

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة فرحات عباس-سطيف 1  
Université Ferhat Abbas- Sétif 1

## THÈSE

Présentée à Institut d'Optique et de Mécanique de Précision pour l'obtention du

Diplôme de

**DOCTORAT 3<sup>ème</sup> Cycle LMD**

Domaine : Sciences et Technologies

Filière : Optique et Mécanique de Précision

Spécialité : Optique et photonique

Par

**ISSAAD Dahia**

## THÈME

*Etude et Simulation de la Distribution des Modes Lasers et leurs Interférences : Application en Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence*

**Soutenue le : 19 Novembre 2019**

**Devant le jury composé de**

<b>Président du jury</b>	AYADI Khaled	Prof	UFA Sétif 1
<b>Directrice de thèse</b>	MEDJAHED Aïcha	MCA	UFA Sétif 1
<b>Co-directrice de thèse</b>	DJAKER Nadia	MCA	U. Paris 13
<b>Examineur</b>	ZIANE Omar	Prof	USTHB Alger
<b>Examinatrice</b>	ABDI Djamila	Prof	UFA Sétif 1
<b>Invité</b>	LAMY DE LA CHAPELLE Marc	Prof	U. Paris 13

*« Ce n'est pas la fin. Ce n'est même pas le commencement de la fin. Mais, c'est peut-être la fin du commencement »*

***Winston churchill***

# REMERCIEMENTS

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été effectué au sein du Laboratoire d'Optique Appliquée (LOA) de l'Institut d'Optique et de Mécanique de Précision de l'Université Ferhat Abbas de Sétif-1 et du Laboratoire de Chimie, Structure et Propriétés des Biomatériaux et Agents Thérapeutiques (CSPBAT) de l'Université Paris 13. J'adresse donc mes sincères remerciements aux membres de ces deux laboratoires.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du programme bilatéral (PHC-Tassili) qui est porté et financé par le ministère français des Affaires étrangères et le Ministère de l'Enseignement Supérieur français d'une part et par le Ministère algérien de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait l'ensemble des membres du jury qui ont généreusement accepté d'évaluer et de juger l'ensemble du travail. De ce fait, j'adresse mes remerciements les plus sincères au Professeur K. AYADI (Université de Ferhat Abbas Sétif-1) d'avoir accepté de présider ce jury, et au Professeur O. ZIANE (Université Houari Boumediene d'Alger) et au Professeur D. ABDI (Université de Ferhat Abbas Sétif-1) d'avoir fait partie des membres examinateurs ainsi qu'au Professeur M. LAMY DE LA CHAPELLE (Université Paris 13) d'avoir répondu positivement à notre invitation.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes directrices de recherche Medjahed Aïcha et Djaker Nadia, sans qui ce travail n'aurait jamais été achevé avec succès. Cela dit, je leur demeure reconnaissante de m'avoir choisie pour ce projet et de m'avoir fait confiance. Je voudrais vous adresser un immense remerciement car vous avez fait preuve de patience, persévérance, rigueur et optimisme permanent. En ayant travaillé à vos côtés, j'ai beaucoup appris.

Un remerciement particulier au Professeur Mohamed Bouafia, chef de projet du côté algérien. Sans nul doute, il a mené ce projet avec une immense qualité d'écoute, et il a apporté son soutien sans épargner aucun effort ni conseil. Ma reconnaissance s'étend au professeur Marc Lamy de la Chapelle, chef de projet du côté français et responsable de l'équipe SBMB. Il m'a accueillie au sein de son équipe, et au cours de mes séjours je me suis sentie comme l'une des leurs.

Travailler au sein d'une équipe dynamique, dont la bonne ambiance a largement contribué à mon bien-être, était une véritable chance pour ma personne. Mon devoir aujourd'hui est d'adresser ces quelques mots qui ne suffiront pas à remercier assez toutes les personnes côtoyées au SBMB au cours de ces années, et avec lesquelles l'échange scientifique et culturel n'était pas des moindres. Mes remerciements s'étendent également à Raymond qui m'a initiée à l'univers de SERS et cela avec beaucoup de générosité scientifiques. Toujours au sein de ce groupe, il y a un électron libre et positif que je ne peux écarter. Une vive pensée à toi Inga pour ta bonne humeur, ta gentillesse et tes discussions philosophiques. Je remercie chaleureusement tous mes compagnons de l'équipe de thésards, postdocs et stagiaires pour tous les bons moments passés à vos côtés : Hannane, Celia, Inès, Justine, Fatima, Sadequa et Ryohei. À ceux qui ont fait partie de ma promotion, vous, Naima, Sara, Nour El Houda, Fouzia, Walid, Redouane, Moncef, Lazhar, étiez mes confrères, mes collègues et mes amis au même temps. Une partie de vos personnalités loge désormais en moi. Et pour vous tous, je prononce une prière sincère : 'Que tous vos rêves qu'ils soient scientifiques ou personnels deviennent une réalité !'

Il m'est impossible de continuer mes remerciements sans penser à mes amies, en particulier Mouna, Meriem et Samia, que l'adjectif intime ne saurait pas qualifier ; elles m'ont bien entourée et épaulée au cours de cette thèse.

À cette audience ici présente, il ne peut vous être un secret que sans famille, aucune réussite n'est permise. À partir de ce constat, je ne peux m'empêcher de me remémorer ceux avec qui j'ai grandi. Aujourd'hui, c'est grâce à vous mes frères ; Zohir, Nabil, Salim, Ilyes et Aghayas que je suis parvenue à aller au bout de mes études et arriver à la fin de ce travail.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à mes parents, vos prières me portent et me guident tous les jours. Peut-être ne comprenez-vous pas la totalité de mon travail, mais vous avez été la source de mon inspiration. À aucun moment, vous n'avez douté de moi. Je vous envoie un dessin en forme de cœur et vous dit merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Je dédie ce travail à mes très chers parents.

# Table des matières

Introduction générale.....	1
<b>I. Etat de l'art : L'apport de l'optique des faisceaux lasers en nanotechnologie</b>	
<b>Chapitre 1 : La distribution des modes lasers et leurs interférences en microscopie.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Introduction.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Les faisceaux lasers .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Principe .....	6
1.2.2 Propagations des faisceaux lasers .....	7
1.2.2.1 Les faisceaux Hermite-Gauss .....	7
1.2.2.2 Les faisceaux Laguerre-Gauss .....	8
1.2.2.3 Mode fondamental ou faisceau gaussien .....	9
<b>1.3 Interférences des faisceaux lasers .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Principe .....	11
1.3.2 Formalisme général des interférences à deux ondes .....	11
<b>1.4 Microscopie optique à fluorescence .....</b>	<b>13</b>
1.4.1 Limite de la résolution spatiale d'un microscope optique .....	13
1.4.2 Microscopie conventionnelle .....	15
1.4.3 Microscopie confocale.....	16
<b>1.5 Techniques de super-résolution en microscopie optique .....</b>	<b>17</b>
1.5.1 Réduction du volume d'excitation : Méthodes à un faisceau.....	17
1.5.1.1 Microscopie de fluorescence par réflexion totale : TIRF.....	18
1.5.1.2 Microscopie à feuille de lumière.....	19
1.5.2 Réduction du volume d'excitation : Méthodes à deux ou plusieurs faisceaux .....	19
1.5.2.1 Microscopie $4\pi$ .....	19
1.5.2.2 Microscopie par illumination structurée .....	20
1.5.2.3 Microscopie à déplétion par émission stimulée : STED .....	21
<b>1.6 Conclusion.....</b>	<b>22</b>
<b>Chapitre 2 : Les nanoparticules d'or en nanotechnologie.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Introduction .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Nanoparticules et nanomatériaux .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Les nanoparticules d'or et leurs propriétés .....	26
2.2.1.1 Les propriétés optiques des nanoparticules d'or .....	27
A) Bande plasmon de surface.....	27
B) Influence de la taille.....	27
C) Influence de la forme .....	28
D) Influence du milieu environnant .....	28
2.2.1.2 Les applications des nanoparticules d'or .....	28
<b>2.3 Diffusion Raman.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Diffusion Raman exaltée de surface (SERS).....</b>	<b>30</b>
2.4.1 Les paramètres influençant l'effet SERS .....	32
<b>2.5 Techniques de caractérisation des nanoparticules .....</b>	<b>33</b>
2.5.1 La spectroscopie UV-VIS.....	33
2.5.2 Caractérisation électrostatique (potentiel Zêta).....	34
2.5.3 La spectroscopie de corrélation .....	35

2.5.3.1 La diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	35
2.5.3.2 La spectroscopie de corrélation combinée au microscope confocal.....	36
<b>2.6 Conclusion .....</b>	<b>36</b>

## **Chapitre 3 : La spectroscopie de corrélation de fluorescence FCS.....37**

<b>3.1 Introduction .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 La fluorescence .....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Principe de la fluorescence .....	38
3.2.2 Propriétés des fluorophores .....	40
3.2.2.1 La durée de vie de la fluorescence .....	40
3.2.2.2 Le rendement quantique de la fluorescence.....	41
3.2.2.3 Le coefficient d'extinction.....	41
3.2.2.4 La photo-stabilité et l'extinction de fluorescence.....	41
<b>3.3 Théorie de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS).....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Principe de la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS).....	42
3.3.2 Aspect mathématique de la fonction de corrélation en FCS.....	44
3.3.3 Les paramètres accessibles par la fonction de corrélation en (FCS) .....	48
3.3.3.1 Concentration du fluorophore .....	48
3.3.3.2 Le rayon hydrodynamique .....	50
3.3.3.3 Aspects photophysiques des mesures FCS : état triplet.....	51
3.3.4 Les applications de la FCS .....	52
<b>3.4 Conclusion .....</b>	<b>53</b>

## **II. Modélisation et simulation numérique**

### **Chapitre 4 : Simulation numérique des modes lasers gaussiens et leurs interférences : amélioration de la résolution en microscopie confocale.....55**

<b>4.1 Introduction .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2 Modélisation de la fonction d'étalement du point (PSF) .....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Calcul de la fonction d'étalement du point (PSF) d'un microscope confocal.....	58
4.2.1.1 PSF d'un microscope confocal illuminé par un faisceau gaussien.....	59
4.2.1.2 Les principaux paramètres influençant la PSF d'un microscope confocal.....	60
A) Effet de la longueur d'onde sur la distribution de la PSF .....	61
B) Effet de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope sur la PSF.....	62
C) Effet du taux de remplissage de l'objectif de microscope sur la PSF .....	64
D) Etude des effets réfractifs sur la PSF en microscopie confocale.....	66
<b>4.3 Amélioration de la résolution par interférences des modes laser.....</b>	<b>70</b>
4.3.1 Interférences de deux faisceaux gaussiens .....	70
4.3.1.1 Effet du décalage entre les deux rayons de courbure .....	72
4.3.1.2 Superposition coaxiale de deux faisceaux gaussiens à travers un système optique convergent.....	75
A) Cas de deux faisceaux gaussiens avec des rayons de courbures égaux et opposés.....	77
B) Cas de deux faisceaux gaussiens avec un décalage positif entre les deux rayons de courbure.....	80
4.3.1.3 Effet de la phase de Gouy.....	82
<b>4.4 Conclusion .....</b>	<b>86</b>

### III. Réalisation du montage de spectroscopie de corrélation : Application à la caractérisation des nanoparticules d'or

<b>Chapitre 5 : Mise en place du système expérimental .....</b>	<b>88</b>
<b>5.1 Introduction .....</b>	<b>89</b>
<b>5.2 Le montage expérimental .....</b>	<b>89</b>
5.2.1 Source d'excitation.....	90
5.2.2 Le filtrage spectral.....	91
5.2.2.1 Filtrés d'excitation .....	91
5.2.2.2 Miroirs dichroïques .....	91
5.2.2.3 Filtrés d'émission.....	92
5.2.3 Le filtrage spatial .....	92
5.2.3.1 Télescope.....	92
5.2.3.2 Objectif de microscope .....	93
5.2.3.3 Trou confocal (Pinhole) .....	93
5.2.4 Acquisition des données .....	94
5.2.4.1 Photodiodes à avalanches (APD) .....	94
5.2.4.2 Corrélateur.....	95
<b>5.3 Caractérisation du montage de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS).....</b>	<b>96</b>
5.3.1 Détermination de la résolution optique du montage par la mesure de la PSF (Point Spread Function)...	97
5.3.2 Détermination de la résolution optique du montage par la technique FCS .....	99
5.3.2.1 Matière et méthode .....	100
5.3.2.2 Principe de mesure FCS .....	101
5.3.2.3 Comparaison entre les trois méthodes de détermination du volume effectif.....	105
5.3.3 Aspects photophysiques des mesures de FCS : état triplet .....	106
5.3.4 Les principaux paramètres influençant la résolution du montage FCS.....	109
5.3.4.1 Effet de la taille du trou confocal sur la mesure de la PSF.....	109
5.3.4.2 Effet de la taille du faisceau gaussien sur la mesure de la PSF.....	110
5.3.4.3 Effet de la modification du profil gaussien d'intensité de l'excitation sur la mesure de la PSF .....	114
<b>5.4 Etude des effets réfractifs en microscopie confocale de fluorescence .....</b>	<b>116</b>
Article du journal joint: Refractive effects of the Gaussian beam on the volume confinement for fluorescence correlation spectroscopy: Experimental and numerical study.....	117
<b>5.5 Conclusion .....</b>	<b>126</b>
<b>Chapitre 6 : Caractérisation des nanoparticules d'or par la spectroscopie de corrélation.....</b>	<b>127</b>
<b>6.1 Introduction .....</b>	<b>128</b>
<b>6.2 Etude des nanoparticules par la spectroscopie de corrélation.....</b>	<b>128</b>
<b>6.3 Matériels et méthodes.....</b>	<b>130</b>
<b>6.4 Résultat et discussions.....</b>	<b>132</b>
<b>6.5 Conclusion .....</b>	<b>135</b>
Article du journal joint: Scattering Correlation Spectroscopy and Raman Spectroscopy of Thiophenol on Gold Nanoparticles: Comparative Study between Nanospheres and Nanourchins.....	135
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>145</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>147</b>

# Table des figures

FIGURE. 1.1 – Section transversale des modes laser Hermite-Gauss [29].	8
FIGURE. 1.2 – Section transversale des modes laser Laguerre-Gauss [30].	9
FIGURE. 1.3 – Illustration de la distribution d'un faisceau gaussien avec ses principaux paramètres.	10
FIGURE. 1.4 – Description de l'ouverture numérique d'un objectif de microscope.	13
FIGURE. 1.5 – La relation entre le critère de Rayleigh, la FWHM et le waist, dans la description de la résolution.	15
FIGURE. 1.6 – Présentation des principales techniques de microscopie. a) La microscopie conventionnelle et b) la microscopie confocale [53].	16
FIGURE. 1.7 – Principe de la microscopie TIRF.	18
FIGURE. 1.8 – Principe de la microscopie à base de feuille de lumière.	19
FIGURE. 1.9 – Principe de la microscopie $4\pi$ [60].	20
FIGURE. 1.10 – Principe de la microscopie SIM [65].	21
FIGURE. 1.11 – Principe de fonctionnement de la microscopie STED [71].	22
FIGURE. 2.1 – Les différents types de nanoparticules [78].	25
FIGURE. 2.2 – Principe de l'effet plasmon de surface [93].	27
FIGURE. 2.3 – Les différentes formes des NPs d'or.	28
FIGURE. 2.4 – Principe de la spectroscopie Raman.	30
FIGURE. 2.5 – Comparaison entre un spectre Raman (vert) et un spectre SERS (noir) de la molécule Rhodamine 6G [125].	31
FIGURE. 2.6 – Principe de la diffusion Raman exaltée de surface SERS [127].	32
FIGURE. 2.7 – Spectres SERS de la Rhodamine 6G à différentes formes de NPs d'or [125].	33
FIGURE. 2.8 – Schéma de la double couche et du potentiel Zêta [144].	34
FIGURE. 3.1 – Diagramme de Jablonski [155].	39
FIGURE. 3.2 – Diagramme de Jablonski simplifié.	40
FIGURE. 3.3 – Spectre d'absorption et d'émission d'Alexa 532. Données obtenues auprès du fabricant [158].	42
FIGURE. 3.4 – Schéma illustrant le principe de la spectroscopie de corrélation de fluorescence [171].	44
FIGURE. 3.5 – Schéma montrant un exemple de la courbe de corrélation [178].	47
FIGURE. 3.6 – Schéma montrant le profil de la fonction de corrélation pour les différents types de diffusion [174].	48
FIGURE. 3.7 – Schéma montrant l'effet de la concentration sur la fonction de corrélation en FCS [159, 178].	49
FIGURE. 3.8 – Schéma montrant l'effet de la taille des molécule sur la fonction de corrélation [159, 178].	50
FIGURE. 3.9 – Diagramme de Jablonski présente le croisement inter-système entre les états singulet (S) et triplet (T).	51
FIGURE. 3.10 – Schéma montrant la fonction de corrélation avec l'état triplet [178].	52
FIGURE. 4.1 – Comparaison entre les PSFs normalisées d'un microscope conventionnel et d'un microscope confocal.	60
FIGURE. 4.2 – Représentation en 2D des PSFs pour différentes longueurs d'onde, a) distributions des intensités latérales et b) distributions des intensités axiales.	61
FIGURE. 4.3 – a) Les profils latéraux et b) les profils axiaux des PSFs pour différentes longueurs d'ondes.	62
FIGURE. 4.4 – Représentation en 2D des PSFs pour différentes ouvertures numériques, a) distributions des intensités latérales et b) distributions des intensités axiales.	63
FIGURE. 4.5 – Influence de l'ouverture numérique sur la PSF, a) profil d'intensité latérale et b) profil d'intensité axiale d'un microscope confocal.	63
FIGURE. 4.6 – Représentation en 2D de la PSF pour différentes valeurs du taux de remplissage $\beta$ , a) distributions des intensités latérales et b) distributions des intensités axiales.	65
FIGURE. 4.7 – Profils d'intensités normalisées en fonction du taux de remplissage, a) Evolution de la PSF dans la direction latérale et b) Evolution de la PSF dans la direction axiale.	65
FIGURE. 4.8 – Représentation schématique de la différence de la trajectoire des rayons lumineux à travers un objectif de microscope: (a) Partie conception et (b) Partie expérimentale.	68
FIGURE. 4.9 – a) Distribution d'intensité latérale en 2D (x,y) avec son profil , b) Distribution d'intensité axiale en 2D ( $\rho,z$ ) ainsi que son profil avec $R=200mm$ , $W_0=1mm$ et $\lambda=532nm$ .	71

FIGURE. 4.10 – Présentation des interférogrammes simulés et leurs profils d'intensité latéraux pour $R_1=200\text{mm}$ et $R_2$ variable.....	73
FIGURE. 4.11 – Profils de l'intensité axiale correspondant aux franges d'interférences de deux faisceaux gaussiens illustrant l'effet de la variation du rayon de courbure.....	75
FIGURE. 4.12 – Profil et distribution en 2D de l'intensité de l'interférence de deux faisceaux gaussiens.....	78
FIGURE. 4.13 – Distributions d'intensités latérales, (a) plan situé à $z=66\text{mm}$ , (b) plan situé sur le plan focal à $z=f=100\text{mm}$ et (c) plan situé $z=200\text{mm}$ .....	78
FIGURE. 4.14 – Profil et distribution en 2D de l'intensité latérale de l'effet du rayon de courbure sur la mise en forme d'un faisceau gaussien.....	79
FIGURE. 4.15 – Evolution de la distribution de l'intensité axiale de l'interférence de deux faisceaux gaussiens en fonction de la variation du décalage entre les deux rayons de courbure.....	80
FIGURE. 4.16 – (a) Interférences de deux faisceaux gaussiens polarisés suivant les axes x et en y avec des centres décalés d'une distance $2\Delta$ . (b) Les déphasages de Gouy associés aux deux faisceaux. (c) La différence des phases de Gouy [215].....	82
FIGURE. 4.17 – Comparaison entre les profils d'intensité d'un faisceau gaussien et celui de l'interférence de deux faisceaux gaussiens :(a) Profils latéraux (b) Profils axiaux.....	84
FIGURE. 4.18 – Représentation des profils d'intensité (a) latérale et (b) axiale pour différentes valeurs de $\Delta/z_R$ .....	85
FIGURE. 5.1 – Schéma du dispositif de la spectroscopie de corrélation de fluorescence FCS.....	90
FIGURE. 5.2 – Caractéristiques des filtres d'excitation : spectre de transmission tracé pour la gamme de longueur d'onde a) 300-650 nm pour le filtre d'excitation de 532 nm (ZET532/10x) et b) 500-750 nm pour le filtre d'excitation de 633 nm (HQ620/60x). (D'après : <a href="http://www.chroma.com">http://www.chroma.com</a> ).....	91
FIGURE. 5.3 – Caractéristiques des miroirs dichroïques : spectre de transmission tracé pour la gamme de longueur d'onde a) 300-650 nm pour le laser à 532 nm (ZT532rdc) et b) 500-750 nm pour le laser à 633 nm (z633rdc). (D'après: <a href="http://www.chroma.com">http://www.chroma.com</a> ).....	91
FIGURE. 5.4 – Caractéristiques des filtres d'émission : spectre de transmission tracé pour la gamme de longueur d'onde a) 300-650 nm pour le laser à 532 nm (ET575/50m) et b) 550-800 nm pour le laser à 633 nm (HQ665lp). (D'après : <a href="http://www.chroma.com">http://www.chroma.com</a> ).....	92
FIGURE. 5.5 – Schéma du collimateur optique.....	92
FIGURE. 5.6 – Description d'un objectif de microscope.....	93
FIGURE. 5.7 – Courbe de l'efficacité quantique de la photodiode à avalanche en fonction de la longueur d'onde (D'après : <a href="http://www.excelitas.com">http://www.excelitas.com</a> ).....	94
FIGURE. 5.8 – Photographie du dispositif expérimental.....	96
FIGURE. 5.9 – (a) Image par fluorescence d'une bille en Latex de 170 nm de diamètre, (b) les profils latéral et (c) axial normalisés de l'intensité de fluorescence sous une excitation à 633 nm.....	98
FIGURE. 5.10 – (a) Image de fluorescence d'une bille en Latex de 170 nm de diamètre, (b) les profils latéral et (c) axial normalisés de l'intensité de fluorescence avec une excitation à 532 nm.....	98
FIGURE. 5.11 – Spectres d'absorption normalisés de a) l'Alexa 647 et b) l'Alexa 532 mesurés par spectroscopie UV-Visible.....	100
FIGURE. 5.12 – Spectres d'absorption des solutions de différentes concentrations d'Alexa 647 obtenus par la spectroscopie UV-Visible.....	100
FIGURE. 5.13 – Enregistrement du signal de fluorescence de l'Alexa 647 en fonction du temps pour un seul détecteur.....	101
FIGURE. 5.14 – Les courbes de corrélation de solutions de différentes concentrations d'Alexa 647.....	102
FIGURE. 5.15 – Le nombre de molécules déterminé par FCS en fonction de la concentration des solutions fluorescentes d'Alexa 647.....	103
FIGURE. 5.16 – Les courbes de corrélation de solutions de différentes concentrations d'Alexa 532.....	104
FIGURE. 5.17 – Le nombre de molécules déterminé par FCS en fonction de la concentration des solutions fluorescentes d'Alexa 532.....	105
FIGURE. 5.18 – (a) La fonction de corrélation de l'Alexa 647 (50 nM) à différentes puissances d'excitation laser. (b) L'influence de la puissance sur le nombre moyen de molécules fluorescentes (N), (c) taux de comptage par molécule (CRM) en fonction de la puissance laser et (d) évolution du temps triplet en fonction de la puissance d'excitation.....	107

FIGURE. 5.19 – Profils de la PSF pour différents diamètres de trou confocal (20, 30 et 50 $\mu\text{m}$ ) mesurés sur des microsphères de 170 nm, avec une excitation $\lambda=532$ nm. Les valeurs expérimentales sont représentées par des cercles tandis que les ajustements gaussiens sont représentés par des lignes continues. ....	109
FIGURE. 5.20 – Troncation transversale du faisceau gaussien par utilisation d'un diaphragme variable. a) un faisceau exciteur remplissant complètement l'arrière de l'objectif et b) un faisceau exciteur diaphragmé. ....	111
FIGURE. 5.21 – Profils de la PSF en fonction du taux de remplissage de l'entrée de l'objectif de microscope, mesurés à $\lambda=532$ nm pour un trou confocal de 30 $\mu\text{m}$ de diamètre. Les croix représentent les points expérimentaux alors que les traits pleins les ajustements théoriques par une gaussienne. ....	112
FIGURE. 5.22 – Le faisceau gaussien est mis en forme par un filtre spatial. ....	114
FIGURE. 5.23 – (a) Image par fluorescence d'une bille en Latex de 170 nm de diamètre, (b) les profils latéral et (c) axial, normalisés de l'intensité de fluorescence sous une excitation à 532 nm. ....	115
FIGURE. 5.24 – Résultats expérimentaux et de simulation du volume effectif d'une bille de Latex 0.17 $\mu\text{m}$ de diamètre en fonction de l'indice de réfraction du milieu environnant. ....	117
FIGURE. 6.1– Interaction covalente (S-Au) entre la surface de la nanoparticule d'or et le thiophénol. ....	130
FIGURE. 6.2 – (a) Spectres d'extinction du NPS et (b) NPU après incubation dans des solutions de thiophénol à différentes concentrations (100 nM-1 M). ....	132
FIGURE. 6.3 – Les courbes SCS (cercles) et leurs ajustement correspondant (lignes pleines) pour les NPS incubées à différentes concentrations de solution de thiophénol. ....	133
FIGURE. 6.4 – Les courbes SCS (cercles) et leurs ajustement correspondant (lignes pleines) pour les NPU incubées à différentes concentrations de solution de thiophénol. ....	133

# Table des abréviations

## Abréviations

<i>EOD</i> :	<i>Eléments d'optique diffractive</i>
<i>PSF</i> :	<i>Fonction d'Étalement du Point (en anglais, Point Spread Function)</i>
<i>SIM</i> :	<i>Microscopie par illumination structurée (en anglais, Structured Illumination Microscopy)</i>
<i>SLM</i> :	<i>Modulateur spatial de lumière (en anglais, Spatial Light Modulator)</i>
<i>STED</i> :	<i>Déplétion par émission stimulée (en anglais, STimulated Emission Depletion)</i>
<i>TIRF</i> :	<i>Fluorescence par réflexion totale interne (en anglais, Total Internal Reflection Fluorescence)</i>
<i>FWHM</i> :	<i>Largeur à mi-hauteur (en anglais, Full Width at Half Maximum)</i>

## Symboles

$x, y$ :	<i>Coordonnées cartésiennes transversales</i>
$z$ :	<i>Coordonnée cartésienne longitudinale (axe optique du faisceau)</i>
$\rho, \varphi$ :	<i>Coordonnées cylindriques transversales dans la région focale</i>
$\lambda$ :	<i>Longueur d'onde</i>
$n$ :	<i>Indice de réfraction</i>
$k$ :	<i>Nombre d'onde</i>
$r$ :	<i>Vecteur position</i>
$E$ :	<i>Champ électrique du faisceau</i>
$E_i$ :	<i>Composante selon <math>i</math> du champ électrique</i>
$ON$ :	<i>Ouverture numérique</i>
$f$ :	<i>Longueur focale</i>
$R$ :	<i>Rayon de courbure de front d'onde du faisceau</i>
$z_R$ :	<i>Distance de Rayleigh</i>
$W$ :	<i>Taille du faisceau incident</i>
$W_0$ :	<i>Waist du faisceau incident</i>
$C$ :	<i>Concentration locale en fluorophores</i>
$J_n(\cdot)$ :	<i>Fonction de Bessel de première espèce d'ordre <math>n</math></i>
$H_n(\cdot)$ :	<i>Polynôme d'Hermite de degré <math>n</math></i>

# Introduction générale

Le développement des outils de pointe pour la caractérisation des nano-objets a été un axe de recherche majeur durant ces dix dernières années. Récemment, l'utilisation des nanoparticules métalliques connaît une forte hausse dans divers domaines et leurs caractéristiques doivent être correctement contrôlées. L'étude de leurs propriétés physico-chimiques et leurs interactions dans leur environnement local constitue l'un des domaines les plus actifs dans le cas des applications biologiques et médicales. Jusqu'à présent, le seul outil de caractérisation non destructif prodigué par les scientifiques est bien la lumière, particulièrement la lumière laser. Depuis sa création, elle conduit à l'essor d'une instrumentation optique plus performante et variée permettant d'exploiter et d'agir sur un objet infiniment petit à l'échelle du micron et même en dessous.

Dans ce contexte, la technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS, fluorescence correlation spectroscopy) est bien adaptée pour caractériser la dynamique de processus moléculaires dans des milieux peu concentrés. Elle est basée sur l'analyse des fluctuations du signal de fluorescence émise par les molécules ou particules provenant d'un volume d'observation de l'ordre du femtolitre. Ce volume est défini par les paramètres du faisceau laser et du microscope confocal. Cependant, la taille minimale du volume d'excitation est limitée par les lois imposées par la diffraction. Nous sommes partis de l'idée que réduire le volume d'excitation et améliorer le pouvoir de résolution passait nécessairement par une nouvelle technique de structuration de l'intensité du faisceau laser. Les interférences sont connues par leur pouvoir de mettre en forme les distributions d'intensité des faisceaux. Il s'agit donc de concevoir d'autres instruments permettant d'exploiter ce phénomène. Le travail principal de cette thèse est de développer différentes approches de modélisation et de simulation numérique dont l'objectif est de proposer d'autres distributions d'excitation afin d'augmenter la résolution.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire d'Optique Appliquée (LOA) de l'Institut d'Optique et de Mécanique de Précision de l'Université Ferhat Abbas de Sétif-1 et l'Equipe de Spectroscopie des Biomolécules et Milieux Biologiques (SBMB) du Laboratoire de Chimie, Structure et Propriétés des Biomatériaux et Agents Thérapeutiques (CSPBAT) de l'Université Paris 13. Ce partenariat se définit comme un accord-programme de coopération interuniversitaire franco-algérienne (TASSILI).

La motivation de ce regroupement est de développer et d'optimiser les modèles de faisceaux lasers ainsi que leurs interférences pour améliorer la résolution de la microscopie confocale associée à la spectroscopie de corrélation. L'étude se focalise sur la caractérisation des nanoparticules d'or et leurs interactions avec les molécules.

L'ensemble de ce manuscrit est présenté en trois parties. La première partie est un état de l'art divisé en trois chapitres. Le premier chapitre s'attache à rassembler la théorie des faisceaux lasers ainsi que les phénomènes liés à leurs interférences. Il évoque aussi les applications des faisceaux lasers dans les systèmes optiques modernes telles que les techniques d'imagerie à super résolution en microscopie optique. Le deuxième chapitre s'intéresse aux nano-objets notamment les nanoparticules d'or et leurs propriétés. Il expose également les différentes techniques utilisées pour l'étude et la caractérisation de ces nanoparticules. Le troisième chapitre est consacré à la théorie de la fluorescence et les principes physiques de la technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) ainsi que ses applications.

La deuxième partie, présentée dans le quatrième chapitre, est réservée aux études numériques sous environnement Matlab. Elle consacre une partie à la modélisation de la fonction d'étalement du point (PSF) de la microscopie confocale et les différentes sources de dégradations. D'autre part, une étude des interférences des modes laser gaussiens est réalisée afin d'améliorer la résolution et de modifier la distribution de l'intensité au plan focal d'un système optique.

La troisième partie est une étude expérimentale devisée en deux chapitres. Le cinquième chapitre présente une description de l'alignement du dispositif expérimental de la FCS et sa caractérisation spatiale, dont une discussion de résultats expérimentaux est détaillée. Le sixième chapitre est consacré à l'application innovante de la spectroscopie de corrélation afin d'étudier les nanoparticules d'or.

À la fin de ce document, une conclusion générale regroupe l'ensemble de ces travaux de recherche et suggère quelques perspectives d'étude.

*Première partie*  
*Etat de l'art*

L'apport de l'optique des faisceaux lasers en  
nanotechnologie

# Chapitre 1

## La distribution des modes lasers et leurs interférences en microscopie

### Sommaire

---

<b>1.1 Introduction.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Les faisceaux lasers .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Principe .....	6
1.2.2 Propagations des faisceaux lasers .....	7
1.2.2.1 Les faisceaux Hermite-Gauss.....	7
1.2.2.2 Les faisceaux Laguerre-Gauss .....	8
1.2.2.3 Mode fondamental ou faisceau gaussien.....	9
<b>1.3 Interférences des faisceaux lasers .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Principe .....	11
1.3.2 Formalisme général des interférences à deux ondes .....	11
<b>1.4 Microscopie optique à fluorescence.....</b>	<b>13</b>
1.4.1 Limite de la résolution spatiale d'un microscope optique.....	13
1.4.2 Microscopie conventionnelle.....	15
1.4.3 Microscopie confocale.....	16
<b>1.5 Techniques de super-résolution en microscopie optique.....</b>	<b>17</b>
1.5.1 Réduction du volume d'excitation : Méthodes à un faisceau.....	17
1.5.1.1 Microscopie de fluorescence par réflexion totale : TIRF.....	18
1.5.1.2 Microscopie à feuille de lumière.....	19
1.5.2 Réduction du volume d'excitation : Méthodes à deux ou plusieurs faisceaux.....	19
1.5.2.1 Microscopie $4\pi$ .....	19
1.5.2.2 Microscopie par illumination structurée .....	20
1.5.2.3 Microscopie à déplétion par émission stimulée : STED .....	21
<b>1.6 Conclusion.....</b>	<b>22</b>

---

## 1.1 Introduction

Les travaux du prix Nobel de Bassov, Prokhorov et Townes ont frayé la voie à la conception de générateurs de rayonnement optique cohérent. Ce n'est qu'au début des années soixante que le LASER, acronyme signifiant «Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation», susceptible de fonctionner pour la première fois a pu être mis en évidence par Maiman [1]. Jusqu'à présent, le laser a occupé une place d'une grande importance dans le vaste champ de la recherche fondamentale à la recherche appliquée. Parmi les caractéristiques frappantes qui ont valu au laser l'attention universelle en premier lieu est la tache focale. Les utilisateurs de lasers ont en général souhaité disposer d'un faisceau laser le plus apte possible à générer de petites taches focales réduites à l'extrême. Ceci a fait l'objet d'innombrables sujets de recherche notamment sur les différentes méthodes permettant d'agir sur les caractéristiques spatiales de la distribution d'intensité des faisceaux lasers [2, 3].

Le microscope optique éclairé par le faisceau laser joue un rôle majeur dans les sciences et technologies modernes et son application est devenue de plus en plus croissante ces dernières années. La performance optique de ce microscope est déterminée par les résolutions transversales et axiales qui sont régies par le phénomène de diffraction. Les enjeux sont donc de concevoir des montages optiques les plus efficaces possibles qui assurent la focalisation du faisceau dans des petits volumes afin de parvenir à une résolution spatiale maximale et affranchir la limite de diffraction. L'amélioration de la résolution au-delà des limites conventionnelles est susceptible d'avoir un grand impact sur une grande variété d'applications. De ce fait, différentes approches dans le domaine de l'optique ont été mises en œuvre via deux paradigmes majeurs ; la diffraction et les interférences.

Ces recherches ont commencé par l'étude des faisceaux gaussiens, dont les distributions d'intensité axiales et latérales ainsi que leurs mise en forme ont été améliorées par l'utilisation des éléments d'optique diffractifs (EODs) simples telles que les ouvertures d'amplitude et de phase [4, 5]. D'autres recherches ont été effectuées pour améliorer la résolution au point de focalisation [6, 7] par la transformation du mode gaussien fondamental ( $TEM_{00}$ ) en modes supérieurs, Laguerre gauss (LG) et Hermite gauss (HG), ou l'inverse en utilisant des (EODs) plus complexes telles que les éléments de phase binaire [8, 9]. Récemment, plusieurs éléments divers ont été développés pour structurer la distribution d'intensité des faisceaux laser, comme l'utilisation des axicons qui ont permis la génération des faisceaux Bessel non-diffractants [10, 11].

Un autre moyen jugé efficace pour structurer et mettre en forme les taches focales est le phénomène d'interférence. Ce dernier a incité plusieurs groupes de recherche à travailler pour générer et modifier la distribution de l'intensité des faisceaux lasers tout en offrant des formes très importantes applicables dans plusieurs domaines, tels que :

- Le vortex optique [12, 13] est caractérisé par une zone sombre qui est entourée d'une zone d'intensité plus élevée dans les trois directions afin de piéger les particules ayant un indice de réfraction inférieur au milieu environnant. Ainsi, capturer les atomes froids au centre du vortex est un procédé qui a comme objectif de leurs éviter de subir un chauffage [14, 15].
- La génération des pinces optiques (Optical tweezers en anglais) qui peuvent être utilisées en biologie pour déplacer les objets nanométriques [16].
- L'obtention d'un point focal ayant une taille inférieure à celle d'un faisceau gaussien par l'interférence de deux faisceaux gaussiens [17]. L'exemple le plus marquant se nomme la microscopie  $4\pi$ , qui a permis l'apparition d'une nouvelle ère de microscope à hyper-résolution. Avec seulement l'interférence de deux faisceaux, cette dernière parvient à atteindre une résolution de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres [18].

Ce premier chapitre est consacré à la théorie des faisceaux lasers, nous définissons les expressions, les propriétés mathématiques et physiques des faisceaux gaussiens ainsi que le principe de leurs interférences. Ensuite, nous nous intéresserons plus précisément à l'étude de la microscopie optique à base du laser, où nous passerons en revue les principales techniques de super-résolution en structurant l'intensité des faisceaux lumineux.

## **1.2 Les faisceaux lasers**

### **1.2.1 Principe**

Le laser est un dispositif constitué d'un milieu actif qui contient des atomes ou des molécules dans un état excité (à cause du pompage optique). Ces derniers se désexcitent au passage d'une onde lumineuse de fréquence appropriée par émission stimulée ou induite [19]. Le milieu actif est placé dans une cavité optique résonnante qui permet à la fois, d'augmenter considérablement l'effet amplificateur par les multiples passages de l'onde lumineuse dans le milieu actif [20, 21] et d'augmenter la sélectivité spectrale du dispositif [22].

Dans ce travail, nous n'aborderons pas le milieu amplificateur et le système de pompage, nous nous focalisons simplement sur les faisceaux lasers sortant de la cavité.

## 1.2.2 Propagations des faisceaux lasers

La propagation des faisceaux lasers est régie par les équations de Maxwell [23]. Ces dernières consistent en principe à examiner séparément les différentes composantes transversales du champ électrique ou magnétique et à les considérer comme indépendantes l'une de l'autre.

L'amplitude complexe du champ électrique d'un faisceau  $E(r, z)$  est alors une solution de l'équation d'onde paraxiale qui prend la forme suivante :

$$\nabla^2 E(r, z) - 2ik \frac{\partial E(r, z)}{\partial z} = 0 \quad (1.1)$$

avec :  $r=(x, y)$  est le vecteur position et  $k$  : est le nombre d'onde.

L'équation (1.1) présente plusieurs solutions qui vérifient les conditions aux limites décrivant le faisceau laser. Ces solutions peuvent être regroupées dans deux grandes familles : l'une est obtenue par la méthode de séparation de variables en coordonnées cartésiennes et l'autre en coordonnées cylindriques [24].

### 1.2.2.1 Les faisceaux Hermite-Gauss

Les faisceaux Hermite-Gauss représentent les solutions obtenues par la méthode de séparation de variables en coordonnées cartésiennes possédant les symétries axiales [19, 21]. Ces faisceaux s'expriment sous la forme suivante :

$$E_{m,n}(x, y, z) = \frac{W_0}{W(z)} H_m \left( \frac{\sqrt{2}x}{W(z)} \right) H_n \left( \frac{\sqrt{2}y}{W(z)} \right) \exp \left[ -\frac{x^2 + y^2}{W(z)} \right] \exp \left[ -ik \frac{x^2 + y^2}{2R(z)} \right] \times \exp \left[ ik(m+n+1)\phi(z) \right] \quad (1.2)$$

où,  $W_0$  est la taille minimale du faisceau qu'on appelle aussi waist,  $W(z)$  est la largeur du faisceau à la distance de propagation  $z$ . Les ordres ( $m$  et  $n$ ) correspondent aux nombres de zéros de l'amplitude dans les directions transverses  $x$  et  $y$ .  $\phi(z)$  et  $R(z)$  sont respectivement la phase et le rayon de courbure du front d'onde.

$H_m$  est le polynôme d'Hermite d'ordre  $m$ , définit par :

$$\begin{aligned} H_0 &= 1, \\ H_1 &= 2x, \\ H_2 &= 4x^2 - 2 \end{aligned} \quad (1.3)$$

En utilisant la formule de récurrence suivante :

$$H_{n+1}(x) = 2xH_n(x) - 2nH_{n-1}(x) \quad (1.4)$$

On peut développer les polynômes d'Hermite selon la série ci-dessous :

$$H_n(x) = n! \sum_{s=0}^{n/2} (-1)^s \frac{(2x)^{n-2s}}{(n-2s)!s!} \quad (1.5)$$

Une représentation spatiale de la répartition de l'intensité lumineuse, pour les faisceaux Hermite-Gauss dans le plan transverse à la direction de propagation, est illustrée sur la figure. 1.1.

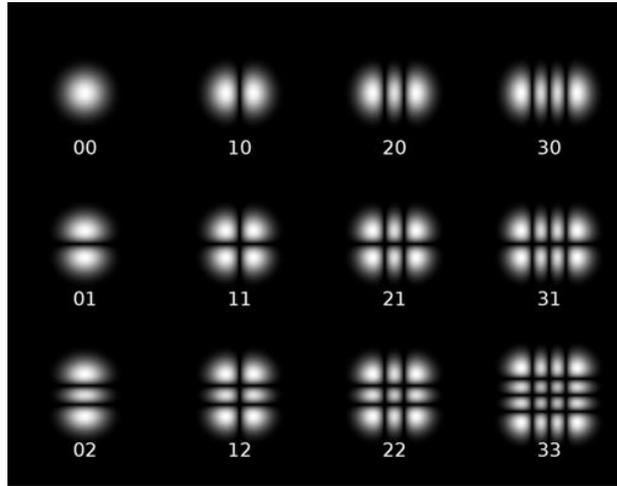


FIGURE. 1.1 – Section transversale des modes laser Hermite-Gauss [25].

### 1.2.2.2 Les faisceaux Laguerre-Gauss

Les faisceaux Laguerre-Gauss représentent l'autre solution de l'équation d'onde paraxiale obtenue par la méthode de séparation de variables en coordonnées cylindriques. L'équation mathématique que prennent ces faisceaux est donnée par la forme suivante [19, 21]:

$$E_{p,l}(\rho, \theta) = E_0 \left( \frac{\sqrt{2}\rho}{W_0} \right)^l L_p^l \left( \frac{2\rho^2}{W_0^2} \right) \exp \left[ -\frac{\rho^2}{W^2} \right] \exp(il\theta) \quad (1.6)$$

où,  $E_0$  est une constante complexe et  $W_0$  est le waist du faisceau. Les indices ( $p$  et  $l$ ) représentent l'ordre radial et l'ordre azimutal respectivement.

$L_p^l(2\rho^2/W_0^2)$  est le polynôme généralisé de Laguerre d'ordre ( $p$  et  $l$ ) qui est aussi défini de la manière suivante :

$$L_p^{(l)}(x) = \frac{x^{-l} e^x}{p!} \frac{d^p}{dx^p} (e^{-x} x^{p+l}) \quad (1.7)$$

Les relations entre les coordonnées cylindriques et cartésiennes sont définies par :  $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$  et  $\theta = \tan^{-1}(y/x)$ .

Une représentation spatiale de la répartition de l'intensité lumineuse des modes Laguerre-Gauss dans le plan transverse à la direction de propagation est illustrée dans la figure. 1.2.

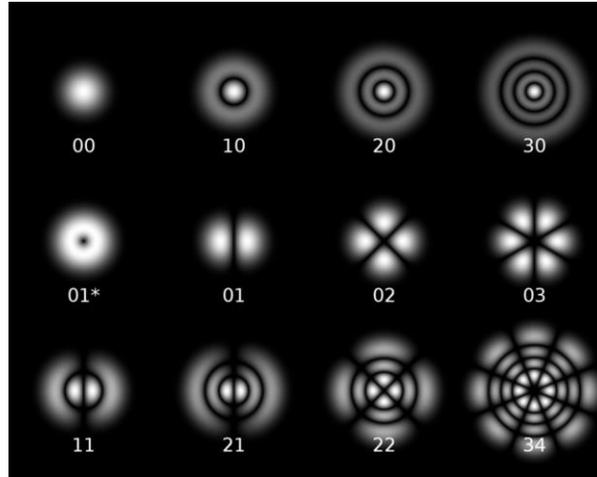


FIGURE. 1.2 – Section transversale des modes laser Laguerre-Gauss [26].

L'avantage de ces modes est leur pouvoir de générer de très petits volumes focaux notamment lorsque ils sont remodelés par un élément d'optique diffractif approprié (EOD) [27].

### 1.2.2.3 Mode fondamental ou faisceau gaussien

Nous pouvons tirer l'expression du champ électrique d'un faisceau laser d'ordre fondamental sortant de la cavité à partir de deux types de modes décrits ci-dessus, prenant en considération les conditions suivantes : ( $m=0, n=0$ ) et aussi ( $l=0, p=0$ ). Ce mode fondamental  $TEM_{00}$  est la base de l'étude des faisceaux lasers, appelé faisceau gaussien et son profil d'intensité à symétrie axiale est représenté par la figure. 1.3. Son champ électrique, selon les coordonnées radiales, est alors décrit comme suit [20, 22]:

$$E(\rho, z) = E_0 \frac{W_0}{W(z)} \exp \left[ - \left( \frac{\rho}{W(z)} \right)^2 \right] \exp \left[ -i \left( kz + \frac{k\rho^2}{2R(z)} - \phi(z) \right) \right] \quad (1.8)$$

où,  $\rho$  est la coordonnée radiale du faisceau gaussien,  $k = 2\pi / \lambda$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde et  $W_0$  est le waist du faisceau laser gaussien. Les paramètres :  $W(z)$ ,  $\phi(z)$  et  $R(z)$  sont respectivement la largeur du faisceau, la phase de Gouy et le rayon de courbure du front d'onde qui dépendent de la position longitudinale  $z$  et obéissent aux formules suivantes :

- $W(z)$  est la largeur du faisceau gaussien, telle que :

$$W^2(z) = W_0^2 \left[ 1 + \left( \frac{z}{z_R} \right)^2 \right] \quad (1.9)$$

- $\phi(z)$  est la phase de Gouy et son expression est donnée par :

$$\phi(z) = \arctan \left( \frac{z}{z_R} \right) \quad (1.10)$$

Nous introduisons aussi une grandeur clé qui est la distance de Rayleigh  $z_R$ , elle décrit la profondeur de focalisation du faisceau laser :

$$z_R = \frac{\pi W_0^2}{\lambda} \quad (1.11)$$

La relation (1.12) représente l'angle de divergence (élargissement du faisceau), qui est donné par le rapport entre la longueur d'onde  $\lambda$  et la largeur minimale  $W_0$  du faisceau gaussien.

$$\theta = \frac{\lambda}{\pi W_0} \quad (1.12)$$

Le rayon de courbure du faisceau gaussien  $R(z)$  s'exprime par la relation suivante :

$$R(z) = z \left[ 1 + \left( \frac{z_R}{z} \right)^2 \right] \quad (1.13)$$

Les principales variables décrivant ce mode sont représentées dans la figure. 1.3.

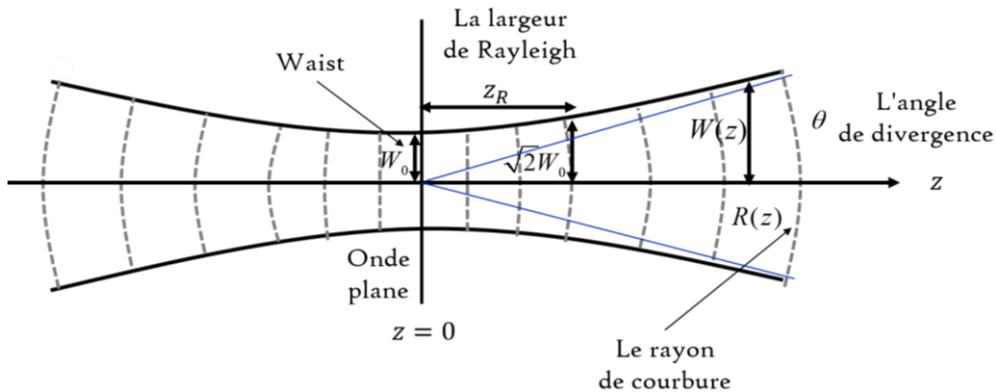


FIGURE. 1.3 – Illustration de la distribution d'un faisceau gaussien avec ses principaux paramètres.

À partir de l'expression du champ électrique représentée par l'équation (1.8), la distribution de l'intensité est donnée par l'équation suivante [22] :

$$I(\rho, z) = I_0 \left( \frac{W_0}{W(z)} \right)^2 \exp \left[ -2 \frac{\rho^2}{W^2(z)} \right] \quad (1.14)$$

L'expression de l'intensité suivant l'axe de propagation  $z$  est donnée comme suit :

$$I(0, z) = I_0 \left( \frac{W_0}{W(z)} \right)^2 = \frac{I_0}{1 + (z/z_R)^2} \quad (1.15)$$

L'intensité décroît de sa valeur maximale à  $z=0$  en se propageant progressivement selon  $z$ .

### 1.3 Interférences des faisceaux lasers

#### 1.3.1 Principe

Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, le physicien britannique Thomas Young a ouvert une nouvelle voie à la physique, en démontrant grâce à une expérience des interférences lumineuses, la nature ondulatoire de la lumière. Ce phénomène d'interférence résulte de la superposition de deux ou plusieurs ondes émises par les sources cohérentes en un seul point de l'espace. En optique, de telles interférences ne peuvent être obtenues que par la division d'une onde issue d'une source unique. Suivant la manière dont cette séparation est réalisée, nous distinguons les phénomènes d'interférences par division de front d'onde ou par division d'amplitude [28, 29]. Le dispositif optique qui produit les interférences est nommé l'interféromètre. Il existe diverses configurations d'interféromètres, les plus connus et les plus utilisés sont les interféromètres de Michelson et de Mach Zehnder.

#### 1.3.2 Formalisme général des interférences à deux ondes

Considérons le champ électrique d'un faisceau laser donné par l'expression complexe suivante [23]:

$$E = A e^{-i\Psi} \quad (1.16)$$

où,  $A$  est l'amplitude et  $\Psi$  représente la phase.

En fait, l'amplitude peut être constante lors de la propagation le long de l'axe ' $z$ ', comme le cas d'une onde plane. Par contre dans le cas d'un faisceau gaussien, l'amplitude dépend des coordonnées transversales  $(x, y)$  et décroît avec une forme gaussienne caractéristique donnée par :  $\exp(x^2 + y^2/W^2)$ , et  $W$  représente la largeur du faisceau à la distance de propagation ' $z$ '.

Par ailleurs, la phase d'une onde plane se propageant dans la direction ' $z$ ' peut prendre une forme simple donnée par :  $(kz - \omega t)$  où,  $k = 2\pi/\lambda$  est le nombre d'onde et  $\omega$  est la fréquence angulaire. En revanche, l'expression de la phase d'une onde gaussienne est plus élaborée et peut être représentée par :  $k(x^2 + y^2/2R)$  avec ' $R$ ' est le rayon de courbure du front d'onde.

Il y a également une autre phase que les faisceaux gaussiens acquièrent en raison de la propagation, cette phase s'appelle la phase de Gouy donnée par  $\varphi = (N + 1) \tan^{-1}(z/z_R)$ , où  $z_R$  est la largeur de Raleigh et  $N$  est l'ordre du mode de faisceau laser [30].

Alors, soient  $E_1$  et  $E_2$  les deux champs électriques issus de chaque faisceau laser, l'intensité totale de ces deux faisceaux en un point de l'espace est représentée par l'expression donnée comme suit :

$$I = |E_1 + E_2|^2 \quad (1.17)$$

$$= |A_1 e^{i\Psi_1} + A_2 e^{i\Psi_2}|^2 \quad (1.18)$$

$$= A_1^2 + A_2^2 + A_1 A_2 \left( e^{i(\Psi_1 - \Psi_2)} + e^{-i(\Psi_1 - \Psi_2)} \right) \quad (1.19)$$

$$I = A_1^2 + A_2^2 + 2A_1 A_2 \cos(\Psi_1 - \Psi_2) \quad (1.20)$$

La relation (1.20) représente la distribution de l'intensité totale. Le premier terme représente la somme des intensités individuelles de chaque faisceau et le second terme est lié à l'origine du phénomène de l'interférence.

Généralement, pour avoir un bon contraste de l'image, on pose :  $A_1 = A_2 = A$  ; dans ce cas, l'intensité peut s'écrire plus simplement :

$$I = 2A^2 (1 + \cos \Delta\Psi) \text{ et,} \quad (1.21)$$

$$\Delta\Psi = (\Psi_1 - \Psi_2) \quad (1.22)$$

avec  $\Delta\Psi$  est la différence de phase entre les deux faisceaux. Cette différence de phase est le paramètre clé qui module la distribution de l'intensité des franges d'interférences qu'on appelle interférogramme composé généralement de franges brillantes et de franges sombres.

Une mise en forme de l'intensité de faisceau laser en utilisant ce principe de l'interférence a déjà été démontrée dans la littérature. D'ailleurs, la génération d'un point focal ayant une taille inférieure à celle d'un faisceau gaussien a été obtenue par la superposition axiale de deux faisceaux gaussiens [17, 31]. Nombreuses sont les applications basées sur le phénomène d'interférence telles que: l'interférométrie classique [32], l'holographie et la fabrication des éléments holographiques pour le stockage de données et d'images numériques [33], la reconnaissance de forme, l'interférométrie de speckle [34, 35] et les mesures astronomiques. À partir des trois dernières décennies, les recherches se sont accentuées sur l'application des interférences en microscopie optique [18, 36].

## 1.4 Microscopie optique à fluorescence

La microscopie optique permet l'observation des objets à des petites échelles. La condition nécessaire pour faire apparaître ou discerner un objet est le fait qu'il soit contrasté et cela grâce à sa capacité d'absorption, de réflexion ou d'émission de photons. Pour les objets transparents, de nombreuses techniques ont été mises au point afin d'augmenter le contraste. La fluorescence apparaît aujourd'hui comme l'un des moyens les plus efficaces. La technique consiste à marquer avec un fluorophore une espèce de molécule utilisée dans le processus d'étude. En général, ces fluorophores sont excités optiquement pour réémettre une lumière dite la fluorescence (qui sera détaillée dans le chapitre 3).

Récemment, de nombreux développements en microscopie ont permis l'émergence d'une large variété de systèmes dotés de différentes caractéristiques et propriétés. Cependant, l'élément principal et commun de tous microscopes optiques concerne l'objectif de microscope. Il est caractérisé par une ouverture numérique  $ON$  (NA : Numerical Aperture en anglais), comme illustré sur la figure.1.4. Elle est le paramètre influençant la quantité de photons traversant l'objectif, définie par  $ON = n \cdot \sin \theta$ , avec ' $n$ ' l'indice de réfraction dans le milieu d'observation et ' $\theta$ ' est le demi-angle au sommet du cône de lumière entre l'axe optique et le rayon le plus écarté de l'axe optique qui entre ou sorte de l'objectif.

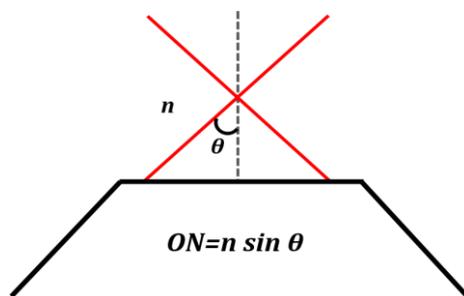


FIGURE. 1.4 – Description de l'ouverture numérique d'un objectif de microscope.

### 1.4.1 Limite de la résolution spatiale d'un microscope optique

À la fin du dix-neuvième siècle, les physiciens Ernst Abbe [37], John William Rayleigh [38] et Émile Verdet [39] étudièrent les propriétés de focalisation de la lumière. Ils arrivèrent à montrer que la limite de la résolution d'un microscope dépend des lois de la diffraction. Plusieurs chercheurs ont tenté de calculer la réponse impulsionnelle du microscope, cette dernière est aussi appelée la fonction d'étalement du point (PSF pour, Point Spread Function en anglais), qui est la description mathématique de l'image du disque d'Airy obtenue lorsqu'on observe un point lumineux par un système optique.

Une large gamme d'approches ont été développées dans la littérature pour la description de la PSF. La plupart des approches qui existent pour la distribution de l'intensité lumineuse dans la région focale d'un objectif de microscope sont, soit très simplistes conduisant au modèle scalaire comme celui de Born et Wolf, soit précises consacrées à la description vectorielle proposée par Richards et Wolf. D'ailleurs, en comparaison avec l'approche vectorielle, plusieurs auteurs ont montré que l'approximation scalaire donne une bonne description de la PSF au plan focal lorsqu'elle est excitée par une onde plane (voir le chapitre 4). Cette fonction est exprimée par la relation suivante [23]:

$$PSF(r,z) = \left| A \int_0^1 J_0(krON\rho) \exp\left(\frac{-ikON^2\rho^2z}{2n}\right) \rho d\rho \right|^2 \quad (1.23)$$

avec,  $A$  est une constante d'amplitude,  $J_0$  est la fonction de Bessel d'ordre zéro,  $k$  est le nombre d'onde donné par  $2\pi/\lambda$  et  $\lambda$  est la longueur d'onde. Le paramètre  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$  indique les coordonnées d'un point,  $ON$  est l'ouverture numérique de l'objectif de microscope et ' $n$ ' est l'indice de réfraction.

Alors, la tache de diffraction d'une onde plane décrite par le modèle de Born et Wolf est équivalente à la fonction du disque d'Airy donnée par :

$$PSF(r,0) = \left| A \int_0^1 J_0(krON\rho) \rho d\rho \right|^2 = |A|^2 \left( \frac{J_1(krON)}{krON} \right)^2 \quad (1.24)$$

Ce modèle a été utilisé par Rayleigh pour établir son critère de résolution, il relie la résolution du système aux dimensions de la PSF et considère que deux pics voisins ne peuvent être résolus si le maximum de l'un correspond au minimum de l'autre. Conventionnellement, cette distance minimale est estimée par le diamètre de la tache de diffraction qui correspond à la largeur à mi-hauteur du premier zéro de la fonction de Bessel d'ordre un ( $J_1$ ). En deçà de cette distance, le système optique perd son pouvoir séparateur.

La connaissance exacte de la PSF permet en principe d'obtenir une meilleure estimation du pouvoir de résolution. Donc, appliquer un algorithme d'ajustement adéquat à la PSF s'avère nécessaire. Par conséquent, une fonction gaussienne a été proposée pour l'approximation de la PSF où, l'estimation des paramètres de la réponse impulsionnelle d'un tel modèle a fait l'objectif de nombreux travaux [40–42]. Cette considération gaussienne des PSFs réduit le nombre de variables à estimer et contraint aussi la forme des PSFs. La relation entre les paramètres définis par l'approximation gaussienne de la PSF dans la détermination de la résolution selon le critère de Rayleigh, la FWHM (la largeur à mi-hauteur pour, Full width at Half Maximum en anglais) et le waist, est représentée sur la figure. 1.5.

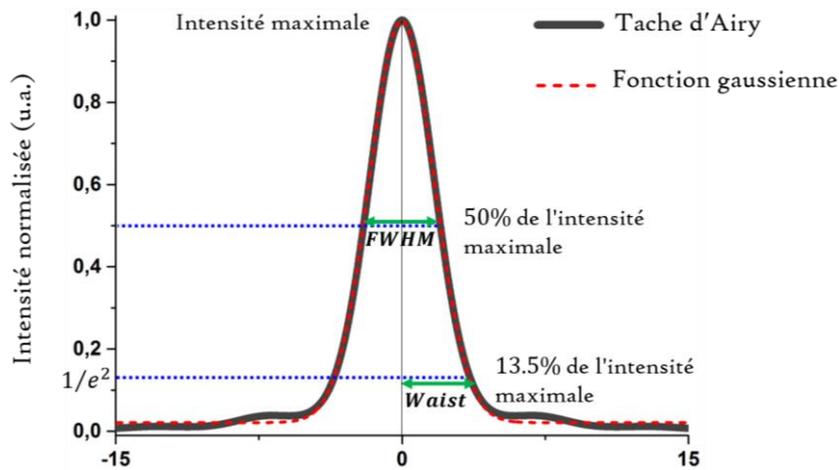


FIGURE. 1.5 – La relation entre le critère de Rayleigh, la FWHM et le waist, dans la description de la résolution.

### 1.4.2 Microscopie conventionnelle

En microscopie conventionnelle, aussi appelée à champ large, l'échantillon est entièrement illuminé par une source de lumière blanche, généralement une lampe à mercure ou à xénon. Alors, tout objet se trouvant sur la trajectoire de cette lumière émet des photons dans toutes les directions. Ces photons proviennent de l'ensemble de l'échantillon sont collectés par l'objectif de microscope puis par le détecteur où l'image sera formée. La résolution latérale est définie selon le critère de Rayleigh comme la distance minimale en-dessous de laquelle on ne peut pas résoudre deux points proches, soit [43, 44] :

$$r_{x,y} = 0.61 \lambda / ON \quad (1.25)$$

De la même manière, la résolution axiale selon le critère de Rayleigh est inversement proportionnelle au carré de l'ouverture numérique de l'objectif et définie par :

$$z_{\min} = 2n \lambda / ON^2 \quad (1.26)$$

Le dispositif décrit dans la figure. 1.6 (a) représente les chemins optiques pour l'excitation et la détection d'un point dans le plan focal de l'objectif. Sachant que les ondes d'illumination et de détection étant spectralement dissociées par un dispositif optique appelé miroir dichroïque. Dans la microscopie conventionnelle, l'image finale contient l'image du plan focal ainsi que l'information de la partie hors foyer. Le fait de superposer ces différents plans, l'image finale apparaît floue dans le plan de détection. Ceci limite la résolution du système et la qualité des images.

Le premier dispositif à améliorer la résolution de la microscopie conventionnelle et à pallier ses défauts est la microscopie confocale. Cette dernière est aujourd'hui considérée comme un outil de référence dans le domaine de l'imagerie.

### 1.4.3 Microscopie confocale

En 1957, l'américain Marvin Minsky dépose son brevet en inventant le principe de la microscopie confocale [45]. Son idée consiste d'améliorer la résolution par l'élimination spatiale de la lumière provenant des plans hors focalisation de l'échantillon. En pratique, cette technique n'a pas eu d'importance que vers les années 80, avec le développement des sources lasers ainsi que les détecteurs ultrasensibles et l'apparition des outils performants pour le traitement des données. D'ailleurs la lampe d'excitation en microscopie conventionnelle est remplacée par une source laser. Ce laser est focalisé sur l'échantillon à travers un objectif de microscope. Ensuite, les photons émis par cet échantillon sont collectés par le même objectif, puis transmis par le miroir dichroïque afin de se focaliser finalement dans un trou confocal ('pinhole' en anglais). Ce trou confocal, placé au foyer optique conjugué de l'objectif, permet de bloquer toute la lumière en provenance des plans non-focaux [46] et collecter ainsi celle qui passe par le foyer à destination du détecteur ( la figure. 1.6 (b)). Grâce à ce trou, la zone étudiée étant très restreinte, permet une bonne résolution tridimensionnelle [47].

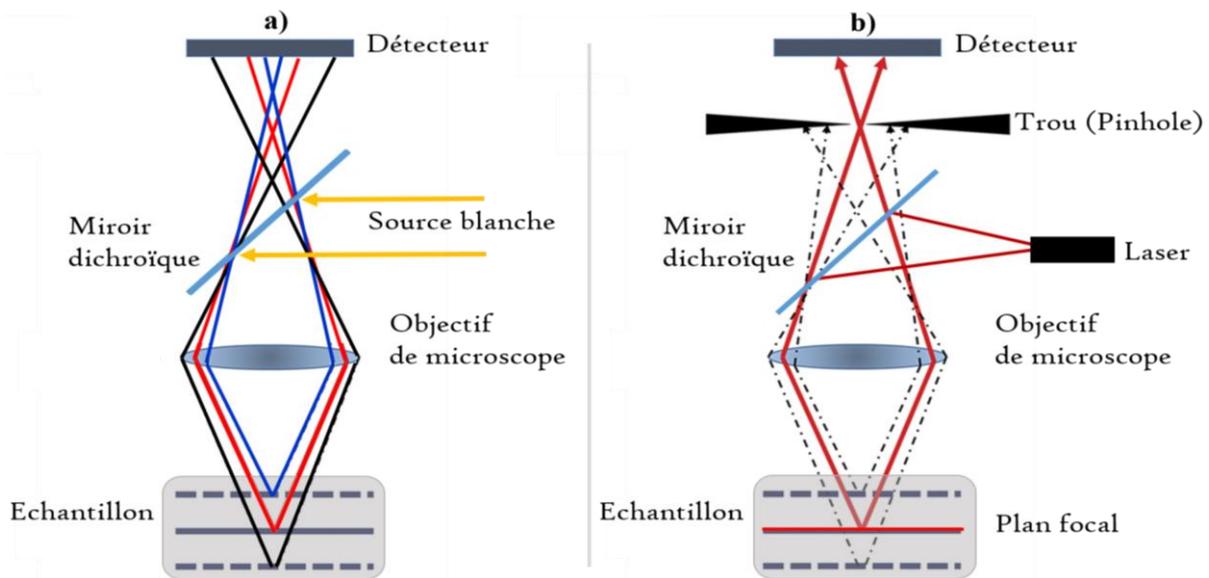


FIGURE. 1.6 – Présentation des principales techniques de microscopie. a) La microscopie conventionnelle et b) la microscopie confocale [48].

Les expressions mathématiques des résolutions dans les directions latérale et axiale sont données par [43] :

$$r_{x,y}^{conf} \approx 0.4 \lambda / ON \quad (1.27)$$

$$z_{min}^{conf} \approx 1.4n \lambda / ON^2 \quad (1.28)$$

Par conséquent, les résolutions latérale et axiale en microscopie confocale sont améliorées par rapport à la microscopie conventionnelle.

Au cours des deux dernières décennies, plusieurs nouvelles techniques d'imagerie optique ont été introduites pour dépasser la limite de diffraction, ces techniques se basent sur la structuration de la distribution de l'intensité d'excitation dites les techniques de super-résolution ou hyper-résolution optiques.

## **1.5 Techniques de super-résolution en microscopie optique**

En microscopie optique, les techniques de super-résolution sont appelées ainsi pour leurs capacités de dépasser la limite imposée par le phénomène de diffraction et de produire une tache centrale de diffraction plus petite que la tache d'Airy. De nombreux groupes de recherche ont concentré leurs efforts sur le développement de nouvelles techniques permettant de franchir la limite de diffraction. En intervenant sur le matériel utilisés, comme les objectifs à grande ouverture numérique, les longueurs d'ondes d'excitation les plus petites et les détecteurs de forte sensibilité. Tandis que de nombreux efforts ont été menés pour contourner la limite de diffraction en structurant l'intensité du faisceau d'excitation.

