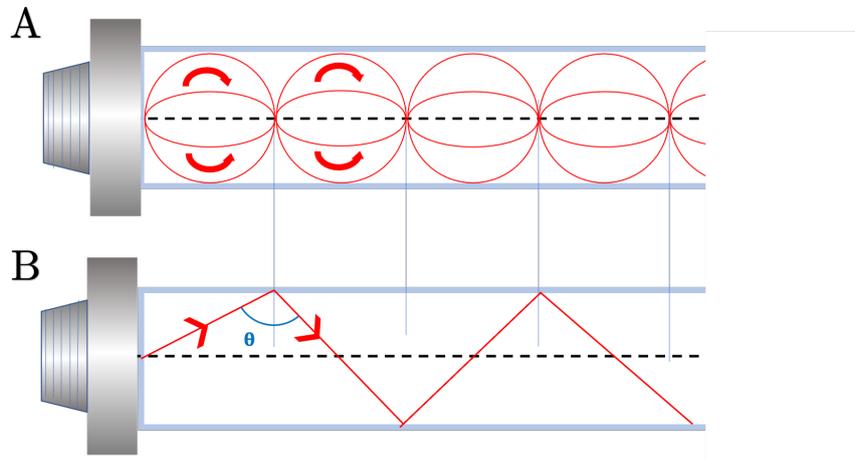


FIGURE 3.9 – Schéma de deux fibres : en A, l'indice est gradué, ce qui entraîne la propagation de la lumière selon une forme de courbe. En B, le mode rectangulaire où l'indice chute brutalement entraînant un chemin optique linéaire avec angles.

Finalement, les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus avec une fibre de chez Ocean Insight (référence QP115-2-XSR), ayant un cœur de $115\ \mu\text{m}$ avec un revêtement en silicone surmonté d'un filetage en acier pour la résistance. Ce modèle possède une résistance extrême à la solarisation et permet de transmettre une gamme spectrale allant de 190 nanomètres à 800 nanomètres.

Le séparateur de faisceau

Le séparateur de faisceau, dit beam splitter en anglais, est le sujet le plus épineux du montage. En effet, c'est un composant indispensable mais le développement industriel de ce produit dans la gamme des ultraviolets est quasi inexistant. Si l'on se rapporte aux paramètres des séparateurs de faisceau, il est important de prendre en compte trois points : la gamme spectrale, le pourcentage du faisceau en transmission et en réflexion et enfin la forme (lame ou cube).

Pour notre projet, la gamme spectrale doit être large et commencer dans le domaine des UVs, préférentiellement dès 200 nanomètres. Pour le faisceau, le signal envoyé sur la fibre doit être maximal, tout en transmettant également une puissance suffisante à la caméra pour obtenir une belle image. Après différents tests, le ratio 50 :50 fonctionne bien puisqu'il permet de visualiser correctement les particules sur la caméra et donc de faciliter la position de la zone de collecte.

Concernant la forme, le cube est idéal puisqu'il permet d'empêcher tout reflet. Cependant, ce type de composant est introuvable pour l'UV. Nous avons tout de même essayé de fabriquer notre propre cube en combinant deux prismes UV (référence PS610, Thorlabs) séparés par un film d'huile d'indice optique (Zeiss Immersol 518F, indice 1,51), sans succès. En effet, le ratio n'était pas bon, nous n'avions pas suffisamment de puissance sur la caméra et trop d'absorption car il y avait beaucoup de matière à traverser. Nous avons donc dû adopter la forme de lame, en essayant de trouver le composant idéal qui limiterait au maximum les reflets gênants sur la face arrière ou encore les aberrations chromatiques.

La figure 3.10 reprend sous forme de tableau tous les composants que nous avons testés, avec un schéma descriptif ainsi qu'un récapitulatif des avantages et des inconvénients de chacun. Pour les mesures qui suivront dans la partie 3 de ce chapitre, nous avons utilisé la lame avec revêtement, référence BSW20R chez Thorlabs. Elle permet d'obtenir un spectre à partir de 250 nanomètres et le reflet provoqué par la face arrière n'est pas source d'un trop grand dérangement. Cette solution reste imparfaite mais permet tout de même d'obtenir des résultats satisfaisants.

Nom et référence	Caractéristiques optiques	Schéma optique	Avantages	Inconvénients
Lame de quartz	<ul style="list-style-type: none"> Épaisseur 5 mm 200-1200 nm 70/30 		<ul style="list-style-type: none"> Faible coût 	<ul style="list-style-type: none"> Deux reflats peu de signal sur la caméra
Polka dot <u>BPD254-FS</u>	<ul style="list-style-type: none"> Grille en aluminium 250-2000 nm 50/50 		<ul style="list-style-type: none"> Gamme spectrale large 	<ul style="list-style-type: none"> Figure de diffraction
Lame incurvée <u>BSF2550</u>	<ul style="list-style-type: none"> Forme trapézoïdale 185-2100 nm 80/20 		<ul style="list-style-type: none"> Pas de reflet dans le champs 	<ul style="list-style-type: none"> Faisceau incohérent Perte de signal
Cube maison <u>PS610</u>	<ul style="list-style-type: none"> 185-2100 nm 50/50 		<ul style="list-style-type: none"> Choix du revêtement 	<ul style="list-style-type: none"> Difficulté de mise en œuvre Coupe à 350nm
Lame <u>BSW20R</u>	<ul style="list-style-type: none"> Épaisseur 1mm 250-450 nm 50/50 		<ul style="list-style-type: none"> Bon signal 	<ul style="list-style-type: none"> Reflats Coupe à 250nm et moins performant au dessus de 600nm

FIGURE 3.10 – Tableau listant les différentes solutions utilisées pour le séparateur de faisceau. Les colonnes 1 et 2 reprennent le nom, la référence et les caractéristiques optiques. La troisième colonne montre le schéma optique du composé associé à l'image du laser sur la caméra pour illustrer l'impact des reflats. Enfin les deux dernières colonnes reprennent respectivement les avantages et les inconvénients de chacun des composés.

II.3 Forme actuelle

Avec les améliorations apportées, la forme actuelle du microscope optique nous permet de mesurer le signal LSPR de particules uniques en aluminium. La gamme spectrale du microscope couvre les UVs et le visible, de 230 nanomètres à 650 nanomètres.

Le schéma de la figure 3.11 présente le montage. La source n'a pas changé, nous utilisons toujours la lampe blanche à plasma.

Concernant la partie illumination, nous utilisons désormais un objectif UV de grossissement x5, ouverture numérique de 0,12, pour focaliser le faisceau sur l'échantillon (référence LMU-5X-UVB, Thorlabs). Avec cette technique, la zone illuminée est plus petite et la puissance est plus grande ce qui permet d'amplifier localement l'interaction entre l'échantillon et la source. De plus, en jouant sur la distance de travail de l'échantillon qui est de 37,3 mm, il est possible d'obtenir un spot d'illumination plus ou moins grand, le minimum ayant un diamètre de 3 microns. Cette technique

permet d'obtenir une puissance suffisante pour faire de la détection de particule unique. Il est tout à fait envisageable d'utiliser un objectif semblable avec un grossissement supérieur pour obtenir encore plus de puissance.

Un polariseur s'ajoute ou se retire facilement sur le montage par un système de pied à fixation magnétique. Nous utilisons un polariseur UV type Rochon (référence RPM10, Thorlabs) puisqu'il permet de séparer efficacement la lumière polarisée en S de la lumière polarisée en P qui reste parfaitement dans l'axe. En plaçant un pinhole juste après, le second faisceau est éliminé. Nous avons ajouté à la platine de l'échantillon deux vis piézoélectriques pour pouvoir la déplacer électroniquement et de façon très précise selon les axes x et y. Associée à un contrôleur avec manette, le déplacement se fait sur une course maximum de $3 \mu\text{m}^2$. Cet outil permet de positionner parfaitement une particule dans la zone de collecte mais également d'éviter de toucher le montage et donc de provoquer des vibrations parasitant les mesures.

Concernant l'objectif de collecte, situé juste après l'échantillon, il a fallu faire un choix entre la résolution et la partie UV du spectre électromagnétique. En effet, avec les objectifs visibles, nous avons un objectif de grossissement de x100, avec une ouverture numérique de 0.9. Par conséquent, la résolution permettait la visualisation sur la caméra de petites particules, notamment celle de 60 nanomètres de diamètre. Cependant, il est évident que cet objectif n'était pas optimisé pour les longueurs d'onde inférieures à 400 nanomètres, et nous obtenions difficilement des données dans la gamme des ultraviolets. Nous avons donc changé d'objectif pour prendre un des meilleurs objectifs UV de la gamme Mitutoyo, le M plan UV x80. Avec un grossissement de x80 et une ouverture numérique de 0.5, la résolution a considérablement diminué, principalement à cause des limites techniques de fabrication d'optique pour l'UV. En revanche, la distance de travail a été augmentée à 1 cm et désormais, il est possible de déposer une goutte d'indice sur l'échantillon sans toucher l'objectif.

La seconde lentille focale a été remplacée par un doublet achromatique (ACA254-200-UV, Thorlabs) et le séparateur de faisceau, par une lame UV (référence BSW20R). La caméra n'a pas été changée, mais les réglages ont été optimisés pour visualiser plus facilement les nanoparticules lithographiées sur le substrat.

Une amélioration notable concerne l'intégration d'un boîtier de switch optique. Cet appareil nous permet de relier successivement au montage le spectromètre et une LED bleue 432nm, pour visualiser la zone de collecte. Auparavant, cet échange était réalisé manuellement en branchant la fibre de collecte sur l'un des appareils ce qui provoquait des vibrations et une instabilité. Désormais, il est facile de voir l'image de la fibre et donc la zone de collecte sur l'échantillon en changeant simplement de canal d'entrée sur le switch.

III Étude de nanoparticules uniques d'aluminium

Dans le chapitre 2, nous avons fabriqué des nanoparticules d'aluminium colloïdales sphériques dans de l'éthanol avec une nouvelle méthode combinant la sonochimie et la solvochimie. La sonochimie permet la fabrication de précurseurs ioniques d'aluminium en détruisant des feuillets d'aluminium massif. La solvochimie utilise l'oxydation de l'éthylène glycol à sa température d'ébullition et ces mêmes précurseurs pour les transformer en nanoparticules. Chaque jour, les particules vont croître en solution, donnant un diamètre moyen de 10 nanomètres au 4^{ème} jour de recuit à un diamètre moyen de 94 nanomètres au 14^{ème} jour, le tout avec une bonne concentration et une polydispersité assez faible.

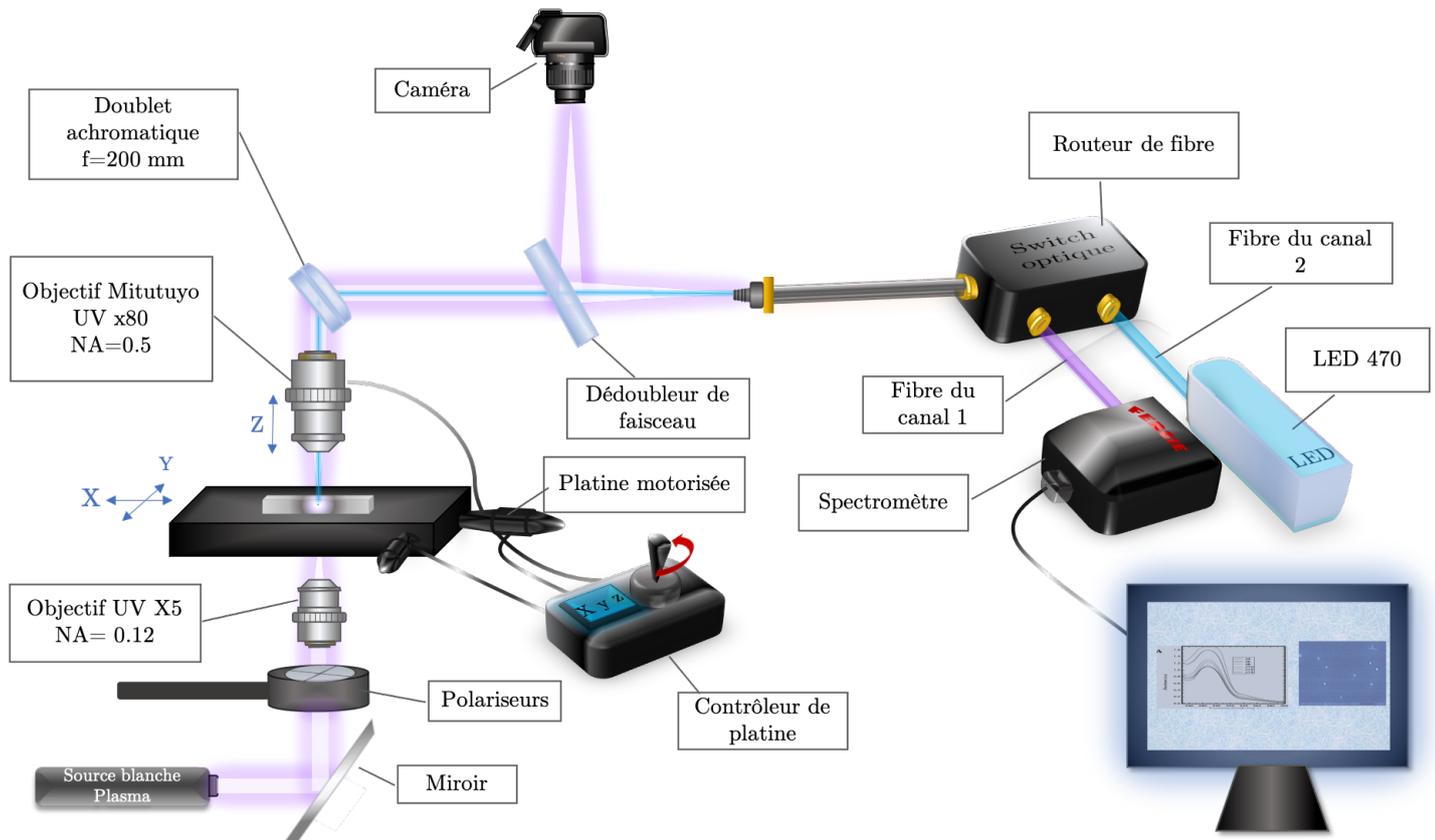


FIGURE 3.11 – Illustration du microscope confocal dans sa dernière version.

Dans l'intérêt de caractériser ces nanoparticules optiquement et de façon précise, nous avons conçu le montage optique présenté précédemment. Dans cette partie, nous aborderons dans un premier temps les mesures obtenues sur l'échantillon de référence, une lithographie électronique de nanodisques en aluminium de différents diamètres connus. Dans un second temps, la mesure des particules colloïdales sera présentée.

III.1 Plot d'aluminium unique

Avant de caractériser les nanoparticules d'aluminium colloïdales et durant tout le processus d'amélioration du montage optique, nous nous sommes servis de lithographies électroniques de plots d'aluminium uniques, comme référence. Pour cela, nous avons réalisé un masque correspondant au schéma de la figure 3.12 A, B et D : une matrice de 9 carrés de $10000 \mu\text{m}^2$, avec à l'intérieur de chaque carré, des plots d'aluminium d'une hauteur de 50 nanomètres, séparés de $3 \mu\text{m}$. Le diamètre des plots change à chaque carré, avec un pas 10 nanomètres, allant de 80 nanomètres à 160 nanomètres. Ainsi, la mesure de chacun des plots est réalisée sans contribution du signal des plots voisins. La photographie du champ sombre de la figure 3.12 C montre l'évolution des couleurs des plots en fonction de leur diamètre, passant ainsi du bleu/gris au vert clair.

L'évolution de la résolution du montage optique est présentée dans la figure 3.13, avec la mesure d'un plot de 110 nanomètres de diamètre. La première courbe en A correspond au signal obtenu lors de la version initiale du montage : une lentille focale classique pour illuminer l'échantillon, un objectif de collecte visible x100 ; une lentille de tube classique ; une fibre de collecte de $100 \mu\text{m}$ de cœur de

faible qualité et un spectromètre optique de base. Le spectre est très bruité mais exploitable. La seconde courbe en B correspond au signal obtenu en ayant modifié tous les composants précédents, hormis l'objectif visible. Il y a une très nette amélioration du bruit, dû d'une part à la plus grande précision du spectromètre et d'autre part aux changements de la fibre et des lentilles focales, comme exposé dans la seconde partie de ce chapitre.

Cette nette amélioration nous permet de mesurer précisément la réponse plasmonique pour chaque diamètre de cylindre, donnant la figure 3.12 E. Le pic LSPR se déplace vers le rouge et s'élargit lorsque le diamètre augmente, du fait de l'apparition de nouveaux modes de résonances. Cependant, le spectre est coupé en dessous de 350 nanomètres, limite de transmission de l'objectif visible. Or, pour notre projet, nous souhaitons mesurer la réponse plasmonique de particules ayant une résonance à 320 nanomètres. Nous devons donc changer d'objectif, pour opter pour un objectif UV. La nouvelle courbe obtenue est présentée dans la figure 3.13 C. Le bruit augmente légèrement et la partie du spectre supérieure à 600 nanomètres devient inexploitable. Cependant, le signal n'est plus du tout bruité dans la partie UV, en dessous de 350 nanomètres. Ainsi, nous pourrions désormais mesurer des nanoparticules ayant des résonances aux alentours de 320, ce que nous souhaitions pour le projet. La limite basse de lecture se trouve désormais à 280 nanomètres.

En utilisant la formule (3.1), il est possible de calculer le rapport signal sur bruit (SNR) pour chacun des spectres de la figure 3.13 et mettre en évidence l'impact des différentes améliorations sur la qualité du spectre. Les valeurs du signal et du bruit sont relevées au niveau du pic LSPR. Ainsi, pour la figure 3.13, A le bruit est de 8,32dB. Il passe à 20,59dB pour le spectre B et redescend légèrement à 19,8dB pour le spectre C. Ce calcul permet de souligner qu'au niveau du pic LSPR, malgré le changement d'objectif (passage du visible à l'UV), il n'y a pas d'impact majeur.

$$SNR = 20 \times \log\left(\frac{I_{signal}}{I_{bruit}}\right) \quad (3.1)$$

III.2 Nanoparticule d'aluminium colloïdale unique

Après s'être assuré de la viabilité du montage optique avec l'échantillon de référence, nous avons réalisé la caractérisation des colloïdes d'aluminium. Pour ce faire, une goutte de solution de nanoparticules du 14^{ème} jour de solvochimie (diamètre moyen de 97 nanomètres, polydispersité de 32 nanomètres) est déposée sur une lame de quartz, gravée d'une grille (Figure 3.14 A). Cette grille est imprimée sur le substrat à l'aide d'un masque dans une enceinte sous vide par gravure ionique réactive. Elle est composée de 4 zones de 100 cases, numérotées et chiffrées, pour que chacune des cases ait son propre repère : par exemple, la première case de la zone 1 se nomme A1. Chacune des cases a une surface de 10000 μm^2 . L'objectif est d'avoir un minimum de particules par cases pour quelles soient espacées suffisamment pour faire la mesure sur particules uniques. L'échantillon déposé est donc une dilution par 5 de l'échantillon original et le volume est infime (1 μL). Le dépôt doit être réalisé légèrement excentré de la grille, afin d'éviter les phénomènes d'agglomération par séchage, notamment les couronnes de séchage.

Ensuite, les nanoparticules d'aluminium déposées sur la grille sont recensées en utilisant un microscope à champ-sombre (figure 3.14 B). En effet, le champ sombre va permettre de mieux les visualiser puisque l'on ne voit que la diffusion, par l'effet Tyndal [110]. Ainsi, elles sont pour la plupart visibles avec un grossissement x80 malgré la faible diffusion de l'aluminium. Leurs couleurs varient en fonction de leurs diamètres, les plus petites sont grisâtres et les plus grandes, vertes. En plus de photographies, chaque emplacement de particules a été soigneusement noté dans un cahier de laboratoire pour pouvoir les retrouver facilement à la prochaine étape de mesure spectrale.

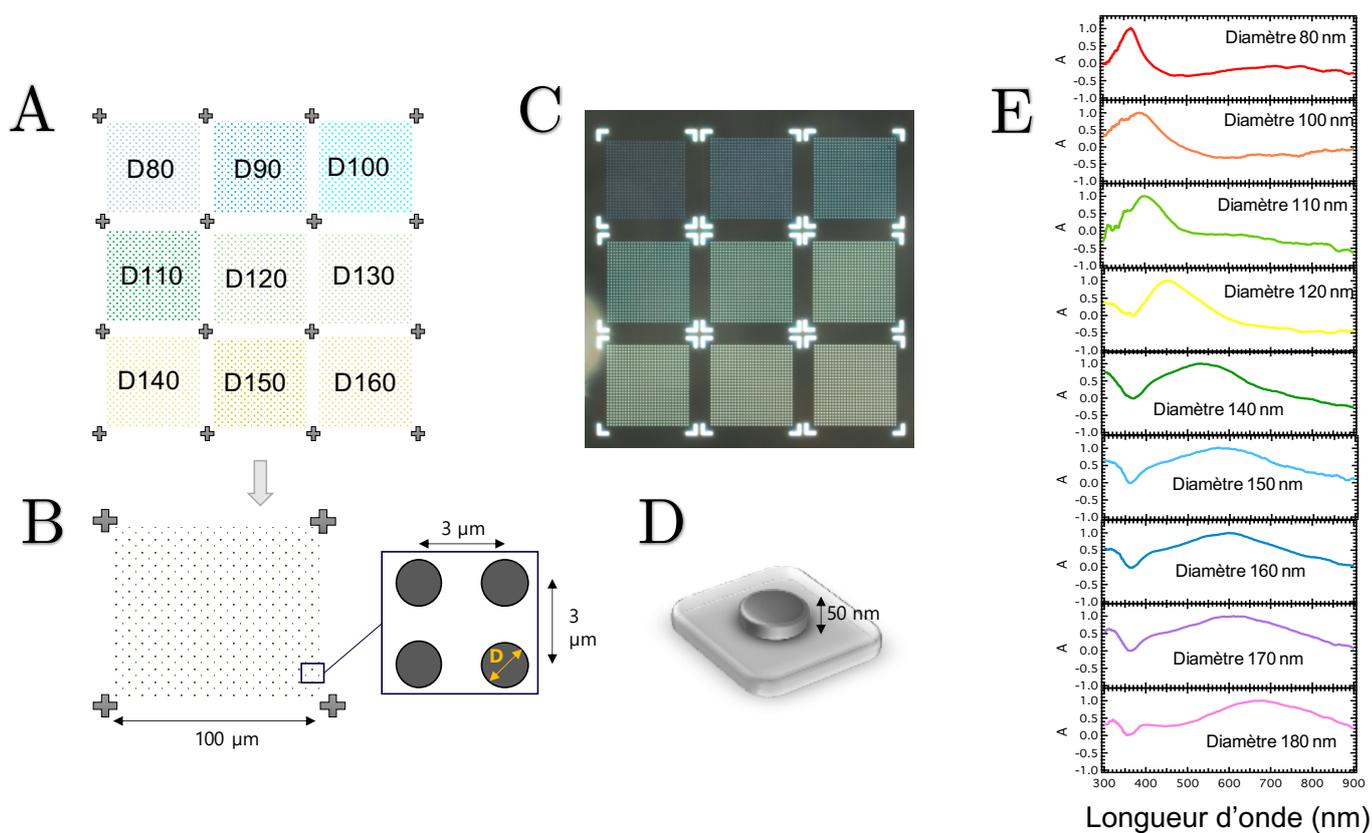


FIGURE 3.12 – Illustration de l'échantillon lithographié test. En A, B et D, le schéma du design de la lithographie. En B, l'image en champ sombre de l'échantillon. En E, les spectres expérimentaux des disques d'aluminium : du plus petit diamètre en haut (80 nanomètres) au plus grand diamètre (180 nanomètres).

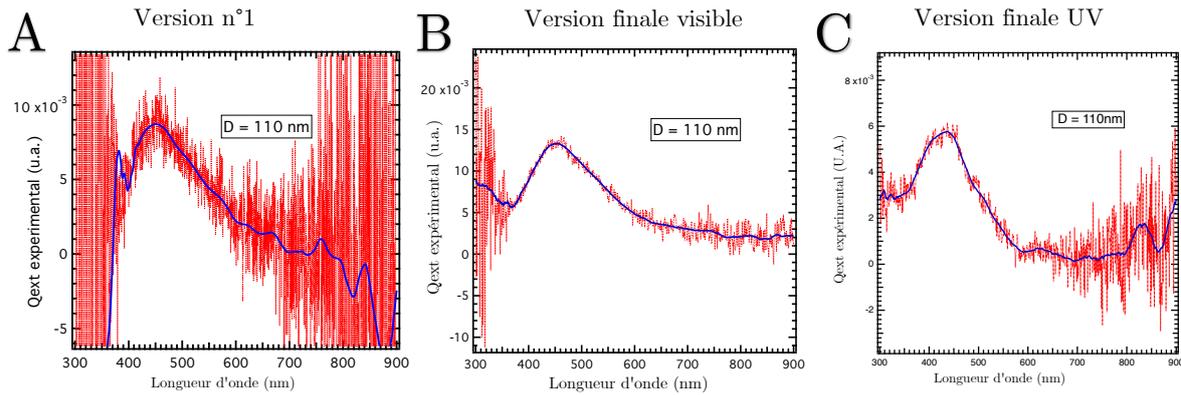


FIGURE 3.13 – Figure représentant un spectre d’extinction d’un disque d’aluminium de 110 nanomètres de diamètre. En A, le spectre obtenu avec le montage initial. En B, le spectre obtenu avec le montage final en mode visible. En C, le spectre obtenu avec le montage final en mode UV.

S’en suit l’étape la plus délicate, la mesure de la réponse plasmonique par spectroscopie d’extinction de nos nanoparticules avec notre nouveau montage optique (figure 3.15 C). Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier l’alignement du montage avec un laser, comme avant chaque grande série de mesures. Dans un second temps, le focus est adapté pour obtenir une image nette de l’échantillon et la zone de collecte est délimitée à l’écran, sur la caméra. Notons ici que la confocalité doit être parfaite pour obtenir le meilleur signal, il est donc indispensable de vérifier que le plan image de la fibre et le plan objet de l’échantillon se superposent. Si ce n’est pas le cas, la position de la fibre doit être ajustée à l’aide du système piézoélectrique. Le meilleur alignement est obtenu lorsque l’image de la fibre sur la caméra montre un cercle homogène, représentant le cœur de la fibre. De plus, comme il est délicat de voir nettement les nanoparticules de petite taille en champ clair, les réglages colorimétriques de la caméra nécessitent une modification. Le meilleur contraste est obtenu avec les réglages suivants : saturation 0,5 ; Hue -0,5 ; Balance des blancs 3,3 et 1,8.

Enfin, lorsque les réglages sont optimums, la procédure se déroule ainsi :

- Attendre la stabilisation du montage (environ 15 minutes)
- Enregistrer un signal de fond sur le spectromètre (sans lumière)
- Placer manuellement la zone de collecte dans une case, proche d’une nanoparticule
- Enregistrer un spectre de référence
- Se placer sur la particule à l’aide des déplacements piézoélectriques, et enregistrer un spectre
- refaire la procédure pour toutes les nanoparticules recensées à l’étape précédente

Selon les spectromètres, le spectre de référence est parfois soustrait et l’affichage montre seulement la réponse de la particule. Sur notre spectromètre, nous avons utilisé la formule (3.2) pour obtenir cet affichage, avec I le spectre ; I_0 le spectre sur la zone sans particules (la référence) et $bcgd$, le bruit de l’appareil et de la salle (spectre sans lumière).

$$Q_{ext_{experimental}} = -\log\left(\frac{I}{I_0 - bcgd}\right) \quad (3.2)$$

Les nanoparticules d’aluminium renvoyant un signal très faible en extinction, les paramètres d’acquisition du spectromètre sont obligatoirement adaptés. Pour ces mesures, nous utilisons un temps d’acquisition d’une seconde, avec en plus, une superposition automatique de 20 spectres (le logiciel

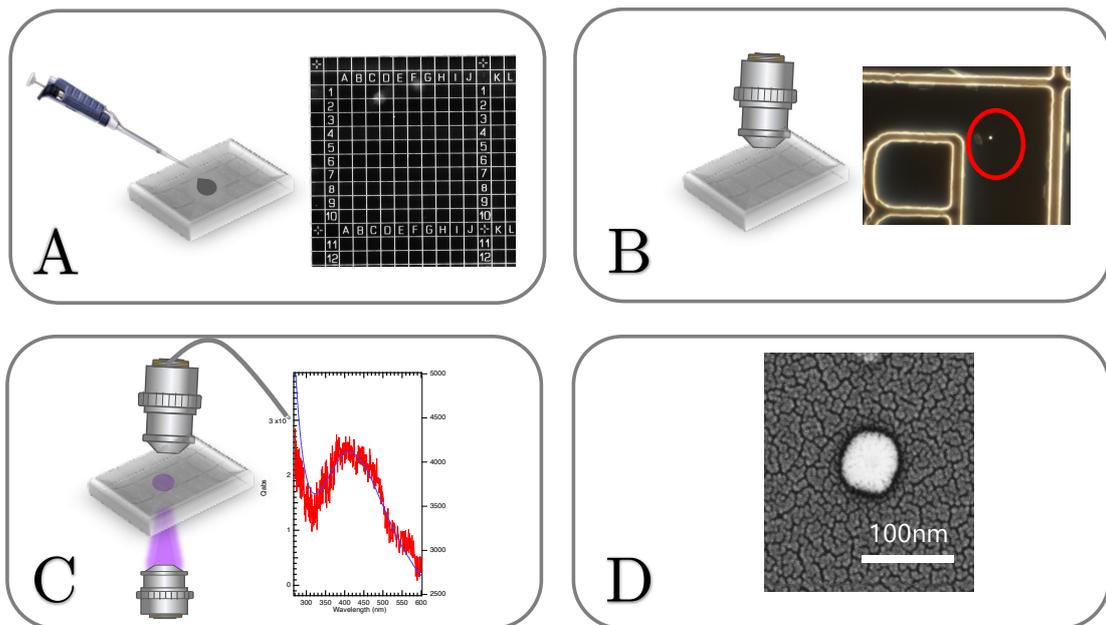


FIGURE 3.14 – Illustration de la méthode de caractérisation optique des nanoparticules d'aluminium. En A, le dépôt sur la grille. En B, l'observation en champ sombre. En c, la mesure optique et enfin en D, l'imagerie MEB après métallisation.

en fait une moyenne). Aussi, plusieurs spectres sont réalisés par particule, pour tester la reproductibilité et sélectionner le spectre avec le moins de bruit. Pour limiter le bruit, une nouvelle mesure de référence doit être enregistrée avant chaque mesure.