Le principal avantage commun de ces techniques super-résolues purement optiques est qu'elles ne reposent pas sur les propriétés des échantillons (fluorophores), mais le pouvoir de résolution de l'instrument est amélioré intrinsèquement par un développement de méthodes exploitant des géométries de focalisation plus élaborées. Chacune a cependant ses spécificités : certaines améliorent sensiblement la résolution axiale tandis que d'autres interviennent davantage sur la résolution latérale. Généralement, toutes ces techniques présentent des avantages et des inconvénients, et il appartient à l'utilisateur de choisir celle qui est la plus adaptée au mieux pour répondre à sa question de recherche [49].

Dans ce qui suit, nous allons énumérer quelques exemples d'application de la structuration des faisceaux lasers en microscopie. Les méthodes de la réduction du volume d'excitation peuvent être divisées en deux catégories principales ; celles qui se basent sur un seul faisceau et celles sur plusieurs faisceaux.

### **1.5.1 Réduction du volume d'excitation : Méthodes à un faisceau**

Afin d'exciter efficacement un échantillon, le faisceau laser est focalisé dans un tout petit volume appelé volume d'excitation. En fait, la résolution du système est définie par le volume de détection (volume d'observation). Ce dernier dépend à la fois des propriétés du faisceau via le volume d'excitation et du système optique de collection. Jusqu'à présent, quasiment rien n'a permis de réduire le volume de collection hormis un trou confocal adapté à la tache de diffraction qui limite axialement le volume de collection et par conséquent le volume de détection.

Dans cette sous-section, un bref aperçu sur quelques différentes méthodes qui sont apparues afin de produire une lumière d'excitation structurée dans l'objectif d'améliorer la résolution jusqu'au volume sub-longueur d'onde.

### 1.5.1.1 Microscopie de fluorescence par réflexion totale : TIRF

La microscopie TIRF a été développée au début des années 1980 par Daniel Axelrod à l'Université du Michigan (Etats-Unis) [50]. Le principe physique de cette technique repose sur l'illumination en réflexion totale interne à travers une interface (solide/liquide), entre deux milieux d'indices de réfraction respectifs ' $n_1$ ' pour le milieu incident (la lamelle en verre) et ' $n_2$ ' pour le second milieu (l'échantillon en solution aqueuse). Le phénomène de réflexion totale interne pourra avoir lieu lorsque le rayon lumineux incident se trouve dans un milieu d'indice de réfraction plus grand que l'éventuel rayon réfracté ( $n_1 > n_2$ ) avec un angle d'incidence ' $\theta$ ' supérieur à l'angle critique de réflexion. Dans ces conditions, une génération d'onde évanescente de longueur d'onde  $\lambda$  survient au niveau de l'objet, comme illustré sur la figure. 1.7. Le champ de l'onde évanescente est confiné longitudinalement sur une distance d'une centaine de nanomètres appelée profondeur de pénétration ' $d$ ' donnée par :

$$d = \frac{\lambda}{4\pi \times \sqrt{(n_1 \sin \theta)^2 - n_2^2}} \quad (1.29)$$

Ce champ se propage parallèlement à la surface entre les deux milieux afin d'exciter l'échantillon (molécule fluorescente) qui se déplace sur l'interface supérieure. Cette configuration permet d'obtenir une résolution longitudinale typiquement autour de  $\lambda/7$  (avec  $ON=1.45$  et  $n_2=1.33$ ). Par conséquent, le volume d'excitation est limité que pour les fluorophores localisés près de l'interface [51].

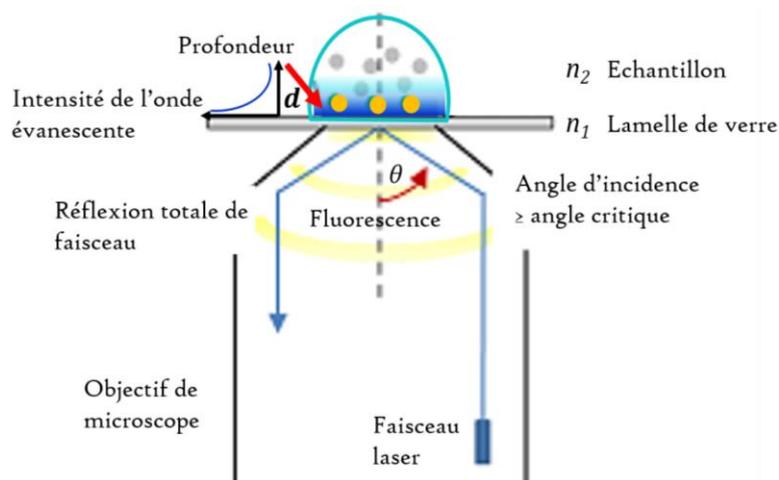


FIGURE. 1.7 – Principe de la microscopie TIRF.

### 1.5.1.2 Microscopie à feuille de lumière

Une autre méthode de réduction du volume d'excitation consiste à illuminer sélectivement un plan d'intérêt dans l'échantillon. VOIE et al ont démontré la méthode pour la première fois en 1993 par l'utilisation d'un microscope à base de feuille de lumière (LSM, pour light sheet microscopy) [52]. Dans cette technique, comme représenté sur la figure. 1.8, une lentille cylindrique est utilisée afin de produire une fine couche de lumière orthogonale à l'objectif nommée feuille de lumière. Elle permet d'imager un seul plan à la fois et réduit considérablement le photo-blanchiment des structures hors focales avec un rapport signal sur bruit très élevé. Par cette méthode, l'échantillon est scanné le long de la dimension axiale ce qui permet à une pile d'images de reproduire une reconstruction 3D.

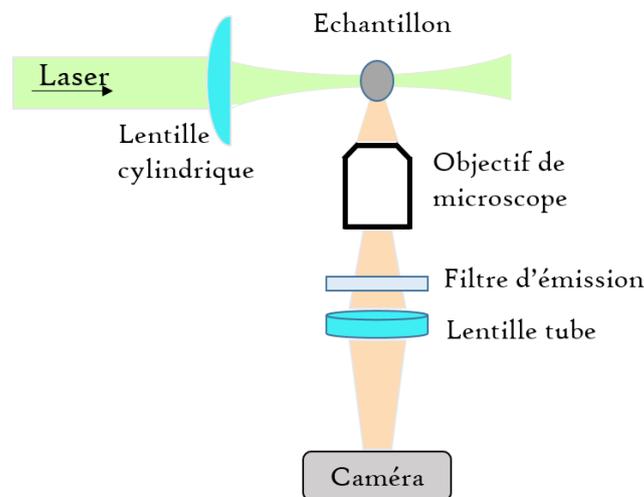


FIGURE. 1.8 – Principe de la microscopie à base de feuille de lumière.

À la place du faisceau gaussien, l'utilisation d'un faisceau de Bessel, produit par un axicon, a permis l'élaboration de feuilles de lumière ultraminces. Ces dernières contribuent à l'augmentation supplémentaire de la résolution ainsi que la réduction du photo-blanchiment [53]. La principale limite de cette technique est la distance du travail de l'objectif de microscope, car généralement les objectifs de grandissement important ont une courte distance de travail. De ce fait, cette technique n'est pas applicable à tous types d'échantillons.

## 1.5.2 Réduction du volume d'excitation : Méthodes à deux ou plusieurs faisceaux

### 1.5.2.1 Microscopie $4\pi$

Dans les années 1990, Stefan Hell a eu l'idée d'utiliser les interférences pour franchir la limite de résolution imposée par la diffraction [54]. La technique est basée sur l'utilisation couplée de deux objectifs de microscope de positionnement opposé pour structurer le volume d'excitation. Le nom de  $4\pi$ -microscope vient des premiers montages décrits par Hell et Sheppard [18, 55], où la fluorescence fût collectée quasiment dans toutes les directions de l'espace (sur  $4\pi$  stéradians).

Dans le montage expérimental, la lumière laser est divisée en deux faisceaux se propageant en direction inverse, qui sont ensuite focalisés indépendamment par les deux objectifs opposés. Des interférences constructives au niveau de l'échantillon entre les deux faisceaux permettent de réduire la dimension de la tache de focalisation et d'augmenter la résolution axiale d'un facteur 5 fois supérieure à celle obtenue avec un microscope confocal.

Il existe plusieurs configurations de la microscopie  $4\pi$  qui diffèrent par les conditions de détection. Quand' il y a des interférences à la fois sur le faisceau d'excitation et sur l'émission, nous faisons référence au  $4\pi$ -microscope de type C. Par contre, les types A et B ne font interférer que le faisceau l'excitation ou celui de l'émission. La mise en œuvre des microscopes  $4\pi$  reste toutefois très complexe notamment ne permettent ni de travailler avec les échantillons volumineux ni d'être réglés facilement par les non-spécialistes [56].

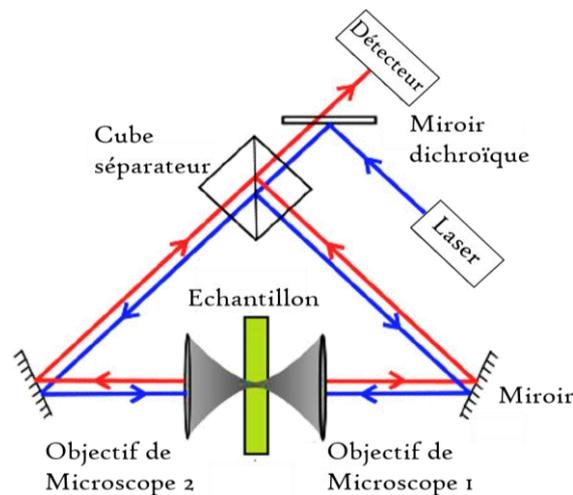


FIGURE. 1.9 – Principe de la microscopie  $4\pi$  [56].

De nombreuses techniques sont d'ailleurs dérivées de la microscopie  $4\pi$ , développées et sont même commercialisées. La méthode à hyper-résolution la plus répandue est la microscopie  $I^5M$  en champs large [57]. L'échantillon est excité par deux objectifs de haute ouverture numérique placés dans des directions opposées. L'interférence constructive des deux faisceaux focalisés permet ainsi d'obtenir une PSF de 3 à 4 fois plus petite dans la direction axiale que celle obtenue par un microscope confocal.

### 1.5.2.2 Microscopie par illumination structurée

La microscopie à illumination structurée (SIM) est l'une des principales techniques de la super-résolution. L'idée a été décrite pour la première fois dans un brevet en 1997 par Gustafsson et réalisée expérimentalement en 2000 [58]. La SIM est une technique à champ large dans laquelle l'échantillon est excité avec une série d'illuminations de profils structurés spatialement par l'application d'un motif d'illumination.

Ce motif d'illumination est périodique, souvent un réseau de diffraction, pour interférer au foyer de l'objectif les ordres de diffraction +1 et -1. Récemment, le réseau est remplacé par un modulateur spatial de lumière (SLM : Spatial Light Modulator) [59]. En multipliant la fréquence du réseau par les fréquences spatiales élevées de l'échantillon, les interférences de Moiré se produisent. Par conséquent, l'image acquise est un produit du diagramme de l'illumination et la structure de l'échantillon (figure. 1.10). Les images obtenues avec des motifs d'éclairage décalés et / ou pivotés sont ensuite utilisées afin de calculer l'image finale super-résolue. Le décalage introduit par le motif permet d'observer les fréquences spatiales plus élevées. L'amélioration de la résolution peut être observée en regardant la transformée de Fourier des images acquises. L'illumination structurée permet donc de restaurer les fréquences spatiales perdues par le microscope.

En utilisant cette technique, il est également possible d'augmenter la résolution latérale d'un facteur d'environ 2 fois la limite de la résolution optique. Cependant, elle est difficilement applicable aux plans plus profonds car les échantillons diffusent. Dans ces circonstances, il devient difficile de conserver la structure de l'illumination [60].

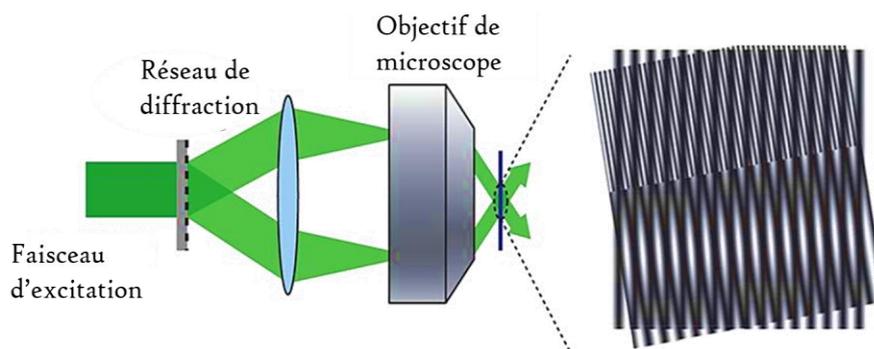


FIGURE. 1.10 – Principe de la microscopie SIM [61].

A ce jour, les incarnations récentes de la technique atteignent de grandes résolutions tant dans les directions latérales qu'axiales [57, 62]. Les meilleurs résultats ont été obtenus en combinant l'illumination structurée avec la microscopie I<sup>3</sup>M. Dans cette configuration, la PSF devient quasi-isotrope, ce qui correspond à une résolution spatiale d'environ 100 nm dans les trois dimensions [49].

### 1.5.2.3 Microscopie à déplétion par émission stimulée : STED

L'une des techniques les plus sophistiquées permettant de dépasser la limite due à la diffraction est la microscopie à déplétion par émission stimulée (STED : Stimulated Emission Depletion) [63]. Le principe de cette microscopie est assez différent des autres techniques de microscopies présentées. La microscopie STED est basée sur la déplétion de l'émission stimulée de la fluorescence afin de diminuer la zone de l'émission de fluorescence spontanée par la saturation d'une transition entre deux états électroniques et empêcher localement l'émission de la fluorescence [64].

L'excitation de l'échantillon est effectuée par un faisceau continu focalisé dans des dimensions limitées par la diffraction et entouré par un deuxième faisceau impulsionnel en forme d'anneau encerclant la zone à imager (les impulsions sont de l'ordre de picoseconde au femtoseconde avec une longueur d'onde légèrement décalée vers le rouge). Ce faisceau provoque alors l'émission stimulée à la périphérie du point de focalisation de l'excitation et interdit l'émission spontanée. Alors, seule la zone située au centre de l'anneau produit une émission spontanée de fluorescence avec une longueur d'onde différente du celle de l'émission stimulée. Un filtre spectral permet de bloquer la longueur d'onde indésirable provenant de l'émission stimulée afin de n'observer que la fluorescence de la zone d'intérêt [65]. La taille de cette zone non déplétée est donc fortement réduite permettant ainsi d'atteindre des résolutions optiques de quelques nanomètres [66].

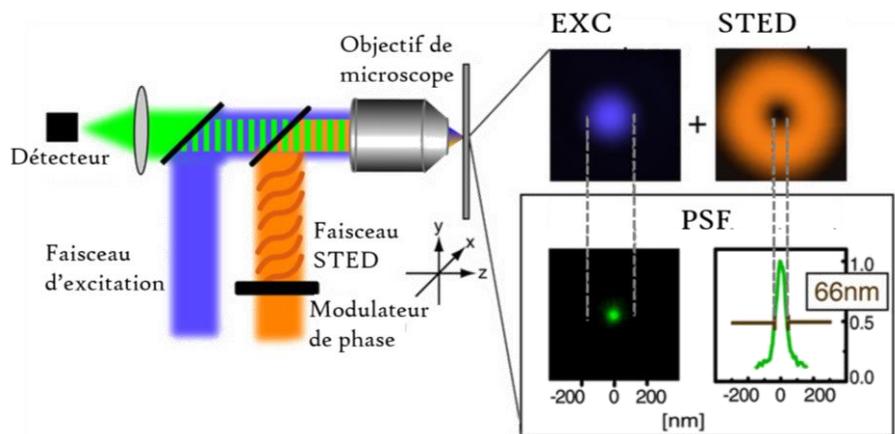


FIGURE. 1.11 – Principe de fonctionnement de la microscopie STED [67].

## 1.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux progrès dans l'optique des faisceaux lasers et leurs applications en microscopie optique. Dans un premier temps, une étude bibliographique a été effectuée sur les différents types de faisceaux laser ainsi que leurs interférences. Ensuite, un intérêt particulier a été porté aux microscopes à base de la structuration de faisceaux d'excitation. En outre, différentes techniques de microscopie ont été présentées dans l'objectif d'augmenter la résolution optique. La liste des méthodes pour l'amélioration de la résolution spatiale est bien longue. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Malgré cela, la microscopie à champ large et confocale restent très utilisées et faciles à manipuler pour l'étude des échantillons relativement variés.

# Chapitre 2

## Les nanoparticules d'or en nanotechnologie

### Sommaire

---

<b>2.1 Introduction.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Nanoparticules et nanomatériaux .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Les nanoparticules d'or et leurs propriétés.....	26
2.2.1.1 Les propriétés optiques des nanoparticules d'or .....	27
A) Bande plasmon de surface .....	27
B) Influence de la taille.....	27
C) Influence de la forme .....	28
D) Influence du milieu environnant .....	28
2.2.1.2 Les applications des nanoparticules d'or .....	28
<b>2.3 Diffusion Raman .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Diffusion Raman exaltée de surface (SERS) .....</b>	<b>30</b>
2.4.1 Les paramètres influençant l'effet SERS.....	32
<b>2.5 Techniques de caractérisation des nanoparticules.....</b>	<b>33</b>
2.5.1 La spectroscopie UV-VIS.....	33
2.5.2 Caractérisation électrostatique (potentiel Zêta) .....	34
2.5.3 La spectroscopie de corrélation.....	35
2.5.3.1 La diffusion dynamique de la lumière (DLS) .....	35
2.5.3.2 La spectroscopie de corrélation combinée au microscope confocal .....	36
<b>2.6 Conclusion .....</b>	<b>36</b>

---

## 2.1 Introduction

Les nanosciences ont connu un essor fulgurant ces dernières décennies, et ont fait l'objet de nombreux travaux de recherches dans diverses disciplines comme la physique, la chimie, la biologie et les sciences techniques. Ces recherches ont suscité des espoirs importants en raison des propriétés particulières de la matière à l'échelle nanométrique qui permettent d'envisager de nouvelles fonctions. Néanmoins, cela inclut de nouvelles problématiques de fabrication, de manipulation et d'observation des nano-objets. Afin d'étudier et comprendre les propriétés de ces derniers ainsi que leurs interactions avec leurs milieux environnants, l'instrumentation doit être performante. Avec l'émergence du domaine de la nanotechnologie, les outils et méthodes se multiplient pour bénéficier du processus de la nano-fabrication à la nano-détection [68].

Afin de répondre au mieux aux exigences des nanosciences et comprendre les phénomènes associés, il faut qu'il y ait l'association de l'optique (microscopie et spectroscopie), la photonique (l'interaction lumière matière), la chimie de surfaces et la physique.... Les dernières avancées résultantes de cette intégration pluridisciplinaire ont permis l'apparition de certaines techniques de caractérisation très performantes et sensibles. Ces dernières sont même adaptées à l'analyse in situ par l'intégration de la dimension temporelle et la prise en compte des phénomènes dynamiques afin de caractériser les nano-objets dans leur environnement fonctionnel. Il est désormais possible d'étudier les phénomènes auxquels sont soumis les nano-objets pendant leur occurrence [69].

Ce chapitre expose d'une manière générale les nanomatériaux, notamment les nanoparticules d'or qui ont différents domaines d'application tels qu'en chimie, biologie et plus particulièrement en médecine. Ensuite, les méthodes spectroscopiques capables de caractériser ces nano-objets avec une grande résolution spatiale seront présentées. Dans ce contexte, la spectroscopie Raman et la spectroscopie de corrélation seront les différentes techniques abordées dans ce manuscrit pour étudier les nanoparticules et caractériser leurs propriétés physico-chimiques.

## 2.2 Nanoparticules et nanomatériaux

La nanotechnologie est la science qui traite la matière à l'échelle du nanomètre (un milliardième de mètre :  $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) dont la taille est l'un des critères principaux définissant les nanoparticules ou les nanomatériaux. La nanoparticule est la composante fondamentale de la constitution d'une nanostructure. Sa dimension caractéristique est située dans l'ordre de grandeur allant de 1 à 100 nm d'après la norme ISO, mais plus grande qu'un atome défini par la mécanique quantique [70].

L'histoire des nanomatériaux remonte à 1959 lorsque Richard P. Feynman, physicien et lauréat du prix Nobel, a mis au défi la communauté scientifique dans l'une de ses conférences en déclarant : «Il y a beaucoup d'espace en bas». Il a suggéré que le passage au niveau inférieur était la clé de la technologie et l'avancement vers le futur, en semant les graines d'une nouvelle ère et en prédisant l'avènement des nanomatériaux [71]. Au fil des années, de nouveaux matériaux nanostructurés sont apparus avec de nouvelles propriétés magnétiques, optiques, chimiques et physiques fondamentalement différentes de celles du matériau massif. Grâce à l'augmentation du nombre d'atomes de surface par rapport à la diminution de la taille des particules (très grand rapport surface/volume), les nanoparticules acquièrent des surfaces spécifiquement réactives [72].

Récemment, une grande variété de nanoparticules ayant bouleversé plusieurs domaines, grâce à leurs diversifications causées par les différences liées à leur taille, leur surface spécifique ou encore leur forme et notamment leur composition chimique. Par exemple, on distingue les nanoparticules composites (Quantum dots CdSe- ZnS), les nanoparticules inorganiques (nanotubes de carbone), les nanoparticules métalliques (or, argent, oxydes de fer), les nanoparticules magnétiques, organiques (polymères) et les nanoparticules lipidiques (liposomes), sont les types de nanoparticules les plus prometteuses fabriquées de nos jours pour diverses applications [73], comme illustré en figure. 2.1.

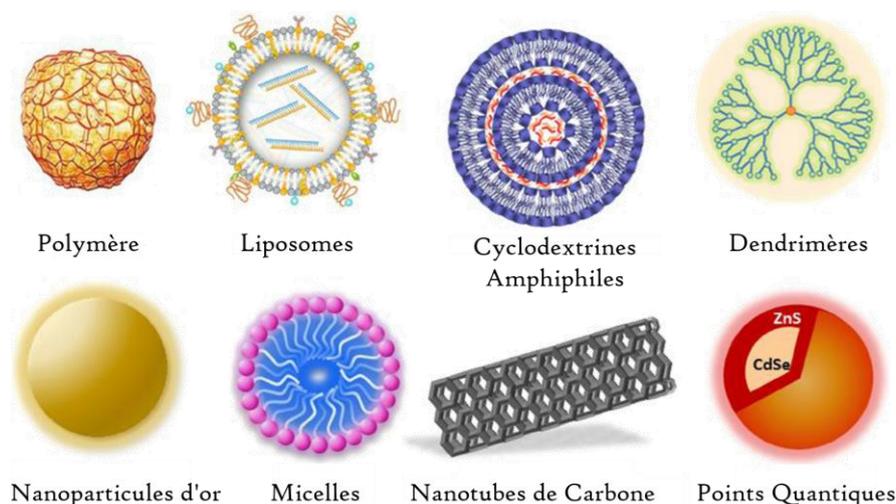


FIGURE. 2.1 – Les différents types de nanoparticules [74].

En raison de leurs propriétés physiques et chimiques remarquables, cette nouvelle famille de nanomatériaux, particulièrement de métaux est pressentie pour de nombreuses applications. Grâce à leurs performances, plus légères, plus solides et plus durables, un large éventail d'applications est disponible. Actuellement, les nanoparticules sont adoptées par plusieurs domaines, notamment dans le secteur industriel en raison de leurs applications dans des systèmes de stockage électroniques [75]. Améliorer l'efficacité des panneaux solaires [76] ou encore en spectroscopie Raman (SERS) où, leur réponse optique peut également être utilisée indirectement dans la caractérisation de diverses molécules [77]. Aussi, dans la biotechnologie comme les nano-vecteurs pour une administration ciblée de médicaments [78, 79], ou bien dans les produits pharmaceutiques ou cosmétiques [80]. Récemment, les nanoparticules métalliques offrent de grandes opportunités dans le domaine de la nanomédecine pour le diagnostic et thérapie des cancers [81, 82].

### **2.2.1 Les nanoparticules d'or et leurs propriétés**

L'histoire des nanoparticules (notées NPs) d'or remonte à l'époque romaine, quand elles furent utilisées pour des fins décoratives. L'exemple le plus célèbre est la fameuse coupe de Lycurgus constituée d'un verre contenant des NPs d'or et d'argent, ce qui lui donne une couleur différente en fonction de l'éclairage (intérieur ou extérieur) [83]. Toutefois, l'importance scientifique des NPs d'or n'a commencé qu'avec les travaux de Michael Faraday vers les années 1850, lorsqu'il a observé que les solutions d'or colloïdales<sup>1</sup> ont des propriétés différentes de l'or massif. La solution colloïdale est de couleur rouge intense pour les particules de moins de 100 nm et elle est d'une couleur jaunâtre pour les grosses particules [84]. Afin, de décrire les propriétés de coloration des NPs d'or dispersées, il est nécessaire de passer en revue certaines caractéristiques des NPs d'or. Cette nouvelle classe de nanomatériaux ayant des propriétés distinctes de l'or à l'échelle macroscopique qui s'explique par l'augmentation du nombre d'atomes de surface avec la diminution de la taille des particules qui sont responsable de l'interaction lumière-particule. Le phénomène appelé la « résonance plasmon » décrit l'interaction des électrons libres à la surface de la NP avec la lumière. Ce phénomène donne aux NPs des propriétés optiques uniques dépendant de la longueur d'onde [85].

---

<sup>1</sup>Les solutions colloïdes sont des nanoparticules métalliques en suspension.

### 2.2.1.1 Les propriétés optiques des nanoparticules d'or

#### A) Bande plasmon de surface

Lorsque la NP d'or est soumise à un champ électromagnétique, les électrons libres (de surface) sont mis en mouvement et oscillent de manière collective ; ces oscillations sont appelées oscillations plasmoniques [86], comme illustré à la figure. 2.2. Un déplacement collectif du nuage d'électrons, produit un excès de charges négatives d'un côté et un excès de charges positives de l'autre. Il en résulte l'apparition d'un champ électrique ayant tendance à ramener le nuage d'électrons à sa position d'équilibre en effectuant des oscillations autour de cette position à la fréquence du plasmon [87, 88]. Avec la réduction de la taille de matériau, la propagation de cette onde est suspendue et le plasmon de surface reste confiné à l'intérieur de la NP et prend le nom de plasmon de surface localisé (LSP). Lors les NPs sont soumises à un rayonnement électromagnétique de fréquence égale à la fréquence d'oscillation du plasmon de surface localisé, on parle de résonance des plasmons de surface localisés (LSPR). Dans ce cas, une exaltation locale du champ électromagnétique se produit avec une intensité évanescente (exponentiellement décroissante) en s'écartant de la surface de la NP [89].

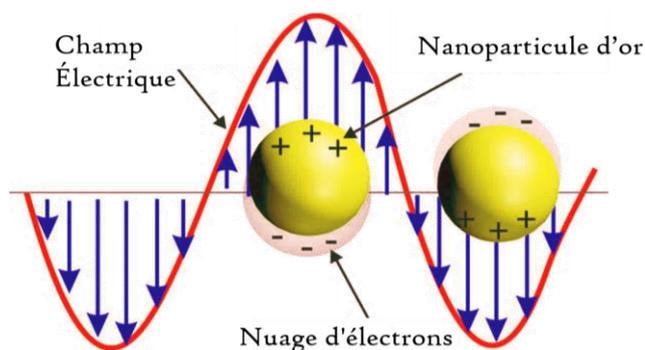


FIGURE. 2.2 – Principe de l'effet plasmon de surface [89].

En effet, la bande plasmon dépend de nombreux facteurs influençant sa position et son intensité.

#### B) Influence de la taille

La position de la résonance du plasmon (LSPR) des NPs peut différer sensiblement d'une petite particule par rapport à une plus grande et cela même avec une identique nature chimique. Car, pour les grandes tailles, la proportion des électrons qui oscillent est très faible par rapport au nombre total d'électrons, ce qui tend à décaler l'absorption légèrement vers le rouge tandis que la diffusion croît rapidement. Donc, l'augmentation de la taille engendre un déplacement de la position du maximum de la résonance du plasmon vers les plus grandes longueurs d'onde [86, 90].

### C) Influence de la forme

En effet, la diversification dans les formes des NPs mène à la différence de leurs propriétés. Chaque géométrie de NP a un mode d'oscillation des électrons de surface correspondant à une fréquence de résonance propre. Par exemple, les NPs en forme de nano-bâtonnets ont deux modes de résonance, un longitudinal et l'autre transversal. La LSPR dépend fortement du rapport longueur/largeur [91] et lorsque le rapport augmente, la position du LSPR se déplace du visible vers l'infrarouge [92, 93].

### D) Influence du milieu environnant

Les propriétés des NPs dépendent tout autant de leur environnement que de leur composition. La nature du milieu environnant modifie directement l'oscillation collective des électrons par le biais de la constante diélectrique, c'est-à-dire, l'indice de réfraction du milieu, ce qui affecte la LSPR des NPs. Alors, la bande plasmon se décale vers les grandes longueurs d'onde avec l'augmentation de l'indice de réfraction du milieu environnant [94–96].

Différentes méthodes de synthèse des NPs d'or ont été développées permettant la mise en œuvre de différentes tailles et formes de NPs. Sphériques et non-sphériques (Nano-étoile, nano-bâtonnet, nano-cube, nano-triangle et nano-amas (voir la figure. 2.3) [97–99] avec des chimies de surface (environnement) multiples pour des applications spécifiques [100, 101].

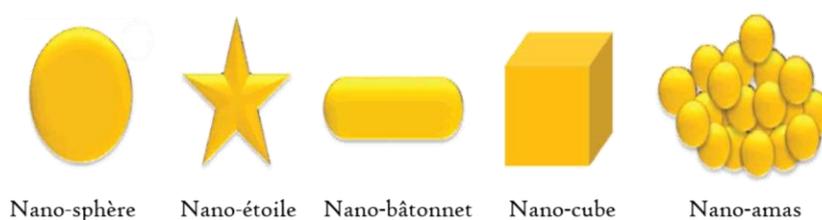


FIGURE. 2.3 – Les différentes formes des NPs d'or.

#### 2.2.1.2 Les applications des nanoparticules d'or

Les domaines d'applications des NPs d'or sont très variés. Leurs possibilités d'applications sont non seulement liées aux propriétés morphologiques mais également à leurs surfaces spécifiques. Les NPs d'or ont des propriétés de réactivité de surface uniques dues au rapport surface/volume très élevé. En effet, les NPs d'or présentent de grandes capacités de fonctionnalisation ou multifonctionnalisation en surface [100]. Il est montré que la surface de l'or présente une forte affinité pour les molécules contenant des groupes fonctionnels tels que ; les groupements thiol (-SH) [102], les mercaptans [103], les phosphines [104] et les amines [105].

Etant donné que les NPs d'or soient biocompatibles, cela offre une opportunité unique de les conjuguer aux ligands tels que des ADN, des protéines, enzymes, anticorps et au polymères (éthylène glycol, PEG) [106, 107] afin de les vectoriser pour cibler les cellules cancéreuses ou autres [108, 109].

En plus, les NPs d'or sont des candidats très intéressants pour les applications de détection grâce à leurs propriétés optiques [110]. La grande sensibilité de la LSPR envers l'environnement permet de les utiliser comme capteurs. Ces applications sont possibles en modifiant la distance molécule-NP ou en modifiant la constante diélectrique du milieu qui affecte directement la position LSPR. Lors de la présence d'une molécule adsorbée ou à proximité d'une NP, son émission Raman est exaltée par la NP [111]. Cette exaltation trouve son origine dans les modifications de l'environnement électromagnétique dues à la présence de la NP et est connue sous le nom de la diffusion Raman exaltée de surface (SERS).

## 2.3 Diffusion Raman

La diffusion Raman est basée sur la diffusion inélastique de la lumière qui fut observée expérimentalement pour la première fois en 1928 par C. V. Raman et son étudiant K. S. Krishnan [112]. En 1930, Raman a reçu le prix Nobel de physique pour cette découverte.

Il s'agit d'un processus physique, c'est à dire, quand une molécule est irradiée par une onde électromagnétique, une grande partie de la lumière est diffusée d'une manière élastique induisant l'émission d'un photon de même énergie nommée la diffusion Rayleigh, et une autre partie de faible proportion d'une manière inélastique induisant l'émission d'un photon avec une énergie différente nommée la diffusion Raman. Cet échange d'énergie est dû au niveau vibrationnel excité induisant une diffusion de la lumière à une énergie soit plus faible nommée la diffusion Stokes soit par un gain d'énergie appelée la diffusion anti-Stokes. La diffusion Stokes a lieu quand la molécule est au départ à l'état fondamental et se désexcite sur un état vibrationnel excité en diffusant une énergie plus faible. La diffusion anti-Stokes se produit quand la molécule est au départ dans un état vibrationnel excité et se désexcite vers l'état fondamental avec une énergie rediffusée supérieure à l'énergie d'excitation. A l'équilibre thermodynamique, l'état fondamental est le plus peuplé par rapport aux états excités (distribution de Boltzmann) alors, ce dernier processus est très peu probable [113]. Un diagramme énergétique dans la figure. 2.4 illustre les deux processus de la diffusion Raman (Stokes et anti-Stokes) et la diffusion élastique (Rayleigh) ainsi que leurs correspondances en fréquence.

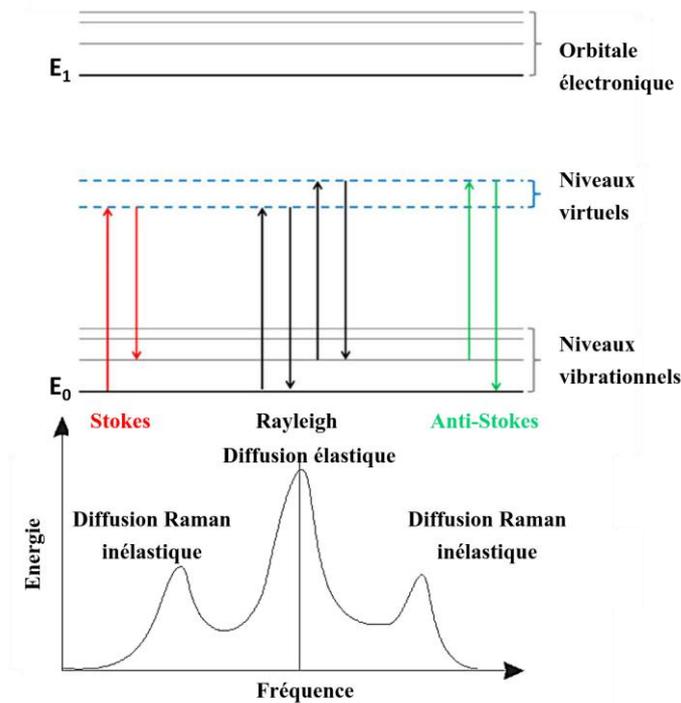


FIGURE. 2.4 – Principe de la spectroscopie Raman.

Pour obtenir un spectre Raman, il faut que l'échantillon soit excité par une lumière monochromatique. La différence entre l'énergie d'excitation et celle diffusée donne les informations sur les énergies de modes de vibration de la molécule analysée et les positions des bandes correspondent à leurs fréquences propres. Il est donc possible de faire l'analyse de la composition chimique de l'échantillon et sa structure moléculaire [114].

Par ailleurs, la section efficace de diffusion Raman est très faible, c'est-à-dire, que seule une faible partie du rayonnement incident sera effectivement diffusée de manière inélastique par l'objet étudié. Donc, l'utilisation d'une grande quantité de la matière est nécessaire pour collecter un signal Raman exploitable. Ceci la rend inutilisable pour de faibles concentrations et inadaptée pour la caractérisation des nano-objets. Pour observer de faibles concentrations de molécules, il est alors nécessaire d'utiliser des techniques permettant d'augmenter le signal Raman comme la diffusion Raman exaltée de surface (SERS).

## 2.4 Diffusion Raman exaltée de surface (SERS)

La diffusion Raman exaltée de surface (SERS, pour Surface Enhanced Raman Scattering en anglais) est un phénomène qui fut découvert en 1974 par M. Fleischmann [115], lors d'une amplification de l'intensité du signal Raman de la molécule de pyridine adsorbée sur une électrode d'argent rugueuse. Plus tard, cet effet d'exaltation fut attribué à deux origines, une origine électromagnétique [116] et une origine chimique [117].

L'origine chimique explique ce phénomène d'exaltation du signal Raman en SERS par un transfert de charges entre le métal et la molécule cible (formation d'un complexe métal/molécule). L'exaltation due à l'effet chimique est souvent négligée puisque sa contribution conduit à des modifications d'exaltation d'un facteur 10 à 100 fois [118, 119]. Par contre, l'origine électromagnétique explique l'exaltation du signal Raman par l'excitation des plasmons de surface localisés à la surface de la NP [120]. La figure. 2.5 montre une amplification de l'intensité du signal Raman de la Rhodamine 6G autour d'une NP d'or.

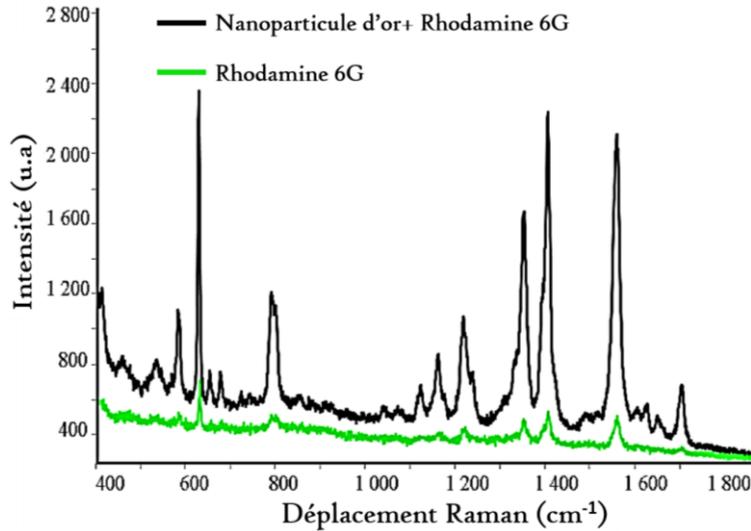


FIGURE. 2.5 – Comparaison entre un spectre Raman (vert) et un spectre SERS (noir) de la molécule Rhodamine 6G [121].

En fait, l'excitation d'une NP métallique par une onde lumineuse induit la formation d'un champ local ( $E_{loc}$ ) à la surface de la NP exalté par rapport au champ électrique excitateur ( $E_0$ ) [120, 122]. L'intensité induite étant proportionnelle au carré du champ électrique de l'onde excitatrice, cela implique l'apparition d'un premier facteur d'exaltation proportionnel au carré de l'exaltation du champ local à la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_0$ ) défini par  $M_{loc}^2(\lambda_0) = (E_{loc}(\lambda_0)/E_0)^2$ . Ensuite, le champ Raman diffusé par les molécules proches ou adsorbées sur cette surface interagit également avec le champ exalté localement par la NP induisant une deuxième exaltation à la longueur d'onde de diffusion Raman ( $\lambda_R$ ) définie par  $M_{loc}^2(\lambda_R) = (E_{loc}(\lambda_R)/E_0)^2$ . Alors, le facteur d'exaltation électromagnétique SERS total  $G$  est le produit de la contribution de ces deux processus et s'exprime sous la forme  $G = M_{loc}^2(\lambda_0) \times M_{loc}^2(\lambda_R)$ . Souvent, la longueur d'onde de réémission Raman est proche de la longueur d'onde d'excitation, ce qui implique que  $M_{loc}(\lambda_0) \approx M_{loc}(\lambda_R)$  et donc, le facteur d'amplification est égal à  $G \approx M_{loc}^4(\lambda_0)$  [120, 122, 123]. On parle alors de l'approximation en champ électrique local à la puissance quatre, donné par la relation suivante [123] :

$$G = \left( \frac{E_{loc}(\lambda_0)}{E_0} \right)^4 \quad (2.1)$$

C'est pour cela qu'il est communément admis que l'exaltation SERS est à la puissance 4 de l'exaltation locale du champ électromagnétique produit par la NP. La figure. 2.6 montre le principe du SERS autour d'une NP d'or.

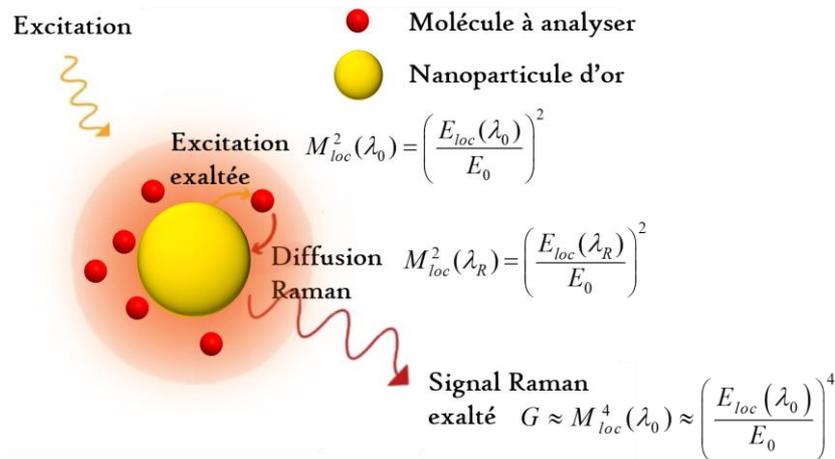


FIGURE. 2.6 – Principe de la diffusion Raman exaltée de surface SERS [123].

Toute molécule se trouvant à proximité de la surface métallique nano-structurée, son signal Raman s'exalte ce qui permet sa détection à de très faibles concentrations [124, 125].

### 2.4.1 Les paramètres influençant l'effet SERS

D'une manière générale, le phénomène SERS se produit soit sur une surface métallique ayant une rugosité à l'échelle nanométrique (substrat) ou sur des NPs métalliques.

Les colloïdes d'or sont très utilisés dans les applications liées au SERS, en raison de la variété des géométries (taille et forme) et la facilité de leur production avec un faible coût par différentes méthodes de synthèse chimiques développées ces dernières années [126–128]. Avec ces colloïdes, les propriétés optiques peuvent être accordées et modifiées sur une très large gamme spectrale afin de correspondre à la longueur d'onde d'excitation souhaitée [129]. La variation de la forme engendre la localisation d'un champ électromagnétique intense sur différentes régions de la NP métallique [130]. De plus, l'utilisation de différentes formes de NPs métalliques rugueuses en présence des pointes à la surface (nano-étoile [131], nano-fleurs [132] et nano-bâtonnets [133]) permet l'augmentation du facteur d'exaltation [134] ainsi l'augmentation du signal SERS [130]. La figure. 2.7 montre une comparaison des spectres SERS de la Rhodamine 6G autour de différentes formes de NP d'or. Il est à noter que plus la NP présente des points chauds (nano-étoiles ou nano-oursins) plus le signal SERS est exalté [135].

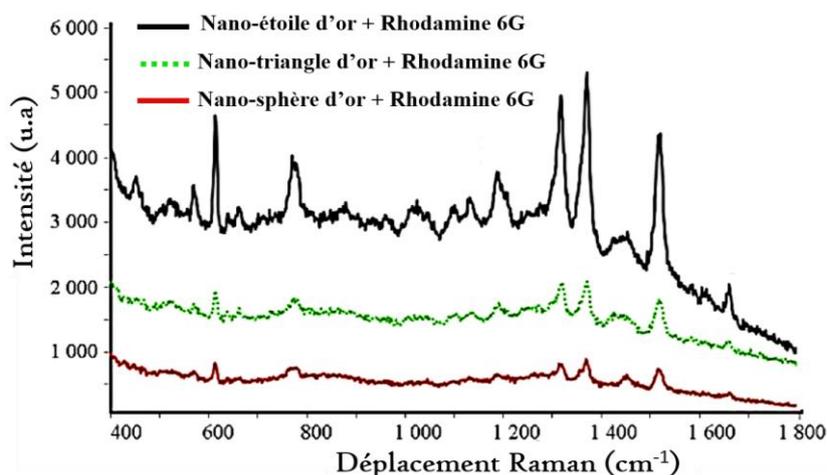


FIGURE. 2.7 – Spectres SERS de la Rhodamine 6G à différentes formes de NPs d'or [121].

## 2.5 Techniques de caractérisation des nanoparticules

L'absorption et la diffusion dues à l'interaction de la lumière avec les NPs peuvent être caractérisées par plusieurs techniques. Ces techniques sont souvent basées sur des équipements optiques comme la microscopie, la spectroscopie ainsi que leurs combinaisons.

### 2.5.1 La spectroscopie UV-VIS

La spectroscopie d'absorption UV-visible est une technique d'analyse très utilisée pour étudier les propriétés optiques des échantillons dans les domaines d'ultra-violet et du visible. Elle est basée sur la propriété des échantillons d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. La bande d'absorption correspond aux longueurs d'onde de la radiation qui provoque la transition électronique, elle est caractérisée par sa position en longueur d'onde et par son intensité reliée au coefficient d'extinction molaire.

En effet, la spectroscopie UV-visible consiste à mesurer l'atténuation d'un rayon lumineux (source de lumière blanche) en fonction de la longueur d'onde, lorsque celui-ci traverse un milieu contenant une espèce absorbante. Une analyse quantitative est permise par l'utilisation de la loi de Beer-Lambert donnée par :  $A = \epsilon.C.l$  où,  $A$  est l'absorbance,  $C(mol.L^{-1})$  est la concentration de la solution absorbante,  $l(cm)$  est la valeur du trajet optique et  $\epsilon(L.mol^{-1}.cm^{-1})$  est le coefficient d'extinction molaire.

Nous obtenons des informations très importantes sur les NPs par le biais d'une mesure par la spectroscopie UV-Vis telles que : la détermination de la bande d'extinction caractéristique (LSPR) ainsi la détection des décalages de la LSPR dans le cas d'une modification soit du milieu environnant, soit de la taille ou de la forme de la NP [136].

## 2.5.2 Caractérisation électrostatique (potentiel Zêta)

Le potentiel Zêta est une technique qui permet la caractérisation de la charge électrique de la surface des colloïdes en fonction de son environnement. Il représente la charge de la surface de la particule, et c'est un indicateur des interactions de répulsion ou d'attraction électrostatiques entre particules, qui est affecté par le pH, la conductivité et la concentration ionique [137, 138].

Quand les particules sont mises en mouvement, elles s'entourent d'ions organisés en une «double couche électrique» : une couche interne s'accroche à la particule formant ainsi une couche d'ions adhérents dite couche dense, appelée aussi couche de Stern, et une couche extérieure diffuse dont les ions sont plus libres, comme illustré en figure. 2.8. La limite entre les deux couches s'appelle plan de cisaillement, où les ions et les particules forment une entité stable. Alors, le potentiel Zêta est la mesure de la différence de potentiel entre ce plan de cisaillement et le milieu de dispersion [139].

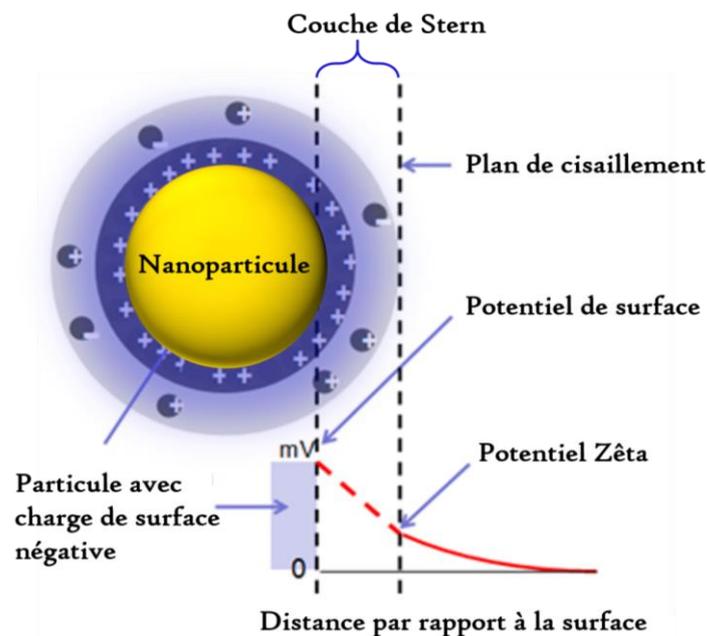


FIGURE. 2.8 – Schéma de la double couche et du potentiel Zêta [140].

En effet, plus le potentiel Zêta est éloigné en valeur absolue de zéro, plus les répulsions entre les particules deviennent prépondérantes, ainsi le rapprochement entre les particules est défavorisé, la suspension est donc stable. Cependant, quand le potentiel Zêta est faible les particules peuvent s'attirer et s'agréger, alors la suspension est instable [141].

### **2.5.3 La spectroscopie de corrélation**

Les NPs présentent un certain nombre de propriétés uniques directement corrélées à leur taille, considérée comme la clé de leur fonctionnement. Pour cette raison, il est important de pouvoir caractériser les distributions de taille dans les suspensions avec précision. Alors, différentes techniques ont été développées pour la détermination de la taille. Il est très connu que la microscopie électronique à transmission (TEM) peut remonter à la taille des NPs. Cependant, il est difficile de prendre des images de NPs hydrosolubles à haute résolution, en raison de l'agrégation dans la préparation des échantillons TEM et cela est due à la provocation d'interaction entre la grille de cuivre et l'échantillon déposé [142]. Par ailleurs, un outil d'observation in situ très sensible à haute résolution est nécessaire.

La spectroscopie de corrélation est une technique analytique basée sur l'analyse des fluctuations des signaux provenant des molécules dans une solution observée. Traditionnellement, cette technique est utilisée pour l'étude de la diffusion (déplacement) moléculaire ainsi que la dynamique des réactions chimiques dans des solutions diluées. Récemment, ce même principe a été appliqué aux NPs afin de mesurer leur taille en solution et aussi fournir des informations pratiques sur leur comportement sans avoir à les retirer de leur environnement [143].

#### **2.5.3.1 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)**

Parmi les techniques de caractérisation de la taille de particule basées sur la corrélation temporelle, il existe la diffusion dynamique de la lumière (DLS, pour Dynamic Light Scattering) qui est souvent appelée spectroscopie de corrélation de photons ou diffusion quasi-élastique de la lumière [144]. Il s'agit d'une technique de mesure permettant d'obtenir les informations à partir des fluctuations temporelles de l'intensité de la lumière diffusée par les particules en solution soumises au mouvement brownien. L'information est contenue dans la fonction de corrélation des fluctuations de l'intensité du signal diffusé, qui exprime le degré de similitude entre deux instants séparés par un décalage temporel. Cette courbe de corrélation permet de déterminer le rayon hydrodynamique (taille) des particules.

Néanmoins, cette technique est limitée par la faible résolution due au grand volume d'observation ainsi que la grande perte du signal diffusé qui est collecté par un seul détecteur sous un seul angle considéré [145].

### **2.5.3.2 La spectroscopie de corrélation combinée au microscope confocal**

Actuellement, la spectroscopie de corrélation (des signaux de fluorescence, de diffusion, ou de diffusion Raman exaltée de surface) s'est imposée comme un outil d'analyse incontournable pour étudier un grand nombre de processus dynamique à l'échelle moléculaire avec une très grande résolution. Les applications de la spectroscopie de corrélation se sont multipliées, pour analyser les systèmes colloïdaux complexes avec une très grande sensibilité (suivi de molécules ou nano-objets individuels pour des échantillons en concentration de l'ordre du pico-molaire), et pour une résolution spatio-temporelle élevée (volume confocal de l'ordre du femtolitre avec un temps caractéristique de l'ordre de la dizaine de microsecondes). Un potentiel immense de la spectroscopie de corrélation appliquée dans le domaine biomédical permet l'étude des phénomènes biologiques (les interactions intra-ou intermoléculaires), chimiques (les interactions moléculaires ou suivi des modifications de conformation) et physique (détermination des concentrations ainsi que les rayons hydrodynamiques) [146, 147].

## **2.6 Conclusion**

Ce chapitre a mis en évidence la recherche autour des NPs qui connaît un engouement très marqué dans la communauté scientifique. De ce fait, nous avons passé en revue les différentes applications dépendant essentiellement de leurs propriétés. Ensuite, nous avons présenté la technique de la spectroscopie SERS qui exploite les propriétés optiques des NPs métalliques et permet à la fois une détection spécifique des molécules à l'échelle de traces ainsi une caractérisation des molécules adsorbées ou accrochées à la surface des NPs. La performance de cette technique dépend fortement de la nature, la taille, la forme et la chimie de surface de la NP.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons principalement à la spectroscopie de corrélation pour la mesure des tailles (rayons hydrodynamiques) des NPs qui permet à la fois la caractérisation in situ du rayon hydrodynamique des NPs métalliques et le suivi dynamique de leurs interactions avec d'autres molécules. Alors, nous nous focaliserons sur la caractérisation et l'application de cette technique qui sera l'objectif du prochain chapitre.

# Chapitre 3

## La spectroscopie de corrélation de fluorescence FCS

### Sommaire

---

<b>3.1 Introduction</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2 La fluorescence</b> .....	<b>38</b>
3.2.1 Principe de la fluorescence .....	38
3.2.2 Propriétés des fluorophores.....	40
3.2.2.1 La durée de vie de la fluorescence .....	40
3.2.2.2 Le rendement quantique de la fluorescence .....	41
3.2.2.3 Le coefficient d'extinction .....	41
3.2.2.4 La photo-stabilité et l'extinction de fluorescence .....	41
<b>3.3 Théorie de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)</b> .....	<b>42</b>
3.3.1 Principe de la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS).....	42
3.3.2 Aspect mathématique de la fonction de corrélation en FCS .....	44
3.3.3 Les paramètres accessibles par la fonction de corrélation en (FCS).....	48
3.3.3.1 Concentration du fluorophore .....	48
3.3.3.2 Le rayon hydrodynamique .....	50
3.3.3.3 Aspects photophysiques des mesures FCS : état triplet .....	51
3.3.4 Les applications de la FCS.....	52
<b>3.4 Conclusion</b> .....	<b>53</b>

---

## 3.1 Introduction

Depuis, le développement de la microscopie optique et la capacité d'imager différents objets, les scientifiques ont toujours eu envie d'atteindre le niveau moléculaire, dans l'espoir de comprendre divers processus dynamiques à des échelles spatio-temporelles très faibles. Pour ses raisons, les physiciens ont tenté de répondre aux aspirations par la mesure du signal provenant de l'ensemble des molécules dont ils ne peuvent pas imager, afin de déduire certaines grandeurs physiques pertinentes. Parmi ces différentes méthodes, la technique nommée la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy). Cette dernière repose sur l'analyse des fluctuations temporelles de l'intensité de fluorescence émise par les molécules ou particules dans le volume d'observation défini par le faisceau d'illumination focalisé sur le milieu à analyser ainsi que le système de collection confocal. Ensuite, les variations temporelles de l'intensité de fluorescence sont collectées et corrélées temporellement. Récemment, la FCS est devenue un outil d'analyse de haute résolution spatio-temporelle applicable dans divers domaines notamment en biologie. En plus de cela, la FCS peut être considérée comme une technique de caractérisation à molécule unique. Dans ce cas, le signal de fluorescence provient d'une seule molécule ou particule [148].

Ce chapitre est scindé en deux parties :

- La première partie comporte les différentes notions théoriques, les concepts relatifs à la fluorescence ainsi que les propriétés des fluorophores.
- La seconde partie explique la théorie et le principe de la spectroscopie de corrélation de fluorescence.

## 3.2 La fluorescence

### 3.2.1 Principe de la fluorescence

Le phénomène de la fluorescence peut être défini comme la propriété de certaines molécules (appelées fluorophores) à absorber la lumière à une certaine longueur d'onde pour la restituer ensuite à une longueur d'onde différente. C'est un processus de désexcitation par lequel une molécule passe d'un état électronique excité du à un effet physique (absorption de la lumière) à un état plus bas en générant de la lumière [149].

Alexandre Jablonski a été le premier à proposer les relations entre le niveau d'énergie et la fluorescence, une molécule possède différents états électroniques excités dites états singulets ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ) et chaque état est divisé en un certain nombre de niveaux d'énergie vibrationnels et rotationnels [150]. Le diagramme de Jablonski, illustré par la figure 3.1, permet de visualiser les différents

processus mis en jeu au cours des transitions entre les états. Le résultat est décrit en trois étapes avec des temps caractéristiques très distincts : l'excitation, la relaxation et l'émission de la fluorescence. L'excitation d'une molécule s'effectue par l'absorption d'un photon de niveau fondamental  $S_0$  vers les différents niveaux vibrationnels de l'état singulet  $S_1$ , la durée caractéristique associée à ce processus est immédiat, de l'ordre de la femtoseconde ( $10^{-15}$  s), alors que le temps associé aux relaxations vibrationnelles et/ou conversion interne (par lesquels l'énergie est perdue sans émission de lumière) est de l'ordre de la picoseconde ( $10^{-12}$  s). Par contre, le processus de l'émission de la fluorescence qui est le processus inverse à l'absorption correspond au saut énergétique entre l'état électronique excité  $S_1$  et les différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental  $S_0$ , il se produit sur des temps plus longs de l'ordre de la nanoseconde ( $10^{-9}$  s) [151].

Il y a aussi la possibilité d'observer d'autres processus qui peuvent entrer en compétition avec l'émission de la fluorescence. En effet, la molécule excitée à un niveau élevé peut retourner au niveau fondamental de façon non radiative, interactions entre molécules peuvent induire des transferts d'énergie sous forme de chaleur, lors de croisements inter-systèmes. Dans cette dernière, l'énergie peut être transmise de l'état singulet  $S_1$  vers l'état triplet  $T_1$  d'une manière non radiative. La désexcitation de l'état triplet  $T_1$  à l'état fondamental  $S_0$  se fait de manière radiative et correspond à la phosphorescence. L'émission de phosphorescence est située à des longueurs d'onde plus grandes que la fluorescence (l'état triplet a une énergie moins importante que celle de l'état singulet de la même configuration) donc les durées de vie associées sont beaucoup plus longues [152].

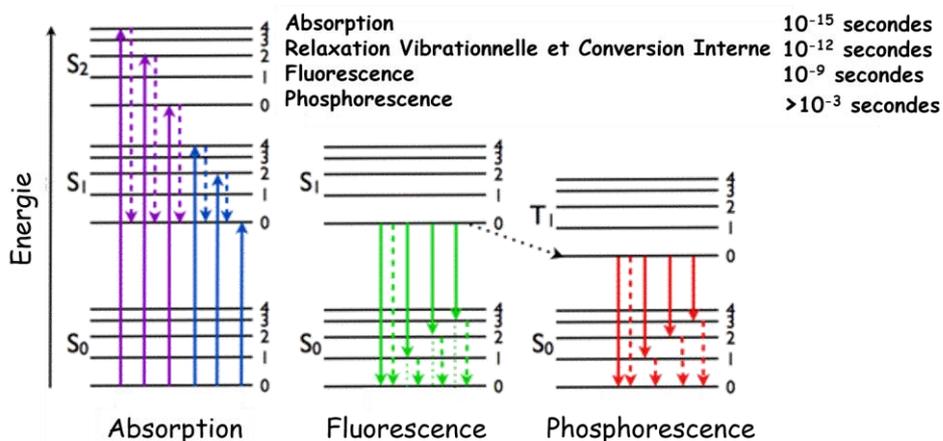


FIGURE. 3.1 – Diagramme de Jablonski [151].

Le diagramme présenté en figure. 3.1 schématise les divers processus mis en jeu : l'absorption, la fluorescence et la phosphorescence sont représentées par des flèches pleines, alors que les relaxations vibrationnelles et conversions inter-systèmes sont représentées par des flèches en pointillées.

### 3.2.2 Propriétés des fluorophores

#### 3.2.2.1 La durée de vie de la fluorescence

La durée de vie de la fluorescence d'une molécule correspond au temps moyen pendant lequel la molécule demeure excitée avant de retourner à l'état fondamental [149].

Lors du phénomène de désexcitation, comme représenté sur la figure. 3. 2, les molécules à l'état excité  $S_1$  vont pouvoir retourner à l'état fondamental  $S_0$  par deux processus possibles ; le premier correspond à une désexcitation non radiative avec une probabilité notée ( $k_{nr}$ ) et le deuxième correspond à une désexcitation radiative par l'émission de la fluorescence avec une probabilité notée ( $k_r$ ).

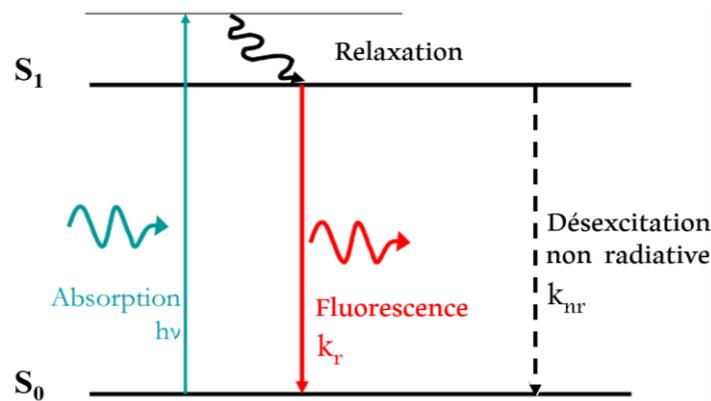


FIGURE. 3.2 – Diagramme de Jablonski simplifié.

Supposons que  $N(t)$  est la population de fluorophores se trouvant à l'état excité, la dépopulation de l'état excité va être en fonction de deux probabilités radiative et non radiative donc, la vitesse de désexcitation est donnée par l'équation différentielle ci-dessous [151] :

$$-\frac{dN(t)}{dt} = (k_r + k_{nr})N(t) \quad (3.1)$$

L'intégration de cette équation différentielle conduit à l'équation suivante :

$$N(t) = N_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (3.2)$$

où,  $N_0$  est le nombre de molécules dans l'état excité  $S_1$  à l'instant 0 avec «  $\tau$  » est la durée de vie de fluorescence donnée par [151] :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (3.3)$$

### 3.2.2.2 Le rendement quantique de la fluorescence

Une autre propriété importante de fluorophore est le rendement quantique «  $\Phi$  », qui définit l'efficacité de l'émission de fluorescence. Ce dernier est donné par le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés [151, 153], et s'écrit comme suit :

$$\Phi = \frac{k_r}{k_{nr} + k_r} \quad (3.4)$$

Ce rendement varie entre 0.1 et 1. Quand ce rendement atteint 1, le signal de fluorescence est très intense ce qui correspond à un bon fluorophore [153].

### 3.2.2.3 Le coefficient d'extinction

Le coefficient d'extinction molaire ' $\epsilon$ ' ou l'absorbance spécifique est une propriété intrinsèque de l'espèce, qui exprime l'efficacité avec laquelle une molécule absorbe la lumière à une longueur d'onde donnée. Il provient de la loi de Beer-Lambert (voir chapitre 2, section 2.5.1) ;  $\epsilon = A/(C.l)$  où, ' $A$ ' l'absorbance, ' $C$ ' la concentration de l'échantillon et ' $l$ ' la longueur de la cuve. Cette valeur peut être un critère utile pour la sélection des fluorophores.

### 3.2.2.4 La photo-stabilité et l'extinction de fluorescence

Le phénomène de photo-blanchiment (photobleaching) se produit quand un fluorophore perd de façon définitive la capacité d'émettre des photons de fluorescence en raison de dommages chimiques photo-induits. En effet, au cours de la transition vers l'état triplet, un fluorophore peut interagir avec d'autres molécules, ce qui entraîne des modifications non réversibles. Aussi, les fluorophores exposés à de nombreux cycles d'excitation et d'émission perdent leur capacité à émettre des photons. Le nombre moyen de cycles avant photo-blanchiment dépend du fluorophore ainsi que son environnement.

En revanche, l'extinction momentanée de fluorescence (Quenching) correspond à tout phénomène diminuant et amortissant l'intensité de la fluorescence qui peut avoir diverses origines. Généralement, l'extinction est due au contact des molécules en solution ou à proximité immédiate entre un fluorophore à l'état excité et une molécule dite extinctrice qui désexcite le fluorophore sans émission de photons [152].

Chaque molécule peut être caractérisée par un spectre d'absorption et d'émission qui lui est propre. Un exemple de spectre d'absorption et d'émission correspondant à l'Alexa 532 est représenté par la figure. 3.3.

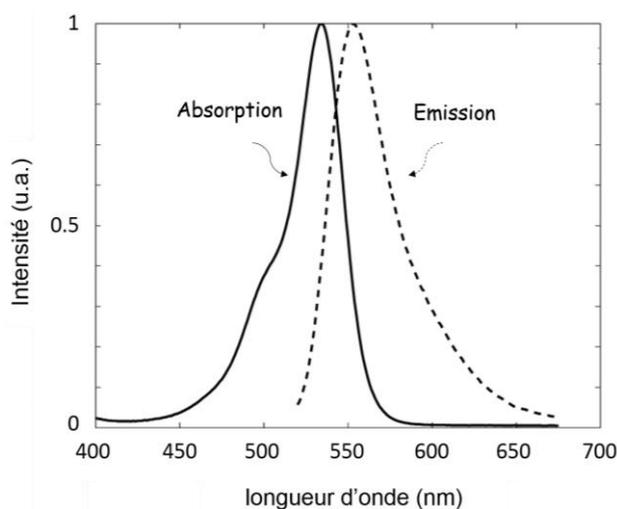


FIGURE. 3.3 – Spectre d’absorption et d’émission d’Alexa 532. Données obtenues auprès du fabricant [154].

### 3.3 Théorie de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

Avec le développement des marqueurs fluorescents à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, la spectroscopie optique de fluorescence est devenue le meilleur outil d’analyse de haute sélectivité. Depuis, la spectroscopie de fluorescence a bénéficié de plusieurs avancées scientifiques. Au cours de ces dernières années, de nombreuses méthodes de spectroscopies ont été développées pour obtenir le maximum d’informations et répondre aux questions complexes posées par un échantillon à l’échelle moléculaire. Parmi les différentes méthodes d’analyse de molécules en solution établies, on retrouve la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) [155].

#### 3.3.1 Principe de la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS)

Au début de l’année 1972, un groupe de chercheurs américains et suédois développent une nouvelle méthode de caractérisation pour mesurer les coefficients de diffusion, la cinétique des interactions et les dynamiques moléculaires en solution. Cette technique est fondée sur un principe différent des technique conventionnelles, nommée la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy) [156]. D’après les pionniers Magde, Elson et Webb, cette technique repose sur l’analyse des fluctuations d’intensité de fluorescence émise au cours du temps, en opposition aux techniques classiques basées sur l’analyse de l’intensité moyenne de la fluorescence produite par les molécules fluorescentes.

Ce nouveau concept de FCS permet de tirer profit des minuscules variations du signal de fluorescence pour extraire les informations concernant les paramètres physico-chimiques impliqués dans leur apparition, et cela par une évaluation de l’amplitude et le temps caractéristique des fluctuations d’intensité en utilisant la fonction de corrélation [157, 158].

Ces fluctuations de fluorescence sont majoritairement provoquées par la diffusion des molécules due au mouvement brownien à travers le volume d'analyse, c'est-à-dire, les déplacements aléatoires dans les trois directions de l'espace qui proviennent des collisions entre les molécules du solvant et les particules. En principe, le coefficient de diffusion et le nombre moyen de molécules peuvent être déterminés à partir de ces fluctuations de fluorescence. En plus de la diffusion, tout processus se traduisant par une fluctuation de l'intensité de fluorescence peut être mesuré par la FCS [159].