Pour finir, l'échantillon est métallisé sur 4 nanomètres d'épaisseur, avec un plasma or/palladium et est observé au microscope électronique à balayage (figure 3.14 D). L'objectif de cette étape est double : vérifier que l'objet est bien une nanoparticule et mesurer son diamètre. Le repérage avec la grille rend l'observation plus aisée.

En résumé, pour chacune des nanoparticules présentes sur la grille, nous avons une image en microscopie de champ sombre, un spectre optique en extinction et une image au microscope électronique à balayage. La figure 3.15 présente la compilation de ces trois techniques pour 4 tailles de particules différentes : la première colonne correspond à l'image en champ sombre, la seconde au spectre d'extinction, expérimental en rouge et théorique en bleu. La dernière colonne correspond à l'image en microscopie électronique. Cette figure met en lumière à la fois le changement de couleur de la particule en champ sombre et le déplacement vers le rouge du pic LSPR avec l'augmentation du diamètre de la particule. Ainsi, une nanoparticule d'aluminium ayant un diamètre de 90 nanomètres a une coloration grisâtre et un pic LSPR aux alentours de 300 nanomètres tandis qu'une nanoparticule d'aluminium avec un diamètre de 140 nanomètres apparaît turquoise en champ sombre et possède un pic LSPR centré approximativement sur 420 nanomètres. Les spectres théoriques qui apparaissent en bleu sur les spectres optiques sont les données de Qext extraites du logiciel de Garcia de Abajo (ICFO, Spain)[94][95], que nous avons déjà présenté dans le chapitre précédent. Dans le modèle théorique venant de la théorie de Mie, nous avons admis que nos nanoparticules étaient entourées d'une fine coque d'alumine native, de trois nanomètres, mise en évidence par les images MET (caractéristique structurale, chapitre 2).

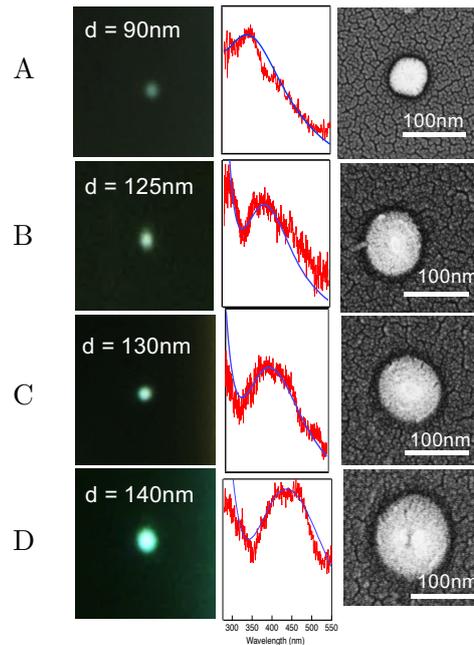


FIGURE 3.15 – *Caractérisations optiques de 4 diamètres de nanoparticules d'aluminium colloïdales. En A, l'image en champ sombre. En B, le spectre expérimental brut en rouge et le spectre simulé en bleu. En C, l'image MEB après métallisation.*

IV Conclusion et perspective

Dans ce chapitre, nous avons développé, étape par étape, la construction d'un microscope confocal UV pour permettre l'observation de la réponse plasmonique de nanostructures en aluminium. Après plusieurs années de développement, nous sommes parvenus à mesurer le pic LSPR de nanoparticules colloïdales d'aluminium, en particule unique, synthétisée selon la méthode présentée dans le chapitre 2. Cet aboutissement était un point essentiel dans le projet initial de fabrication d'un nanocapteur UV à partir de nanoparticules d'aluminium. Cependant, la disponibilité de ce montage ouvre la voie à d'autres projets de recherche, utilisant aussi la plasmonique UV. Ainsi, il sera présenté dans cette partie les perspectives d'amélioration supplémentaires, notamment avec l'ajout de sources lasers. Et en complément, l'étude d'un autre type de lithographies électroniques d'aluminium, des dimères, sera présentée.

IV.1 Amélioration du montage

Le premier élément à améliorer sur le montage est le beam splitter. Actuellement, ce composé empêche la transmission en dessous de 280 nanomètres. Or, il est possible avec l'objectif Mitutuyo UV de descendre en dessous de cette valeur, jusqu'à 200 nanomètres (avec un pic de transmission de 60% à 260 nanomètres). Pour cela, il serait adéquat de commander un beam splitter personnalisé à une entreprise spécialisée. Il est également envisageable de combiner 2 prismes à angle droit en silice fondue, afin de fabriquer un cube à faible coût. Cet assemblage a été testé, mais apporte quelques difficultés qu'il faudrait dépasser. Afin d'obtenir une transmission et une réflexion suffisante pour avoir à la fois l'image à la caméra et sur la fibre, il est nécessaire d'utiliser une huile d'indice et d'ajouter sur l'une des faces internes, une fine couche métallique. Nous avons réalisé des essais avec de l'aluminium et de l'or, sans succès. Il serait intéressant de tester ce protocole avec d'autres métaux,

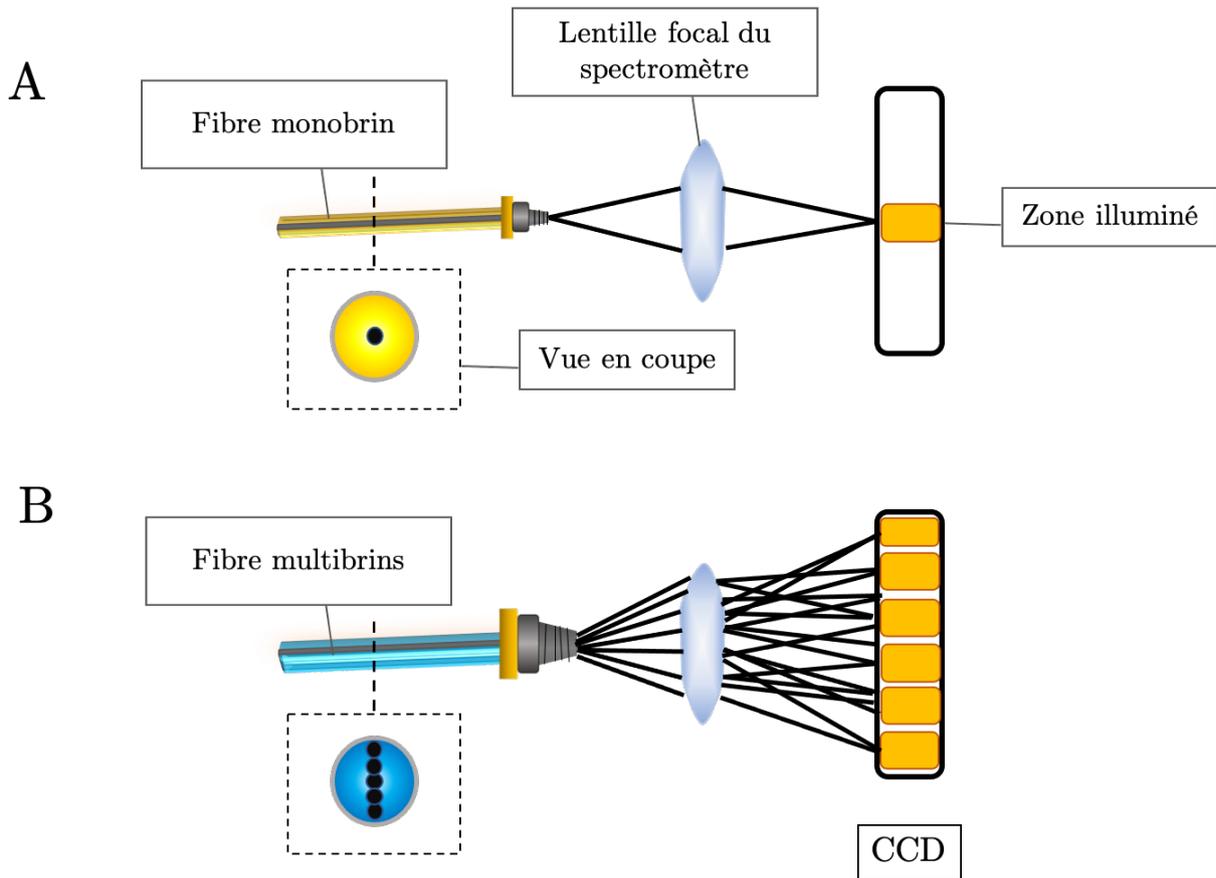


FIGURE 3.16 – Illustration des deux fibres : en A, la fibre initiale qui est monobrin et en B, la fibre avec des multibrins verticaux. Le schéma présente une vue en coupe de la fibre, le trajet optique et les zones d'éclairage du capteur CCD

peut-être des oxydes, pour trouver un bon ratio transmission/réflexion tout en gardant une gamme spectrale descendant en dessous de 250 nanomètres.

Ensuite, le second élément est la fibre qui arrive au spectromètre. Nous avons commandé une fibre avec un embout multibrins verticaux afin d'éclairer la totalité du capteur CCD contenu dans le spectromètre et ainsi augmenté la sensibilité de la détection : tout le capteur (communément appelé ROI) sera illuminé. La figure 3.16 présente les deux fibres : en A, la fibre classique et en B, la fibre multibrin.

Enfin, il est également possible d'envisager d'ajouter une autre source, notamment une source laser pour pouvoir réaliser sur le même montage, des spectres de fluorescence sur plot unique. Pour cela, un système de cube peut être utilisé en plaçant les bons éléments optiques (filtre d'émission, filtre d'excitation et miroir dichroïque) correspondant à la cible fluorescente choisie (figure 3.17).

IV.2 Dimères d'aluminium

Durant cette thèse, nous avons également mesuré un autre type de structure : des dimères en aluminium. Lithographie électronique sur un substrat en silice fondue, l'échantillon est composé de 8 patterns, correspondant à quatre diamètres de plot (60 nm 90 nm 120 nm 150 nm) et quatre distances interplot ou gap (10 nm 20 nm 30 nm 40 nm), comme schématisé dans la figure 3.18, A. L'idée est

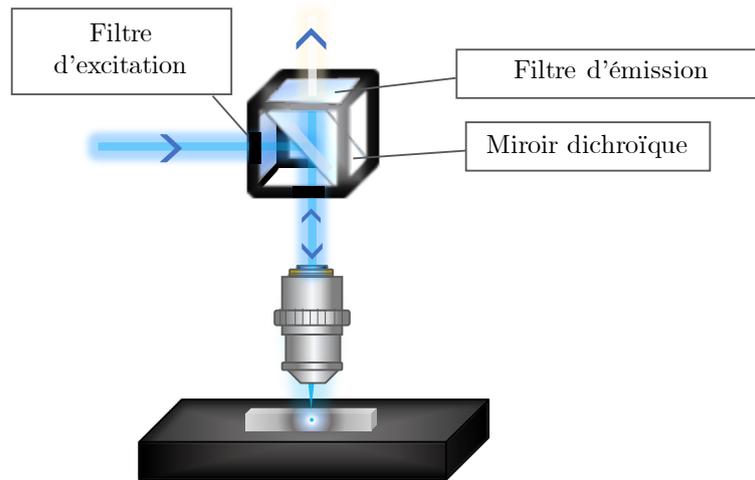


FIGURE 3.17 – Illustration d'un système de cube contenant un miroir dichroïque et des filtres permettant de faire de la microscopie d'émission avec une source laser.

d'utiliser les capacités du montage pour mesurer d'autres types de structures associées à d'autres projets.

En utilisant un polariseur, nous avons mesuré la réponse optique de ces dimères d'aluminium, dans l'air et avec différents indices optiques. L'objectif ayant une distance de travail assez grande (10 mm), une goutte d'un mélange eau/glycerol à différents ratios a été déposée sur l'échantillon pour simuler la variation de l'indice optique. La figure 3.18 B montre l'image champ sombre de l'échantillon et en C, une image MEB de ces dimères, obtenus après métallisation de l'échantillon par un plasma or/palladium pour obtenir une meilleure résolution. Le spectre de la figure 3.18, D représente la mesure expérimentale d'un dimère composé de deux plots de 150 nanomètres de diamètre espacés de 30 nanomètres, dans l'air. En revanche, il est encore à ce stade impossible de conclure sur ce que représentent ces pics. En effet, la présence d'une couche d'alumine native et la forme en disque entraînent l'apparition de plusieurs modes de résonances qui peuvent fusionner, se décaler ou encore s'éteindre, ce qui rend l'interprétation complexe. Nous réalisons encore des simulations et des mesures pour permettre de conclure cette étude.

Hormis l'intérêt de pouvoir observer optiquement d'autres types de structure en aluminium, les dimères sont également des structures qui permettent d'obtenir un fort confinement du champ dans le gap (l'espace entre les deux plots). Cette zone est particulièrement intéressante pour l'exaltation de sonde fluorescente. Il est donc possible d'imaginer par la suite, fixer un objet fluorescent par fonctionnalisation à cet endroit et ainsi obtenir une meilleure exaltation qu'avec un unique plot. Ce genre de structure existe déjà pour de l'or dans la littérature, comme dans la publication de Busson et al. [111].

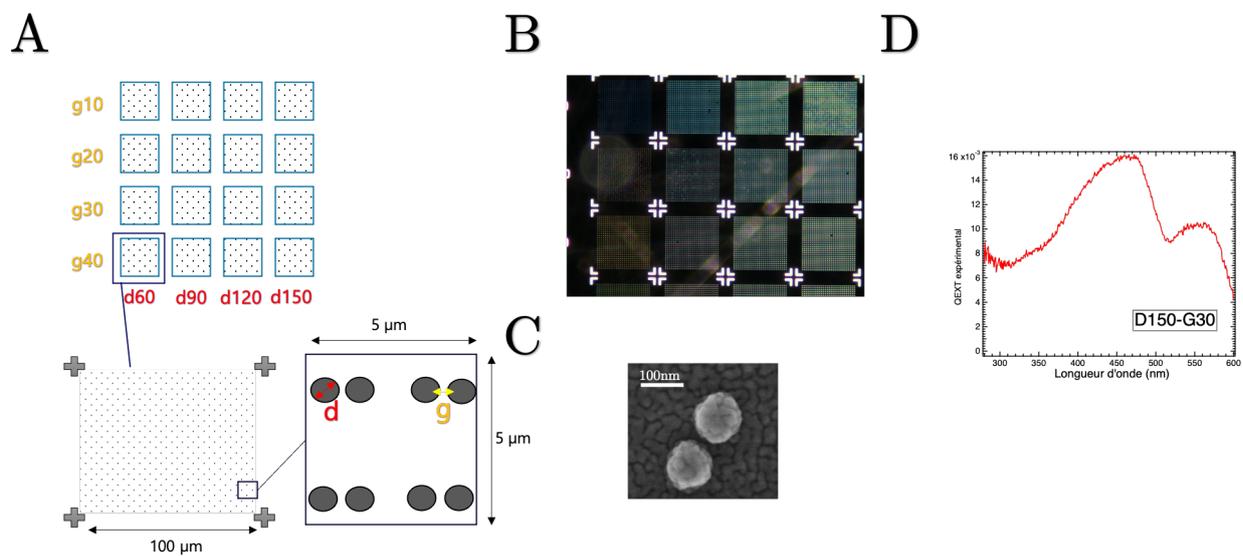


FIGURE 3.18 – Illustration du projet dimères d'aluminium. En A, le schéma du design : un pattern de 4×4 avec 4 tailles et 4 gaps. En B, l'image champ sombre de l'échantillon et en C, une image MEB d'un dimère après métallisation. En D, un aperçu d'un spectre mesuré pour un dimère de 150 nanomètres espacé d'un gap de 30 nanomètres.

Chapitre 4

Mesure de Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence dans le visible

Dans l'optique de mieux comprendre la physique impliquée dans les phénomènes d'exaltation de fluorescence par les métaux, nous avons entrepris d'expérimenter la technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence, dite FCS. Elle permet de détecter statistiquement, à l'échelle de la molécule unique, la fluctuation de la fluorescence dans un volume d'observation défini [11]. Les résultats de cette analyse statistique donnent accès à différents paramètres concernant l'objet fluorescent, tels que sa brillance (ou count rate par molécule (CMR)), son temps de diffusion ou encore des informations sur le peuplement de ses états triplets. En jouant sur l'augmentation de la puissance du laser à saturation (Spectroscopie de corrélation de fluorescence à saturation FCSS), il est même possible de quantifier les différentes transitions électroniques engendrant la fluorescence d'une molécule (Chapitre 1, la physique des fluorophores)

Cette méthode a tout d'abord été utilisée pour des applications en biologie, telle que l'observation d'ADN fluorescent ou de cellules contenant des fluorophores [64]. Puis, les nombreux avantages de cette technique (excellente résolution spatiale et temporelle, temps d'analyse courts, faible quantité de produit...) ont rapidement conduit la communauté scientifique à utiliser cette méthode en plasmonique, et notamment pour la quantification de l'exaltation de la fluorescence d'un fluorophore par un nano-objet métallique [67].

Dans le cadre de notre projet, nous avons choisi d'utiliser cette méthode pour comparer la fluorescence d'un brin d'ADN fluorescent seul et après sa fixation sur une nanoparticule métallique. Pour des raisons évidentes de limitation optique dans le domaine UV, comme présenté dans le chapitre 3, nous avons réalisé ici cette expérience dans le domaine du visible. Ainsi, un montage avec un laser 532 nm a été choisi pour exciter une sonde fluorescente visible : l'Atto Rhodamine 3B. Pour le métal, des nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre ont été utilisées pour leur propriété plasmonique dans le visible et leur petite taille.

Ce chapitre présentera dans un premier temps, le montage utilisé ainsi qu'un exemple de traitement d'une sonde fluorescente de référence, la Rhodamine 6G, en FCSS. Dans un deuxième temps, le protocole de fabrication des objets et la physique du fluorophore seul seront détaillés. Dans un troisième temps, nous exposerons tous les résultats obtenus durant l'expérience. Enfin, dans un dernier temps, nous donnerons des éléments d'explications des phénomènes observés tout en ouvrant

une voie vers d'autres expériences complémentaires, pour des projets comme le nôtre.

Sommaire

I	Présentation du montage et d'une sonde de référence	76
I.1	Le montage	76
I.2	Les paramètres de corrélation	79
I.3	Le système à 5 niveaux	81
II	Fabrication et physique du système	85
II.1	Fabrication des échantillons	85
II.2	Présentation de la sonde	87
II.3	Modèle Reverse Inter System Crossing	87
III	Étude des paramètres du système	89
III.1	Spectres d'absorption et de fluorescence	89
III.2	Brillance	92
III.3	Autres paramètres photophysiques	92
III.4	Temps de vie	94
IV	Conclusion et ouverture	95
IV.1	Interprétation des résultats	95
IV.2	Expériences complémentaires	97
IV.3	Ouverture sur l'UV	97

I Présentation du montage et d'une sonde de référence

I.1 Le montage

Dans le chapitre 1, nous avons développé l'historique, le modèle physique et la littérature utilisant la technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence. Dans le chapitre 3, nous avons présenté l'intérêt d'utiliser un montage confocal dans le cadre de l'observation de molécule unique. Dans ce chapitre, le montage utilisé reprend ces deux points, en combinant la mesure statistique de la fluctuation de fluorescence à la précision d'un montage confocal. Le montage est inversé pour faciliter l'observation d'échantillons en biologie, notamment en solution.

La source du montage est un laser vert 532 nm, avec un pulse de 8 ps et une fréquence de 20 MHz. Le laser est positionné sur un chemin optique prédéfini à l'aide de plusieurs miroirs. Il traverse ensuite une densité optique de 0,6 puis deux roues de densité, permettant d'ajuster la puissance laser arrivant sur l'échantillon. La première roue possède 4 densités allant de 1 à 4 et la seconde, 6 densités filtrant plus finement, allant de 0,2 à 0,6. Le tableau de la figure 4.1 reprend les puissances laser mesurées arrivant sur l'échantillon pour chacune des configurations des roues de densité. Seules les puissances utilisées ont été indiquées dans le tableau.

Le laser traverse ensuite un miroir dichroïque et arrive à l'objectif, un Olympus U-plan x60 avec une ouverture numérique de 1,2. Cet objectif est à immersion et requière le dépôt d'eau distillée avant chaque expérience (environ 100 μ L de volume). La bague de réglage a été spécifiquement adaptée pour une épaisseur de lame de verre de 0,17 millimètre d'épaisseur. Le signal émis par l'échantillon est ensuite renvoyé dans le miroir dichroïque et dirigé sur une fibre optique de 50 μ m de cœur, élément de filtrage confocal, avant d'atteindre l'appareil de détection, ici une APD (Perkin Elme), choisie pour son faible bruit de fond.

La figure 4.2 reprend le schéma du montage, avec les principaux composants. Le volume d'observation dépend du bon alignement du montage, il est donc nécessaire de vérifier l'alignement avant

Nom de la configuration	Première densité 0,6	Roue de densité 1	Roue de densité 2	Puissance Laser (μW)
300	oui	3	aucune	1,03
206	oui	2	06	3,57
205	oui	2	05	4,88
204	oui	2	04	6,17
203	oui	2	03	8,76
202	oui	2	02	8,3
200	oui	2	aucune	16,5
106	oui	1	06	46,9
105	oui	1	05	64
104	oui	1	04	80
103	oui	1	03	111
102	oui	1	02	105
100	oui	1	aucune	208
006	oui	aucune	06	520
005	oui	aucune	05	720
004	oui	aucune	04	870

FIGURE 4.1 – Tableau indiquant les différentes configurations de puissance laser : la première colonne correspond à la notation de chacune des configurations, la seconde indique la présence ou non de la première densité de 0,6. La troisième et la quatrième indiquent les configurations des deux roues de densité et la dernière informe sur la puissance laser associée.

chaque expérience.

Pour la préparation des supports échantillons, nous utilisons un protocole précis propre au laboratoire, qui nous garantit une grande reproductibilité et un faible coût de fabrication. Des lames de verre d'épaisseur de 0,17 mm et de dimension 25x27 mm sont nettoyées dans un mélange d'éthanol et d'eau à 70% en alcool pendant 5 minutes aux ultrasons. Elles sont ensuite rincées et séchées pour être exposées pendant 5 minutes à l'ozone/UV afin d'éliminer tous les déchets organiques. Ensuite, des contenants de la marque Eppendorf sont découpés sur la partie haute et fixés au verre avec une colle à joint. Après une demi-heure minimum de séchage, les cuves sont prêtes à accueillir un échantillon. Lorsque l'échantillon à observer contient de l'ADN, une étape supplémentaire est ajoutée pour éviter l'adsorption de celui-ci sur le verre. Une solution de BSA (pour Bovine Serum Albumine) à 10% dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) est déposée dans le contenant pendant une heure, avant d'être rincée plusieurs fois par du PBS propre. Ainsi, la BSA va s'adsorber sur le verre et empêcher les molécules d'ADN de s'y déposer. Le volume d'observation n'étant pas à la surface, mais légèrement au-dessus, ces molécules ne gênent aucunement l'observation. De plus, elles sont non fluorescentes dans le visible. Le volume d'échantillon à verser dans ces cuves est de 300 μL . Elles sont scellées avec un couvercle et du parafilm pour éviter l'évaporation du solvant et garder un volume constant durant l'expérience. La figure 4.3 montre un schéma de l'échantillon.

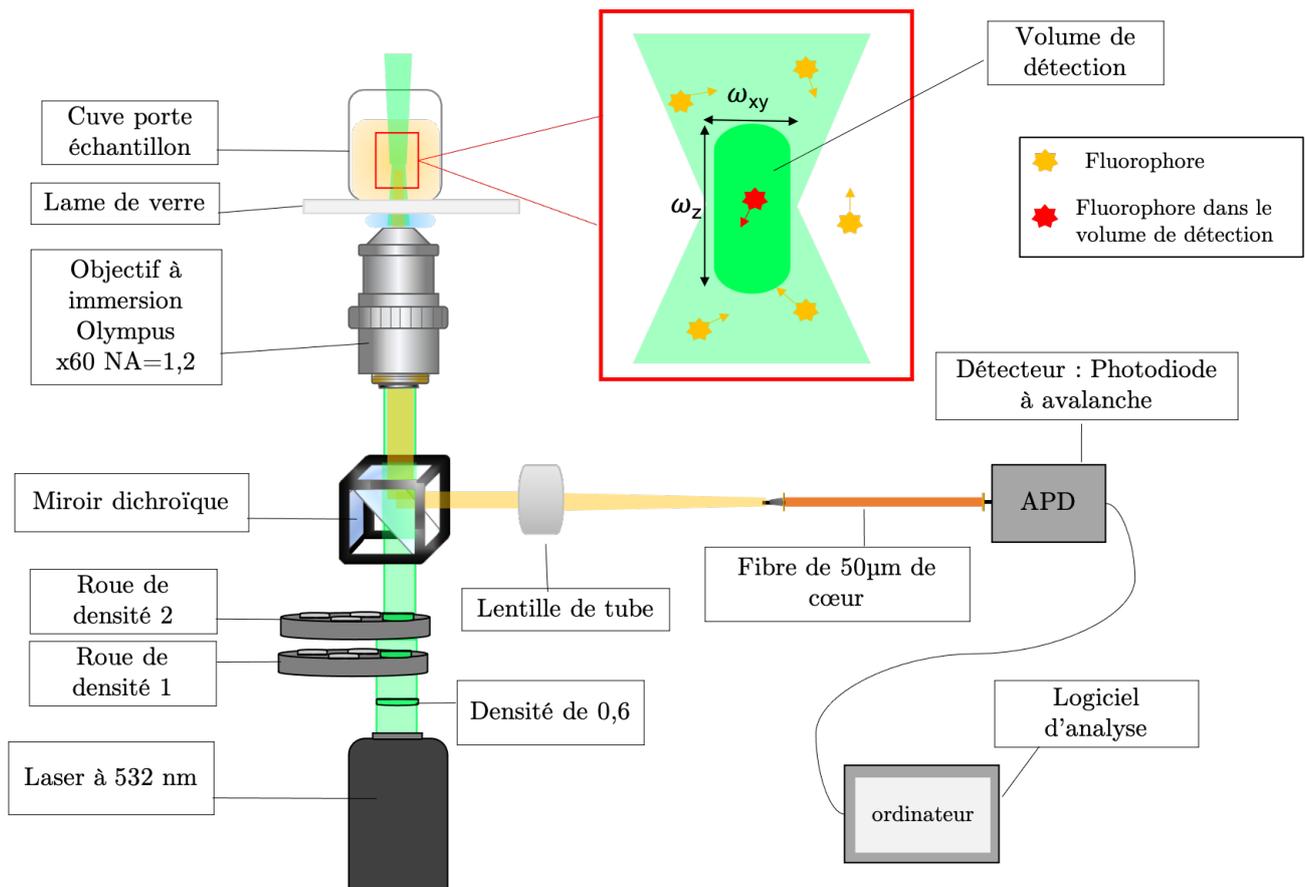


FIGURE 4.2 – Schéma du montage optique utilisé pour la FCS : le laser traverse des roues de densité et un miroir dichroïque et arrive sur l'échantillon. Le signal de fluorescence repasse ensuite par le miroir dichroïque, est focalisé sur une fibre optique qui joue le rôle de filtre confocal pour arriver sur le détecteur, une APD. Le signal est analysé sur ordinateur avec une carte d'acquisition et un logiciel de traitement de données.

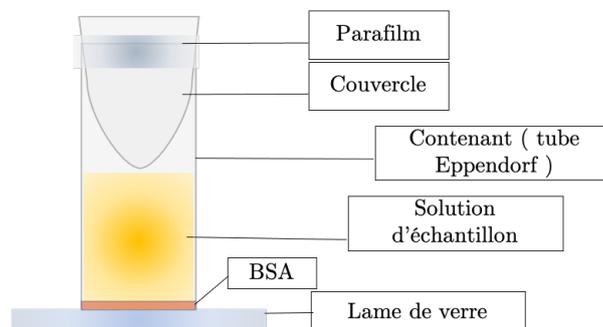


FIGURE 4.3 – Schéma du support échantillon : le tube Eppendorph est découpé et scellé sur une lame de verre pour recueillir la solution contenant le fluorophore. De la BSA est fixée sur le verre lorsque l'échantillon contient de l'ADN afin d'empêcher son adsorption sur le verre. Le contenant est fermé hermétiquement avec un bouchon et du parafilm.

I.2 Les paramètres de corrélation

Afin d'illustrer les différentes informations qu'il est possible d'obtenir avec cette méthode, nous avons étudié un cas classique, bien connu de la littérature, le fluorophore rhodamine 6G. En plus d'avoir une qualité de fluorescence importante, se rapprochant des 100% de rendement quantique, cette sonde possède une grande stabilité et un modèle physique simple. La figure 4.4, B présente la forme chimique de cette molécule.

L'étude a été réalisée dans l'éthanol, milieu de prédilection pour ce fluorophore. Lorsque l'échantillon est placé sur le montage, une densité intermédiaire est sélectionnée et un premier enregistrement est réalisé sur une première carte d'acquisition de contrôle, affichant un premier aperçu du signal de fluctuation de fluorescence (dit le nombre de count, figure 4.4 A). Cette étape permet de vérifier l'alignement du montage et donne un aperçu de la courbe de corrélation, ce qui permet d'estimer la concentration de l'échantillon. Cette étape est particulièrement importante puisqu'une courbe de corrélation trop importante (un nombre de count trop faible ou trop fort) limite le bon déroulement de l'expérience. Il est préférable en FCS de travailler avec des solutions très diluées, contenant environ 1 molécule dans le volume, pour éviter l'effet de groupe ou l'émission de photons simultanés.

Une fois que toutes les conditions sont remplies, l'expérience démarre en changeant de carte d'acquisition, ici une carte PicoHarp qui permet, en plus d'enregistrer le signal, la visualisation de la courbe du temps de vie de l'échantillon. Trois à six enregistrements sont réalisés pour chaque puissance laser, en ajustant le temps d'acquisition en fonction du nombre de photons détectés. Ainsi, pour un nombre de photons autour de 5000, il faut en moyenne 1 minute d'acquisition alors que pour un nombre de photons autour de 1000, il est nécessaire d'augmenter ce temps à 5 minutes (300 secondes). L'expérience se termine lorsque toutes les puissances laser ont été traitées, ce qui représente sur ce montage environ 15 valeurs et 75 enregistrements.

Ensuite, le traitement des données commence. Tout d'abord, un logiciel de conversion symphotime transforme le signal moyen de fluorescence en courbe de corrélation, comme visible sur la figure 4.4 A. Il est possible sur ce logiciel de choisir plusieurs paramètres : la fenêtre temporelle de calcul (binning), le nombre de points par décade ou encore la plage temporelle d'affichage. La résolution temporelle est limitée par la largeur du pulse laser. Il en résulte une courbe de corrélation, calculée pour chacun des enregistrements, soit 3 à 6 courbes par puissance laser. Ce logiciel permet également d'obtenir une information sur le nombre moyen de photons dans la solution, soit la fluorescence du système. Pour chaque puissance laser, les courbes de corrélation obtenues sont moyennées, et l'on obtient un ensemble de courbe (figure 4.4 C).

C'est à cette étape qu'intervient la modélisation des courbes de corrélations pour obtenir les paramètres photophysiques de l'échantillon (chapitre 1, FCS). La figure 4.5 A présente une courbe de corrélation avec son écart type et sa modélisation en bleue, obtenue avec la formule 4.1. Pour chacune des puissances laser, la modélisation permet d'obtenir 5 paramètres sur l'échantillon, en plus de la composante y_0 qui définit la ligne de base.

- **N** : Le nombre de molécules dans le volume d'observation
- **p** : La fraction de molécules dans l'état triplet
- τ_p : Temps caractéristique associé à la durée de vie de l'état triplet, à l'ISC, au taux de relaxation radiatif de S1 et au taux d'excitation de la puissance laser
- τ_d : Le temps de diffusion
- **S** : Ratio en taille du volume d'observation selon les axes vertical et horizontal

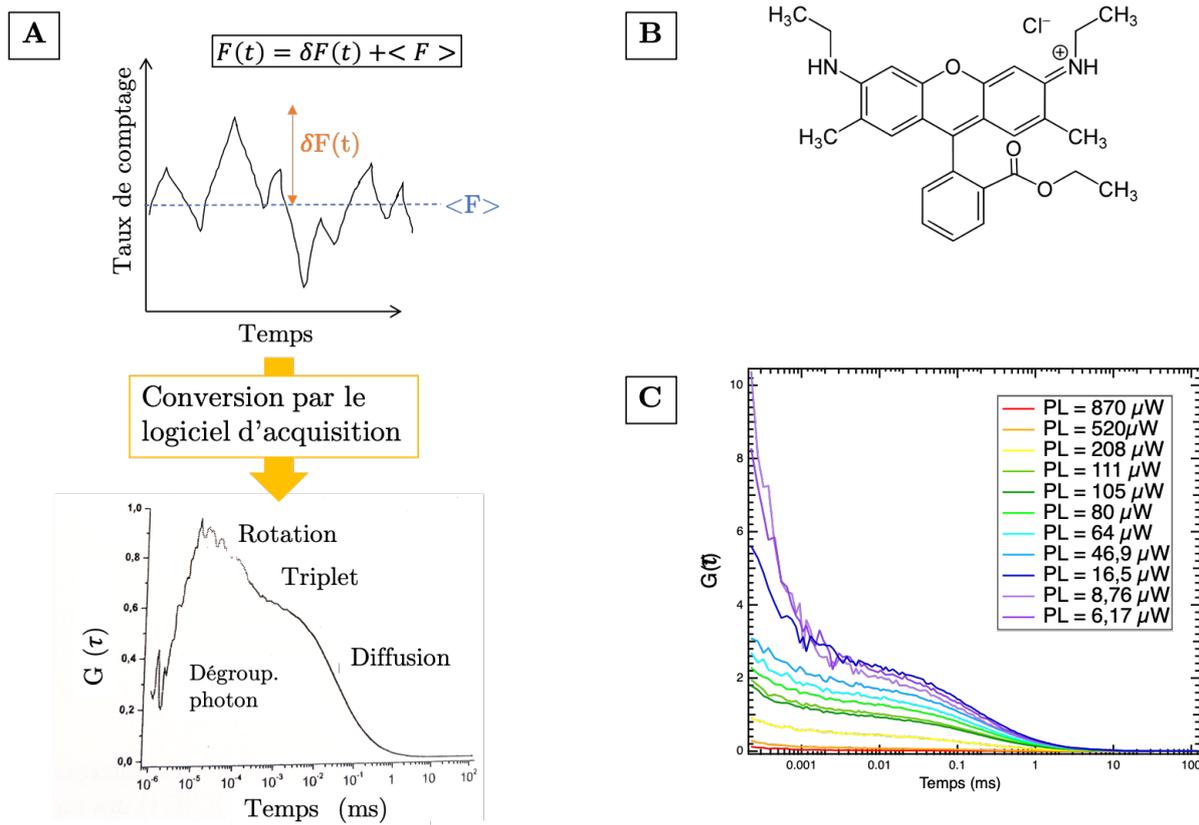


FIGURE 4.4 – En A, principe de la FCS : le signal moyen de fluorescence est mesuré au cours du temps puis converti par le logiciel d'acquisition en courbe de corrélation $G(\tau)$, tracé ici sur une large fenêtre temporelle pour représenter tous les phénomènes observables (diffusion, état triplet, rotation puis dégroupement de photons). En B, la formule chimique de la rhodamine 6G. En C, les différentes courbes de corrélation obtenues lors d'une expérience sur le montage, en fonction de la puissance laser.

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \times (1 - B/F)^2 \times \frac{1 + \frac{p}{1 - \text{pexp} \frac{-\tau}{tp}}}{(1 + \frac{\tau}{d}) \sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \text{taud}}}} \quad (4.1)$$

La figure 4.5 (B, C, E, F, G) présente ces différents éléments, tracés en fonction de la puissance laser. F (Figure 4.5, C) est obtenu en moyennant le taux de photons mesuré, à l'étape du logiciel symphotime. Le bruit est mesuré en enregistrant le signal de fluorescence du solvant. Les profils des courbes sont commentés dans la partie suivante, qui explique le modèle théorique.

Enfin, la dernière étape consiste à tracer la brillance du système, qui représente le ratio entre l'intensité de fluorescence mesurée et le nombre de molécules dans le volume, soit $\frac{F}{N}$. La courbe obtenue est présentée dans la figure 4.5, D. Le nombre de molécules est préalablement corrigé par le bruit.

Pour plus de lisibilité et de sens physique, il est possible de réexprimer la puissance laser (PL) en flux de photon, en remontant au volume de détection. Cette information est obtenue en modélisant le début de la courbe correspondant au taux de diffusion des molécules dans le volume (τd), par une fonction de saturation (figure4.5, E). L'équation 4.2 représente l'équation de modélisation de τd , qui donne accès à PS, la puissance laser de saturation, α , la pente et surtout τd_0 , le temps de diffusion lorsque la puissance laser tend vers 0. S'en suivent deux enchainements d'équations. L'équation 4.3 nous permet d'obtenir ω_L , grandeur spatiale de la zone de détection du montage optique, avec τd_0 et D, le coefficient de diffusion théorique, obtenu dans les tables. Puis, l'équation 4.4 permet d'obtenir la conversion de la puissance laser en flux de photon, ϕ_e . I_e correspond à l'intensité émise du laser et $h\nu$, l'énergie des photons.

$$\tau d = \tau d_0 + \frac{\alpha P_L}{1 + \frac{P_L}{P_S}} \quad (4.2)$$

$$\omega_L \approx (4D\tau d_0)^2 \quad (4.3)$$

$$\phi_e = \frac{I_e}{h\nu} = \frac{P_L}{h\nu \frac{1}{2} \pi \omega_L^2} \quad (4.4)$$

À cette étape, le traitement des données a permis d'obtenir un panel d'informations sur le fluorophore et chacun des paramètres peut être exprimé en fonction du flux de photon. Désormais, il est possible d'interpréter ces paramètres par un modèle d'interprétation physique, qui est présenté dans la partie suivante.

I.3 Le système à 5 niveaux

L'intérêt de la méthode de spectroscopie de corrélation, FSC, est la possibilité de remonter jusqu'à la quantification des échanges électroniques qui ont lieu au sein d'un fluorophore. Dans le cadre de notre montage, l'ajout de la variation de puissance laser en allant jusqu'à saturation permet de

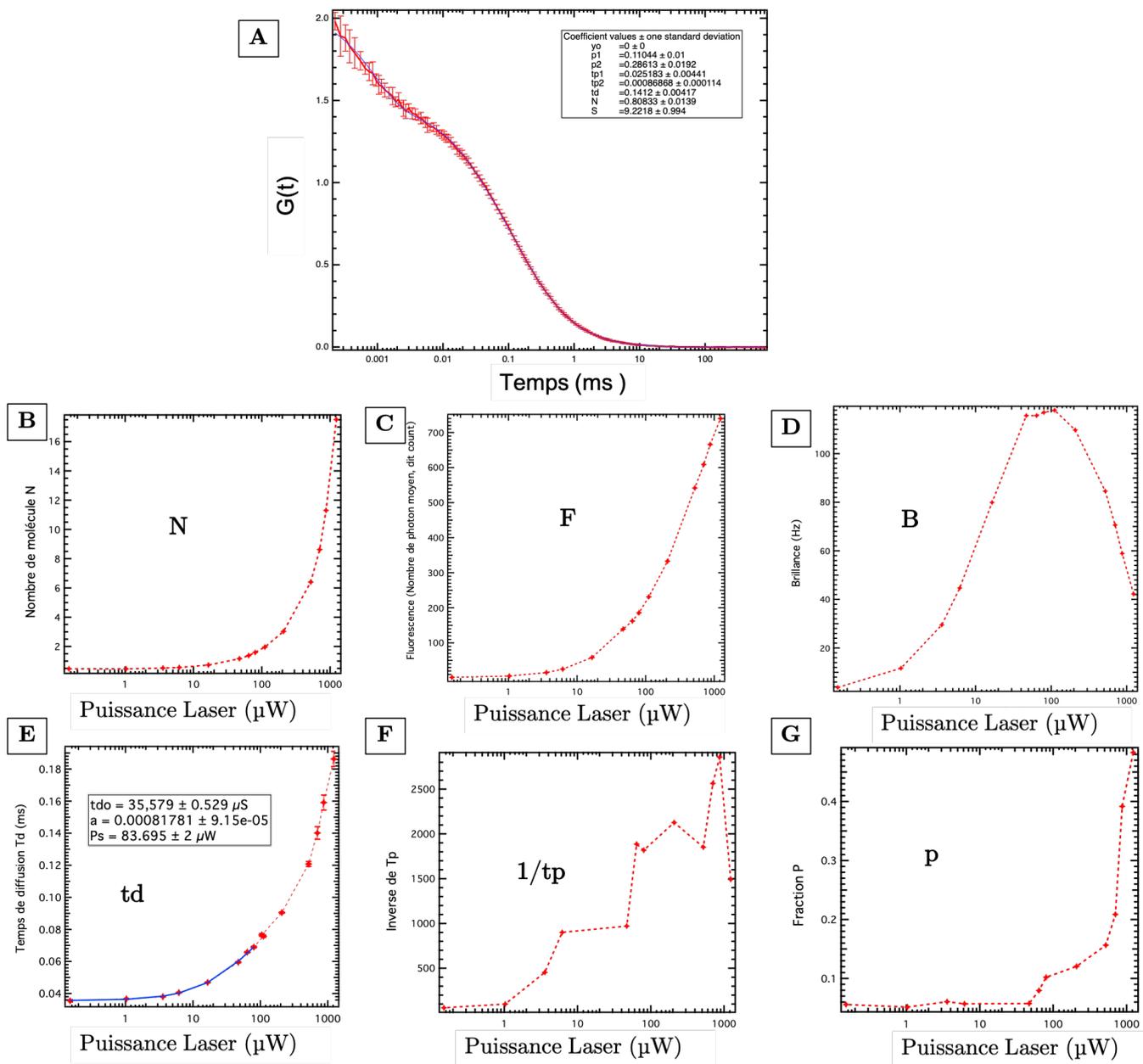


FIGURE 4.5 – En A, un exemple de courbe de corrélation moyenne avec son écart type et sa modélisation en bleu. Les valeurs des paramètres de modélisation sont affichées dans le cadre et valables pour une puissance laser. De B à G, les paramètres de corrélations obtenus tracés en fonction de la puissance laser : en B, le nombre de molécule ; en C, la fluorescence ; en D, la brillance ; en E, le temps de diffusion τ_d , en F, l'inverse de τ_p et en G, p .

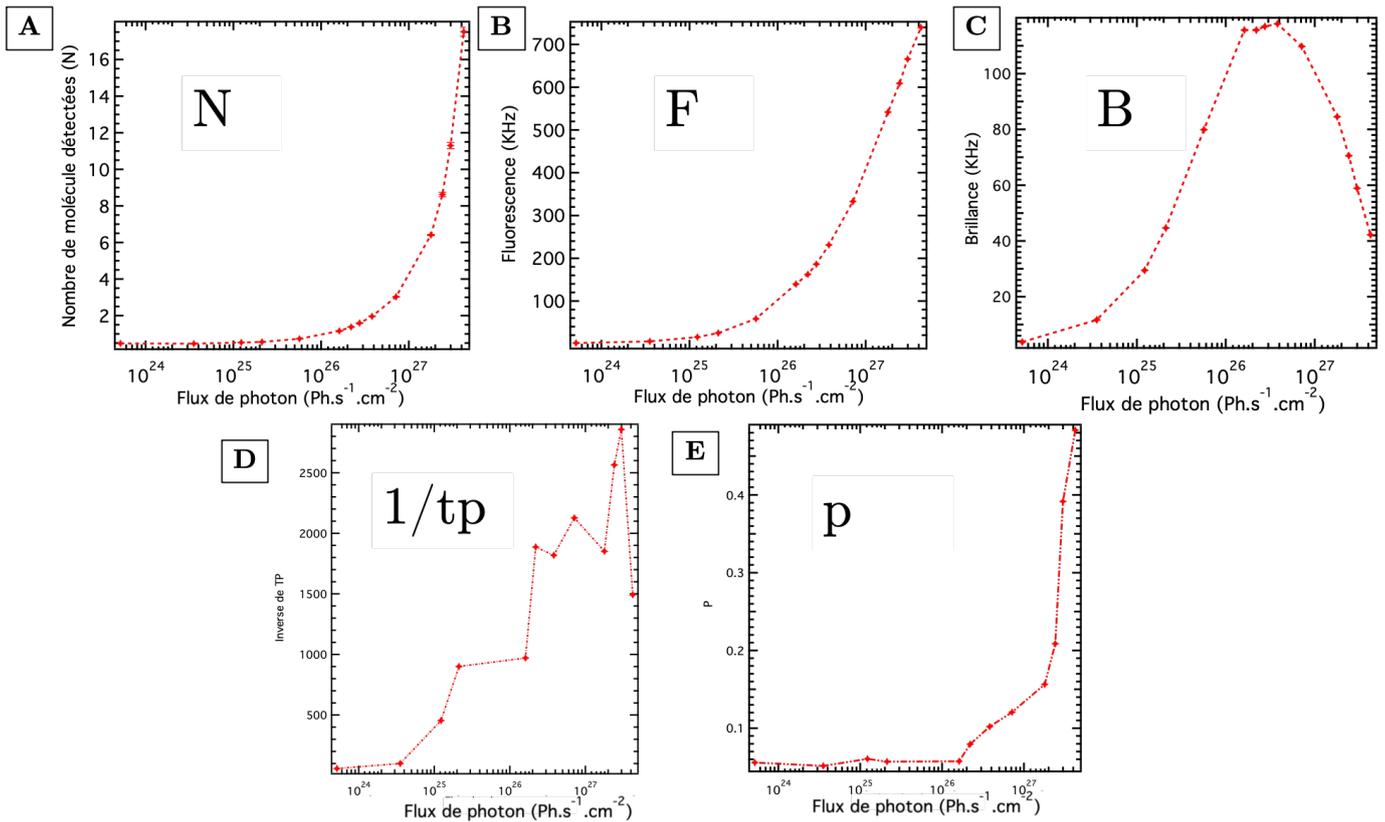


FIGURE 4.6 – En A, le nombre de molécules dans le volume d’observation. En B, la fluorescence mesurée. En C, la brillance du système. En D, l’inverse du temps de résidence des molécules dans l’état triplet et en E, le taux de peuplement de l’état triplet p .

dépasser le modèle physique à 3 niveaux classiquement utilisé [112], pour aller vers un modèle plus complexe, le modèle à 5 niveaux (figure 4.4) [113].

La figure 4.6 présente les données obtenues précédemment, exprimées en fonction du flux de photon. Dans un système sans photo-blanchiment, le nombre de molécules dans le volume (figure 4.6 A), la fluorescence du système (figure 4.6 B) et le temps de diffusion des molécules dans le volume (figure 4.5 E) vont augmenter exponentiellement avec l’augmentation du flux de photon. La fraction de molécule dans l’état triplet (figure 4.6 E) augmente également avec la saturation, puisque les temps de résidence de cet état sont plus longs. Par ailleurs, comme présenté dans le chapitre 1, dans la définition de la fluorescence, le photoblanchiment est dû à une saturation de l’état triplet qui entraîne une relaxation des électrons, sans émission de photon. Le temps associé à p , t_p est lui inversement impacté, on trace donc son inverse et l’on obtient une courbe croissante en fonction du flux de photon (figure 4.6 D).

Il reste à étudier la brillance du système, soit la fluorescence mesurée par rapport aux nombres de molécules dans le volume d’observation. Dans de nombreuses publications utilisant des puissances faibles, la modélisation de ce paramètre est une droite. Or dans le cas de la FCS de saturation, la courbe de brillance a une forme caractéristique en cloche : la courbe atteint un maximum puis décroît. Cette tendance est associée à des paliers de saturation, qui sont explicités par la suite. Et c’est ce phénomène qui est particulièrement intéressant, puisqu’il permet de remonter à des transitions électroniques supérieures au niveau S1. La figure 4.7 A présente l’illustration physique d’un modèle à 5 niveaux d’énergies, avec le libellé de chacune des transitions, semblables au diagramme de Jablonski présenté dans le chapitre 1.

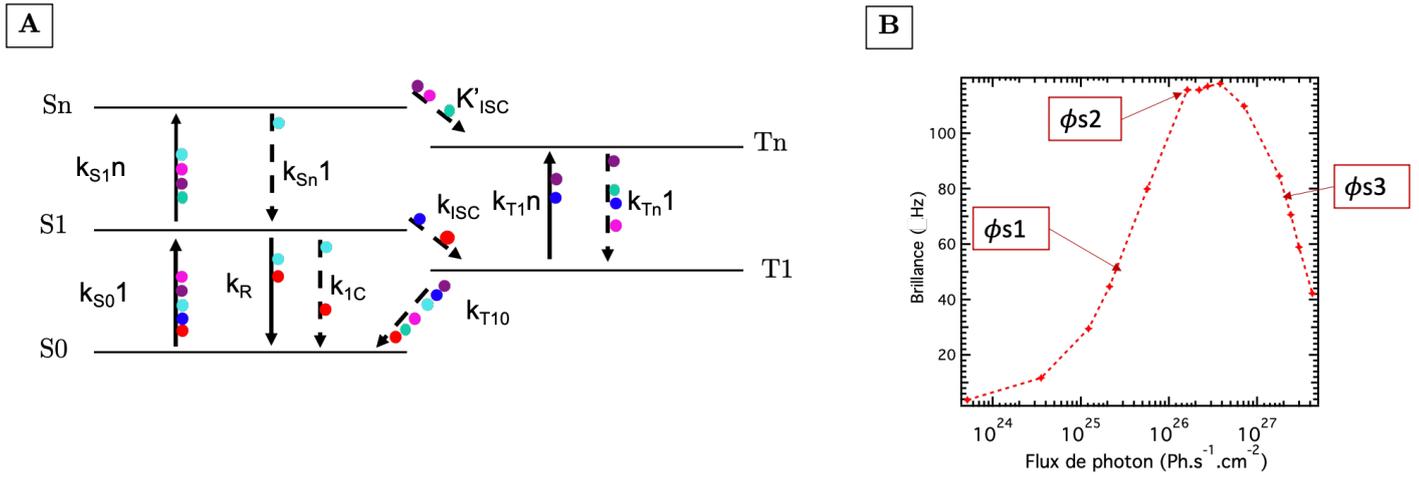


FIGURE 4.7 – En A, le modèle à 5 niveaux : les transitions radiatives sont en trait plein et non radiatives en pointillé. Les cercles colorés font référence aux équations 4.6, 4.7 et 4.8 du modèle démontrant les transitions multiphotoniques. En B, tracé d'une courbe de brillance légendée avec les trois termes de saturation ϕ_1 ϕ_2 ϕ_3

Lorsque l'on modélise la courbe de brillance en cloche (figure 4.6 C) par la formule 4.5, il est possible d'obtenir 3 paramètres, ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3 . Ces trois paramètres sont associés aux transitions électroniques du modèle à 5 niveaux, et représentent les trois zones de saturation de la courbe de brillance (figure 4.7 B). Les équations 4.6, 4.7 et 4.8 explicitent le détail de ces trois termes. Un code couleur est utilisé afin de mieux visualiser à quelles transitions sont associés chacun des termes (figure 4.7 A, cercles colorés au niveau des flèches des transitions).

$$\varepsilon(\phi_e) = \eta_d \sigma S_{01} \frac{kr}{k_0} \frac{\phi_e}{1 + \frac{\phi_e}{\phi_{s1}} \frac{\phi_e^2}{\phi_{s2}} \frac{\phi_e^3}{\phi_{s3}}} \quad (4.5)$$

$$\phi_1 = \left(\frac{k\sigma S_{01}}{k_0} + \frac{\sigma S_{1n} k'_{ISC}}{k_0(k_{S_{n1}} + k'_{ISC})} \right)^{-1} \quad (4.6)$$

$$\phi_2 = \left\{ \frac{\sigma S_{01} \sigma T_{1n} (k-1)}{k_0 k T_{n1}} + \frac{\sigma S_{1n} \sigma S_{01}}{k_0 (k_{S_{n1}} + k'_{ISC})} \left(1 + \frac{k'_{ISC}}{k T_{10}} + \frac{k'_{ISC}}{k T_{n1}} \right) \right\}^{-1} \quad (4.7)$$

$$\phi_3 = \left(\frac{k'_{ISC} \sigma S_{1n} \sigma S_{01} \sigma T_{1n}}{k_0 k T_{10} k T_{n1} (k_{S_{n1}} + k'_{ISC})} \right)^{-1} \quad (4.8)$$

Ce modèle permet donc de quantifier les transitions entre les niveaux. Dans la publication de P.Winkler et R. Jaffiol [113], qui reprend ce modèle en comparant deux fluorophores, la rhodamine 6G et l'Alexa 488, toutes les transitions sont quantifiées, soit temporellement, soit selon leur section efficace. Une valeur de k'_{ISC} , soit le croisement inter système des niveaux Sn et Tn, est également obtenue. La distinction entre les deux fluorophores n'est alors plus uniquement définie par leur temps de vie ou leur rendement quantique, mais également par chacune des transitions. Par exemple, il y a

quasiment un facteur 3 entre le k_{ISC} de la rhodamine 6G ($0,3\mu s^{-1}$) et celui de l'Alexa 488 ($1\mu s^{-1}$).

Dans le cadre de notre projet, cette méthode apporte un intérêt non négligeable puisqu'en comparant les transitions électroniques d'un fluorophore avec et sans métal, le rôle de la plasmonique dans ces transitions deviendra quantifiable. Nous avons donc choisi de faire cette étude sur un fluorophore attaché à un brin d'ADN, avec et sans nanoparticules d'or.

II Fabrication et physique du système

II.1 Fabrication des échantillons

Lors de la définition du protocole expérimental, nous avons tout d'abord sélectionné le fluorophore du projet en tenant compte des points suivants : une excitation possible avec un laser 532nm, une grande photostabilité, un rendement quantique moyen et une comptabilité avec le greffage sur ADN. C'est ainsi que l'ATTO rhodamine 3B a été sélectionnée, dont la forme est illustrée en figure 4.8, A. L'ADN a été commandé dans l'entreprise allemande IBA-Lifesciences. Nous avons choisi 3 séquences de trois longueurs différentes, respectivement composées de 6,15 et 30 nucléotides. Les séquences, présentées dans la figure 4.8 B, ont été construites afin de garantir un seuil de dénaturation élevé pour éviter toutes modifications d'hybridation durant l'expérience. La sonde a été greffée à l'extrémité du brin, en position 5', selon le protocole du fabricant. De plus, une fonction trithiol a été choisie pour l'attache sur l'or, en position 5' sur le brin complémentaire. Pour garantir une pureté suffisante, la technique de chromatographie double HPLC (High performance Liquid Chromatography), a été réalisée par le fabricant.

Lorsque les brins d'ADN sont réceptionnés, ils sont dans une forme déshydratée. Selon les indications du fabricant, un certain volume d'eau déionisée est à ajouter afin d'obtenir une concentration initiale de $100\mu M$. Il est également nécessaire d'ajouter un composant pour le brin thiolé, le TCEP hydrochloride, afin de casser les interactions entre les terminaisons thiolés, comme les ponts disulfures. Selon la séquence, le volume initial d'ADN peut être limité, il est donc nécessaire d'être vigilant sur les quantités utilisées. Une solution mère de $10\mu M$ est préparée pour la conservation et une dilution par 10 de la solution mère, soit une concentration de $1\mu M$, est utilisée pour les expériences. Le solvant est ici le PBS (Phosphate Buffered Saline), un tampon aqueux salin très utilisé en biologie et permettant une bonne conservation de l'ADN. L'ADN ayant tendance à s'adsorber sur les surfaces, la concentration peut évoluer avec le temps, d'autant plus lorsque la solution est peu concentrée. Il est alors utile de faire des contrôles réguliers de la concentration par spectroscopie UV-visible.

Pour l'hybridation des deux brins, le protocole consiste à préparer une solution contenant un volume du brin attaché à la sonde fluorescente pour 3 volumes du brin complémentaire. Ce ratio garantit un pourcentage maximal d'hybridation. La solution est maintenue en température à $90^{\circ}C$ pendant 5 minutes puis refroidie lentement. Cette étape peut être réalisée avec un bain-marie ou un appareil contrôlant des rampes de température.