Bien que le concept présente un potentiel important, le montage initial de la technique FCS n'était néanmoins pas à la hauteur en termes de sensibilité. En 1992, les perspectives d'application de la FCS se sont remarquablement répandues. Lorsque Rigler a combiné le microscope confocal au dispositif expérimental de la FCS, et cela en introduisant un trou micrométrique en position conjugué par rapport à l'excitation [160]. En fait, cet arrangement améliore la résolution par un rejet de toute fluorescence en provenance des molécules en dehors du plan confocal, cela permet de confiner le volume d'observation (PSF) de l'ordre du femto-litre ( $\sim$ fL) et ainsi réduire le nombre de molécules observées.

Les avancées technologiques ne cessent d'améliorer la FCS. Par exemple; l'excitation en focalisant l'illumination par le biais d'un objectif de microscope à grande ouverture numérique, la détection par l'utilisation des photodiodes à avalanche très sensibles, l'adaptation de filtres passe-bande sélectifs afin de discriminer la fluorescence de l'arrière-plan pour obtenir un meilleur rapport signal sur bruit, et les systèmes électroniques de corrélation pour une analyse statistique fine des fluctuations de fluorescence [159, 160].

Actuellement, la FCS est devenue une technique très efficace notamment en biophysique pour étudier les processus moléculaires. La grande résolution spatio-temporelle du système permet d'accéder à un grand nombre de paramètres physico-chimiques qui ne se limite pas seulement à la détermination du temps de diffusion et les concentrations locales, mais peut s'étendre également à l'analyse d'autres caractéristiques (in vitro et in vivo) [161–163] autant qu'elles engendrent des fluctuations de fluorescence supplémentaires telles que : la brillance, les paramètres photophysiques, le rayon hydrodynamique et tant d'autres interactions.

La figure. 3.4 résume le principe de la technique FCS. La figure. 3.4. (a) montre la diffusion de molécules fluorescentes issues du plus petit volume confiné. La figure. 3.4. (b) représente les fluctuations de l'intensité de fluorescence qui sont produites par la diffusion de molécules à travers le volume confocal. Dans ce cas de figure, elles sont détectées et enregistrées en fonction du temps. La figure. 3.4. (c) schématise le calcul mathématique de la fonction de corrélation temporelle des fluctuations de l'intensité de fluorescence.

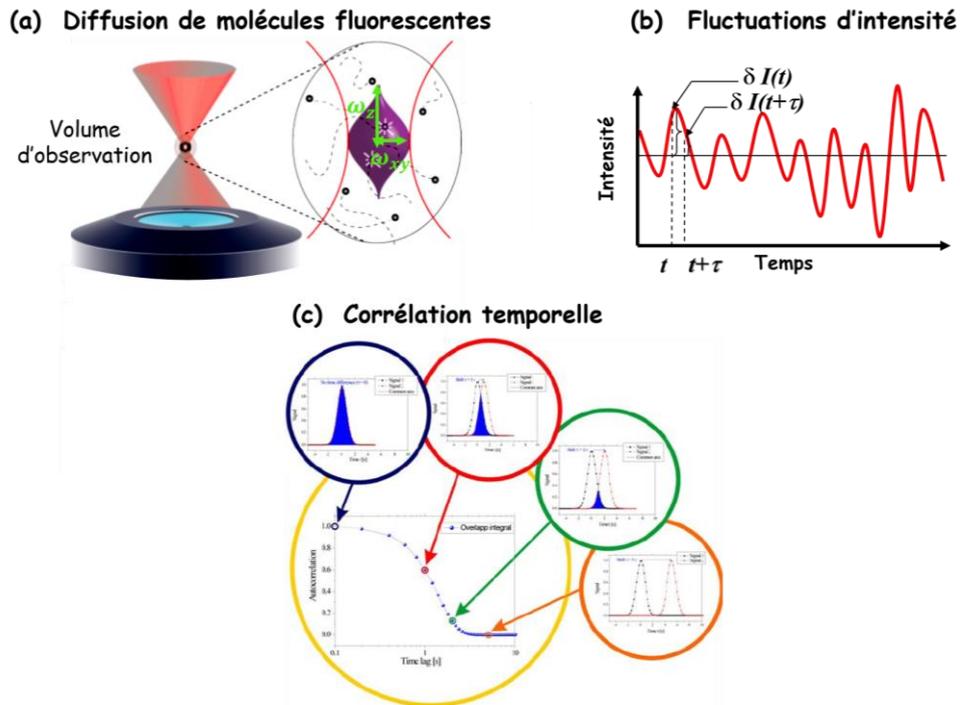


FIGURE. 3.4 – Schéma illustrant le principe de la spectroscopie de corrélation de fluorescence [164].

### 3.3.2 Aspect mathématique de la fonction de corrélation en FCS

La fonction de corrélation temporelle notée  $G(\tau)$  permet d'évaluer l'amplitude et le temps caractéristique des fluctuations de la fluorescence. La fonction de corrélation normalisée est définie ainsi [156–158] :

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.5)$$

Cette fonction fournit une mesure de l'autosimilarité entre les signaux temporels après un délai de temps ' $\tau$ '.

Les fluctuations de l'intensité de fluorescence dues aux mouvements des molécules via le volume confocal peuvent être définies par la relation suivante :

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (3.6)$$

avec,

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad (3.7)$$

où  $\langle \rangle$  désigne une moyenne.

Si les fluctuations temporelles de fluorescence sont directement liées aux fluctuations de concentrations locales ( $\delta C$ ), c'est-à-dire, à la diffusion des molécules qui entrent et sortent du volume confocal, les variations de fluctuation peuvent être écrites de la façon suivante :

$$\delta F(t) = \kappa \int_V I_{exc}(\vec{r}) \cdot CEF(\vec{r}) \cdot \sigma \cdot \Phi \cdot \delta C(\vec{r}, t) dV \quad (3.8)$$

où  $\kappa$  : est l'efficacité de détection du système.  $I_{exc}(\vec{r})$  : est l'intensité d'excitation dans le plan focal de l'objectif de microscope.  $CEF(\vec{r})$  : est la fonction d'efficacité de collection (sans dimension).  $\sigma$  : est la section efficace d'absorption du fluorophore.  $\Phi$  : est le rendement quantique du fluorophore.  $C(\vec{r}, t)$  : est la concentration à l'instant 't' et à la position ( $\vec{r}$ ) des molécules fluorescentes.

Pour simplifier l'équation (3.8), le terme  $I_{exc}(\vec{r}) \cdot CEF(\vec{r})$  peut-être combiné en une fonction qui décrit l'Efficacité de Détection Moléculaire qui sera notée  $MDE(\vec{r})$  (pour Molecular Detection Efficiency) ; c'est-à-dire, le volume d'observation. D'une manière générale cette fonction est décrite par une gaussienne dans les trois directions de l'espace par l'équation suivante [160]:

$$MDE(r(x, y, z)) = \exp\left(-2\left(\frac{x^2 + y^2}{\omega_{xy}^2}\right)\right) \exp\left(-2\left(\frac{z^2}{\omega_z^2}\right)\right) \quad (3.9)$$

où, les paramètres  $\omega_{xy}$  et  $\omega_z$  décrivent la taille du volume d'observation. Dans ces conditions, l'équation (3.8) devient :

$$\delta F(t) = \kappa \int_V MDE(\vec{r}) \cdot \sigma \cdot \Phi \cdot \delta C(\vec{r}, t) dV \quad (3.10)$$

En injectant l'équation (3.9) dans l'équation de la fonction de corrélation (3.5), on obtient l'équation suivante :

$$G(\tau) = 1 + \frac{\iint MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle dV dV'}{(\langle C \rangle \int MDE(\vec{r}) dV)^2} \quad (3.11)$$

Dans le cas où, les variations de la concentration sont uniquement dues aux molécules d'une seule espèce qui diffusent librement dans le volume confocal, alors  $\delta C(\vec{r}, t)$  obéit à l'équation classique de diffusion suivante [165–169] :

$$\frac{\partial C(\vec{r}, t)}{\partial t} = \frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta C(\vec{r}, t) \quad (3.12)$$

où 'D' est le coefficient de diffusion des molécules fluorescentes.

Donc, le terme  $\langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle$  peut être calculé avec une probabilité qu'une particule, qui était à la position  $\vec{r}$  au temps 't' d'être à la position  $\vec{r}'$  au temps  $(t + \tau)$ . Les conditions aux limites pour les fluctuations de concentrations imposent :

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

Alors :

$$\langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle = \frac{1}{\langle C \rangle (4\pi D\tau)^{3/2}} \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}{4D\tau}\right) \quad (3.13)$$

La fonction de corrélation des fluctuations de concentration conduit à l'expression suivante :

$$G(\tau) = 1 + \frac{e^{-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}{4D\tau}}}{\langle C \rangle (4\pi D\tau)^{3/2}} \frac{\iint MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') e^{-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}{4D\tau}} dV dV'}{(\langle C(\vec{r}, t) \rangle \int MDE(\vec{r}) dV)^2} \quad (3.14)$$

Introduisant le temps de diffusion ' $\tau_D$ ', ce temps caractéristique représente le temps pendant lequel la molécule traverse le volume d'observation. Il est défini de la façon suivante [160, 170] :

$$\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4D} \quad (3.15)$$

Sachant que la taille du volume d'observation est définie à partir du profil de la *MDE* alors, le volume effectif pour la FCS s'écrit comme suit [160, 165, 167]:

$$V_{eff} = \frac{(\int MDE(\vec{r}) dV)^2}{\int MDE^2(\vec{r}) dV} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z \quad (3.16)$$

Pour une espèce diffusant librement dans les trois dimensions, la fonction de corrélation  $G(\tau)$  peut être réécrite de la manière suivante [160, 170] :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{V_{eff} \cdot \langle C \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\left(1 + \frac{\omega_{xy}^2}{\omega_z^2} \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{1/2}} \quad (3.17)$$

avec,  $V_{eff} \cdot \langle C \rangle = \langle N \rangle$  le nombre de molécule dans le volume effectif. Donc, l'équation finale de la fonction de corrélation est donnée par :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\left(1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{1/2}} \quad (3.18)$$

ou,  $s = \omega_{xy} / \omega_z$  représente le rapport des élongations radiales et axiales du volume effectif.

Un paramètre important en FCS lié directement au rapport signal sur bruit, est le taux de comptage par molécule  $CRM$  (count rate per molecule). Ce dernier représente le nombre de photons émis par molécule par seconde. Ce taux est défini comme suit :  $CRM = \langle F \rangle / \langle N \rangle$ , avec ' $F$ ' est le signal moyen de fluorescence et ' $N$ ' est le nombre moyen de molécules fluorescentes dans le volume effectif, qui est inversement proportionnel à l'amplitude de la fonction de corrélation à ' $\tau=0$ '.

Alors, la fonction de corrélation permet de relier les propriétés statistiques de l'émission de fluorescence aux paramètres clés de la dynamique des fluorophores. La connaissance des paramètres du système (les dimensions du volume effectif) permet en effet, la mesure directe du coefficient de diffusion grâce au temps de diffusion ' $\tau_D$ ' ainsi que la concentration du fluorophore dans la solution en connaissant le nombre moyen de molécules ' $N$ '.

D'après la courbe de corrélation représentée par la figure. 3.5, trois informations peuvent être extraites :

- Le nombre moyen de molécules fluorescentes dans le volume confocal défini à  $G(\tau = 0) = 1 + 1/\langle N \rangle$ .
- Le temps de diffusion pendant lequel le fluorophore traverse le volume confocal est déterminé à la largeur à mi-hauteur de la courbe de corrélation.
- Le mode de diffusion des fluorophores indiqué par le profil de décroissance de la courbe de corrélation.

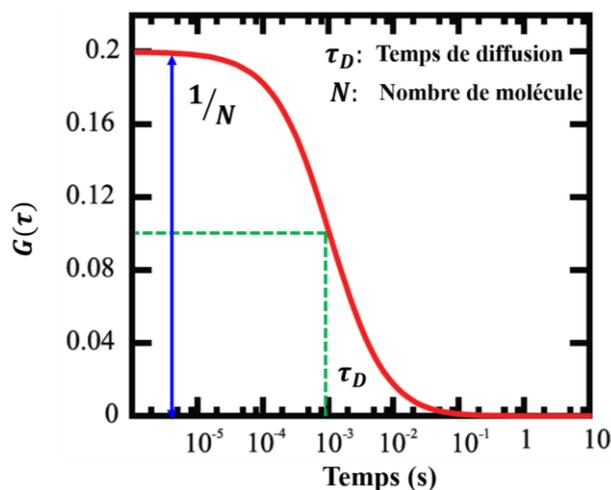


FIGURE. 3.5 – Schéma montrant un exemple de la courbe de corrélation [171].

Le résultat de la fonction de corrélation, décrit par l'équation (3.18), est produit uniquement pour une diffusion brownienne à trois dimensions.

Cependant, si la diffusion des molécules fluorescentes est restreinte au plan ( $xy$ ), l'expression de la fonction de l'Efficacité de Détection Moléculaire (MDE) sera décrite juste pour deux dimensions et les intégrales triples doivent être remplacées par des intégrales doubles. De même, le volume effectif  $V_{eff}$  doit être remplacé par la surface effectif  $S_{eff}$ , dans ce cas, on parle alors d'une diffusion brownienne en 2D. Si la diffusion des molécules fluorescentes est dans une seule direction, la MDE sera décrite juste pour une seule dimension on parle donc, de la diffusion brownienne 1D (figure. 3.6).

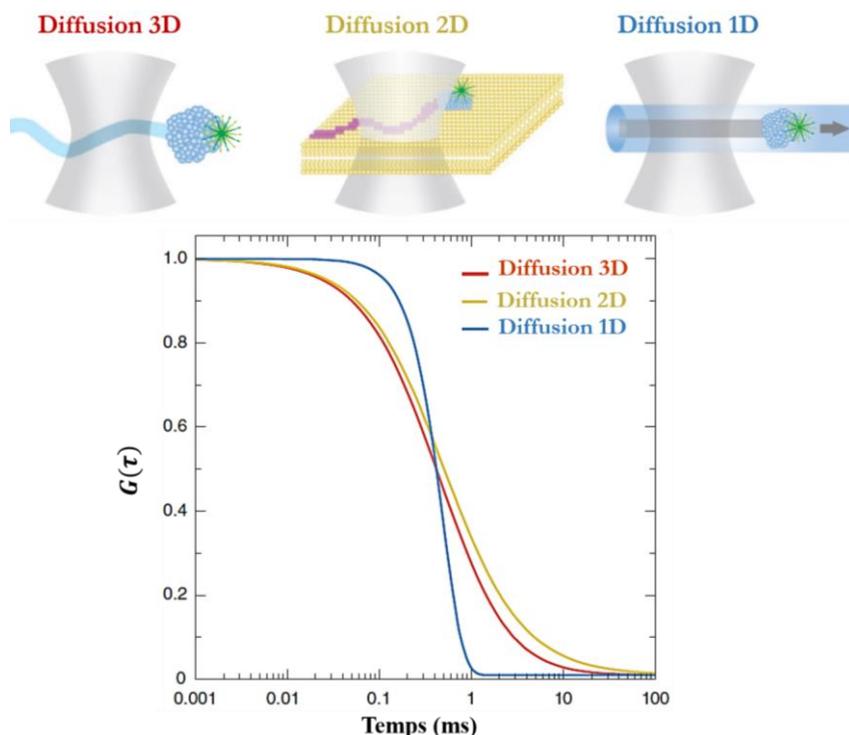


FIGURE. 3.6 – Schéma montrant le profil de la fonction de corrélation pour les différents types de diffusion [167].

### 3.3.3 Les paramètres accessibles par la fonction de corrélation en (FCS)

#### 3.3.3.1 Concentration du fluorophore

La principale application de la FCS est de mesurer la concentration et la constante de diffusion des fluorophores dans le volume confocal (à très faible concentration,  $\sim$  nM). L'amplitude de la fonction de corrélation  $G(\tau)$  consiste à déterminer le nombre moyen de molécules ' $N$ ' qui est directement proportionnel à la concentration de la solution préparée. En effet, l'amplitude de la fonction de corrélation est inversement proportionnelle au nombre moyen de molécules, c'est la raison pour laquelle la FCS était relativement inutilisée dans les années 1970 et 1980. Sans système optique confocal, le volume d'observation était grand, le nombre de molécules était important, par

conséquent les amplitudes des fonctions de corrélation étaient trop faibles pour des mesures fiables [152]. L'effet de la concentration sur la fonction de corrélation est représenté sur la figure. 3.7.

En fait, lorsque la concentration de molécules fluorescentes est faible, un petit nombre de molécules se trouve dans le volume d'observation entraînant un signal de fluorescence fortement fluctuant ; et cela est dû à l'entrée et à la sortie d'une molécule fluorescente. Par conséquent, l'intensité des fluctuations de fluorescence est très importante par rapport à l'intensité moyenne de la fluorescence produite. Cela signifie que lorsque le nombre de molécules fluorescentes diminue, la variation relative de l'intensité de fluorescence par rapport à la valeur moyenne augmente et ce en offrant ainsi une plus grande amplitude pour la fonction de corrélation. En revanche, si la concentration de molécules fluorescentes devient trop élevée, un grand nombre de molécules rentrent et sortent dans le volume d'observation. L'intensité des fluctuations relatives à chaque molécule est donc faible par rapport à l'intensité moyenne de la fluorescence. En outre, la contribution des molécules individuelles devient très faible, les fluctuations d'intensité se chevauchent et ne seront pas importantes. Il en résulte une faible amplitude pour la fonction de corrélation [172].

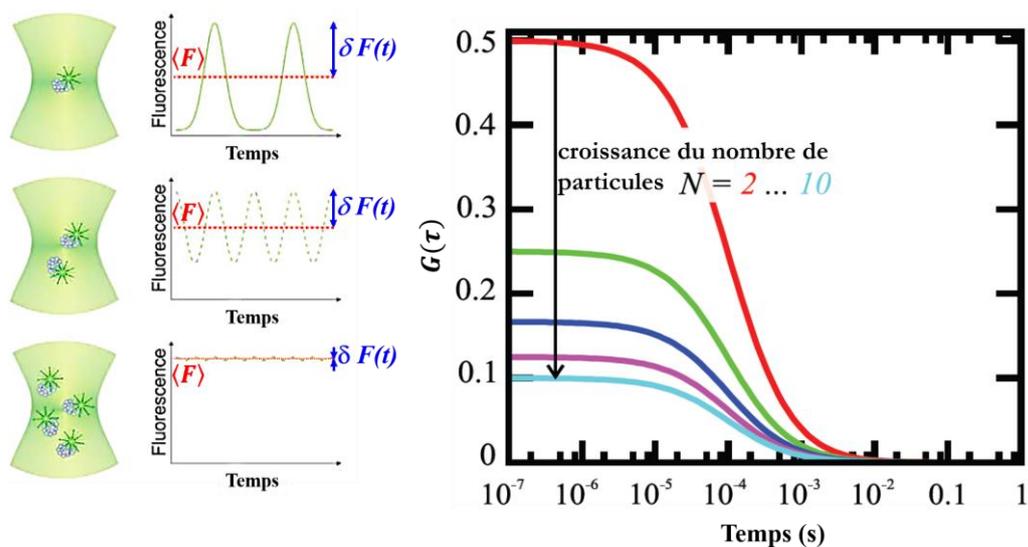


FIGURE. 3.7 – Schéma montrant l'effet de la concentration sur la fonction de corrélation en FCS [155, 171].

L'avantage de la FCS réside dans sa capacité de l'utilisation d'une faible quantité de molécules pour réaliser des mesures satisfaisantes dans un volume d'analyse ayant une taille de l'ordre du femto-litre, ce qui correspond à une concentration allant de l'ordre du nano-molaire ( $< 10^{-9}M$ ) jusqu'au micro-molaire ( $10^{-6} M$ ).

Par ailleurs, la technique FCS a été couplée avec diverses techniques comme le TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) et le STED (STimulated Emission Depletion) pour bénéficier de la grande résolution de ces microscopes. Cela a permis d'étudier les objets à l'échelle de la molécule unique dans les milieux concentrés [173, 174].

### 3.3.3.2 Le rayon hydrodynamique

Il est possible de déterminer la taille des molécules ou particules en utilisant la technique FCS, grâce au temps de diffusion ' $\tau_D$ ' extrait de la courbe de corrélation définie par la fonction  $G(\tau)$ . Le temps de diffusion est lié au coefficient de diffusion qui est relié à son tour au rayon de la particule (sphérique) en solution par l'équation de Stokes-Einstein, de sorte que le rayon d'une particule ou molécule peut être estimé de la manière suivante [152, 167] :

$$R = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (3.19)$$

où,  $R$  est le rayon de la molécule sphérique,  $k$  est la constante de Boltzmann,  $T$  est la température et  $\eta$  est la viscosité.

Par contre, en pratique les molécules étudiées ne sont pas toutes sphériques et la forme peut s'écarter d'une simple sphère. Alors, la taille qui est prise en compte dans cette situation est la taille apparente de la particule en mouvement dans la solution. Donc, au lieu d'utiliser le rayon géométrique ' $R$ ' d'une sphère, on le remplace avec un rayon effectif nommé le rayon hydrodynamique ' $R_h$ ' [175]. Nous avons déjà évoqué la relation entre le temps de diffusion ' $\tau_D$ ' et le coefficient de diffusion ' $D$ ', alors l'équation de Stokes-Einstein est souvent formulée comme suit [146]:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta} \left( \frac{4\tau_D}{\omega_{xy}^2} \right) \quad (3.20)$$

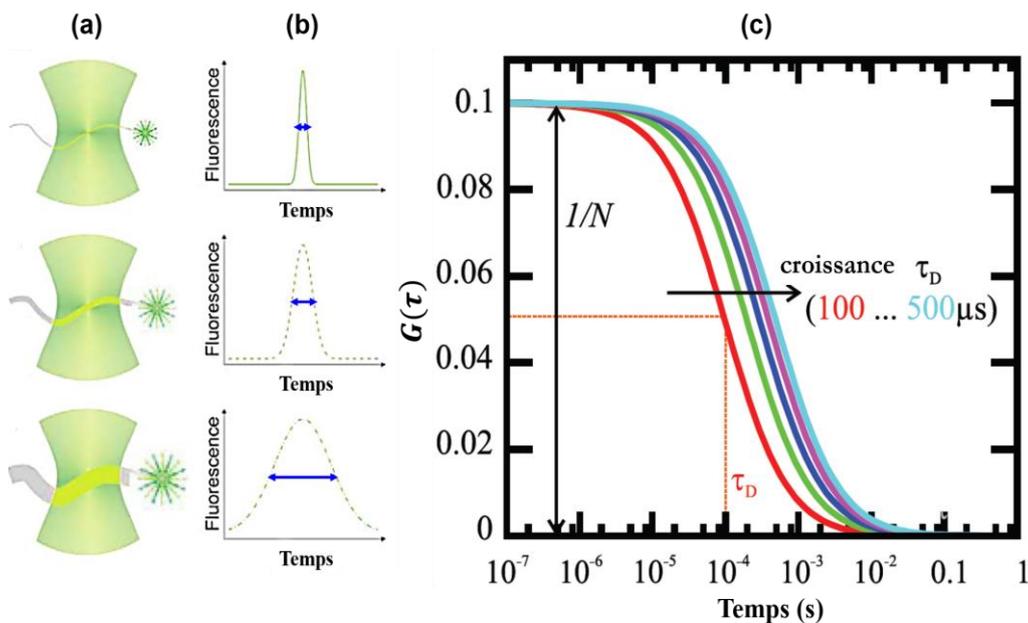


FIGURE. 3.8 – Schéma montrant l'effet de la taille des molécules sur la fonction de corrélation [155, 171].

La figure. 3.8 montre les courbes de corrélation de molécules fluorescentes ayant une différence de taille. En figure. 3.8 (a), les molécules fluorescentes de différentes tailles entrent et sortent du volume confocal en raison du mouvement brownien. Sur la figure. 3.8 (b), les molécules ayant de petites tailles présentent un déplacement rapide dans le volume confocal produisant ainsi des fluctuations d'intensité de fluorescence dans de faibles laps du temps. Néanmoins, les molécules ayant de grandes tailles présentent un déplacement lent dans le volume confocal produisant ainsi des fluctuations d'intensité de fluorescence dans de larges laps de temps. Elles engendrent également une plus grande trace due à une diffusion plus lente. Par conséquent, la fonction de corrélation se décale vers des valeurs de temps de diffusion plus longues, comme schématisé en figure. 3.8 (c) [152, 159]. Cela fait de la FCS une technique très sensible pour les études des interactions de liaison par la variation du rayon hydrodynamique [147].

### 3.3.3.3 Aspects photophysiques des mesures FCS : état triplet

En raison de l'illumination élevée des molécules fluorescentes, un phénomène de croisement inter-système peut se produire. Dans ces conditions, l'état singulet excité  $S_1$  devient fortement peuplé ainsi le passage à l'état triplet  $T_1$  devient probable suivi d'une relaxation dans l'état fondamental  $S_0$  [169]. Le processus de l'émission de fluorescence est en compétition avec les transitions non radiatives ce qui fait que les molécules de l'état singulet excité vont passer vers l'état triplet au lieu d'émettre de la fluorescence (la figure. 3.9).

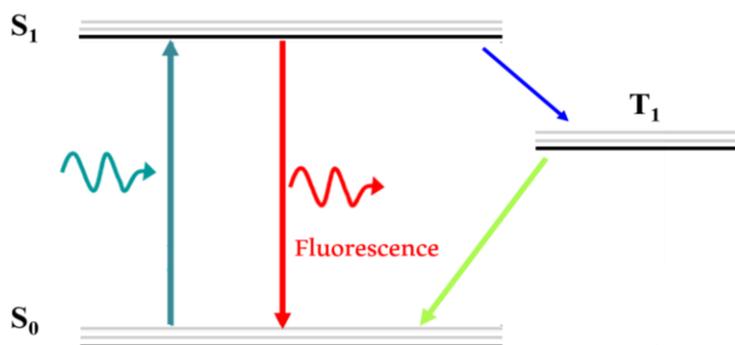


FIGURE. 3.9 – Diagramme de Jablonski présente le croisement inter-système entre les états singulet (S) et triplet (T).

Au cours des mesures FCS, la puissance d'excitation du fluorophore est un paramètre très critique. Plus les puissances d'excitation sont élevées plus le processus triplet aura lieu et plus la probabilité que les molécules fluorescentes se retrouvent dans un état noir (état triplet) pendant la diffusion dans le volume effectif. Ceci a pour conséquence d'engendrer des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence supplémentaires qui ne sont pas dues à la diffusion des molécules mais à leurs propriétés photophysiques.

Donc, les fluorophores dans le volume effectif à l'état triplet ne sont pas observés, ce qui entraîne une diminution du nombre de fluorophores en affectant la fonction de corrélation. Si les fluorophores ne retournent pas à  $S_0$  pendant le temps de diffusion l'amplitude de la fonction de corrélation sera modifiée.

Pour en tenir compte dans les analyses FCS, un terme qui dépend des propriétés photophysiques des molécules fluorescentes est introduit dans la fonction de corrélation  $G(\tau)$ . Ainsi, l'équation (3.18) peut se réécrire de la manière suivante [176–178]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \left( \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}} \right)^{\frac{1}{2}} \left( 1 + n_T \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right) \right) \quad (3.21)$$

où, ' $n_T$ ' et ' $\tau_T$ ' représentent respectivement l'amplitude et le temps de vie de l'état triplet.

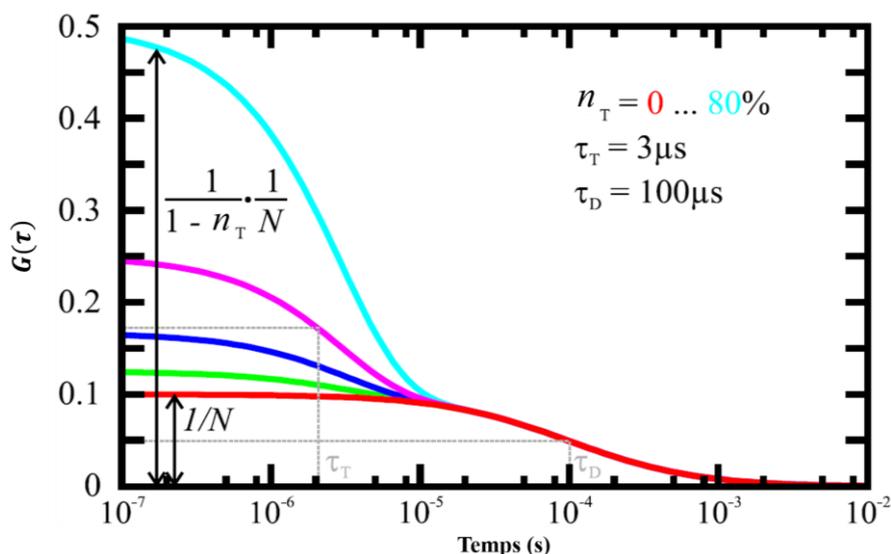


FIGURE. 3.10 – Schéma montrant la fonction de corrélation avec l'état triplet [171].

### 3.3.4 Les applications de la FCS

Il y a plus de 40 ans, la première application de la FCS a été proposée par Magde, Elson et Webb pour étudier le couplage entre le bromure d'éthidium et l'ADN en solution [158]. Ensuite, un grand nombre de réactions à l'échelle moléculaires ont été explorées, en particulier les réactions des protéines [179], la caractérisation in situ de la formation des complexes comme la polymérisation [180, 181] et l'étude in-vivo des interactions de liaisons entre les ligands et les récepteurs [182, 183]. Récemment, le nombre d'application de la technique FCS ne cesse d'augmenter dans divers domaines biologie, biophysique et biotechnologie [184–186].

Au cours des deux dernières décennies, la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est de plus en plus utilisée pour analyser les systèmes et les processus liés à la science des colloïdes. La méthode est devenue un outil de routine pour mesurer les rayons hydrodynamiques de petites molécules fluorescentes, macromolécules et NPs, caractériser leurs interactions et suivre une éventuelle agrégation. Elle est également utilisée pour étudier la diffusion dans des milieux inhomogènes tels que : les polymères fondus, les solutions ou les gels [187].

Grâce à la FCS, il est possible d'avoir accès localement à la dynamique des interactions moléculaires et cela pourrait en bénéficier largement la biologie car cette technique semble pouvoir sonder les mécanismes cellulaires à l'échelle moléculaires. L'étude des interactions entre molécules et NPs et leurs assemblages ont été discernées. Des propriétés uniques qui sont largement influencées par plusieurs paramètres ont été démontrées. Une caractérisation in situ de l'adsorption de la protéine sur la NP d'or avec différentes chimie de surfaces a été montrée [147]. Ainsi, la FCS a été utilisée afin de caractériser les NPs d'or par la mesure de leurs rayons hydrodynamiques à différentes formes, tailles et chimies de surfaces [146].

### **3.4 Conclusion**

Dans ce chapitre, la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) a été décrite. La technique repose sur les fluctuations spontanées de la fluorescence provenant d'un volume d'observation de l'ordre du femtolitre défini par le faisceau d'excitation et le montage optique confocal. Ce dernier a d'ailleurs performé la FCS en réduisant le volume d'observation ainsi le nombre de molécules, ce qui rend la FCS sensible envers les faibles concentrations. En outre, les développements mathématiques nécessaires à l'analyse d'une expérience FCS ont été présentés. La FCS permet à la fois l'extraction des données qualitatives (présence ou absence d'interaction à partir de l'allure de la courbe de corrélation) et quantitatives (temps de diffusion, concentration des particules, les paramètres photophysique et le rayon hydrodynamique).

Les chapitres suivants sont consacrés à :

- L'optimisation des paramètres géométriques influençant la résolution de la microscopie confocale.
- La mise en place d'un montage reliant la technique FCS au microscope confocal.
- L'exploitation de cette technique pour l'étude des NPs d'or et les résultats vont être présentés dans le chapitre 6.

## *Deuxième partie*

### **Modélisation et simulation numérique**

# Chapitre 4

## Simulation numérique des modes lasers gaussiens et leurs interférences : Amélioration de la résolution en microscopie confocale

### Sommaire

---

<b>4.1 Introduction.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2 Modélisation de la fonction d'étalement du point (PSF) .....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Calcul de la fonction d'étalement du point (PSF) d'un microscope confocal .....	58
4.2.1.1 PSF d'un microscope confocal illuminé par un faisceau gaussien .....	59
4.2.1.2 Les principaux paramètres influençant la PSF d'un microscope confocal.....	60
A) Effet de la longueur d'onde sur la distribution de la PSF .....	61
B) Effet de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope sur la PSF .....	62
C) Effet du taux de remplissage de l'objectif de microscope sur la PSF .....	64
D) Etude des effets réfractifs sur la PSF en microscopie confocale.....	66
<b>4.3 Amélioration de la résolution par interférences des modes laser .....</b>	<b>70</b>
4.3.1 Interférences de deux faisceaux gaussiens.....	70
4.3.1.1 Effet du décalage entre les deux rayons de courbure .....	72
4.3.1.2 Superposition coaxiale de deux faisceaux gaussiens à travers un système optique convergent ..	75
A) Cas de deux faisceaux gaussiens avec des rayons de courbures égaux et opposés .....	77
B) Cas de deux faisceaux gaussiens avec un décalage positif entre les deux rayons de courbure....	80
4.3.1.3 Effet de la phase de Gouy .....	82
<b>4.4 Conclusion.....</b>	<b>86</b>

---

## 4.1 Introduction

La microscopie optique est un outil incontournable pour la compréhension de nombreux phénomènes à l'échelle du micromètre voir nanomètre, ses succès et ses performances sont également liés à sa réponse impulsionnelle (PSF). Il a été montré dans le chapitre 1, que la PSF détient un rôle prépondérant dans la configuration de la résolution du système optique et sa réponse conditionne son fonctionnement. Généralement, les microscopes sont éclairés par des distributions d'intensité en forme gaussienne ; puisque cette dernière influence énormément les propriétés de la PSF, alors la résolution offerte par le système optique peut être améliorée soit par l'éclairage avec d'autres distributions telles que : les modes LG ou les HG, ou bien en faisant une structuration basée sur le phénomène d'interférence au niveau du point de focalisation du système optique.

L'objectif principal de ce chapitre est la modélisation de la fonction d'étalement du point (PSF) d'un microscope confocal éclairé :

- Premièrement par une onde gaussienne, qui est la distribution d'excitation utilisée dans la partie expérimentale.
- Deuxièmement par une distribution résultante de l'interférence de deux faisceaux gaussiens afin de parvenir à la modification de la distribution globale du faisceau d'excitation et voir même un confinement plus important du volume focal.

Avant d'entamer la simulation numérique, un bref aperçu théorique a été donné sur les modèles utilisés pour la représentation mathématique de la PSF au point d'illumination et de détection.

Des programmes ont été écrits sous environnement Matlab pour tracer des courbes latérales et axiales ainsi que la présentation en images des distributions d'intensité des PSFs dans le cas d'une excitation avec un simple faisceau gaussien ou bien avec l'interférence de deux faisceaux gaussiens.

## 4.2 Modélisation de la fonction d'étalement du point (PSF)

Comme cela a été décrit dans le premier chapitre, la fonction d'étalement du point (PSF) d'un système optique a un aspect très important pour la description de la résolution de ce dernier. En microscopie optique, la réponse impulsionnelle varie d'une expérience à une autre suivant les milieux étudiés ainsi que les aberrations introduites par les composants optiques de ce microscope. Pourtant, une approximation de la PSF peut être calculée en modélisant la propagation de la distribution du faisceau à travers les composants optiques utilisés.

En littérature, il existe plusieurs modèles de PSF théoriques caractérisés par un grand nombre d'approximations avec différents degrés de précision. Notamment, le calcul de la PSF d'un microscope confocal. Il y a plusieurs décennies, une approche scalaire a été présentée par Born et Wolf [23, 188]. Dans cette approche, la distribution spatiale de l'intensité lumineuse est calculée pour une onde plane dans la région focale (voir chapitre 1, l'équation (1.23)). L'étude a ensuite progressé en proposant d'autres modèles scalaires ayant une représentation relativement simple et plus rapide à calculer. Stokseth a montré que la génération de la PSF peut être calculée à partir de la transformée de Fourier inverse de la fonction pupille, qui correspond à l'amplitude et la phase du front d'onde produit par un point source [189]. Cette fonction décrit alors les différents types de distorsions affectant le front d'onde en traversant les interfaces du système optique. Elle est exprimée en fonction de la coordonnée axiale correspondant à la position du plan de focalisation. Notons pour qu'une image soit nette, il faut que l'objet soit placé dans le plan focal du système optique, lorsque celui-ci est décalé du plan focal, il en résulte un flou produit par la lumière hors focal (défocalisation). Cependant, l'amélioration apportée par le microscope confocal est indéniable car la défocalisation est considérablement réduite à travers un trou confocal, placé dans un plan conjugué au plan focal de l'objectif, qui permet de bloquer la lumière provenant des plans non-focaux. Une autre formulation scalaire, largement utilisée dans la littérature, a été introduite par Gibson et Lanni pour décrire la PSF [190]. Ce modèle tient aussi en compte les points sources se situant sur le plan focal loin de l'axe optique (hors axe) ainsi qu'il présente les propriétés souhaitables d'une précision accrue pour les plus grands angles. Cette approximation montre que l'étendue de la PSF est symétrique sur le plan focal, et que la PSF prédite par un point hors axe est une translation de manière linéaire que celle prévue sur l'axe.

Certaines applications nécessitent néanmoins une description plus précise de la PSF, en tenant compte de l'effet de polarisation de la lumière. De ce fait, la théorie vectorielle est établie par Wolf et Richards [191] sur la base des résultats de Maxwell et Debye [192]. Plus tard, elle s'est élargie par Hell en déterminant la PSF pour un seul à deux milieux de propagation [193]. Le calcul a ensuite été généralisé par Török pour une structure stratifiée de  $N^{\text{ième}}$  interfaces d'indice de réfraction différents de celui de la lentille de l'objectif [194]. Ces dernières approches sont les plus précises et les plus coûteuses en termes de temps de calcul. En revanche, les mesures effectuées par Haeberlé [195] ont montré que l'approximation scalaire proposée par Gibson et Lanni [190] donne une bonne description de la distribution d'intensité lumineuse au voisinage du point focal en la comparant à l'approche vectorielle.

De ce fait, une analyse vectorielle est généralement nécessaire afin de modéliser correctement un microscope à grande ouverture numérique. Néanmoins, l'approximation scalaire peut être utilisée dans ce cas, vu le temps de calcul rapide sans modifications des résultats qui limitent principalement la résolution d'un microscope optique.

#### 4.2.1 Calcul de la fonction d'étalement du point (PSF) d'un microscope confocal

Les microscopes confocaux sont caractérisés par une PSF d'illumination et une PSF de détection. Le processus d'excitation est décrit par une PSF d'illumination qui dépend de la longueur d'onde d'excitation ainsi que l'ouverture numérique de l'objectif du microscope. Cette PSF d'illumination décrit aussi la PSF de la microscopie conventionnelle. De plus, en raison de la disposition symétrique d'un microscope confocal par rapport à l'axe optique, une autre PSF de détection similaire est attribuée au processus de détection. Puisque les deux doivent se produire, alors la PSF totale est une multiplication des deux PSFs d'illumination et de détection et son expression s'écrit comme suit [196, 193, 197]:

$$PSF(x, y, z) = |PSF_{ill}(x, y, z)| \cdot |PSF_{det}(x, y, z)| \quad (4.1)$$

où,  $PSF_{ill}(x, y, z)$  est l'amplitude de l'onde d'excitation et  $PSF_{det}(x, y, z)$  est l'amplitude de l'onde d'émission.

Dans le cas d'un microscope confocal, un trou conjugué au plan focal de l'objectif de microscope est utilisé afin de limiter la lumière hors focalisation. Souvent, la PSF associée à ce modèle peut s'exprimer de la manière suivante [197–199] :

$$PSF^{conf}(x, y, z) = |PSF_{ill}(x, y, z)| \cdot |D(x, y) * PSF_{det}(x, y, z)| \quad (4.2)$$

et

$$D(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{Si } \sqrt{x^2 + y^2} \leq D_i \\ 0 & \text{Sinon} \end{cases} \quad (4.3)$$

avec, « \* » est l'opérateur de convolution et  $D(x, y)$  est une fonction qui caractérise l'ouverture du trou confocal avec un rayon  $D_i$ . Pour un microscope confocal idéal (confocalité parfaite) [197, 200], l'ouverture du trou est autour de  $1UA^2$ .

---

<sup>2</sup> $UA$ , Airy Unit en anglais est une unité de mesure du diamètre de trou confocal. Elle correspond au diamètre du disque d'Airy du microscope. Sa valeur diffère suivant les propriétés du système considéré et elle s'exprime comme suit :  $1UA = 1.22\lambda/ON$ .

Généralement, la PSF se simplifie selon la forme suivante [197]:

$$PSF^{conf}(x, y, z) = |PSF_{ill}(x, y, z)| \cdot |PSF_{det}(x, y, z)| \quad (4.4)$$

Lorsque les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont assez proches, la PSF d'illumination et la PSF de détection peuvent être supposées égales. Il s'ensuit donc ;  $|PSF_{ill}(x, y, z)| \approx |PSF_{det}(x, y, z)|$ , ce qui permet d'écrire l'expression de la PSF finale de la microscopie confocale [197]:

$$PSF^{conf}(x, y, z) = |PSF_{ill}(x, y, z)|^2 \approx |PSF_{det}(x, y, z)|^2 \quad (4.5)$$

La résolution est finalement déterminée par l'étendue tridimensionnelle de la PSF confocale décrite par la largeur à mi-hauteur (FWHM).

#### 4.2.1.1 PSF d'un microscope confocal illuminé par un faisceau gaussien

L'expression mathématique de la distribution de l'intensité de la réponse impulsionnelle dans le plan focal, illuminé par un faisceau laser du mode gaussien fondamental (TEM<sub>00</sub>), peut s'écrire de la manière suivante [201]:

$$PSF_{ill}(r, z) = \left| A \int_0^1 \exp\left(\frac{-ikON^2\rho^2z}{2n}\right) J_0(krON\rho) \exp\left(-\frac{\rho^2}{\beta^2}\right) \rho d\rho \right|^2 \quad (4.6)$$

où,  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ , 'n' est l'indice de réfraction de l'échantillon et le terme  $\left[\exp\left(-\frac{\rho^2}{\beta^2}\right)\right]$  décrit le faisceau gaussien incident. Avec  $\beta = W_0/a$  ; est le rapport entre le waist  $W_0$  (la largeur à 1/e<sup>2</sup> du profil d'intensité de faisceau gaussien) et le rayon de l'ouverture de l'objectif 'a'.

$J_0(\cdot)$  est la fonction de Bessel d'ordre 0, A est une constante d'amplitude normalisée et  $\rho$  est une coordonnée radiale.

La PSF totale spécifique correspondant à chaque type de microscope est [199];

- La microscopie conventionnelle :  $PSF^{conv}(x, y, z) = |PSF_{ill}(x, y, z)|$
- La microscopie confocale :  $PSF^{conf}(x, y, z) = |PSF_{ill}(x, y, z)|^2$

Dans l'objectif de montrer l'influence des paramètres agissant sur la PSF, une représentation comparative des distributions d'intensité axiales et latérales en deux dimensions de la PSF (figure. 4.1) a été faite entre un microscope conventionnel et un microscope confocal. L'objectif de microscope pris comme exemple est un objectif à immersion d'eau, avec  $ON=1.2$  et la longueur d'onde d'excitation est celle d'un laser vert ( $\lambda=532$  nm).

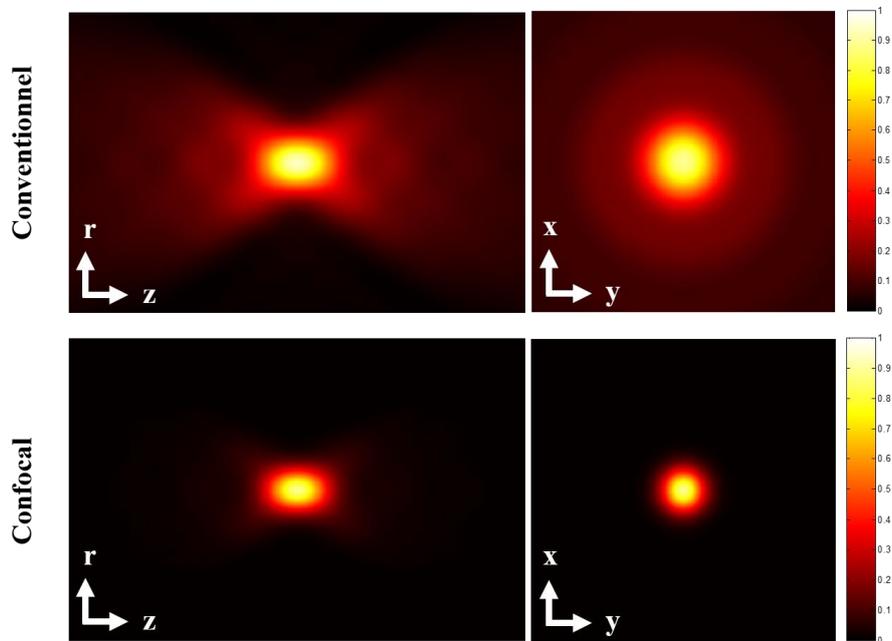


FIGURE. 4.1 – Comparaison entre les PSFs normalisées d'un microscope conventionnel et d'un microscope confocal.

La figure. 4.1 montre que dans le cas d'un microscope conventionnel, les distributions d'intensité axiales et latérales sont plus étalées que celles obtenues à l'aide d'un microscope confocal. Ceci s'explique par le fait que le trou confocal a une très grande importance dans l'amélioration de la résolution du système.

Dans cette étude, nous nous intéressons principalement à ce type d'instrumentation, qui est la microscopie confocale.

#### 4.2.1.2 Les principaux paramètres influençant la PSF d'un microscope confocal

La simulation de la PSF d'un microscope confocal a été faite sous environnement Matlab en prenant en considération l'équation (4.6). Cette dernière est en fonction de plusieurs paramètres influençant la largeur et la forme géométrique des allures des distributions axiales et latérales des PSFs.

Dans le but d'une éventuelle expérimentation, une telle étude permet d'assurer la compréhension des effets de plusieurs paramètres tels que :

- La longueur d'onde d'excitation.
- La variation de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope.
- Le taux de remplissage de l'objectif de microscope par le faisceau gaussien.
- Par la suite, nous nous attacherons à décrire le phénomène d'aberrations sphériques observé en cas de variation d'indice de réfraction pouvant intervenir dans la modélisation de la PSF en contrôlant l'indice du milieu d'observation (huile, eau et air). Notre discussion sera centrée sur le modèle scalaire proposé par Gibson et Lanni pour l'étude des effets réfractifs qui permet d'assurer un bon compromis entre le temps de calcul et la précision de l'approximation.

### A) Effet de la longueur d'onde sur la distribution de la PSF

Afin de mieux illustrer l'influence de la longueur d'onde d'excitation sur l'estimation de la PSF, nous considérons trois longueurs d'onde différentes (488 nm, 532 nm, 633 nm) qui sont les longueurs d'onde fréquemment utilisées dans le montage expérimental. Dans les calculs, un microscope confocal équipé d'un objectif de microscope à immersion à eau d'une ouverture numérique  $ON= 1.2$  est simulé. La figure. 4.2 illustre les images d'intensités latérales et axiales des trois PSFs des longueurs d'ondes déclarées ci-dessus.

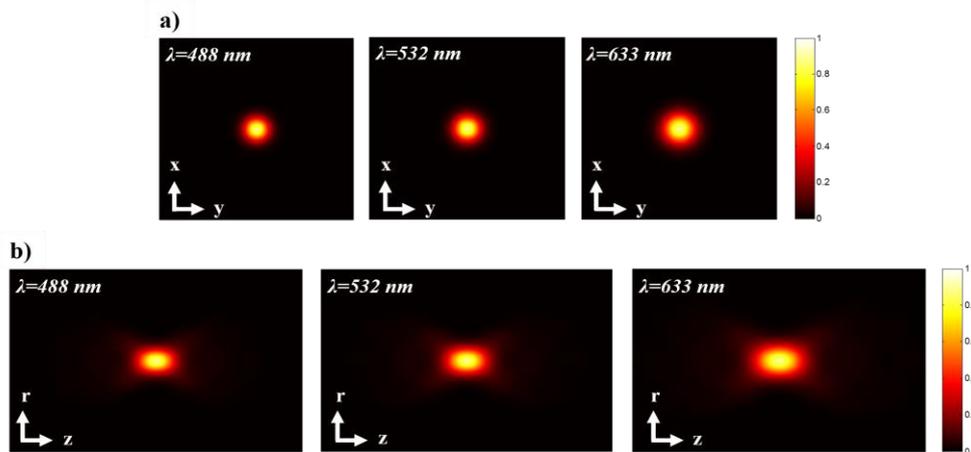


FIGURE. 4.2 – Représentation en 2D des PSFs pour différentes longueurs d'onde, a) distributions des intensités latérales et b) distributions des intensités axiales.

La figure. 4.2 montre que les distributions des PSFs latérales et axiales évoluent lentement en fonction de la longueur d'onde d'excitation mais les formes géométriques sont restées les mêmes.

Pour mieux exploiter cette évolution, des profils latéraux et axiaux à la position ( $z=0$ ) et ( $r=0$ ) sont respectivement extraits de la figure. 4.2, et sont illustrés sur la figure. 4.3.

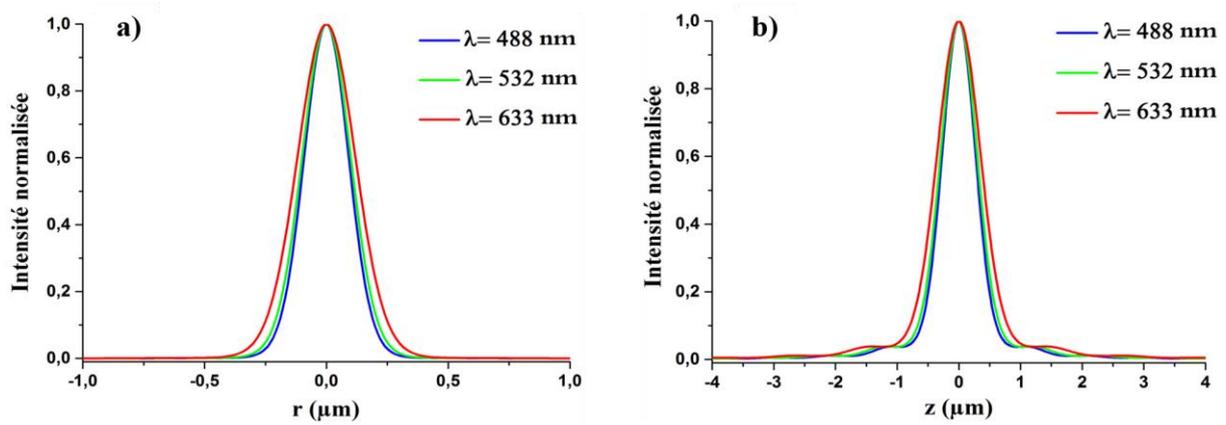


FIGURE. 4.3 – a) Les profils latéraux et b) les profils axiaux des PSFs pour différentes longueurs d’ondes.

Une comparaison des largeurs à mi-hauteurs de ces PSFs est obtenue par une pondération des données des profils passant par les centres dans les deux directions avec un ajustement par une fonction gaussienne.

TABLEAU. 4.1 – Les valeurs des largeurs à mi-hauteurs (FWHM) des PSFs latérales et axiales à différentes longueurs d’onde d’excitation.

PSF	$\lambda=488nm$	$\lambda=532nm$	$\lambda=633nm$
FWHM latérale ( $\mu m$ )	0.21	0.23	0.28
FWHM axiale ( $\mu m$ )	0.65	0.70	0.84

Le tableau 4.1 montre que les largeurs à mi-hauteur des distributions d’intensités axiales sont trois fois plus grandes que celles des distributions d’intensités latérales. Nous observons aussi que la résolution est proportionnelle à la longueur d’onde d’excitation. Les résultats trouvés sont conformes aux résolutions latérales et axiales données selon le critère de Rayleigh (voir chapitre 1 : équations (1.27) et (1.28)).

## B) Effet de l’ouverture numérique de l’objectif de microscope sur la PSF

Une des caractéristiques principale d’un objectif de microscope est celle de l’ouverture numérique. Une simulation numérique de la PSF d’un faisceau gaussien à travers des objectifs à différentes ouvertures numériques a été réalisée.

Pour ce faire, nous considérons les mêmes paramètres de calcul que ceux utilisés précédemment, nous fixons la longueur d’onde ( $\lambda=532 nm$ ), le taux de remplissage total ( $\beta=1$ ), l’indice de réfraction du milieu à immersion à 1.33 et nous prenons en considération la variation de l’ouverture numérique  $ON$  de 0.5 à 1.4.

Les résultats simulés sont représentés par la figure. 4.4. Cette dernière illustre les distributions d'intensités latérales et axiales en 2D pour cinq valeurs d'ouvertures numériques.

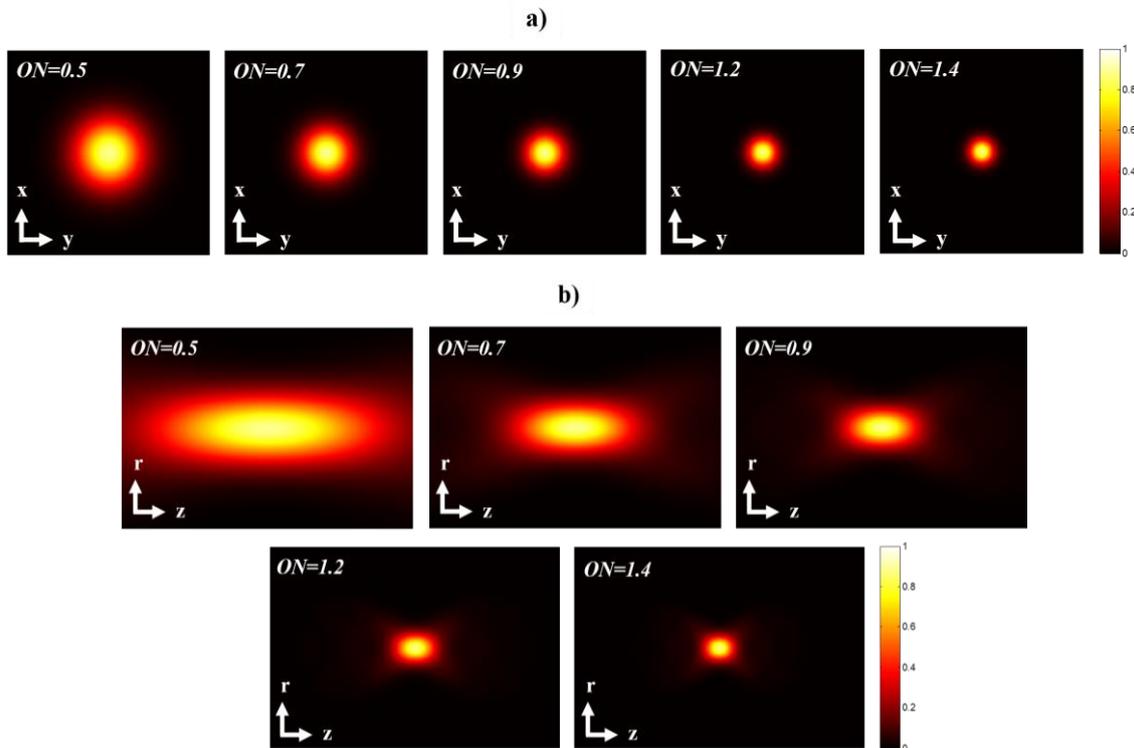


FIGURE. 4.4 – Représentation en 2D des PSFs pour différentes ouvertures numériques, a) distributions des intensités latérales et b) distributions des intensités axiales.

La figure. 4.4 (a, b) montre que la distribution de la fonction d'étalement du point diminue au fur et à mesure que l'ouverture numérique augmente. Ainsi, les distributions d'intensités axiales sont beaucoup plus élargies que celles des distributions des parties latérales.

Pour mieux visualiser et exploiter les résultats trouvés, des profils latéraux et axiaux à la position ( $z=0$ ) et ( $r=0$ ) sont extraits de la figure. 4.4, et sont illustrés sur la figure. 4.5.

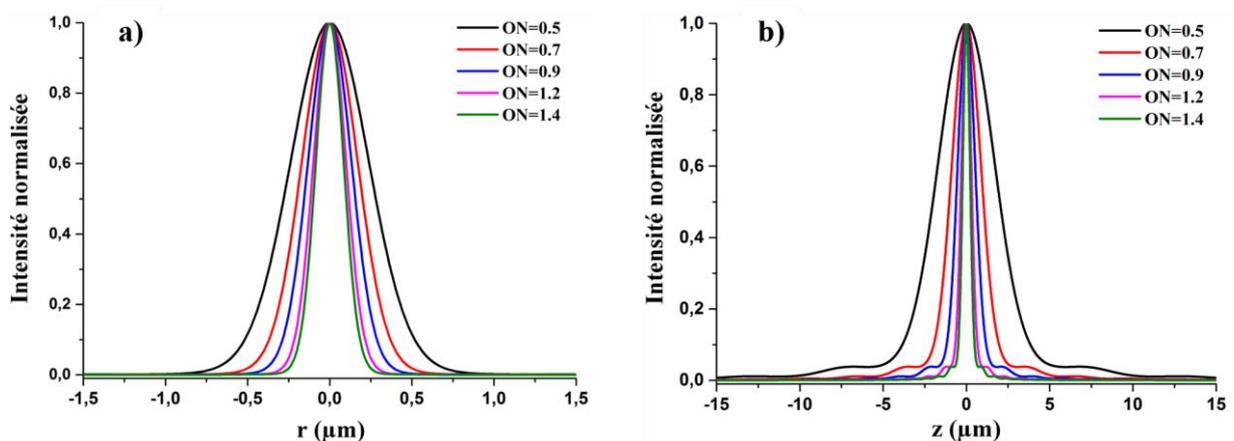


FIGURE. 4.5 – Influence de l'ouverture numérique sur la PSF, a) profil d'intensité latérale et b) profil d'intensité axiale d'un microscope confocal.

L'allure des courbes tracées ressemble toutes à une distribution gaussienne dont la largeur du pic central est nettement différente. En outre, les distributions d'intensités dans la direction axiale présentent des lobes secondaires très faibles par rapport au pic central.

Afin d'exploiter les profils d'intensité de la figure 4.5, les largeurs à mi-hauteurs de ces PSFs (voir tableau 4.2) sont obtenues par une pondération des données des profils passant par les centres dans les deux directions avec un ajustement par une fonction gaussienne.

TABLEAU. 4.2 – Les valeurs des largeurs à mi-hauteur (FWHM) latérales et axiales obtenues pour les différentes ouvertures numérique avec une intensité normalisée maximale.

<b>PSF</b>	<b><i>ON=0.5</i></b>	<b><i>ON=0.7</i></b>	<b><i>ON=0.9</i></b>	<b><i>ON=1.2</i></b>	<b><i>ON=1.4</i></b>
<b>FWHM latérale (µm)</b>	0.56	0.4	0.31	0.23	0.20
<b>FWHM axiale (µm)</b>	3.99	2.07	1.26	0.70	0.52

Les résultats, illustrés dans le tableau 4.2, confirment bien que la PSF latérale et axiale d'un microscope confocal est inversement proportionnel à l'ouverture numérique de l'objectif de microscope.

En fait, la capacité de collection de la lumière par un objectif de microscope est exprimée quantitativement en termes d'ouverture numérique, qui est une mesure du nombre de rayons lumineux capturés par l'objectif. Lorsque les valeurs d'ouverture numérique sont petites, l'angle de collection est petit et les rayons lumineux sont peu transmis, et ceci entraîne un fort élargissement de la PSF. En revanche, lorsque les valeurs d'ouvertures numériques sont plus élevées, une contribution maximale est permise aux rayons de plus en plus obliques de pénétrer dans l'objectif, et cela réduit la taille de la PSF.

Par ailleurs, l'évolution des FWHMs latérales en fonction de l'ouverture numérique sont beaucoup plus faibles que celles des FWHMs axiales. Ceci est confirmé par les formules de résolution décrites par Rayleigh (chapitre 1) montrant que la résolution latérale est inversement proportionnelle à l'ouverture numérique et la résolution axiale est inversement proportionnelle au carré de l'ouverture numérique. De ce fait, plus l'ouverture numérique est grande, plus la PSF est étroite et meilleure est la résolution optique.

### **C) Effet du taux de remplissage de l'objectif de microscope sur la PSF**

Afin d'illustrer l'effet du taux de remplissage de la lentille arrière de l'objectif de microscope sur la PSF d'un microscope confocal excité par un faisceau gaussien, une simulation numérique représentée par le paramètre  $\beta$  est étudiée.

Lorsque  $\beta \gg 1$ , la lentille d'entrée est «sur remplie» et si  $\beta < 1$  la lentille d'entrée est «sous remplie».

Pour être proche du dispositif expérimental utilisé, toutes les simulations numériques ont été réalisées en prenant comme caractéristique ; une ouverture numérique de l'objectif de microscope  $ON=1.2$ , un milieu à immersion d'indice  $n=1.33$  et un faisceau d'excitation de longueur d'onde  $\lambda=532nm$ . Les résultats de simulations des distributions d'intensité latérales et axiales de la PSF, en fonction du taux de remplissage variant entre 0.2 et 1, sont illustrés par la figure 4.6.

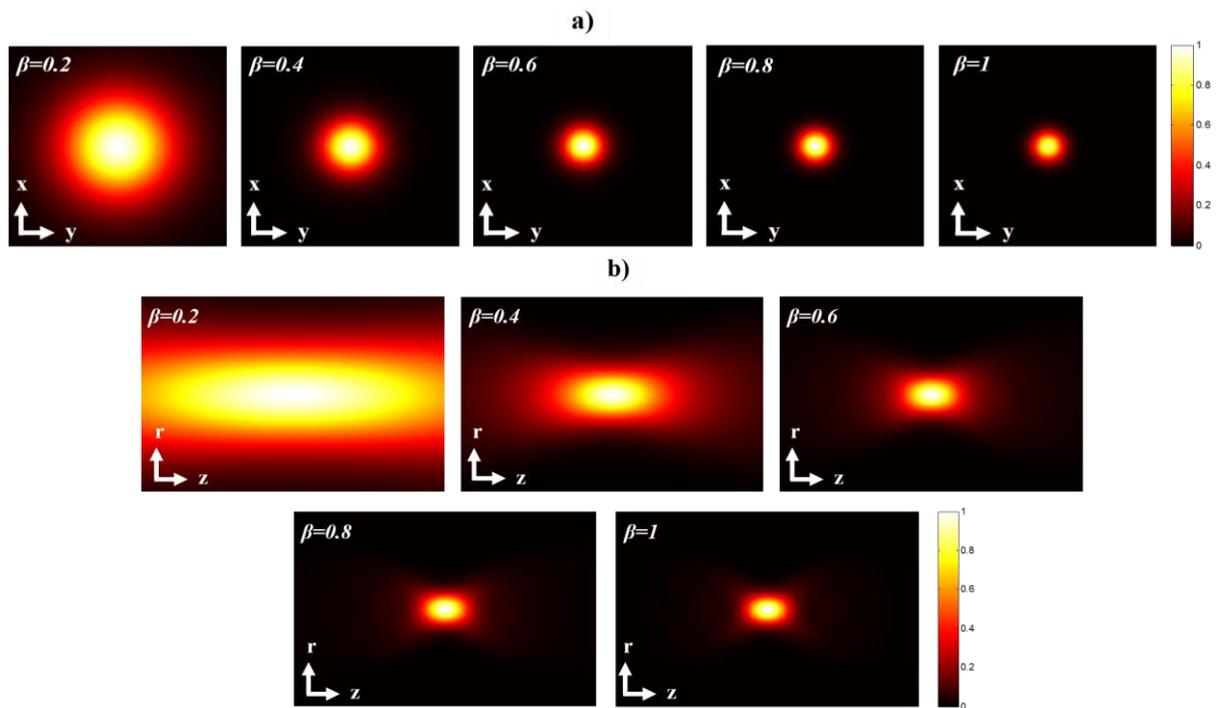


FIGURE. 4.6 – Représentation en 2D de la PSF pour différentes valeurs du taux de remplissage  $\beta$ , a) distributions des intensités latérales et b) distributions des intensités axiales.

Les profils latéraux et axiaux à la position ( $z=0$ ) et ( $r=0$ ) sont extraits des images 2D de la figure 4.6 et sont représentés par la figure 4.7.

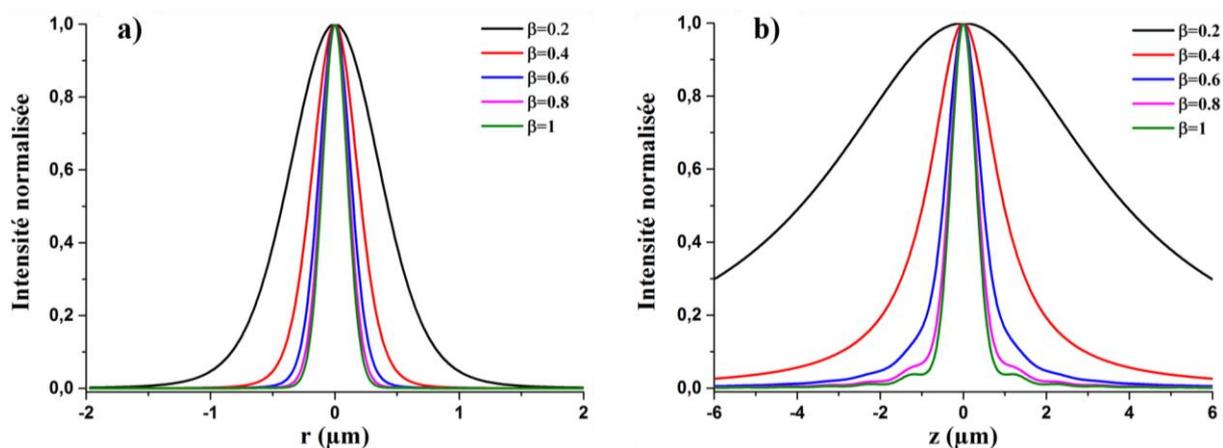


FIGURE. 4.7 – Profils d'intensités normalisées en fonction du taux de remplissage, a) Evolution de la PSF dans la direction latérale et b) Evolution de la PSF dans la direction axiale.

L'ajustement de ces profils avec une gaussienne, nous a permis l'extraction des largeurs à mi-hauteur en fonction du taux de remplissage  $\beta$ . Les résultats trouvés sont rassemblés dans le tableau 4.3.

TABLEAU. 4.3 – Les valeurs des dimensions latérales et axiales des largeurs à mi-hauteur (FWHM) obtenus pour chaque taux de remplissage de l'objectif.

PSF	$\beta=0.2$	$\beta=0.4$	$\beta=0.6$	$\beta=0.8$	$\beta=1$
FWHM latérale ( $\mu\text{m}$ )	0,86	0,44	0,30	0,26	0,23
FWHM axiale ( $\mu\text{m}$ )	6,02	2,15	1,08	0,80	0,70

Le tableau 4.3 montre que l'élargissement du pic central des PSFs diminue au fur et à mesure que le taux de remplissage de l'objectif de microscope augmente. Ainsi, l'évolution des FWHMs dans la direction latérale est beaucoup plus lente que celle dans la direction axiale.