En ce qui concerne les nanoparticules, nous avons souhaité travailler avec des particules ayant un diamètre de 10 nanomètres, pour limiter le temps de transition sous excitation et éviter un photo-blanchiment du fluorophore. Ces particules sont sphériques, proviennent de la société Sigma Aldrich et ont une concentration initiale de 10^{17} particules par millilitres ainsi qu'une densité optique de 1. La première étape permet de changer le ligand, en substituant le citrate par une molécule

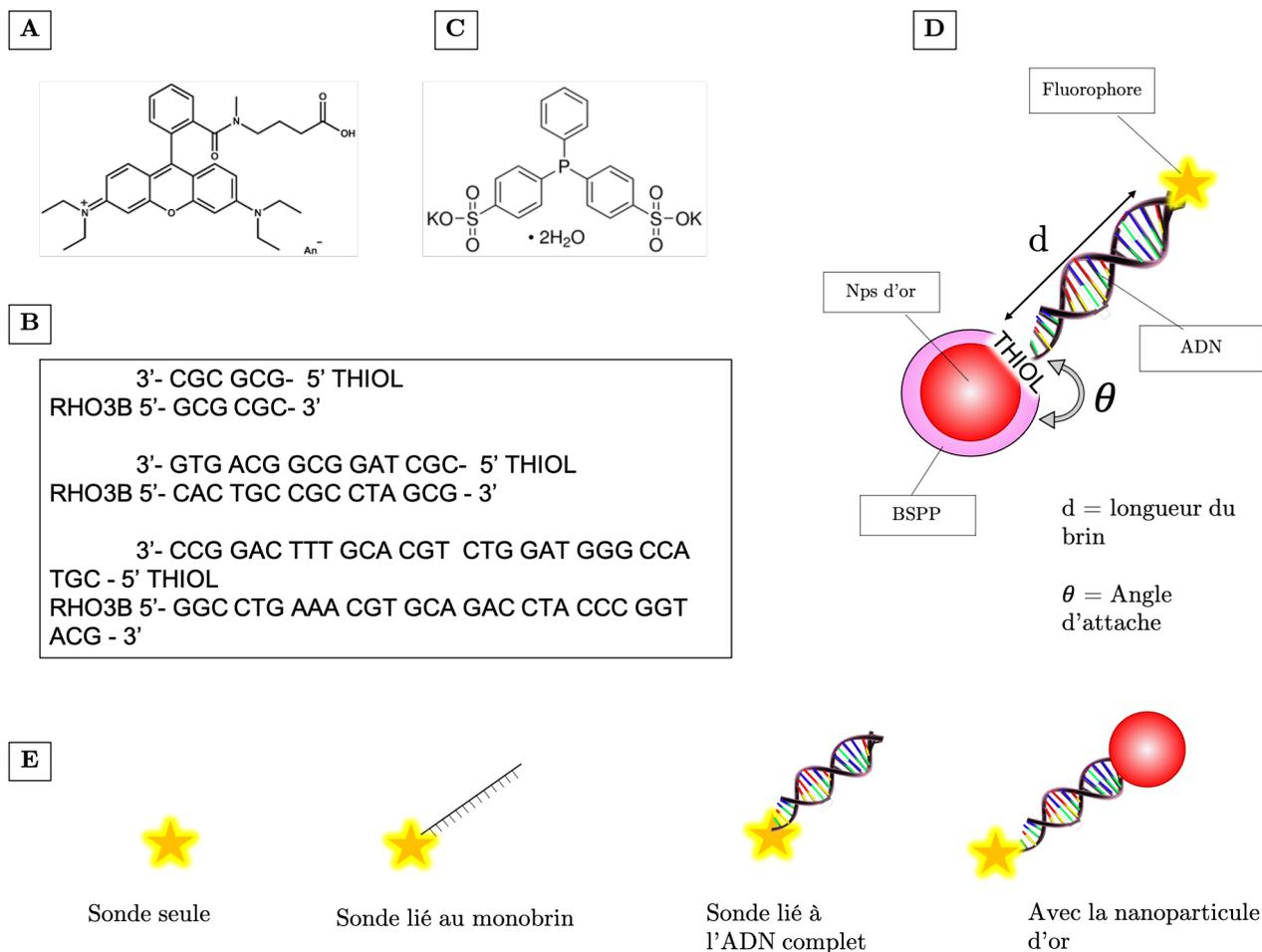


FIGURE 4.8 – En A, la formule chimique de la molécule de rhodamine 3B. En B, les séquences de nos trois tailles d'ADN. En C, la formule chimique du BSPP. Et en D, le système final de l'expérience, une nanoparticule d'or relié à un brin d'ADN ayant un fluorophore à son extrémité. En E, les différentes configurations pour l'étude de la sonde, étape par étape.

de BSPP (Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt), donc la molécule est illustrée dans la figure 4.8 C. Cette modification stabilise les nanoparticules, en permettant une distribution homogène de charges de surface négatives. La seconde étape consiste à mettre en contact l'ADN complet, préalablement hybridé, avec les nanoparticules d'or. Les calculs de concentration sont optimisés pour obtenir un ratio d'un brin d'ADN par nanoparticules. Enfin la dernière étape consiste à purifier la solution par centrifugation, pour retirer les brins non attachés à une nanoparticule.

Nous avons étudié la fluorescence du système à chaque étape : pour la sonde fluorescente seule, pour la sonde fluorescente liée à un monobrin d'ADN, pour l'ADN complet après hybridation et pour le système final, avec la nanoparticule d'or, comme illustré sur la figure 4.8 D et E. Chacune des expériences a été réalisée trois fois, pour mesurer la reproductibilité et obtenir une moyenne statistique. La concentration de la solution était comprise entre 0,6 et 1 nM. Du fait du phénomène d'inhibition de fluorescence pour le brin contenant 6 nucléotides (l'inhibition de la fluorescence de la sonde), les résultats ne seront pas présentés, le signal n'étant pas suffisant vis-à-vis du bruit pour réaliser l'expérience correctement. Nous présenterons alors les résultats pour deux longueurs seulement, le brin de 15 nucléotides et le brin de 30 nucléotides.

II.2 Présentation de la sonde

Pour commencer, nous avons étudié le fluorophore seul, l'Atto rhodamine 3B (Rho3B), diluée dans du PBS. Les résultats après traitement sont présentés dans la figure 4.9. Pour éliminer le bruit, surtout le retour de photons qui est important du fait du faible signal mesuré, la fenêtre temporelle pour le traitement des données a été ajustée (binning=290-1500), comme illustré sur la figure 4.9 A. Le nombre de molécules (figure 4.9 B) augmente exponentiellement en fonction de la puissance laser comme attendu, ainsi que la fluorescence du système (figure 4.9 C). Étant donné que le rendement quantique est moyen, le signal de fluorescence mesuré est beaucoup plus faible que pour la Rhodamine 6G (\approx un facteur 2 pour une puissance intermédiaire), ce qui a impliqué des temps d'acquisition beaucoup plus longs. La brillance présente également une forme en cloche, comme attendu (figure 4.9 D). Notre sonde fluorescente est environ 5 fois moins brillante que la rhodamine 6G. Les temps de diffusion sont compris entre 0.06 ms et 0.14 ms et sont semblables cette fois-ci à ceux obtenus avec la référence 4.9, E. En revanche, nous avons été surpris par le comportement de P et de l'inverse de t_p , qui décroissent au lieu de croître (figure 4.9 F et G) car cette tendance va à l'encontre de ce qui est attendu pour un modèle classique à 5 niveaux. L'explication a été trouvée en remontant à l'origine des études photophysiques, dans l'étude des lasers à colorant, comme développé dans la partie suivante.

II.3 Modèle Reverse Inter System Crossing

Pour comprendre d'où provient le comportement de P, taux de peuplement de l'état triplet, il fallait remonter à des expériences antérieures sur les lasers à colorant. Il est possible d'avoir une autre voie de désexcitation de l'état triplet à l'état singulet lorsque le système est dans une configuration de RISC : Reverse Inter System Crossing en anglais. Les niveaux supérieurs à S1 et T1, soit S_n et T_n se retrouvent proche d'un point de vue énergétique et le croisement intersystème peut avoir lieu dans les deux sens (figure 4.10).

Les publications de C.M.Marian et al. [114] et D. Setiawan et al. [115], démontrent que les fluorophores du type de la rhodamine (rhodamine A pour l'un, B pour l'autre), peuvent être concernés par le RISC lorsque leur environnement le permet. La configuration chimique de ces sondes, contenant des cycles aromatiques, facilite les liaisons avec des molécules d'eau en solution aqueuse, ce qui entraîne un rapprochement des niveaux T_n et S_n. Toutefois, ces faits ont été démontrés seulement avec de la simulation, en utilisant la méthode DFT (Density Functional Theory), qui simule les énergies des transitions électroniques d'un fluorophore en étudiant sa composition chimique.

La publication de C. Ringemann et al. [116] démontre elle, ce phénomène à travers la FCS, en utilisant une seconde source laser dans le rouge pour provoquer cette nouvelle voie de désexcitation (soit un laser 568 nm, soit un 671 nm). Les fluorophores utilisés sont illuminés avec un laser 488 nm ou 532 nm et sont au nombre de 7 : FITC (fluoresceine isothiocyanate), Rhodamine 110, Rhodamine 6G, ATTO 532, Eosin Y, Bromofluoresceine et EYFP. De plus, l'impact du milieu est aussi évalué, en étudiant les fluorophores dans l'eau et dans un alcool, le PVA. Les principaux résultats démontrent une exaltation de la fluorescence, due à une réduction du temps de résidence dans l'état triplet. En revanche, cette exaltation dépend fortement de la longueur d'onde du second laser et du milieu. Ainsi, avec le second laser à 671nm, la fluorescence de la FITC augmente considérablement, ce qui n'est pas le cas pour les autres sources. De même, l'étude démontre que selon la configuration de la sonde, l'ajout d'un second laser peut entraîner un photoblanchissement plus important, ce qui modifie le traitement des données. Ainsi, le modèle utilisé pour le traitement des données de la FCS contient un facteur correspondant au photoblanchiment.

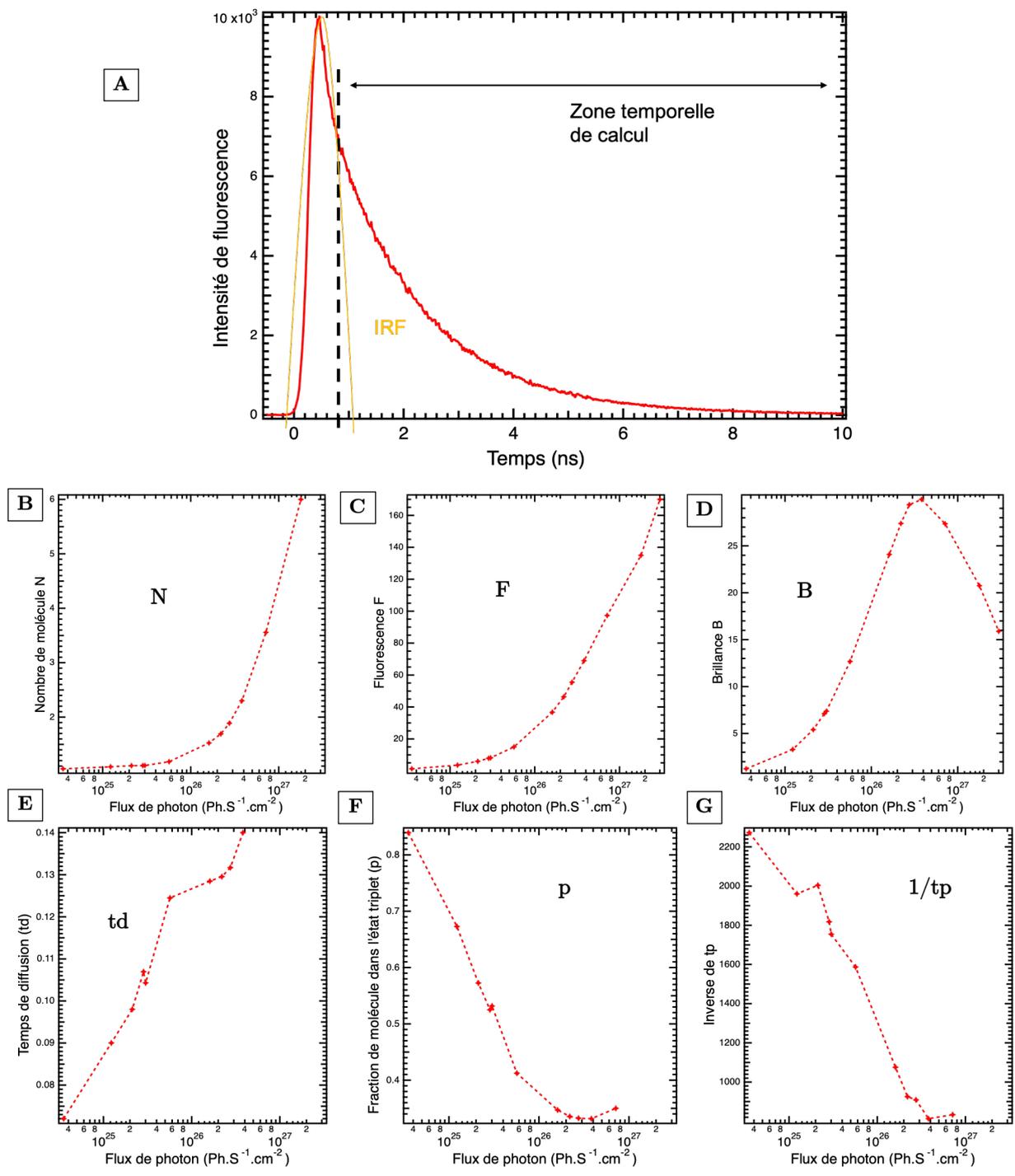


FIGURE 4.9 – En A, la courbe du temps de vie de la molécule rho3B seule : l'IRF est schématisé en orange. De B à G les caractéristiques photophysiques de la sonde rho3B extraites des courbes de corrélation tracées en fonction du flux de photons.

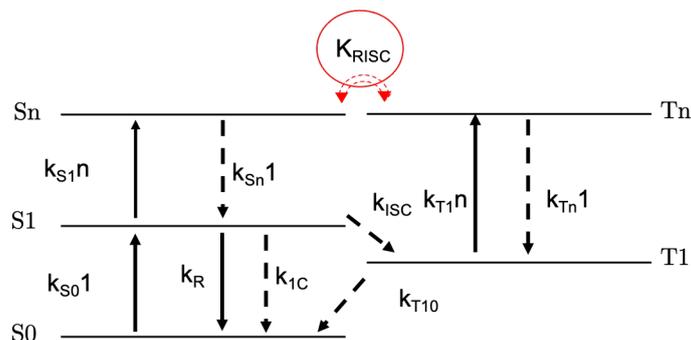


FIGURE 4.10 – Schéma du modèle à 5 niveaux, en croisement intersystème inverse, soit RISC. Les flèches pleines représentent les transitions radiatives et les flèches en pointillés, les transitions non radiatives.

Nous avons donc pris en considération ces différentes informations pour étudier les résultats de notre propre fluorophore à la différence que nous n'avons pas noté de photoblanchiment. Le modèle précédent sera donc à adapter pour retranscrire au mieux la photophysique de notre système.

III Étude des paramètres du système

Dans cette section, nous démontrerons les résultats obtenus pour deux longueurs d'ADN, le 15 bases et le 30 bases. Chacun des résultats permet d'obtenir des explications intermédiaires, et la conclusion finale se fera dans la dernière partie du chapitre.

III.1 Spectres d'absorption et de fluorescence

Afin de caractériser un fluorophore, on utilise la spectrométrie d'absorbance et de fluorescence pour visualiser les profils d'absorption et d'émission. Les deux techniques sont réalisées en cuvette avec une différence sur l'illumination et la collecte du signal.

Nous avons déjà décrit la technique de spectroscopie d'absorbance UV-visible dans le chapitre 3 : un faisceau lumineux est envoyé sur l'échantillon et l'on mesure la différence entre son intensité initiale et son intensité après le passage par la cuve pour remonter à l'absorbance de l'échantillon. Pour un fluorophore, cette technique permet de visualiser son profil d'absorption. Chacun des pics représente une transition vibronique, soit le changement d'état des électrons dans le système. Ces transitions sont quantifiables en mesurant la section efficace d'absorption du fluorophore pour une longueur d'onde donnée par le maximum du pic. La figure 4.11 reprend les spectres obtenus pour la sonde seule, le brin complet et le système avec l'or. Tout d'abord, lorsque la sonde est placée dans l'ADN (courbe orange), on observe un léger déplacement vers le rouge, indiquant la modification de l'environnement de la sonde, caractéristique des échanges électroniques entre l'ADN et la sonde. Ce déplacement est le même pour les deux longueurs de brin. Puis, en ajoutant l'or, il y a une modification très importante, entraînant une modification des bandes vibroniques. Ce phénomène se visualise très bien sur le 30 bases (figure 4.11 A) : la bande initiale 1 à ≈ 570 nm est toujours présente mais beaucoup moins intense, contrairement à la seconde bande à ≈ 530 nm. C'est ici encore une signature des transferts électroniques entre l'or et l'ADN contenant le fluorophore. Il faut tout de même noter que ces spectres sont particulièrement difficiles à obtenir puisque les nanoparticules d'or absorbent beaucoup. De plus, il y a un seul brin par fluorophore, ce qui implique une faible concentration d'ADN et donc un faible

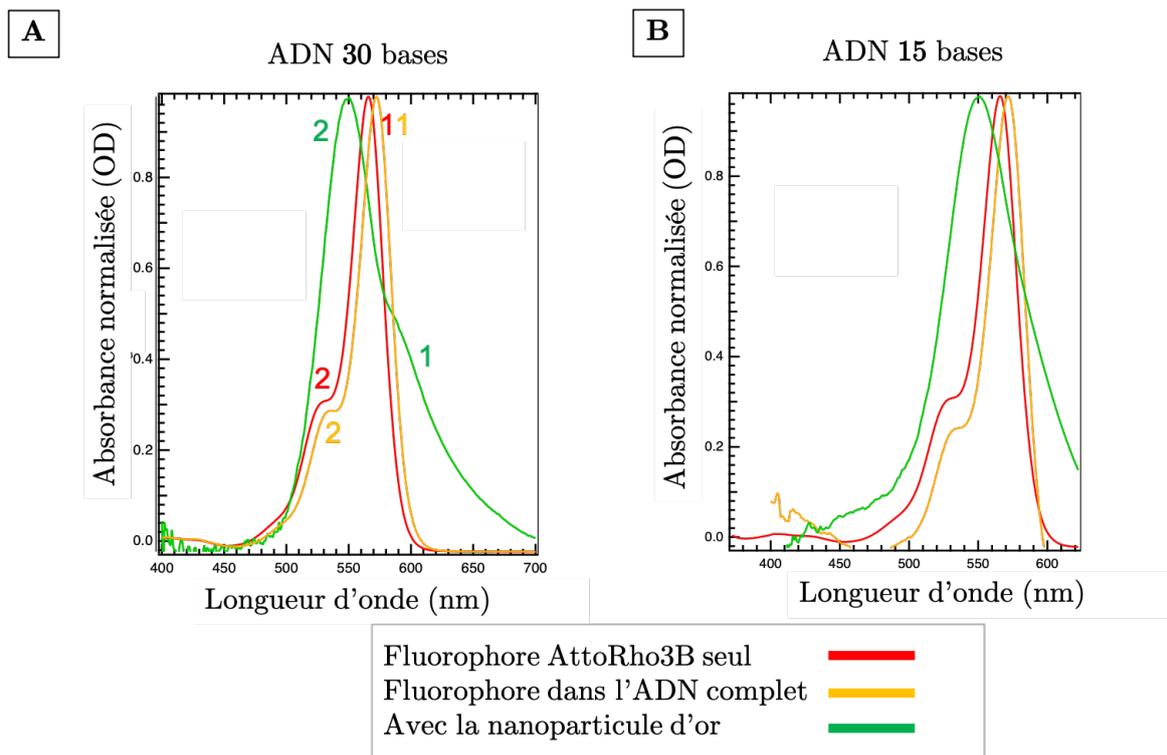


FIGURE 4.11 – Spectres d'absorbance normalisés tracés en fonction de la longueur d'onde pour deux longueurs d'ADN, le 30 bases et le 15 bases. Chacun des graphiques compare le fluorophore seul en rouge, le fluorophore dans l'ADN en orange et le système complet avec l'or en vert. Sur le graphique A, les numéros représentent la position des bandes vibroniques 1 et 2.

taux de fluorophore. Initialement, nous souhaitons remonter aux sections efficaces d'absorption de chacune des bandes vibroniques, mais pour cela, il était nécessaire d'avoir une idée très précise de la concentration, ce qui n'est pas possible avec notre technique de greffage or/ADN. Il aurait fallu faire des mesures sur particules uniques pour obtenir ces informations, comme dans la publication de Bidault et al. [117].

Concernant la technique de spectroscopie de fluorescence, la méthode est illustrée dans la figure 4.12. Ici, il ne s'agit plus de mesurer l'intensité de la lumière transmise mais plutôt la fluorescence, qui se propage dans toutes les directions. Ainsi, il est possible de retracer les profils du fluorophore pour différentes longueurs d'onde d'émission et sur une plage de longueurs d'onde variable. Les spectres obtenus pour notre expérience, en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 532 nm (comme notre laser), sont dans la figure 4.13, A pour les 30 bases et la figure 4.13, B pour les 15 bases. Le code couleur reste identique aux spectres précédents. En ajoutant l'ADN puis l'or, le profil d'émission du fluorophore se déplace légèrement vers le rouge. De plus, il y a de nouveau une modification des profils des bandes vibroniques, la seconde bande à 650 nm environ étant beaucoup plus intense avec l'ajout de l'or. Encore une fois, ces spectres attestent de la présence d'échanges électroniques au sein du système. Il confirme aussi la liaison or/ADN. Cependant, il est nécessaire de croiser ses informations avec d'autres expériences pour apporter une explication plus approfondie sur la dynamique du système.

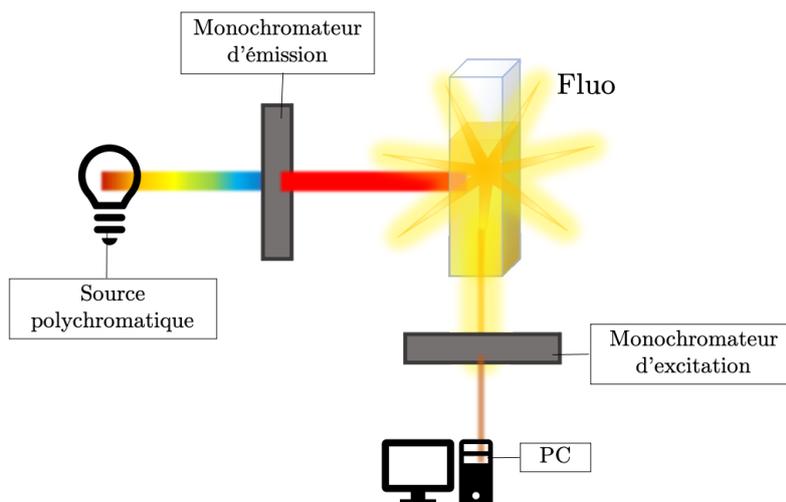


FIGURE 4.12 – Schématisation du fonctionnement d'un fluorimètre.

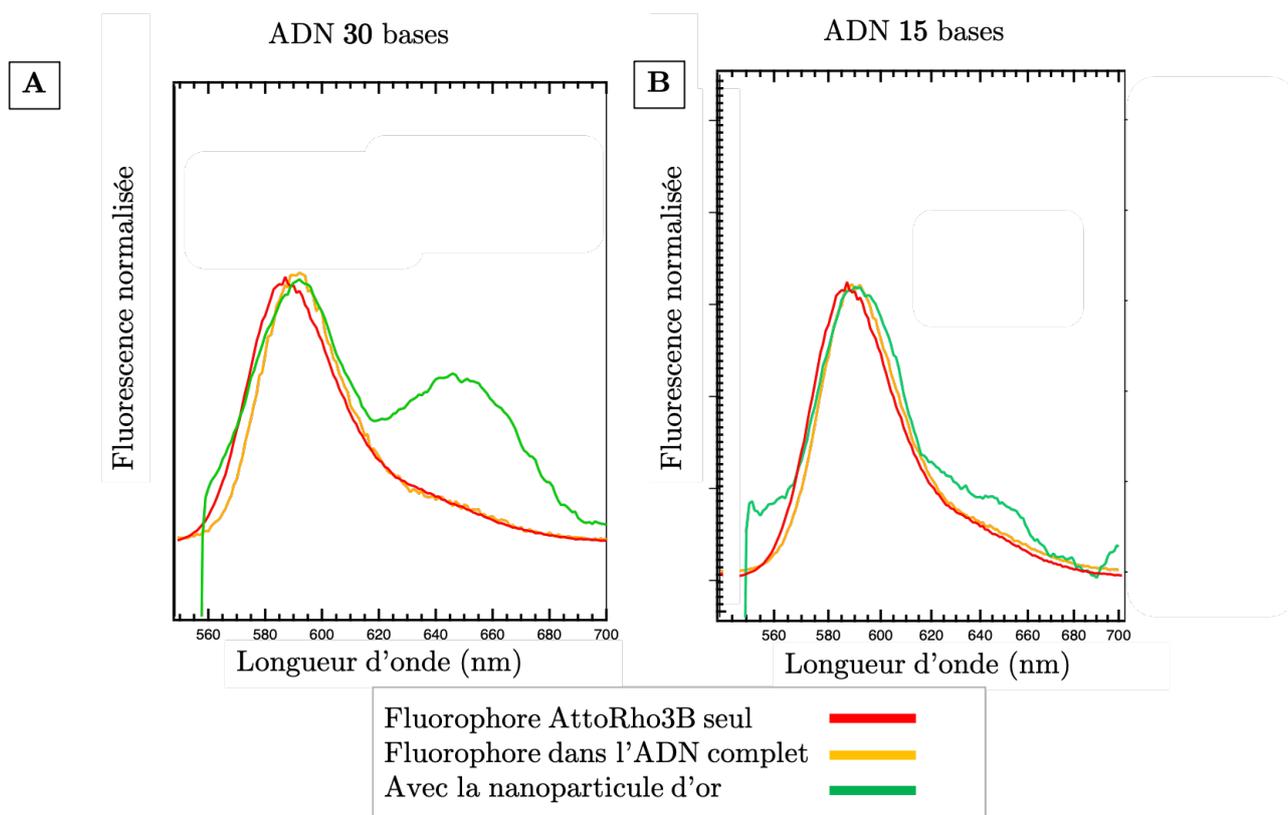


FIGURE 4.13 – Spectres de fluorescence normalisés tracés en fonction de la longueur d'onde pour deux longueurs d'ADN, le 30 bases et le 15 bases. Chacun des graphiques compare le fluorophore seul en rouge, le fluorophore dans l'ADN en orange et le système complet avec l'or en vert.

III.2 Brillance

Le paramètre le plus important dans notre expérience est la brillance. Pour rappel, ce terme représente le ratio entre l'intensité de fluorescence mesurée et le nombre de molécules présentes dans le volume d'observation. Nous souhaitons visualiser une augmentation de la brillance avec l'ajout de l'or, comme preuve d'exaltation par le métal.

La figure 4.14 présente les profils de brillance pour nos deux tailles d'ADN, 15 bases et 30 bases, pour les trois configurations : le monobrin d'ADN (orange), le brin complet (vert) et le brin attaché à l'or (bleu). Il y a plusieurs constats à faire sur ces graphiques. Premièrement, il n'y a pas ou peu de différence entre la brillance de la sonde seule (figure 4.9 D) et la brillance obtenue avec le monobrin (figure 4.18, courbe orange). Deuxièmement, le fait d'attacher le brin complémentaire entraîne une diminution de la brillance (comparaison du spectre orange et du spectre vert). Cela peut s'expliquer par des transitions électroniques le long de la chaîne qui agissent comme inhibiteurs de fluorescence. Les différences observées entre les deux brins sont très probablement dues à la différence dans la séquence, surtout à proximité du fluorophore (CAC pour le 15 bases et GGC pour le 30).

Le plus intéressant à comparer pour notre expérience est le brin d'ADN complet, sans et avec nanoparticules d'or (comparaison des courbes vertes et bleues). Dans les deux cas, lorsque la nanoparticule d'or est ajoutée au système, la brillance augmente. Il y a donc exaltation de la fluorescence par le métal. À ce stade, il n'est pas possible d'identifier le ou les paramètres physiques entraînant cette exaltation, il peut s'agir de contribution plasmonique, de transfert de charges, de phénomènes quantiques ou encore de nouvelles voies de désexcitation.

III.3 Autres paramètres photophysiques

Nous avons également comparé les autres données photophysiques obtenues en étudiant les courbes de corrélations.

Tout d'abord, intéressons-nous au temps de diffusion. La figure 4.15, affiche le profil des temps de diffusion dans la première colonne, pour chacun des composants (même code couleur que précédemment) et pour les deux longueurs d'ADN. Ils augmentent bien avec le flux de photons, comme attendu physiquement. Ils varient entre 0.12 ms et 0,25 ms. Ils sont plus long pour l'ADN 30 bases que pour le 15 bases, la dimension moléculaire du 30 bases étant deux fois supérieures à celle du 15 bases. Aussi, lorsque l'on ajoute la nanoparticule d'or (en bleu), le temps de diffusion est légèrement plus long.

Ensuite, le paramètre P (figure 4.15, deuxième colonne) : le taux de peuplement de l'état triplet. Comme attendu dans le modèle de RISC, le profil de P décroît. De plus, surtout pour le brin d'ADN contenant 30 bases, la valeur de P arrive très rapidement à zéro (aux alentours de $4 \cdot 10^{26}$ de flux de photon) ce qui signifie qu'il n'y a plus de molécules dans l'état triplet. La nouvelle voie de désexcitation de l'état triplet due au RISC semble favorisée. Le profil de P est identique pour les trois configurations.

Enfin, le profil de l'inverse de t_p , composante temporelle associée à p (figure 4.15, troisième colonne). Difficile à caractériser, nous pouvons tout de même noter sa décroissance avec l'augmentation de la puissance laser, comme prévue par le modèle RISC. Ce paramètre est nul lorsque p est à zéro. Là encore, il n'y a aucune distinction entre les trois configurations.

Comme la fluorescence du système est assez faible comparée à d'autres expériences, il est parfois

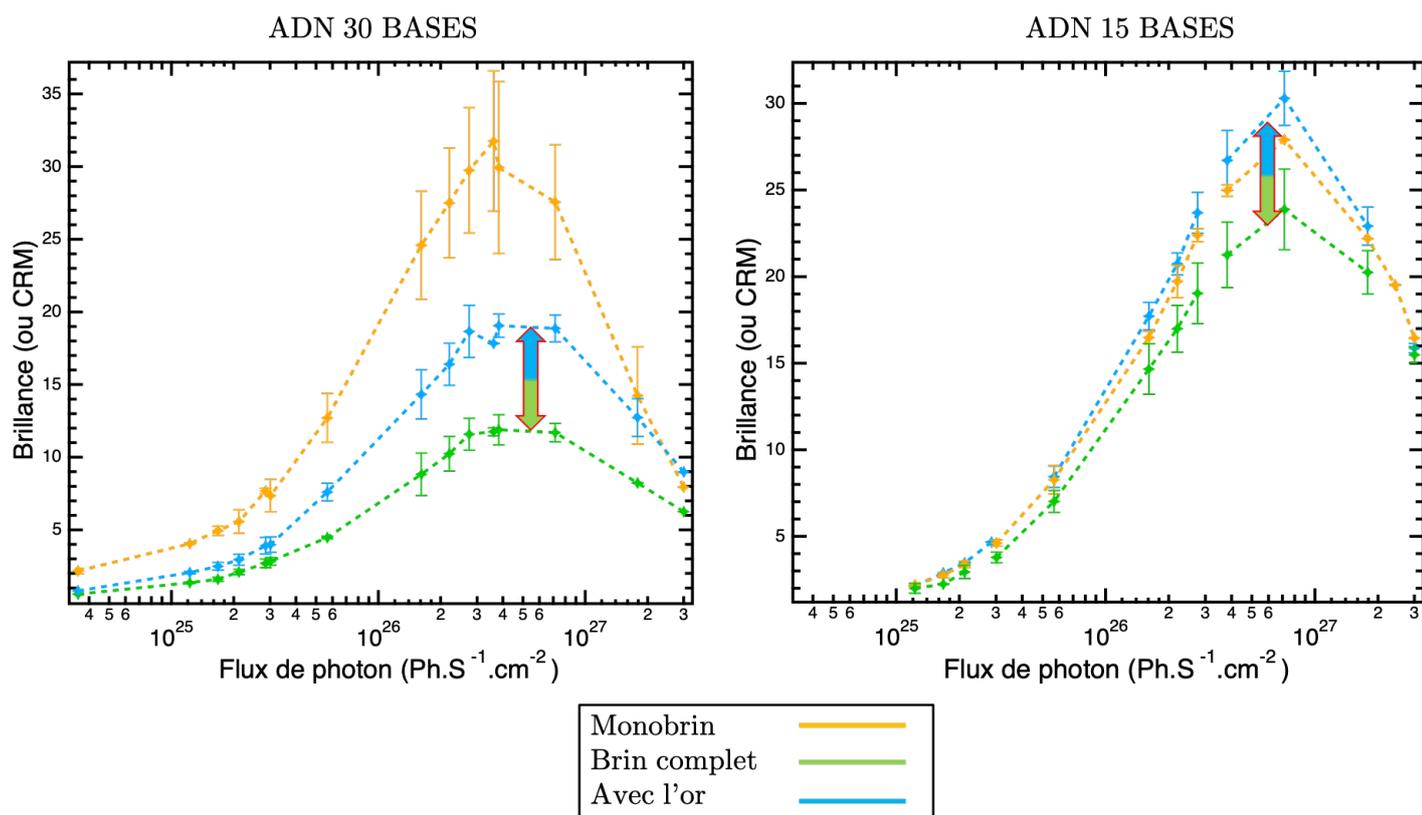


FIGURE 4.14 – Courbes de la brillance, soit la fluorescence par molécules tracées en fonction du flux de photons pour les deux longueurs d'ADN : le 30 bases et le 15 bases. Les trois configurations sont représentées : en orange, le monobrin ; en vert, le brin complet ; en bleu, le système avec la nanoparticule d'or.

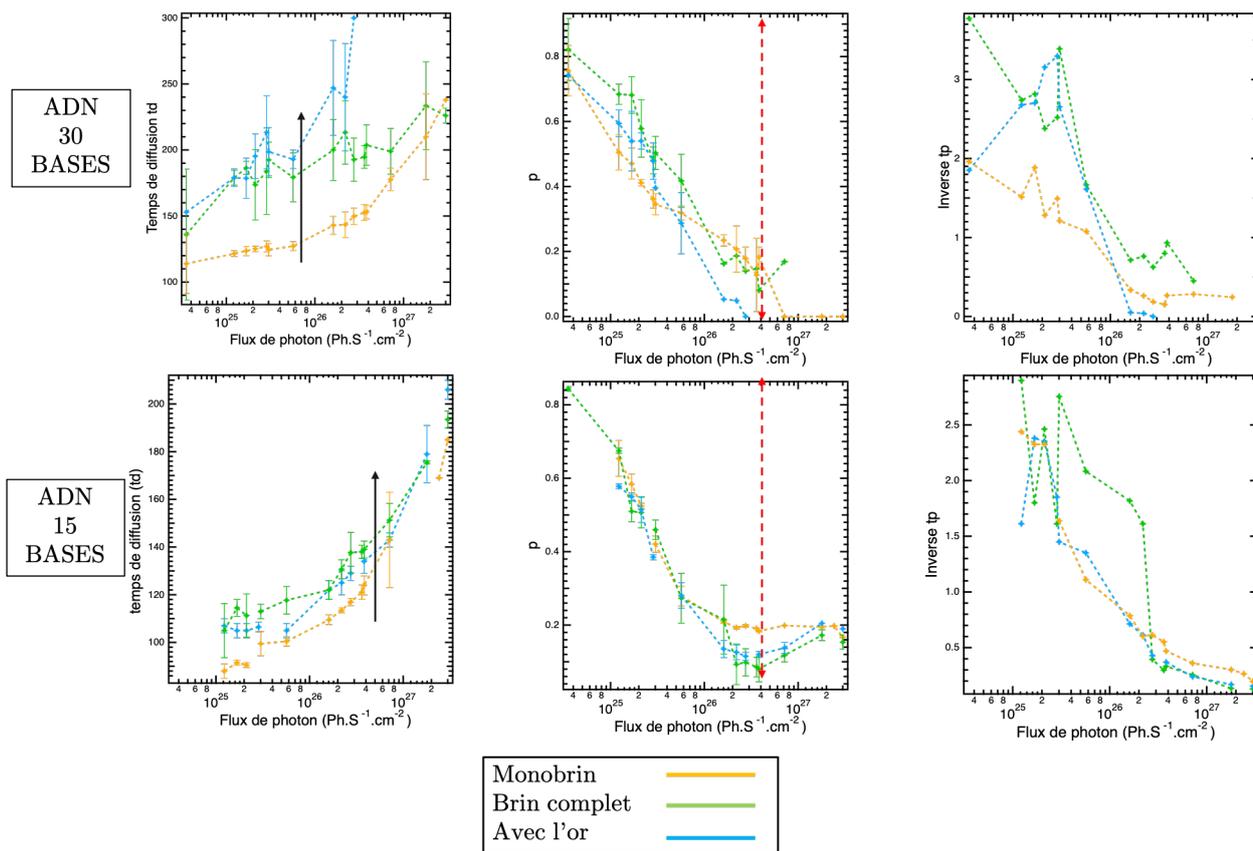


FIGURE 4.15 – *Autres paramètres photophysiques de notre expérience : la première colonne concerne le temps de diffusion t_d , la seconde, p et la dernière, l'inverse de t_p . La première ligne est associée au brin d'ADN de 30 bases et la seconde, celui de 15 bases.*

difficile d'obtenir une évolution claire et incontestable de ces paramètres. Seuls le nombre de molécules et la fluorescence, donc la brillance, sont très robustes dans la modélisation. C'est pourquoi nous ne commentons ici que la tendance des courbes. Toutefois, l'expérience est assez reproductible (pour t_d et p), comme en témoignent les barres d'erreurs présentes sur les courbes.

III.4 Temps de vie

Pour étudier la photo physique du système, il est nécessaire de mesurer ou calculer le temps de vie et/ou le rendement quantique du fluorophore. La carte d'acquisition PicoHarp Quant du montage permet d'obtenir directement le temps de vie sous forme de courbe.

Pour chacune des étapes, nous avons suivi l'évolution du temps de vie. La première remarque notable est l'apparition d'un déclin multiexponentiel lorsque la sonde fluorescente est attachée à l'ADN. Ce phénomène s'observe graphiquement, lorsque la visualisation du temps de vie sous forme de courbe présente une décroissance avec plusieurs pentes. Cela signifie qu'il y a une distinction d'au moins deux composantes dans le temps de vie moyen mesuré, ayant chacune leur propre contribution. Par exemple, nous observons pour le monobrin avec le fluorophore (30 bases) deux composantes : un temps de vie très court ($\approx 0,5$ ns) et un temps de vie plus long (≈ 3 ns), avec un ratio 10 :1. Ce ratio est calculé par le logiciel et donne une amplitude pour chacun des temps de vie.

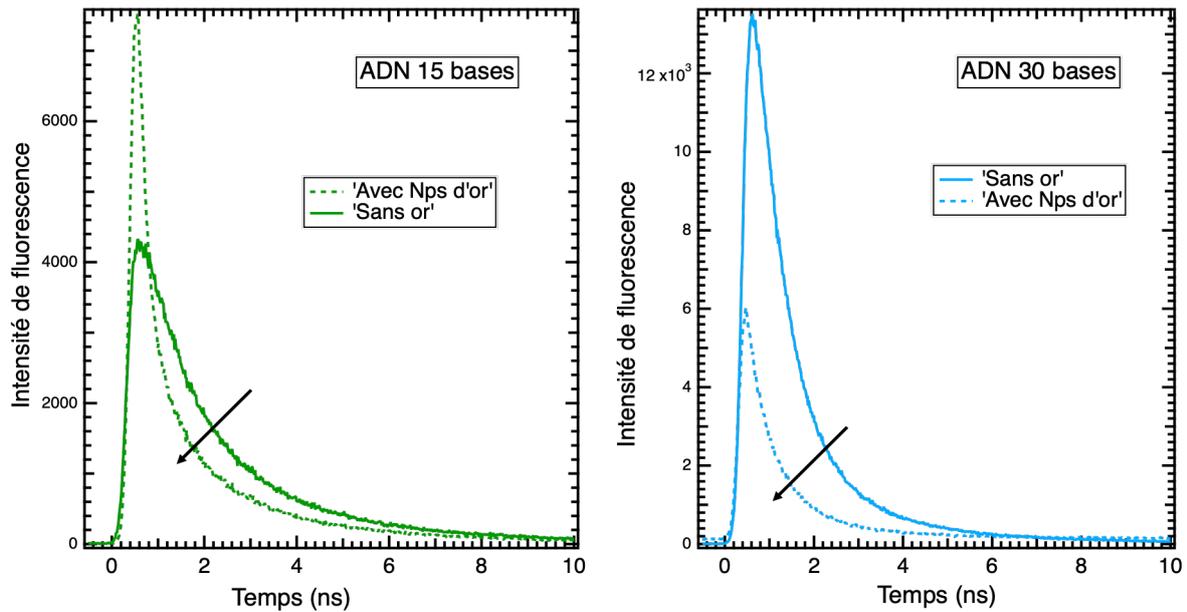


FIGURE 4.16 – Courbes du temps de vie, en vert pour le 15 bases et en bleu pour le 30 bases. Lorsque la nanoparticule d'or est attachée au brin (courbe en pointillée), le temps de vie moyen diminue légèrement.

La deuxième remarque est que ce temps de vie n'évolue pas énormément lors des étapes de l'expérience. Le temps de vie initial du fluorophore est de 1,57 ns contre 1,31 ns lorsqu'il est attaché à l'ADN complet.

Le plus étrange est que lorsque l'on ajoute une nanoparticule d'or, le temps de vie n'évolue que très peu (1,6 ns contre 1,3 ns). Or, dans la littérature, lorsque le métal intervient dans la fluorescence, il a été démontré de nombreuses fois que ce temps de vie doit considérablement diminuer, d'un facteur 1,5 minimum [118] [116], [113]. Graphiquement, la différence entre la courbe de temps de vie avec et sans nanoparticules est tout de même légèrement visible sur la figure 4.16. Pour les deux tailles d'ADN, la courbe avec l'or (en pointillée) est en dessous de la courbe sans or.

Ces courbes nous ont permis d'apporter des explications supplémentaires sur la synergie du système et notamment sur la contribution du métal. L'interprétation des divers résultats est réalisée dans la partie suivante.

IV Conclusion et ouverture

IV.1 Interprétation des résultats

Avec toutes les données obtenues précédemment, nous avons entrepris d'interpréter notre système, d'un point de vue photophysique.

La première donnée importante est l'augmentation de la brillance lorsque l'on ajoute une nanoparticule d'or. Cela signifie qu'il y a bien exaltation de la fluorescence par le métal. Or contrairement à la littérature, cette exaltation ici n'entraîne pas de modification majeure du temps de vie, comme le démontre la figure 4.16. Afin de comprendre ce point, nous avons simulé une cartographie du

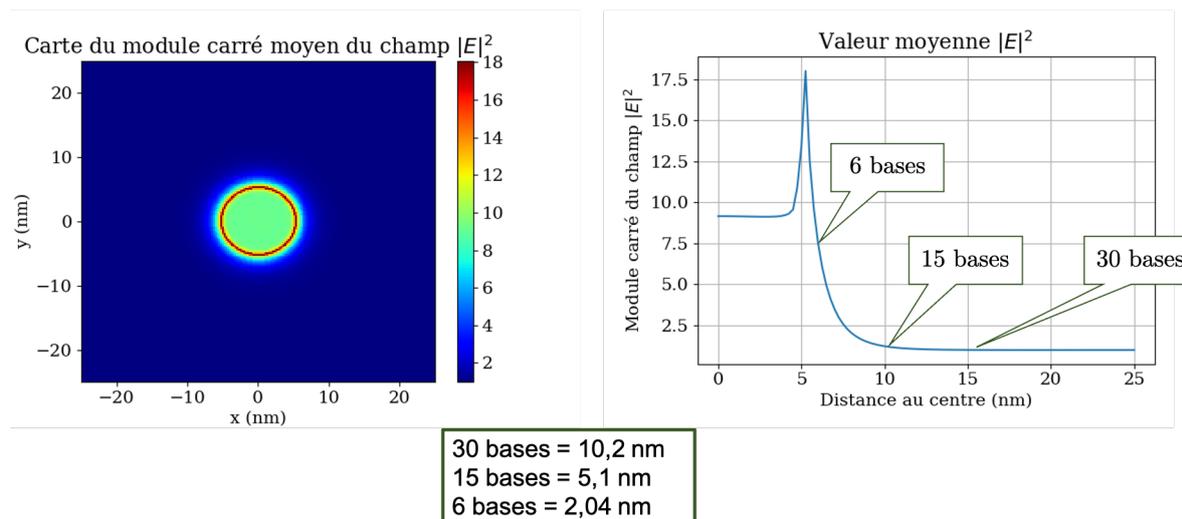


FIGURE 4.17 – Cartographie du module du champ électrique moyen au carré $|E|^2$ pour une particule de 10 nanomètres de diamètre et son profil associé. Les longueurs de brins d'ADN sont placées sur le graphique.

champ électrique moyen présent autour de la particule, présentée dans la figure 4.17. En plaçant nos trois longueurs d'ADN sur le graphique, nous pouvons observer qu'ils sont assez éloignés de la zone de confinement du champ, soit la zone où le plasmon est le plus important. Dans la littérature, de nombreuses publications utilisent des particules plus grandes et par conséquent, le fluorophore se trouve bien dans une zone où le champ est fort [119] [120]. Nous avons ici fait le choix de particules de plus petits diamètres pour éviter le photoblanchiment, ce qui a entraîné un champ réduit autour de la sonde. Par conséquent, le rôle de la plasmonique semble ici être infime voire nul. Et même en tenant compte d'une position du brin d'ADN avec un angle, comme présenté dans la figure 4.8, le fluorophore reste tout de même éloigné de la zone de confinement du champ.

Ce constat apporte un grand nombre de questions supplémentaires : si les propriétés plasmoniques du métal n'interviennent pas dans l'exaltation de la fluorescence ici, quel phénomène contribue à ce résultat ?

Une des possibilités est l'échange d'électrons entre la sonde fluorescente et la structure de l'ADN. En effet, la structure de la chaîne d'ADN est composée de cycles aromatiques et peut favoriser le transfert de charges. Les spectres d'absorption et de fluorescence (figure 4.13 et 4.11) démontrent la modification importante des bandes vibroniques lors de l'attache avec la nanoparticule métallique : cela confirme en partie le transfert de charges. Les électrons libres de l'ADN ou du métal participent à cette modification.

Il y a également une autre possibilité : un phénomène quantique apporté par la petite taille de nos objets. Les connaissances sur ce point étant moindre, il ne sera pas étudié mais seulement inscrit comme une hypothèse.

À ce stade, l'expérience apporte donc de nombreux questionnements, sans possibilité d'interprétation approfondie sur la photophysique du système. Il y a trois pistes : l'apport de la plasmonique, le transfert de charges ou encore la partie quantique. Pour délibérer, il est nécessaire de trouver un nouveau modèle, tenant compte du modèle de RISC et permettant de quantifier certaines transitions. Ce modèle étant basé sur des équations complexes, nous continuons de travailler dessus. En effet, pour produire une modélisation réaliste et qui puisse être calculée, nous devons tester de nombreuses possibilités pour ne pas réaliser des simplifications hasardeuses. Il sera semblable à la publication

de Ringemann et al. [116], mais sans le facteur de photoblanchiment. Pour poursuivre également la compréhension de notre système, il est possible d'envisager d'autres expériences complémentaires, comme présentées dans la partie suivante.

IV.2 Expériences complémentaires

Suite aux questions soulevées par cette expérience, plusieurs expériences complémentaires pourraient permettre de compléter les résultats préalablement obtenus.

La première expérience consisterait en l'utilisation de plusieurs tailles de nanoparticules, afin d'étudier la piste de la contribution de la plasmonique. Les particules de plus grands diamètres ont un champ électrique qui s'étend sur de plus grandes distances : le fluorophore se trouverait donc dans la zone d'exaltation du champ. L'intérêt ici est de voir si le temps de vie est modifié et si cela entraîne une exaltation de la fluorescence supplémentaire, autrement dit plus de brillance.

Une autre possibilité serait de placer un élément entre le fluorophore et l'ADN, au niveau du greffage, pour éliminer toute possibilité d'échange électronique entre l'ADN et le fluorophore, afin d'exclure le transfert de charge.

Enfin, l'utilisation d'un autre fluorophore permettrait d'éliminer les points de difficulté que nous avons rencontrés : la configuration RISC et le déclin multiexponentiel du temps de vie. Pour cela, une expertise en photophysique et biophysique sera nécessaire, afin de limiter le nombre d'expériences.

Ces trois points devront être étudiés dans un ou plusieurs projets complémentaires puisque la technique de FCS est tout de même assez chronophage. Cependant, nous avons démontré l'intérêt de cette technique pour l'étude des phénomènes d'exaltation de la fluorescence. C'est pourquoi la partie suivante aborde l'utilisation de cette technique pour notre capteur, mais cette fois ci, dans le domaine des ultraviolets.

IV.3 Ouverture sur l'UV

Dans le chapitre 1, nous avons explicité l'objectif du projet, et notamment la façon de détecter l'épigénétique avec l'exaltation de fluorescence. Le capteur est identique au système utilisé dans cette expérience : un brin d'ADN relié à une nanoparticule métallique, qui sera en revanche de l'aluminium pour ses propriétés en plasmonique UV.

Comme démontré précédemment, la FCS est une technique très intéressante pour observer la photophysique du système et notamment l'exaltation de fluorescence sur particule unique, à travers la brillance. Ce même montage pourrait donc nous permettre, adapté au domaine UV, d'observer les modifications de l'ADN par l'épigénétique, et ce, directement à l'intérieur d'une cellule. La figure 4.18 présente les mécanismes et les résultats hypothétiques d'une telle expérience.

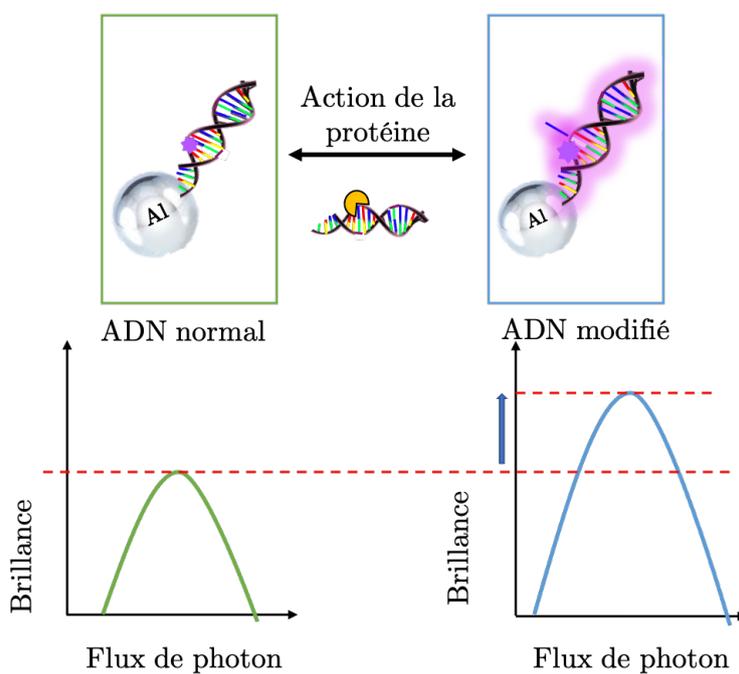


FIGURE 4.18 – Schématisation du fonctionnement de notre capteur, associé à la technique de FCS. Lors de l'exclusion d'un nucléotide par l'action de protéines, la valeur de brillance devrait considérablement augmenter, supportée par la plasmonique de l'aluminium. Ainsi, la fréquence de ce phénomène d'épigénétique serait quantifiable.

Chapitre 5

Conception et phase de test du nano-capteur

Dans les chapitres précédents, nous avons décrit les différentes étapes du projet à travers la fabrication et la compréhension de capteurs MEF. Nous avons notamment synthétisé (chapitre 2) et caractérisé (chapitre 3) des nanoparticules d'aluminium pour exalter la fluorescence de la ThG, une sonde fluorescente biocompatible. Puis nous avons étudié le fonctionnement d'un capteur ADN-or grâce à la méthode de FCS dans le chapitre 4. Désormais, il reste une étape, la plus importante, l'assemblage et le test du capteur. C'est un défi technique puisqu'actuellement, il existe très peu de capteurs à base d'aluminium, pour des questions de stabilité. De plus, nous souhaitons atteindre la molécule unique qui permet d'étudier un seul brin d'ADN. La première partie de ce chapitre décrit le protocole de fonctionnalisation entre l'ADN et l'aluminium. La deuxième partie concerne la validation du protocole et la caractérisation du capteur dans le visible. Enfin, la troisième et dernière partie aborde les perspectives du projet, notamment les expériences qui resteront à réaliser pour pérenniser le fonctionnement de cet ensemble.

Sommaire

I	La fonctionnalisation ADN-Aluminium	100
I.1	Définition d'un plan d'action	100
I.2	Stabilisation de l'Aluminium lithographié	101
I.3	Mise en place du protocole	102
II	Mesure de fluorescence exaltée	104
II.1	Imagerie de fluorescence	104
II.2	Vers la molécule unique	105
II.3	Caractérisation	106
III	Perspective du projet	109
III.1	Mesure avec la ThG	109
III.2	Fonctionnalisation en solution	109
III.3	Optimisation du capteur : perspectives	111

I La fonctionnalisation ADN-Aluminium

I.1 Définition d'un plan d'action

Nous avons abordé dans le chapitre 2 la fabrication de structures nanométriques d'aluminium par la technique de lithographie électronique. Pour rappel, il s'agit de dessiner un design dans une résine déposée sur un substrat, à l'aide d'un faisceau d'électrons, et de recouvrir le tout d'une couche d'aluminium par métallisation sous vide. Lors de l'étape de développement, la résine est retirée, ne laissant plus que le dessin initial, qui peut être par exemple, des disques d'aluminium. L'avantage des structures lithographiées par rapport aux colloïdes, c'est que le motif permet de localiser précisément chaque particule sur le substrat. De plus, pour fonctionnaliser une lithographie, il suffit de l'immerger en solution. Nous nous sommes donc dans un premier temps concentrés sur la fonctionnalisation de lithographies d'aluminium.

La première étape dans la définition d'un protocole de fonctionnalisation est de déterminer les groupes fonctionnels présents sur la surface du métal [121]. Et également la charge surfacique, si le métal est immergé. Par exemple, si l'on prend le cas de l'or, il n'y a que des atomes d'or en surface pour une lithographie vu qu'il ne s'oxyde pas. En revanche, en solution, les nanoparticules d'or sont entourées de ligands, molécules stabilisatrices, qui déterminent les groupes fonctionnels et la charge. Dans la littérature, le groupement thiol est souvent utilisé pour la fonctionnalisation de l'or, puisque la liaison thiol-or, bien que non covalente, est réputée pour être particulièrement robuste à température ambiante [122]. Dans le cas de l'aluminium, que se soit en lithographie ou en solution, une fine couche d'alumine Al_2O_3 se forme en surface [71]. La surface est donc composée de fonctions -OH, qui deviennent chargées en solution.

Pour fonctionnaliser des -OH, les silanes sont une bonne option. Dans l'usage classique, ils sont utilisés pour fonctionnaliser le verre, de formule SiO_2 [123]. Il existe un grand panel de molécules à base de silane, la figure 5.1 A illustre une forme générique. Le silane est attaché à 3 groupes réactifs et à une chaîne plus ou moins longue de carbones à la quatrième liaison, avec une fonction au choix à l'extrémité. Par exemple, on attache au verre des mercaptopropyl-triméthoxysilane, dont la formule est illustrée dans la figure 5.1 B, pour y attacher ensuite des nanoparticules d'or, via la fonction -thiol [122].

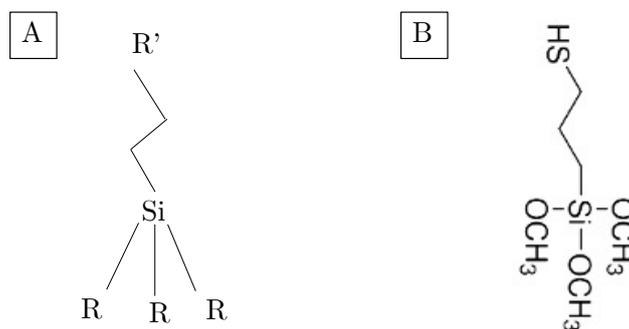


FIGURE 5.1 – Schémas de molécules de silanes. En A, une forme générique, où R et R' représente des groupements ou fonctions. En B, un mercaptopropyl-triméthoxysilane.

La seconde étape est la prise en compte de la partie ADN. Même si la plupart des fournisseurs proposent d'attacher un grand nombre de fonctions à l'extrémité de l'ADN, le prix peut devenir excessif si le protocole est complexe. Aussi, lier directement l'ADN au métal n'est pas une option

possible dans notre cas, puisque la séquence d'étude est courte. Cela reviendrait à trop rapprocher le fluorophore de la surface et donc à limiter son efficacité. Il faut alors prendre en compte à la fois le prix de la séquence d'ADN et la distance ADN-métal pour la construction du plan d'expérience. Dans un premier temps, nous avons sélectionné un protocole très utilisé en biologie, le duo neutravidine-ADN biotine, comme présenté dans la publication de F. Séverac et al. [124]. Il a l'avantage d'être robuste et facile d'exécution. Cependant, la neutravidine est une protéine imposante et la distance entre notre fluorophore et la surface du métal aurait dépassé la limite des 15 nanomètres. Nous avons aussi dans l'idée d'utiliser seulement une molécule contenant du silane, en choisissant la distance de la chaîne carbonée et la fonction finale, comme dans la publication de Z. Guo et al. [125] qui fonctionnalisent des particules d'alumine avec des silanes dans le THF. Cependant, le rendement de fixation est très faible. Nous avons donc sélectionné un protocole avec un composant intermédiaire entre le silane et l'ADN, le glutaraldéhyde [126]. Il permet d'augmenter le rendement de fixation et d'apporter un espace entre le métal et la sonde. Des fonctions amines et aldéhydes sont utilisées pour faire les liaisons entre les différents composants. Ce protocole sera détaillé dans la troisième sous partie de cette section.

Ces protocoles imposent de travailler en solution, surtout à l'étape du greffage de l'ADN. Or les lithographies d'aluminium ne sont pas stables en solution. Il a été indispensable de définir une stratégie de stabilisation préalablement aux étapes de fonctionnalisation, comme développée dans la partie suivante.

I.2 Stabilisation de l'Aluminium lithographié

La lithographie est une excellente manière de fabriquer des nanoparticules sur substrat. Cette méthode possède en revanche, dans le cas de l'aluminium, une faiblesse. En effet, le dépôt métallique n'est pas tout à fait homogène et favorise l'oxydation totale de l'aluminium en présence de solvants. Les lithographies d'aluminium sont notamment particulièrement sensibles dans les solvants aqueux, indispensables pour les expériences en biologie, comme le démontre l'article de F. Zhang et al [72]. Cette donnée devait être prise en compte dans le choix d'un protocole de fonctionnalisation.