Dans le cas où, le rayon ' $a$ ' de la lentille arrière de l'objectif est le paramètre qui contrôle le taux de remplissage  $\beta$ , alors plus le rayon ' $a$ ' est petit, plus les effets de diffraction sont plus forts. En fait, la distribution d'intensité produite au niveau du plan focal n'est qu'une multiplication entre le faisceau gaussien par la fonction de l'ouverture de la lentille arrière de l'objectif. Par conséquent, une réduction du rayon de l'ouverture mène à un changement dans les bornes d'intégration en produisant un étalement de la distribution spatiale de l'intensité (la transformée de Fourier d'une gaussienne étroite est une gaussienne large).

En revanche, dans le cas où, le waist ' $W_0$ ' est le paramètre qui contrôle le taux de remplissage  $\beta$ , lorsque la dimension du waist est réduite, l'angle du cône de lumière rentrant dans l'objectif est faible. Cet angle a une relation étroite avec l'ouverture numérique et ceci provoque un élargissement de la PSF. De ce fait, plus le remplissage de l'objectif est total meilleure est la résolution du microscope confocal.

#### D) Etude des effets réfractifs sur la PSF en microscopie confocale

De nombreux auteurs se sont intéressés à la modélisation et l'étude des effets de changements d'indices de réfraction sur la PSF [193, 202]. Une contribution significative dans ce sens a été proposée par Gibson et Lanni, qui ont développé un modèle de formation d'images basé sur la diffraction scalaire proposée par Born et Wolf [190]. Un terme d'aberration lié aux variations d'indice de réfraction est inclus à ce modèle par un calcul de la différence de chemin optique (OPD) entre les conditions idéales supposées par le constructeur et les conditions expérimentales d'observation [203].

Les aberrations résiduelles résultantes de ce décalage entre les conditions de conception et expérimentale ont un aspect essentiel dans la description de la PSF. L'avantage de ce modèle est qu'il possède une simplicité d'utilisation ainsi qu'une dépendance aux plusieurs paramètres liés au système optique accessibles en pratique.

Lorsqu'un faisceau laser traverse un système optique qui présente des milieux d'indices de réfraction différents, il subit généralement une dégradation due aux effets de réfraction engendrant des aberrations. Cet effet se manifeste dans la dégradation de la focalisation du système et ceci est observé dans la PSF. L'expression de la PSF d'un microscope selon le modèle de Gibson et Lanni est satisfaisante à la relation suivante [203]:

$$PSF(X, X_p; p) = \left| A \int_0^1 J_0(krON\rho) e^{i\varphi(\rho, X, X_p; p)} \rho d\rho \right|^2 \quad (4.7)$$

avec,  $A$  est une constante d'amplitude,  $X=(x, y, z)$  indique les coordonnées d'un point dans le plan image.  $X_p (x_p, y_p, z_p)$  indique les coordonnées d'un point dans le plan objet et  $p=(ON, n, t)$  est un vecteur décrivant les paramètres du système.  $ON$  est l'ouverture numérique, ' $n$ ' est l'indice de réfraction et ' $t$ ' est l'épaisseur des couches des milieux individuelles.  $r = \sqrt{(x - x_p)^2 - (y - y_p)^2}$   $\varphi(\rho, X, X_p; p)$  est un terme de phase décrivant les différences de chemins optiques entre les conditions idéales préconisées par le constructeur et les conditions réelles d'observation et  $J_0$  est la fonction de Bessel d'ordre zéro.

La figure 4.8 illustre le principe de la marche des rayons optiques à travers un objectif de microscope avec les caractéristiques de son milieu environnant. Cette figure montre la différence de chemin optique (OPD) entre la partie modèle et la partie expérimentale.

Dans la partie expérimentale, nous avons :

- Une bille fluorescente prise comme source ponctuelle située à une profondeur  $t_s$  dans un milieu d'indice de réfraction  $n_s$ .
- Une lamelle d'une épaisseur  $t_g$  avec un indice de réfraction  $n_g$ .
- Le milieu à immersion d'une épaisseur  $t_i$  avec un indice de réfraction  $n_i$ .

Dans le système de conception, la bille est située directement au-dessous de la lamelle, dont :

- La lamelle ayant une épaisseur  $t_g^*$  et un indice de réfraction  $n_g^*$ .
- Le milieu à immersion d'une épaisseur  $t_i^*$  avec un indice de réfraction  $n_i^*$ .

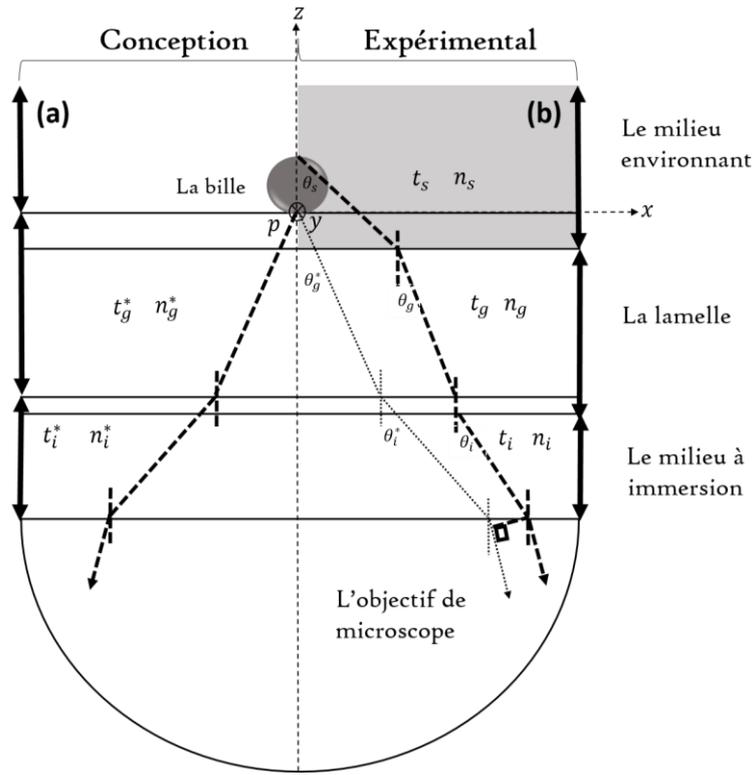


FIGURE. 4.8 – Représentation schématique de la différence de la trajectoire des rayons lumineux à travers un objectif de microscope: (a) Partie conception et (b) Partie expérimentale.

L'OPD due à la variation d'indice de réfraction est décrite par l'équation suivante [203]:

$$\begin{aligned}
 OPD(\rho, X, X_p; p) = & n_i z \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_i}\right)^2} + n_g t_g \left( \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_g}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_i}\right)^2} \right) \\
 & - n_g^* t_g^* \left( \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_g^*}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g^*}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_i}\right)^2} \right) - n_i^* t_i^* \left( \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_i^*}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_i^*}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_i}\right)^2} \right) \\
 & + n_s t_s \left( \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_s}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_s}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{ON\rho}{n_i}\right)^2} \right). \quad (4.8)
 \end{aligned}$$

Le terme de phase  $\varphi(\rho, X, X_p; p)$  est obtenu en multipliant  $OPD$  avec  $k = 2\pi / \lambda$  et  $\lambda$  est la longueur d'onde d'excitation.

Afin d'étudier la PSF en fonction de la variation de l'indice de réfraction du milieu environnant, le système est simulé numériquement en tenant compte les paramètres expérimentaux tels que : la longueur d'onde d'excitation  $\lambda=532$  nm, l'ouverture numérique  $ON=1.2$ , la lamelle de microscope utilisée d'un indice de réfraction  $n=1.51$  et d'une épaisseur  $t=170\mu\text{m}$ . La bille de latex fluorescente à un indice de réfraction  $n=1.6$ . Pour produire le phénomène des effets réfractifs, la bille de latex a été plongée dans trois milieux d'indice de réfraction différent les que : l'air, l'eau et l'huile.

En tenant compte de toutes les caractéristiques énumérées ci-dessus, la PSF est ensuite calculée à partir de l'équation (4.7). Les résultats numériques des largeurs à mi-hauteur FWHMs latéraux et axiaux trouvés sont présentés dans le tableau 4.4.

TABLEAU. 4.4 – Les valeurs des largeurs à mi-hauteur (FWHM) latérales et axiales en fonction de l'indice de réfraction du milieu environnant.

PSF	<i>Air (n=1)</i>	<i>Eau (n=1.33)</i>	<i>huile (n=1.51)</i>
<b>FWHM latérale (µm)</b>	0.30	0.27	0.25
<b>FWHM axiale (µm)</b>	1.23	0.99	0.79

Le tableau 4.4 montre que plus la différence de la variation d'indices de réfraction entre la bille et le milieu environnant est faible plus les largeurs à mi-hauteurs sont étroites. En outre, l'évolution des FWHMs est considérablement grande dans la direction axiale que celle dans la direction latérale.

En fait, lorsque la lumière traverse deux milieux d'indices de réfraction différents, la lumière réfractée dévie par rapport à sa trajectoire initiale. La déviation dépendra de l'angle d'incidence du rayon et du rapport entre les indices de réfraction des deux milieux selon la loi de Snell Descartes. Par conséquent, lorsque la bille est incorporée dans les différents milieux, une réfraction supplémentaire sera produite aux interfaces induisant ainsi des changements dans les chemins optiques parcourus par les différents rayons à travers le système. Dans le cas où, la bille est immergée dans l'huile, le décalage entre l'indice de la bille et celle du milieu est faible, ceci engendre un angle de réfraction des rayons lumineux faiblement inclinés. Cet effet crée une petite différence de chemin optique en produisant de petites déformations dans la PSF. En revanche, pour une variation d'indice de réfraction significative entre celle de la bille et le milieu où elle est baignée (cas de l'air ou l'eau), les angles de réfraction des rayons sont assez grands. De ce fait, les rayons parcourus deviennent plus difficiles à collecter. Dans cette situation, les différences de chemin optique sont plus grandes en provoquant de grandes déformations dans la PSF.

Ce modèle de calcul de la PSF prenant en compte les effets réfractifs a été validé expérimentalement (voir le chapitre 5) et faisant l'objet d'une publication dans le journal 'OPTIK'.

Malgré tous les développements techniques apportés à la microscopie, il n'est pas possible d'augmenter la résolution spatiale au-delà de la limite imposée par la diffraction, même avec la prise en compte de tous ses paramètres. Utiliser donc un autre moyen de confinement des faisceaux d'excitation afin de résoudre ce problème s'avère nécessaire. Ce phénomène est l'interférence des modes lasers.

### 4.3 Amélioration de la résolution par interférences des modes laser

Afin de s'affranchir la limite de la résolution imposée par la diffraction en microscopie optique, diverses méthodes ont été proposées. Les interférences font parties des méthodes de structuration de base en optique pour modifier les distributions d'illumination. L'objectif de nos travaux est donc de proposer des solutions simples et implantables dans les microscopes confocaux déjà existants qui permettraient d'en augmenter la résolution. Pour cela, nous avons concentré nos recherches sur une simulation numérique basée sur l'interférence de deux faisceaux lasers gaussiens TEM<sub>00</sub>.

#### 4.3.1 Interférences de deux faisceaux gaussiens

Avant de présenter les résultats de simulation du confinement et la mise en forme d'un faisceau gaussien par le moyen de l'interférence de deux champs lumineux gaussiens TEM<sub>00</sub>, une description mathématique de ces deux derniers doit être donnée.

Les amplitudes des champs électriques décrits par  $E_1$  et  $E_2$  (voir le chapitre 1) sont définies de la manière suivante :

$$E_1(\rho, z) = E_{01} \frac{W_{01}}{W_1(z)} \exp \left[ - \left( \frac{\rho}{W_1(z)} \right)^2 \right] \exp \left[ -i \left( kz + \frac{k\rho^2}{2R_1(z)} - \phi_1(z) \right) \right] \quad (4.9)$$

$$E_2(\rho, z) = E_{02} \frac{W_{02}}{W_2(z)} \exp \left[ - \left( \frac{\rho}{W_2(z)} \right)^2 \right] \exp \left[ -i \left( kz + \frac{k\rho^2}{2R_2(z)} - \phi_2(z) \right) \right] \quad (4.10)$$

Ici,  $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$  est la coordonnée radiale.

L'expression mathématique de l'intensité totale de l'interférence de deux faisceaux gaussiens  $E_1$  et  $E_2$  est calculée à partir du carré de la somme des deux équations (4.9) et (4.10), est donnée comme suit :

$$I(\rho, z) = \left( E_{01} \frac{W_{01}}{W_1(z)} \right)^2 e^{-\frac{2\rho^2}{W_1^2(z)}} + \left( E_{02} \frac{W_{02}}{W_2(z)} \right)^2 e^{-\frac{2\rho^2}{W_2^2(z)}} + 2 \left( E_{01} \frac{W_{01}}{W_1(z)} \right) \left( E_{02} \frac{W_{02}}{W_2(z)} \right) e^{-\rho^2 \left( \frac{1}{W_1^2(z)} + \frac{1}{W_2^2(z)} \right)} \cdot \cos \left[ \left( \frac{\pi\rho^2}{\lambda} \left( \frac{1}{R_2(z)} - \frac{1}{R_1(z)} \right) \right) + (\phi_2(z) - \phi_1(z)) \right] \quad (4.11)$$

L'équation (4.11) peut être vue comme la somme de deux termes un terme d'intensité et un autre qui contient un terme modulé en « cos » qui prend son origine, soit du décalage entre les rayons de courbure ou bien du décalage entre les phases de Gouy des deux faisceaux.

Pour comprendre mieux les propriétés spatiales de l'interférence de deux faisceaux gaussiens, une simulation d'un seul faisceau gaussien est effectuée.

En éliminant les termes de phase de l'équation (4.9) ou (4.10), l'expression de la distribution de l'intensité latérale à  $z=0$ , est donnée par :

$$I(\rho, 0) = I_0 \exp\left(-\frac{\rho^2}{W_0^2}\right) \quad (4.12)$$

Avec les mêmes équations et en se mettant sur l'axe du faisceau ( $\rho = 0$ ), l'expression de l'intensité axiale est défini comme suit :

$$I(0, z) = I_0 \left[ \frac{W_0}{W(z)} \right]^2 = \frac{I_0}{1 + (z/z_R)^2} \quad (4.13)$$

Les résultats des simulations des équations (4.12) et (4.13) illustrées dans la figure (4.9, a et b) ont été faites en prenant un rayon de courbure de 200mm, un waist de 1mm et une longueur d'onde d'excitation  $\lambda=532nm$ .

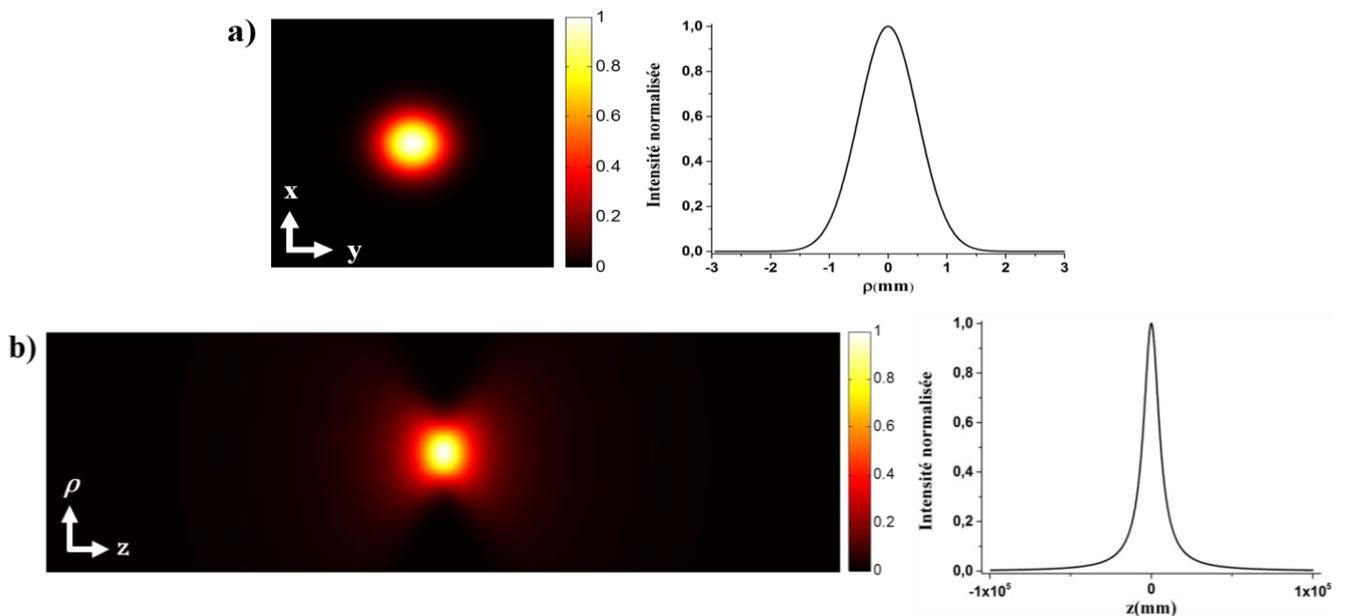


FIGURE. 4.9 – a) Distribution d'intensité latérale en 2D ( $x,y$ ) avec son profil , b) Distribution d'intensité axiale en 2D ( $\rho,z$ ) ainsi que son profil avec  $R=200mm$ ,  $W_0=1mm$  et  $\lambda=532nm$ .

La figure (4.9-a) montre que l'intensité latérale a une allure d'une gaussienne, où le maximum se trouve au centre du faisceau ( $z=0, \rho=0$ ) et elle diminue graduellement avec l'augmentation de ' $\rho$ ' en atteignant la moitié de sa valeur à ( $\rho=W_0$ ). Cependant, l'intensité axiale (la figure (4.9-b)) décroît avec la distance selon une distribution Lorentzienne, où son intensité maximale se produit au centre du faisceau ( $z=0, \rho=0$ ) et elle diminue graduellement avec l'augmentation du ' $z$ ' en atteignant la moitié de sa valeur à  $z=\pm z_R$ .

Pour montrer maintenant l'effet de l'interférence de deux faisceaux gaussiens par rapport à la distribution d'un seul faisceau gaussien, nous introduisons tout d'abord un décalage entre les rayons de courbure  $R_2$  et  $R_1$ .

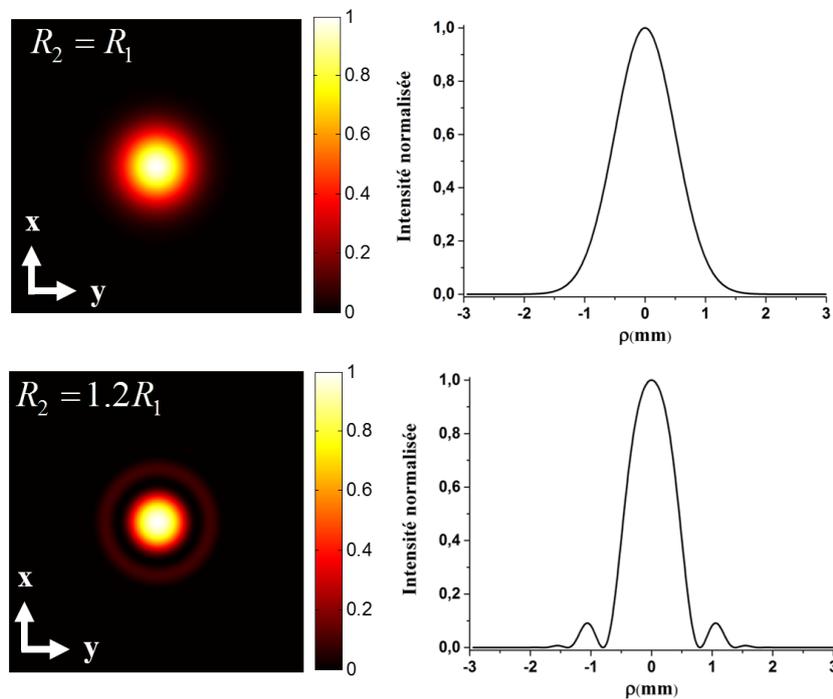
#### 4.3.1.1 Effet du décalage entre les deux rayons de courbure

La partie qui suit montre l'interférence entre deux faisceaux gaussiens dont l'effet de décalage entre les deux rayons de courbure est pris en considération. Pour voir cet effet, l'équation (4.11) a été simulée sous environnement Matlab et les résultats obtenus sont présentés dans la figure. 4.10.

Pour les calculs numériques, nous supposons que :

- Les waists du premier et du deuxième faisceau sont égaux,  $W_{01}=W_{02}=1mm$ .
- La longueur d'onde d'excitation est  $\lambda=532nm$ .
- Le rayon de courbure du premier faisceau est  $R_1=200mm$ , par contre le rayon de courbure  $R_2$  du deuxième faisceau prendra premièrement une valeur égale  $R_1$ , puis d'autres valeurs différentes de celle de  $R_1$ .

Les franges d'interférence (les images et les profils d'intensité latéraux) typiques dans le champ commun de deux faisceaux gaussiens sont illustrées sur la figure. 4.10.



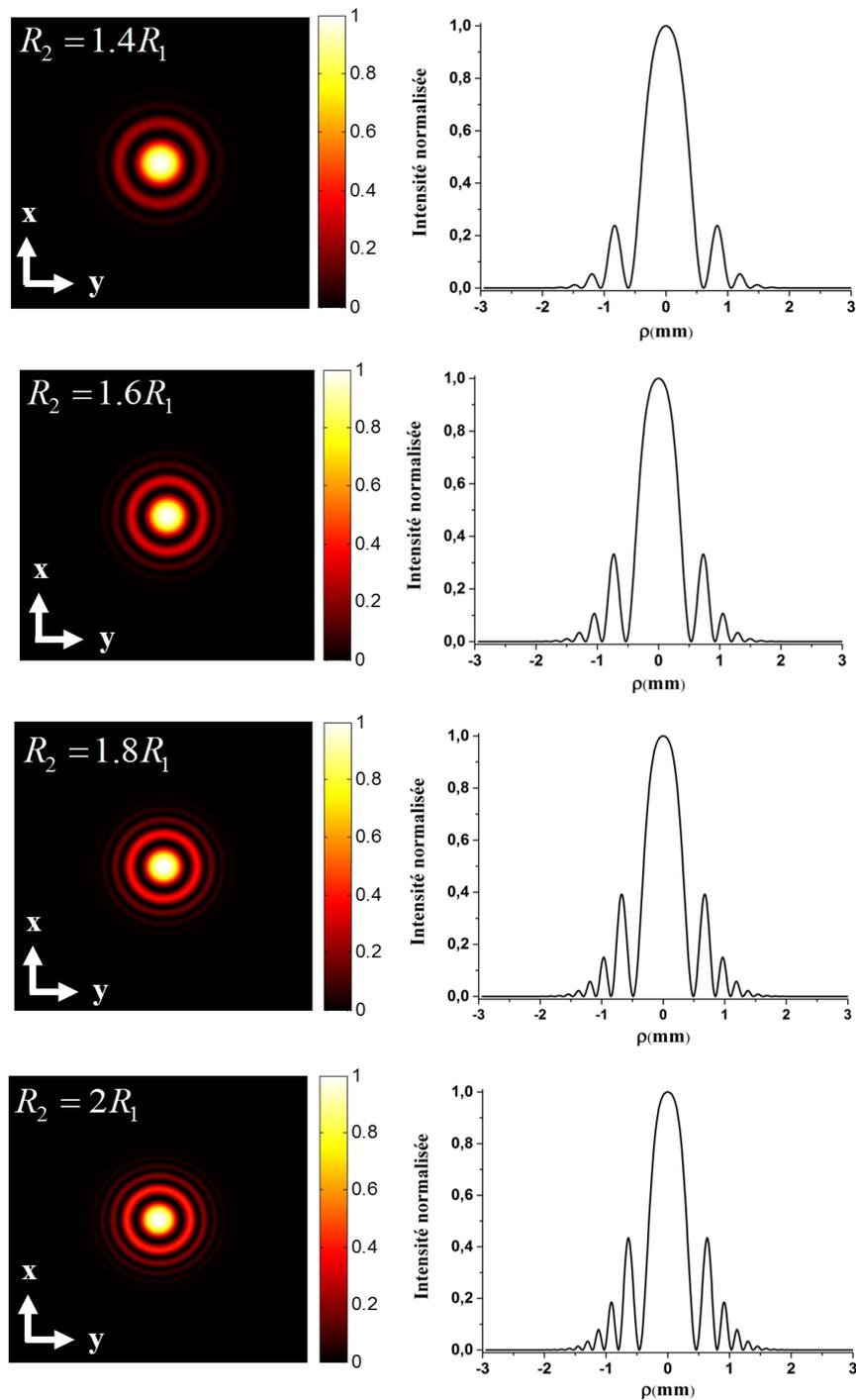


FIGURE. 4.10 – Présentation des interférogammes simulés et leurs profils d'intensité latéraux pour  $R_1=200\text{mm}$  et  $R_2$  variable

La figure. 4.10 montre deux cas de figures :

- Le premier cas, lorsque les deux rayons de courbures  $R_1$  et  $R_2$  sont identiques, la distribution reste une gaussienne comme celle de la figure (4.9-a).
- Le deuxième cas, lorsque  $R_1 \neq R_2$  l'interférence de deux faisceaux gaussiens donne naissance à une distribution annulaire des intensités.

Plus le décalage entre les deux rayons de courbure augmente, plus le nombre d'anneaux augmente sur un même espace (-2mm et +2mm), ceci explique la diminution progressive des largeurs à mi-hauteurs (FWHMs) du pic central.

La simulation a été poursuivie en étudiant cette fois-ci l'effet du décalage entre les rayons de courbure sur les distributions d'intensité axiales, en prenant les mêmes données que précédemment. Les résultats trouvés sont présentés dans la figure (4.11).

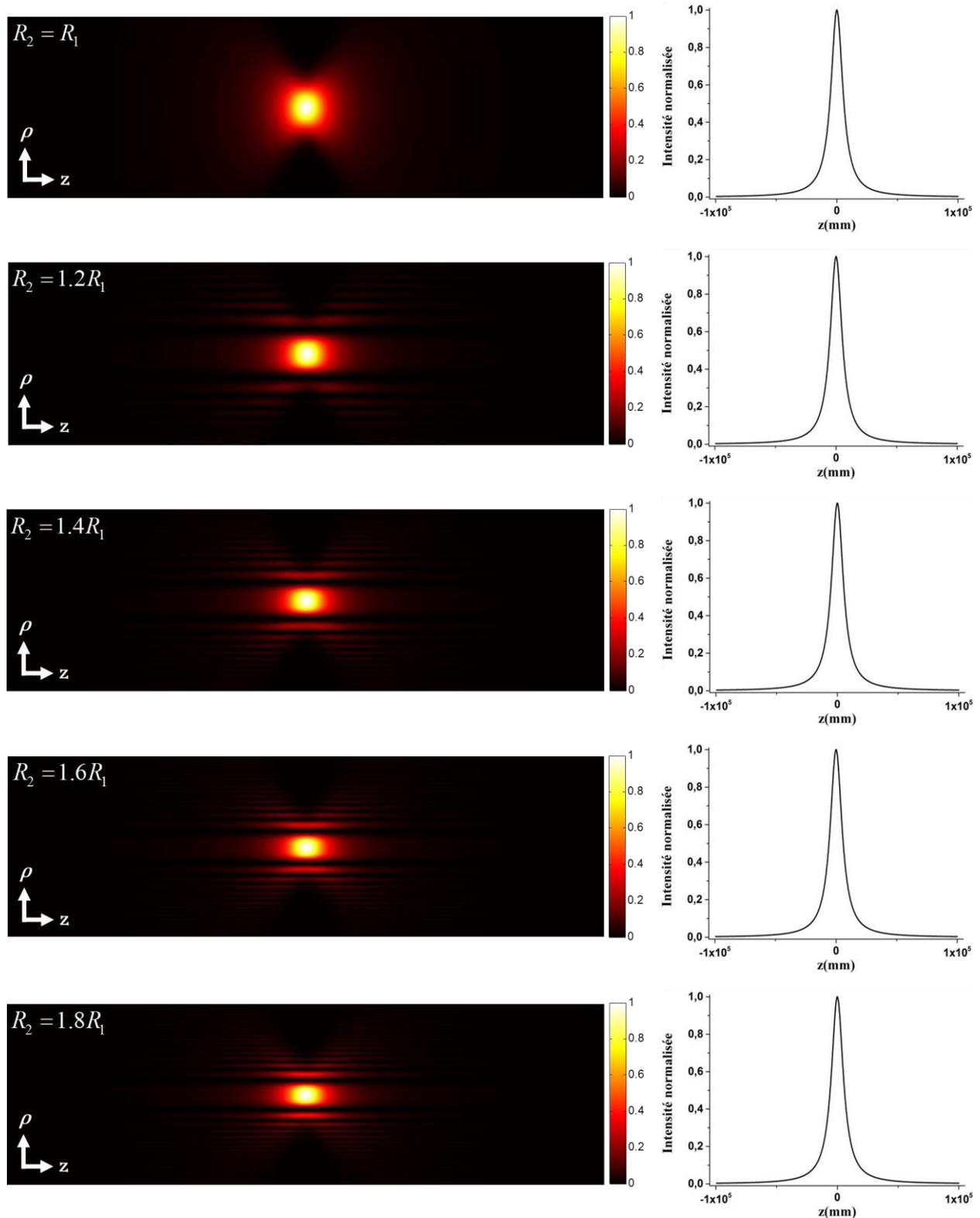




FIGURE. 4. 11 – Profils de l’intensité axiale correspondant aux franges d’interférences de deux faisceaux gaussiens illustrant l’effet de la variation du rayon de courbure.

D’après la figure 4.11, les profils tirés des interférogrammes montrent un seul pic à la position  $z=0$ . L’allure de ce profil ressemble à celle d’une Lorentzienne.

Une constatation globale, le décalage entre les rayons de courbure n’affecte pas les distributions des intensités axiales de l’interférence de deux faisceaux gaussiens, par contre son effet se voit clairement sur les distributions des intensités latérales.

#### 4.3.1.2 Superposition coaxiale de deux faisceaux gaussiens à travers un système optique convergent

Pour focaliser un faisceau laser dans un espace très réduit avec un diamètre, une courbure et une phase appropriée, un système convergent est nécessaire. Dans le cas d’une lentille idéale (dépourvue d’aberrations), la distribution du champ électrique d’un faisceau sortant reste la même que celle du faisceau entrant. Par exemple, un faisceau gaussien fondamental émerge de la lentille en tant que faisceau fondamental. Ainsi, le système convergent change seulement les paramètres du faisceau, c’est-à-dire, le rayon de courbure  $R(z)$  et le waist  $W(z)$  [204].

Dans le cas d’une superposition de deux faisceaux gaussiens à travers une lentille mince idéale de focale ‘ $f$ ’ appropriée, les rayons de courbures  $R'_1$  et  $R'_2$  à la sortie dépendent des rayons de courbure d’entrée  $R_1$  et  $R_2$  (correspondent au premier et au deuxième faisceau), et sont donnés par les expressions suivantes [204, 205]:

$$R'_1 = fR_1 / f - R_1 \tag{4.14}$$

$$R'_2 = fR_2 / f - R_2 \tag{4.15}$$

Les waists associés aux faisceaux gaussiens dans le plan focal sont donnés par :

$$W'_{01} = W_1 / \sqrt{1 + (\pi W_1^2 / \lambda R'_1)^2} \tag{4.16}$$

$$W'_{02} = W_2 / \sqrt{1 + (\pi W_2^2 / \lambda R'_2)^2} \tag{4.17}$$

Les positions  $z'_{01}$  et  $z'_{02}$  des waists des faisceaux sont représentées par les expressions suivantes :

$$z'_{01} = R'_1 / 1 + (\lambda R'_1 / \pi W_1^2)^2 \quad (4.18)$$

$$z'_{02} = R'_2 / 1 + (\lambda R'_2 / \pi W_2^2)^2 \quad (4.19)$$

Les positions des distributions d'amplitudes des deux champs électriques à travers un système convergent à une position 'z', se présentent comme suit :

$$z'_1 = z + z'_{01} \quad (4.20)$$

$$z'_2 = z + z'_{02} \quad (4.21)$$

Les expressions mathématiques des amplitudes de deux champs électriques gaussiens focalisés par une lentille en coordonnées cylindriques peuvent s'écrire de la manière suivante [205]:

$$E'_1 = E'_{01} \frac{W'_{01}}{W'_1} \exp \left[ - \left( \frac{\rho}{W'_1} \right)^2 \right] \exp \left[ i \left( kz'_1 - \phi'_1 + \frac{k\rho^2}{2R'_1} \right) \right] \quad (4.22)$$

$$E'_2 = E'_{02} \frac{W'_{02}}{W'_2} \exp \left[ - \left( \frac{\rho}{W'_2} \right)^2 \right] \exp \left[ i \left( kz'_2 - \phi'_2 + \frac{k\rho^2}{2R'_2} \right) \right] \quad (4.23)$$

Avec :

- $z'_{R1,2} = \pi W_{01,2}^2 / \lambda$  sont les distances de Rayleigh des deux faisceaux gaussiens après la lentille.
- $W'_{1,2} = W'_{01,2} \sqrt{1 + (z'_{1,2} / z'_{R1,2})^2}$  sont les largeurs des deux faisceaux gaussiens après la lentille.
- $R'_{1,2} = z'_{1,2} \left[ 1 + (z'_{R1,2} / z'_{1,2})^2 \right]$  sont les rayons de courbure des deux faisceaux gaussiens après la lentille.

Le champ électrique résultant de l'interférence de deux faisceaux gaussiens émergeant juste après une lentille est décrit par la formule suivante :

$$E'_T(\rho, z) = [E'_1(\rho, z) + E'_2(\rho, z)] \quad (4.24)$$

L'équation de l'intensité est calculée en négligeant les phases de Gouy et exprimée comme suit :

$$I'(\rho, z) = \left( E'_{01} \frac{W'_{01}}{W'_1} \right)^2 e^{-\frac{2\rho^2}{W_1'^2}} + \left( E'_{02} \frac{W'_{02}}{W'_2} \right)^2 e^{-\frac{2\rho^2}{W_2'^2}} + 2 \left( E'_{01} \frac{W'_{01}}{W'_1} \right) \left( E'_{02} \frac{W'_{02}}{W'_2} \right) e^{-\rho^2 \left( \frac{1}{W_1'^2} + \frac{1}{W_2'^2} \right)} \cdot \cos \left[ \left( \frac{\pi\rho^2}{\lambda} \left( \frac{1}{R'_2} - \frac{1}{R'_1} \right) \right) \right] \quad (4.25)$$

D'après l'équation (4.25), le champ émergent à travers un système convergent de focal  $f$  conduit à deux cas :

- Le premier cas est que l'un des deux faisceaux gaussiens focalise toujours à une position le long de l'axe de propagation  $z$ .
- Le deuxième cas concerne le second faisceau gaussien et comprend trois possibilités [205]:
  - (i) Le faisceau focalise dans certaines positions le long de l'axe de propagation après le foyer du premier faisceau gaussien.
  - (ii) Le faisceau est collimaté pendant la propagation.
  - (iii) Le faisceau diverge pendant la propagation avec une focale virtuelle positionnée avant la lentille.

Dans ce qui suit, nous nous intéresserons seulement au cas (i) pour pouvoir explorer les propriétés de la distribution spatiale de l'interférence d'après l'équation (4.25).

#### A) Cas de deux faisceaux gaussiens avec des rayons de courbures égaux et opposés

Ce cas de figure se présente quand les deux faisceaux gaussiens qui vont interférer au plan focal du système convergent auront les mêmes largeurs ( $W_{01}=W_{02}$ ), mais des rayons de courbure opposés ( $R_2=-R_1=R$ ). Ainsi l'équation (4.25) aura comme expression :

$$I'(\rho, z) = \left( E'_{01} \frac{W'_{01}}{W_1} \right)^2 e^{-\frac{2\rho^2}{W_1'^2}} + \left( E'_{02} \frac{W'_{02}}{W_2} \right)^2 e^{-\frac{2\rho^2}{W_2'^2}} + 2 \left( E'_{01} \frac{W'_{01}}{W_1} \right) \left( E'_{02} \frac{W'_{02}}{W_2} \right) e^{-\rho^2 \left( \frac{1}{W_1'^2} + \frac{1}{W_2'^2} \right)} \cdot \cos \left[ \left( \frac{\pi \rho^2}{\lambda R} \right) \right] \quad (4.26)$$

Les résultats numériques de l'équation (4.26) effectués avec une focale  $f=100mm$ , des waists  $W_{01}=W_{02}=1mm$  et  $\lambda=532$  nm, sont illustrés par la figure. 4.12. L'allure de la courbe montre la distribution de l'intensité axiale  $I'(0,z)$  résultant de la superposition coaxiale de deux faisceaux gaussiens en fonction de 'z'.

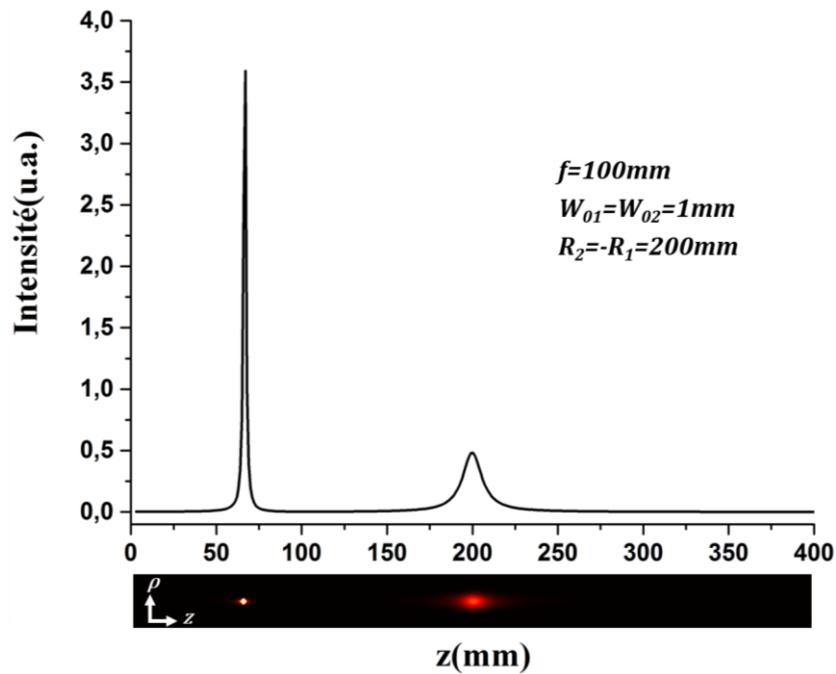


FIGURE. 4.12 – Profil et distribution en 2D de l'intensité de l'interférence de deux faisceaux gaussiens.

La figure. 4.12 montre deux pics, le premier est très intense se trouvant en avant du point focal situé à  $z=66\text{mm}$  et le deuxième moins intense situé au-delà du point focal à  $z=200\text{mm}$ .

De la figure. 4.12, trois distributions d'intensités latérales sont générées situées dans les plans positionnés à :  $z=66\text{mm}$ ,  $z=f=100\text{mm}$  et  $z=200\text{mm}$ . Les allures de ces dernières sont représentées par la figure. 4.13.

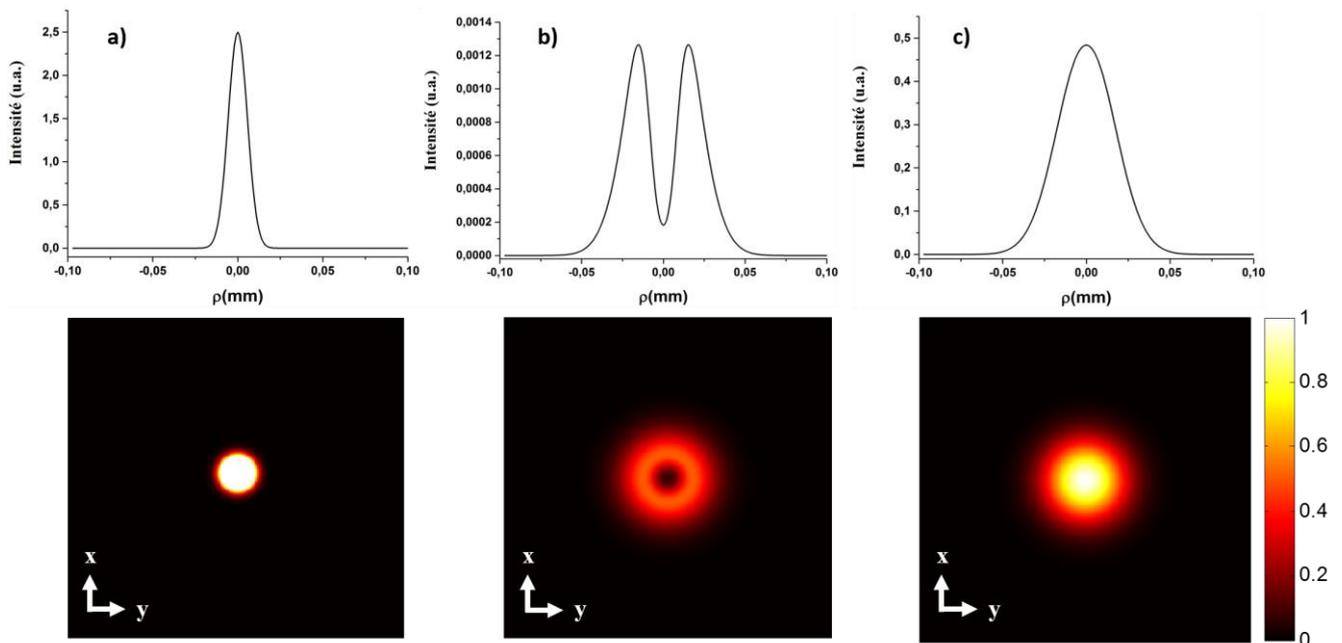


FIGURE. 4.13 – Distributions d'intensités latérales, (a) plan situé à  $z=66\text{mm}$ , (b) plan situé sur le plan focal à  $z=f=100\text{mm}$  et (c) plan situé  $z=200\text{mm}$ .

L'analyse de la distribution de l'intensité, selon la figure 4.13, montre les cas suivants :

- Pour le premier cas (4.13-a), à  $z=66\text{mm}$  (premier plan de focalisation), le profil latéral de l'intensité du faisceau possède une allure gaussienne avec une forte intensité et une largeur FWHM très petite.
- Le deuxième cas (4.13-b) correspondant à  $z=100\text{mm}$  (plan focal de la lentille), la distribution de l'intensité a une allure d'un creux.
- Le troisième cas (4.13-c), présente le deuxième plan de focalisation, situé à  $z=200\text{mm}$ . Le profil montre une allure gaussienne avec une intensité très faible et une largeur à mi-hauteur plus grande que celle du premier cas.

Examinant maintenant de près le cas (b), qui correspond à la distribution latérale de l'intensité lumineuse au point focal  $z=f$ . Dans ce plan, l'influence de la grandeur du rayon de courbure ( $R_2=-R_1=R$ ) sur la mise en forme de l'interférence des deux faisceaux gaussiens est montrée (voir la figure. 4.14).

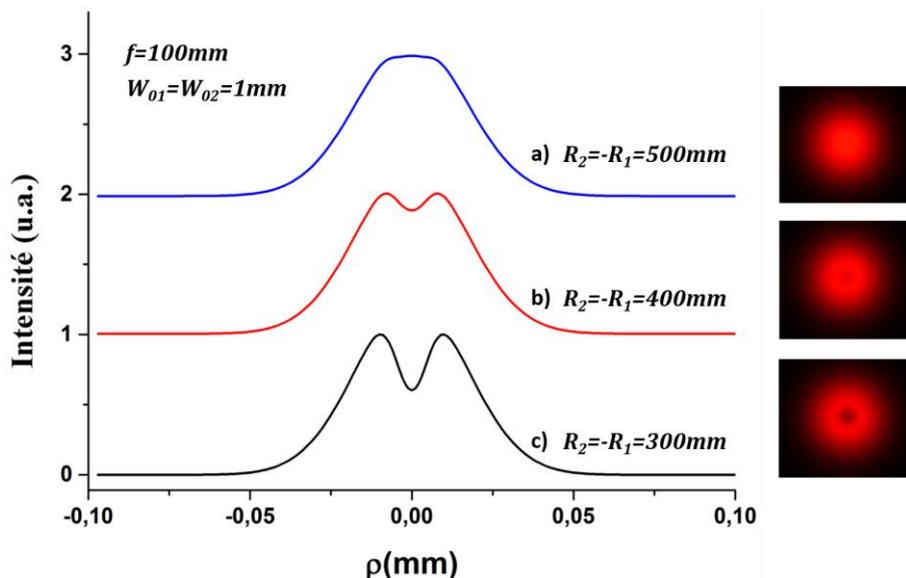


FIGURE. 4.14 – Profil et distribution en 2D de l'intensité latérale de l'effet du rayon de courbure sur la mise en forme d'un faisceau gaussien.

La figure. 4.14 montre que lorsque le rayon de courbure ' $R$ ' change, une mise en forme du faisceau est observée. La mise en forme de la distribution d'intensité est tracée pour trois valeurs de ' $R$ ' différentes :

- a) Pour ( $R_2=-R_1=500\text{mm}$ ), c'est-à-dire, une valeur cinq fois plus grande que celle de la focale, le faisceau gaussien (peut être trouvé avec un rayon de courbure très grand) devient une gaussienne à sommet plat.

- b) Le deuxième cas est tracé pour ( $R_2=-R_1=400\text{mm}$ ), la gaussienne à sommet plat a pris la forme d'un chapeau.
- c) L'acquisition d'un profil sous forme d'un beignet a été obtenu pour ( $R_2=-R_1=300\text{mm}$ ). Cette forme de profil peut prendre l'allure d'un creux pour des valeurs de 'R' plus petites (voir figure. 4.13 (b)).

Il est alors important de noter que l'interférence entre deux faisceaux gaussiens de rayons de courbures opposés, avec des valeurs proches ou très grandes par rapport à la focale du système convergent, permet de transformer un faisceau incident dont le profil radial est gaussien en une forme de faisceaux. Cette évolution peut être expliquée par le facteur modulateur  $\cos(\pi\rho^2/\lambda R)$ . Cette modulation peut se faire avec de simples interféromètres ou bien des optiques diffractives de phase.

### B) Cas de deux faisceaux gaussiens avec un décalage positif entre les deux rayons de courbure

Dans ce deuxième cas, nous étudions dans le plan focal les propriétés spatiales de la superposition coaxiale de deux faisceaux gaussiens, avec une même largeur des waists, mais maintenant avec un décalage ( $\Delta R=R_2-R_1$ ) positif entre les deux rayons de courbure ( $R_2>R_1$ ).

La figure. 4.15 représente les profils axiaux en fonction du décalage ' $\Delta R$ ' entre les rayons de courbure des faisceaux gaussiens interférés.

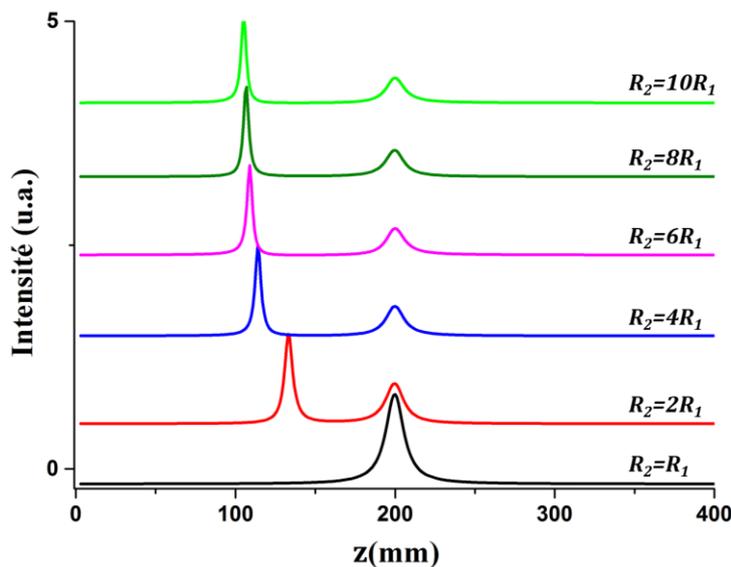


FIGURE. 4.15 – Evolution de la distribution de l'intensité axiale de l'interférence de deux faisceaux gaussiens en fonction de la variation du décalage entre les deux rayons de courbure.

La figure. 4.15 révèle deux cas :

- Le premier cas calculé pour ( $R_2=R_1$ ), un seul pic centré sur  $z=200mm$  est observé.
- Le deuxième cas, lorsque ( $R_2>R_1$ ), toutes les courbes présentent deux spots lumineux. Le plus large est constamment situé à  $z=200mm$ , mais beaucoup moins intense. Le deuxième pic est plus intense est moins large que le premier et se déplace vers le plan focal avec l'augmentation de ' $\Delta R$ '. Aussi, l'écart entre les maxima des deux pics augmente au fur et à mesure que le décalage des rayons de courbure croît.

Les positions exactes du deuxième pic en fonction de ' $\Delta R$ ', le long de propagation de l'axe ' $z$ ', sont représentées dans le tableau 4.5.

TABLEAU. 4.5 – Les positions axiales de l'intensité maximale en fonction de l'écart entre les rayons de courbure de deux faisceaux gaussiens interférés.

$\Delta R$	$R_2=2R_1$	$R_2=4R_1$	$R_2=6R_1$	$R_2=8R_1$	$R_2=10R_1$
<b>Position <math>z(mm)</math></b>	133.35	114.17	108.86	106.66	105.09

En tenant compte du deuxième pic, les largeurs à mi-hauteurs (FWHMs) des pics d'intensité en fonction de ' $\Delta R$ ', sont rassemblées dans le tableau 4.6. Pour illustrer cet effet, un ajustement de ce pic a été fait avec une gaussienne.

TABLEAU. 4.6 – Les valeurs des largeurs à mi-hauteur du deuxième pic en fonction de l'écart entre les rayons de courbure des faisceaux gaussiens interférés.

$\Delta R$	$R_2=2R_1$	$R_2=4R_1$	$R_2=6R_1$	$R_2=8R_1$	$R_2=10R_1$
<b>FWHM axial (mm)</b>	7.23	5.36	4.89	4.89	4.57

D'après le tableau 4.6, plus ' $\Delta R$ ' augmente plus la largeur à mi-hauteur diminue. Au début la décroissance est plus rapide, puis elle devient pratiquement très faible. Ceci peut s'expliquer par le facteur modulateur de l'équation (4.25), c'est-à-dire, lorsque ' $\Delta R$ ' est nul, la fonction 'cos' tend vers '1' et nous obtenons seulement un seul pic gaussien situé à ( $z=200mm$ ). Par contre, lorsque ' $\Delta R$ ' n'est pas nul, l'interférence des faisceaux gaussiens est capable de produire deux distributions gaussiennes de largeurs différentes, une située à la même position et l'autre est décalée par rapport à la première.

### 4.3.1.3 Effet de la phase de Gouy

Généralement, pour améliorer la résolution des systèmes optiques et produire un faisceau focalisé dans des dimensions très petites, la théorie scalaire est adoptée et les effets de la polarisation sont ignorés. En effet, les phénomènes de diffraction et de polarisation sont découplés tandis que les changements dans les courbures des fronts d'onde s'accompagnent d'un déphasage variable au cours de la propagation. Alors, l'état de la polarisation d'une onde est également modifié et cet effet est particulièrement aigu lors du passage dans une région focale [206]. Ce phénomène peut être exploité de telle sorte que les composantes de la polarisation sélectionnée acquièrent un plus grand confinement dans les directions transversale et axiale. La technique est basée sur l'interférence de deux faisceaux gaussiens de polarisation orthogonale ayant un décalage dans leurs phases de Gouy. Ce décalage est principalement créé par un retard dans le chemin optique qui introduit ainsi une composante de polarisation (circulaire droite ou gauche) avec un volume focal très petit par rapport à celui du faisceau gaussien [17].

La figure. 4.16 illustre deux faisceaux gaussiens coaxiaux polarisés orthogonalement avec des waists  $W_{01}$  et  $W_{02}$  décalés axialement d'une valeur de  $2\Delta$ . De ce fait, les faisceaux subissent un retard limité à la région proche des foyers avec une valeur maximale correspondant à une alternance au centre. La phase de Gouy de chaque faisceau varie de  $[-\pi/2, +\pi/2]$  pour un  $z$  compris entre  $[-\infty, +\infty]$  et présente une valeur nulle au foyer.

Par conséquent, la différence de la phase de Gouy entre les deux faisceaux est nulle partout sauf à proximité des foyers où elle atteint une valeur maximale de  $\pi$  au centre des faisceaux.

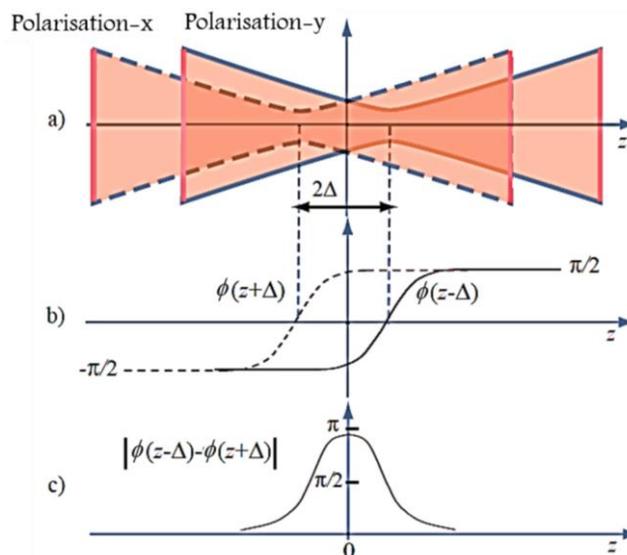


FIGURE. 4. 16 – (a) Interférences de deux faisceaux gaussiens polarisés suivant les axes x et en y avec des centres décalés d'une distance  $2\Delta$ . (b) Les déphasages de Gouy associés aux deux faisceaux. (c) La différence des phases de Gouy [206].

L'amplitude des champs électrique des faisceaux gaussiens polarisés en x et y, tout en considérant que les centres de faisceaux sont décalés d'une distance de  $2\Delta$ , peut s'écrire de la manière suivante [206]:

$$E_x(\rho, z - \Delta) = E_{01} \frac{W_{01}}{W_1} \exp\left[-\left(\frac{\rho}{W_1}\right)^2\right] \exp\left[-i\left(k(z - \Delta) + \frac{k\rho^2}{2R} - \phi(z - \Delta)\right)\right] \quad (4.27)$$

$$E_y(\rho, z + \Delta) = E_{02} \frac{W_{02}}{W_2} \exp\left[-\left(\frac{\rho}{W_2}\right)^2\right] \exp\left[-i\left(k(z + \Delta) + \frac{k\rho^2}{2R} - \phi(z + \Delta) + \xi\right)\right] \quad (4.28)$$

où,  $\xi$  est un facteur de phase supplémentaire introduit dans la composante y.

En tenant compte de l'état de polarisation circulaire, l'équation (4.11) de la distribution de l'intensité de l'interférence de deux faisceaux gaussiens deviendra comme suit [206] :

$$I(\rho, z) = \left(E_{01} \frac{W_{01}}{W_1}\right)^2 e^{-\frac{2\rho^2}{W_1^2}} + \left(E_{02} \frac{W_{02}}{W_2}\right)^2 e^{-\frac{2\rho^2}{W_2^2}} + 2\left(E_{01} \frac{W_{01}}{W_1}\right)\left(E_{02} \frac{W_{02}}{W_2}\right) e^{-\rho^2\left(\frac{1}{W_1^2} + \frac{1}{W_2^2}\right)} \cdot \sin(\phi(z - \Delta) - \phi(z + \Delta) + 2k\Delta - \xi) \quad (4.29)$$

D'après l'équation (4.29), la différence de phase produite par l'interférence de deux faisceaux gaussiens avec un décalage axial de  $2\Delta$  est donnée comme suit :

$$\phi(z - \Delta) - \phi(z + \Delta) + 2k\Delta - \xi \quad (4.30)$$

La phase trouvée varie en fonction de 'z' et de l'état de polarisation. Comme illustré à la figure. 4.16, la différence entre les phases de Gouy est approximativement nulle, sauf près du foyer du faisceau, où elle peut atteindre une valeur maximale de  $\pi$  à  $z=0$ . Cette condition peut être exploitée pour effectuer une conversion de l'état de polarisation à la région focale.

- Dans ce cas, si la phase constante ( $2k\Delta - \xi = \pi/2$ ), le faisceau combiné est à l'état de polarisation circulaire droite aux points axiaux éloignés de la région focale ( $z \neq 0$ ) et à l'état de polarisation circulaire gauche à ( $z=0$ ).

Par conséquent, la conversion de polarisation sur l'axe lorsque le faisceau traverse la région focale est uniquement attribuée à l'effet Gouy.

Selon la figure 4.16, quand ( $z=0$ ) et en présence du décalage ' $\Delta$ ', la phase de Ghouy aura comme expression  $\phi(\Delta) = \arctan(\Delta/z_R)$  (voir chapitre 1 équation 10). Maintenant, nous montrons que pour certaines valeurs de ( $\Delta/z_R$ ), le volume focal de la polarisation circulaire gauche peut être inférieur à celui du faisceau gaussien, réalisant ainsi une super-résolution axiale ou latérale ou les deux.

L'étude de l'influence de ce paramètre a été contrôlée pour les deux étapes suivantes :

- La première étape, illustrée par la figure 4.17, montre la comparaison entre les distributions des intensités d'un faisceau gaussien et celle de l'interférence de deux faisceaux gaussiens avec un rapport de décalage  $\Delta/z_R \approx 0,1$ . L'analyse numérique a été effectuée avec une longueur d'onde d'excitation  $\lambda=532$  nm et des waists  $W_{01}$  et  $W_{02}=1$ mm.

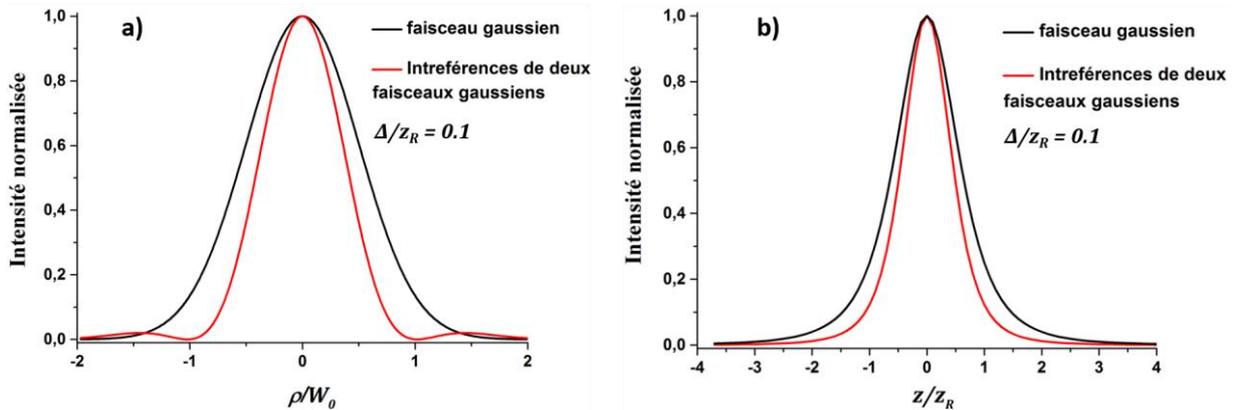


FIGURE. 4.17 – Comparaison entre les profils d'intensité d'un faisceau gaussien et celui de l'interférence de deux faisceaux gaussiens :(a) Profils latéraux (b) Profils axiaux.

Les valeurs des FWHMs, tirées des profils d'intensité de la figure 4.17 ont été ajustés par une fonction gaussienne, sont représentées dans le tableau 4.7.

TABLEAU. 4.7 – Comparaison entre les valeurs des largeurs à mi-hauteur latérales et axiales d'un faisceau gaussien et celles de l'interférence de deux faisceaux gaussiens.

Méthodes	FWHM latéral	FWHM axial
Faisceau gaussien	1.18	1.38
Interference de deux faisceaux gaussiens	0.79	1.05

En passant d'un faisceau gaussien à l'interférence de deux faisceaux gaussiens, nous constatons qu'un décalage dans la phase de Gouy peut améliorer la résolution latérale de 39% et celle de la résolution axiale de 30%. Donc, il est possible de générer un faisceau focalisé avec des dimensions de foyer plus petites que celles des faisceaux gaussiens et franchir la limite de la résolution en utilisant les interférences de ces deux derniers.

- La deuxième étape, illustrée par la figure 4.18, indique l'évolution des distributions d'intensités latérales et axiales produites par l'interférence de deux faisceaux gaussiens pour différentes valeurs de  $\Delta/z_R$ .

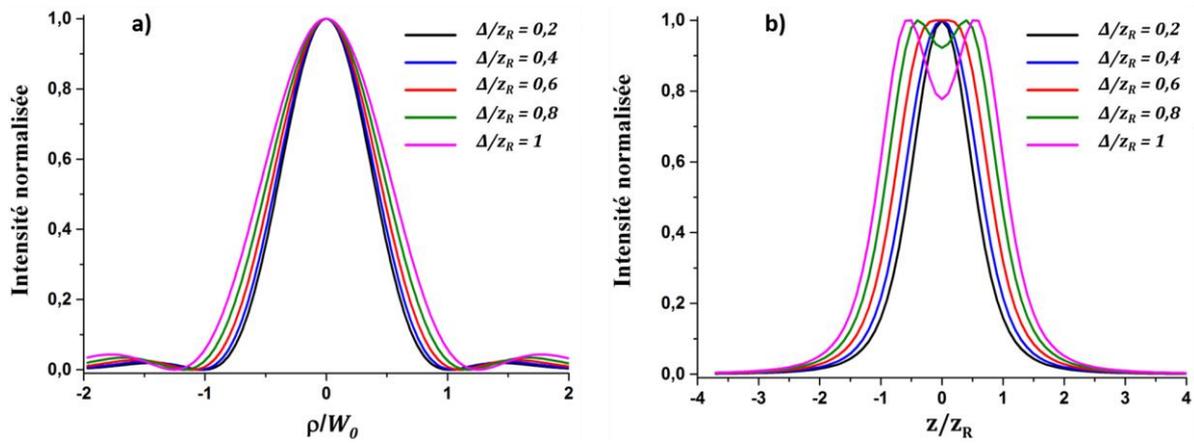


FIGURE. 4. 18 – Représentation des profils d’intensité (a) latérale et (b) axiale pour différentes valeurs de  $\Delta/z_R$ .

D’après la figure 4.18, l’allure des profils des distributions d’intensités latérales ont une forme d’une gaussienne, par contre l’allure des profils des intensités axiales évolue sous une forme gaussienne, puis prend une forme non gaussienne (aplatie ou la forme d’un creux). De ce fait, la combinaison de faisceaux gaussiens avec un grand décalage de phase de Gouy correspond à des faisceaux polarisés circulairement mais avec des distributions spatiales non gaussiennes.

Les valeurs des largeurs à mi-hauteurs des courbes tracées dans la figure 4.18 sont représentées dans le tableau 4.7.

TABLEAU. 4.8 – Comparaison entre les valeurs des FWHMs latérales et axiales de l’interférence de deux faisceaux gaussiens en fonction de  $\Delta/z_R$ .

$\Delta/z_R$	0.2	0.4	0.6	0.8	1
FWHM latéral	0.80	0.84	0.90	0.97	1.06
FWHM axial	1.17	1.33	Non gaussien		

Le tableau ci-dessus montre que plus le rapport  $\Delta/z_R$  augmente plus les largeurs des FWHMs augmentent. Par conséquent, afin d’atteindre une meilleure résolution, il faut que le rapport  $\Delta/z_R$  soit égale ou inférieure à 0.1.

## 4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons introduit le microscope confocal illuminé par un faisceau gaussien en évoquant sa réponse impulsionnelle (PSF) et les principales distorsions qui peuvent affecter ses performances. Pour le calcul numérique de la PSF, un modèle basé sur la diffraction scalaire est utilisé. Dans ce modèle, la variation de la PSF a été étudiée en fonction de plusieurs paramètres parmi lesquels les aberrations sphériques qui découlent uniquement des effets réfractifs en provenance de l'échantillon et de son environnement.

Dans la deuxième partie du chapitre, la modélisation et l'aspect théorique des interférences des modes lasers gaussiens sont présentés. Les interférences de deux faisceaux gaussiens en présence d'un décalage entre les rayons de courbure permettent une mise en forme de la distribution spatiale de l'intensité en produisant différentes distributions au foyer d'un système optique. En outre, les interférences de deux faisceaux gaussiens en présence d'un décalage entre les phases de Gouy permettent la réduction de la taille du faisceau en offrant une alternative pour l'amélioration de la résolution. Par conséquent, la contrôlabilité de la différence de la phase de Gouy permettra de grandes applications potentielles dans le plan focal de la microscopie optique.

## *Troisième partie*

Réalisation du montage de spectroscopie de  
corrélation : Application à la caractérisation des  
nanoparticules d'or

# Chapitre 5

## Mise en place du système expérimental

### Sommaire

---

<b>5.1 Introduction .....</b>	<b>89</b>
<b>5.2 Le montage expérimental.....</b>	<b>89</b>
5.2.1 Source d'excitation.....	90
5.2.2 Le filtrage spectral.....	91
5.2.2.1 Filtres d'excitation.....	91
5.2.2.2 Miroirs dichroïques.....	91
5.2.2.3 Filtres d'émission .....	92
5.2.3 Le filtrage spatial.....	92
5.2.3.1 Télescope.....	92
5.2.3.2 Objectif de microscope.....	93
5.2.3.3 Trou confocal (Pinhole).....	93
5.2.4 Acquisition des données.....	94
5.2.4.1 Photodiodes à avalanches (APD).....	94
5.2.4.2 Corrélateur .....	95
<b>5.3 Caractérisation du montage de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS).....</b>	<b>96</b>
5.3.1 Détermination de la résolution optique du montage par la mesure de la PSF (Point Spread Function).....	97
5.3.2 Détermination de la résolution optique du montage par la technique FCS.....	99
5.3.2.1 Matière et méthode .....	100
5.3.2.2 Principe de mesure FCS .....	101
5.3.2.3 Comparaison entre les trois méthodes de détermination du volume effectif.....	105
5.3.3 Aspects photophysiques des mesures de FCS : état triplet.....	106
5.3.4 Les principaux paramètres influençant la résolution du montage FCS .....	109
5.3.4.1 Effet de la taille du trou confocal sur la mesure de la PSF.....	109
5.3.4.2 Effet de la taille du faisceau sur la mesure de la PSF .....	110
5.3.4.3 Effet de la modification du profil gaussien d'intensité de l'excitation sur la mesure de la PSF .....	114
<b>5.4 Etude des effets réfractifs en microscopie confocale de fluorescence .....</b>	<b>116</b>
- Article du journal joint: Refractive effects of the Gaussian beam on the volume confinement for fluorescence correlation spectroscopy: Experimental and numerical study.....	117
<b>5.5 Conclusion .....</b>	<b>126</b>

---

## 5.1 Introduction

Ce chapitre est dédié au montage de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), où sa mise en place ainsi que sa caractérisation ont constitué une partie très importante de mon travail de thèse. Le chapitre se scinde en deux parties, la première partie est consacrée à la description du système expérimental, tandis que la deuxième partie est consacrée au fonctionnement du système et sa caractérisation par différentes méthodes. Ces dernières s'appuient sur la corrélation du signal de molécules fluorescentes ainsi que sur l'étude de la fonction d'étalement du point (PSF) faite avec des billes fluorescentes. Les résultats expérimentaux obtenus pour différents échantillons sont représentés et discutés à la fin du chapitre.

Le chapitre est suivi par une contribution que nous avons réalisée sur les effets réfractifs dans la mesure du volume confocal dans le cadre de la spectroscopie de corrélation de fluorescence.

## 5.2 Le montage expérimental

Le montage expérimental de la FCS est basé sur l'utilisation d'un microscope inversé (Axio Observer D1, Zeiss), comme illustré à la figure. 5.1. Le système d'excitation est constitué de plusieurs sources laser : He-Ne (633 nm) et diodes laser (488 et 532 nm). La puissance du faisceau exciteur est contrôlée par une lame demi-onde ( $\lambda/2$ ) accolée à un polariseur. Le faisceau est élargi spatialement par le biais d'un dispositif afocal (téléscope) afin de couvrir la pupille arrière de l'objectif de microscope (60X, ON=1.2, Zeiss plan apochromat à immersion à eau). Le faisceau incident est focalisé sur l'échantillon à l'aide de l'objectif de microscope après avoir été réfléchi par un miroir dichroïque, conçu pour réfléchir l'excitation sous une incidence de 45 degrés, et transmettre le signal de fluorescence. La fluorescence émise par l'échantillon est collectée par le même objectif. Par la suite, le signal de fluorescence est focalisé par une lentille ( $f^*=160$  mm) sur un trou confocal ("pinhole" en anglais, de 30 $\mu$ m ou 50 $\mu$ m de diamètre (Thorlabs)) placé dans le plan image de l'objectif de microscope. En sortie du trou confocal, le signal de fluorescence est divisé par un cube séparateur 50/50 et collecté par deux photodiodes à avalanche (SPCM-AQRH, Excelitas technologies, Canada), placées derrière des filtres d'émission. Les deux photodiodes à avalanche sont reliées à un corrélateur (ALV-7004/USB Multiple Tau Digital Correlator, ALV-Laser GmbH, Langen, Germany) afin d'analyser le signal de fluorescence. L'analyse des données par FCS permet l'obtention de plusieurs informations : le nombre de molécules fluorescentes dans le volume confocal, le temps de diffusion de ces molécules, la durée de vie de l'état triplet ainsi que le taux de comptage par molécule (CRM).

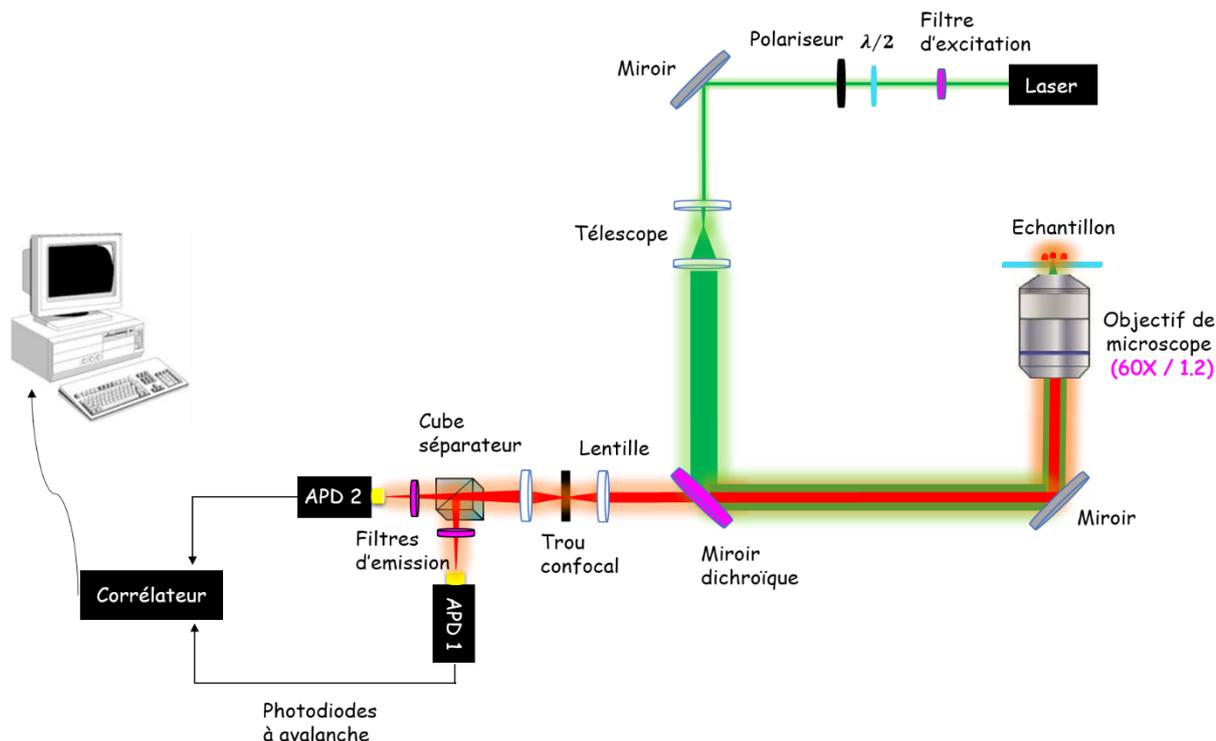


FIGURE. 5.1 – Schéma du dispositif de la spectroscopie de corrélation de fluorescence FCS.

Ce dispositif expérimental comporte trois parties : la partie excitation, le microscope (confocal) et le système de détection, ces parties vont être décrites successivement.

### 5.2.1 Source d'excitation

Les sources d'excitation utilisées sont des sources LASER de différentes longueurs d'onde afin d'exciter différents types de fluorophores. Pour mener nos expériences, nous avons installé dans notre dispositif trois lasers : une diode laser avec  $\lambda=488$  nm (lasers Cobolt MLDTM) ayant une puissance maximale de 150 mW, une deuxième diode laser avec  $\lambda=532$  nm (Optoelectronics Company, Royaume-Uni) d'une puissance d'environ 2 mW et un laser à gaz avec  $\lambda=633$  nm (He-Ne Laser, Thorlabs SAS, France) de puissance de 1 mW. Les sources laser sont accompagnées par leurs filtres d'émission, dichroïque et d'excitation correspondant à chaque longueur d'onde. La puissance des sources lasers est ajustée en tournant l'axe d'une lame demi-onde et un polariseur (qui reste fixe pour une polarisation horizontale en sortie), ensuite à l'aide d'un photodétecteur (NOVA, OPHIR Photonics, USA) combiné à un puissance-mètre, les valeurs de la puissance d'excitation sont ajustées en fonction de la mesure effectuée.

## 5.2.2 Le filtrage spectral

### 5.2.2.1 Filtres d'excitation

À la sortie de chaque faisceau laser, un filtre d'excitation (filtre passe-bande) est utilisé pour sélectionner la longueur d'onde principale d'excitation. La figure. 5.2 montre les courbes de transmission des filtres d'excitation pour les longueurs d'onde 532 et 633 nm.

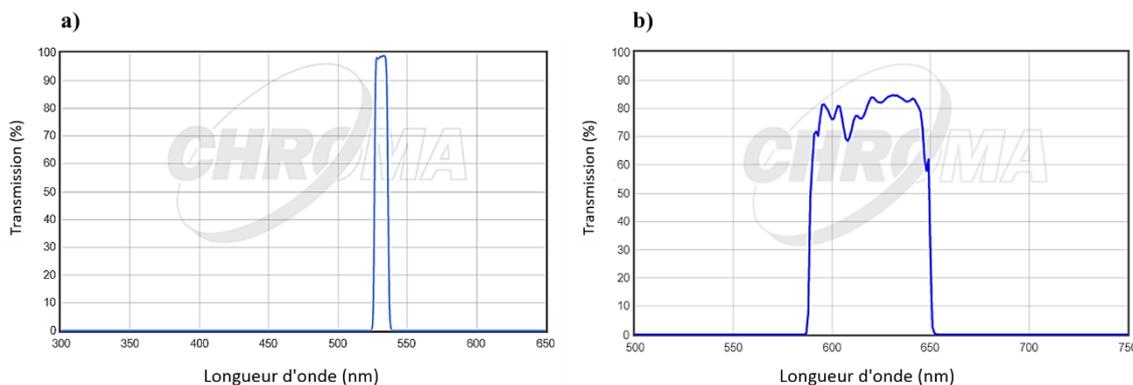


FIGURE. 5.2 – Caractéristiques des filtres d'excitation : spectre de transmission tracé pour la gamme de longueur d'onde a) 300-650 nm pour le filtre d'excitation de 532 nm (ZET532/10x) et b) 500-750 nm pour le filtre d'excitation de 633 nm (HQ620/60x). (D'après : <http://www.chroma.com>)

### 5.2.2.2 Miroirs dichroïques

Un élément essentiel du microscope de fluorescence est le miroir dichroïque (le filtre dichroïque). Ce dernier est situé juste avant l'objectif et orienté à 45°. Son rôle est de séparer les faisceaux d'excitation de la fluorescence, qui empruntent tous deux le même trajet optique via l'objectif. Un filtre dichroïque réfléchit le faisceau d'excitation vers l'échantillon, et transmet la fluorescence émise par celui-ci, c'est un filtre passe-haut. Les courbes de transmission des miroirs dichroïques en fonction de la longueur d'onde sont illustrées à la figure. 5.3.

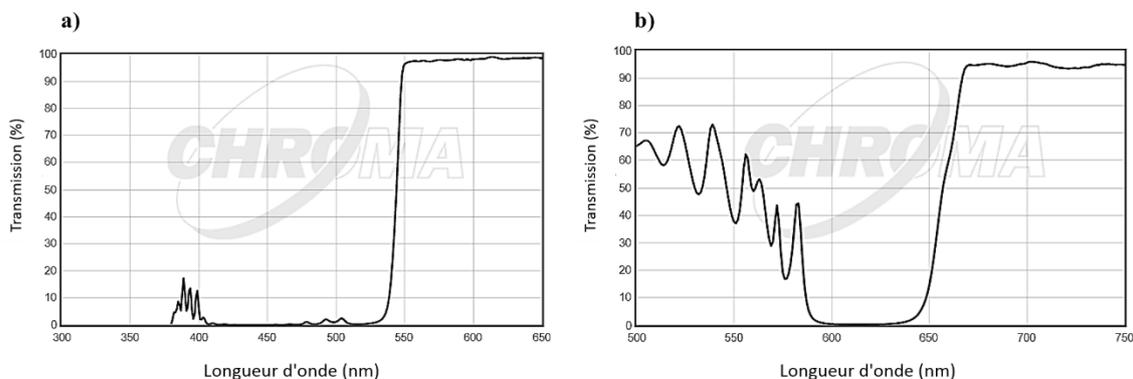


FIGURE. 5.3 – Caractéristiques des miroirs dichroïques : spectre de transmission tracé pour la gamme de longueur d'onde a) 300-650 nm pour le laser à 532 nm (ZT532rdc) et b) 500-750 nm pour le laser à 633 nm (z633rdc). (D'après: <http://www.chroma.com>)

### 5.2.2.3 Filtres d'émission

Le filtre d'émission est utilisé afin de bloquer une deuxième fois l'excitation (diffusion Rayleigh), et transmettre le signal de fluorescence émis par l'échantillon vers le détecteur. Les courbes de transmission des filtres d'émission pour les longueurs d'onde 532 et 633 nm sont illustrées à la figure. 5.4.

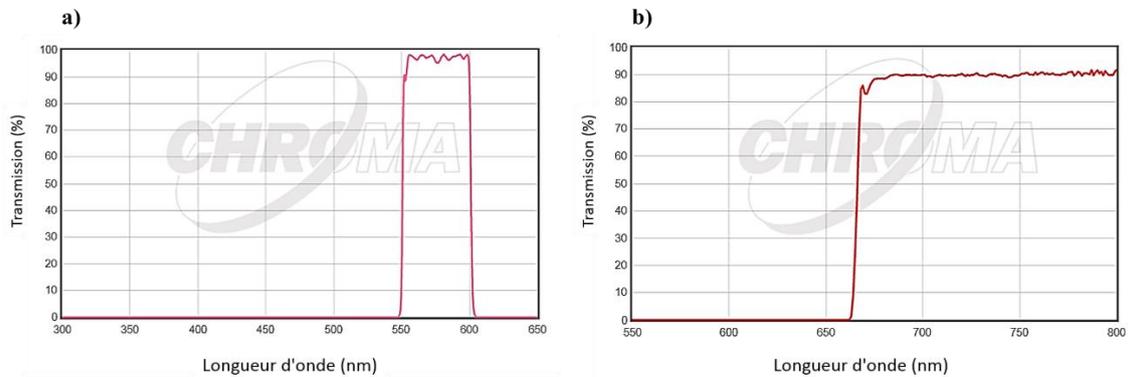


FIGURE. 5.4 – Caractéristiques des filtres d'émission : spectre de transmission tracé pour la gamme de longueur d'onde a) 300-650 nm pour le laser à 532 nm (ET575/50m) et b) 550-800 nm pour le laser à 633 nm (HQ665lp). (D'après : <http://www.chroma.com>)

### 5.2.3 Le filtrage spatial

#### 5.2.3.1 Télescope

La figure. 5.5 représente le schéma de principe d'un système afocal (téléscope) qui comporte deux lentilles convergentes  $L_1$  et  $L_2$  avec des distances focales  $f_1$  et  $f_2$  respectivement. Les deux lentilles sont placées de façon à ce que le foyer image de la première lentille corresponde au foyer objet de la deuxième.

Les deux lentilles permettent d'élargir le faisceau d'excitation d'un facteur de grandissement  $G$ . Si les diamètres du faisceau laser avant et après l'expansion sont  $d$  et  $D$ , le facteur de grandissement de faisceau est défini comme suit :

$$G = f_2 / f_1 = D / d \quad (5.1)$$

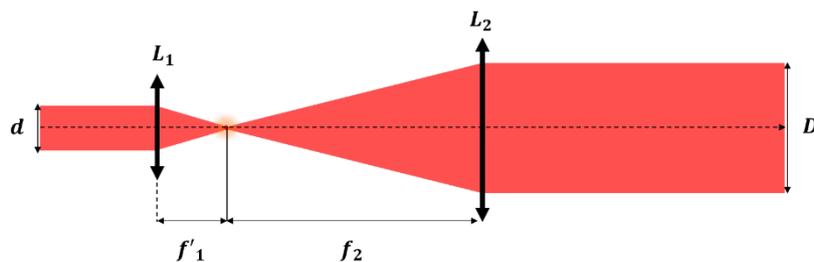


FIGURE. 5.5 – Schéma du collimateur optique.

Dans le montage expérimental, le diamètre du faisceau laser (2 mm) est agrandi 4 fois afin de permettre un remplissage effectif total de la pupille arrière (8 mm) de l'objectif de microscope pour qu'il soit utilisé dans une configuration où son ouverture numérique soit maximale afin d'obtenir une bonne résolution optique.

### 5.2.3.2 Objectif de microscope

L'objectif de microscope est l'un des composants les plus essentiels en microscopie optique, il est caractérisé par l'ouverture numérique ( $ON$ ), qui est définie par:  $ON = n \sin \theta$ , avec  $n$  l'indice de réfraction du milieu après l'objectif et  $\theta$  le demi-angle au sommet du cône de lumière pouvant entrer (ou sortir) de l'objectif (figure. 5.6). L'ouverture numérique joue un rôle essentiel à la fois lors de l'excitation (focalisation du faisceau sur l'échantillon) et de la détection (collection du faisceau de fluorescence).

Dans le dispositif FCS, un objectif de microscope avec une grande ouverture numérique ( $ON=1.2$ ) à immersion à eau est utilisé. Ceci est compatible avec l'imagerie des échantillons aqueux (solutions, cellules, ...etc).

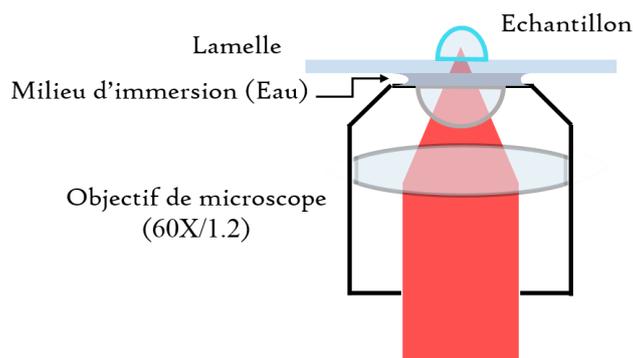


FIGURE. 5.6 – Description d'un objectif de microscope.

### 5.2.3.3 Trou confocal (Pinhole)

Le trou confocal a été introduit pour la première fois dans le dispositif de la spectroscopie de corrélation de fluorescence par Rigler afin de réduire le volume effectif de collection et augmenter le rapport signal sur bruit [160]. En effet, le système confocal est réalisé à l'aide d'un trou soigneusement placé au foyer optique conjugué de l'objectif de microscope. Toute fluorescence émise derrière ou devant le plan focal est bloquée par le trou et n'est donc pas détectée. Par contre, si la fluorescence est émise à partir du plan focal, le signal est envoyé derrière le trou et enregistré par le détecteur.

Afin d'avoir la meilleure résolution (filtrage spatial), il est nécessaire d'utiliser un trou le plus petit possible. Cependant au-delà d'une certaine limite le signal devient très faible, ce qui réduit le rapport signal sur bruit. Donc, la taille du trou confocal doit être judicieusement choisie de sorte que son image par l'objectif de microscope soit un trou de diamètre correspondant au disque d'Airy de faisceau laser. La tache centrale de cette fonction d'Airy a un diamètre défini comme suit  $\phi = 1.22M \lambda / ON$  avec  $M$  le grossissement du microscope.

Par conséquent, pour avoir une bonne résolution et conserver un rapport signal sur bruit correct, le diamètre du trou confocal ne doit pas être inférieur à la valeur de  $\phi$ .

## 5.2.4 Acquisition des données

### 5.2.4.1 Photodiodes à avalanches (APD)

Le signal de fluorescence collecté par l'objectif de microscope traverse le trou confocal et ensuite détecté par deux photodiodes à avalanche (APD). Ces dernières convertissent le signal de fluorescence en un signal électronique mesurable. Les APDs sont des détecteurs (SPCM-AQRH, Excelitas technologies, Canada) à haute efficacité quantique, QE  $\sim 70\%$  à 700 nm avec un courant d'obscurité de l'ordre de 100 coups/s, d'une région active de  $180 \mu\text{m}^2$  fonctionnant en régime de comptage de photons uniques sur une large gamme de longueurs d'onde (400-1000 nm). La figure. 5.7 représente l'efficacité quantique des photodiodes à avalanche (APD) utilisées.

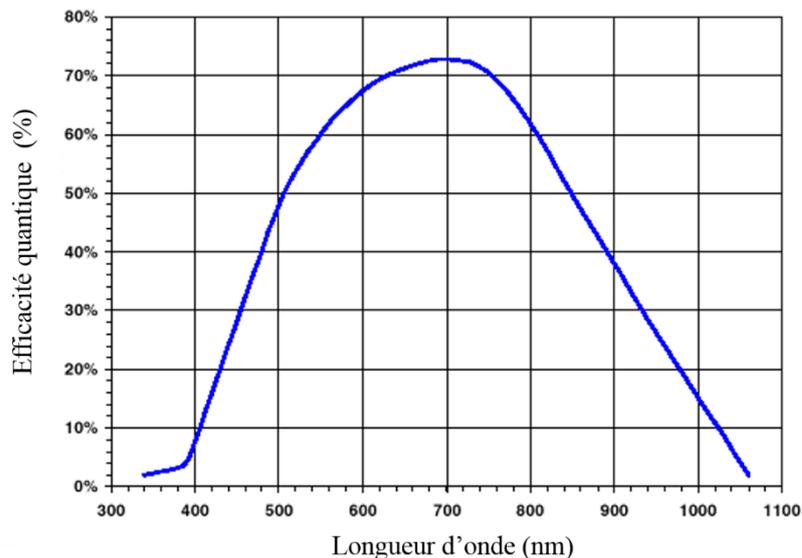


FIGURE. 5.7 – Courbe de l'efficacité quantique de la photodiode à avalanche en fonction de la longueur d'onde (D'après : <http://www.excelitas.com>).

L'intérêt d'utiliser deux détecteurs plutôt qu'un seul en FCS est de contourner leurs limitations technologiques. Les systèmes à comptage de photons ont un problème de génération d'un signal ultra bref dit "après-pulsation, afterpulsing en anglais" dans la région aux temps courts [207]. Par conséquent, les détecteurs génèrent un faux signal de l'ordre de la nano à la microseconde après la détection du signal de fluorescence [208]. Cet effet est un problème sérieux dans FCS en raison de sa nature corrélable. Un fort pic caractéristique apparaît dans la fonction de corrélation à la région des nanosecondes jusqu'aux microsecondes. Bien que l'effet de l'après-pulsation soit faible à 1ms, mais il interfère avec les vrais signaux qui représentent les processus dynamiques rapides comme la formation de l'état triplet ainsi qu'il perturbe l'estimation correcte de l'amplitude de la fonction de corrélation à petite échelle [207, 208].

Afin d'éliminer l'effet de l'après-pulsation, le moyen le plus simple était d'utiliser deux détecteurs indépendants [208]. Dans le montage FCS, le signal de fluorescence est séparé en deux par un cube séparateur 50/50 (Chroma) avant d'être envoyé sur deux photodiodes à avalanche (APD). Par la suite, un calcul de corrélation croisée entre les sorties des APDs est réalisé ; une courbe de corrélation dépourvue de l'effet de l'après-pulsation est donc obtenue. Dans ce cas, la fonction de corrélation résultante est formellement similaire à la fonction d'autocorrélation sans perturbation.

#### **5.2.4.2 Corrélateur**

Les photodiodes à avalanche APD sont connectées à un corrélateur multi-canal (ALV-7004 / USB Multiple Tau corrélateur numérique, ALV-Laser GmbH, Langen, Allemagne) qui est relié à l'ordinateur via une carte d'acquisition LabView (National Instruments, Texas, États-Unis). Le corrélateur effectue directement un calcul de corrélation en incluant l'enregistrement de la trace d'intensité en fonction du temps, et la fonction de corrélation est ensuite présentée sur une échelle du temps logarithmique en une seule mesure [207]. Ce corrélateur a la capacité de mesurer les corrélations temporelles pour des délais allant d'une durée inférieure à la microseconde jusqu'à plusieurs minutes.

Le dispositif FCS est équipé d'une platine de déplacement (x,y,z) actionnée par des calles piézo-électriques (PZ82E-200 × 200 × 20µm- Physike Instrument, Allemagne), reliée à un contrôleur (Digital PZT Controller E - 710, Physike Instrument, Allemagne) permettant par le biais d'une connexion IEEE le pilotage par ordinateur les déplacements des échantillons fixés sur la platine. À l'aide d'un programme en Labview, les images de l'échantillon sont réalisées à partir des signaux de fluorescence enregistrés par les APD en mode point par point.

Une photographie du montage expérimental développé au laboratoire CSPBAT (université paris 13) est représentée sur la figure 5.8.

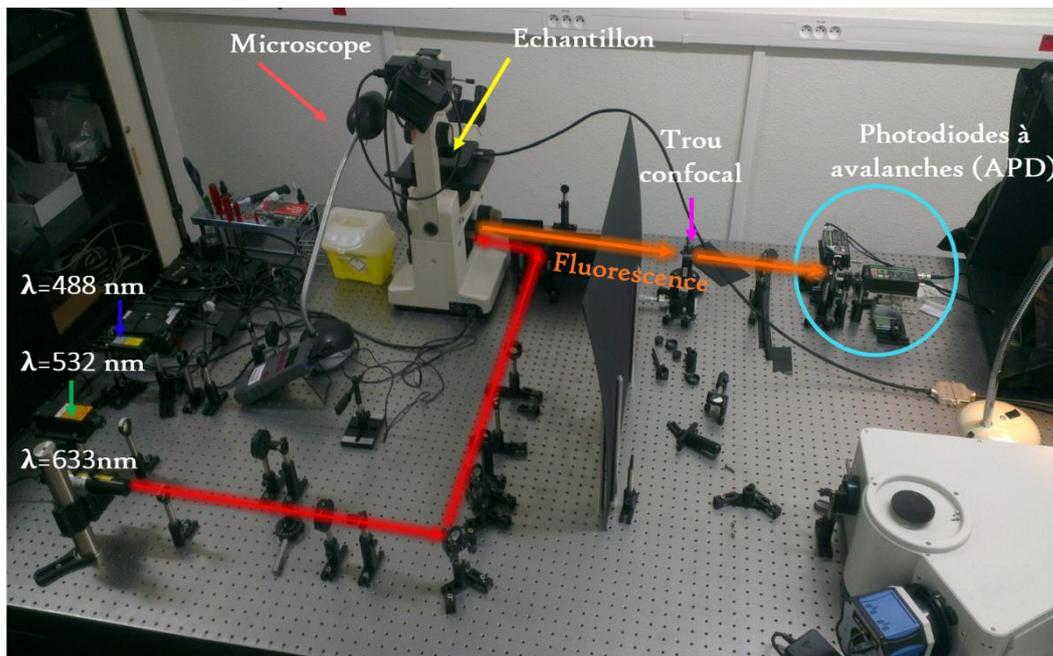


FIGURE. 5.8 – Photographie du dispositif expérimental.

Le dispositif est monté sur une table anti vibration (S-2000 Stabilizer Vibration Isolators and Optical Table, Newport Corporation, USA).

### 5.3 Caractérisation du montage de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

Une étape essentielle avant toute mesure consiste à caractériser la réponse de l'appareil. Dans le cas du montage FCS, l'objectif était de calibrer le volume d'observation afin de caractériser les performances spatiales du microscope confocal par une détermination précise des dimensions axiale et latérale de ce volume qui présente sa résolution optique. Les techniques utilisées sont basées sur des études de ce volume en utilisant la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et des mesures par imagerie confocale de la fonction d'étalement du point (PSF). Principalement, la FCS est une méthode basée sur l'analyse statistique des fluctuations locales des molécules fluorescentes et le volume effectif est quantifié par le temps de diffusion de la molécule fluorescente en traversant le volume déterminé par le faisceau laser et le système optique. Cependant, la PSF est une méthode basée sur l'imagerie optique, un simple balayage direct des microsphères fluorescentes par un faisceau laser suffit pour visualiser le volume effectif.

La comparaison entre ces deux différentes méthodes de caractérisation du volume d'observation permet de déterminer la résolution ainsi que les principaux paramètres contribuant à l'amélioration globale du montage.

### 5.3.1 Détermination de la résolution optique du montage par la mesure de la PSF (Point Spread Function)

Le paramètre le plus important caractérisant un système optique particulièrement le microscope confocal est la taille du volume d'observation. La méthode expérimentale est basée sur l'imagerie d'une bille fluorescente de dimension inférieure à la limite de diffraction, agissant comme une source ponctuelle pour déterminer le profil d'intensité de la PSF dans les directions latérale (xy) et axiale (z).

Des microsphères en Latex fluorescentes de diamètre de 170 nm, de longueur d'onde d'excitation variable et d'indice de réfraction  $n_s=1.6$  ont été utilisées (Molecular Probes). Les microsphères en solution concentrée sont dans un premier temps diluées dans de l'eau pure, afin d'avoir une sphère par élément de volume de  $1 \mu\text{m}^3$  (ceci permet d'avoir une sphère individuelle lors de l'imagerie). Par la suite cette solution est déposée sur une lamelle de microscope propre et séchée à l'abri de la lumière.

Pour mesurer la PSF expérimentalement, la lamelle contenant les billes de Latex est placée sur un porte échantillon qui est fixé sur la platine piézo-électrique sur le microscope. Le positionnement des échantillons, sous le faisceau laser focalisé par l'objectif, est réalisé grâce à cette platine piézo-électrique dans les trois directions de l'espace. L'acquisition des images de fluorescence des billes est pilotée par le logiciel Labview qui commande le déplacement de la platine ainsi que l'acquisition des signaux de fluorescence détectés par les photodiodes. Les profils gaussiens latéral et axial sont obtenus par un balayage de la microsphère avec une intensité du laser d'excitation réglée à  $50 \mu\text{W}$ , afin d'éviter le photoblanchiment de l'échantillon.

La figure. 5.9 représente une image de la sphère fluorescente avec les profils axial et latéral en utilisant un laser d'excitation à 633 nm et un trou confocal de  $50 \mu\text{m}$  de diamètre.

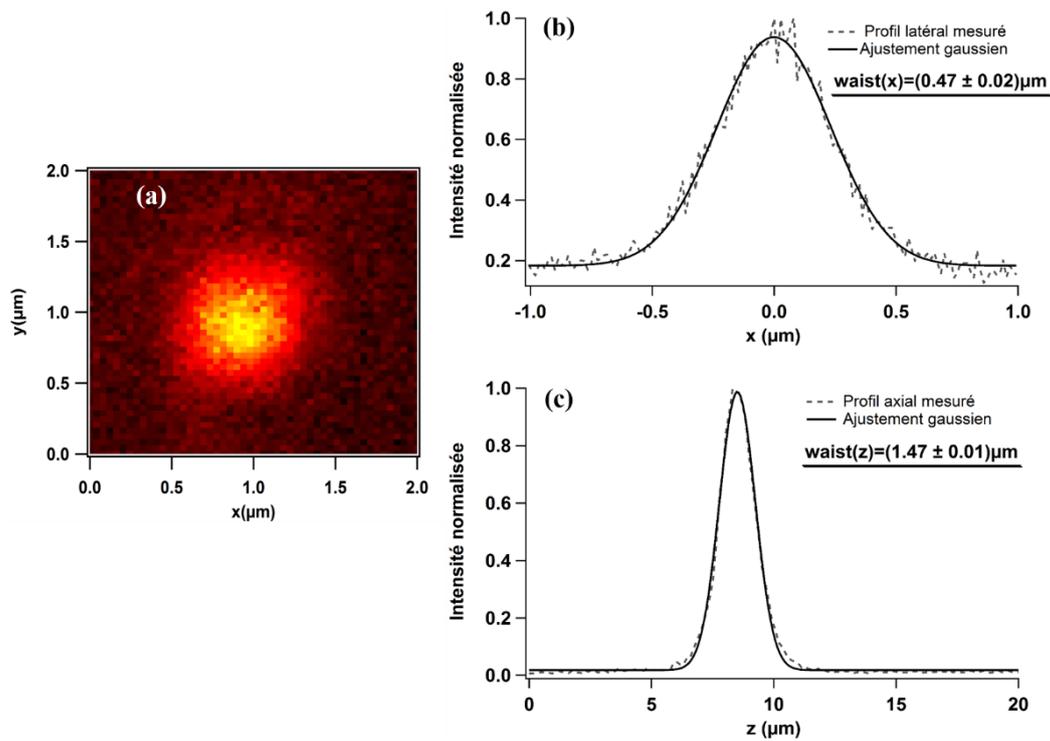


FIGURE. 5.9 – (a) Image par fluorescence d’une bille en Latex de 170 nm de diamètre, (b) les profils latéral et (c) axial normalisés de l’intensité de fluorescence sous une excitation à 633 nm.

Avec le même principe, une deuxième caractérisation spatiale est effectuée à une longueur d’onde de  $\lambda=532$  nm. Les profils de la PSF sont mesurés avec une puissance laser  $P_{\text{ext}}=50 \mu\text{W}$ , et un trou confocal de 30  $\mu\text{m}$  de diamètre.

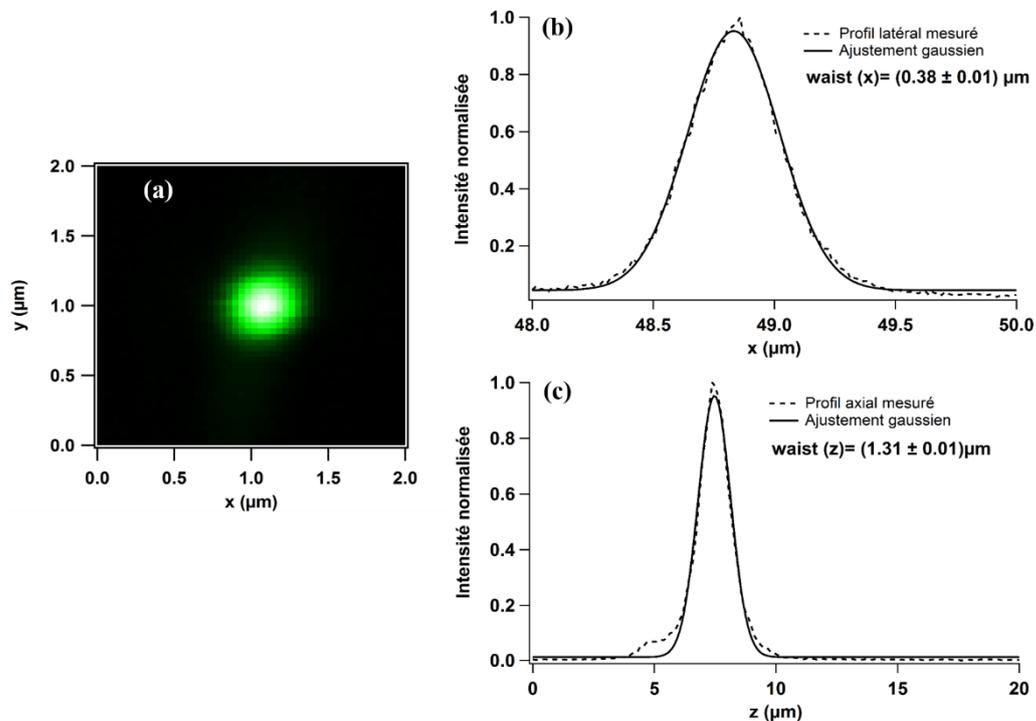


FIGURE. 5.10 – (a) Image de fluorescence d’une bille en Latex de 170 nm de diamètre, (b) les profils latéral et (c) axial normalisés de l’intensité de fluorescence avec une excitation à 532 nm.

La résolution optique est déterminée sur les profils de la PSF à la hauteur de  $1 / e^2 = 0,135$  (waist). Le volume effectif a une dimension latérale ( $\omega_{xy}$ ), et une dimension axiale ( $\omega_z$ ). Le volume effectif est calculé par la formule suivante [209–211]:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z \quad (5.2)$$

TABLEAU. 5.1 – Les valeurs des résolutions latérale et axiale et le volume effectif pour les deux longueurs d’onde laser.

Longueur d’onde	Waist latéral $\omega_{xy}(\mu\text{m})$	Waist axial $\omega_z(\mu\text{m})$	Volume effectif $V_{eff}(\text{fL})$
<b>633nm</b>	$0.47 \pm 0.02$	$1.47 \pm 0.01$	$1.80 \pm 0.16$
<b>532nm</b>	$0.38 \pm 0.01$	$1.31 \pm 0.01$	$1.05 \pm 0.06$

Le tableau. 5.1 montre les dimensions des waists latérales et axiales pour les deux dispositifs, en scannant une microsphère fluorescente dans les deux directions. L’avantage de cette méthode réside dans sa technique d’imagerie optique loin des statistiques et permet une visualisation directe du profil de la PSF du montage.

### 5.3.2 Détermination de la résolution optique du montage par la technique FCS

Il est possible de déterminer le volume effectif par la technique FCS en utilisant deux approches différentes [209]. La première approche nécessite de connaître le coefficient de diffusion du fluorophore ‘ $D$ ’, elle repose sur le calcul des waists à partir du temps de diffusion ‘ $\tau_D$ ’ déterminé grâce à l’ajustement de la courbe de corrélation par la fonction suivante :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \left( \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}} \right)^{1/2} \quad (5.3)$$

avec  $\omega_{xy} = \sqrt{4D\tau_D}$  est le waist latéral et  $s = \omega_{xy} / \omega_z$  le rapport des élongations radiale et axiale.

La deuxième approche est basée sur la mesure de l’amplitude de corrélation en supposant que la concentration est connue. Le nombre de molécules peut être déterminé à  $G(\tau=0)$ , ainsi le volume effectif est calculé par l’amplitude de la fonction de corrélation à ( $\tau=0$ ), qui est inversement proportionnelle au nombre de molécules fluorescentes, en utilisant l’équation suivante :

$$V_{eff} = \frac{1}{G(\tau=0) N_A C} = \frac{N}{N_A C} \quad (5.4)$$

Où  $G(\tau=0)$  est l’amplitude de corrélation à temps ( $\tau=0$ ),  $C$  représente la concentration de l’échantillon en unités molaires et  $N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  est le nombre d’Avogadro.

### 5.3.2.1 Matière et méthode

Pour les expériences de spectroscopie FCS décrites ci-après, deux types de fluorophores ont été utilisés, l'Alexa Fluor 647 (AF647) et l'Alexa Fluor 532 (AF532) de (Life technologies, France). La figure. 5.11 illustre les spectres d'absorption normalisés pour les deux fluorophores caractérisés par la spectroscopie UV-Visible. L'AF647 présente une absorbance maximale à 647 nm et AF532 à 532 nm.

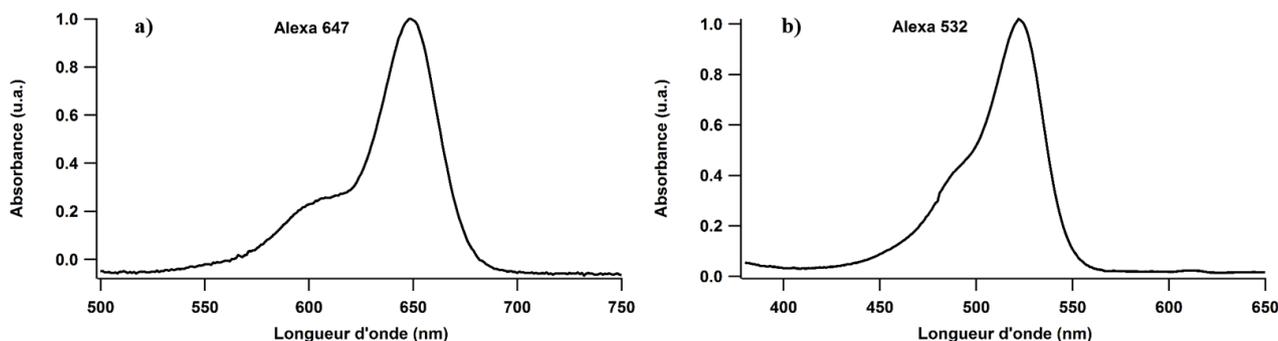


FIGURE. 5.11 – Spectres d'absorption normalisés de a) l'Alexa 647 et b) l'Alexa 532 mesurés par spectroscopie UV-Visible.

Une série de dilutions d'Alexa 647 a été réalisée. Initialement, la solution mère est préparée à 1  $\mu\text{M}$  et mesurée par le spectromètre d'absorption UV-Vis. Les autres concentrations (200 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM et 10 nM) ont été ensuite diluées ultérieurement de la solution mère avec de l'eau pure.

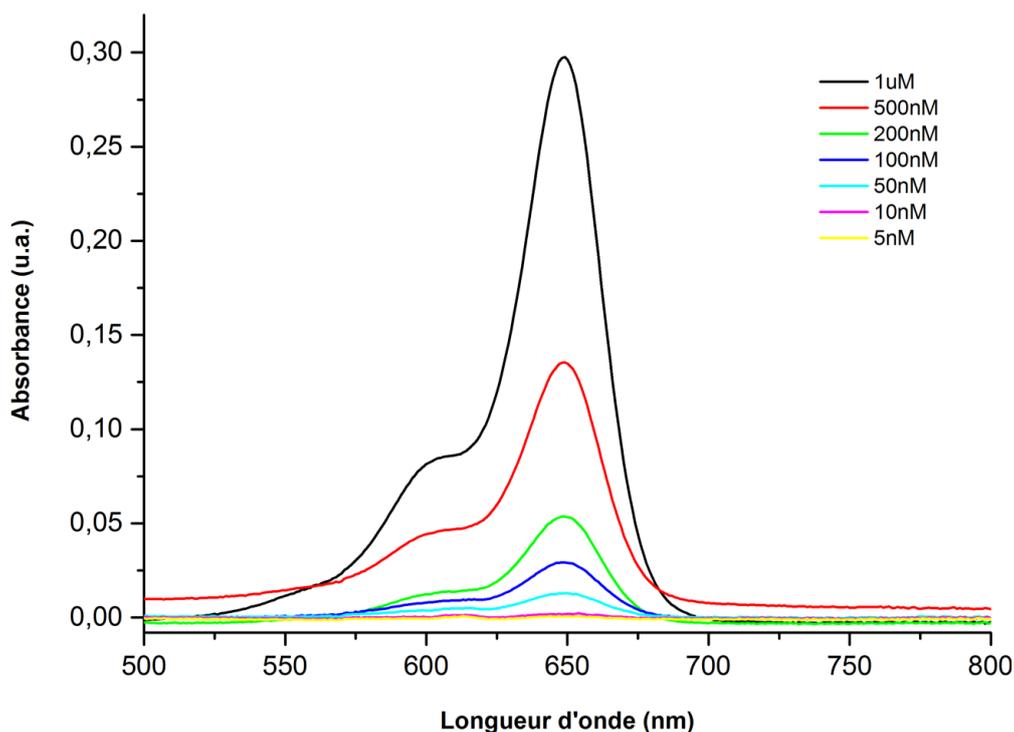


FIGURE. 5.12 – Spectres d'absorption des solutions de différentes concentrations d'Alexa 647 obtenus par la spectroscopie UV-Visible.

Les différentes solutions de l'Alexa 647 ont été caractérisées par la spectroscopie UV-visible comme le montre la figure 5.12. Il y'a une proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, néanmoins à 50 nM (concentration très faible), le spectromètre est à la limite de la détection. Dans le but de déterminer la résolution du montage FCS, il est important d'utiliser une solution à une concentration suffisamment faible afin de ne pas détruire l'amplitude de la courbe de corrélation. De ce fait, la solution de 50 nM a été prise comme concentration de départ pour la nouvelle série de dilution afin de caractériser et vérifier la sensibilité de système FCS.

### 5.3.2.2 Principe de mesure FCS

Une goutte de 80  $\mu$ L de solution fluorescente d'Alexa 647 est déposée sur une lamelle de microscope puis excitée par le faisceau laser. La figure 5.13 représente un exemple du signal de fluorescence enregistré par l'un des APDs avec une durée d'acquisition de 10 secondes.

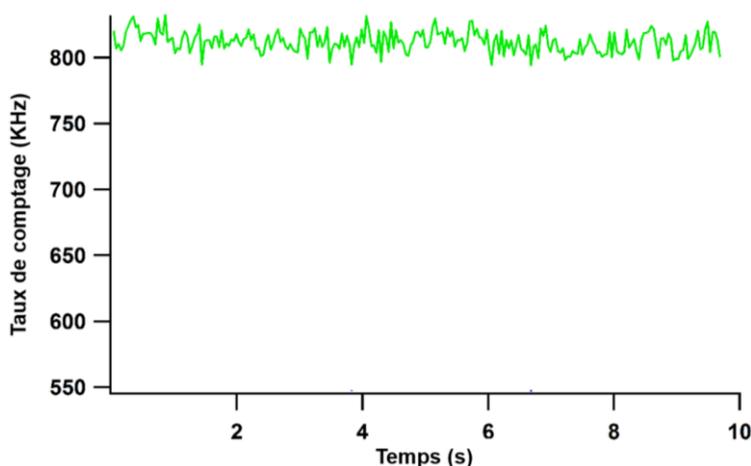


FIGURE. 5.13 – Enregistrement du signal de fluorescence de l'Alexa 647 en fonction du temps pour un seul détecteur.

Les différentes courbes de corrélation pour les différentes concentrations sont reportées sur la figure 5.14. Chaque courbe  $G(\tau)$  résulte de la moyenne de cinq acquisitions de dix (10) secondes. La puissance à l'entrée de l'objectif est la même que pour les différentes concentrations :  $200\mu$ W. Les courbes de corrélation sont ajustées avec la formule standard de la fonction de corrélation (équation 5.3).

Pour l'ajustement de la courbe expérimentale avec le modèle théorique  $G(\tau)$ , deux paramètres sont fixés, le coefficient de diffusion de AF647,  $D = 3.3 (10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s})$  et  $s=0.3$ , les paramètres libres sont le nombre de molécules  $N$  et le temps de diffusion  $\tau_D$ .

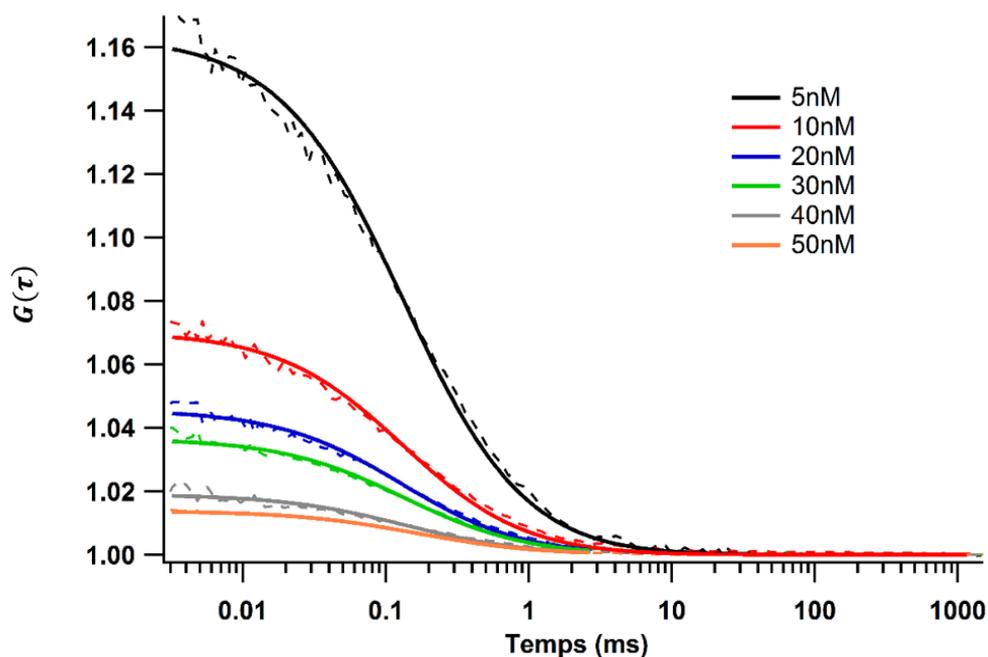


FIGURE. 5.14 – Les courbes de corrélation de solutions de différentes concentrations d’Alexa 647.

Le nombre moyen de molécules et le temps de diffusion ont été déterminés pour chaque concentration à partir de l’ajustement des courbes expérimentales par la fonction de corrélation.

TABLEAU. 5.2 – Les valeurs du nombre de molécules fluorescentes détectées ( $N$ ) et le temps de diffusion ( $\tau_D$ ) de l’Alexa 647.

Concentration (nM)	Nombre de molécules $N$	Temps de diffusion $\tau_D$ (ms)
<b>5</b>	$6.3 \pm 0.5$	$0.17 \pm 0.01$
<b>10</b>	$14.3 \pm 0.4$	$0.16 \pm 0.02$
<b>20</b>	$22.6 \pm 0.3$	$0.16 \pm 0.01$
<b>30</b>	$28.1 \pm 0.2$	$0.18 \pm 0.03$
<b>40</b>	$46.8 \pm 0.2$	$0.18 \pm 0.02$
<b>50</b>	$72.6 \pm 0.3$	$0.18 \pm 0.02$

D’après la figure. 5.14, l’amplitude des courbes de corrélation augmente quand la concentration des solutions d’Alexa 647 diminue, en effet le nombre moyen de molécules est inversement proportionnelle à l’amplitude de  $G(\tau)$ . Les valeurs de temps de diffusion sont comparables car ce temps ne dépend pas de la concentration mais de la nature de la molécule et les conditions expérimentales du montage.

Le waist latéral est calculé à partir de la valeur moyenne du temps de diffusion. En utilisant les équations (5.3) et (5.1) nous déterminons le waist axial et le volume effectif.

TABLEAU. 5.3 – Les valeurs des waists latéral et axial et le volume effectif à partir des ajustements des courbes de corrélation.

Méthode	Coefficient de diffusion $D$ ( $10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$ )	Temps de diffusion $\tau_D$ (ms)	Waist latéral $\omega_{xy}$ ( $\mu\text{m}$ )	Waist axial $\omega_z$ ( $\mu\text{m}$ )	Volume effectif $V_{\text{eff}}$ (fL)
Ajustement FCS	3.3	$0.17 \pm 0.02$	$0.47 \pm 0.03$	$1.57 \pm 0.10$	$1.93 \pm 0.18$

Avec cette méthode, les dimensions latérale et axiale du volume effectif sont calculées à partir du temps de diffusion extrait par l'ajustement de la courbe de corrélation, en connaissant le coefficient de diffusion ( $D$ ). L'avantage de cette méthode est que la concentration de l'échantillon n'a pas besoin d'être connue et que les dimensions du volume effectif peuvent être extraites d'un seul ensemble de mesures.

Le volume effectif peut être aussi déterminé à partir des mesures du nombre de molécules d'Alexa 647 en supposant que les concentrations sont connues au préalable par l'utilisation de l'équation (5.4).

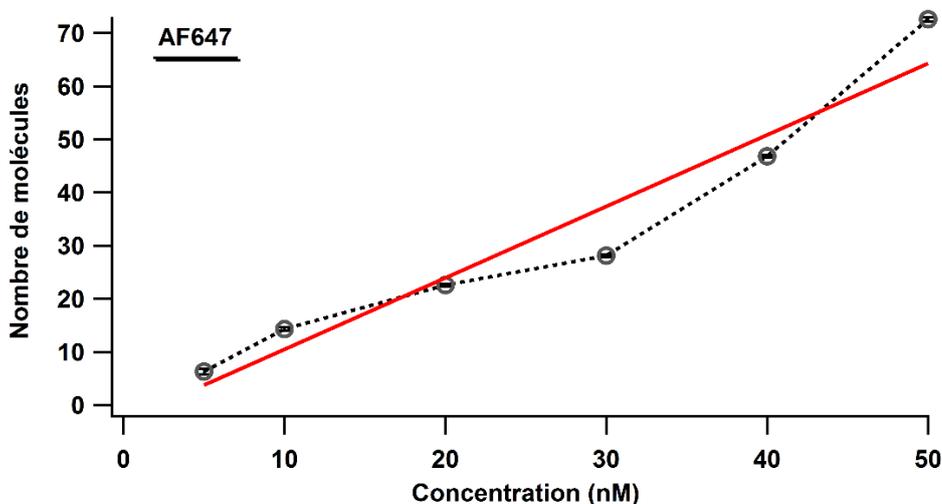


FIGURE. 5.15 – Le nombre de molécules déterminé par FCS en fonction de la concentration des solutions fluorescentes d'Alexa 647.

Le volume effectif est déduit par la pente de l'ajustement linéaire (traits continus rouges) présentée dans la figure. 5.15.

TABLEAU. 5.4 – La valeur du volume effectif à partir de l'amplitude des courbes de corrélation à ( $\tau=0$ ).

Méthode	Waist latéral $\omega_{xy}$ ( $\mu\text{m}$ )	Waist axial $\omega_z$ ( $\mu\text{m}$ )	Volume effectif $V_{\text{eff}}$ (fL)
$G$ ( $\tau=0$ )	Non définit	Non définit	$2.23 \pm 0.20$

La pente d'ajustement donne une dépendance presque linéaire entre le nombre de molécules et la concentration. Cette méthode est sujette à une grande propagation d'erreur due non seulement à des incertitudes des statistiques de la technique elle-même, mais aussi causée particulièrement par la méthode de préparation des échantillons.

- Les mêmes procédures ont été suivies pour caractériser le dispositif à la longueur d'onde d'excitation laser 532 nm en utilisant, cette fois ci, différentes solutions d'Alexa 532.

Le coefficient de diffusion de l'AF532 est  $D = 3.96 (10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s})$  et  $s=0.3$  sont des paramètres fixes, les paramètres libres qui pourront être déterminés sont le nombre de molécules  $N$  et le temps de diffusion  $\tau_D$ .

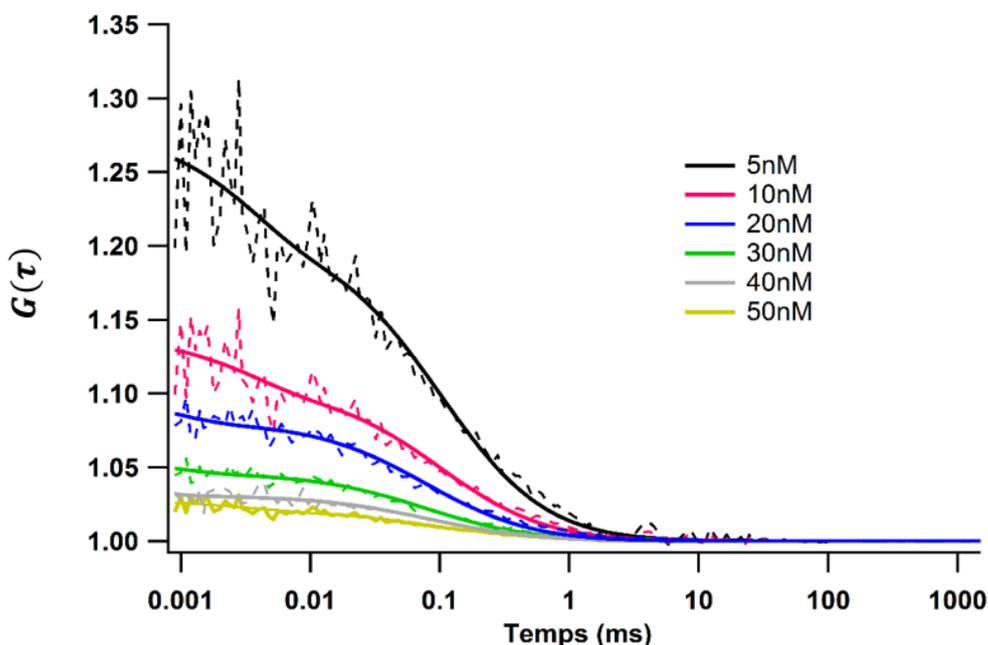


FIGURE. 5.16 – Les courbes de corrélation de solutions de différentes concentrations d'Alexa 532.

TABLEAU. 5.5 – Les valeurs du nombre de molécules détectées ( $N$ ) et les temps de diffusion ( $\tau_D$ ) de l'Alexa 532.

Concentration (nM)	Nombre de molécules $N$	Temps de diffusion $\tau_D$ (ms)
5	$4.8 \pm 1.2$	$0.10 \pm 0.01$
10	$9.6 \pm 3.1$	$0.10 \pm 0.01$
20	$16.3 \pm 2.9$	$0.11 \pm 0.01$
30	$21.6 \pm 5.0$	$0.10 \pm 0.02$
40	$32.3 \pm 4.6$	$0.10 \pm 0.01$
50	$48.3 \pm 2.2$	$0.10 \pm 0.02$

- Détermination du volume effectif à partir du temps de diffusion extrait par l'ajustement de la courbe de corrélation en connaissant le coefficient de diffusion ( $D$ ).

TABLEAU. 5.6 – Les valeurs des waists latéral et axial et le volume effectif à partir de l'ajustement des courbes de corrélation.

Méthode	Coefficient de diffusion $D$ ( $10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$ )	Temps de diffusion $\tau_D$ (ms)	Waist latéral $\omega_{xy}(\mu\text{m})$	Waist axial $\omega_z(\mu\text{m})$	Volume effectif $V_{\text{eff}}$ (fL)
ajustement FCS	3.96	$0.10 \pm 0.02$	$0.40 \pm 0.04$	$1.33 \pm 0.13$	$1.18 \pm 0.20$

- Détermination du volume effectif à partir de l'amplitude des courbes de corrélation à ( $\tau=0$ ).

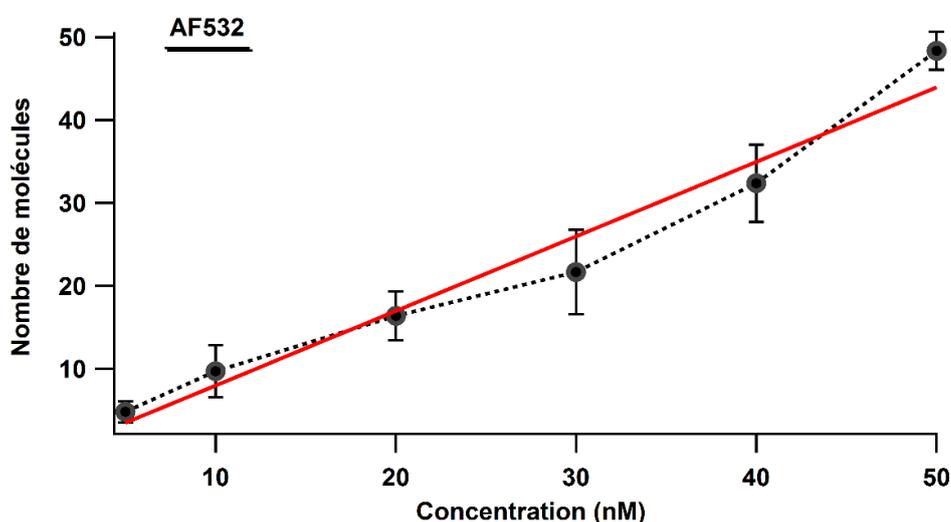


FIGURE. 5.17 – Le nombre de molécules déterminé par FCS en fonction de la concentration des solutions fluorescentes d'Alexa 532.

TABLEAU. 5.7 – La valeur du volume effectif à partir de l'amplitude des courbes de corrélation à ( $\tau=0$ ).

Méthode	Waist latéral $\omega_{xy}(\mu\text{m})$	Waist axial $\omega_z(\mu\text{m})$	Volume effectif $V_{\text{eff}}$ (fL)
$G$ ( $\tau=0$ )	Non difinit	Non difinit	$1.48 \pm 0.30$

### 5.3.2.3 Comparaison entre les trois méthodes de détermination du volume effectif

Les résultats des volumes effectifs obtenus avec différentes méthodes de caractérisation ont été comparés dans les deux dispositifs à longueur d'onde d'excitation laser  $\lambda=633$  nm et  $\lambda=532$  nm respectivement.

TABLEAU. 5.8 – Les dimensions du volume effectif obtenues par les trois méthodes de caractérisation de la résolution optique.

Méthodes	Volume effectif $V_{\text{eff}}$ (fL)		Volume effectif $V_{\text{eff}}$ (fL)
	PSF	Ajustement FCS	$G(0)=N$
$\lambda=633\text{nm}$	$1.80 \pm 0.16$	$1.93 \pm 0.18$	$2.23 \pm 0.20$
$\lambda=532\text{nm}$	$1.05 \pm 0.06$	$1.18 \pm 0.20$	$1.48 \pm 0.30$

D'après le tableau. 5.8, les résultats de volumes effectifs déterminés par différentes méthodes de caractérisation sont comparables en prenant en compte les incertitudes.

En ce qui concerne le protocole expérimental des expériences FCS, les deux méthodes les plus utilisées pour déterminer la résolution du montage sont celles basées sur les mesures d'imagerie confocale du volume effectif (PSF) avec des billes fluorescentes, cette technique donne une image directe du volume et les artefacts peuvent être directement identifiés. La deuxième méthode est celle où, le volume effectif est extrait d'un ajustement de la corrélation en connaissant le coefficient de diffusion du fluorophore. L'avantage de ces deux méthodes est celui de mesurer le volume effectif sans aucune considération des propriétés de l'échantillon, mais à part la prise en compte des paramètres expérimentaux du montage. Cependant, le volume effectif déterminé par la PSF est moins sujet aux incertitudes en le comparant au volume effectif extrait de l'ajustement de la courbe de corrélation. Car les valeurs du temps de diffusion de cette dernière dépendent fortement de la qualité de l'ajustement de la courbe de corrélation et ne peuvent être extraites qu'avec des incertitudes dues aux faibles ou médiocres statistiques.

### 5.3.3 Aspects photophysiques des mesures de FCS : état triplet

Généralement, l'intensité de fluorescence est supposée varier linéairement avec l'intensité d'excitation et les concentrations de fluorophores. Cependant, pour des intensités d'excitation plus élevées, pour lesquelles le taux d'excitation est du même ordre de grandeur que le taux de désexcitation de l'état singulet excité, la saturation de la fluorescence et d'autres phénomènes photo-induits peuvent avoir lieu. Dans les mesures FCS, et en raison des intensités d'excitation élevées, les croisements inter-systèmes du premier état singulet excité à l'état triplet sont fréquemment observés [177, 212]. Cet effet engendre des fluctuations d'intensité de fluorescence accessibles aux détecteurs (APDs) qui se retrouvent superposées à celles liées à la diffusion des fluorophores dans le volume d'observation. Dans ce cas, la fonction de corrélation est donnée par :

$$G(\tau) = G_D(\tau) \cdot G_T(\tau) \quad (5.5)$$

ici,  $G_D(\tau)$  est le terme dû à la diffusion et  $G_T(\tau)$  est le terme relatif aux fluctuations d'intensité induites par le peuplement de l'état triplet (dépendant des propriétés photophysiques du fluorophore). Cependant ces fluctuations restent à des échelles de temps plus courtes que celle dues à la diffusion. Ainsi, le processus de corrélation permet de différencier de tels temps caractéristiques au niveau du corrélogrammes qui peut être ajusté par la fonction théorique dont l'équation est donnée comme suit [212]:

$$G(\tau) = G_D(\tau) \cdot (1 + n_T \exp(-\tau/\tau_T)) \quad (5.6)$$

où, ' $n_T$ ' et ' $\tau_T$ ' sont respectivement l'amplitude moyenne et le temps de vie de l'état triplet des molécules fluorescentes.

Les fonctions de corrélation de l'Alexa 647 en solution sont représentées dans la figure. 5.18 (a) pour différentes puissances d'excitation laser.

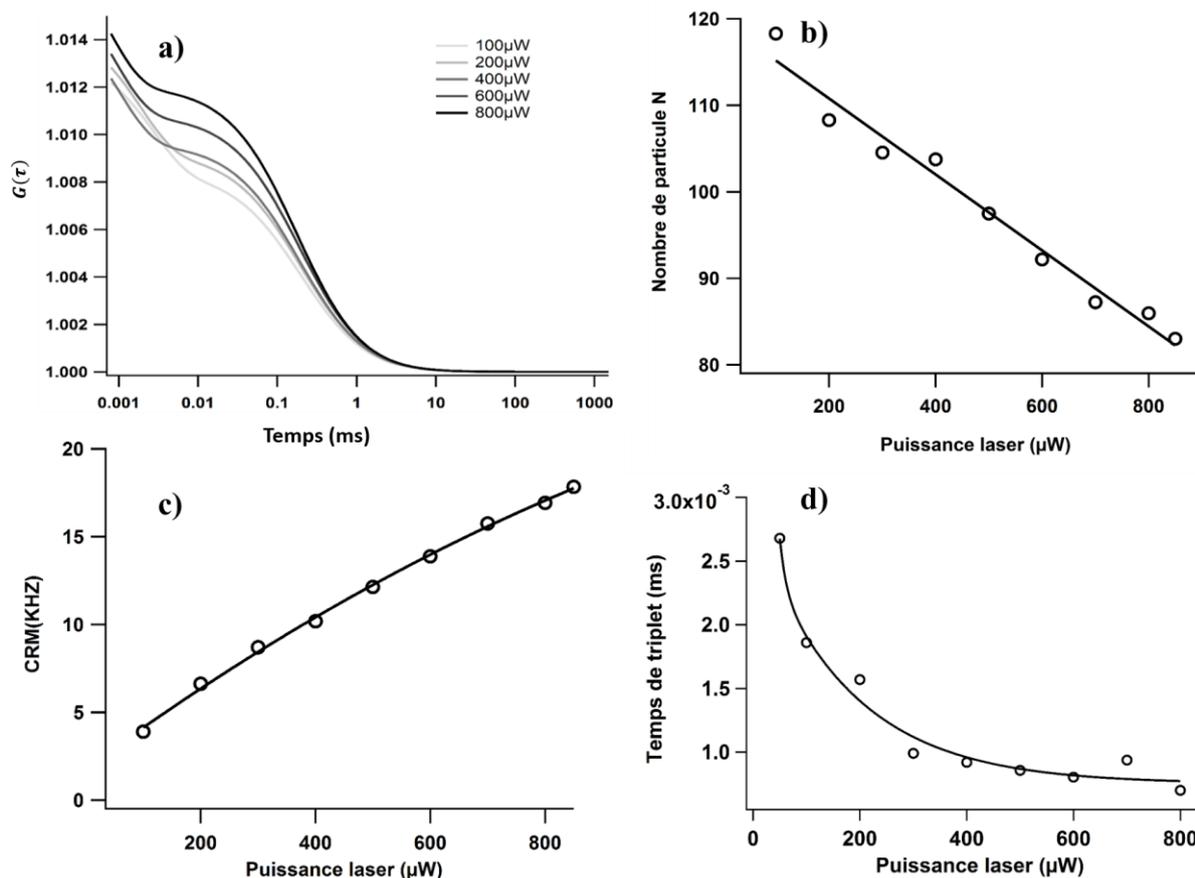


FIGURE. 5.18 – (a) La fonction de corrélation de l'Alexa 647 (50 nM) à différentes puissances d'excitation laser. (b) L'influence de la puissance sur le nombre moyen de molécules fluorescentes ( $N$ ), (c) taux de comptage par molécule (CRM) en fonction de la puissance laser et (d) évolution du temps triplet en fonction de la puissance d'excitation.

Lorsque la puissance d'excitation augmente, les fonctions de corrélation ont des épaulements supplémentaires superposés sur la courbe dans la plage des temps courts. Cet épaulement correspond aux conversions des molécules fluorescentes vers l'état triplet non fluorescent.

Ainsi, après avoir ajusté chaque corrélogramme, un tracé de l'évolution du nombre moyen de molécules fluorescentes de l'AF 647 dans le volume d'observation en fonction de la puissance est présenté dans la figure. 5.18 (b). Le nombre moyen de molécules ( $N$ ) diminue avec l'augmentation de la puissance d'excitation laser. À forte puissance, les molécules fluorescentes passent à l'état noir (état triplet) et s'éteignent avant même d'avoir traversé entièrement le volume d'observation. De ce fait, la contribution des fluorophores diminue et provoque une sous-estimation du nombre de fluorophores ( $N$ ) dans le volume effectif, car une molécule dans l'état triplet se trouve incapable d'émettre le photon de fluorescence pendant quelques microsecondes. C'est pourquoi le nombre de molécules fluorescentes ( $N$ ) détectées dans le volume d'observation diminue avec l'augmentation de la puissance d'excitation.

La figure 5.18 (c) présente le taux de comptage par molécule (CRM) en fonction de la puissance d'excitation, c'est-à-dire, le nombre de photons émis par molécule en une seconde. Pour des puissances d'excitation inférieures à 400  $\mu\text{W}$ , l'approximation linéaire est suffisamment satisfaite. Au-delà de 400  $\mu\text{W}$  pour des puissances d'excitation plus élevées, la courbe s'écarte du régime linéaire cela veut dire que les effets de la saturation du fluorophore deviennent évidents.

Par ailleurs, le temps de vie de l'état triplet diminue lorsque la puissance d'excitation augmente. Les puissances d'excitation élevées rend le fluorophore vulnérable à perdre sa propriété d'émettre la fluorescence. Le passage dans l'état triplet fournit donc une voie majeure de destruction photo-induite ou photoblanchiment qui limite le nombre de cycles absorption-émission de fluorophore.

En fait, chaque fluorophore possède des propriétés photophysiques qui lui sont propre. Alors, le choix de la puissance d'excitation du laser doit être adéquate, pas trop élevée de sorte que l'émission du fluorophore se situe dans sa plage linéaire, et pas trop faible afin d'optimiser le rapport signal sur bruit du système.