Comme présenté dans le chapitre 2, il existe plusieurs manières de stabiliser les lithographies d'aluminium, notamment l'utilisation de plasmas. Nous avons vu que le plasma O_2 n'est pas idéal puisqu'il laisse des dépôts et une surface non homogène. Nous utilisons donc un plasma air. Dès lors que le métal a été déposé, avant même la révélation (liftoff), l'échantillon est inséré dans une chambre sous vide et un plasma air est appliqué pendant une dizaine de minutes à intensité moyenne. La mesure d'angle de contact et d'épaisseur par la méthode du profilomètre démontre que la couche d'oxyde n'est pas plus profonde, mais seulement plus dense. Les atomes d'hydrogène viennent combler les rugosités de surface en dopant l'alumine et la surface devient plus hydrophile.

Ensuite, afin de contrôler la stabilité en solution, nous avons réalisé des tests d'immersions. Différents solvants ont été choisis, soit en fonction des protocoles de fonctionnalisation, soit en fonction de l'ADN. Pour les solvants non biologiques, nous avons testé : l'eau, l'éthanol, l'isopropanol, l'hexane, le THF et l'acétone. Pour les solvants biologiques, nous avons sélectionné un échantillon de solution tampon utilisée en biologie : le PBS, le TBE, l'eau saline, le Tris et une solution tampon de sodium acétate. Ici, ce n'est pas tant les composants de la solution qui jouent un rôle sur l'oxydation de l'aluminium, mais plutôt le pH de la solution. Concernant les temps d'immersion, nous les avons fait varier de 1 heure à 24 heures.

Dans l'eau déionisée (pH=6,5), même après l'étape de stabilisation par plasma air, la lithographie

d'aluminium se détériore rapidement. En revanche, dans les solvants type alcool (éthanol, isopropanol et acétone), la lithographie reste quasi intacte, voir inchangée après 3 heures d'immersion. Après ce délai, la surface devient rugueuse et les propriétés optiques sont modifiées. Pour l'Hexane et le THF, même observation, au bout d'une heure. Concernant les solutions tampons, seul le tampon de sodium acétate, avec un pH de 5, permet de conserver les lithographies pendant 24 heures. Cette constatation est dû à l'alumine présente en surface, qui est stable à température ambiante pour un pH compris entre 4 et 6,5 [127][91]. Il n'y a donc ni corrosion, ni dissolution. La figure 5.2 illustre l'arbre des possibilités de cette expérience, avec encadré en orange, les solvants sélectionnés pour la fonctionnalisation.

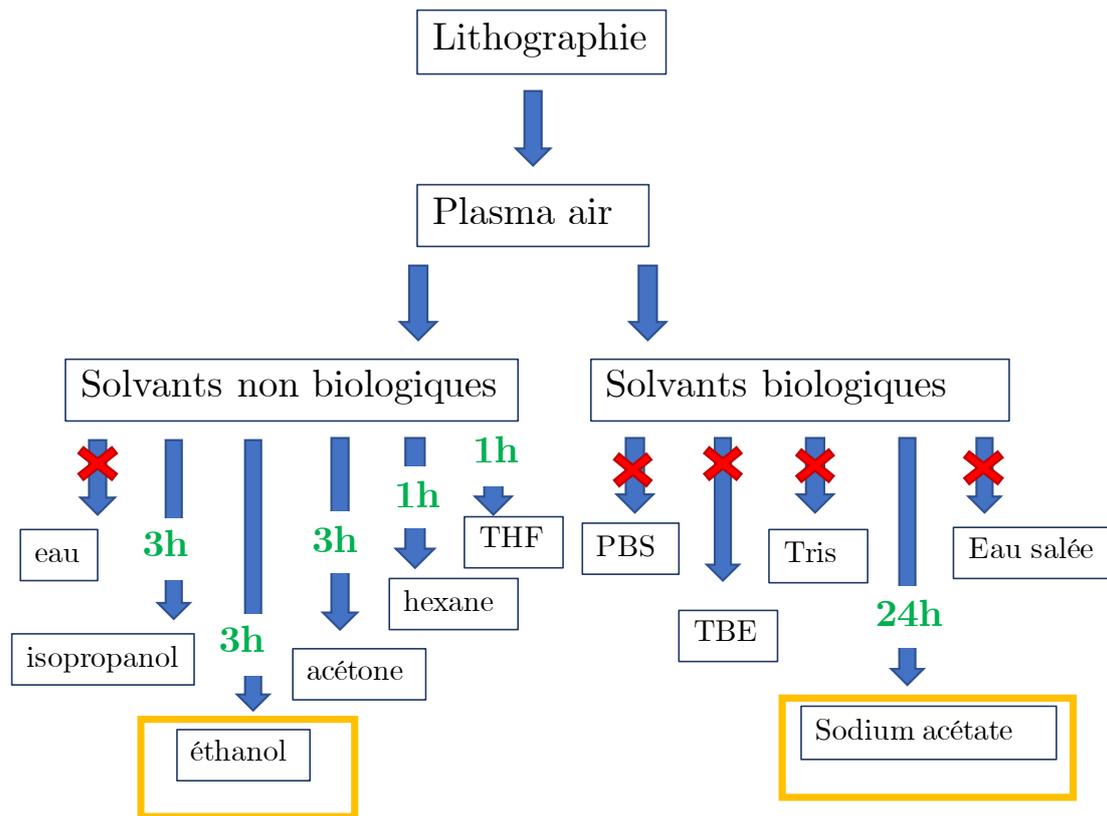


FIGURE 5.2 – Arbre de l'expérience de stabilisation des lithographies d'aluminium dans le solvant

I.3 Mise en place du protocole

La totalité du protocole de fonctionnalisation est illustrée dans la figure 5.3. Après la métallisation, l'échantillon lithographié est stabilisé par un plasma air. La révélation (liftoff) n'est pas réalisée immédiatement, pour empêcher de fonctionnaliser aussi le verre. C'est très important, car l'aluminium possède en surface des groupements -OH, tout comme le verre. Et même si les pourcentages de fixation sont différents pour les deux matériaux, notre objectif est d'obtenir de l'ADN fluorescent exclusivement sur les nanoparticules d'aluminium. Par ailleurs, les structures choisies pour la lithographie sont de simples disques de différents diamètres et de 50 nanomètres d'épaisseur, identiques à ceux étudiés optiquement dans le chapitre 3.

Pour attacher des silanes, il existe plusieurs protocoles. Il faut simplement faire attention à la nomenclature du produit. Lorsque ce sont des méthoxysilanes, la fonctionnalisation dans l'isopropanol anhydre est conseillée. En revanche, si la molécule est un éthoxysilanes, il faut utiliser une solution acide, à base d'éthanol, avec un peu d'eau. Nous avons choisi un 3-AminopropylTriéthoxysilane,

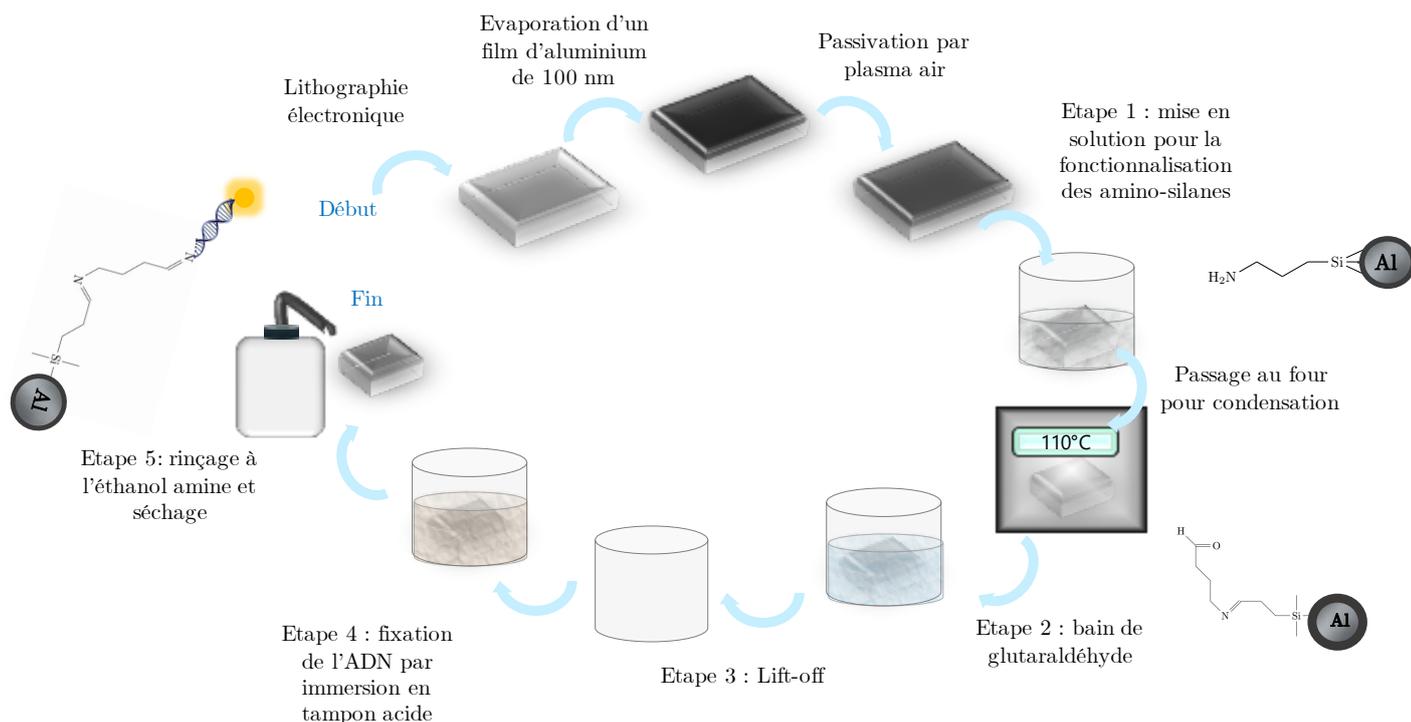


FIGURE 5.3 – Schéma de la fonctionnalisation. Après le dépôt métallique et la stabilisation de l'aluminium, l'échantillon subit 5 étapes pour que l'ADN y soit attaché.

de la marque Sigma Aldrich. La solution utilisée pour la fonctionnalisation est donc de l'éthanol, enrichi à 5 % en eau. Cette solution globale est ajustée à un pH de 4 avec de l'acide acétique. Cela permet à la fois d'activer le silane et les groupements -OH de l'alumine. La lithographie est immergée pendant 2h. La concentration de silane dans la solution est de 25%. Ensuite, l'échantillon est rincé puis passé au four pendant 30 minutes à 110°C, afin d'éliminer toutes les molécules qui ne se sont pas attachées à la surface et de condenser les ponts silane. Ce protocole peut être également réalisé par dépôt en face gazeuse : l'échantillon est placé dans une boîte à atmosphère contrôlée, sous argon et chauffée. Sous l'action de la température, lorsqu'une goutte de silane est déposée dans l'enceinte, elle va se sublimer et se déposer sur les surfaces environnantes, dont l'échantillon. Ce protocole est très utile pour éviter l'immersion de la lithographie mais il reste tout de même moins reproductible.

Une fois le silane attaché à l'aluminium, et toujours sans faire le liftoff, le composé intermédiaire est ajouté. C'est le glutaraldéhyde. Cet intermédiaire possède deux fonctions aldéhydes à chaque extrémité d'une chaîne carbonée. Il est particulièrement dangereux à l'utilisation. Il est alors nécessaire de porter un masque filtrant, spécialement conçu pour les solvants dangereux, et de travailler sous hotte aspirante lors de la manipulation. La solution mère commerciale (Sigma-Aldrich, 111-30-8) est diluée à 25% dans l'eau. Elle est diluée de nouveau dans le tampon acide, à hauteur de 20% pour la fonctionnalisation. Nous avons testé plusieurs temps d'immersion, l'idéal étant de laisser l'échantillon immergé durant plus de 6 heures, sans dépasser les 24 heures.

À la fin de cette deuxième étape, le liftoff est réalisé. L'échantillon est immergé dans une solution d'acétone, pour une nuit. L'acétone va dissoudre la résine restante, ici le PMMA, et provoquer la révélation des motifs. Dans notre cas, les deux étapes précédentes vont modifier légèrement la structure de la résine, rendant cette étape plus délicate. Alors, une étape supplémentaire avec bain d'ultrasons à faible intensité est parfois nécessaire pour décoller la totalité de la résine.

Enfin, la dernière étape est la fixation de l'ADN. Nous avons choisi d'utiliser une fonction amine, greffée à l'extrémité 3' du monobrin. Si les étapes précédentes se sont déroulées correctement, le glutaraldéhyde ne se situe que sur les plots d'aluminium. L'ADN aminé ne pouvant pas se fixer sur le verre, après immersion de 12h, les brins vont alors se lier uniquement au glutaraldéhyde.

A la fin de ce processus, il reste alors des disques d'aluminium reliés à des brins d'ADN, de façon covalente, avec une distance sonde-métal estimée à 10 nanomètres. L'échantillon est rincé dans une solution d'éthanol amine, pour neutraliser les molécules de glutaraldéhyde qui ne se sont pas attachées à l'ADN. Un second rinçage à l'eau distillée permet d'éliminer l'excédent de sel apporté par le tampon et éviter sa cristallisation sur le substrat.

Il y a plusieurs techniques de caractérisation qui permettent de vérifier si la fonctionnalisation s'est bien déroulée. Elles seront présentées dans la partie suivante.

II Mesure de fluorescence exaltée

Nous avons vu précédemment comment attacher notre brin d'ADN à l'aluminium. Ces étapes de fonctionnalisation sont principalement basées sur des réactions chimiques. Il est crucial de respecter l'ordre et les temps d'immersion, afin que le protocole se déroule correctement. Pour vérifier la fonctionnalisation, le monobrin d'ADN aminé a été attaché à une sonde fluorescente dans le visible, la Cyanine 3, à l'extrémité 5'. De plus, le brin complémentaire a lui aussi été relié à une sonde fluorescente, cette fois-ci une cyanine 5, à l'extrémité 3'. Ces fluorophores vont permettre de caractériser la fonctionnalisation, par le suivi de la fluorescence.

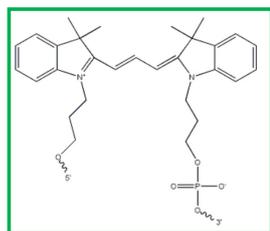
II.1 Imagerie de fluorescence

La première étape de caractérisation du protocole d'attache est l'imagerie de fluorescence. Pour cela, nous avons intégré des fluorophores à l'ADN : sur le premier monobrin, une cyanine 3 et sur le second, une cyanine 5. Ces deux différentes sondes permettent de vérifier la présence de l'ADN mais aussi l'hybridation.

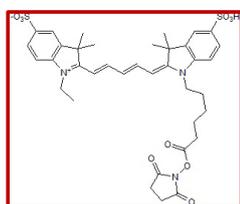
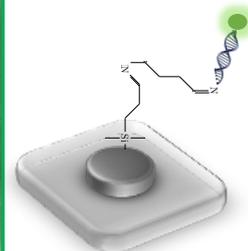
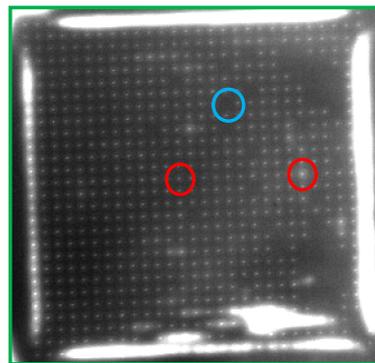
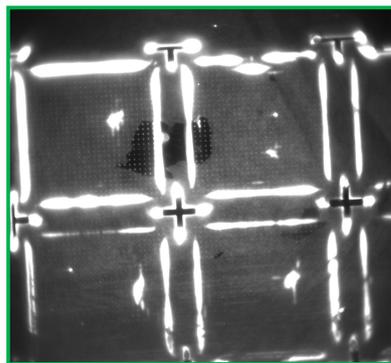
Initialement, nous souhaitons caractériser le protocole avec des mesures de fluorescence de la solution contenant les brins d'ADN, avant et après l'immersion de la lithographie. En effectuant la différence entre l'intensité de la fluorescence initiale et l'intensité finale, on obtient le pourcentage de brins s'étant lié à l'échantillon. Cependant, cette méthode n'est pas réalisable ici pour deux raisons. Premièrement, l'échantillon est rincé plusieurs fois après immersion dans l'ADN. Cette action va enlever des brins qui ne se sont pas liés de façon covalente. Par conséquent, le résultat est faussé. Deuxièmement, l'objectif étant d'atteindre la molécule unique, la concentration en fluorophore utilisée est très faible. Le rapport signal sur bruit de la mesure d'intensité de fluorescence est donc assez mauvais et la distinction avant/après immersion n'est pas assez discriminante.

Par conséquent, nous avons préféré l'imagerie. À la fin du protocole, l'échantillon est séché et placé sur un microscope à imagerie de fluorescence. Les images obtenues sont présentées dans la figure 5.4. Pour la détection de la cyanine 3, on utilise une source laser 488 nm. Pour la cyanine 5, un laser rouge 632 nm. Chaque image est réalisée pour un brin d'ADN complet avec un seul fluorophore. Les images de la cyanine 3 confirment que le protocole fonctionne et celles de la cyanine 5, que l'appariement entre les deux brins est possible. Certains plots ne sont pas fonctionnalisés, comme

nous pouvons le voir dans les cercles bleus. D'autres le sont, mais possèdent des intensités différentes (cercles rouges). Cette différence d'intensité est reliée aux nombres de brins d'ADN attachés au disque d'aluminium.



Cyanine 3



Cyanine 5

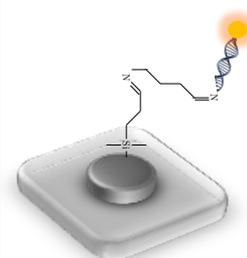
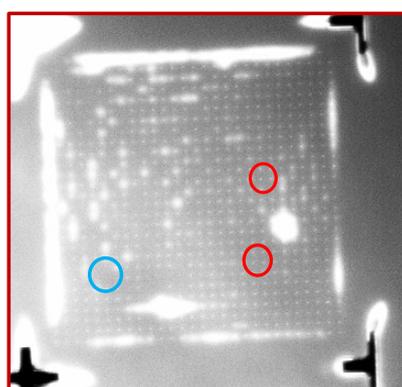
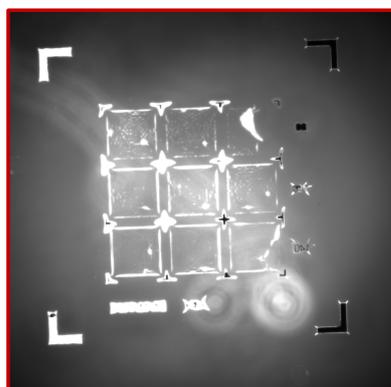


FIGURE 5.4 – Image de microscopie de fluorescence pour notre échantillon. La première ligne concerne l'ADN relié à une cyanine 3, tandis que la seconde concerne la cyanine 5 sur le brin complémentaire. En bleu, le cercle localise un disque qui n'est pas fonctionnalisé et en rouge, deux intensités de greffage différentes.

Notons que l'imagerie à ce stade ne peut pas fournir plus d'informations. La fonctionnalisation est bien effective, mais nous n'avons pas d'informations sur le nombre de brins d'ADN sur un plot. Nous avons donc par la suite travaillé avec notre équipe partenaire, le LBP, pour optimiser le protocole.

II.2 Vers la molécule unique

Une fois que la preuve de concept du protocole a été démontrée par imagerie de fluorescence, il a fallu l'optimiser. Nous souhaitons tendre vers la molécule unique, c'est à dire avoir un maximum de plot où un seul brin d'ADN est fixé. Des mesures de fluorescence ont donc été conduites sur plusieurs échantillons en faisant varier la concentration d'ADN pendant la fonctionnalisation. Pour ce faire, un montage optique de saturation a été utilisé. Il est constitué d'un microscope inversé avec imagerie caméra et d'un appareil de détection de photon. Pour connaître le nombre de fluorophores par plot, on effectue des mesures de photo-blanchiment. En éclairant un disque d'aluminium, une certaine intensité initiale de fluorescence est mesurée. En conservant l'illumination dans le temps, le fluorophore va se dégrader complètement et ne plus émettre de photons, c'est le photo-blanchiment. La mesure de l'intensité permet alors de compter le nombre de fluorophores sur la surface. Comme tracé dans la figure 5.5, lorsque le plot possède plusieurs fluorophores, donc plusieurs brins d'ADN, le photo-blanchiment sera progressif, entraînant un profil de décroissance exponentielle (à droite). En revanche, s'il n'y a qu'un seul brin, une marche est observée (à gauche).

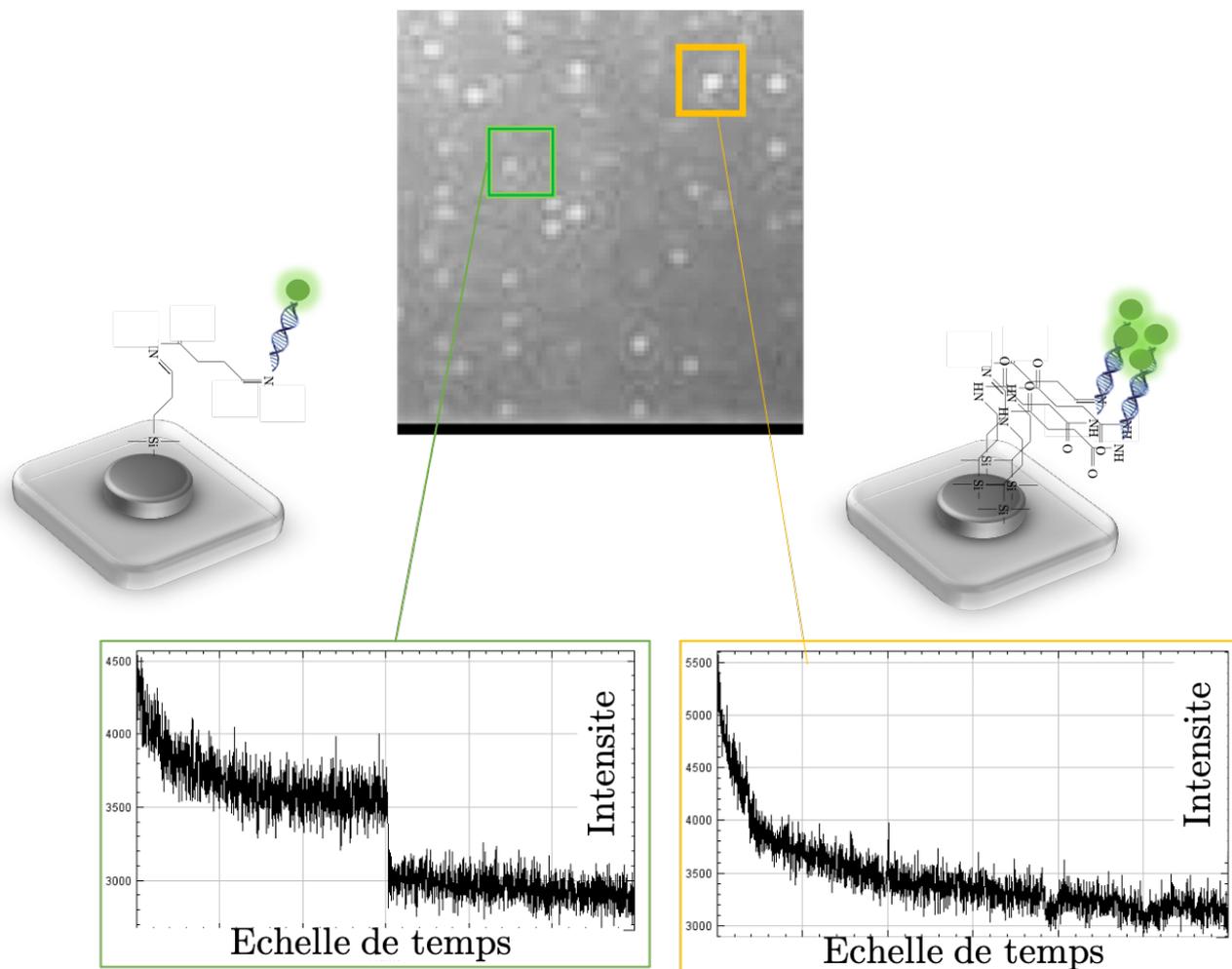


FIGURE 5.5 – Image de fluorescence du capteur et mesures d'intensité. Lorsqu'il n'y a qu'un brin d'ADN sur un disque d'aluminium, l'intensité présente une marche. Lorsque le plot est saturé de fluorophores, l'intensité décroît exponentiellement.

C'est avec cette méthode que nous avons optimisé la concentration de la solution d'ADN et les temps d'immersion. Le meilleur résultat a été obtenu pour une solution de 0,5 nanomolaires. Cela peut paraître peu, mais lorsque l'on convertit cette donnée en quantité, on obtient 3×10^{14} brins par litre.

II.3 Caractérisation

Pour poursuivre l'étude, nous avons réalisé des mesures optiques du capteur, dans le visible. Pour cela, un microscope confocal pour la détection de fluorescence a été utilisé. L'échantillon est illuminé par un laser 532 nm, traversant un miroir dichroïque et un objectif x100 (N.A. 0.9). Les filtres sont interchangeables et permettent de sélectionner une partie du spectre d'émission. Le signal peut être collecté sur plusieurs appareils de détection : une caméra, un spectromètre ou encore une APD. Ce montage permet d'obtenir des spectres d'émission et des mesures de temps de vie sur un même échantillon.

Nous avons obtenus deux données par plot, un spectre d'émission et un profil de temps de vie. Les

mesures ont été conduites sur deux tailles de plot, 100 nanomètres de diamètre et 160 nanomètres de diamètre. L'objectif était de comparer l'influence de la taille des disques sur l'exaltation. La figure 5.6 A donne un aperçu de la formule chimique de la cyanine 3 ainsi que son spectre d'émission. La figure 5.6 B correspond aux disques de 100 nm de diamètre et la figure 5.6 C, aux disques de 160 nm. La première colonne des lignes B et C correspond aux spectres d'extinction expérimentaux des disques d'aluminium, avant fonctionnalisation, avec l'image de microscopie champs sombre incrustée. Ensuite, les graphiques suivants illustrent respectivement le spectre d'émission et le profil du temps de vie du fluorophore sur le disque. Il y a deux courbes de temps de vie, obtenues en modifiant les filtres ; associées chacune à une partie du spectre d'émission.

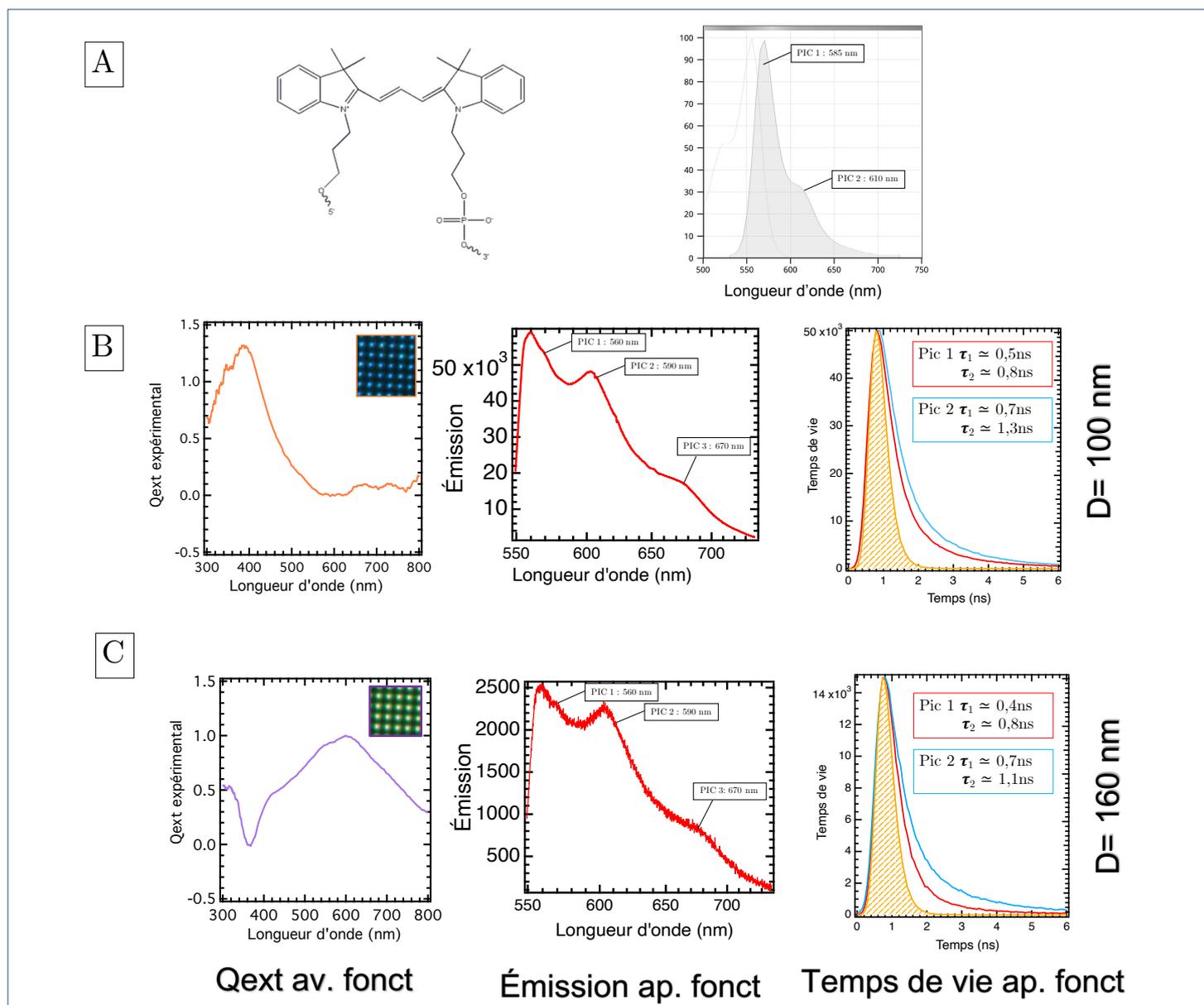


FIGURE 5.6 – Caractérisation optique du nano-capturer dans le visible. En A, formule et spectre d'émission de la sonde fluorescente, la cyanine 3. En B et C, mesures optiques sur deux tailles de disques d'aluminium, respectivement 100nm et 160nm. La première courbe correspond au spectre d'extinction du disque non fonctionnalisé, avec l'imagerie champs sombre. La deuxième courbe correspond au spectre émission et la troisième, aux temps de vie.