### 5.3.4 Les principaux paramètres influençant la résolution du montage FCS

#### 5.3.4.1 Effet de la taille du trou confocal sur la mesure de la PSF

Afin d'illustrer l'effet de la taille du trou confocal sur la résolution du montage, différents diamètres ont été utilisés : 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$  pour la mesure des profils de la PSF. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 5.19.

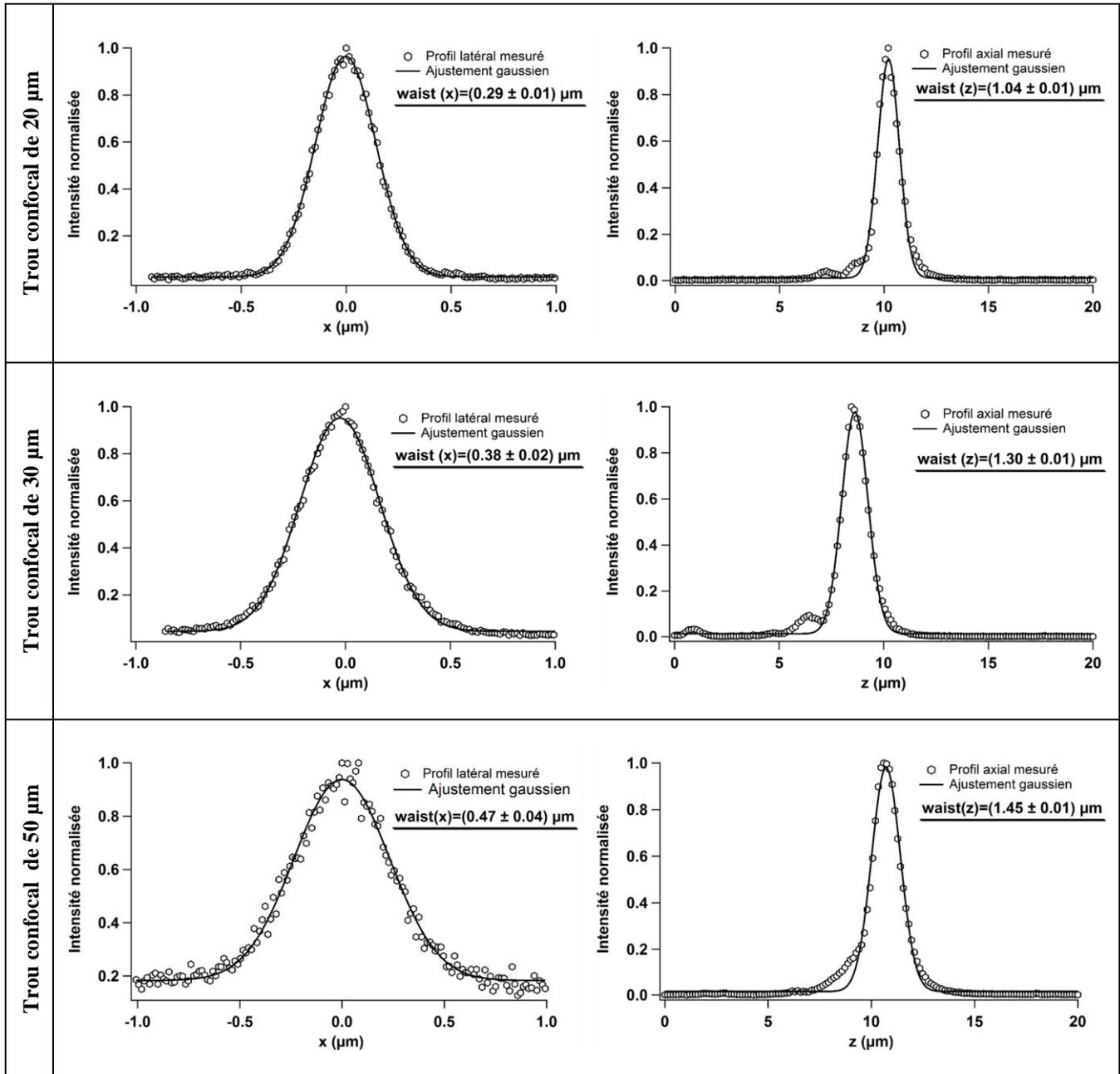


FIGURE. 5.19 – Profils de la PSF pour différents diamètres de trou confocal (20, 30 et 50  $\mu\text{m}$ ) mesurés sur des microsphères de 170 nm, avec une excitation  $\lambda=532$  nm. Les valeurs expérimentales sont représentées par des cercles tandis que les ajustements gaussiens sont représentés par des lignes continues.

TABLEAU. 5.9 – Les valeurs des dimensions latérales et axiales des waists et les volumes effectifs obtenus pour les trois tailles de trou confocal.

Diamètre du trou confocal ( $\mu\text{m}$ )	Waist latéral $\omega_{xy}(\mu\text{m})$	Waist axial $\omega_z(\mu\text{m})$	Volume effectif $V_{\text{eff}}(\text{fL})$
20	$0.29 \pm 0.01$	$1.04 \pm 0.01$	$0.49 \pm 0.04$
30	$0.38 \pm 0.02$	$1.30 \pm 0.01$	$1.05 \pm 0.12$
50	$0.47 \pm 0.04$	$1.45 \pm 0.01$	$1.78 \pm 0.31$

Les profils de la PSF obtenus ci-dessus pour différentes tailles des trous confocaux gardent la même allure par contre les valeurs des waists latéraux et axiaux mesurés ainsi que les volumes effectifs augmentent avec l'augmentation de la taille du trou confocal comme le montre le tableau. 5.9.

En fait, la résolution élevée du microscope confocal par rapport à celle du microscope conventionnel est due principalement à l'intégration du trou confocal au plan conjugué de l'objectif de microscope, où seule la lumière provenant de ce plan est transmise et limite les autres plans non conjugués. Par conséquent, la taille du trou confocal joue un rôle primordial dans la détermination de la résolution ou le volume effectif. La résolution spatiale du montage est donnée par le volume de détection ou effectif qui est le résultat du produit de volume d'excitation, définit par l'intensité du faisceau gaussien focalisé au voisinage du foyer, et le volume de collection définit par l'image du trou confocal à travers le microscope. Donc, en faisant varier le diamètre de trou confocal nous varions le volume de collection ainsi le volume effectif, tandis que le volume d'excitation reste inchangé. En outre, lorsque on réduit la taille du trou confocal on réduit le volume de collection ce qui produit un volume effectif faible.

Donc, plus la taille du trou confocal est petite, plus le volume effectif sera faible, meilleure sera la résolution du microscope. Cependant au-delà d'une certaine limite le signal devient très faible ce qui implique un mauvais rapport signal sur bruit.

#### 5.3.4.2 Effet de la taille du faisceau gaussien sur la mesure de la PSF

Afin d'étudier l'influence du taux de remplissage de la lentille arrière de l'objectif sur la résolution, différents  $\beta$  (taux de remplissage) ont été appliqués,  $\beta=1$ ,  $\beta=0.75$ ,  $\beta=0.5$  et  $\beta=0.25$ . Expérimentalement, deux techniques sont utilisées pour modifier le remplissage de l'objectif, la première consiste à utiliser un télescope à focal variable (un système afocal constitué de deux lentilles, une lentille fixe et une lentille mobile) pour modifier le waist de faisceau gaussien [213].

La deuxième consiste à tronquer le faisceau d'excitation à l'aide d'un diaphragme de diamètre réglable placé devant l'objectif afin de couper le faisceau transversalement [214]. C'est la méthode que nous avons choisie et utilisée pour obtenir les résultats décrits ci-dessous.

Le profil du faisceau gaussien (Figure. 5.20) a été mis en forme par un diaphragme de diamètre variable placé entre l'élargisseur de faisceau (téléscope) et le miroir dichroïque de façon à ajuster l'illumination à l'entrée de l'objectif. Cette illumination est caractérisée par le facteur  $\beta = W_0/a$ , avec 'a' le rayon de la lentille arrière de l'objectif et 'W<sub>0</sub>' est le waist du faisceau gaussien incident.

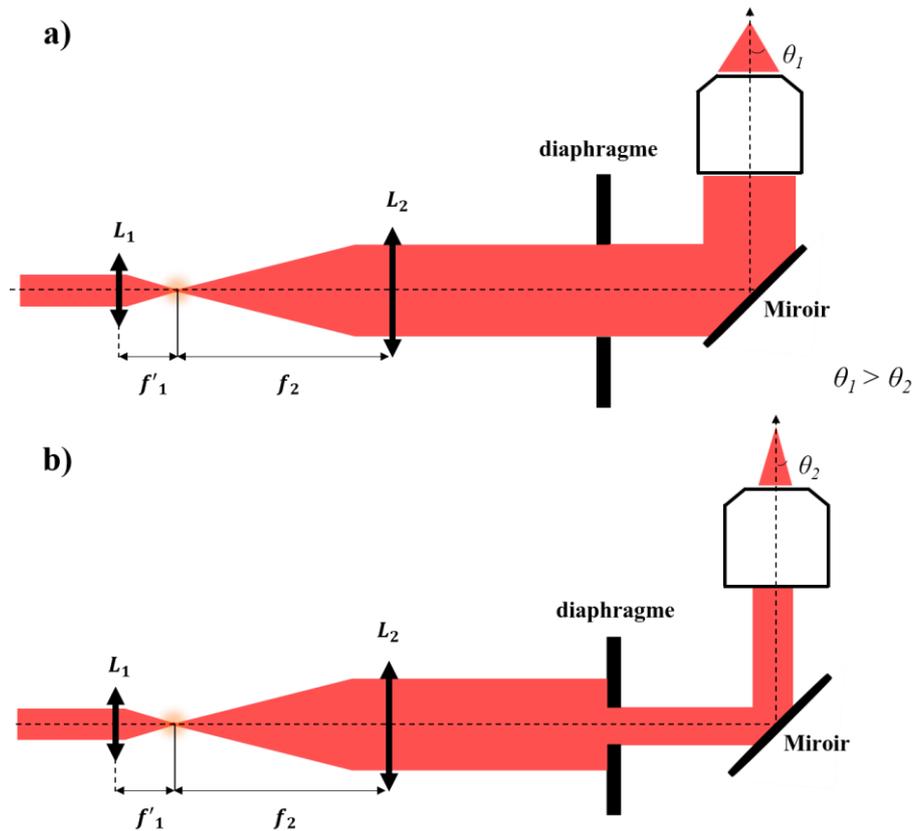


FIGURE. 5.20 – Troncature transversale du faisceau gaussien par utilisation d'un diaphragme variable. a) un faisceau excitateur remplissant complètement l'arrière de l'objectif et b) un faisceau excitateur diaphragmé.

Il est possible d'obtenir différentes valeurs du taux de remplissage du système en utilisant différentes ouvertures du diaphragme, avec un diamètre de deux, trois et quatre fois plus petit que celui de la lentille d'entrée de l'objectif.

La figure 5.21 représente les profils de la PSF pour quatre valeurs différentes de  $\beta$  ( $\beta=1$ ,  $\beta=0.75$ ,  $\beta=0.5$  et  $\beta=0.25$ ).

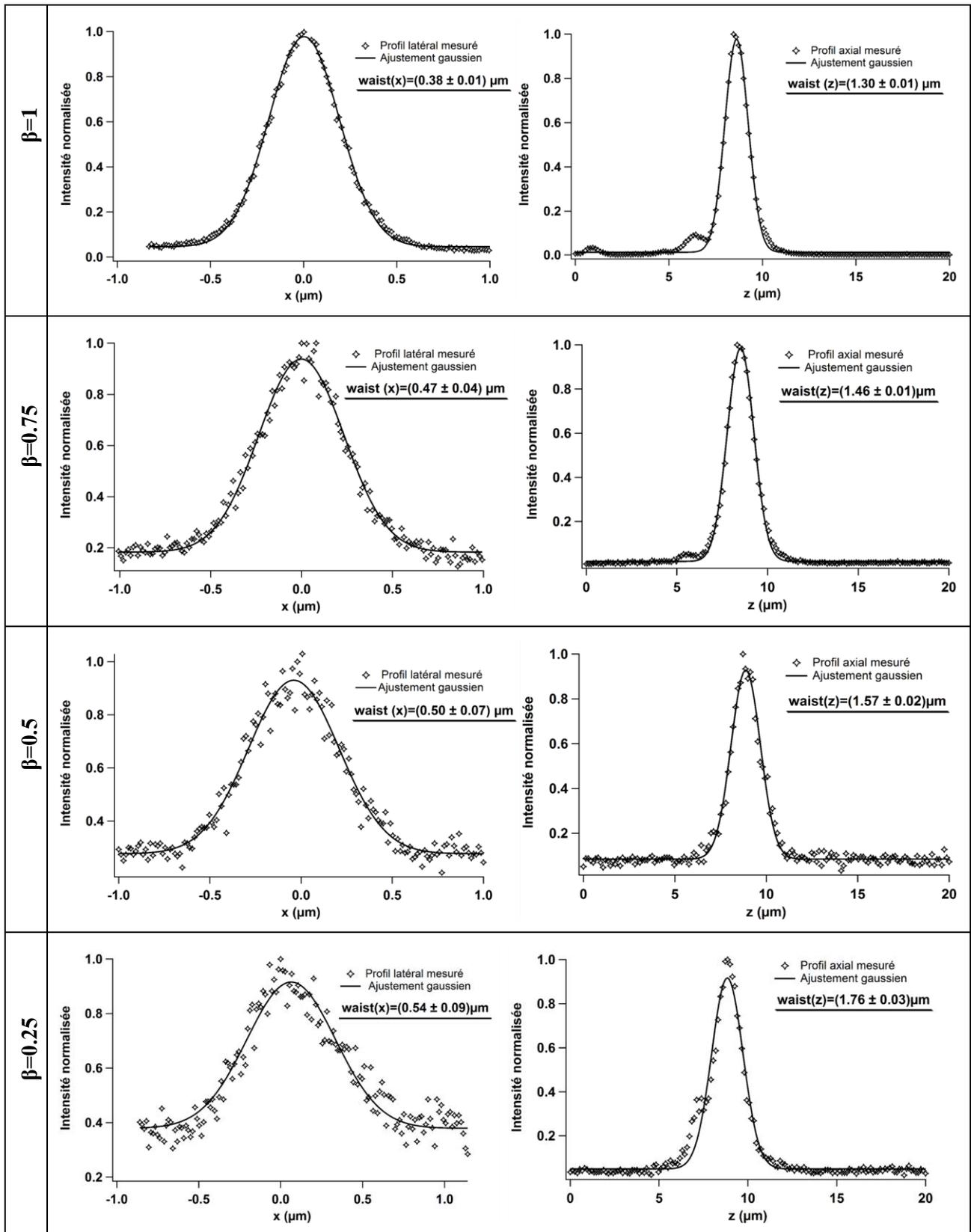


FIGURE. 5.21 – Profils de la PSF en fonction du taux de remplissage de l'entrée de l'objectif de microscope, mesurés à  $\lambda=532$  nm pour un trou confocal de  $30\mu\text{m}$  de diamètre. Les croix représentent les points expérimentaux alors que les traits pleins les ajustements théoriques par une gaussienne.

Les profils de la PSF obtenus ci-dessus pour différents taux d'illumination gardent la même allure par contre les valeurs des waist latéraux et axiaux mesurés augmentent avec la réduction de rayon du diaphragme. Le fait de réduire le taux de remplissage, l'intensité d'illumination s'étend le long de l'axe optique en induisant un élargissement latéral et axial de la PSF, par conséquent une augmentation du volume effectif.

TABLEAU. 5.10 – Les valeurs des dimensions latérales et axiales des waists et les volumes effectifs obtenus pour différents taux de remplissage.

Taux de remplissage ' $\beta$ '	Waist latéral $\omega_{xy}(\mu\text{m})$	Waist axial $\omega_z(\mu\text{m})$	Volume effectif $V_{\text{eff}}(\text{fL})$
$\beta=1$	$0.38 \pm 0.01$	$1.30 \pm 0.01$	$1.05 \pm 0.06$
$\beta=0.75$	$0.47 \pm 0.04$	$1.46 \pm 0.01$	$1.79 \pm 0.31$
$\beta=0.5$	$0.50 \pm 0.07$	$1.57 \pm 0.02$	$2.18 \pm 0.63$
$\beta=0.25$	$0.54 \pm 0.09$	$1.76 \pm 0.03$	$2.86 \pm 0.96$

Le tableau. 5.10 montre la variation du volume effectif lorsque le remplissage de l'entrée de l'objectif est modifié. Lorsque on réduit latéralement le faisceau laser avec un sous remplissage  $\beta=0.25, 0.5, 0.75$ , les volumes effectifs sont excessivement larges. En revanche, pour un remplissage total  $\beta=1$ , le volume effectif est trop étroit.

Dans cette configuration, le rayon de l'ouverture est le paramètre qui contrôle la divergence du faisceau d'excitation, plus le rayon du diaphragme est petit, plus le faisceau est diffracté. Au niveau du plan focal, la distribution spatiale de l'intensité d'excitation n'est qu'une convolution entre le faisceau d'excitation et l'ouverture du diaphragme. Avec la troncature du faisceau gaussien par les faibles ouvertures du diaphragme, les effets de la diffraction sont de plus en plus forts. En limitant la largeur de faisceau d'excitation par un changement des bornes de la fonction de l'ouverture ceci produit un étalement dans la PSF. En effet, la TF d'une gaussienne étroite est une gaussienne large. Comme l'ouverture du diaphragme détermine l'angle du cône de la lumière rentrant dans l'objectif, plus l'angle du cône de lumière est petit, plus la proportion de lumière entrante est faible. Cet angle affecte directement l'ouverture numérique donc l'élargissement de la PSF ou la résolution.

Pour illuminer efficacement l'échantillon, il est nécessaire d'utiliser un remplissage total de l'objectif de microscope afin d'assurer la focalisation parfaite avec une bonne résolution. En outre, ce paramètre est très important pour faire varier le volume confocal sans utiliser d'autres objectifs, avec des ouvertures numériques et des grossissements différents. Il est donc possible d'allonger et d'élargir le profil d'illumination au point focal de l'objectif en réduisant soit le rayon du faisceau gaussien ou le diamètre de l'ouverture de l'objectif.

### 5.3.4.3 Effet de la modification du profil gaussien d'intensité de l'excitation sur la mesure de la PSF

Dans l'objectif de réduire la PSF d'excitation et améliorer la résolution, un dispositif expérimental avec un filtre spatial a été réalisé. Ce filtre spatial (un trou) est utilisé afin de produire une tache de diffraction, cette distribution d'intensité considérée comme un faisceau Bessel représentée sous forme d'un anneau le long de l'axe optique (figure. 5.22). Le diamètre du filtre spatial utilisé est de l'ordre de  $50\ \mu\text{m}$ . Ce choix a été fait de façon à générer un faisceau Bessel d'une intensité assez importante pour exciter les billes fluorescentes.

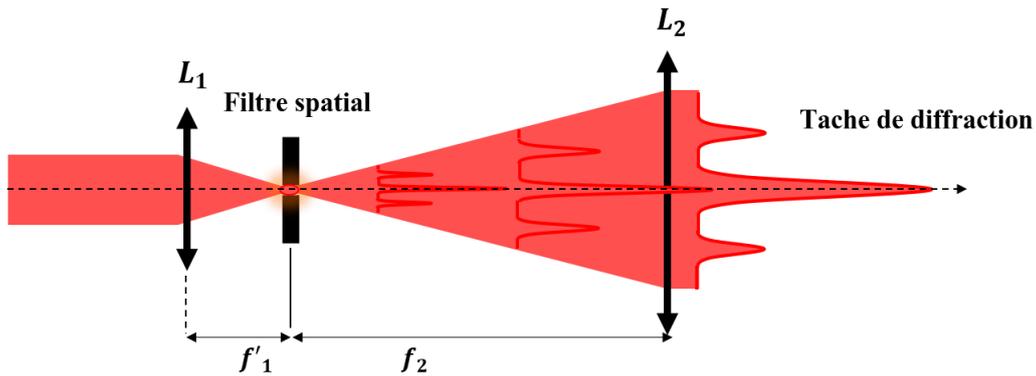


FIGURE. 5.22 – Le faisceau gaussien est mis en forme par un filtre spatial.

Le faisceau Bessel est ensuite élargi pour couvrir toute la lentille d'entrée de l'objectif de microscope. Afin de tester les performances de cette distribution, nous avons utilisé les billes fluorescentes de  $170\ \text{nm}$  de diamètre comme émetteurs ponctuels et enregistré leurs images et profils dans les deux directions latérale et axiale (illustrés dans la figure. 5.23). De plus, nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux utilisant un profil d'excitation gaussien.

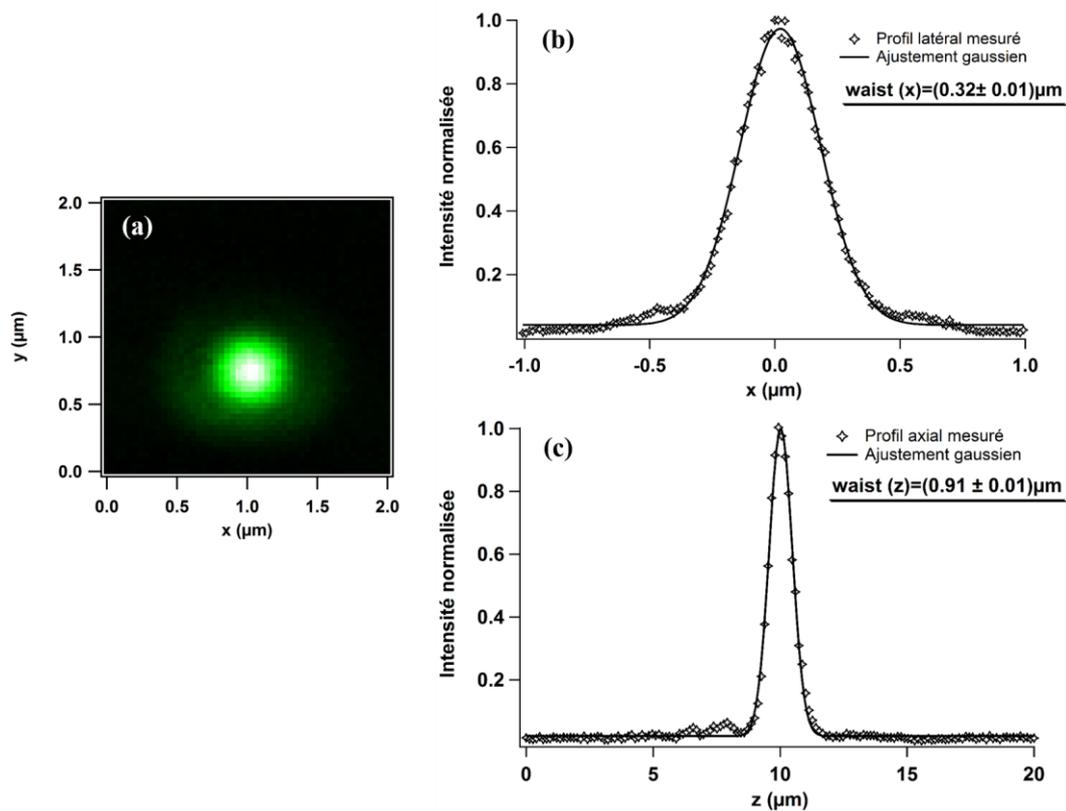


FIGURE. 5.23 – (a) Image par fluorescence d’une bille en Latex de 170 nm de diamètre, (b) les profils latéral et (c) axial, normalisés de l’intensité de fluorescence sous une excitation à 532 nm.

TABLEAU. 5.10 – Les valeurs des résolutions latérale et axiale ainsi que le volume effectif pour un faisceau Bessel.

longueur d’onde	Waist latéral $\omega_{xy}(\mu\text{m})$	Waist axial $\omega_z(\mu\text{m})$	Volume effectif $V_{\text{eff}}(\text{fL})$
<b>532nm</b>	$0.32 \pm 0.01$	$0.91 \pm 0.01$	$0.52 \pm 0.04$

Rappel : Les valeurs des résolutions latérale et axiale ainsi que le volume effectif pour un faisceau gaussien (TABLEAU. 5.1)

longueur d’onde	Waist latéral $\omega_{xy}(\mu\text{m})$	Waist axial $\omega_z(\mu\text{m})$	Volume effectif $V_{\text{eff}}(\text{fL})$
<b>532nm</b>	$0.38 \pm 0.01$	$1.31 \pm 0.01$	$1.05 \pm 0.06$

D’après les résultats représentés dans les tableaux au-dessus, les waists latéral et axial obtenus dans le cas d’une excitation Bessel sont clairement plus faibles que les waists conventionnels obtenus avec une excitation gaussienne. En utilisant ce dispositif, la résolution est nettement plus élevée. La PSF mesurée avec un faisceau Bessel a enregistré un gain latéral de 60 nm, cependant la PSF axiale a produit un gain en résolution de 400 nm par rapport à celle utilisant un faisceau gaussien.

Il est aussi intéressant de noter que le volume effectif relatif à cette distribution est deux fois plus petit par rapport au volume effectif obtenu avec le faisceau gaussien.

Ce composant (filtre spatial) a agi sur la distribution spatiale de l'intensité du faisceau gaussien et produit ainsi un faisceau Bessel. Cette technique rentre dans l'approche de la mise en forme de la distribution spatiale d'intensité. Généralement, les faisceaux Bessel peuvent être générés soit par un axicon ou une ouverture circulaire [215]. Ces faisceaux font partie d'une catégorie de faisceaux qu'on appelle non diffractants, c'est-à-dire, leur distribution d'intensité n'a pas tendance à s'élargir en se propageant, mais elle reste plutôt invariante en taille et en profils [216, 217]. Par conséquent, plusieurs applications ont été adaptées à ce types de faisceaux notamment en microscopie afin de maintenir une bonne résolution [218, 219].

Par ailleurs, en utilisant ce filtre spatial la puissance enregistrée à l'entrée de l'objectif de microscope ne dépasse pas les 50  $\mu\text{W}$ , ce qui permet de caractériser la résolution du montage par une seule méthode, l'imagerie (PSF). La mesure FCS est dans ce cas impossible car les molécules fluorescentes à une concentration inférieure à 50 nM nécessitent des puissances d'excitation plus élevées.

## **5.4 Etude des effets réfractifs en microscopie confocale de fluorescence**

L'impact des effets réfractifs sur le comportement de la PSF a été publié (article joint à la fin du chapitre). Des aberrations optiques principalement dues à une différence d'indice de réfraction dans le chemin optique du faisceau laser sont responsables de cette modification de la PSF.

L'essentiel du travail démontré concerne l'évolution de la PSF à partir de la variation d'indice de réfraction sur l'étalement de la PSF. D'après la loi de Snell-Descartes, les angles de réfraction que font les rayons lumineux dans chacun des milieux avec l'axe optique dépendent principalement de la différence entre les indices de réfraction. Ceci signifie qu'en présence de l'inégalité entre ces indices de réfraction la PSF n'est plus la même, celle-ci varie suivant la variation des indices de réfraction entre les différents milieux et l'échantillon tout en engendrant des aberrations qui sont essentiellement responsables de la dégradation de la PSF.

Dans ces expériences, une bille fluorescente d'indice de réfraction  $n_s=1.6$ , déposée sur une lamelle de verre ( $n=1.51$ ), a été utilisée. Ensuite, le système (substrat et bille) est entouré par différents milieux environnants (air, eau, huile) dont les indices de réfraction sont (1, 1.33 et 1.51) respectivement. Des mesures de la PSF du système (lamelle + bille + milieu environnant) ainsi qu'une modélisation numérique ont été effectuées pour chaque cas. Les calculs théoriques sont illustrés dans le chapitre 4, en utilisant les paramètres suivants : l'indice de réfraction de la bille, la longueur d'onde

d'excitation et les indices de réfraction des milieux environnants. Les mesures expérimentales de la PSF dans différents milieux ont été comparées avec les résultats du calcul théorique en utilisant les valeurs du système expérimental.

Dans la figure.5.24, les volumes effectifs mesurés et simulés sont présentés en fonction de l'indice de réfraction du milieu environnant. Lorsque la différence d'indice entre la bille et le solvant est grande, le volume effectif est maximal. En revanche, lorsque nous utilisons l'huile qui a un indice de réfraction très proche de la bille, le volume effectif est minimal. Nous avons expliqué ces résultats expérimentaux à travers des simulations numériques basées sur le modèle de Gibson et Lanni. Les résultats de ces simulations permettent de bien interpréter les résultats expérimentaux et de démontrer l'influence des effets réfractifs sur le confinement du volume effectif dans la microscopie confocale.

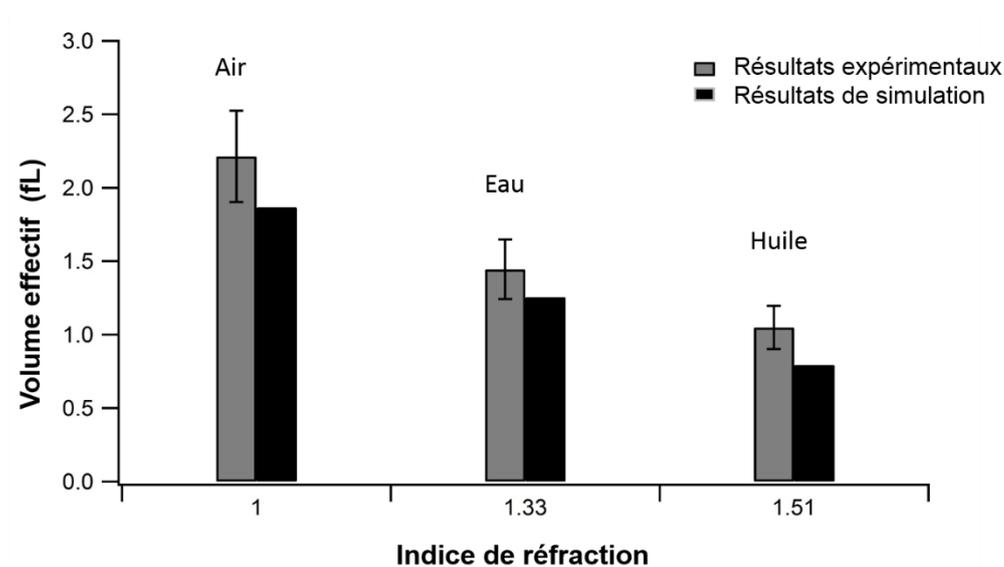


FIGURE. 5.24 – Résultats expérimentaux et de simulation du volume effectif d'une bille de Latex 0.17 $\mu$ m de diamètre en fonction de l'indice de réfraction du milieu environnant.

**Article du journal joint:** Refractive effects of the Gaussian beam on the volume confinement for fluorescence correlation spectroscopy: Experimental and numerical study.



Original research article

## Refractive effects of the Gaussian beam on the volume confinement for fluorescence correlation spectroscopy: Experimental and numerical study



Dahia Issaad<sup>a,\*</sup>, Aicha Medjahed<sup>a</sup>, Lazhar Lalaoui<sup>a</sup>, Mohamed Bouafia<sup>a</sup>,  
Marc Lamy de la Chapelle<sup>b</sup>, Nadia Djaker<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Optique Appliquée, Institut d'Optique et de Mécanique de Précision, Université Ferhat Abbas Sétif-1, Cite Maâbouda, 19000 Sétif, Algeria

<sup>b</sup> Laboratoire CSPBAT, CNRS (UMR 7244), Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 April 2017

Accepted 4 August 2017

#### Keywords:

Fluorescence correlation spectroscopy

Gaussian laser beam

Point spread function

Confocal microscopy

### ABSTRACT

The effective detection volume in the case of confocal fluorescence microscopy was investigated in situ by two methods the fluorescence correlation spectroscopy (FCS) of diluted fluorophore solutions, and the measurement of the point spread function (PSF) with calibrated fluorescent microspheres. The determination of the effective volume depends on many parameters and the optical variations in the refractive index were studied experimentally by measuring the PSF under various environmental conditions. The fluorescent microspheres were embedded in different refractive index surroundings media, and excited by a focused Gaussian beam. This allowed us to demonstrate that the mismatches that occur in the refractive index between the media and the sample induce a significant difference in the size of the effective volume and hence in the evolution of the optical resolution. The experimental confocal volume values were compared with those reported in theoretical studies based on the Lanni and Gibson model.

© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

During the last decades, various optical techniques have been developed in the level of the single molecule detection. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) introduced in the early 70's by Magde, Elson and Webb [1–3], is a spectroscopic technique that analyses the time fluctuations of the fluorescence signal coming from low concentrations in the pico-molar to nano-molar range [4]. Different information can be provided by FCS, such as kinetic and dynamic parameters of molecules, concentrations and diffusion coefficient. These parameters are becoming accessible due to the fluctuations in fluorescence intensity which are generally caused by the movement of a number of fluorescent molecules in a very small observation volume [5].

In fact, FCS witnessed a renaissance only in the early 90's. The development of this method started with the adaption of the confocal microscopy to the FCS setup. The observation volume became as small as possible to reduce the noise, to increase the signal/noise ratio and to improve the optical resolution [6].

\* Corresponding author.

E-mail address: [dihiaissaad@yahoo.fr](mailto:dihiaissaad@yahoo.fr) (D. Issaad).

Recently, FCS became an important spectroscopic tool that spread to many application fields due to its non-invasive character. It is used to extract information from biological systems [7–9] and it has found also a broad interest in chemistry reactions [10], biophysics processes [11,12] and nanotechnology [13].

On the other hand, it is well known that the key parameter to perform FCS measurements is the accurate determination of the confocal volume [14]. There are numerous publications reporting the sensitivity of FCS measurements to small modifications in the experimental conditions like cover slide thickness variation, laser beam characteristics or refractive index mismatches [14], [15].

In this contribution, we demonstrated that preliminarily calibrations of the observation volume is necessary before any experiment of interest with FCS. However, optical calibration depends on many optical parameters: alignment, observation depth and refractive index of the solvent. In this publication, we investigate the key role of refractive index mismatches on the confocal volume determination and as a consequence on the FCS measurements.

For that aim, we studied the point spread function (PSF) that characterizes the optical parameters affecting image formation. We evaluated the influence of optical aberrations induced by the refractive effects on the size of the observation volume by focusing the excitation laser beam on fluorescent microspheres embedded in different media with various refractive index. We characterized the effective FCS confocal volume by two methods: the analysis of the experimental data obtained by FCS with fluorescent solutions and the PSF measurement by confocal microscopy imaging of fluorescent microspheres in different environments.

## 2. Theoretical approach

FCS is an important technique that reaches high spatial and temporal resolutions for detecting and analysing fluorescent molecules at very low concentrations [16]. The detected fluorescence intensity  $F(t)$  is correlated at different time shift values  $\tau$  and the result is called autocorrelation function [17]. The normalized autocorrelation function  $G(\tau)$  of the fluorescence fluctuations is calculated from the fluorescence intensity  $F(t)$  and given by the following formula [18]:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

where  $\tau$ , is the time delay between the signals. The measured fluorescence fluctuations  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  correspond to any modifications of the concentration or of the number of fluorescent molecules diffusing in the confocal volume (the angle brackets denote the average of the fluorescence signal over time). The temporal decay of  $G(\tau)$  provides information about the characteristic time scales of the process giving rise to the fluorescence fluctuations. The autocorrelation function for translational diffusion can be calculated as [2,18]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \right) \cdot \left( \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \right) \quad (2)$$

where  $N$ , is the average number of fluorescent molecules in the effective volume ( $V_{eff}$ ).  $s = \omega_{xy}/\omega_z$  is the ratio between the transversal and the axial dimensions of the analysis volume.  $\tau_D$ , is defined as the average lateral diffusion time of a molecule through the effective volume ( $V_{eff}$ ).

Using the relation  $N = cV_{eff}$ , the local concentration  $c$ , of fluorescent molecules can be determined from the measured correlation curve amplitude with a very high precision [19,20].

The parameters  $N$ ,  $\tau_D$  and  $s$  can be determined by fitting the correlated experimental data with Eq. (2). If the molecule diffusion coefficient,  $D$ , is known the lateral extension  $\omega_{xy}$  can be extracted using the following equation [19]:

$$\tau_D = \omega_{xy}^2 / 4D \quad (3)$$

Thus, the effective volume can be easily derived from the characteristic decay time of the correlation function and the  $s$  factor calculated in calibrated systems by using the below Eq. (4) [19]:

$$V_{eff} = \pi \frac{3}{2} \omega_{xy}^2 \omega_z \quad (4)$$

The effective volume described above is considered as 3D ellipsoidal Gaussian profile where  $\omega_{xy}$  and  $\omega_z$  are the radii determined at the height of  $1/e^2$  [19].

## 3. Materials and methods

### 3.1. FCS instrumentation

The set-up of confocal FCS used for this study is illustrated in Fig. 1. The excitation source is operating at a wavelength of 532 nm (The Optoelectronics Company, UK) with a maximum power of 2 mW. The system is based on an inverted microscope (Nikon) combined to a water immersion objective (60X) with a high numerical aperture (1.2). At first, the laser spot is expanded by means of a telescope to ensure overfilling of the objective's back aperture. A dichroic mirror reflects the

excitation beam into the microscope objective that is focused on a fluorescent solution (Alexa Fluor 532, LifeTechnologies, USA). The fluorescent light from the solution is collected by the same objective, transmitted through the dichroic mirror and focused onto a 30  $\mu\text{m}$  diameter pinhole in the image plane to reject the out-of-focus light and to define a confocal volume. Afterwards, a 50/50 beam splitter is used to send the light into two avalanche photodiodes with single-photon sensitivity (SPCM-AQRH, Excelitas technologies, Canada). The detectors are linked to a multi-channel correlator (ALV-7004/USB Multiple Tau Digital Correlator –ALV-Laser GmbH, Langen, Germany) which is connected to a computer to evaluate the output data by the LabView commercial software (National Instruments, Texas, USA).

### 3.2. PSF measurement method (Imaging of fluorescent microspheres)

For the PSF studies, we prepared samples of fluorescent polystyrene latex microspheres ( $\phi = 0.170 \pm 0.005 \mu\text{m}$  PS-Speck microspheres from Invitrogen) with a refractive index of about 1.6 and a maximum excitation absorption at 540 nm wavelength and a maximum emission at 560 nm. A droplet of diluted solution (the final microsphere solution was for  $10^6$  stock dilution) of fluorescent microspheres was dried onto a coverslip [21]. The microspheres immobilized on coverslips were then imaged using a water immersion objective with a corrector for coverslips thickness.

The sample scanning plane was moved into different positions using an XYZ piezoflexure stage (Physike Instrument, Germany), the scanning distance was chosen of 200 nm between consecutive XY sections and 20 nm for z sections to achieve PSF profiles from the fluorescent microsphere images.

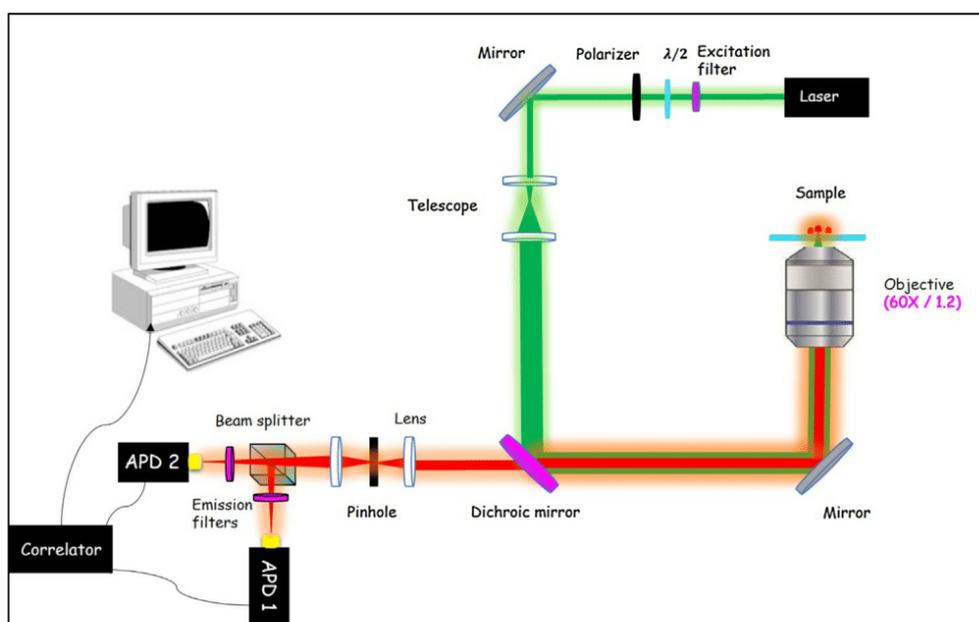


Fig. 1. Schematic drawing of the experimental FCS setup.

## 4. Results and discussion

### 4.1. Determination of the effective volume

#### a) From the FCS analysis

To analyse the FCS data we used the analytical model established for diffusion in Eq. (2). The FCS correlation curves of the fluorescence signal were recorded with Alexa fluor 532 at 5 nM concentration with an excitation power of 500  $\mu\text{W}$ . The correlation fitting curves gave direct access to the average lateral diffusion time of molecules through the effective volume. The diffusion coefficient  $D$  of Alexa Fluor 532 is known as  $3.96 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  [13]. By analysing the results (Fig. 2) using the fitting parameter ( $s = 0.3$ ), the effective volume  $V_{\text{eff}}$  was calculated from Eq. (4), and the results were reported in Table 1.

#### b) By imaging of fluorescent microspheres (PSF)

The effective volume was visualised by scanning the immobilized fluorescent microspheres on a glass coverslip at different positions of the sample. The excitation power was reduced to 50  $\mu\text{W}$  to avoid fluorescence photobleaching.

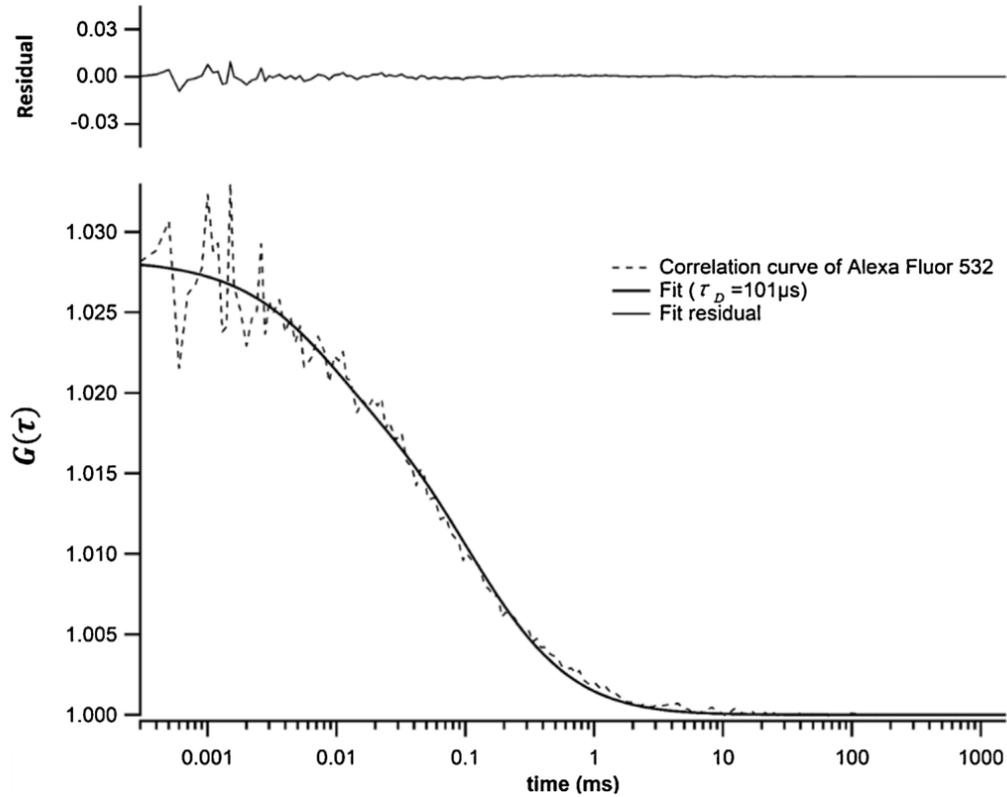


Fig. 2. Fluorescence correlation curve of Alexa Fluor 532 (dashed line) and the fitting curve using Eq. (4) (solid line).

Table 1

Dimensions of the effective volume determined by FCS and PSF from (1D Gaussian fits).

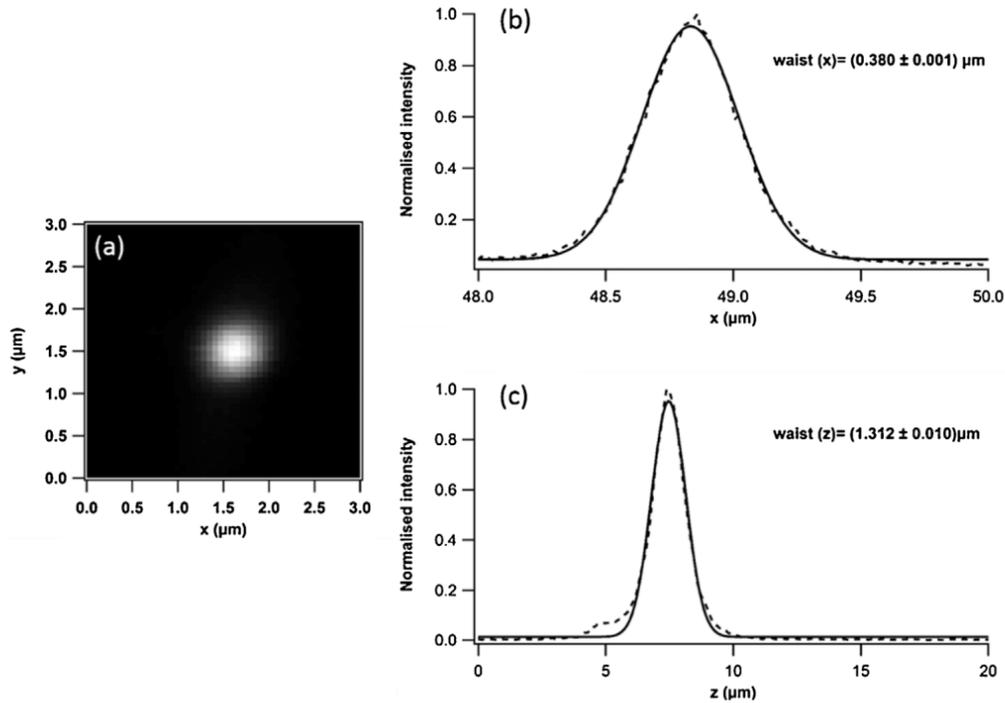
Method	sample	lateral waist $\omega_{xy}$ ( $\mu\text{m}$ )	axial waist $\omega_z$ ( $\mu\text{m}$ )	effective volume $V_{\text{eff}}$ (fl)
FCS	Alexa Fluor 532.	$0.399 \pm 0.003$	$1.330 \pm 0.010$	$1.179 \pm 0.022$
PSF	fluorescent microsphere	$0.380 \pm 0.001$	$1.312 \pm 0.010$	$1.054 \pm 0.012$

Fig. 3(a) showed an image of a unique fluorescent microsphere. Lateral and axial profiles were fitted with a Gaussian function to determine the waists  $\omega_{xy}$  and  $\omega_z$  after, the effective volume was deduced using the Eq. (4). The results of the PSF measurements were given in Table 1 and compared to the FCS measurements of the fluorescent solutions. Both techniques gave the effective volume with low uncertainties. From FCS measurements, a good fit is necessary to provide accurate diffusion time since the FCS is a method based on statistical analysis of the fluorescence fluctuations to quantify the effective volume. However, in the case of PSF just a direct scanning of the fluorescent microspheres is enough to determine the effective volume. At least both techniques gave approximately the same values of the effective volume. We note that the effective volume determined with FCS technique is slightly larger. This small deviation from the two expected techniques is not due to uncertainties of the measuring techniques itself but caused by: the quality of the correlated data influences the precision of the results; when applying a fitting model for the data, the amplitude of the correlation function contains a significant contribution of fluctuations caused by triplet state. Moreover, the difference in the photo physics behavior of the two samples; fluorescent solutions and fluorescent microspheres will yield a modification on the effective volume.

#### 4.2. Influence of the refractive index on the confocal volume

##### a) Determination of the refractive effects on the effective volume by imaging fluorescent microspheres in different surrounding media (PSF)

In previous reported works, the effects of the refractive index on the imaging properties of microscope were studied. It was shown that different medium refractive indexes can induce a decrease in the optical resolution when focusing at different depths from the interface [22], [23]. In our work, to investigate the role of refractive effects on radial and axial PSF widths, the fluorescent microspheres were imbedded in different media (air ( $n = 1$ ), water ( $n = 1.33$ ), and oil ( $n = 1.51$ )) and scanned. The extracted profiles were then fitted with a Gaussian function for the determination of the effective volume under mismatches in refractive index.



**Fig. 3.** (a) Lateral image of a fluorescent microsphere in oil obtained by fluorescence confocal microscopy. (b) Transverse and (c) axial profiles of the microsphere fluorescence intensity.

**Table 2**

Waists and effective volumes values with respect to the refractive index of the medium.

Method	surrounding medium	lateral waist $\omega_{xy}$ ( $\mu\text{m}$ )	axial waist $\omega_z$ ( $\mu\text{m}$ )	effective volume $V_{\text{eff}}$ (fl)
PSF	Air ( $n = 1$ )	$0.47 \pm 0.05$	$1.77 \pm 0.09$	$2.2 \pm 0.5$
	Water ( $n = 1.33$ )	$0.40 \pm 0.01$	$1.58 \pm 0.09$	$1.4 \pm 0.2$
	Oil ( $n = 1.51$ )	$0.38 \pm 0.02$	$1.31 \pm 0.07$	$1.0 \pm 0.1$

Table 2 showed the lateral and axial dimensions of the waists in different media. In Each medium, we measured waists over six independent fluorescent microspheres to yield mean values and corresponding errors. The effective volume was then calculated from these mean values using Eq. (4). We noted that the waists  $\omega_{xy}$  and  $\omega_z$  obtained in three media differed significantly. We observed that, when the mismatches in refractive index between the surrounding media and the fluorescent microsphere increased; the effective volume became wider. Note that, for the modification of the refractive index induces a lateral waist in water 1.05 times larger than lateral waist in oil and the ratio between the air waist and the oil waist is 1.23. Similarly, for axial waist values, the water waist is 1.21 times larger than the oil one and the factor of waists between the air and the oil is 1.36.

In fact, when the fluorescent microspheres are embedded in different media, an additional refraction occurred at the different interfaces crossed by the light. Relative changes in refracted angles induced modifications in the optical path lengths of the various rays from the different locations of the microspheres through the total optical system Fig. 4. In the case of the fluorescent microspheres embedded in oil, the mismatch in refractive index was very weak and the refracted angle of rays was closely inclined. This allows a small optical path difference that induces small deformations in the effective volume. The mismatch in refractive indexes in the case of the microspheres in water or air was significantly bigger. Therefore, the refracted angles were larger and the microspheres refracted the light farther away. As a consequence, the optical rays became more difficult to collect inducing big deformations of the effective volume. Indeed, the large differences in the refractive indexes between the fluorescent microspheres and the surrounding media lead to big changes in optical path length. These differences in the optical phase cause many optical aberrations that degrade and modify the effective volume.

To understand furthermore the experimental results and to study the refractive effects on the confocal volume, we have also performed several numerical simulations.

#### b) Determination of the refractive effects on the effective volume by numerical approach in different media

The PSF of an imaging system characterizes its performance. It shows to what extent the image of an infinitely small point [22]. We have used here the model of Gibson and Lanni [24] to predict the PSF of a confocal microscope using the scalar diffraction approach [25]. The model described aberrations induced by the optical path difference (OPD) between two

rays: one in the design conditions and the other in experimental conditions. Hence, the optical path difference (OPD) used to understand the aberrations introduced when the microscope is used under nondesign optical conditions such as the effects induced by refractive index mismatch between the microsphere and its environment (see Fig. 4). The optical path difference between corresponding rays in design and experimental system OPD was defined as [24]:

$$\begin{aligned}
 OPD(\rho, X, X_p; p) = & n_i z \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} + n_g t_g \left( \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \right) \\
 & - n_g^* t_g^* \left( \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g^*}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g^*}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \right) - n_i^* t_i^* \left( \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i^*}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_i^*}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \right) \\
 & + n_s t_s \left( \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_s}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_s}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \right). \tag{5}
 \end{aligned}$$

The microsphere lied at a depth  $t_s$  in a medium of a refractive index  $n_s$ . The coverslip had a thickness  $t_g$  and a refractive index  $n_g$ . The immersion water had a thickness  $t_i$  and a refractive index  $n_i$ . In the design system the microsphere was located immediately below the coverslip, the coverslip had a thickness  $t_g^*$  and a refractive index  $n_g^*$ , and the immersion medium had a thickness  $t_i^*$  and a refractive index  $n_i^*$ .

Then the phase term  $\varphi(\rho, X, X_p; p)$  is obtained by multiplying OPD with  $k=2\pi/\lambda$  in which  $\lambda$  is the wavelength. The PSF can then be calculated using Kirchoff's diffraction formula given by [24]:

$$PSF(X, X_p; p) = \left| A \int_0^1 J_0(krNA\rho) e^{i\varphi(\rho, X, X_p; p)} \rho d\rho \right|^2 \tag{6}$$

where  $X=(x, y, z)$ , denotes the coordinate of a point in the image plane.  $X_p=(x_p, y_p, z_p)$  is the coordinate of the point source.  $p=(NA, n, t)$  is the parameter set of the imaging system in which  $NA$  is the numerical aperture,  $n$  is the refractive index and  $t$  is the thickness.  $r = \sqrt{(x - x_p)^2 + (y - y_p)^2}$ ,  $A$  is a constant amplitude and  $J_0(\cdot)$  is the zero order Bessel function of the first kind.

Using experimental values of the set up described in Fig. 1:  $\lambda=532$  nm, (60X/1.2) water immersion objective, coverslip (index  $n = 1.51$  and thickness  $t = 170 \mu m$ ), the lateral and axial PSF profiles were simulated for a fluorescent latex microsphere in different media.

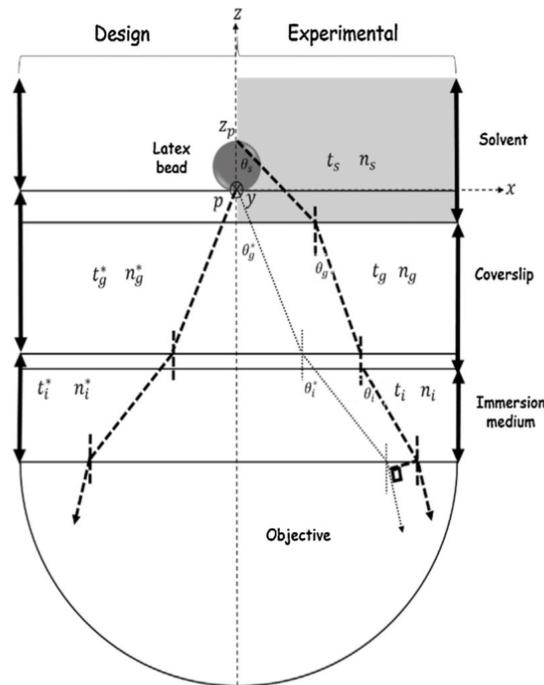
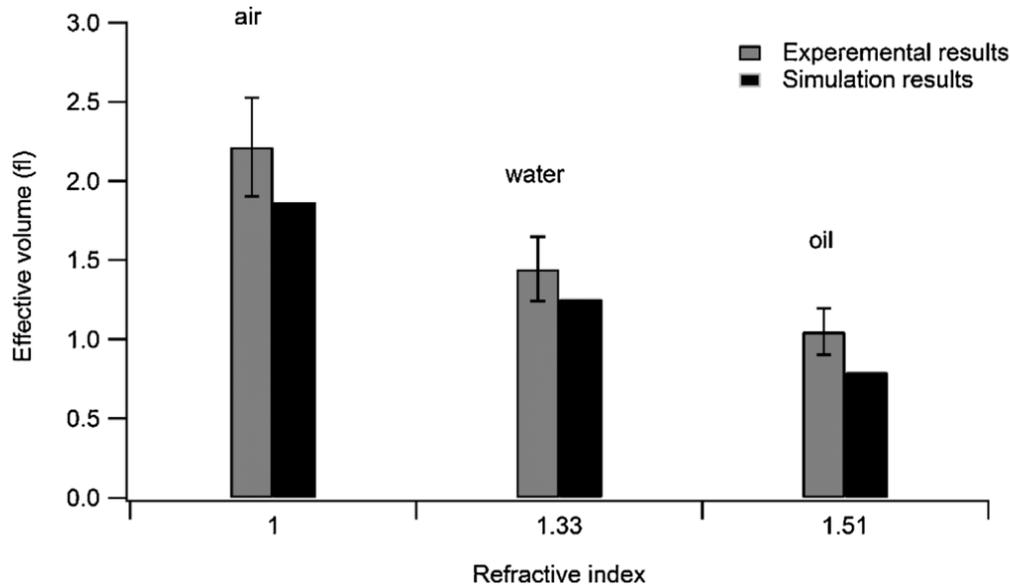


Fig. 4. Schematic representation of geometric model showed the path difference between two rays in design system and experimental system induced by the fluorescent microsphere embedded in solvent with different refractive index.

**Table 3**  
Simulated PSF values based on the Gibson and Lanni model.

Method	surrounding medium	lateral waist $\omega_{xy}$ ( $\mu\text{m}$ )	axial waist $\omega_z$ ( $\mu\text{m}$ )	effective volume $V_{\text{eff}}$ (fl)
PSF	Air ( $n=1$ )	0.43	1.74	1.86
	Water ( $n=1.33$ )	0.39	1.41	1.25
	Oil ( $n=1.51$ )	0.35	1.12	0.79



**Fig. 5.** Comparison between the experimental and simulated results of the effective volume in different media showing the important contribution of refractive effects.

As shown in Table 3, the refractive index mismatch affects directly the values of the dimensions of the lateral and axial waists and thus the effective volume value.

In the presence of this refractive index mismatch, the rays became nonparallel when crossing through the system and can no longer go through the focal point. They are spread out intersecting the optic axis at different axial distances. This difference in rays direction is originated from the mismatch that occurred between the refractive index of the fluorescent microspheres and the surrounding medium one. Hence, the largest amount difference in effective volume was introduced when the microspheres were embedded in a medium exhibiting a large refractive index mismatch as in the case of air.

Since the microsphere in oil have lower mismatch in refractive index than water, the PSF shift is smaller than for the other media. Consequently, the effective volume is smaller than in air or in water.

Moreover, we have compared the results obtained on simulated PSF with those measured experimentally under refractive index mismatch. It is noticeable that in the three cases, the predicted effective volumes match quite well with the experimental ones. Fig. 5 summarized both simulation and experimental results indicating that the refractive index mismatch affect significantly the effective volume.

The simulated and experimental results showed a slight discrepancy (the simulated volume is systematically lower than the experimental one). This could be explained by the fact that the experimental measurements are influenced by other sources of aberrations. The remaining aberrations could be introduced by others effects which were not taken into account with the modelling PSF, such as artifact due to the coverslip thickness, mirrors surfaces, laser beam quality or collimation degree and photo-physical effects of the fluorescent microspheres under investigation were already reported in [22,23,26]. These various parameters could degrade imaging performance and distort the light propagation through the system. This changes the size and shape of the confocal volume and causes a loss in resolution accompanied by a decrease in signal and a distribution of the light over a larger volume [26,27].

The determination of the confocal volume is a very important step before FCS measurements to obtain accurate results.

To emphasize the effect of the mismatch in refractive index on FCS measurements, we pointed out the influence of these refractive effects to derive the diffusion time and the number of molecules. Note that the diffusion time  $\tau_D$  is connected with the lateral extension  $\omega_{xy}$  of the confocal volume by the diffusion coefficient  $D$  (see Eq. (3)). The simulated lateral waist has been deduced for each medium and we obtained that the simulated  $\omega_{xy}$  in water is around 1.11 times stronger than that for oil. Comparing the lateral waist in air and in oil, we could estimate in this case that the factor is around 1.22. The discrepancies on the lateral waist  $\omega_{xy}$  in different media were attributed by the aberrations introduced by the refractive index mismatch. These aberrations could play a role in the diffusion time estimation because of the direct relation between the lateral waist and the diffusion time. For instance, the resulted effects may induce a wrong estimation of the diffusion time

in living cells that are constituted of various compounds with different refractive indexes. Similarly, the number of molecules  $N$ , the second parameter provided by FCS [19], is directly related to the effective volume  $V_{eff}$ . By using the theoretical values obtained by Gibson and Lanni model, we observed that  $V_{eff}$  shifted from 0.79 in oil to 1.25 in water and to 1.86 in air. We could calculate the correction factor on the number of molecules measured in different media as it depends directly on the effective volume. After analysis, in the case of water and oil, this correction factor is  $\approx 1.58$ . By increasing the mismatch in refractive index in the case of air and oil, the factor is  $\approx 2.35$ . This corresponds to an increase in the number of molecules due to the increase in the effective volume. The results reveal that the relative increase of  $\tau_D$  was less pronounced than for  $N$  since it only depends on the lateral extension of the effective volume whereas  $N$  depends on both lateral and axial extensions of the effective volume. Indeed, the optical aberrations, which were induced by refractive effects have a large impact on the effective volume, affecting the FCS data determination. Therefore, we found out that an increase in aberrations influenced the determination of effective volume that produced undesired effects on the estimation of the diffusion time and even more on the mean number of molecules.

## 5. Conclusion

In this study, the effective volume calibration was explored. We have compared experimental results obtained by FCS of diluted fluorophore solutions and by PSF of calibrated fluorescent microspheres. These results showed a good concordance between these two methods.

We also highlighted how the PSF was affected by refractive index mismatch between the microsphere and its surrounding media. Large differences were observed on the PSF when significant mismatches occurred between refractive indexes. Afterward, we presented a model that takes into account aberrations introduced by refractive effects. The simulated results were compared with the experimental ones showing that the effective volume not only relied on experimental conditions but also on sample properties.

Moreover, we emphasise on the importance of preliminary calibration of the effective volume under the same conditions that apply in the experiment of interest. Hence, a change in the surrounding medium of the sample will yield in modification on the volume confinement. The latter's artefacts could distort the PSF and have substantial effects that raise errors on the FCS parameters estimation.

## Acknowledgements

This work has been supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the Campus France Agency as part of the Tassili agreement program.

## References

- [1] D. Magde, E. Elson, W.W. Webb, Thermodynamic fluctuations in a reacting system, measurement by fluorescence correlation spectroscopy, *Phys. Rev. Lett.* 29 (September (11)) (1972) 705–708.
- [2] E.L. Elson, D. Magde, Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory, *Biopolymers* 13 (January (1)) (1974) 1–27.
- [3] D. Magde, E.L. Elson, W.W. Webb, Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization, *Biopolymers* 13 (1) (1974) 29–61.
- [4] E. Etienne, P.-F. Lenne, J.N. Sturgis, H. Rigneault, Confined diffusion in tubular structures analyzed by fluorescence correlation spectroscopy on a mirror, *Appl. Opt.* 45 (June (18)) (2006) 4497–4507.
- [5] Y. Han, J. Lee, Y. Lee, S. Kim, Measurement of the diffusion coefficients of fluorescence beads and quantum dots by using fluorescence correlation spectroscopy, *J. Korean Phys. Soc.* 59 (51) (2011) 3177–3181.
- [6] R. Rigler, Mets Ü, J. Widengren, P. Kask, Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion, *Eur. Biophys. J.* 22 (3) (1993) 169–175.
- [7] M.Á. Medina, P. Schwille, Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology, *Bioessays* 24 (August (8)) (2002) 758–764.
- [8] N. Altan-Bonnet, G. Altan-Bonnet, Fluorescence correlation spectroscopy in living cells: a practical approach, *Curr. Protoc. Cell Biol.* (2009) 4.24.1–4.24.14.
- [9] A. Tiiman, J. Jarvet, A. Gräslund, V. Vukojević, Heterogeneity and turnover of intermediates during amyloid- $\beta$ (A $\beta$ ) peptide aggregation studied by fluorescence correlation spectroscopy, *Biochemistry (Mosc.)* 54 (December (49)) (2015) 7203–7211.
- [10] N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia, P. Schwille, Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy, *J. Struct. Biol.* 147 (July (1)) (2004) 77–89.
- [11] E.L. Elson, Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future, *Biophys. J.* 101 (December (12)) (2011) 2855–2870.
- [12] A.A. Kinkhabwala, Z. Yu, S. Fan, W.E. Moerner, Fluorescence correlation spectroscopy at high concentrations using gold bowtie nanoantennas, *Chem. Phys.* 406 (2012) 3–8.
- [13] N. Djaker, et al., Spherical and flower-shaped gold nanoparticles characterization by scattering correlation spectroscopy, *J. Phys. Chem. C* 120 (June (21)) (2016) 11700–11708.
- [14] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, J. Fitter, Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5 (April (2)) (2004) 155–161.
- [15] T. Dertinger, A. Loman, B. Ewers, C.B. Müller, B. Krämer, J. Enderlein, The optics and performance of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy, *Opt. Express* 16 (September (19)) (2008) 14353–14368.
- [16] H. Aouani, N. Djaker, J. Wenger, H. Rigneault, High-efficiency single molecule fluorescence detection and correlation spectroscopy with dielectric microspheres, *SPIE Proceedings* 7571 (2010) 75710A–757112A.
- [17] I. von der Hocht, J. Enderlein, Fluorescence correlation spectroscopy in cells: confinement and excluded volume effects, *Exp. Mol. Pathol.* 82 (April (2)) (2007) 142–146.
- [18] A versatile dual spot laser scanning confocal microscopy system for advanced fluorescence correlation spectroscopy analysis in living cell, *Rev. Sci. Instrum.* 80 (8) (2009) 083702.

- [19] S. Rüttinger, V. Buschmann, B. Krämer, R. Erdmann, R. Macdonald, F. Koberling, Determination of the confocal volume for quantitative fluorescence correlation spectroscopy, *Confocal, Multiphoton, and Nonlinear Microscopic Imaging III* (2007) 6630.12 (paper 6630.12).
- [20] E. Haustein, P. Schwill, Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy, *Methods* 29 (February (2)) (2003) 153–166.
- [21] R.W. Cole, T. Jinadasa, C.M. Brown, Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control, *Nat. Protoc.* 6 (December (12)) (2011) 1929–1941.
- [22] S. Hell, G. Reiner, C. Cremer, E.H.K. Stelzer, Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index, *J. Microsc.* 169 (March (3)) (1993) 391–405.
- [23] M.J. Booth, T. Wilson, Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction, *J. Biomed. Opt.* 6 (3) (2001) 266–272.
- [24] S.F. Gibson, F. Lanni, Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy, *JOSA A* 8 (October (10)) (1991) 1601–1613.
- [25] M. Born, E. Wolf, *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*, Elsevier, 2013.
- [26] C.J.R. Sheppard, P. Török, Effects of specimen refractive index on confocal imaging, *J. Microsc.* 185 (March (3)) (1997) 366–374.
- [27] S.T. Hess, W.W. Webb, Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 83 (October (4)) (2002) 2300–2317.

## 5.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit le principe de fonctionnement de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Nous avons démontré que le contrôle de la résolution optique ou le volume effectif du système est primordial, cette vérification est assurée lors de chaque manipulation. Les résultats ont prouvé que la configuration FCS construite dans notre plate-forme donne de bonnes performances avec une très bonne résolution optique.