Tout comme dans le chapitre précédent sur l'étude d'un capteur MEF visible par la technique de FCS, les conclusions ne sont pas évidentes et définitives. Toutefois, nous démontrons qu'il existe

des observations similaires entre les deux expériences, bien que la sonde et la séquence d'ADN ait changé.

Si l'on se concentre sur les spectres d'émission, l'ajout du métal provoque un changement d'intensité dans la répartition des pics, un léger décalage vers le bleu, et l'apparition d'un troisième pic dans le rouge. Ces modifications démontrent qu'il y a des échanges électroniques qui modifient le comportement du fluorophore (comme vu dans le chapitre 4). En comparant les spectres d'un disque de 100 nanomètres à un disque de 160 nanomètres, on observe une grande différence d'intensité pour un même nombre de brin sur le plot. Les plots de 100 nanomètres provoquent une exaltation du signal de fluorescence supérieures au plot de 160 nanomètres. En se référant aux spectres d'extinction de la première colonne, nous pouvons émettre l'hypothèse que ce phénomène est dû à la qualité de la résonance plasmonique du disque. Le pic du disque de 100 nanomètres est étroit et recouvre une partie de la zone d'émission du fluorophore. En revanche, le profil pour le diamètre de 160 nm est plus large et recouvre davantage la zone d'émission. Cette taille de plot diffuse également plus. Le plus petit diamètre participerait alors de manière plus efficace à l'exaltation que celui de 160 nanomètres. Aussi, en se référant à la théorie du MEF décrite dans le chapitre 1 de ce manuscrit, il est possible que le plus petit plot participe à l'exaltation par la voie de l'absorption alors que le plot de plus grande taille serait dans la catégorie d'exaltation par échanges électroniques à hauts niveaux d'énergie.

Les spectres de temps de vie sont tracés dans la troisième colonne. L'aspect des courbes suggèrent un déclin multi-exponentiel associés à des temps de vie très courts (proche de l'IRF et proche de la nanoseconde). Les temps de vie du premier pic, centré sur 565 nm, sont compris entre $0,5 \pm 0,3$ nanosecondes et $0,8 \pm 0,6$ nanosecondes. Pour le second pic, la modélisation du profil donne des temps de vie compris entre $0,7 \pm 0,45$ nanosecondes et $1,3 \pm 0,54$ nanosecondes. Notons que la précision du montage est d'environ 0,5 nanosecondes et que les mesures ont été réalisées sur une dizaine de plots. Aussi, le temps de vie de la molécule de cyanine 3 est initialement très faibles, de l'ordre de la nanoseconde sur un brin d'ADN (cela dépend de la séquence utilisée [128]). Il est donc difficile de mesurer un temps de vie cohérent et d'émettre une conclusion définitive sur l'influence de la taille des plots. En revanche, il est possible d'admettre que le temps de vie varie légèrement en fonction du pic sélectionné. Sur toutes les mesures, il s'avère que le pic 1 est toujours associés à des temps de vie plus courts que le pic 2.

Les observations de cette expérience sont similaires à celles obtenues dans le chapitre précédent, lors de l'étude d'un capteur visible MEF en FCS. Pourtant, le fluorophore et la séquence ont été changés. Le spectre d'émission est fortement modifié et le temps de vie affiche un déclin multiexponentiel. Ces deux expériences tendent donc vers des conclusions identiques. Soit l'exaltation est dû à des échanges électroniques le long de la chaîne de l'ADN, soit c'est la plasmonique qui exalte la fluorescence. Pour connaître l'influence des deux hypothèses, il faut remonter à la quantification des transitions électroniques de la sonde. Dans cette configuration, c'est encore le fluorophore qui limite l'expérience.

Nous avons sélectionné la cyanine 3 pour être en cohérence avec les études réalisés par le laboratoire partenaire du projet, le LBP. La cyanine 3 et la cyanine 5 sont fréquemment utilisées en biologie [128]. Cependant, pour réaliser des expériences en MEF, la cyanine 3 n'est pas idéale. Son temps de vie est trop court et sa dégradation est rapide. Encore une fois, seule une expertise photo-physique et un plus grand nombre d'expériences pourront apporter davantage de données pour conclure.

Cette expérience permet de démontrer de l'exaltation dans le visible, même si les conditions expérimentales ne sont pas idéales. Pour poursuivre l'expérience et obtenir des données dans le domaine UV, il faut changer de sonde. L'objectif est donc d'utiliser cet échantillon en le reliant à la

sonde fluorescente ThG, pour poursuivre l'expérience et tendre vers le dispositif final du projet.

III Perspective du projet

Dans les sections précédentes, nous avons décrit le protocole de fabrication du capteur et les premiers tests de fonctionnement de celui-ci, dans le visible. L'objectif du projet est l'utilisation de ce capteur pour détecter des phénomènes d'épigénétique, notamment dans le domaine UV. Cependant, à la suite des nombreux développements préalables à l'utilisation du capteur, les mesures actuelles sont insuffisantes pour conclure. Cette partie aborde alors les perspectives du projet, entre les attentes des mesures du capteur jusqu'aux expériences qu'il reste à réaliser pour finir le développement. Le temps nécessaire restant est estimé à une année environ.

III.1 Mesure avec la ThG

Nous avons vu précédemment comment attacher de l'ADN à nos nanostructures en aluminium. Pour faire des mesures avec la ThG, il suffit d'appareiller le brin complémentaire qui contient la sonde, comme schématisé dans la figure 5.7. L'échantillon est ensuite placé sur un montage optique, utilisant la méthode TIRF pour Total Intern Reflexion Fluorescence en anglais. La source est une diode laser construite sur mesure émettant à 332 nanomètres. La publication de V. Kilin et al. [47] présente une première étude de la séquence d'ADN contenant la ThG et de l'effet de l'exclusion génétique sur la fluorescence. La figure 5.8 est extraite de cet article et montre comment l'intensité de la fluorescence varie lorsque la cytosine méthylée est exclue de l'ADN par l'action de la protéine SRA. Pour le capteur, nous nous attendons à obtenir le même type de profil, avec plus d'intensité et un meilleur rapport signal sur bruit.

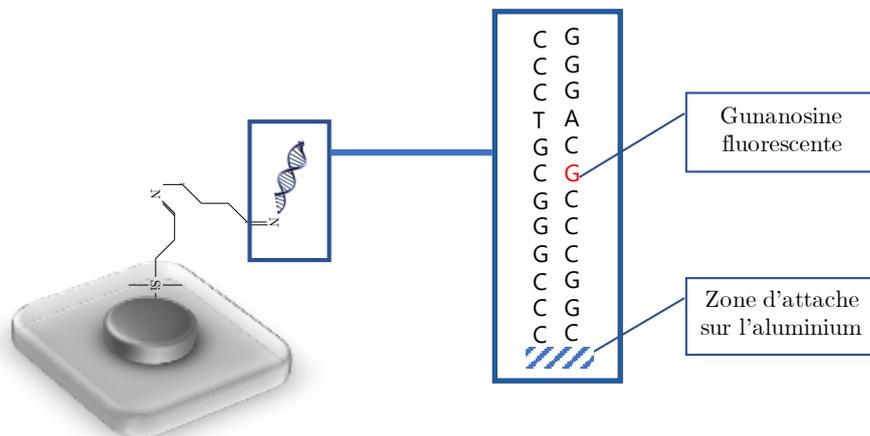


FIGURE 5.7 – Schéma du capteur avec le détail de la séquence d'ADN.

III.2 Fonctionnalisation en solution

Dans le chapitre 2, nous avons développé une synthèse de nanoparticules d'aluminium colloïdales, afin d'être directement en solution pour faciliter les expériences en biologie. Nous avons également dé-

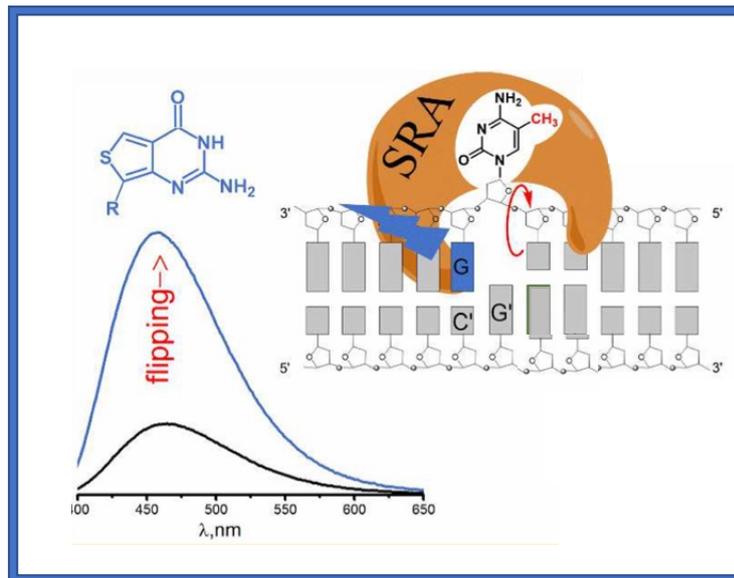


FIGURE 5.8 – Schématisation du fonctionnement du capteur à base de ThG. Lorsque la protéine SRA sort la cytosine méthylée de la structure de l'ADN, il y a augmentation de l'intensité de la fluorescence. Figure extraite de [47]

veloppé pour des lithographies d'aluminium, un protocole permettant de relier l'ADN à l'aluminium, par différentes étapes utilisant la chimie. Ce protocole devait être appliqué sur ces nanoparticules colloïdales, mais nous avons fait face à quelques défis techniques.

Premièrement la stabilité des nanoparticules en solution. Après la synthèse, les particules sont conservées dans l'éthanol et sont stables durant plus d'une année, comme le démontre la figure 5.9 A. En revanche, lorsque ces mêmes particules sont transférées dans de l'eau, ou notre tampon biologique acide à pH=5, il y a une agglomération rapide et une destruction partielle (figure 5.9 B). Cela provient de plusieurs facteurs : premièrement, les nanoparticules ne peuvent pas être stabilisées comme une lithographie ; deuxièmement, il ne semble pas y avoir de ligands en particulier autour des particules après notre protocole, donc aucune protection hormis la couche d'alumine.

Pour résoudre ce problème, il est nécessaire de modifier la surface des colloïdes. Dans la publication de D. Renard et al. [129], où la même constatation a été réalisée, ils ont choisi de recouvrir les nanoparticules d'aluminium d'une coque en silice. Lorsque l'épaisseur est contrôlée, il n'y a pas de modification majeure de la plasmonique, les particules conservent alors leurs propriétés optiques. De plus, la couche protège de la corrosion et permet le passage en solvant aqueux. Cependant, cette technique demande de revoir le protocole de fonctionnalisation, pour l'adapter à la silice et prendre en compte l'épaisseur supplémentaire qu'elle apporte au diamètre de la nanoparticule. Il est également possible de faire croître de l'or en surface de l'aluminium, comme dans les publications de S. Pande et al. [130] et G. Park et al. [131]. Avec cette technique, la réponse optique sera modifiée mais l'exaltation pourra hypothétiquement être amplifiée. En effet, le cœur aluminium va exalter l'absorption de la ThG tandis que l'or recouvrira la partie émission du spectre. Il faudra également adapter le protocole, en utilisant des thiols à la place des amines.

La seconde impasse est la purification des nanoparticules d'aluminium. Classiquement, lorsque l'on fonctionnalise des colloïdes, on réalise des centrifugations entre chaque étape pour éliminer les résidus. Or, l'aluminium est un matériau très peu dense, qui ne se centrifuge pas facilement, même en utilisant des gradients de solvants polaires ou des vitesses élevées. Nous avons alors imaginé une autre technique, utilisée normalement en biologie, la dialyse (figure 5.10). Composée d'une membrane

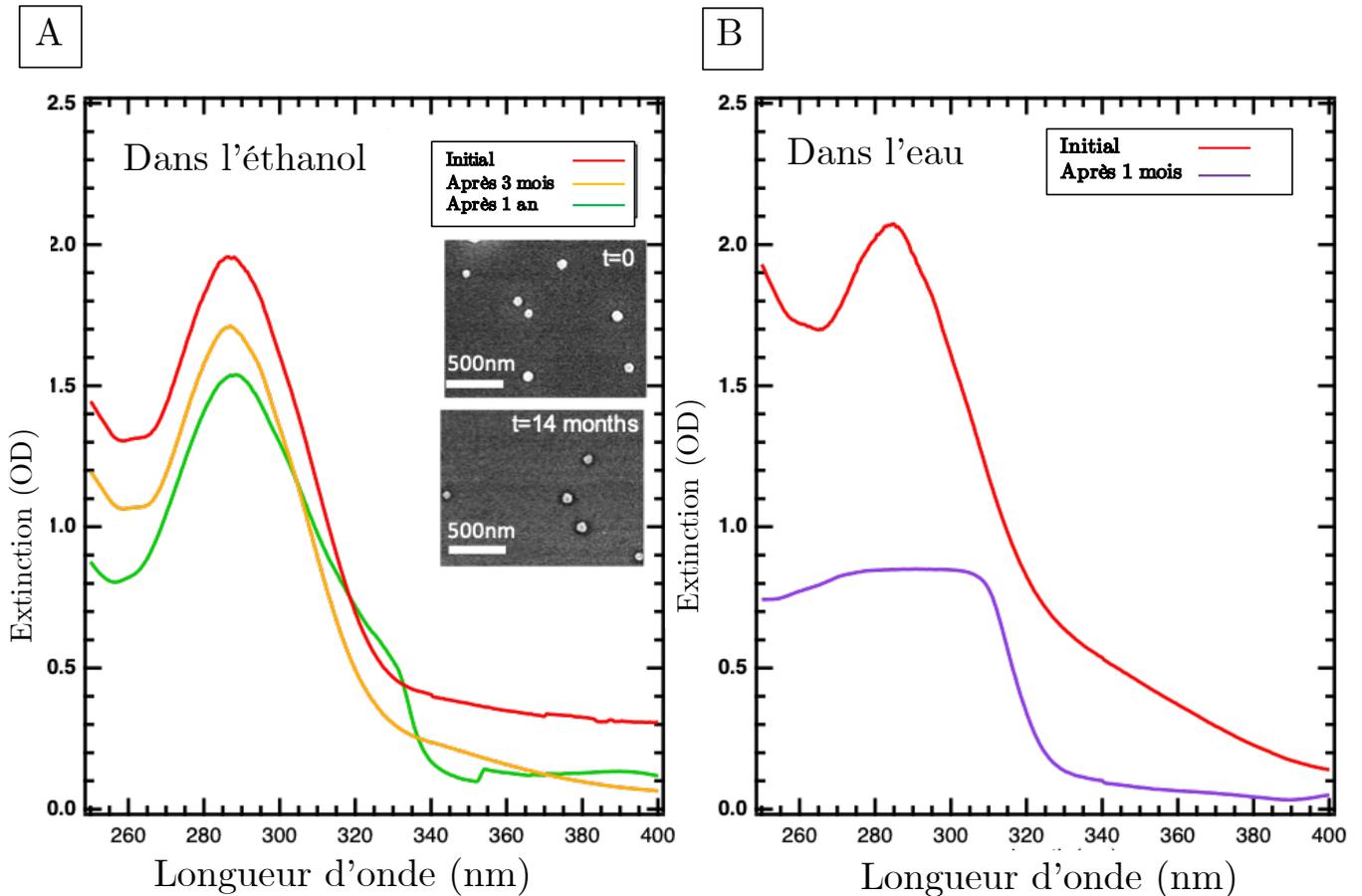


FIGURE 5.9 – Courbe d'extinction d'une solution colloïdale de nanoparticules d'aluminium, en A dans l'éthanol et en B, dans l'eau. L'éthanol en A permet de conserver une stabilité sur une année alors que l'eau, en B, provoque une agglomération rapide.

perméable, la dialyse permet de séparer les composants par taille avec la méthode de diffusion osmotique. Les nanoparticules d'aluminium resteraient à l'intérieur du tube membranaire et les composants n'ayant pas réagi passeraient à travers la membrane, dans le contenant externe. Le seul inconvénient de cette méthode est le temps de diffusion, qui est de 24 heures pour chacune des étapes. La dialyse ne stabilise pas les particules, en revanche cette technique peut permettre d'ajouter des ligands pour stabiliser les nanoparticules et permettre par la suite la fonctionnalisation.

III.3 Optimisation du capteur : perspectives

Dans l'objectif de maximiser l'efficacité d'un capteur, il est intéressant d'utiliser les techniques d'optimisation de la plasmonique. Sur lithographies, la forme des particules sur le substrat peut être modifiée. Par exemple, nous avons fabriqué des dimères, soit deux disques assez rapprochés, qui ont la capacité de créer un confinement du champ très localisé, au milieu des deux disques. Il est également envisageable de faire des triangles, pour avoir ici un confinement aux extrémités des pointes, comme le démontre la publication de R. Morarescu[132]. Pour que l'optimisation fonctionne, le brin d'ADN fluorescent doit se fixer sur les zones de confinement du champ, c'est-à-dire à l'intérieur du dimère ou l'extrémité des triangles. L'illustration de ces configurations sont présentées dans la figure 5.11 A et B. Pour obtenir un tel résultat, il faut soit miser sur la probabilité, en espérant que sur au moins

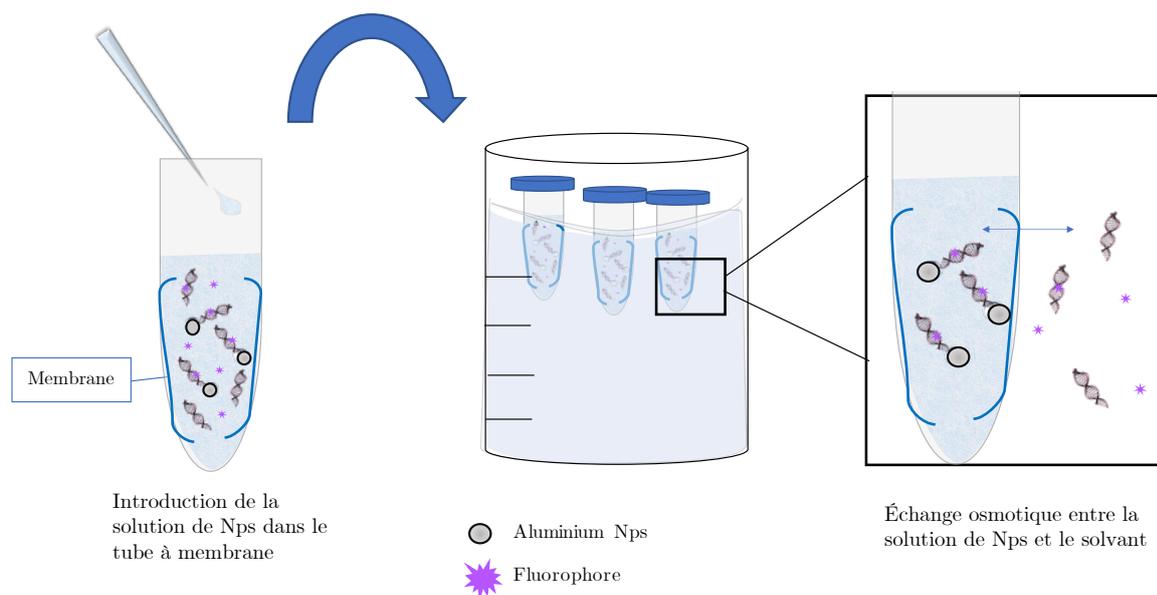


FIGURE 5.10 – Schéma du protocole de dialyse détournée pour la purification des nanoparticule d'aluminium lors de la fonctionnalisation

un des motifs, le brin d'ADN fluorescent se fixe à cet endroit. Soit, il faut modifier le protocole pour obtenir une fonctionnalisation localisée. Dans la publication de V. Nguyen et al. [133], des sels de diazonium sont utilisés pour la fonctionnalisation localisée. Sous l'excitation lumineuse, ils se fixent dans les zones de confinement du champ, soit à l'intérieur des dimers ou à l'extrémité des pointes des triangles. Ces molécules, de formule $R - N \equiv N^+$, peuvent présenter en bout de chaîne n'importe quel groupe fonctionnel. L'ADN pourra alors être attaché à la particule via ce groupe.

En solution, nous avons commencé à faire des modifications morphologiques des nanoparticules d'aluminium, notamment à l'aide de surfactants, comme présenté à la fin du chapitre 2. Cependant, la forme obtenue, octaédrique, n'est pas nécessairement favorable pour notre application. En revanche, il est possible d'imaginer la fabrication de dimères d'aluminium, reliés par l'ADN. Dans un précédent projet, nous avons réalisé des dimères d'or à base d'ADN, Il suffirait d'adapter le protocole pour l'aluminium (figure 5.11 C). Les dimères en solution sont tout aussi efficace que ceux sur substrat, mais ils possèdent un avantage supplémentaire sur le contrôle du gap entre les deux disques. En effet, en contrôlant la séquence d'ADN qui relie les deux nanoparticules, la longueur du gap est modifiable de manière très précise.

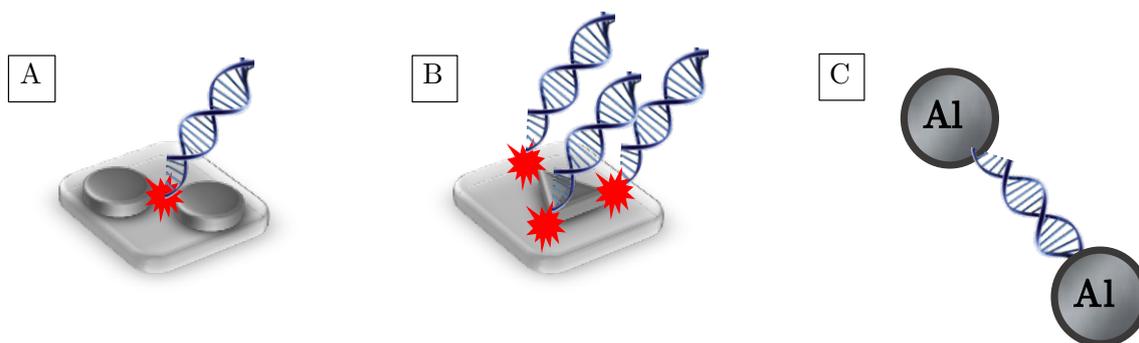


FIGURE 5.11 – Schéma du protocole de dialyse détournée pour la purification des nanoparticule d'aluminium lors de la fonctionnalisation

Conclusion

Ce manuscrit présente, à travers cinq chapitres, le développement de nano-capteurs épigénétiques amplifiés par la plasmonique UV.

Dans le premier chapitre, qui relie la nanotechnologie à la biologie, nous définissons l'épigénétique, un phénomène qui est à l'origine de modification dans la transcription de l'ADN. En fonction de nos modes de vie, l'environnement influe sur l'expression des gènes, et cela peut conduire à l'expression de maladies qui n'auraient pas été exprimées initialement. Cependant, il est difficile d'observer ces mécanismes. C'est ainsi que des termes tels que la fluorescence, la plasmonique ou encore le MEF ont été introduits. La fluorescence est apportée par des molécules capables d'émettre des photons sous excitation lumineuse, apportant ainsi un marquage visuel à l'ADN. La plasmonique est associée aux nanomatériaux qui de par leurs tailles, sont capables d'interagir avec la lumière et d'engendrer un phénomène de plasmon de surface localisée. Quant au MEF, c'est l'exaltation de la fluorescence par un métal, combinant les deux phénomènes précédemment définis. Ces techniques regroupées permettent de fabriquer un nano-capteur sensible pour l'épigénétique. Il est ici composé d'une nanoparticule d'aluminium, liée à un brin d'ADN contenant un fluorophore.

Au sein du deuxième chapitre, nous avons présenté un nouveau protocole permettant de fabriquer des nanoparticules d'aluminium colloïdales, qui sont utilisées pour le capteur. Ainsi, nous avons vu comment la sonochimie et la solvochimie transforment des feuillets d'aluminium commerciaux en précurseurs, puis en nanoparticules. Jusqu'alors absente de la littérature, la synthèse d'aluminium colloïdal permet ici de fabriquer des particules sphériques de 10 à 100 nm de diamètre, possédant des propriétés optiques dans l'UV. Ces objets ont besoin d'être étudiés dans le domaine UV, nous avons alors démontré, dans le chapitre 3, pas à pas, la construction d'un microscope confocal adapté à ce domaine. En effet, il n'y a que très peu d'optiques pour l'UV du fait des limitations techniques. Ce montage optique permet aujourd'hui non seulement d'atteindre des longueurs d'onde de détection de 250 nm à 600 nm mais aussi de mesurer des objets à l'échelle de la particule unique. Le chapitre 4 utilise la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) pour étudier le fonctionnement d'un nano-capteur dans le visible. Cet ensemble permet de mieux comprendre les phénomènes d'exaltation de la fluorescence par la plasmonique et notamment d'identifier les mécanismes photo-physiques à l'origine de cet effet. Enfin, le chapitre 5 est consacré à la fabrication et à la phase de test du capteur. Le protocole d'attache entre l'ADN et l'aluminium y est développé, en utilisant des protocoles de modification chimique de surface.

En plus des différentes étapes de construction des nano-capteurs, chacun des protocoles développés pour le projet ouvre la voie à d'autres projets de recherche. Le protocole de synthèse peut être détourné pour la fabrication d'autres nanoparticules métalliques. Nous avons ainsi récemment adaptés la technique pour fabriquer des nanoparticules d'Étain. Les nanoparticules d'aluminium sont également utiles dans tous les projets qui utilisent la plasmonique UV, ou encore pour fabriquer des biocarburants. En somme, toutes les techniques de microscopie utilisées peuvent être détournées, en

adaptant la source et les outils de détection à la cible.

Concernant le capteur, il reste encore quelques phases de test avant de pouvoir envisager d'aller vers une fabrication plus industrielle. Chacune des phases de conception a apporté son lot de questions et de défis techniques. Un travail supplémentaire est nécessaire sur la stabilisation de l'aluminium colloïdal en solvant aqueux. De plus, les phases de test avec la sonde ThG se poursuivent, avec des statistiques de reproductibilité. Dans la volonté de mieux comprendre le MEF, il est également intéressant de poursuivre des expériences de FCS, voir d'ajouter des expériences complémentaires et pouvoir ainsi apporter une conclusion plus définitive sur la contribution plasmonique du métal dans ce phénomène.

Le dénouement de ce projet prouve que le domaine des nano-capteur reste encore d'actualité. Les nanotechnologies apportent non seulement la possibilité de miniaturiser les capteurs, mais aussi d'augmenter la sensibilité de détection. Le large panel de matériaux et de sondes fluorescentes permet de varier les concepts et d'adapter la conception à chaque problématique.

Bibliographie

- [1] Friedrich C. Simmel and Wendy U. Dittmer. DNA Nanodevices. *Small*, 1(3) :284–299, March 2005.
- [2] Glenn A. Burley. DNA-Based Construction of Molecular Photonic Devices. In Eugen Stulz and Guido H. Clever, editors, *DNA in Supramolecular Chemistry and Nanotechnology*, pages 1–21. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, June 2017.
- [3] Jing Wen, Hao Shen, Yan-Rong Zhai, and Feng-Shou Zhang. Simulation of DNA in water/ethanol mixture. *Physica A : Statistical Mechanics and its Applications*, 450 :515–522, May 2016.
- [4] Rajeshwar P. Sinha and Donat-P. Häder. UV-induced DNA damage and repair : a review. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1(4) :225–236, April 2002.
- [5] Lilian T. C. França, Emanuel Carrilho, and Tarso B. L. Kist. A review of DNA sequencing techniques. *Quart. Rev. Biophys.*, 35(2) :169–200, May 2002.
- [6] Laurence Cattiaux. Gène sans gène. *FUNMOOC*.
- [7] Adrian Bird. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143) :396, 2007.
- [8] Chloe Chung Yi Wong, Avshalom Caspi, Benjamin Williams, Ian W Craig, Renate Houts, Antony Ambler, Terrie E Moffitt, and Jonathan Mill. A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics*, 5(6) :516–526, 2010.
- [9] M Rémi Métivier. Contrôle optique de la photoluminescence de nanosources hybrides. page 160.
- [10] Danuta Frackowiak. The Jablonski diagram. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 2(3) :399, 1988.
- [11] Pascale Winckler. *Spectroscopie de corrélation de fluorescence : fluidité membranaire et détection de molécule unique en solution concentrée*. PhD thesis, 2011. Thèse de doctorat dirigée par Jaffiol, Rodolphe Optique et nanotechnologies Troyes 2011.
- [12] Bernard Valeur. *Invitation à la fluorescence moléculaire*. De Boeck Supérieur, 2004.
- [13] Osamu Shimomura. Structure of the chromophore of aequorea green fluorescent protein. *FEBS letters*, 104(2) :220–222, 1979.
- [14] Alfons Penzkofer and W Leupacher. Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6g solutions. *Journal of luminescence*, 37(2) :61–72, 1987.
- [15] Florian M Zehentbauer, Claudia Moretto, Ryan Stephen, Thangavel Thevar, John R Gilchrist, Dubravka Pokrajac, Katherine L Richard, and Johannes Kiefer. Fluorescence spectroscopy of rhodamine 6g : Concentration and solvent effects. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121 :147–151, 2014.
- [16] Ewa M Goldys. *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. John Wiley & Sons, 2009.