Les différentes propriétés optiques de notre montage ont été présentées par deux techniques de façon directe et indirecte ; la mesure directe (PSF) sur des billes fluorescentes et indirecte par la mesure statistique (FCS) sur des échantillons de solutions fluorescentes. Dans le chapitre suivant, l'intérêt de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) pour l'étude des nanoparticules est mis en évidence. La pertinence d'un tel montage sera démontrée lors de l'étude des propriétés de l'interaction des nanoparticules d'or avec des molécules (thiophénol).

# Chapitre 6

## Caractérisation des nanoparticules d'or par la spectroscopie de corrélation

### Sommaire

---

<b>6.1 Introduction .....</b>	<b>128</b>
<b>6.2 Etude des nanoparticules par la spectroscopie de corrélation .....</b>	<b>128</b>
<b>6.3 Matériels et méthodes .....</b>	<b>130</b>
<b>6.4 Résultat et discussions.....</b>	<b>132</b>
<b>6.5 Conclusion.....</b>	<b>135</b>
- Article du journal joint: Scattering Correlation Spectroscopy and Raman Spectroscopy of Thiophenol on Gold Nanoparticles: Comparative Study between Nanospheres and Nanourchins.	135

---

## 6.1 Introduction

Ce dernier chapitre expose les études expérimentales effectuées par la spectroscopie de corrélation afin de caractériser les nanoparticules d'or. Dans le chapitre précédent, la caractérisation et l'étude de la sensibilité de l'installation expérimentale ont été vérifiées en obtenant un volume confocal de l'ordre du ( $\sim$ fL). Cela a donc permis à la spectroscopie de corrélation d'être une technique de caractérisation à l'échelle moléculaire dotée d'une bonne résolution spatiale.

En termes d'investigation et de compréhension des interactions molécules nanoparticules, la spectroscopie de corrélation s'avère un outil puissant pour cette étude. L'objectif de ce travail est de comprendre l'influence de la morphologie des nanoparticules d'or sur les interactions avec d'autres molécules. Par ailleurs, deux catégories de nanoparticules d'or de différentes formes et tailles ; les nano-oursins et les nano-sphères ont été fonctionnalisées par des molécules de thiophénol. Malgré la grande affinité entre les molécules de thiophénol et les surfaces d'or, aucune étude n'a été rapportée en évaluant l'influence de la morphologie (forme et taille) sur les propriétés de l'interaction molécule-NPs d'or en utilisant la spectroscopie de corrélation.

Les résultats de l'étude comparative de l'interaction thiophénol-nanoparticule ont été rapportés dans un article publié. Une copie de l'article se trouve à la fin de ce chapitre.

## 6.2 Etude des nanoparticules par la spectroscopie de corrélation

Ces dernières années ont vu d'énormes progrès dans le domaine des nanotechnologies. Une grande variété de NPs a été développée, avec des propriétés physicochimiques bien contrôlées incluant la taille, la forme, la charge, la composition chimique et la chimie de surface. Ces nano-objets ont déjà trouvé leur place dans différentes applications. Cette révolution technologique nécessite des méthodes de caractérisation permettant d'évaluer directement les potentiels associés à cette nouvelle classe de matériaux qui doivent être soigneusement étudiés.

Nous avons démontré précédemment que la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une technique basée sur l'enregistrement des fluctuations temporelles de fluorescence dans un volume confocal bien défini (autour du fL). Elle est utilisée pour étudier la diffusion moléculaire et les processus de réactions dans des solutions très diluées. Le temps de diffusion défini par la FCS est corrélé à la taille de l'espèce diffusante ainsi qu'aux conditions environnementales locales, donc cette technique s'avère très bien adaptée pour étudier les NPs.

Le potentiel de la technique FCS comme outil de caractérisation des NPs a été démontré précédemment dans plusieurs travaux de recherche. Une étude comparative a été réalisée par la FCS pour trois chimies de surface différentes afin d'optimiser les nanocristaux biocompatibles, en présentant leurs propriétés photophysiques, les rayons hydrodynamiques, les concentrations locales et les propriétés d'agrégations [220]. L'architecture interne des NPs fluorescentes a été élucidée, grâce à l'étude sur les coquilles de silice de différentes tailles, avec l'ajout d'une coquille de silice, les variations de tailles des NPs ont été observées [221]. Afin de prévoir les réponses physiologiques à l'exposition aux NPs, la variation des rayons hydrodynamiques de NPs a été étudiée dans différents milieux biologiques [222, 223]. À l'aide de la FCS, il est possible de : caractériser l'adsorption et la formation des protéines sur la surface des NPs [224, 225], définir les constantes d'affinité entre les protéines et les NPs [226, 227], déterminer l'effet de différents ligands sur la formation de la couronne protéique [228–230], étudier les arrangement et les orientations spécifiques de certaines protéines autour de la surface de NPs [231]. La FCS a été aussi utilisée dans l'étude de la dynamique intracellulaire des NPs d'or. Une estimation locale de la concentration de NPs ainsi qu'une mesure de rayons hydrodynamiques ont été effectuées dans l'environnement intracellulaire [232].

Cependant, les NPs en FCS doivent être préalablement marquées par un fluorophore afin de faciliter leur détection. Et cela risque de modifier leurs propriétés. Dans l'objectif de pallier cette limite, Medina et ses collègues [147] ont mis en œuvre, pour la première fois, une spectroscopie de corrélation basée sur l'enregistrement des fluctuations temporelles de la diffusion de Mie de NPs d'or sans marquage fluorescent [233]. En fait, quand la lumière visible interagit avec une NP, une forte diffusion a lieu avec des sections d'extinction plusieurs fois supérieures à celles des fluorophores. Récemment, cette technique basée sur la diffusion est largement utilisée pour l'étude des NPs d'or, connue sous le nom de la spectroscopie de corrélation de diffusion (SCS, en anglais scattering correlation spectroscopy) [143, 233].

La SCS a été utilisée pour l'étude de l'adsorption de la protéine BSA (albumine de sérum bovin) sur les surfaces de NPs d'or. Une analyse des paramètres de diffusion avant et après l'adsorption des protéines a été rapportée. Des informations importantes ont été extraites sur les liaisons des protéines aux NPs avec l'augmentation du rayon hydrodynamique des NPs d'or correspond à la formation d'une monocouche de BSA sur la surface des NPs d'or [147]. Dernièrement, N. Djaker et al ont exploré cette technique afin de caractériser différentes formes de nanoparticules d'or (sphères et fleurs), avec différentes tailles (20-50 nm), différentes chimies de surface (nues, Polyéthylène glycol PEG) à très faibles concentrations (~ pM) et avec une très grande précision (~0,2 nm). Cette étude a mis l'accent sur les propriétés de la diffusion de chaque morphologie de nanoparticules dans la mesure de réussir leurs applications en nano-médecine [146].

### 6.3 Matériels et méthodes

Dans ces expériences, deux types de nanoparticules d'or NPs dans des solutions colloïdales ont été utilisées. Les nanoparticules d'or de forme sphériques (NPS) et les nanoparticules d'or de forme oursins (NPU) stabilisées au citrate ont été acquises chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Les NPS (753645, Sigma-Aldrich) et NPU (797723, Sigma-Aldrich) ont des diamètres de 50nm et 80nm respectivement. Le thiophénol ( $C_6H_5SH$ ) comme molécule sonde a été acheté auprès de Sigma-Aldrich (240249-50G, 99%) ainsi que l'eau Milli Q (18 M  $\Omega$ , Millipore, France) et l'éthanol ( $C_2H_6O$ ) pour la préparation des solutions et les rinçages.

Les NPS et NPU ont été fonctionnalisées par le thiophénol. Le choix de thiophénol comme molécule sonde est essentiellement dû à sa grande affinité avec les surfaces d'or. Ainsi, cette molécule est généralement utilisée comme un système modèle en Raman à cause de sa grande efficacité SERS [234]. L'interaction entre les NPs d'or et le thiophénol est assurée par les liaisons covalentes entre les fonctions portées par les NPs d'or COOH et les fonctions SH portées par le thiol (figure. 6.1).

Dans un premier temps, une solution mère de thiophénol ( $C_6H_5SH$ ) est préparée dans l'éthanol. L'utilisation de l'éthanol comme solvant est principalement due à la faible solubilité de thiophénol dans l'eau.

Ensuite, différentes concentrations de thiophénol ont été préparées par dilution de la solution mère dans l'eau. Les NPS et les NPU à la même concentration ont été incubés dans des solutions de thiophénol de différentes concentrations (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M). Cette expérience est réalisée à température ambiante et nécessite un temps de réaction de 24 h. Par la suite, les nanoparticules fonctionnalisées ont été purifiées par 2 cycles de centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min puis redispersées encore dans de l'eau ultra pure. Des suspensions colloïdales homogènes ont été obtenues dont la concentration est de 10 pM mesurée par la spectroscopie UV-visible.



FIGURE. 6.1– Interaction covalente (S-Au) entre la surface de la nanoparticule d'or et le thiophénol.

Les trois principales méthodes de caractérisation utilisées pour l'évaluation de l'interaction sont la spectroscopie UV-visible, la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) et la spectroscopie de corrélation de diffusion (SCS).

- **La spectroscopie UV-visible**

Les spectres d'extinction des NPs fonctionnalisées à différentes concentrations allant de 100nM à 1 M ont été enregistrés, en utilisant un spectrophotomètre (Kontron Instruments, Montigny le Bretonneux, France) dans la gamme spectrale de 400 à 800 nm avec une résolution de 1 nm.

- **La spectroscopie SERS**

Pour mesurer les spectres Raman des NPs fonctionnalisées, le spectromètre Xplora ONE (HORIBA Scientific) est utilisé. La longueur d'onde d'excitation laser est de 660 nm avec une puissance d'excitation de 20 mW. Le spectre Raman des NPs fonctionnalisées est enregistré dans la gamme allant de 400 à 1800  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution spectrale inférieure à 3  $\text{cm}^{-1}$ . Le temps d'acquisition pour chaque mesure est fixé à 60 secondes avec deux répétitions.

- **La spectroscopie de corrélation de diffusion (SCS)**

La spectroscopie de corrélation de diffusion (SCS) se base sur l'analyse des fluctuations d'intensité de diffusion des NPs fonctionnalisées à travers le volume défini par le microscope confocal. Le montage expérimental est basé sur un microscope inversé avec un objectif de microscope à immersion à eau d'ouverture numérique  $\text{ON}=1.2$ . Pour les mesures SCS, l'excitation est effectuée par un laser He-Ne fonctionnant à 633 nm. Un trou confocal de 50  $\mu\text{m}$  est conjugué au plan focal de l'échantillon. La détection est réalisée par deux photodiodes à avalanche (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada). Etant donné que la technique se base sur la diffusion, les filtres de fluorescence sont enlevés du dispositif en rajoutant des densités optiques devant les détecteurs afin d'éviter leur saturation. Les fluctuations d'intensité de diffusion ont été analysées en corrélant le signal de chaque photodiode avec un corrélateur (ALV-7004, ALV-Laser Vertriebsgesellschaft, Langen, Germany). Chaque mesure individuelle a été obtenue en faisant la moyenne de 5 enregistrements de 60s. Une fois le temps de diffusion est mesuré, les rayons hydrodynamiques des NPs fonctionnalisées à différentes concentrations sont calculés à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein [146, 147]:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta} \left( 4\tau_D / \omega_{xy}^2 \right) \quad (6.1)$$

où,  $R_h$  est le rayon hydrodynamique,  $k$  est la constante de Boltzmann,  $T$  est la température et  $\eta$  est la viscosité. Avec  $\tau_D$  le temps de diffusion et  $\omega_{xy}$  représente le waist latéral du volume effectif.

## 6.4 Résultat et discussions

Les positions de la résonance des plasmons de surface localisés (LSPR) ont été mesurées à 534 et 624 nm pour les NPS et NPU respectivement avant le greffage du thiophénol. Après, l'incubation des NPs dans le thiophénol, les spectres obtenus représentés dans la figure. 6.2 montrent un décalage de la position de résonance (LSPR) vers le rouge pour les NPS (figure. 6.2. (a)) et les NPU (figure. 6.2. (b)), ce qui confirme la formation de la couche de thiophénol. Le déplacement de la résonance des plasmons de surface des NPs a été estimé pour chaque concentration de thiophénol (voir le tableau 6.1). Dans le cas où la concentration de thiophénol est de 1mM, les LSPR des NPS présentent un décalage de 534 à 536 nm, tandis que les LSPR des NPU présentent un décalage de 624 à 630 nm. Lorsque la concentration de thiophénol augmente à 1 M, les NPS présentent un LSPR à 537 nm (pas de décalage), tandis que les NPU présentent un LSPR à 638 nm (décalage de 8 nm). Donc, les LSPR des NPS à 1mM et 1M de thiophénol ne subissent aucun décalage ce qui explique que la saturation de la surface des NPS a lieu à 1mM de thiophénol. En revanche, les NPU subissent un décalage des LSPR qui sont de plus en plus visibles avec l'augmentation de la concentration confirmant ainsi la continuation de greffage de thiophénol jusqu'à la saturation de la surface.

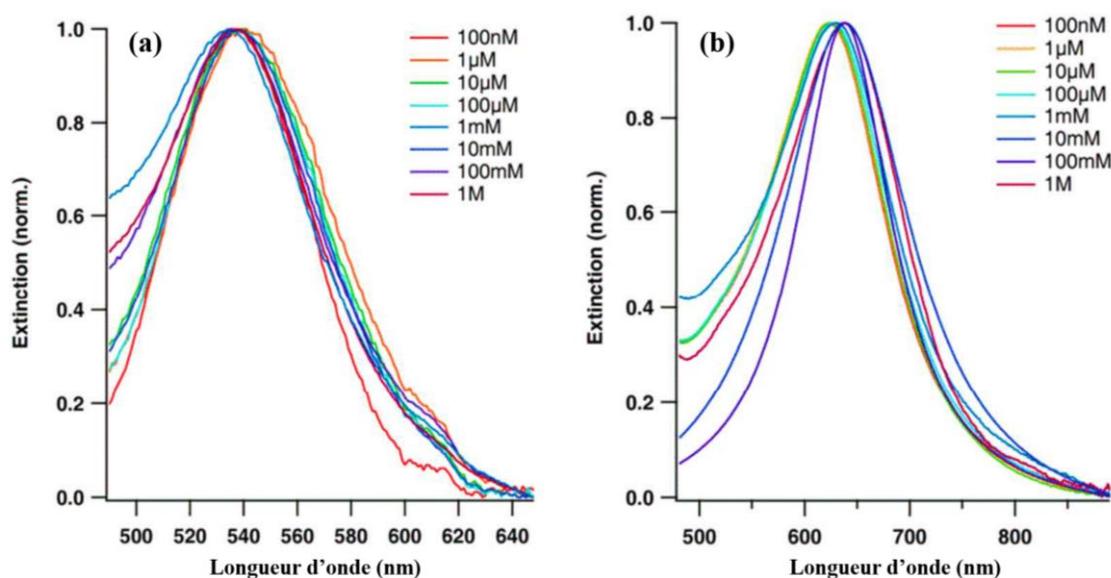


FIGURE. 6.2 – (a) Spectres d'extinction du NPS et (b) NPU après incubation dans des solutions de thiophénol à différentes concentrations (100 nM-1 M).

TABLEAU. 6.1 – Les valeurs des LSPR pour les NPs d'or sphériques (NPS) et oursins (NPU) fonctionnalisées à différentes concentrations de thiophénol.

C/ Thiophenol	0nM	100nM	1µM	10µM	100µM	1mM	10mM	100mM	1M
LSPR (NPS) nm	534	535	535	535	535	536	536	537	537
LSPR (NPU) nm	624	624	624	625	627	630	633	635	638

Par ailleurs, les courbes de corrélation ont été enregistrées pour les NPS (figure. 6.3) et les NPU (figure. 6.4) fonctionnalisées à différentes concentrations de thiophénol en faisant la moyenne de 5 passages de 60s.

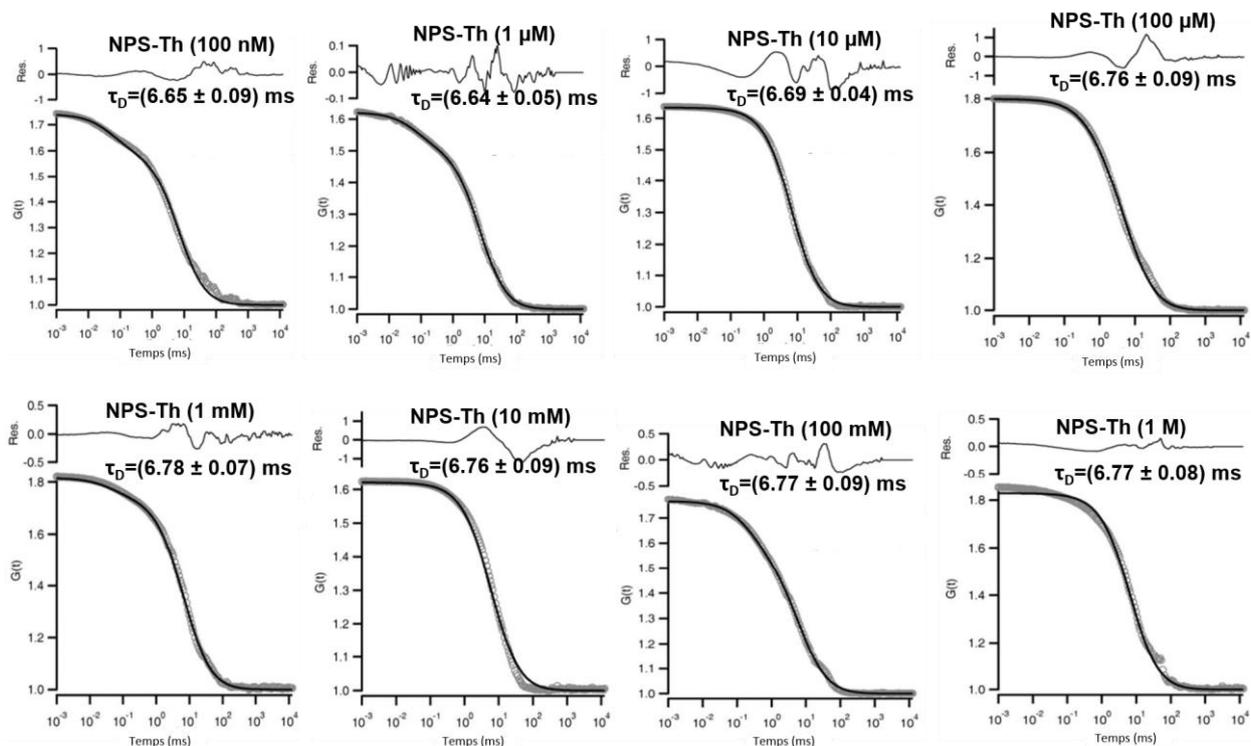


FIGURE. 6. 3 – Les courbes SCS (cercles) et leurs ajustement correspondant (lignes pleines) pour les NPS incubées à différentes concentrations de solution de thiophénol.

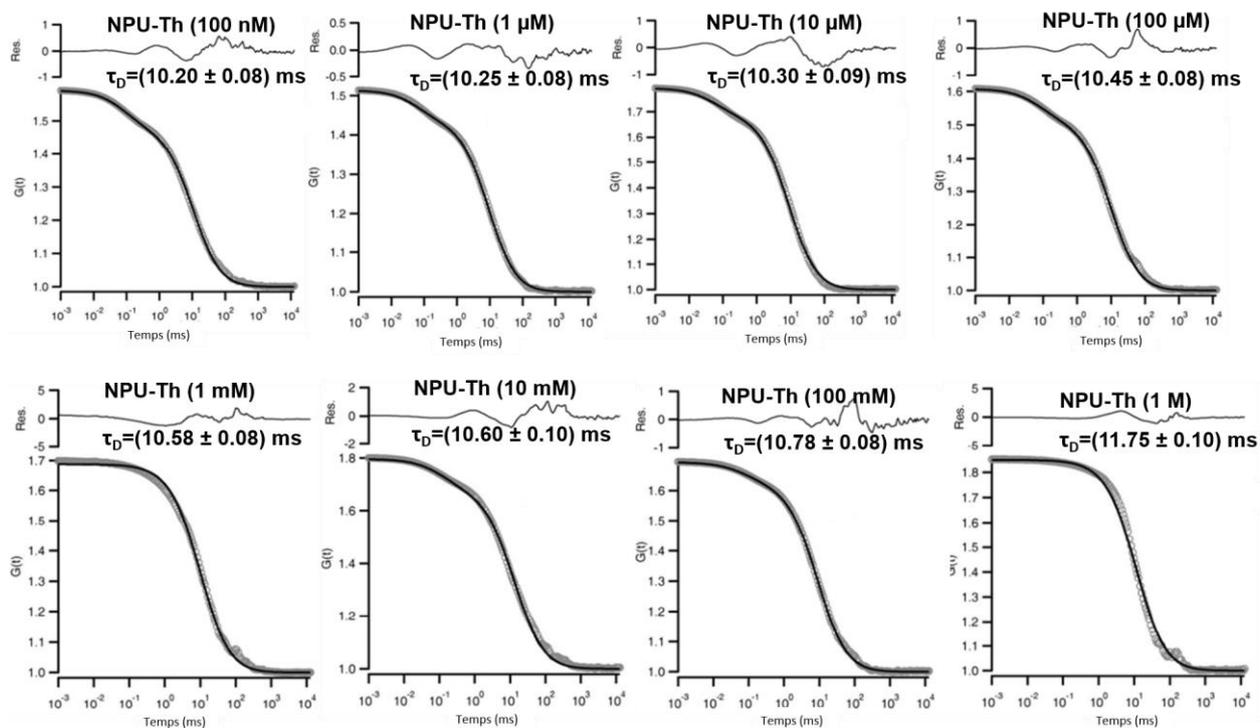


FIGURE. 6.4 – Les courbes SCS (cercles) et leurs ajustement correspondant (lignes pleines) pour les NPU incubées à différentes concentrations de solution de thiophénol.

Les temps de diffusion ( $\tau_D$ ) ont été déterminés pour les NPS et les NPU incubées dans différentes concentrations de thiophénol par l'ajustement des courbes de corrélation. Ensuite, les rayons hydrodynamiques ( $R_h$ ) ont été calculés pour les NPS et les NPU fonctionnalisées à différentes concentrations en utilisant l'équation (6.1). Les résultats sont représentés dans (tableau. 6.2).

TABLEAU. 6.2 – Les valeurs des rayons hydrodynamiques pour les NPs d'or sphériques (NPS) et oursins (NPU) fonctionnalisées à différentes concentrations de thiophénol.

Concentration de thiophenol	Les NPs d'or sphériques (NPS)		Les NPs d'or oursins (NPU)	
	$\tau_D$ (ms)	$R_h$ (nm $\pm$ 0.2)	$\tau_D$ (ms)	$R_h$ (nm $\pm$ 0.2)
<b>0nM</b>	6.62 $\pm$ 0.04	25.6	10.22 $\pm$ 0.08	39.4
<b>100nM</b>	6.65 $\pm$ 0.09	25.7	10.20 $\pm$ 0.08	39.4
<b>1<math>\mu</math>M</b>	6.64 $\pm$ 0.05	25.6	10.25 $\pm$ 0.08	39.5
<b>10<math>\mu</math>M</b>	6.69 $\pm$ 0.04	25.8	10.30 $\pm$ 0.09	39.7
<b>100<math>\mu</math>M</b>	6.76 $\pm$ 0.09	26.1	10.45 $\pm$ 0.08	40.3
<b>1mM</b>	6.78 $\pm$ 0.07	26.2	10.58 $\pm$ 0.08	40.9
<b>10mM</b>	6.76 $\pm$ 0.09	26.1	10.60 $\pm$ 0.10	40.9
<b>100mM</b>	6.77 $\pm$ 0.09	26.1	10.78 $\pm$ 0.08	41.6
<b>1M</b>	6.77 $\pm$ 0.08	26.1	11.75 $\pm$ 0.10	45.3

Les rayons hydrodynamiques ont été calculés à (25.6  $\pm$  0.2) nm et (39.4  $\pm$  0.2) nm pour les NPS et NPU respectivement avant le greffage de thiophénol. Après, l'incubation des NPs dans le thiophénol, les rayons hydrodynamiques augmentent ce qui confirme la formation de la couche de thiophénol sur les surfaces des NPs. À une concentration de thiophénol de 1 mM, les NPS présentent un rayon hydrodynamique de (26.2  $\pm$  0.2) nm, tandis que les NPU présentent un rayon hydrodynamique de (40.9  $\pm$  0.2) nm. Lorsque la concentration de thiophénol augmente à 1M, les NPS présentent un rayon hydrodynamique de (26.1  $\pm$  0.2) nm (pas de changement), tandis que les NPU présentent un rayon hydrodynamique de (45.3  $\pm$  0.2) nm. En fait, les rayons hydrodynamiques des NPS à 1 mM et à 1 M de thiophénol ne subissent aucune variation ce qui indique que la saturation de la surface a eu lieu à 1 mM. Cependant, dans le cas des NPU, le rayon hydrodynamique augmente en fonction de la concentration du thiophénol jusqu'à la saturation de la surface à 1 M.

L'intérêt principal de ce travail réalisé dans le cadre de cette thèse concerne l'étude de l'influence de la morphologie (taille et forme) des NPs d'or sur les propriétés de l'interaction molécules-NPs par la spectroscopie de corrélation de diffusion (SCS). En comparant les NPs sphériques et oursins, nous avons démontré que l'interaction thiophénol-NP d'or dépend fortement de la morphologie des NPs. Nous avons observé que pour les oursins, le thiophénol est d'abord greffé sur le noyau avec une concentration de saturation d'environ  $10^{-3}$  M comme observé pour les sphères. Par la suite, la saturation des branches se produit à une concentration plus élevée en thiophénol ( $\sim 1$  M). Nous avons démontré pour la première fois que les nano-oursins sont fonctionnalisés en deux étapes.

Une étude en parallèle a été réalisée en illustrant l'influence de la morphologie sur l'affinité et la coopérativité de liaison AU-S. De ce fait, un ajustement des rayons hydrodynamiques des NPs d'or sphériques et oursins a été effectué par l'équation de Hill. Nous avons illustré que les nano-oursins d'or avaient une meilleure affinité à la molécule de thiophenol en comparaison aux nano-sphères d'or. De plus, nous avons confirmé nos résultats expérimentaux par un calcul théorique, en constatant que la surface des NPs oursins est plus grande que celle des NPs sphériques. En outre, la caractérisation est complétée par la spectroscopie vibrationnelle résultante de l'exaltation de la diffusion Raman SERS de la molécule de thiophenol déposée sur la surface de NPs d'or. Dans le cas des NPs oursins, nous avons observé que l'exaltation du signal SERS est plus importante que celle des NPs sphériques.

## 6.5 Conclusion

Dans ce dernier chapitre, nous avons montré la puissance de la spectroscopie de corrélation dans le cadre de l'étude des échantillons sans marquage fluorescent. Nous avons déjà démontré les performances de la spectroscopie de corrélation en terme de résolution ainsi qu'en terme de sensibilité.

Nous avons mis en application la spectroscopie de corrélation de diffusion (SCS) pour l'étude des NPs d'or. Grâce à la SCS, les rayons hydrodynamiques des NPs ont été déterminés avec une grande précision avant et après interaction avec des molécules sondes (thiophénol). L'étude réalisée a démontré, pour la première fois, la grande influence de la morphologie des NPs d'or sur les propriétés de l'interaction molécule-NP, et cela en mettant l'accent sur l'affinité et la coopérativité de la liaison entre molécule-NP d'or.

**Article du journal joint:** Scattering Correlation Spectroscopy and Raman Spectroscopy of Thiophenol on Gold Nanoparticles: Comparative Study between Nanospheres and Nanourchins.

# Scattering Correlation Spectroscopy and Raman Spectroscopy of Thiophenol on Gold Nanoparticles: Comparative Study between Nanospheres and Nanourchins

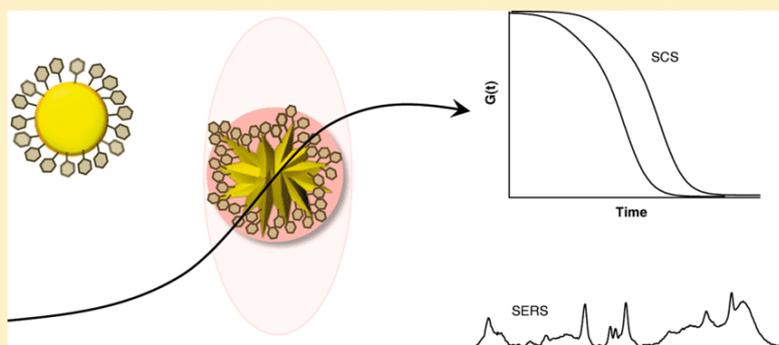
Dahia Issaad,<sup>†</sup> Hanane Moustouai,<sup>‡</sup> Aicha Medjahed,<sup>†</sup> Lazhar Lalaoui,<sup>†</sup> Jolanda Spadavecchia,<sup>‡</sup> Mohamed Bouafia,<sup>†</sup> Marc Lamy de la Chapelle,<sup>‡,§</sup> and Nadia Djaker<sup>\*,‡,§</sup>

<sup>†</sup>Laboratoire d'Optique Appliquée, Université Ferhat Abbas Sétif 1, El-Bez, DZ-19000 Setif, Algeria

<sup>‡</sup>Laboratoire CSPBAT, CNRS (UMR 7244), Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France

<sup>§</sup>Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

## Supporting Information



**ABSTRACT:** The surface characterization of branched and spherical gold nanoparticles was done by two complementary techniques: scattering correlation spectroscopy (SCS) and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). Thiophenol was used as a surface marker to probe the surface area and the gold–thiophenol interaction in gold nanourchins (GNUs) and gold nanospheres (GNSs). We observed that, for GNU, the thiophenol is first grafted on the core, with a saturation concentration of about  $10^{-3}$  M as observed for GNSs. Afterward, the saturation of the branches occurs at a higher thiophenol concentration ( $\sim 1$  M). A numerical calculation of the surface areas of GNSs of different sizes allowed for the estimation of the GNU surface area. The hydrodynamic radius was measured at different steps of thiophenol–GNP functionalization. By comparing spherical and nonspherical nanoparticles, we demonstrate that the molecule–GNP interaction is highly dependent on the nanoparticle morphology (size and shape).

## 1. INTRODUCTION

Gold nanoparticles (GNPs) are widely used in many domains, such as analytical chemistry, catalysis, and nanomedicine.<sup>1–5</sup> Depending on their shape and morphology, GNPs show different optical properties and surface reactivities, which make them the best candidates in the fields of drug delivery, nanovectorization, and photothermal therapy, especially branched GNPs.<sup>6–8</sup> In the case of nanostars, nanoflowers, and nanourchins, many sharp tips are present along their surface. These sharp tips are responsible for a strong enhancement of their interaction with light, inducing higher thermal effects or higher field enhancement (e.g., for surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS), and also for their superhydrophobic properties.<sup>9</sup> They also imply a greater surface area-to-volume ratio for nanovectorization compared to spherical-shaped nanoparticles.<sup>10,11</sup> The core and branches of such particles are bound by distinct crystal planes. Hence,

the crystallographic facets can be engineered to drive rapid chemical reactions.<sup>12</sup>

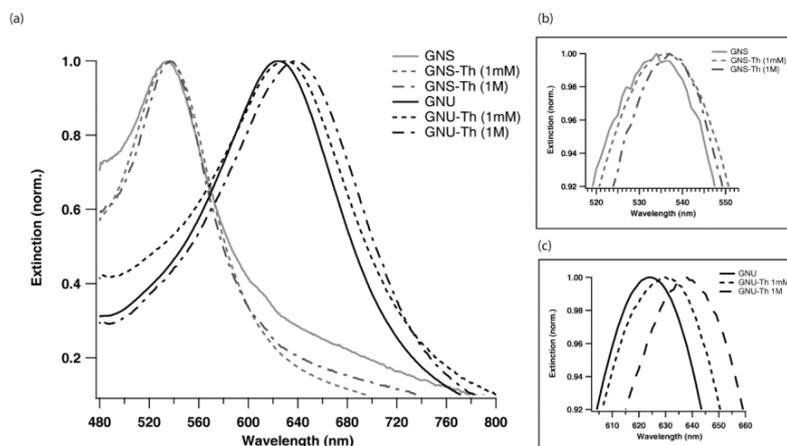
Even if an understanding of the modes of interaction of these molecules and an estimation of the surface areas of branched nanoparticles are the key steps to improving nanovectorization, the geometrical and optical characterization of these GNPs is an inevitable step before any practical application.<sup>13–16</sup> For example, plasmonic properties such as absorption, scattering, and electromagnetic field enhancement have been widely explored for different type of GNPs, with several techniques such as extinction spectroscopy, SERS,<sup>17,18</sup> and fluorescence spectroscopy.<sup>19–23</sup> Geometrical properties such as size and shape have mostly been explored by electronic microsc-

Received: June 1, 2017

Revised: July 31, 2017

Published: July 31, 2017





**Figure 1.** (a) Extinction spectra of GNS (gray) and GNU (black) before (solid lines) and after (dotted and dashed lines) incubation in thiophenol/ethanol/water solution at 1 mM (dotted lines) and 1 M (dashed lines). (b,c) Enlargements of the extinction peaks for (b) GNS and (c) GNU.

py.<sup>24–28</sup> In addition, other properties such as surface area and volume have been measured using electron tomography,<sup>11,29–32</sup> especially for branched nanoparticles.<sup>10,33,34</sup> Whereas electronic microscopy has the disadvantage of consuming a great deal of time for GNP characterization, an attractive alternative is dynamic light scattering,<sup>35,36</sup> although it is difficult to obtain a high spatial resolution and further physical properties with the latter technique.

Recently, correlation spectroscopy has been demonstrated to be one of the fastest and most sensitive techniques for GNP size and surface-chemistry characterization.<sup>37–39</sup> Correlation spectroscopies using fluorescence (FCS) and scattering (SCS) signals have especially been used to characterize GNP interactions with various molecules such as fluorescent markers,<sup>40–43</sup> polymers,<sup>44,45</sup> and proteins.<sup>46</sup> Recently, correlation spectroscopy has been associated with SERS in many studies for the chemical characterization of nanoparticle–molecule interactions.<sup>47,48</sup> In this application, thiophenol is one of the most studied SERS-active molecules used for characterizing GNPs, because of the strong affinity of thiols to form covalent bonds with gold surfaces and the ability of the aromatic cycle to produce strong SERS spectra.<sup>49,50</sup> In most studies involving the use of thiophenol, optical properties such as the electromagnetic enhancement factor have been studied using SERS for GNPs of different sizes and shapes and at different concentrations.<sup>51–54</sup>

Previously, we reported that scattering correlation spectroscopy (SCS) is a powerful technique for determining the hydrodynamic sizes of GNPs with high precision, especially for nonspherical particles.<sup>37</sup> In this work, we also employ SERS to explore the gold–thiophenol interaction in gold nanourchins (GNUs) compared to gold nanospheres (GNSs). That is, we use a combined spectroscopic approach to allow a complete picture of the thiophenol interaction on the gold surface in the case of a complex shape and to determine the surface area of the GNPs. Thus, we demonstrate that, for branched nanoparticles, several functionalization steps occur because of the specific GNU geometry.

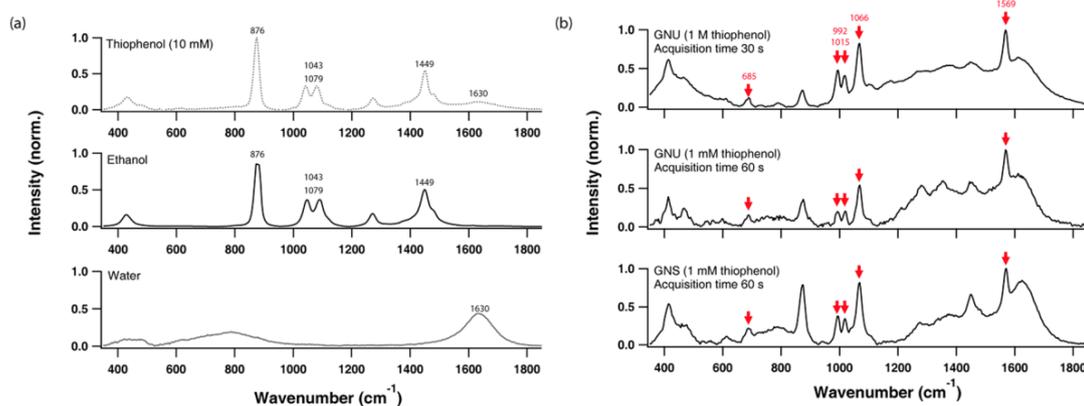
This approach is of great interest for understanding the GNP shape–molecule interaction in the context of nanovectorization.<sup>55,56</sup> We elucidate for the first time how branched GNPs are functionalized in two steps, and we have been able to estimate the huge surface areas of GNUs compared to GNSs.

We believe that our methodology using rapid techniques such as SCS and SERS paves the way toward improving the mechanism of biophysical interaction between biomolecules and complex-shaped gold nanoparticles of interest in the field of nanomedicine.

## 2. EXPERIMENTAL METHODS

**2.1. Materials.** Commercially available citrate-stabilized GNPs were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). GNSs (753645, Sigma-Aldrich) and GNU (797723, Sigma-Aldrich) with nominal diameters of 50 and 80 nm, respectively.<sup>57,58</sup> Thiophenol was purchased from Sigma-Aldrich (240249-50G). Because of the low solubility of thiophenol in water, stock solutions were prepared in ethanol/water (80%/20%) mixed solution. Both GNSs and GNUs (stocks stored in pure water) at the same concentration were incubated in thiophenol solutions of different concentrations (from 100 nM to 1 M) for 24 h. Afterward, the thiophenol-functionalized GNPs were centrifuged and washed with ultrapure water (10000 rpm, 10 min, two times) to remove excess thiophenol, giving a final concentration of  $10^{13}$  GNPs/L for both GNSs and GNUs, as measured by UV–vis spectroscopy. The thiophenol-functionalized GNPs were found to be highly stable, as no aggregates could be observed even after two months of storage at room temperature in ultrapure water. The normalized extinction spectra of the GNPs incubated in thiophenol solutions of different concentrations are illustrated in Figure S1 (Supporting Information).

**2.2. Characterization.** GNP concentrations were obtained by measuring the optical extinction spectra by UV–vis spectroscopy (Kontron Instruments, Montigny le Bretonneux, France) in the spectral range from 400 to 800 nm. Zeta potential measurements of GNPs were performed using a ZEN3600 Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments, Malvern, U.K.). Raman spectra were acquired with an Xplora spectrometer (Horiba Scientific) from 400 to 1800  $\text{cm}^{-1}$  using its liquid sampling feature and at room temperature. The excitation wavelength was set at 660 nm with an excitation power of 20 mW measured at the sample position. The Raman spectra were recorded with a 3  $\text{cm}^{-1}$  spectral resolution and for a 60 s acquisition time and were baseline-corrected using Labspec software (Horiba Scientific).



**Figure 2.** (a) Raman spectra of thiophenol (10 mM) solution in ethanol/water (80%/20%), ethanol, and pure water. (b) SERS spectra of thiophenol at 1 mM incubated with GNS, of thiophenol at 1 mM incubated with GNU, and of thiophenol at 1 M incubated with GNU.

**Table 1. Experimental and Reported<sup>59</sup> Wavenumbers of Thiophenol and Assignments of Vibrational Modes**

mode	experimental	reported <sup>59</sup>
ring out-of-plane deformation	685	689
ring out-of-plane deformation and C–H out-of-plane bending	992	991
ring in-plane deformation and C–C symmetric stretching	1015	1018
C–C asymmetric stretching	1066	1070
C–C asymmetric stretching	1569	1568

**2.3. Scattering Correlation Spectroscopy (SCS).** SCS experiments were performed on a home-built instrument based on an inverted microscope previously described by the authors.<sup>37</sup> The system is based on an excitation wavelength set at 633 nm (He–Ne laser, Thorlabs) with an excitation power of 10  $\mu$ W to avoid any optical trapping effect.<sup>23</sup> The laser beam was circularly polarized using a  $\lambda/4$  waveplate (Thorlabs, Maisons-Laffitte, France) and directed into a water immersion objective (Olympus, 40 $\times$ , NA = 1.2) focusing at a depth of 10  $\mu$ m inside the sample to minimize reflected light from the coverslips.

The scattered light was collected in the backward direction and redirected into a 50  $\mu$ m pinhole (Thorlabs). Optical densities were set in front of the detectors to record enough signal without saturating the detectors for both cases (GNSs and GNUs). The signal was then recorded by two avalanche photodetectors (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada), and the signal cross-correlation was performed by a hardware correlator (ALV-7004, ALV-Laser Vertriebsgesellschaft, Langen, Germany). Each individual SCS measurement was obtained by averaging five runs, each of 60 s duration. Each sample was measured at least five independent times to yield mean values and corresponding errors.

The system was previously calibrated,<sup>37</sup> using the fluorescence signal, giving an effective volume of 1.8 fL with a lateral waist of  $\omega_{xy} = 470$  nm and an axial waist of  $\omega_z = 1.6$   $\mu$ m. Correlation analysis was performed with Igor software (WaveMetrics, Lake Oswego, OR), as previously described.<sup>19</sup>

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

**3.1. GNP Characterization by UV–Vis Spectroscopy and Zeta Potential Measurements.** The localized surface plasmon resonance (LSPR) positions were measured at 534 and 624 nm for GNSs and GNUs, respectively, as shown in Figure 1, and are in a good agreement with the GNP diameters and the product technical specifications. When GNPs were

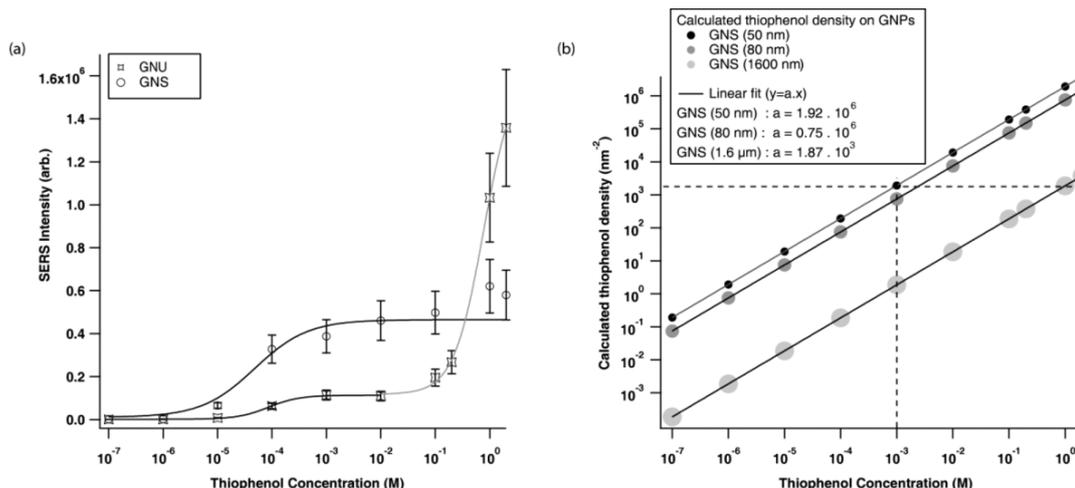
incubated with thiophenol solution, a red shift of the LSPR position was observed, which confirmed the exchange of the citrate surface chemistry by the thiophenol. At 1 mM thiophenol concentration, the GNSs showed a shift from 534 to 536 nm, whereas the GNUs exhibited a shift from 624 to 630 nm. When the thiophenol concentration was increased to 1 M, the GNSs showed an LSPR at 537 nm (no change), whereas the GNUs exhibited an LSPR at 638 nm (red shift of 8 nm).

The thiophenol grafting was further characterized by measuring the surface charge of the GNPs. A shift of the  $\zeta$  potential was observed when the GNPs were incubated with thiophenol solutions of different concentrations. The  $\zeta$  potential increased from approximately  $-40$  to  $-30$  mV (increase of 25%) for GNSs. In the case of GNUs, the  $\zeta$  potential increased from  $-44$  to  $-36$  mV (increase of 18%) at a 1 mM thiophenol concentration and to  $-13$  mV (increase of 70% of the charge) at a 1 M thiophenol concentration.

At a thiophenol concentration of 1 mM, the shifts of the LSPR position and  $\zeta$  potential for the GNSs and GNUs were weak and of the same order of magnitude. At a thiophenol concentration of 1 M, no further shift was observed for the GNSs, indicating that the GNS surface was saturated, whereas the GNUs still exhibited a red shift of the LSPR position and an increase of the  $\zeta$  potential. This is due to an increase in the number of thiophenol molecules at the GNU surface. As a consequence, the grafting of thiophenol at the GNU surface continued even at high concentration. The higher increase of the  $\zeta$  potential from 1 mM to 1 M might be due to the different orientations of the thiophenol molecules at the GNU surface because of surface roughness.

### 3.2. GNP Characterization by Raman Spectroscopy.

Figure 2 shows the Raman spectra of thiophenol in water/ethanol solution and the SERS spectra of thiophenol incubated at different concentrations with GNPs. Note that, in Figure 2a, the Raman spectrum of the incubation solution is only a sum of the signatures of ethanol and water. In the absence of the



**Figure 3.** (a) Integrated SERS intensities from experimental Raman spectra of specific thiophenol bands (685, 992, 1015, 1066, and 1569  $\text{cm}^{-1}$ ) for both GNS and GNU. (b) Calculated thiophenol densities on the spherical surface areas of 50-, 80-, and 1600-nm-diameter GNS.

**Table 2.** Hill Equation Fit Parameters of the Raman Intensity Curves Shown in Figure 3

	$I_{\text{SERS-max}}$	$I_{\text{min}}$	$n$	$C_T$ (mol)
GNS	$4 \times 10^5$	1300	$1.43 \pm 0.3$	$(7.6 \pm 1) \times 10^{-5}$
GNU, <1 mM thiophenol	$10^5$	1850	$1.51 \pm 0.5$	$(8 \pm 1) \times 10^{-5}$
GNU, >1 mM thiophenol	$1.6 \times 10^6$	$10^5$	$1.50 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.08$

GNPs, the Raman signal of thiophenol was not observable despite its high concentration, as already shown in ref 53. Otherwise, the SERS signal of bare GNPs (without thiophenol) shown in Figure S2 (Supporting Information) presents only the SERS signatures of ethanol and water.

The SERS spectra of thiophenol show its specific SERS bands at 685, 992, 1015, 1066, and 1559  $\text{cm}^{-1}$  in Figure 2b for both GNSs and GNUs. Bands assignments are listed in Table 1 and compared with the reported literature data.<sup>59</sup> The SERS intensity increases with the thiophenol concentration for both GNSs and GNUs. To compare between the two types of particles, SERS signals of the thiophenol-specific bands (685, 992, 1015, 1066, and 1569  $\text{cm}^{-1}$ ) were integrated using LabSpec software for each concentration, and the results are shown in Figure 3a.

Figure 3a shows the integrated SERS signal intensity of the specific thiophenol Raman bands for different thiophenol concentrations on GNPs. In the case of GNSs, saturation ( $I_{\text{SERS-max}}$ ) is reached at 1 mM thiophenol concentration. In contrast, for the GNUs, the thiophenol grafting follows a two-step process. A first saturation is observed at 1 mM as in the case of the GNSs, and a second step starts from  $10^{-2}$  M until saturation is reached at a thiophenol concentration of 1 M. As already reported in different other works on the study of the affinity of molecules for nanoparticles,<sup>15,60</sup> the Raman intensity curves were fitted using the Hill equation

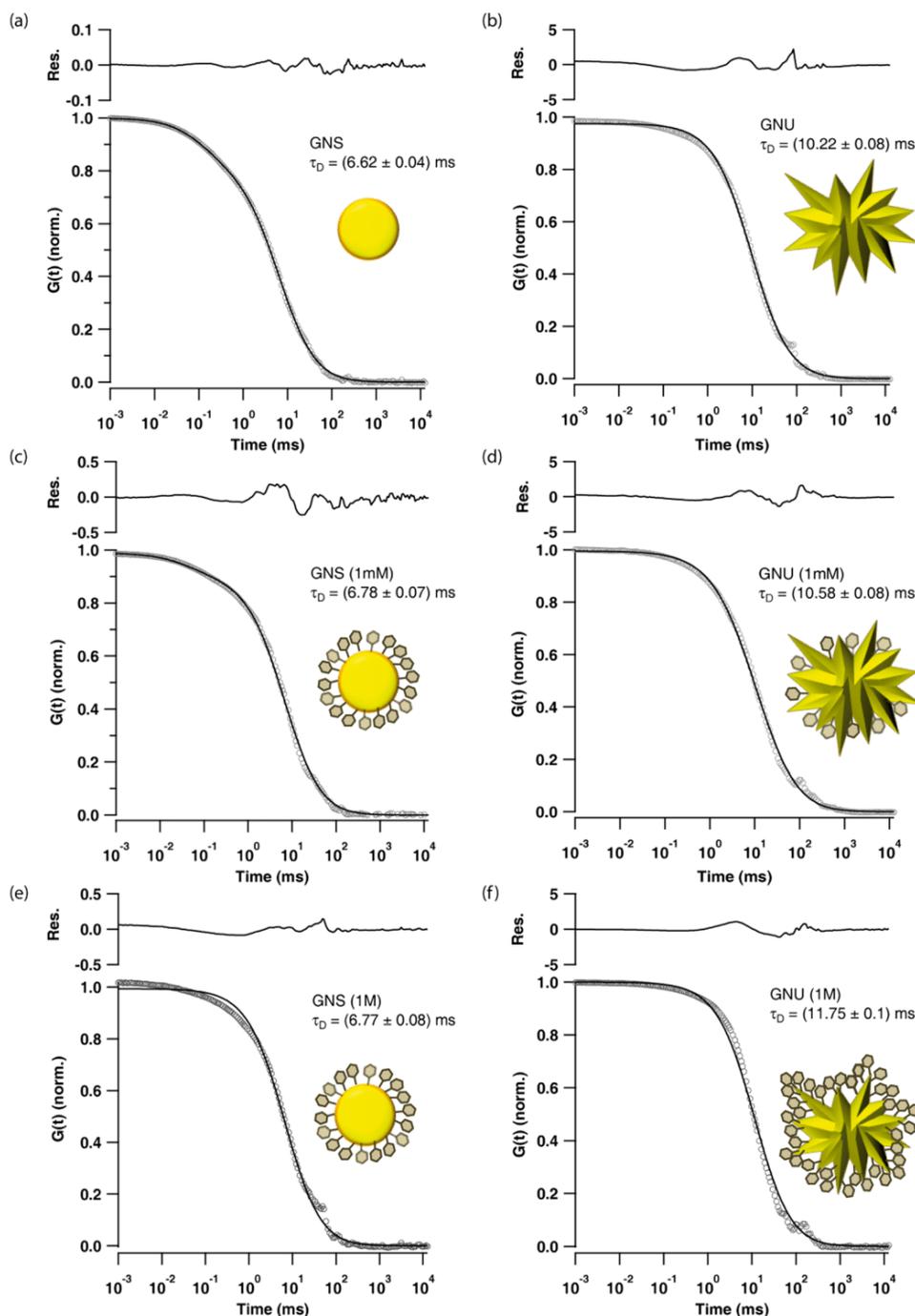
$$I_{\text{SERS}} = \frac{I_{\text{SERS-max}} - I_{\text{min}}}{1 + \left(\frac{C_T}{C}\right)^n} \quad (1)$$

where  $I_{\text{SERS-max}}$  and  $I_{\text{min}}$  are the maximum and the minimum SERS intensities, respectively, obtained for each functionalization step.  $C_T$  denotes the midpoint of the transition, that is, the concentration of thiophenol at half-coverage. The Hill coefficient,  $n$ , controls the steepness of the curve and denotes

the cooperativity of binding. The best-fit parameters presented in Table 2 show that the cooperativity of binding is slightly better for GNUs compared to GNSs. The interaction of the sulfur atom with the gold atoms seems to be favored in the case of the GNU shape. This can be explained by larger local radii of curvature at the surface of the GNUs that increase the reactivity of the gold atoms. The midpoint of the transition,  $C_T$ , for the GNSs is similar to that for the GNUs at thiophenol concentrations below 1 mM, whereas for the GNUs, at concentrations greater than 1 mM, the second step of thiophenol grafting exhibits a midpoint transition close to the molar concentration.

Note that, for GNPs incubated in 1 mM thiophenol solution, the SERS signal of the GNSs was 4 times stronger than the SERS signal of the GNUs. Considering that, at 1 mM, only the core of the GNUs was grafted, this ratio corresponds to the ratio between the SERS signal produced by two GNSs of 50 and 80 nm, which is in a good agreement with previous reported works.<sup>17,25,61</sup> Because the branches of the GNUs can be expected to provide a significantly higher SERS signal because of the tip effect, one can conclude that the SERS signal is due to thiophenol molecules grafted not on the branches but between them.

At 1 M thiophenol concentration, the GNUs showed a SERS signal that was significantly stronger than that of the GNSs (nearly 1 order of magnitude). In this case, the increase in the SERS signal can be attributed to the grafting of the thiophenol on the GNU branches. This observation means that the grafting of the thiophenol at the GNU surface does not occur homogeneously on the whole surface but rather occurs step by step. In the first step, the thiophenol is grafted at the GNU surface between the branches, and in the second step, the grafting occurs on the branches. Moreover, one can estimate that the branches provide a Raman enhancement 10 times higher than the internal surface of the GNU.



**Figure 4.** Normalized SCS curves (circles) and their fits with eq 1 (solid lines) of (a,b) bare GNPs, (c,d) GNPs incubated in 1 mM thiophenol solution, and (e,f) GNPs incubated in 1 M thiophenol solution.

To understand this two-step grafting, we performed theoretical calculations of the thiophenol density at the GNP surface for GNSs of three different sizes (Figure 3b).

The thiophenol density was calculated by taking into account the GNP size and the different thiophenol concentrations using the equation:

$$\begin{aligned} & \text{thiophenol density (thiophenol molecules/nm}^2\text{)} \\ &= \frac{(\text{thiophenol concentration}) \times N_A}{(\text{GNP concentration}) \times (\text{GNP surface area})} \quad (2) \end{aligned}$$

where  $N_A$  is Avogadro's number ( $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ), the concentration of GNPs is about  $10^{13}$  GNPs/L, and the GNP surface area is  $4\pi r^2$  ( $r$  is the GNP radius). The calculations were performed for three sizes of GNSs having diameters of 50, 80, and 1600 nm. Figure 3b shows that the calculated thiophenol density at a 1 mM concentration (dashed vertical line) is about  $2 \times 10^3$  molecules/nm<sup>2</sup> for 50-nm-diameter GNSs and  $8 \times 10^2$  molecules/nm<sup>2</sup> for 80-nm-diameter GNSs. The thiophenol density is then lower at the GNU surface than at the GNS surface, which can explain the lowest Raman signal for GNUs at the 1 mM concentration.

Table 3. Characterization of GNPs by UV–Vis Spectroscopy, Zeta Potential Measurements, and SCS

	thiophenol concentration (mM)	LSPR (nm)	$\zeta$ potential (mV $\pm$ SD <sup>a</sup> )	$\tau_D$ (ms)	$R_h^b$ (nm $\pm$ 0.2)
GNS	0	534	$-39.7 \pm 1.3$	$6.63 \pm 0.04$	25.6
GNS	1	536	$-30.3 \pm 2.6$	$6.78 \pm 0.07$	26.2
GNS	1000	537	$-27.9 \pm 2.2$	$6.77 \pm 0.08$	26.1
GNU	0	624	$-44.1 \pm 1.5$	$10.22 \pm 0.08$	39.4
GNU	1	630	$-36.4 \pm 1.9$	$10.58 \pm 0.08$	40.9
GNU	1000	638	$-13.3 \pm 0.8$	$11.75 \pm 0.1$	45.3

<sup>a</sup>SD = standard deviation. <sup>b</sup>By SCS.

If one assumes that the surface saturation of thiophenol is achieved for a thiophenol density of  $2 \times 10^3$  molecules/nm<sup>2</sup> as for GNSs, one can estimate the equivalent surface of the GNUs for a thiophenol concentration of 1 M. The density calculation demonstrates that the surface saturation corresponding to a thiophenol density of  $2 \times 10^3$  molecules/nm<sup>2</sup> (dashed horizontal line) is reached at a 1 M thiophenol concentration for 1600 nm diameter GNSs (Figure 3b). In this case, we can say that the GNU surface area is comparable to the 1600 nm diameter GNS surface area when the branches are taken into account.

Thus, a GNU of 80 nm diameter has a surface 400 times higher than that of the equivalent nanosphere. The increase in the surface area of branched nanoparticles allows for a greater extent of grafting of the molecules of interest as therapeutic agents and thus makes them better candidates for nanovectoring.<sup>6,7</sup> Hence, in the first step, the thiophenol is grafted to the GNU core until a  $10^{-2}$  M thiophenol concentration is reached. For higher concentrations, the thiophenol is grafted to the branches (surface area of a 1600 nm diameter GNS  $\approx 8 \times 10^6$  nm<sup>2</sup>).

**3.3. Determination of the GNP Hydrodynamic Radius by SCS.** The hydrodynamic radius of the GNPs was determined by SCS. The theory of SCS was described in our previous work.<sup>37</sup> This method relies on scattered intensity fluctuations within a confocal volume to determine the hydrodynamic radius of GNPs.<sup>23,38,39</sup> The correlation curve is mathematically represented by the equation

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \right) \quad (3)$$

where  $N$  is the average number of particles,  $s$  is the ratio of transverse ( $\omega_{xy}$ ) to axial ( $\omega_z$ ) dimensions of the analysis volume ( $s = 0.3$ ), and  $\tau_D$  is the diffusion time of the GNP crossing the focal volume. This time is directly related to the hydrodynamic radius ( $R_h$ ) through the Stokes–Einstein equation<sup>20,22</sup>

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta} \left( \frac{4\tau_D}{\omega_{xy}^2} \right) \quad (4)$$

where  $\eta$  is the water viscosity ( $10^{-3}$  kg m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>),  $k$  is the Boltzmann constant, and  $T$  is the temperature (all measurements were done at room temperature, 21 °C).

In Figure 4, the cross-correlation curves (average of five correlation curves, each with a 60 s acquisition time) were recorded for both GNSs and GNUs, incubated under three different sets of conditions: 0 M, 1 mM, and 1 M thiophenol concentrations for 24 h. The cross-correlation curves were normalized to 1 for ease comparison of time diffusion among the three sets of conditions. (All cross-correlation curves

without normalization are depicted in Figure S3 for bare GNPs, in Figure S4 for thiophenol–GNSs, and in Figure S5 for thiophenol–GNUs.) The diffusion time ( $\tau_D$ ) was deduced for each GNP by fitting each curve with eq 3. Afterward, the  $R_h$  value of the nanoparticles was calculated for each case using eq 4. The results are summarized in Table 3. Without thiophenol, the GNSs showed an  $R_h$  value of  $25.6 \pm 0.2$  nm (the uncertainties in  $R_h$  are about  $\pm 0.2$  nm because of the sample heterogeneity), whereas for the GNUs,  $R_h = 39.4 \pm 0.2$  nm was calculated. Note that the measured GNU hydrodynamic radius is the radius of a hypothetical hard sphere that diffuses with the same speed as the GNUs under examination.<sup>37</sup> The diffusion time will depend on the size of the GNPs and on the surface chemistry (thiophenol), which directly affects the diffusion speed of GNPs.

After the addition of 1 mM thiophenol, the hydrodynamic radius increased to  $R_h = 26.2 \pm 0.2$  nm for the GNSs and to  $R_h = 40.9 \pm 0.2$  nm for the GNUs. When the thiophenol concentration was increased to 1 M, the GNSs showed approximately the same radius ( $R_h = 26.1 \pm 0.2$  nm), which confirms the grafting saturation, whereas the GNUs showed an increase in  $R_h$  to  $45.3 \pm 0.2$  nm. These results confirm that grafting saturation is reached at 1 mM for GNSs and at 1 M for GNUs.

In the case of the GNSs incubated with 1 mM thiophenol, the difference in the hydrodynamic radius,  $\Delta R_h$ , is about  $0.6 \pm 0.2$  nm, which corresponds to the thickness of a thiophenol self-assembled monolayer (SAM).<sup>62,63</sup> Otherwise, for GNUs incubated in 1 mM thiophenol solution, a  $\Delta R_h$  value of  $1.5 \pm 0.2$  nm was measured, whereas for GNUs incubated in 1 M thiophenol solution, the change in hydrodynamic radius increased to  $\Delta R_h = 5.9 \pm 0.2$  nm. For nonspherical particles, the radius calculated from the diffusion properties is indicative of the apparent size of the dynamic hydrated/solvated particle. Hence, the term “hydrodynamic” radius includes both solvent (hydro) and shape (dynamic) effects. As the GNUs showed a greater  $\Delta R_h$  value than the GNSs, this shows that GNUs and GNSs have different dynamics after interacting with thiophenol depending on their shape (surface area) and their surface affinity to thiophenol.

Because of the branches and the specific shape of the GNUs, thiophenol will not form an exact monolayer but will fill the void between the branches, inducing a larger increase of the  $R_h$  than in the case of GNSs. This process is enhanced when the branches are grafted and when the space between them is completely filled with thiophenol. Because of the hydrophobic interaction between water molecules and thiophenol, the water molecules have less penetration inside the space between the branches, and thus, a very large increase in  $R_h$  is observed. One can assume that the measured  $\Delta R_h$  value corresponds to the filling of the space between the branches and, thus, to the branch size, which should be close to 6 nm.

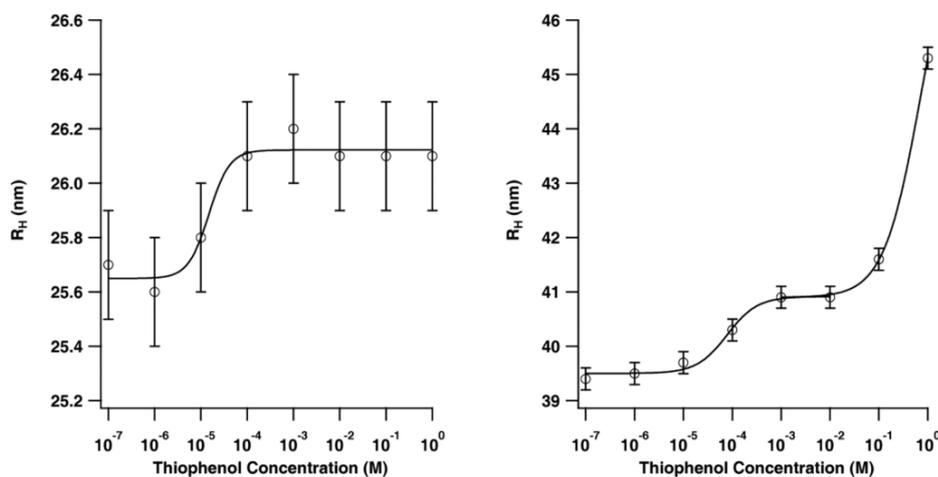


Figure 5. Hydrodynamic radii calculated using eq 4 for (left) GNS and (right) GNU incubated in thiophenol solutions of different concentrations.

Table 4. Hill Equation Fit Parameters of the Hydrodynamic Radius Curves Shown in Figure 5

	$D_{H-max}$ (nm)	$D_{H-min}$ (nm)	$n$	$C_T$ (mol)
GNS-Th	25.7	26.1	$1.3 \pm 0.5$	$(2.3 \pm 1) \times 10^{-5}$
<1 mM thiophenol	39.4	40.9	$1.4 \pm 0.3$	$(8 \pm 1) \times 10^{-5}$
>1 mM thiophenol	40.9	48.2	$1.20 \pm 0.2$	$0.69 \pm 0.02$

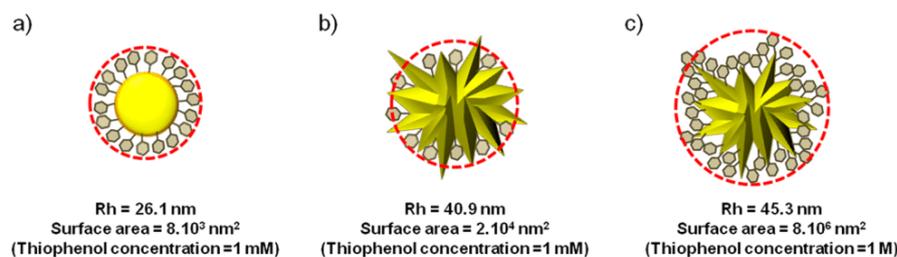


Figure 6. Schematic view of thiophenol grafting: (a) GNS surface saturation, (b) GNU core grafting, and (c) completely saturated GNU.

The hydrodynamic radii calculated from the time diffusion obtained from SCS curves using eq 4 of all GNPs incubated with thiophenol solutions of different concentrations are listed in Table S1 (Supporting Information) and plotted in Figure 5. As was done before for SERS intensity versus thiophenol concentration, the curves for the GNP hydrodynamic radii were fitted using the following Hill equation

$$R_H = \frac{(R_{H-max} - R_{H-min})}{1 + \left(\frac{C_T}{C}\right)^n} \quad (5)$$

The Hill equation fitting parameters of the hydrodynamic radius curves summarized in Table 4 show good agreement with the results obtained previously by SERS. This agreement demonstrates the complementarity between these two techniques in providing molecular identification for SERS and high sensitivity to surface modification for SCS. In summary, Figure 6 shows a scheme of the grafting process for GNSs and GNUs. For GNSs, the thiophenol saturates the surface, forming a self-assembled monolayer, and the value of  $R_h$  corresponds to exactly the radius of a sphere added to the thiophenol size ( $R_h = 25.6 + 0.6$  nm), for a surface area easily calculated as  $8000$  nm<sup>2</sup>. In the case of GNUs, in the first step of the gold–thiophenol interaction, the core is saturated, and the measured radius is  $R_h = 39.4 + 1.5$  nm. Afterward, when the GNU surface

is completely saturated, the surface area is estimated to be  $8 \times 10^6$  nm<sup>2</sup>, and the measured radius is  $R_h = 39.4 + 5.9$  nm.

#### 4. CONCLUSIONS

The combination of scattering correlation spectroscopy (SCS) with surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is able to characterize the size, surface area, and gold–thiophenol interaction of gold nanoparticles (GNPs), especially for branched nanoparticles. By SERS, the surface area and gold–thiophenol interaction can be characterized, whereas by SCS, the hydrodynamic radius can be measured with a high precision ( $\pm 0.2$  nm). We have demonstrated that, for gold nanourchins (GNUs), the interaction with thiophenol follows a two-step process: In the beginning, only the core is functionalized until saturation. Afterward, during the second step, the branches are grafted at a higher concentration. In the case of gold nanospheres (GNSs), the difference between the hydrodynamic radii of the grafted and nongrafted nanoparticles corresponds to the thickness of a thiophenol self-assembled monolayer, whereas in the case of GNUs, the hydrodynamic radius is related not only to the nanoparticle size but also to its shape and surface chemistry, which affect its mobility. For this latter case, we were able to determine the length of the branches as 6 nm. The surface area of the GNUs was estimated to be 400 times higher than that of the GNSs when saturated with

thiophenol, and this difference makes GNUs more suitable as nanovectors or nanomarkers.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.jpcc.7b05355](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b05355).