- [17] Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6g and fluorescein in nine solvents : Improved absolute standards for quantum yields.
- [18] Sidney Udenfriend. *Fluorescence assay in biology and medicine*, volume 2. Academic Press, 2014.
- [19] Paul J Sammak and Gary G Borisy. Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature*, 332(6166) :724–726, 1988.
- [20] Chang-Deng Hu and Tom K Kerppola. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature biotechnology*, 21(5) :539–545, 2003.
- [21] Clémence Allain. *Sondes fluorescentes pour l'ADN : marquages covalent et non-covalent*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2006.
- [22] Stefan A. Maier. *Plasmonics : fundamentals and applications*. Springer, New York, 2007.
- [23] Lewi Tonks and Irving Langmuir. A general theory of the plasma of an arc. *Physical review*, 34(6) :876, 1929.
- [24] Silvère Schuermans. Contribution expérimentale à l'étude des propriétés optiques de Al, Ni et Au/Ni. page 147.
- [25] Julien Proust. Etude, caractérisation et optimisation expérimentales de nano-capteurs plasmoniques. page 169.
- [26] Stefan Enoch and Nicolas Bonod, editors. *Plasmonics : From Basics to Advanced Topics*, volume 167 of *Springer Series in Optical Sciences*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012.
- [27] Andreas Otto. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei*, 216(4) :398–410, 1968.
- [28] Erwin Kretschmann and Heinz Raether. Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 23(12) :2135–2136, 1968.
- [29] Craig F. Bohren and Donald R. Huffman. *Absorption and scattering of light by small particles*. Wiley-VCH, Weinheim, 2004. OCLC : 254937169.
- [30] Vincenzo Giannini, Antonio I Fernández-Domínguez, Susannah C Heck, and Stefan A Maier. Plasmonic nanoantennas : fundamentals and their use in controlling the radiative properties of nanoemitters. *Chemical reviews*, 111(6) :3888–3912, 2011.
- [31] KH Drexhage, H Kuhn, and FP Schäfer. Variation of the fluorescence decay time of a molecule in front of a mirror. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 72(2) :329–329, 1968.
- [32] WL Barnes. Fluorescence near interfaces : the role of photonic mode density. *journal of modern optics*, 45(4) :661–699, 1998.
- [33] Kadir Aslan, Ignacy Gryczynski, Joanna Malicka, Evgenia Matveeva, Joseph R Lakowicz, and Chris D Geddes. Metal-enhanced fluorescence : an emerging tool in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(1) :55–62, February 2005.
- [34] Chris D. Geddes. Metal-enhanced fluorescence. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(45) :19537, 2013.
- [35] Daniel Darvill, Anthony Centeno, and Fang Xie. Plasmonic fluorescence enhancement by metal nanostructures : shaping the future of bionanotechnology. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(38) :15709, 2013.
- [36] Ana M Gabudean, Monica Focsan, and Simion Astilean. Gold nanorods performing as dual-modal nanoprobe via metal-enhanced fluorescence (mef) and surface-enhanced raman scattering (sers). *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(22) :12240–12249, 2012.

- [37] Pierre Viste, Jérôme Plain, Rodolphe Jaffiol, Alexandre Vial, Pierre Michel Adam, and Pascal Royer. Enhancement and quenching regimes in metal- semiconductor hybrid optical nano-sources. *ACS nano*, 4(2) :759–764, 2010.
- [38] Ondrej Stranik, Robert Nooney, Colette McDonagh, and Brian D MacCraith. Optimization of nanoparticle size for plasmonic enhancement of fluorescence. *Plasmonics*, 2(1) :15–22, 2007.
- [39] Huaiyong Xing, Wenbo Bu, Shengjian Zhang, Xiangpeng Zheng, Ming Li, Feng Chen, Qianjun He, Liangping Zhou, Weijun Peng, Yanqing Hua, et al. Multifunctional nanoprobe for upconversion fluorescence, mr and ct trimodal imaging. *Biomaterials*, 33(4) :1079–1089, 2012.
- [40] Zhixue Zhou, Yan Du, and Shaojun Dong. Double-Strand DNA-Templated Formation of Copper Nanoparticles as Fluorescent Probe for Label-Free Aptamer Sensor. *Anal. Chem.*, 83(13) :5122–5127, July 2011.
- [41] Jian Zhang and Joseph R. Lakowicz. A Model for DNA Detection by Metal-Enhanced Fluorescence from Immobilized Silver Nanoparticles on Solid Substrate. *J. Phys. Chem. B*, 110(5) :2387–2392, February 2006.
- [42] Yeechi Chen, Keiko Munechika, and David S. Ginger. Dependence of Fluorescence Intensity on the Spectral Overlap between Fluorophores and Plasmon Resonant Single Silver Nanoparticles. *Nano Lett.*, 7(3) :690–696, March 2007.
- [43] Yunan Cheng, Tim Stakenborg, Pol Van Dorpe, Liesbet Lagae, Mang Wang, Hongzheng Chen, and Gustaaf Borghs. Fluorescence Near Gold Nanoparticles for DNA Sensing. *Anal. Chem.*, 83(4) :1307–1314, February 2011.
- [44] Joseph R Lakowicz, Ben Shen, Zygmunt Gryczynski, Sabato D’Auria, and Ignacy Gryczynski. Intrinsic fluorescence from dna can be enhanced by metallic particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5) :875–879, 2001.
- [45] Wang Xu, Ke Min Chan, and Eric T Kool. Fluorescent nucleobases as tools for studying dna and rna. *Nature chemistry*, 9(11) :1043–1055, 2017.
- [46] Marianna Sholokh, Roberto Improta, Mattia Mori, Rajhans Sharma, Cyril Kenfack, Dongwon Shin, Karine Voltz, Roland H Stote, Olga A Zaporozhets, Maurizio Botta, et al. Tautomers of a fluorescent g surrogate and their distinct photophysics provide additional information channels. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(28) :7974–7978, 2016.
- [47] Vasyl Kilin, Krishna Gavvala, Nicolas PF Barthes, Benoît Y Michel, Dongwon Shin, Christian Boudier, Olivier Mauffret, Valeriy Yashchuk, Marc Mousli, Marc Ruff, et al. Dynamics of methylated cytosine flipping by uhrf1. *Journal of the American Chemical Society*, 139(6) :2520–2528, 2017.
- [48] Davy Gérard and Stephen K Gray. Aluminium plasmonics. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 48(18) :184001, 2014.
- [49] Yael Gutierrez, Dolores Ortiz, Juan M Sanz, Jose M Saiz, Francisco Gonzalez, Henry O Everitt, and Fernando Moreno. How an oxide shell affects the ultraviolet plasmonic behavior of ga, mg, and al nanostructures. *Optics express*, 24(18) :20621–20631, 2016.
- [50] OA Rai, K Park, L Zhou, and MR Zachariah. Understanding the mechanism of aluminium nanoparticle oxidation. *Combustion theory and modelling*, 10(5) :843–859, 2006.
- [51] Jérôme Martin and Jérôme Plain. Fabrication of aluminium nanostructures for plasmonics. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 48(18) :184002, May 2015.
- [52] Jeffrey M. McMahon, George C. Schatz, and Stephen K. Gray. Plasmonics in the ultraviolet with the poor metals Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, and Bi. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(15) :5415–5423, 2013.

- [53] Wanbo Li, Kangning Ren, and Jianhua Zhou. Aluminum-based localized surface plasmon resonance for biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80 :486–494, June 2016.
- [54] Krishanu Ray, Mustafa H. Chowdhury, and Joseph R. Lakowicz. Aluminum Nanostructured Films as Substrates for Enhanced Fluorescence in the Ultraviolet-Blue Spectral Region. *Anal. Chem.*, 79(17) :6480–6487, September 2007.
- [55] Mustafa H. Chowdhury, Krishanu Ray, Stephen K. Gray, James Pond, and Joseph R. Lakowicz. Aluminum Nanoparticles as Substrates for Metal-Enhanced Fluorescence in the Ultraviolet for the Label-Free Detection of Biomolecules. *Anal. Chem.*, 81(4) :1397–1403, February 2009.
- [56] Nuriye Akbay, Joseph R. Lakowicz, and Krishanu Ray. Distance-Dependent Metal-Enhanced Intrinsic Fluorescence of Proteins Using Polyelectrolyte Layer-by-Layer Assembly and Aluminum Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 116(19) :10766–10773, May 2012.
- [57] Douglas Magde, Elliot Elson, and Watt W Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical review letters*, 29(11) :705, 1972.
- [58] Rudolf Rigler and Elliot S Elson. *Fluorescence correlation spectroscopy : theory and applications*, volume 65. Springer Science & Business Media, 2012.
- [59] Jerker Widengren, Rudolf Rigler, and Ülo Mets. Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of fluorescence*, 4(3) :255–258, 1994.
- [60] Jerker Widengren, Bob Terry, and Rudolf Rigler. Protonation kinetics of gfp and fitc investigated by fcs—aspects of the use of fluorescent indicators for measuring ph. *Chemical Physics*, 249(2-3) :259–271, 1999.
- [61] Daria M Shcherbakova, Mark A Hink, Linda Joosen, Theodorus WJ Gadella, and Vladislav V Verkhusa. An orange fluorescent protein with a large stokes shift for single-excitation multicolor fcs and fret imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 134(18) :7913–7923, 2012.
- [62] Marcel Leutenegger, Christian Ringemann, Theo Lasser, Stefan W Hell, and Christian Eggeling. Fluorescence correlation spectroscopy with a total internal reflection fluorescence sted microscope (tirf-sted-fcs). *Optics express*, 20(5) :5243–5263, 2012.
- [63] Hanane Moustauoui, Justine Saber, Ines Djeddi, Qiqian Liu, Dania Movia, Adriele Prina-Mello, Jolanda Spadavecchia, Marc Lamy de la Chapelle, and Nadia Djaker. A protein corona study by scattering correlation spectroscopy : a comparative study between spherical and urchin-shaped gold nanoparticles. *Nanoscale*, 11(8) :3665–3673, 2019.
- [64] Yu Tian, Michelle M. Martinez, and Dimitri Pappas. Fluorescence Correlation Spectroscopy : A Review of Biochemical and Microfluidic Applications. *Appl Spectrosc*, 65(4) :115–124, April 2011.
- [65] Michael Gösch, Hans Blom, Johan Holm, Toni Heino, and Rudolf Rigler. Hydrodynamic flow profiling in microchannel structures by single molecule fluorescence correlation spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 72(14) :3260–3265, 2000.
- [66] Pauline Maffre, Karin Nienhaus, Faheem Amin, Wolfgang J Parak, and G Ulrich Nienhaus. Characterization of protein adsorption onto FePt nanoparticles using dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2 :374–383, July 2011.
- [67] Saumyakanti Khatua, Haifeng Yuan, and Michel Orrit. Enhanced-fluorescence correlation spectroscopy at micro-molar dye concentration around a single gold nanorod. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17(33) :21127–21132, 2015.
- [68] Christophe Vieu, F Carcenac, A Pepin, Y Chen, M Mejias, A Lebib, L Manin-Ferlazzo, L Couraud, and H Launois. Electron beam lithography : resolution limits and applications. *Applied surface science*, 164(1-4) :111–117, 2000.

- [69] Alfredo Campos, Arnaud Arbouet, Jerome Martin, Davy Gerard, Julien Proust, Jerome Plain, and Mathieu Kociak. Plasmonic breathing and edge modes in aluminum nanotriangles. *ACS photonics*, 4(5) :1257–1263, 2017.
- [70] Mark W Knight, Nicholas S King, Lifei Liu, Henry O Everitt, Peter Nordlander, and Naomi J Halas. Aluminum for plasmonics. *ACS nano*, 8(1) :834–840, 2014.
- [71] Christoph Langhammer, Markus Schwind, Bengt Kasemo, and Igor Zorić. Localized Surface Plasmon Resonances in Aluminum Nanodisks. *Nano Lett.*, 8(5) :1461–1471, May 2008.
- [72] Feifei Zhang, Jérôme Martin, and Jérôme Plain. Long-term stability of plasmonic resonances sustained by evaporated aluminum nanostructures. *Opt. Mater. Express*, 9(1) :85, January 2019.
- [73] Víctor Canalejas-Tejero, Sonia Herranz, Alyssa Bellingham, María Cruz Moreno-Bondi, and Carlos Angulo Barrios. Passivated Aluminum Nanohole Arrays for Label-Free Biosensing Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6(2) :1005–1010, January 2014.
- [74] Herbert W Roesky and S Shraavan Kumar. Chemistry of aluminium (i). *Chemical communications*, (32) :4027–4038, 2005.
- [75] Arthur E Martell, Ramunas J Motekaitis, and Robert M Smith. Aluminium complexes of hydroxyaliphatic and hydroxyaromatic ligands in aqueous systems—some problems and solutions. *Polyhedron*, 9(2-3) :171–187, 1990.
- [76] John Turkevich, Peter Cooper Stevenson, and James Hillier. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11 :55–75, 1951.
- [77] Shaoyong Lu, Hua Yu, Samuel Gottheim, Huimin Gao, Christopher J DeSantis, Benjamin D Clark, Jian Yang, Christian R Jacobson, Zhongyuan Lu, Peter Nordlander, et al. Polymer-directed growth of plasmonic aluminum nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 140(45) :15412–15418, 2018.
- [78] Emmanuel Stratakis, Marios Barberoglou, Costas Fotakis, Guillaume Viau, Cecile Garcia, and Georgy A. Shafeev. Generation of Al nanoparticles via ablation of bulk Al in liquids with short laser pulses. *Opt. Express*, 17(15) :12650, July 2009.
- [79] Jean-Louis Luche. *Synthetic organic sonochemistry*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [80] FG Blake Jr. Bjerknes forces in stationary sound fields. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 21(5) :551–551, 1949.
- [81] C. Murali Krishna, Takashi Kondo, and Peter Riesz. Sonochemistry of alcohol-water mixtures. Spin-trapping evidence for thermal decomposition and isotope-exchange reactions. *J. Phys. Chem.*, 93(13) :5166–5172, June 1989.
- [82] James R McKee, Chris L Christman, William D O’Brien Jr, and Shih Yi Wang. Effects of ultrasound on nucleic acid bases. *Biochemistry*, 16(21) :4651–4654, 1977.
- [83] Kenneth S. Suslick, John J. Gawienowski, Paul F. Schubert, and Hau H. Wang. Alkane sonochemistry. *J. Phys. Chem.*, 87(13) :2299–2301, June 1983.
- [84] Cuncheng Li, Weiping Cai, Caixia Kan, Ganhua Fu, and Lide Zhang. Ultrasonic solvent induced morphological change of Au colloids. *Materials Letters*, 58(1-2) :196–199, January 2004.
- [85] Haitao Li, Xiaodie He, Yang Liu, Hui Huang, Suoyuan Lian, Shuit-Tong Lee, and Zhenhui Kang. One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties. *Carbon*, 49(2) :605–609, February 2011.
- [86] Canxia Kan, Weiping Cai, Cuncheng Li, Lide Zhang, and H Hofmeister. Ultrasonic synthesis and optical properties of Au/Pd bimetallic nanoparticles in ethylene glycol. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 36(13) :1609–1614, July 2003.

- [87] Aharon Gedanken. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(2) :47–55, April 2004.
- [88] Guang-Wu Yang and Hulin Li. Sonochemical synthesis of highly monodispersed and size controllable Ag nanoparticles in ethanol solution. *Materials Letters*, 62(14) :2189–2191, May 2008.
- [89] Jianping Lai, Wenxin Niu, Rafael Luque, and Guobao Xu. Solvothermal synthesis of metal nanocrystals and their applications. *Nano Today*, 10(2) :240–267, April 2015.
- [90] Hairong Yue, Yujun Zhao, Xinbin Ma, and Jinlong Gong. Ethylene glycol : properties, synthesis, and applications. *Chem. Soc. Rev.*, 41(11) :4218, 2012.
- [91] John David Hem and Charles Elmer Roberson. Form and stability of aluminum hydroxide complexes in dilute solution. Technical report, USGPO,, 1967.
- [92] Yi Shen, Megan Y Gee, and AB Greytak. Purification technologies for colloidal nanocrystals. *Chemical Communications*, 53(5) :827–841, 2017.
- [93] Ciceron Ayala-Orozco, Cordula Urban, Mark W Knight, Alexander Skyrme Urban, Oara Neumann, Sandra W Bishnoi, Shaunak Mukherjee, Amanda M Goodman, Heather Charron, Tamika Mitchell, et al. Au nanomaterials as efficient near-infrared photothermal transducers for cancer treatment : benchmarking against nanoshells. *ACS nano*, 8(6) :6372–6381, 2014.
- [94] Viktor Myroshnychenko, Jessica Rodríguez-Fernández, Isabel Pastoriza-Santos, Alison M Funston, Carolina Novo, Paul Mulvaney, Luis M Liz-Marzán, and F Javier García De Abajo. Modelling the optical response of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 37(9) :1792–1805, 2008.
- [95] FJ García De Abajo. Multiple scattering of radiation in clusters of dielectrics. *Physical review B*, 60(8) :6086, 1999.
- [96] Nikhil R Jana, Latha Gearheart, and Catherine J Murphy. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chemistry of materials*, 13(7) :2313–2322, 2001.
- [97] Martin Kearns. Development and applications of ultrafine aluminium powders. *Materials Science and Engineering : A*, 375-377 :120–126, July 2004.
- [98] W. K. Lewis, C. G. Rumchik, M. J. Smith, K. A. S. Fernando, C. A. Crouse, J. E. Spowart, E. A. Gulians, and C. E. Bunker. Comparison of post-detonation combustion in explosives incorporating aluminum nanoparticles : Influence of the passivation layer. *Journal of Applied Physics*, 113(4) :044907, January 2013.
- [99] Qingzhao Li, Ke Wang, Yuannan Zheng, Xiaoning Mei, and Baiquan Lin. Explosion severity of micro-sized aluminum dust and its flame propagation properties in 20 L spherical vessel. *Powder Technology*, 301 :1299–1308, November 2016.
- [100] Qibai Wu, Xialin Xie, Yaodong Wang, and Tony Roskilly. Effect of carbon coated aluminum nanoparticles as additive to biodiesel-diesel blends on performance and emission characteristics of diesel engine. *Applied Energy*, 221 :597–604, July 2018.
- [101] Jennifer L. Gottfried, Dylan K. Smith, Chi-Chin Wu, and Michelle L. Pantoya. Improving the Explosive Performance of Aluminum Nanoparticles with Aluminum Iodate Hexahydrate (AIH). *Sci Rep*, 8(1) :8036, December 2018.
- [102] Dmitri V. Talapin, Andrey L. Rogach, Andreas Kornowski, Markus Haase, and Horst Weller. Highly Luminescent Monodisperse CdSe and CdSe/ZnS Nanocrystals Synthesized in a Hexadecylamine-Trioctylphosphine Oxide-Trioctylphosphine Mixture. *Nano Lett.*, 1(4) :207–211, April 2001.
- [103] Y. Hou, H. Kondoh, T. Ohta, and S. Gao. Size-controlled synthesis of nickel nanoparticles. *Applied Surface Science*, 241(1-2) :218–222, February 2005.

- [104] Pranveer Singh. Spr biosensors : Historical perspectives and current challenges. *Sensors and actuators B : Chemical*, 229 :110–130, 2016.
- [105] Jie Zheng, Weimin Yang, Jingyu Wang, Jinfeng Zhu, Lihua Qian, and Zhilin Yang. An ultranarrow spr linewidth in the uv region for plasmonic sensing. *Nanoscale*, 11(9) :4061–4066, 2019.
- [106] V Prasad, D Semwogerere, and Eric R Weeks. Confocal microscopy of colloids. *J. Phys. : Condens. Matter*, 19(11) :113102, March 2007.
- [107] A. D. Dinsmore, Eric R. Weeks, Vikram Prasad, Andrew C. Levitt, and D. A. Weitz. Three-dimensional confocal microscopy of colloids. *Appl. Opt.*, 40(24) :4152, August 2001.
- [108] Sabine Klein, Svea Petersen, Ulrike Taylor, Detlef Rath, and Stephan Barcikowski. Quantitative visualization of colloidal and intracellular gold nanoparticles by confocal microscopy. *Journal of biomedical optics*, 15(3) :036015, 2010.
- [109] Nan Yao and Zhong Lin Wang, editors. *Handbook of microscopy for nanotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 2005.
- [110] Richard A Zsigmondy. Properties of colloids. *Nobel lecture*, 11, 1926.
- [111] Mickaël P Busson, Brice Rolly, Brian Stout, Nicolas Bonod, Jérôme Wenger, and Sébastien Bidault. Photonic engineering of hybrid metal–organic chromophores. *Angewandte Chemie*, 124(44) :11245–11249, 2012.
- [112] Jérôme Wenger, Pierre-François Lenne, Evgueni Popov, Hervé Rigneault, José Dintinger, and Thomas W. Ebbesen. Single molecule fluorescence in rectangular nano-apertures. *Opt. Express*, 13(18) :7035, 2005.
- [113] Pascale Winckler and Rodolphe Jaffiol. Multiphoton Cascade Absorption in Single Molecule Fluorescence Saturation Spectroscopy. *Anal. Chem.*, 85(9) :4735–4744, May 2013.
- [114] Christel M. Marian, Mihajlo Etinski, and Vidisha Rai-Constapel. Reverse Intersystem Crossing in Rhodamines by Near-Infrared Laser Excitation. *J. Phys. Chem. A*, 118(34) :6985–6990, August 2014.
- [115] Dani Setiawan, Andranik Kazaryan, Muhamad Abdulkadir Martoprawiro, and Michael Filatov. A first principles study of fluorescence quenching in rhodamine b dimers : how can quenching occur in dimeric species? *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 :11238–11244, 2010.
- [116] Christian Ringemann, Andreas Schönle, Arnold Giske, Claas von Middendorff, Stefan W. Hell, and Christian Eggeling. Enhancing Fluorescence Brightness : Effect of Reverse Intersystem Crossing Studied by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *ChemPhysChem*, 9(4) :612–624, March 2008.
- [117] Sébastien Bidault, Alexis Devilez, Vincent Maillard, Laurent Lermusiaux, Jean-Michel Guigner, Nicolas Bonod, and Jérôme Wenger. Picosecond Lifetimes with High Quantum Yields from Single-Photon-Emitting Colloidal Nanostructures at Room Temperature. *ACS Nano*, 10(4) :4806–4815, April 2016.
- [118] Kadir Aslan, Ignacy Gryczynski, Joanna Malicka, Evgenia Matveeva, Joseph R Lakowicz, and Chris D Geddes. Metal-enhanced fluorescence : an emerging tool in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(1) :55–62, February 2005.
- [119] Mickaël P. Busson, Brice Rolly, Brian Stout, Nicolas Bonod, Jérôme Wenger, and Sébastien Bidault. Photonic Engineering of Hybrid Metal-Organic Chromophores. *Angew. Chem.*, 124(44) :11245–11249, October 2012.
- [120] Zhijun Zhu, Peiyan Yuan, Shuang Li, Monalisa Garai, Minghui Hong, and Qing-Hua Xu. Plasmon-Enhanced Fluorescence in Coupled Nanostructures and Applications in DNA Detection. *ACS Appl. Bio Mater.*, 1(1) :118–124, July 2018.

- [121] Muhammad Akhyar Farrukh. *Functionalized nanomaterials*. BoD–Books on Demand, 2016.
- [122] Xiaoyang Xu, Nathaniel L Rosi, Yuhuang Wang, Fengwei Huo, and Chad A Mirkin. Asymmetric functionalization of gold nanoparticles with oligonucleotides. *Journal of the American Chemical Society*, 128(29) :9286–9287, 2006.
- [123] Simon Flink, Frank CJM Van Veggel, and David N Reinhoudt. Functionalization of self-assembled monolayers on glass and oxidized silicon wafers by surface reactions. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 14(7) :407–415, 2001.
- [124] Fabrice Séverac, Pierre Alphonse, Alain Estève, Aurélien Bancaud, and Carole Rossi. High-energy al/cuo nanocomposites obtained by dna-directed assembly. *Advanced Functional Materials*, 22(2) :323–329, 2012.
- [125] Zhanhu Guo, Tony Pereira, Oyoung Choi, Ying Wang, and H Thomas Hahn. Surface functionalized alumina nanoparticle filled polymeric nanocomposites with enhanced mechanical properties. *Journal of Materials Chemistry*, 16(27) :2800–2808, 2006.
- [126] Ivan Vlassiuk, Alexey Krasnoslobodtsev, Sergei Smirnov, and Markus Germann. “direct” detection and separation of dna using nanoporous alumina filters. *Langmuir*, 20(23) :9913–9915, 2004.
- [127] Alexander S Sharipov and Alexander M Starik. Theoretical study of the reactions of ethanol with aluminum and aluminum oxide. *The Journal of Physical Chemistry A*, 119(17) :3897–3904, 2015.
- [128] Billie Jo Harvey, Claudia Perez, and Marcia Levitus. Dna sequence-dependent enhancement of cy3 fluorescence. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(8) :1105–1110, 2009.
- [129] David Renard, Shu Tian, Minhan Lou, Oara Neumann, Jian Yang, Aaron Bayles, David Solti, Peter Nordlander, and Naomi J Halas. Uv-resonant al nanocrystals : Synthesis, silica coating, and broadband photothermal response. *Nano Letters*, 21(1) :536–542, 2020.
- [130] Surojit Pande, Sujit Kumar Ghosh, Snigdhamayee Praharaj, Sudipa Panigrahi, Soumen Basu, Subhra Jana, Anjali Pal, Tatsuya Tsukuda, and Tarasankar Pal. Synthesis of normal and inverted gold- silver core- shell architectures in β -cyclodextrin and their applications in sers. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(29) :10806–10813, 2007.
- [131] Garam Park, Chanhyoung Lee, Daeha Seo, and Hyunjoon Song. Full-color tuning of surface plasmon resonance by compositional variation of au@ ag core–shell nanocubes with sulfides. *Langmuir*, 28(24) :9003–9009, 2012.
- [132] Rodica Morarescu, Honghui Shen, Renaud AL Vallée, Bjorn Maes, Branko Kolaric, and Pascal Damman. Exploiting the localized surface plasmon modes in gold triangular nanoparticles for sensing applications. *Journal of Materials Chemistry*, 22(23) :11537–11542, 2012.
- [133] Van-Quynh Nguyen, Yong Ai, Pascal Martin, and Jean-Christophe Lacroix. Plasmon-induced nanolocalized reduction of diazonium salts. *ACS omega*, 2(5) :1947–1955, 2017.

Marion CASTILLA

Doctorat : Matériaux, Mécanique, Optique, Nanotechnologie

Année 2021

Développement de nano-capteurs épigénétiques amplifiés par la plasmonique UV

Cette thèse concerne le développement d'un nano-capteur à base de nanoparticules et d'ADN. L'objectif était de fabriquer un dispositif permettant de suivre les modifications épigénétiques de l'ADN, par exaltation de fluorescence, dans le domaine des ultraviolets. Dans un premier temps, une nouvelle synthèse de nanoparticule d'aluminium colloïdale a été réalisée, en utilisant la sonochimie et la solvochimie. Ces nanoparticules ont été caractérisées optiquement pour confirmer leurs propriétés plasmoniques UVs, à l'aide d'un microscope optique confocal, développé pour le projet. Enfin, un protocole de fonctionnalisation entre l'aluminium et l'ADN a été mis en place pour finaliser le capteur. En parallèle, des mesures de suivi d'exaltation de la fluorescence par un métal (MEF) ont été conduites, dans le visible, pour démontrer l'apport de la plasmonique dans les modifications des transitions électroniques du fluorophore. Pour cela, la technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) a notamment été utilisée. Ce projet ouvre la voie à de nouveaux projets de recherche, que ce soit en adaptant la nouvelle synthèse à d'autres métaux ou en changeant la fonction primaire du capteur.

Mots clés : nanoparticules – aluminium – biocapteurs – microscopie de fluorescence – plasmons.

Development of UV Plasmonic Nanosensors for Epigenetic Detection

This thesis is about the development of a nanosensor made of metallic nanoparticles and DNA. The target is the survey of DNA epigenetic by metal enhancement fluorescence detection in the range of UV. Firstly, colloidal aluminum nanoparticles were synthesized by a new method, mixing sonochemistry and solvochemistry. Secondly, an optical characterization was made by a homemade UV confocal microscope, to measure their plasmonic behaviors. Thirdly, the DNA was attached on the aluminum nanostructure to built the sensor. Finally, it was tested in the visible by fluorescent analysis. Moreover, fluorescence correlation spectroscopy measurements (FCS) were conducted on another visible sensor in order to understand the plasmonic contribution on the fluorescent probe. This project launches further projects, by using the new synthesis method for other materials or by changing the target of the sensor.

Keywords: nanoparticles – aluminium – biosensors – fluorescence microscopy – plasmons (physics).

Thèse réalisée en partenariat entre :



Ecole Doctorale "Sciences pour l'Ingénieur"