Details and information about gold nanoparticles with and without thiophenol in the form of extinction spectra (Figure S1), SERS spectra (Figure S2), and SCS curves (Figures S3–S5). LSPR positions and calculated hydrodynamic radii of the nanoparticles (Table S1) (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel.: +33 148387391. E-mail: [nadia.djaker@univ-paris13.fr](mailto:nadia.djaker@univ-paris13.fr).

### ORCID

Nadia Djaker: [0000-0001-7912-5436](https://orcid.org/0000-0001-7912-5436)

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Region Ile-de-France within the framework of DIM C'Nano IdF and the Campus France Agency as part of the *Tassili* agreement program.

## ■ REFERENCES

- (1) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X. H.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740–2779.
- (2) El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 829–834.
- (3) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **2008**, *23*, 217–228.
- (4) Moustou, H.; Movia, D.; Dupont, N.; Bouchemal, N.; Casale, S.; Djaker, N.; Savarin, P.; Prina-Mello, A.; de la Chapelle, M. L.; Spadavecchia, J. Tunable Design of Gold(III)-Doxorubicin Complex-PEGylated Nanocarrier. The Golden Doxorubicin for Ontological Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 19946–19957.
- (5) Sultana, S.; Djaker, N.; Boca-Farcau, S.; Salerno, M.; Charneau, N.; Astilean, S.; Hlawaty, H.; de la Chapelle, M. L. Comparative toxicity evaluation of flower-shaped and spherical gold nanoparticles on human endothelial cells. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 055101.
- (6) Han, J.; Li, J.; Jia, W.; Yao, L.; Li, X.; Jiang, L.; Tian, Y. Photothermal therapy of cancer cells using novel hollow gold nanoflowers. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 517–526.
- (7) Kumari, S.; Singh, R. P. Glycolic acid-g-chitosan-gold nanoflower nanocomposite scaffolds for drug delivery and tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50*, 878–883.
- (8) Pileni, M. P. Control of the size and shape of inorganic nanocrystals at various scales from nano to macrodomains. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 9019–9038.
- (9) Wang, X. S.; Yang, D. P.; Huang, P.; Li, M.; Li, C.; Chen, D.; Cui, D. X. Hierarchically assembled Au microspheres and sea urchin-like architectures: formation mechanism and SERS study. *Nanoscale* **2012**, *4*, 7766–7772.
- (10) Kumar, P. S.; Pastoriza-Santos, I.; Rodriguez-Gonzalez, B.; Garcia de Abajo, F. J.; Liz-Marzan, L. M. High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 015606.
- (11) Van Doren, E. A. F.; De Temmerman, P.; Francisco, M. A. D.; Mast, J. Determination of the volume-specific surface area by using transmission electron tomography for characterization and definition of nanomaterials. *J. Nanobiotechnol.* **2011**, *9*, 17–24.
- (12) Soetan, N.; Zarick, H. F.; Banks, C.; Webb, J. A.; Libson, G.; Coppola, A.; Bardhan, R. Morphology-Directed Catalysis with Branched Gold Nanoantennas. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 10320–10327.
- (13) Bazan-Diaz, L.; Mendoza-Cruz, R.; Velazquez-Salazar, J. J.; Plascencia-Villa, G.; Romeu, D.; Reyes-Gasga, J.; Herrera-Becerra, R.; Jose-Yacaman, M.; Guisbiers, G. Gold-copper nanostars as photo-thermal agents: synthesis and advanced electron microscopy characterization. *Nanoscale* **2015**, *7*, 20734–20742.
- (14) Boca, S.; Rugina, D.; Pintea, A.; Barbu-Tudoran, L.; Astilean, S. Flower-shaped gold nanoparticles: synthesis, characterization and their application as SERS-active tags inside living cells. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 055702.
- (15) Maffre, P.; Nienhaus, K.; Amin, F.; Parak, W. J.; Nienhaus, G. U. Characterization of protein adsorption onto FePt nanoparticles using dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, *2*, 374–383.
- (16) Schnabel, U.; Fischer, C. H.; Kenndler, E. Characterization of colloidal gold nanoparticles according to size by capillary zone electrophoresis. *J. Microcolumn Sep.* **1997**, *9*, 529–534.
- (17) Bell, S. E. J.; McCourt, M. R. SERS enhancement by aggregated Au colloids: effect of particle size. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7455–7462.
- (18) Xie, J. P.; Zhang, Q. B.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. C. The Synthesis of SERS-Active Gold Nanoflower Tags for In Vivo Applications. *ACS Nano* **2008**, *2*, 2473–2480.
- (19) Aouani, H.; Djaker, N.; Wenger, J.; Rigneault, H. High-efficiency single molecule fluorescence detection and correlation spectroscopy with dielectric microspheres. *Proc. SPIE* **2010**, *7571*, 75710A.
- (20) Bhattacharyya, S.; Prashanthi, S.; Bangal, P. R.; Patra, A. Photophysics and Dynamics of Dye-Doped Conjugated Polymer Nanoparticles by Time-Resolved and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 26750–26759.
- (21) Liu, H.; Dong, C. Q.; Ren, J. C. Tempo-Spatially Resolved Scattering Correlation Spectroscopy under Dark-Field Illumination and Its Application to Investigate Dynamic Behaviors of Gold Nanoparticles in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2775–2785.
- (22) Prashanthi, S.; Lanke, S. R.; Kumar, P. H.; Siva, D.; Bangal, P. R. Determination of Hydrodynamic Properties of Bare Gold and Silver Nanoparticles as a Fluorescent Probe Using Its Surface-Plasmon-Induced Photoluminescence by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66*, 835–841.
- (23) Zhang, B.; Lan, T.; Huang, X.; Dong, C.; Ren, J. Optical Trapping Effect and Its Calibration Method in Resonance Light Scattering Correlation Spectroscopy of Gold Nanoparticles in Solution. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 14495–14501.
- (24) Tian, F.; Bonnier, F.; Casey, A.; Shanahan, A. E.; Byrne, H. J. Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 9116–9123.
- (25) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238–7248.
- (26) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668–677.
- (27) Nehl, C. L.; Liao, H. W.; Hafner, J. H. Optical properties of star-shaped gold nanoparticles. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 683–688.
- (28) Boca, S. C.; Farcau, C.; Astilean, S. The study of Raman enhancement efficiency as function of nanoparticle size and shape. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2009**, *267*, 406–410.
- (29) Ngo, H. M.; Nguyen, P. P.; Ledoux-Rak, I. Optimization of second harmonic generation of gold nanospheres and nanorods in aqueous solution: the dominant role of surface area. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 3352–3356.
- (30) Scarabelli, L.; Coronado-Puchau, M.; Giner-Casares, J. J.; Langer, J.; Liz-Marzan, L. M. Monodisperse Gold Nanotriangles: Size

Control, Large-Scale Self-Assembly, and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2014**, *8*, 5833–5842.

(31) Scott, B. L.; Carron, K. T. Dynamic Raman Scattering Studies of Coated Gold Nanoparticles: 4-Mercaptopyridine, 4-Mercaptophenol, and Benzenethiol. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 20905–20913.

(32) Van Vegten, N.; Haider, P.; Maciejewski, M.; Krumeich, F.; Baiker, A. Feasibility of Methyl Mercaptane as Probe Molecule for Supported Gold Nanoparticle Surface Area Determination. *Chimia* **2010**, *64*, 191–194.

(33) Bakr, O. M.; Wunsch, B. H.; Stellacci, F. High-yield synthesis of multi-branched urchin-like gold nanoparticles. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 3297–3301.

(34) De Puig, H.; Tam, J. O.; Yen, C. W.; Gehrke, L.; Hamad-Schifferli, K. Extinction Coefficient of Gold Nanostars. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 17408–17415.

(35) Mishra, A.; Ram, S.; Ghosh, G. Dynamic Light Scattering and Optical Absorption in Biological Nanofluids of Gold Nanoparticles in Poly(vinyl pyrrolidone) Molecules. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 6976–6982.

(36) Zimbone, M.; Calcagno, L.; Messina, G. C.; Baeri, P.; Compagnini, G. Dynamic light scattering and UV-vis spectroscopy of gold nanoparticles solution. *Mater. Lett.* **2011**, *65*, 2906–2909.

(37) Djaker, N.; Sultana, S.; Issaad, D.; Boca, S.; Moustouli, H.; Spadavecchia, J.; Medjahed, A.; Bouafia, M.; Astilean, S.; de la Chapelle, M. L. Spherical and Flower-Shaped Gold Nanoparticles Characterization by Scattering Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 11700–11708.

(38) Dominguez-Medina, S.; McDonough, S.; Swanglap, P.; Landes, C. F.; Link, S. In Situ Measurement of Bovine Serum Albumin Interaction with Gold Nanospheres. *Langmuir* **2012**, *28*, 9131–9139.

(39) Tcherniak, A.; Dominguez-Medina, S.; Chang, W. S.; Swanglap, P.; Slaughter, L. S.; Landes, C. F.; Link, S. One-Photon Plasmon Luminescence and Its Application to Correlation Spectroscopy as a Probe for Rotational and Translational Dynamics of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 15938–15949.

(40) Leng, X. J.; Starchev, K.; Buffle, J. Adsorption of fluorescent dyes on oxide nanoparticles studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Langmuir* **2002**, *18*, 7602–7608.

(41) Loumagne, M.; Praho, R.; Nutarelli, D.; Werts, M. H. V.; Debarre, A. Fluorescence correlation spectroscopy reveals strong fluorescence quenching of FITC adducts on PEGylated gold nanoparticles in water and the presence of fluorescent aggregates of desorbed thiolate ligands. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 11004–11014.

(42) Rochira, J. A.; Gudheti, M. V.; Gould, T. J.; Laughlin, R. R.; Nadeau, J. L.; Hess, S. T. Fluorescence intermittency limits brightness in CdSe/ZnS nanoparticles quantified by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 1695–1708.

(43) Roy, S.; Woolley, R.; MacCraith, B. D.; McDonagh, C. Fluorescence Lifetime Analysis and Fluorescence Correlation Spectroscopy Elucidate the Internal Architecture of Fluorescent Silica Nanoparticles. *Langmuir* **2010**, *26*, 13741–13746.

(44) Huhn, D.; Kantner, K.; Geidel, C.; Brandholt, S.; De Cock, I.; Soenen, S. J. H.; Rivera\_Gil, P.; Montenegro, J. M.; Braeckmans, K.; Mullen, K.; Nienhaus, G. U.; Klapper, M.; Parak, W. J. Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3253–3263.

(45) Reisch, A.; Runser, A.; Arntz, Y.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S. Charge-Controlled Nanoprecipitation as a Modular Approach to Ultrasmall Polymer Nanocarriers: Making Bright and Stable Nanoparticles. *ACS Nano* **2015**, *9*, 5104–5116.

(46) Maffre, P.; Brandholt, S.; Nienhaus, K.; Shang, L.; Parak, W. J.; Nienhaus, G. U. Effects of surface functionalization on the adsorption of human serum albumin onto nanoparticles - a fluorescence correlation spectroscopy study. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 2036–2047.

(47) Barbara, A.; Dubois, F.; Ibanez, A.; Eng, L. M.; Quemerais, P. SERS Correlation Spectroscopy of Silver Aggregates in Colloidal

Suspension: Quantitative Sizing Down to a Single Nanoparticle. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 17922–17931.

(48) Bjerneld, E. J.; Foldes-Papp, Z.; Kall, M.; Rigler, R. Single-molecule surface-enhanced Raman and fluorescence correlation spectroscopy of horseradish peroxidase. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1213–1218.

(49) Carron, K. T.; Hurley, L. G. Axial and Azimuthal Angle Determination with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Thiophenol on Copper, Silver, and Gold Metal Surfaces. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 9979–9984.

(50) Tripathi, A.; Emmons, E. D.; Christesen, S. D.; Fountain, A. W.; Guicheteau, J. A. Kinetics and Reaction Mechanisms of Thiophenol Adsorption on Gold Studied by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 22834–22842.

(51) Lombardi, J. R.; Birke, R. L. A unified approach to surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 5605–5617.

(52) Lombardi, J. R.; Birke, R. L. The theory of surface-enhanced Raman scattering. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 144704.

(53) Chang, C.-C.; Wu, H.-L.; Kuo, C.-H.; Huang, M. H. Hydrothermal Synthesis of Monodispersed Octahedral Gold Nanocrystals with Five Different Size Ranges and Their Self-Assembled Structures. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 7570–7574.

(54) Joo, S. W. Adsorption of aromatic thiols on gold nanoparticle surfaces investigated by UV-vis absorption spectroscopy and surface enhanced Raman scattering. *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 60–61.

(55) Truong, N. P.; Whittaker, M. R.; Mak, C. W.; Davis, T. P. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Delivery* **2015**, *12*, 129–142.

(56) Zhao, L.; Kim, T. H.; Ahn, J. C.; Kim, H. W.; Kim, S. Y. Highly efficient "theranostics" system based on surface-modified gold nanocarriers for imaging and photodynamic therapy of cancer. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 5806–5817.

(57) Gold nanoparticles. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/753645>.

(58) Gold, nano-urchins. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/797723>.

(59) Li, S. J.; Wu, D. Y.; Xu, X. Y.; Gu, R. N. Theoretical and experimental studies on the adsorption behavior of thiophenol on gold nanoparticles. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38*, 1436–1443.

(60) Roecker, C.; Poetzl, M.; Zhang, F.; Parak, W. J.; Nienhaus, G. U. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 577–580.

(61) Njoki, P. N.; Lim, I. I. S.; Mott, D.; Park, H. Y.; Khan, B.; Mishra, S.; Sujakumar, R.; Luo, J.; Zhong, C. J. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 14664–14669.

(62) Hill, R. T.; Mock, J. J.; Hucknall, A.; Wolter, S. D.; Jokerst, N. M.; Smith, D. R.; Chilkoti, A. Plasmon Ruler with Angstrom Length Resolution. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9237–9246.

(63) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559–3568.

# Conclusion générale

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont touché différents domaines de l'optique : la physique des lasers, l'imagerie par microscopie confocale et la spectroscopie de corrélation dans le cadre de la caractérisation des nano-objets.

Dans un premier temps, une étude bibliographique a été présentée sur les faisceaux lasers ainsi que sur les méthodes de focalisation responsables de la modification de la résolution en microscope optique. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés en particulier au microscope confocal illuminé par un faisceau gaussien. Par le biais de la modélisation de la fonction d'étalement du point (PSF), la réponse impulsionnelle du dispositif d'excitation et de collection a été étudiée sous environnement Matlab. Une caractérisation complète a été effectuée au plan focal via la simulation numérique de la PSF selon différents paramètres optiques (la longueur d'onde d'excitation, l'ouverture numérique et le taux de remplissage de la lentille arrière de l'objectif de microscope). Par ailleurs, nous avons développé une approche basée sur le modèle de Gibson et Lanni pour l'étude des aberrations optiques produites par les effets réfractifs. Nous avons démontré que plus la variation d'indice de réfraction est élevée plus la PSF est étalée. De ce fait, la résolution du microscope confocal se détériore progressivement.

Par la suite, nous avons proposé une approche théorique des interférences des modes lasers dans l'objectif de développer un calcul permettant d'exprimer par l'interférence de deux faisceaux gaussiens une résolution aussi élevée qu'un seul faisceau gaussien. Deux paramètres ont été traités en parallèle. Dans le cas d'une présence d'un décalage entre les rayons de courbures des deux faisceaux gaussiens interférés, une mise en forme du faisceau (la forme à sommet plat, la forme d'un chapeau, la forme d'un creux) est obtenue au plan focal d'un système optique. Dans le cas d'une présence d'un déphasage entre les phases de Gouy des deux faisceaux gaussiens interférés, une augmentation de la résolution optique d'un facteur allant jusqu'à 39% est atteinte.

La caractérisation expérimentale de cette résolution optique a été réalisée par une technique de spectroscopie très sensible, la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Cette dernière est basée sur l'analyse des fluctuations du signal de fluorescence émis par les molécules fluorescentes qui se déplacent dans un volume d'observation défini par le faisceau gaussien et le microscope confocal. Grâce à la FCS, des mesures à des échelles spatio-temporelles très faibles peuvent être réalisées, afin d'extraire différentes informations telles que la concentration, le temps de diffusion ainsi que le rayon hydrodynamique des molécules ou particules analysées. Dans notre travail, l'accent a été mis plus particulièrement sur la mise en place de la plateforme optique de spectroscopie de corrélation de fluorescence et la caractérisation spatiale du volume d'observation de notre dispositif expérimental. Afin d'obtenir une meilleure fonction de ce dernier, différentes méthodes de

caractérisation du système confocal ont été exploitées en utilisant la corrélation du signal de molécules fluorescentes ainsi que la mesure de la PSF par l'imagerie directe des billes fluorescentes. Plusieurs conditions expérimentales et leur influence sur les propriétés de la résolution spatiale du dispositif ont été analysées en nous permettant de comprendre et d'évaluer la précision et les exigences de la spectroscopie de corrélation.

Le travail expérimental sur la spectroscopie de corrélation a été appliqué dans le cadre de l'étude de l'interaction des molécules (thiophénol) avec des nanoparticules d'or. La dernière partie de nos travaux décrit l'apport de la spectroscopie de corrélation à la compréhension de l'influence de la morphologie des NPs (forme et taille) sur l'interaction molécules-NPs. Les expériences de spectroscopie de corrélation de diffusion (SCS) ont été réalisées sur deux types de NPs d'or (sphérique et oursins). La mesure des fluctuations temporelles du signal de diffusion a permis d'obtenir le temps de diffusion de NPs incubées dans des solutions de différentes concentrations de thiophenol. La mesure du temps de diffusion a permis de déduire les rayons hydrodynamiques des NPs de différentes morphologies à différentes concentrations de thiophenol. En utilisant cette méthode, nous avons évalué la dynamique de l'interaction entre le thiophénol et les NPs d'or en fonction de leurs différentes morphologies. Ces études ont permis surtout d'évaluer le rapport de surface entre des NPs sphériques et de forme complexe dans le cadre de la nanovectorisation.

Nombreuses sont les perspectives qui peuvent enrichir ce travail de recherche, que ce soit par des améliorations numériques ou des applications nanotechnologiques. Dans l'objectif de construire un outil simple de caractérisation qui permettra d'obtenir de grandes résolutions, il serait intéressant d'utiliser la technique d'interférence pour générer des faisceaux de différentes tailles et formes. Cette perspective pourrait mettre en évidence la microscopie confocale associée à la spectroscopie de corrélation afin de l'adapter aux variations des applications.

Dans le futur, nous espérons exploiter le même principe de corrélation pour développer la spectroscopie de corrélation de la diffusion Raman exaltée en surface (SERS-CS). Cette technique permettra la caractérisation de l'émission radiative Raman des molécules (proches ou adsorbées sur les NPs) en fonction de la nature, de la taille et de la morphologie des nanostructures métalliques. L'intérêt principal de la technique sera à la fois l'identification chimique à travers l'analyse des bandes Raman de molécules interagissant avec les NPs et, au même temps, l'analyse dynamique des fluctuations des NPs déterminera le comportement de diffusion des particules analysées. Cette corrélation permettra notamment d'appréhender la dynamique de vibrations du champ proche optique associé aux résonances plasmoniques. Bien entendu, il reste aux chercheurs un travail important au niveau des applications de ce montage qui permet d'étudier des processus auxquels aucun autre dispositif d'imagerie ne leur donne accès.

# Bibliographie

- [1] Javan, A.; Bennett, W.R. and Herriott, D.R.: Population Inversion and Continuous Optical Maser Oscillation in a Gas Discharge Containing a He-Ne Mixture, *Physical Review Letters*, **6** (1961), no. 3, pp. 106–110.
- [2] Godin, T.; Ngcobo, S.; Cagniot, E.; Fromager, M.; Forbes, A. and Aït-Ameur, K.: Strong reducing of the laser focal volume, *Laser Beam Shaping XII*, International Society for Optics and Photonics, 2011, p. 81300Q.
- [3] Haddadi, S.; Fromager, M.; Louhibi, D.; Hasnaoui, A.; Harfouche, A.; Cagniot, E. and Aït-Ameur, K.: Improving the intensity of a focused laser beam, *Laser Resonators, Microresonators, and Beam Control XVII*, International Society for Optics and Photonics, 2015, p. 93431R.
- [4] de Saint Denis, R.; Passilly, N.; Laroche, M.; Mohammed-Brahim, T. and Aït-Ameur, K.: Beam-shaping longitudinal range of a binary diffractive optical element, *Applied optics*, **45** (2006), no. 31, pp. 8136–8141.
- [5] Ivanov, V.V.; Isaacs, J.A.; Saffman, M.; Kemme, S.A.; Ellis, A.R.; Brady, G.R.; Wendt, J.R.; Biedermann, G.W. and Samora, S.: Atom trapping in a bottle beam created by a diffractive optical element, arXiv preprint arXiv:1305.5309, (2013).
- [6] Hasnaoui, A.; Bencheikh, A. and Aït-Ameur, K.: Tailored TEM p<sub>0</sub> beams for large size 3-D laser prototyping, *Optics and Lasers in Engineering*, **49** (2011), no. 2, pp. 248–251.
- [7] Hasnaoui, A.; Godin, T.; Cagniot, E.; Fromager, M.; Forbes, A. and Aït-Ameur, K.: Selection of a LG p<sub>0</sub>-shaped fundamental mode in a laser cavity: Phase versus amplitude masks, *Optics Communications*, **285** (2012), no. 24, pp. 5268–5275.
- [8] Kimel, I. and Elias, L.R.: Relations between hermite and laguerre gaussian modes, *IEEE Journal of quantum electronics*, **29** (1993), no. 9, pp. 2562–2567.
- [9] Gori, F.; Santarsiero, M.; Borghi, R. and Guattari, G.: Intensity-based modal analysis of partially coherent beams with Hermite–Gaussian modes, *Optics Letters*, **23** (1998), no. 13, pp. 989–991.
- [10] Ait-Ameur, K. and Sanchez, F.: Gaussian beam conversion using an axicon, *Journal of modern optics*, **46** (1999), no. 10, pp. 1537–1548.
- [11] Lee, K.-S. and Rolland, J.P.: Bessel beam spectral-domain high-resolution optical coherence tomography with micro-optic axicon providing extended focusing range, *Optics letters*, **33** (2008), no. 15, pp. 1696–1698.
- [12] Pyragaitė, V. and Stabinis, A.: Interference of intersecting singular beams, *Optics communications*, **220** (2003), no. 4, pp. 247–255.
- [13] Ando, T.; Matsumoto, N.; Ohtake, Y.; Takiguchi, Y. and Inoue, T.: Structure of optical singularities in coaxial superpositions of Laguerre–Gaussian modes, *JOSA A*, **27** (2010), no. 12, pp. 2602–2612.
- [14] Clifford, M.A.; Arlt, J.; Courtial, J. and Dholakia, K.: High-order Laguerre–Gaussian laser modes for studies of cold atoms, *Optics Communications*, **156** (1998), no. 4, pp. 300–306.
- [15] Olson, S.E.; Terraciano, M.L.; Bashkansky, M. and Fatemi, F.K.: Cold-atom confinement in an all-optical dark ring trap, *Physical Review A*, **76** (2007), no. 6, p. 061404.
- [16] Grier, D.G.: A revolution in optical manipulation, *nature*, **424** (2003), no. 6950, p. 810.
- [17] Stewart, J.B.; Saleh, B.E.; Teich, M.C. and Fourkas, J.T.: Experimental demonstration of polarization-assisted transverse and axial optical superresolution, *Optics communications*, **241** (2004), no. 4, pp. 315–319.
- [18] Hell, S. and Stelzer, E.H.: Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope, *JOSA A*, **9** (1992), no. 12, pp. 2159–2166.
- [19] Siegman, A.E.: *Lasers* University Science Books: Mill Valley, Cal, (1986).

- [20] Kogelnik, H. and Li, T.: Laser beams and resonators, *Proceedings of the IEEE*, **54** (1966), no. 10, pp. 1312–1329.
- [21] Anan'ev, Y.A.: *Laser Resonators and the Beam Divergence Problem* (Adam Hilger, Bristol, 1992), (no date).
- [22] Saleh, B.E.; Teich, M.C. and Masters, B.R.: Fundamentals of photonics, *Journal of Biomedical Optics*, **13** (2008), no. 4, p. 049901.
- [23] Max Born & Emil Wolf: *Principles of Optics*, Pergamon Press, 6 ed., 1980.
- [24] Zauderer, E.: Complex argument Hermite–Gaussian and Laguerre–Gaussian beams, *JOSA A*, **3** (1986), no. 4, pp. 465–469.
- [25] [http://www.optique-ingenieur.org/en/courses/OPI\\_ang\\_M01\\_C03/co/Contenu\\_13.html](http://www.optique-ingenieur.org/en/courses/OPI_ang_M01_C03/co/Contenu_13.html), D. at en wikipedia; original version from: Hermite-Gaussian transverse mode patterns.2004.
- [26] Wikipedia, D. at E.: Laguerre-Gaussian transverse mode patterns.2004.
- [27] Hasnaoui, A.; Bencheikh, A.; Fromager, M.; Cagniot, E. and Aït-Ameur, K.: Creation of a sharper focus by using a rectified TEM p0 beam, *Optics Communications*, **284** (2011), no. 5, pp. 1331–1334.
- [28] Takeda, M. and Mutoh, K.: Fourier transform profilometry for the automatic measurement of 3-D object shapes, *Applied optics*, **22** (1983), no. 24, pp. 3977–3982.
- [29] Gorecki, C.: Interferogram analysis using a Fourier transform method for automatic 3D surface measurement, *Pure and Applied Optics: Journal of the European Optical Society Part A*, **1** (1992), no. 2, p. 103.
- [30] Galvez, E.J.: *Gaussian beams*, Dept. Physics Astronomy, Colgate Univ, (2009).
- [31] Whiting, A.I.; Abouraddy, A.F.; Saleh, B.E.; Teich, M.C. and Fourkas, J.T.: Polarization-assisted transverse and axial optical superresolution, *Optics express*, **11** (2003), no. 15, pp. 1714–1723.
- [32] Stahl, H.P.: Review of phase-measuring interferometry, *SPIE MILESTONE SERIES MS*, **129** (1996), pp. 427–442.
- [33] Min, J.; Yao, B.; Gao, P.; Ma, B.; Yan, S.; Peng, F.; Zheng, J.; Ye, T. and Rupp, R.: Wavefront curvature compensation of polarization phase-shifting digital holography, *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, **123** (2012), no. 17, pp. 1525–1529.
- [34] Creath, K.: Phase-shifting speckle interferometry, *Applied Optics*, **24** (1985), no. 18, pp. 3053–3058.
- [35] Joenathan, C.; Franze, B.; Haible, P. and Tiziani, H.J.: Speckle interferometry with temporal phase evaluation for measuring large-object deformation, *Applied optics*, **37** (1998), no. 13, pp. 2608–2614.
- [36] Gu, M. and Sheppard, C.J.R.: Three-dimensional transfer functions in 4Pi confocal microscopes, *JOSA A*, **11** (1994), no. 5, pp. 1619–1627.
- [37] Abbe, E.: Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung: I. Die Construction von Mikroskopen auf Grund der Theorie, *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, **9** (1873), no. 1, pp. 413–418.
- [38] Strutt, J.W.: On the Diffraction of object-glasses, *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, **33** (1872), p. 59.
- [39] Verdet, M.E.: *Leçons d'optique physique*, Masson, 1869.
- [40] Santos, A. and Young, I.T.: Model-based resolution: applying the theory in quantitative microscopy, *Applied Optics*, **39** (2000), no. 17, pp. 2948–2958.
- [41] Cheezum, M.K.; Walker, W.F. and Guilford, W.H.: Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles, *Biophysical journal*, **81** (2001), no. 4, pp. 2378–2388.
- [42] Zhang, B.; Zerubia, J. and Olivo-Marin, J.-C.: Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models, *Applied optics*, **46** (2007), no. 10, pp. 1819–1829.
- [43] James B. Pawley: *HANDBOOK OF BIOLOGICAL CONFOCAL MICROSCOPY*, Springer, Boston, MA, 2006.

- [44] Novotny, L. and Hecht, B.: Principles of nano-optics, Cambridge university press, 2012.
- [45] Minsky, M.: Microscopy apparatus US patent 3013467, USP Office, Ed. US, (1961).
- [46] Conchello, J.-A. and Lichtman, J.W.: Optical sectioning microscopy, *Nature methods*, **2** (2005), no. 12, p. 920.
- [47] Wilson, T.: Resolution and optical sectioning in the confocal microscope, *Journal of microscopy*, **244** (2011), no. 2, pp. 113–121.
- [48] Stanciu, S.G.; Stanciu, G.A. and Coltuc, D.: Compensating Light Intensity Attenuation in Confocal Scanning Laser Microscopy by Histogram Modeling Methods, *Digital Image Processing*, IntechOpen, 2012.
- [49] Dupuis, G.: La super-résolution, *Photoniques*, (2012), no. 62, pp. 42–47.
- [50] Thompson, N.L.; Burghardt, T.P. and Axelrod, D.: Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy, *Biophysical journal*, **33** (1981), no. 3, pp. 435–454.
- [51] Fish, K.N.: Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy, *Current protocols in cytometry*, **50** (2009), no. 1, pp. 12–18.
- [52] Voie, A.H.; Burns, D.H. and Spelman, F.A.: Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens, *Journal of Microscopy*, **170** (1993), no. 3, pp. 229–236.
- [53] Chen, B.-C.; Legant, W.R.; Wang, K.; Shao, L.; Milkie, D.E.; Davidson, M.W.; Janetopoulos, C.; Wu, X.S.; Hammer, J.A. and Liu, Z.: Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution, *Science*, **346** (2014), no. 6208, p. 1257998.
- [54] Hell, S. and Stelzer, E.H.: Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation, *Optics Communications*, **93** (1992), nos. 5–6, pp. 277–282.
- [55] Sheppard, C.J.R. and YUNRUI, G.: Improvement in axial resolution by interference confocal microscopy, *Optik*, **87** (1991), no. 3, pp. 129–132.
- [56] Davis, B.J.; Dogan, M.; Goldberg, B.B.; Karl, W.C.; Ünlü, M.S. and Swan, A.K.: 4Pi spectral self-interference microscopy, *JOSA A*, **24** (2007), no. 12, pp. 3762–3771.
- [57] Gustafsson, M.G.; Agard, D.A. and Sedat, J.W.: I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100nm axial resolution, *Journal of microscopy*, **195** (1999), no. 1, pp. 10–16.
- [58] Gustafsson, M.G.L.; Sedat, J.W. and Agard, D.A.: Method and apparatus for three-dimensional microscopy with enhanced depth resolution 1997.
- [59] Gustafsson, M.G.: Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy, *Journal of Microscopy*, **198** (2000), no. Pt 2, pp. 82–87.
- [60] Schaefer, L.H.; Schuster, D. and Schaffer, J.: Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach, *Journal of microscopy*, **216** (2004), no. 2, pp. 165–174.
- [61] Development Of Super-Resolved Fluorescence Microscopy, Leaders in Pharmaceutical Business Intelligence (LPBI) Group, <https://pharmaceuticalintelligence.com/2014/10/12/development-of-super-resolved-fluorescence-microscopy/>.
- [62] Schermelleh, L.; Carlton, P.M.; Haase, S.; Shao, L.; Winoto, L.; Kner, P.; Burke, B.; Cardoso, M.C.; Agard, D.A.; Gustafsson, M.G.L.; Leonhardt, H. and Sedat, J.W.: Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy, *Science*, **320** (2008), no. 5881, pp. 1332–1336.
- [63] Westphal, V. and Hell, S.W.: Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope, *Physical review letters*, **94** (2005), no. 14, p. 143903.
- [64] Hell, S.W. and Wichmann, J.: Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy, *Optics letters*, **19** (1994), no. 11, pp. 780–782.

- [65] Hell, S.W.: Far-field optical nanoscopy, *science*, **316** (2007), no. 5828, pp. 1153–1158.
- [66] Rittweger, E.; Han, K.Y.; Irvine, S.E.; Eggeling, C. and Hell, S.W.: STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution, *Nature Photonics*, **3** (2009), no. 3, pp. 144–147.
- [67] Resolution of Fluorescing Microscope Reaches 15nm, [https://www.photonics.com/Articles/Resolution\\_of\\_Fluorescing\\_Microscope\\_Reaches\\_15nm\\_/a26526](https://www.photonics.com/Articles/Resolution_of_Fluorescing_Microscope_Reaches_15nm_/a26526).
- [68] Maynard, A.D.; Aitken, R.J.; Butz, T.; Colvin, V.; Donaldson, K.; Oberdörster, G.; Philbert, M.A.; Ryan, J.; Seaton, A. and Stone, V.: Safe handling of nanotechnology, *Nature*, **444** (2006), no. 7117, pp. 267–269.
- [69] Bhushan, B.: *Springer handbook of nanotechnology*, Springer Science & Business Media, 2010.
- [70] Horikoshi, S. and Serpone, N.: *Introduction to nanoparticles, Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*, (2013), pp. 1–24.
- [71] Appenzeller, T.: The man who dared to think small, *Science*, **254** (1991), no. 5036, pp. 1300–1302.
- [72] Dowling, A.P.: Development of nanotechnologies, *Materials Today*, **7** (2004), no. 12, pp. 30–35.
- [73] Mody, V.V.; Siwale, R.; Singh, A. and Mody, H.R.: Introduction to metallic nanoparticles, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, **2** (2010), no. 4, pp. 282–289.
- [74] Mc Carthy, D.J.; Malhotra, M.; O’Mahony, A.M.; Cryan, J.F. and O’Driscoll, C.M.: Nanoparticles and the blood-brain barrier: advancing from in-vitro models towards therapeutic significance, *Pharmaceutical research*, **32** (2015), no. 4, pp. 1161–1185.
- [75] Kang, Y.S.; Risbud, S.; Rabolt, J.F. and Stroeve, P.: Synthesis and characterization of nanometer-size Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles, *Chemistry of Materials*, **8** (1996), no. 9, pp. 2209–2211.
- [76] Notarianni, M.; Vernon, K.; Chou, A.; Aljada, M.; Liu, J. and Motta, N.: Plasmonic effect of gold nanoparticles in organic solar cells, *Solar Energy*, **106** (2014), pp. 23–37.
- [77] Schlücker, S.: Surface-Enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications, *Angewandte Chemie International Edition*, **53** (2014), no. 19, pp. 4756–4795.
- [78] Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Jones, S.K. and Dobson, J.J.: Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *Journal of physics D: Applied physics*, **36** (2003), no. 13, p. R167.
- [79] Rudge, S.; Peterson, C.; Vessely, C.; Koda, J.; Stevens, S. and Catterall, L.: Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC), *Journal of Controlled Release*, **74** (2001), no. 1, pp. 335–340.
- [80] Mody, V.V.; Nounou, M.I. and Bikram, M.: Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies, *Advanced drug delivery reviews*, **61** (2009), no. 10, pp. 795–807.
- [81] Praetorius, N.P. and Mandal, T.K.: Engineered nanoparticles in cancer therapy, *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, **1** (2007), no. 1, pp. 37–51.
- [82] Dobson, J.: Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery, *Gene therapy*, **13** (2006), no. 4, p. 283.
- [83] Giljohann, D.A.; Seferos, D.S.; Daniel, W.L.; Massich, M.D.; Patel, P.C. and Mirkin, C.A.: Gold nanoparticles for biology and medicine, *Angewandte Chemie International Edition*, **49** (2010), no. 19, pp. 3280–3294.
- [84] Edwards, P.P. and Thomas, J.M.: Fein verteiltes Gold–Faradays Beitrag zu den heutigen Nanowissenschaften, *Angewandte Chemie*, **119** (2007), no. 29, pp. 5576–5582.

- [85] Jain, P.K.; Huang, X.; El-Sayed, I.H. and El-Sayed, M.A.: Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine, *Accounts of chemical research*, **41** (2008), no. 12, pp. 1578–1586.
- [86] Jain, P.K.; Lee, K.S.; El-Sayed, I.H. and El-Sayed, M.A.: Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine, *J. Phys. Chem. B*, **110** (2006), no. 14, pp. 7238–7248.
- [87] Mulvaney, P.: Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles, *Langmuir*, **12** (1996), no. 3, pp. 788–800.
- [88] Link, S. and El-Sayed, M.A.: Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals, *Annual review of physical chemistry*, **54** (2003), no. 1, pp. 331–366.
- [89] Kelly, K.L.; Coronado, E.; Zhao, L.L. and Schatz, G.C.: The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *The Journal of Physical Chemistry B*, **107** (2003), no. 3, pp. 668–677.
- [90] Lee, K.-S. and El-Sayed, M.A.: Dependence of the enhanced optical scattering efficiency relative to that of absorption for gold metal nanorods on aspect ratio, size, end-cap shape, and medium refractive index, *The Journal of Physical Chemistry B*, **109** (2005), no. 43, pp. 20331–20338.
- [91] Murphy, C.J.; Sau, T.K.; Gole, A.M.; Orendorff, C.J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S.E. and Li, T.: Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications, *The Journal of Physical Chemistry B*, **109** (2005), no. 29, pp. 13857–13870.
- [92] Link, S.; Mohamed, M.B. and El-Sayed, M.A.: Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant, *The Journal of Physical Chemistry B*, **103** (1999), no. 16, pp. 3073–3077.
- [93] Malikova, N.; Pastoriza-Santos, I.; Schierhorn, M.; Kotov, N.A. and Liz-Marzán, L.M.: Layer-by-layer assembled mixed spherical and planar gold nanoparticles: control of interparticle interactions, *Langmuir*, **18** (2002), no. 9, pp. 3694–3697.
- [94] Su, K.-H.; Wei, Q.-H.; Zhang, X.; Mock, J.J.; Smith, D.R. and Schultz, S.: Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles, *Nano letters*, **3** (2003), no. 8, pp. 1087–1090.
- [95] Wang, Z.; Lévy, R.; Fernig, D.G. and Brust, M.: Kinase-catalyzed modification of gold nanoparticles: a new approach to colorimetric kinase activity screening, *Journal of the American Chemical Society*, **128** (2006), no. 7, pp. 2214–2215.
- [96] Lee, K.-S. and El-Sayed, M.A.: Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition, *The Journal of Physical Chemistry B*, **110** (2006), no. 39, pp. 19220–19225.
- [97] Jana, N.R.; Gearheart, L. and Murphy, C.J.: Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template, *Advanced Materials*, **13** (2001), no. 18, p. 1389.
- [98] Jana, N.R.; Gearheart, L. and Murphy, C.J.: Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods, *The Journal of Physical Chemistry B*, **105** (2001), no. 19, pp. 4065–4067.
- [99] Kundu, S.; Panigrahi, S.; Praharaj, S.; Basu, S.; Ghosh, S.K.; Pal, A. and Pal, T.: Anisotropic growth of gold clusters to gold nanocubes under UV irradiation, *Nanotechnology*, **18** (2007), no. 7, p. 075712.
- [100] Daniel, M.-C. and Astruc, D.: Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chemical reviews*, **104** (2004), no. 1, pp. 293–346.
- [101] Sharma, V.; Park, K. and Srinivasarao, M.: Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, **65** (2009), no. 1, pp. 1–38.

- [102] Auditore, A.; Tuccitto, N.; Marzanni, G.; Quici, S.; Puntoriero, F.; Campagna, S. and Licciardello, A.: Organized assemblies of thiol-terpyridine and thiophenol on gold surfaces: preferential composition of mixed species evidenced, *Chemical Communications*, (2003), no. 19, pp. 2494–2495.
- [103] Barriet, D.; Yam, C.M.; Shmakova, O.E.; Jamison, A.C. and Lee, T.R.: 4-Mercaptophenylboronic acid SAMs on gold: comparison with SAMs derived from thiophenol, 4-mercaptophenol, and 4-mercaptobenzoic acid, *Langmuir*, **23** (2007), no. 17, pp. 8866–8875.
- [104] Adokoh, C.K.; Quan, S.; Hitt, M.; Darkwa, J.; Kumar, P. and Narain, R.: Synthesis and evaluation of glycopolymeric decorated gold nanoparticles functionalized with gold-triphenyl phosphine as anti-cancer agents, *Biomacromolecules*, **15** (2014), no. 10, pp. 3802–3810.
- [105] Daraee, H.; Eatemadi, A.; Abbasi, E.; Fekri Aval, S.; Kouhi, M. and Akbarzadeh, A.: Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **44** (2016), no. 1, pp. 410–422.
- [106] Zheng, M.; Li, Z. and Huang, X.: Ethylene glycol monolayer protected nanoparticles: synthesis, characterization, and interactions with biological molecules, *Langmuir*, **20** (2004), no. 10, pp. 4226–4235.
- [107] Hao, Y.; Yang, X.; Song, S.; Huang, M.; He, C.; Cui, M. and Chen, J.: Exploring the cell uptake mechanism of phospholipid and polyethylene glycol coated gold nanoparticles, *Nanotechnology*, **23** (2012), no. 4, p. 045103.
- [108] Niemeyer, C.M.: Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science, *Angewandte Chemie International Edition*, **40** (2001), no. 22, pp. 4128–4158.
- [109] Katz, E. and Willner, I.: Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications, *Angewandte Chemie International Edition*, **43** (2004), no. 45, pp. 6042–6108.
- [110] Ray, V.; Subramanian, R.; Bhadrachalam, P.; Ma, L.-C.; Kim, C.-U. and Koh, S.J.: CMOS-compatible fabrication of room-temperature single-electron devices, *Nature nanotechnology*, **3** (2008), no. 10, pp. 603–608.
- [111] El-Sayed, I.H.; Huang, X. and El-Sayed, M.A.: Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer, *Nano letters*, **5** (2005), no. 5, pp. 829–834.
- [112] Raman, C.V. and Krishnan, K.S.: A new type of secondary radiation, *Nature*, **121** (1928), no. 3048, pp. 501–502.
- [113] Venkateswarlu, K.: Relative intensities of stokes and anti-stokes Raman lines in crystals, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, **13** (1941), no. 1, pp. 64–67.
- [114] Turrell, G. and Corset, J. eds.: *Raman Microscopy: Developments and Applications*, 1 edition ed., Academic Press, Amsterdam, 1996.
- [115] Fleischmann, M.; Hendra, P.J. and McQuillan, A.J.: Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters*, **26** (1974), no. 2, pp. 163–166.
- [116] Gersten, J.I.: The effect of surface roughness on surface enhanced Raman scattering, *The Journal of Chemical Physics*, **72** (1980), no. 10, pp. 5779–5780.
- [117] Feng-Qi, Y.; Chun-Ping, Z. and Guang-Yin, Z.: The Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Effect of CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> Adsorbed on Colloidal Silver Particles, *Applied spectroscopy*, **43** (1989), no. 8, pp. 1490–1491.
- [118] Campion, A.; Ivanecy III, J.E.; Child, C.M. and Foster, M.: On the mechanism of chemical enhancement in surface-enhanced Raman scattering, *Journal of the American Chemical Society*, **117** (1995), no. 47, pp. 11807–11808.
- [119] Grand, J.; de La Chapelle, M.L.; Bijeon, J.-L.; Adam, P.-M.; Vial, A. and Royer, P.: Role of localized surface plasmons in surface-enhanced Raman scattering of shape-controlled metallic particles in regular arrays, *Physical Review B*, **72** (2005), no. 3, p. 033407.

- [120] Gersten, J. and Nitzan, A.: Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces, *The Journal of Chemical Physics*, **73** (1980), no. 7, pp. 3023–3037.
- [121] Tian, F.; Bonnier, F.; Casey, A.; Shanahan, A.E. and Byrne, H.J.: Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape, *Analytical Methods*, **6** (2014), no. 22, pp. 9116–9123.
- [122] Wokaun, A.; Gordon, J.P. and Liao, P.F.: Radiation damping in surface-enhanced Raman scattering, *Physical Review Letters*, **48** (1982), no. 14, p. 957.
- [123] Boujday, S.; Chapelle, M.L. de la; Srajer, J. and Knoll, W.: Enhanced vibrational spectroscopies as tools for small molecule biosensing, *Sensors*, **15** (2015), no. 9, pp. 21239–21264.
- [124] Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L.T.; Itzkan, I.; Dasari, R.R. and Feld, M.S.: Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS), *Physical review letters*, **78** (1997), no. 9, p. 1667.
- [125] Nie, S. and Emory, S.R.: Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering, *science*, **275** (1997), no. 5303, pp. 1102–1106.
- [126] Turkevich, J.; Stevenson, P.C. and Hillier, J.: A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, **11** (1951), pp. 55–75.
- [127] Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H. and Plech, A.: Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited, *The Journal of Physical Chemistry B*, **110** (2006), no. 32, pp. 15700–15707.
- [128] TekaiááElhissen, K. and others: Preparation of colloidal silver dispersions by the polyol process. Part 1—synthesis and characterization, *Journal of Materials Chemistry*, **6** (1996), no. 4, pp. 573–577.
- [129] Brown, K.R.; Walter, D.G. and Natan, M.J.: Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions. 2. Improved control of particle size and shape, *Chemistry of Materials*, **12** (2000), no. 2, pp. 306–313.
- [130] Khoury, C.G. and Vo-Dinh, T.: Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization, *The Journal of Physical Chemistry C*, **112** (2008), no. 48, pp. 18849–18859.
- [131] Kumar, P.S.; Pastoriza-Santos, I.; Rodriguez-Gonzalez, B.; de Abajo, F.J.G. and Liz-Marzan, L.M.: High-yield synthesis and optical response of gold nanostars, *Nanotechnology*, **19** (2007), no. 1, p. 015606.
- [132] Xie, J.; Zhang, Q.; Lee, J.Y. and Wang, D.I.: The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for in vivo applications, *ACS nano*, **2** (2008), no. 12, pp. 2473–2480.
- [133] Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L.M. and Mulvaney, P.: Gold nanorods: synthesis, characterization and applications, *Coordination Chemistry Reviews*, **249** (2005), no. 17, pp. 1870–1901.
- [134] Su, Q.; Ma, X.; Dong, J.; Jiang, C. and Qian, W.: A reproducible SERS substrate based on electrostatically assisted APTES-functionalized surface-assembly of gold nanostars, *ACS applied materials & interfaces*, **3** (2011), no. 6, pp. 1873–1879.
- [135] McMahan, J.M.; Henry, A.-I.; Wustholz, K.L.; Natan, M.J.; Freeman, R.G.; Van Duyne, R.P. and Schatz, G.C.: Gold nanoparticle dimer plasmonics: finite element method calculations of the electromagnetic enhancement to surface-enhanced Raman spectroscopy, *Analytical and bioanalytical chemistry*, **394** (2009), no. 7, pp. 1819–1825.
- [136] Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J. and Huo, Q.: Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **58** (2007), no. 1, pp. 3–7.
- [137] Masliyah, J.H. and Bhattacharjee, S.: *Electrokinetic and colloid transport phenomena*, John Wiley & Sons, 2006.

- [138] Kirby, B.J. and Hasselbrink, E.F.: Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations, *Electrophoresis*, **25** (2004), no. 2, pp. 187–202.
- [139] Bard, A.J. and Faulkner, L.R.: *Fundamentals and applications*, *Electrochemical Methods*, **2** (2001).
- [140] Marchese, D.; Di Bello, G.; Greco, M.; Lapenna, V.; Rizzo, E. and Telesca, V.: Self Potential Tomographic Technique to Detect Soil Water Movements in the Vadose Zone: Laboratory Measurements, *Environmental Semeiotics*, **1** (2008), no. 2008, pp. 137–153.
- [141] Xu, R.: Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement, *Particuology*, **6** (2008), no. 2, pp. 112–115.
- [142] Zhang, P.; Li, L.; Dong, C.; Qian, H. and Ren, J.: Sizes of water-soluble luminescent quantum dots measured by fluorescence correlation spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, **546** (2005), no. 1, pp. 46–51.
- [143] Dominguez-Medina, S.; Chen, S.; Blankenburg, J.; Swanglap, P.; Landes, C.F. and Link, S.: Measuring the hydrodynamic size of nanoparticles using fluctuation correlation spectroscopy, *Annual review of physical chemistry*, **67** (2016), pp. 489–514.
- [144] Berne, B.J. and Pecora, R.: *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*, Courier Corporation, 2000.
- [145] Balaji, P.S.; Murthy, A.V.R.; Tiwari, N. and Kulkarni, S.: Fluorescence correlation spectroscopy of gold nanoparticles, *Spectroscopy Letters*, **45** (2012), no. 1, pp. 22–28.
- [146] Djaker, N.; Sultana, S.; Issaad, D.; Boca, S.; Moustou, H.; Spadavecchia, J.; Medjahed, A.; Bouafia, M.; Astilean, S. and de la Chapelle, M.L.: Spherical and Flower-Shaped Gold Nanoparticles Characterization by Scattering Correlation Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry C*, **120** (2016), no. 21, pp. 11700–11708.
- [147] Dominguez-Medina, S.; McDonough, S.; Swanglap, P.; Landes, C.F. and Link, S.: In situ measurement of bovine serum albumin interaction with gold nanospheres, *Langmuir*, **28** (2012), no. 24, pp. 9131–9139.
- [148] Parkkila, P.: *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Application to Langmuir Monolayers*, (2015).
- [149] Valeur, B. and Berberan-Santos, M.N.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 2012.
- [150] Jablonski, A.: Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes, *Nature*, **131** (1933), no. 3319, p. 839.
- [151] Visser, A. and Rolinski, O.J.: *Basic photophysics*, American Society for Photobiology, (2010).
- [152] Lakowicz, J.R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*, Third Edition, Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
- [153] Valeur, B.: *Invitation à la fluorescence moléculaire*, De Boeck Supérieur, 2004.
- [154] Alexa Fluor 532.: <http://products.invitrogen.com>, (no date).
- [155] Haustein, E. and Schwille, P.: Single-molecule spectroscopic methods, *Current opinion in structural biology*, **14** (2004), no. 5, pp. 531–540.
- [156] Magde, D.; Elson, E. and Webb, W.W.: Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System\char22{ }Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Physical Review Letters*, **29** (1972), no. 11, pp. 705–708.
- [157] Elson, E.L. and Magde, D.: Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory, *Biopolymers*, **13** (1974), no. 1, pp. 1–27.
- [158] Magde, D.; Elson, E.L. and Webb, W.W.: Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **13** (1974), no. 1, pp. 29–61.
- [159] Tetin, S.: *Fluorescence fluctuation spectroscopy (FFS)*, Academic Press, 2012.

- [160] Rigler, R.; Mets, Ü.; Widengren, J. and Kask, P.: Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion, *European Biophysics Journal*, **22** (1993), no. 3, pp. 169–175.
- [161] Webb, W.W.: Fluorescence correlation spectroscopy: inception, biophysical experimentations, and prospectus, *Applied Optics*, **40** (2001), no. 24, pp. 3969–3983.
- [162] Hess, S.T.; Huang, S.; Heikal, A.A. and Webb, W.W.: Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review, *Biochemistry*, **41** (2002), no. 3, pp. 697–705.
- [163] Bacia, K. and Schwille, P.: A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy, *Methods*, **29** (2003), no. 1, pp. 74–85.
- [164] Schwille, P. and Haustein, E.: *Fluorescence Correlation Spectroscopy An Introduction to its Concepts and Applications*, 2002.
- [165] Hess, S.T. and Webb, W.W.: Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy, *Biophysical journal*, **83** (2002), no. 4, pp. 2300–2317.
- [166] Elson, E.L.: Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future, *Biophysical journal*, **101** (2011), no. 12, pp. 2855–2870.
- [167] Haustein, E. and Schwille, P.: Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **36** (2007), pp. 151–169.
- [168] Ringemann, C.: *Single molecule studies at the nanoscale: STED Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in subdiffraction focal volumes*, Citeseer, 2008.
- [169] Krichevsky, O. and Bonnet, G.: Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications, *Reports on Progress in Physics*, **65** (2002), no. 2, p. 251.
- [170] Thompson, N.L.: *Fluorescence correlation spectroscopy*, Topics in fluorescence spectroscopy, Springer, 2002, pp. 337–378.
- [171] Krieger, J.; Tóth, K. and Langowski, J.: Fluorescence correlation spectroscopy.", (2001).
- [172] Kim, S.A. and Schwille, P.: Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy: prospects for neuroscience, *Current Opinion in Neurobiology*, **13** (2003), no. 5, pp. 583–590.
- [173] Leutenegger, M.; Ringemann, C.; Lasser, T.; Hell, S.W. and Eggeling, C.: Fluorescence correlation spectroscopy with a total internal reflection fluorescence STED microscope (TIRF-STED-FCS), *Optics Express*, **20** (2012), no. 5, pp. 5243–5263.
- [174] Li, J.; Dong, C. and Ren, J.: Strategies to reduce detection volume of fluorescence correlation spectroscopy (FCS) to realize physiological concentration measurements, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **89** (2017), pp. 181–189.
- [175] Dertinger, T.: *Two-focus fluorescence correlation spectroscopy 2007*.
- [176] Widengren, J.; Mets, U. and Rigler, R.: Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study, *The Journal of Physical Chemistry*, **99** (1995), no. 36, pp. 13368–13379.
- [177] Widengren, J.; Rigler, R. and Mets, Ü.: Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy, *Journal of Fluorescence*, **4** (1994), no. 3, pp. 255–258.
- [178] Widengren, J. and Rigler, R.: Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy, 2001.
- [179] Terry, B.R.; Matthews, E.K. and Haseloff, J.: Molecular characterization of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy, *Biochemical and biophysical research communications*, **217** (1995), no. 1, pp. 21–27.
- [180] Tjernberg, L.O.; Pramanik, A.; Björling, S.; Thyberg, P.; Thyberg, J.; Nordstedt, C.; Berndt, K.D.; Terenius, L. and Rigler, R.: Amyloid  $\beta$ -peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy, *Chemistry & Biology*, **6** (1999), no. 1, pp. 53–62.
- [181] Bark, N.; Földes-Papp, Z. and Rigler, R.: The Incipient Stage in Thrombin-Induced Fibrin Polymerization Detected by FCS at the Single Molecule Level, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **260** (1999), no. 1, pp. 35–41.

- [182] Pramanik, A. and Rigler, R.: Ligand-Receptor Interactions in the Membrane of Cultured Cells Monitored by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biological Chemistry*, **382** (2001), no. 3.
- [183] Rigler, R.; Pramanik, A.; Jonasson, P.; Kratz, G.; Jansson, O.T.; Nygren, P.-Å.; Ståhl, S.; Ekberg, K.; Johansson, B.-L.; Uhlén, S.; Uhlén, M.; Jörnvall, H. and Wahren, J.: Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96** (1999), no. 23, pp. 13318–13323.
- [184] Medina, M.A. and Schwille, P.: Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology, *Bioessays*, **24** (2002), no. 8, pp. 758–764.
- [185] Leder, V.; Lummer, M.; Tegeler, K.; Humpert, F.; Lewinski, M.; Schüttpelz, M. and Staiger, D.: Mutational definition of binding requirements of an hnRNP-like protein in Arabidopsis using fluorescence correlation spectroscopy, *Biochemical and biophysical research communications*, **453** (2014), no. 1, pp. 69–74.
- [186] Macháň, R. and Wohland, T.: Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems, *FEBS letters*, **588** (2014), no. 19, pp. 3571–3584.
- [187] Koynov, K. and Butt, H.-J.: Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **17** (2012), no. 6, pp. 377–387.
- [188] Wolf, E.: Electromagnetic diffraction in optical systems-I. An integral representation of the image field, *Proc. R. Soc. Lond. A*, **253** (1959), no. 1274, pp. 349–357.
- [189] Stokseth, P.A.: Properties of a defocused optical system, *JOSA*, **59** (1969), no. 10, pp. 1314–1321.
- [190] Gibson, S.F. and Lanni, F.: Diffraction by a circular aperture as a model for three-dimensional optical microscopy, *JOSA A*, **6** (1989), no. 9, pp. 1357–1367.
- [191] Richards, B. and Wolf, E.: Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system, *Proc. R. Soc. Lond. A*, **253** (1959), no. 1274, pp. 358–379.
- [192] Debye, P.: Das Verhalten von Lichtwellen in der Nähe eines Brennpunktes oder einer Brennlinie, *Annalen der Physik*, **335** (1909), no. 14, pp. 755–776.
- [193] Hell, S.; Reiner, G.; Cremer, C. and Stelzer, E.H.: Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index, *Journal of microscopy*, **169** (1993), no. 3, pp. 391–405.
- [194] Török, P. and Varga, P.: Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium, *Applied optics*, **36** (1997), no. 11, pp. 2305–2312.
- [195] Haeberlé, O.: Focusing of light through a stratified medium: a practical approach for computing microscope point spread functions. Part I: Conventional microscopy, *Optics communications*, **216** (2003), nos. 1–3, pp. 55–63.
- [196] Hell, S. and Stelzer, E.H.: Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope, *JOSA A*, **9** (1992), no. 12, pp. 2159–2166.
- [197] Egner, A. and Hell, S.W.: Aberrations in confocal and multi-photon fluorescence microscopy induced by refractive index mismatch, *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer, 2006, pp. 404–413.
- [198] Wilson, T. and Sheppard, C.: *Theory and practice of scanning optical microscopy*, Academic Press London, 1984.
- [199] Aguet, F.: *Super-Resolution Fluorescence Microscopy Based on Physical Models*, (2009).
- [200] Zhang, B.; Zerubia, J. and Olivo-Marin, J.-C.: Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models, *Applied optics*, **46** (2007), no. 10, pp. 1819–1829.
- [201] Jaffiol, R.; Blancquaert, Y.; Delon, A. and Derouard, J.: Spatial fluorescence cross-correlation spectroscopy, *Applied Optics*, **45** (2006), no. 6, pp. 1225–1235.
- [202] Sheppard C. J. R. and Török P.: Effects of specimen refractive index on confocal imaging, *Journal of Microscopy*, **185** (2003), no. 3, pp. 366–374.

- [203] Gibson, S.F. and Lanni, F.: Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy, *JOSA A*, **9** (1992), no. 1, pp. 154–166.
- [204] Kogelnik, H. and Li, T.: Laser beams and resonators, *Applied optics*, **5** (1966), no. 10, pp. 1550–1567.
- [205] Boubaha, B.; Naidoo, D.; Godin, T.; Fromager, M.; Forbes, A. and Aït-Ameur, K.: Spatial properties of coaxial superposition of two coherent Gaussian beams, *Applied optics*, **52** (2013), no. 23, pp. 5766–5772.
- [206] Whiting, A.I.; Abouraddy, A.F.; Saleh, B.E.; Teich, M.C. and Fourkas, J.T.: Polarization-assisted transverse and axial optical superresolution, *Optics Express*, **11** (2003), no. 15, pp. 1714–1723.
- [207] Krichevsky, O. and Bonnet, G.: Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications, *Reports on Progress in Physics*, **65** (2002), no. 2, p. 251.
- [208] Ishii, K. and Tahara, T.: Correction of the afterpulsing effect in fluorescence correlation spectroscopy using time symmetry analysis, *Optics Express*, **23** (2015), no. 25, pp. 32387–32400.
- [209] Rüttinger, S.; Buschmann, V.; Krämer, B.; Erdmann, R.; Macdonald, R. and Koberling, F.: Comparison and accuracy of methods to determine the confocal volume for quantitative fluorescence correlation spectroscopy, *Journal of microscopy*, **232** (2008), no. 2, pp. 343–352.
- [210] Schwille, P.; Meyer-Almes, F.-J. and Rigler, R.: Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution, *Biophysical journal*, **72** (1997), no. 4, pp. 1878–1886.
- [211] Haustein, E. and Schwille, P.: Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy, *Methods*, **29** (2003), no. 2, pp. 153–166.
- [212] Widengren, J.; Mets, Ü. and Rigler, R.: Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy, *Chemical Physics*, **250** (1999), no. 2, pp. 171–186.
- [213] Masuda, A.; Ushida, K. and Okamoto, T.: New fluorescence correlation spectroscopy enabling direct observation of spatiotemporal dependence of diffusion constants as an evidence of anomalous transport in extracellular matrices, *Biophysical Journal*, **88** (2005), no. 5, pp. 3584–3591.
- [214] Wawrezynieck, L.; Lenne, P.-F.; Marguet, D. and Rigneault, H.: Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws: application to live cell membranes, *Biophotonics Micro- and Nano-Imaging*, conference ‘Biophotonics Micro- and Nano-Imaging’, International Society for Optics and Photonics, 2004, pp. 92–103.
- [215] Zhang, D.; Zhu, L.; Chen, J.; Wang, R.; Wang, P.; Ming, H.; Badugu, R.; Rosenfeld, M.; Zhan, Q. and Kuang, C.: Conversion of isotropic fluorescence into a long-range non-diverging beam, *Methods and applications in fluorescence*, **6** (2018), no. 2, p. 024003.
- [216] Durnin, J.: Exact solutions for nondiffracting beams. I. The scalar theory, *JOSA A*, **4** (1987), no. 4, pp. 651–654.
- [217] Durnin, J.; Miceli Jr, J.J. and Eberly, J.H.: Diffraction-free beams, *Physical review letters*, **58** (1987), no. 15, p. 1499.
- [218] Snoeyink, C. and Wereley, S.: Single-image far-field subdiffraction limit imaging with axicon, *Optics letters*, **38** (2013), no. 5, pp. 625–627.
- [219] Snoeyink, C.: Imaging performance of Bessel beam microscopy, *Optics letters*, **38** (2013), no. 14, pp. 2550–2553.
- [220] Doose, S.; Tsay, J.M.; Pinaud, F. and Weiss, S.: Comparison of photophysical and colloidal properties of biocompatible semiconductor nanocrystals using fluorescence correlation spectroscopy, *Analytical Chemistry*, **77** (2005), no. 7, pp. 2235–2242.

- [221] Roy, S.; Woolley, R.; MacCraith, B.D. and McDonagh, C.: Fluorescence lifetime analysis and fluorescence correlation spectroscopy elucidate the internal architecture of fluorescent silica nanoparticles, *Langmuir*, **26** (2010), no. 17, pp. 13741–13746.
- [222] Liedl, T.; Keller, S.; Simmel, F.C.; Rädler, J.O. and Parak, W.J.: Fluorescent Nanocrystals as Colloidal Probes in Complex Fluids Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Small*, **1** (2005), no. 10, pp. 997–1003.
- [223] Joshi, N.; Basak, S.; Kundu, S.; De, G.; Mukhopadhyay, A. and Chattopadhyay, K.: Attenuation of the Early Events of  $\alpha$ -Synuclein Aggregation: A Fluorescence Correlation Spectroscopy and Laser Scanning Microscopy Study in the Presence of Surface-Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles, *Langmuir*, **31** (2015), no. 4, pp. 1469–1478.
- [224] Nienhaus, G.U.; Maffre, P. and Nienhaus, K.: Chapter Four - Studying the Protein Corona on Nanoparticles by FCS, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2013, pp. 115–137.
- [225] Shang, L. and Nienhaus, G.U.: In Situ Characterization of Protein Adsorption onto Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Accounts of Chemical Research*, **50** (2017), no. 2, pp. 387–395.
- [226] Röcker, C.; Pötzl, M.; Zhang, F.; Parak, W.J. and Nienhaus, G.U.: A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles, *Nature Nanotechnology*, **4** (2009), no. 9, pp. 577–580.
- [227] Klapper, Y.; Maffre, P.; Shang, L.; Ekdahl, K.N.; Nilsson, B.; Hettler, S.; Dries, M.; Gerthsen, D. and Nienhaus, G.U.: Low affinity binding of plasma proteins to lipid-coated quantum dots as observed by in situ fluorescence correlation spectroscopy, *Nanoscale*, **7** (2015), no. 22, pp. 9980–9984.
- [228] Maffre, P.; Brandholt, S.; Nienhaus, K.; Shang, L.; Parak, W.J. and Nienhaus, G.U.: Effects of surface functionalization on the adsorption of human serum albumin onto nanoparticles – a fluorescence correlation spectroscopy study, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **5** (2014), pp. 2036–2047.
- [229] Pelaz, B.; del Pino, P.; Maffre, P.; Hartmann, R.; Gallego, M.; Rivera-Fernández, S.; de la Fuente, J.M.; Nienhaus, G.U. and Parak, W.J.: Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake, *ACS Nano*, **9** (2015), no. 7, pp. 6996–7008.
- [230] Wang, H.; Lin, Y.; Nienhaus, K. and Nienhaus, G.U.: The protein corona on nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **10** (2018), no. 4, p. e1500.
- [231] Maffre, P.; Nienhaus, K.; Amin, F.; Parak, W.J. and Nienhaus, G.U.: Characterization of protein adsorption onto FePt nanoparticles using dual-focus fluorescence correlation spectroscopy, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **2** (2011), pp. 374–383.
- [232] Murray, R.A.; Qiu, Y.; Chiodo, F.; Marradi, M.; Penadés, S. and Moya, S.E.: A Quantitative Study of the Intracellular Dynamics of Fluorescently Labelled Glyco-Gold Nanoparticles via Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Small*, **10** (2014), no. 13, pp. 2602–2610.
- [233] Tcherniak, A.; Dominguez-Medina, S.; Chang, W.-S.; Swanglap, P.; Slaughter, L.S.; Landes, C.F. and Link, S.: One-photon plasmon luminescence and its application to correlation spectroscopy as a probe for rotational and translational dynamics of gold nanorods, *The Journal of Physical Chemistry C*, **115** (2011), no. 32, pp. 15938–15949.
- [234] Tripathi, A.; Emmons, E.D.; Christesen, S.D.; Fountain III, A.W. and Guicheteau, J.A.: Kinetics and reaction mechanisms of thiophenol adsorption on gold studied by surface-enhanced Raman spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry C*, **117** (2013), no. 44, pp. 22834–22842.

## Résumé

La spectroscopie de corrélation est une méthode d'analyse des fluctuations de l'intensité d'un signal émis par les molécules ou particules d'intérêt à partir d'un volume de l'ordre de ( $\sim fL$ ). Ce volume est défini principalement par le faisceau laser d'excitation et le système optique de collection résultant de la microscopie confocale. La courbe de corrélation est directement liée au rayon hydrodynamique des molécules ou particules étudiées, à leur coefficient de diffusion et à leur concentration. Par conséquent, tout phénomène modifiant le comportement en nombre ou en temps de diffusion de ces molécules ou particules provoque un changement dans la dépendance temporelle des fluctuations d'intensité. Le travail de cette thèse concerne la réalisation d'une spectroscopie de corrélation, sa caractérisation dans le domaine spatial et spectral ainsi que sa mise en application. Les propriétés optiques de cette technique et ses performances en matière de résolution ont été révélées par des études numériques sous environnement Matlab et par des mesures expérimentales. En outre, les recherches menées sur les nanoparticules d'or ont démontré les potentialités de cet outil en nanotechnologie.

**Mots-clés :** Faisceau gaussien, interférences des faisceaux lasers, spectroscopie de corrélation, microscopie confocale, fonction d'étalement du point (PSF), volume effectif, effets réfractifs, les nanoparticules d'or.

## Abstract

Correlation spectroscopy is a method of analyzing fluctuations in the intensity of a signal emitted by molecules or particles under investigation from a volume of the order of ( $\sim fL$ ). This volume is defined mainly by a laser beam excitation and the collecting optical system resulting from confocal microscopy. The correlation curve is directly related to the hydrodynamic radius of the studied molecules or particles, to their diffusion coefficient, and to their concentration. Consequently, any phenomenon modifying the behavior in number or diffusion time of these molecules or particles causes a change in the temporal dependence of intensity fluctuations. This thesis deals with the realization of a correlation spectroscopy, its characterization in the spatial and spectral domain as well as its use. The optical properties of this technique and its resolution performance have been revealed by numerical studies under Matlab environment and by experimental measurements. In addition, research on gold nanoparticles has shown the potential of this tool in nanotechnology.

**Keywords:** Gaussian beam, laser beams interference, correlation spectroscopy, confocal microscopy, point spread function (PSF), effective volume, refractive effects, gold nanoparticles.