

**THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physique

(ED 389 - La Physique de la Particule à la Matière Condensée)

Préparée à l'INSTITUT LANGEVIN - ONDES ET IMAGES

Présentée par

Mickaël Busson

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Nano-Antennes Assemblées sur ADN et
Alimentées par un Émetteur Quantique Unique**

Soutenue le 28 janvier 2013

devant le jury composé de :

M.	BOUHELIER	Alexandre	Rapporteur
M.	VALLÉE	Renaud	Rapporteur
M.	VALLÉE	Fabrice	Président du jury
MME.	MAÎTRE	Agnès	Examineur
M.	BIDAULT	Sébastien	Examineur
M.	CARMINATI	Rémi	Directeur de thèse

Remerciements

Le travail décrit dans ce mémoire a été effectué à l'Institut Langevin. Il est l'aboutissement d'une recherche menée de concert avec de nombreuses personnes qui ont, chacun en fonction de leur compétence, participé à le mener à son terme. Il me sera difficile d'être exhaustif, et je présente d'avance mes excuses à ceux que j'aurais oubliés de citer. Qu'ils soient assurés de ma gratitude et de mon amitié.

Je remercie Rémi Carminati pour m'avoir accueilli et de m'avoir donné l'opportunité de vivre cette expérience enrichissante dans un cadre idéal de travail. J'ai apprécié son enthousiasme et son intérêt porté à mes résultats.

Le fruit des travaux présenté dans cette thèse est dû à la disponibilité, la qualité d'encadrement et aux conseils avisés de Sébastien Bidault que je remercie donc tout particulièrement et sincèrement. La pluridisciplinarité de ce sujet et de ses connaissances m'ont permis d'élargir mes compétences aussi bien en chimie qu'en optique et plus généralement m'ont permis de développer ma capacité à appréhender des systèmes complexes.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche : Alexandre Bouhelier et Renaud Vallée qui ont accepté d'en être les rapporteurs, Fabrice Vallée d'avoir présidé le jury de thèse et Agnès Maitre.

Cette étude a été essentiellement expérimentale. J'ai été amené à partager le dispositif avec une autre équipe. Toutefois ce qui aurait pu paraître comme une contrainte s'est révélé être un atout car cela m'a donné l'opportunité de travailler et de collaborer avec Valentina Krachmalnicoff, Etienne Castanié, et Yannick De Wilde qui sont de très bons expérimentateurs dotés de grandes qualités humaines et scientifiques. Ensemble, nous avons développé un système permettant d'aboutir aux mesures de temps de vie d'émetteurs uniques.

L'équipe s'est ensuite agrandie et enrichie, avec l'arrivée de Vincent et Laurent, deux nouveaux doctorants encadrés par Sébastien. J'ai une pensée toute particulière pour Laurent avec qui j'ai partagé à la fois de bons moments mais aussi mes appréhensions lors

de nos présentations en conférences, en milieu hostile tels qu'à San Francisco et à Hawaï.

La qualité de ces résultats n'aurait pas été aussi importante sans l'amicale collaboration et les calculs théoriques de Nicolas Bonod, Brice Rolly, Brian Stout et des mesures de FCS de Jérôme Wenger, de l'Institut Fresnel de Marseille. J'ai eu la chance également de collaborer avec d'autres personnes extérieures au laboratoire pour les mesures de microscopie électronique : Eric Larquet et Xiangzhen Xu.

Je tenais à profiter de cet espace d'expression pour témoigner ma gratitude à deux personnes qui ont énormément contribué à me donner l'énergie et la motivation nécessaires pour m'engager dans cette thèse en suscitant mon envie de découvrir cet univers. Il s'agit de Danièle Fournier et Jean Paul Roger.

Cette expérience enrichissante n'aurait pas été aussi réussie si je n'avais pas fait la rencontre de gens comme mes anciens collègues et maintenant amis Sarah, Salma, Virginie, Caroline et Karla.

J'ai eu la chance de partager mon bureau, toujours dans une bonne ambiance agréable et décontractée, avec Arthur " l'athlète ", Aniss " le geek ", Amaury " le râleur ", Daria " la spontanée ", Olivier " l'impartial ", Ariadna " la danseuse ", Nicolas " le discret " et, plus récemment, Kevin et Jérôme " les nouveaux "

Cette thèse fut en outre une formidable expérience humaine. L'Institut Langevin a la chance de compter parmi ses membres Emilie Benoit A La Guillaume toujours de bonne humeur et d'une impressionnante vivacité ; Anne Latrive, spécialiste en recherche gastronomique, et également toujours de bonne composition. Je souhaite mentionner Alex, Marc, Max, Michael, Léo, Hoa Vu, Olivier, Gilles et Aurélie de l'IPGP que je remercie pour nos conversations légères et sans prétentions. Je tiens à souligner l'efficacité des gestionnaires Lorainne, Christelle, Delphine.

Lors de ma première conférence internationale, je suis parti seul, dans un contexte particulièrement impressionnant à San Diego. Le " stress " de ma présentation fut estompé grâce à Sylvain Gigan que je remercie pour m'avoir accordé de son temps et de m'avoir fait profité de ses précieux conseils. Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance envers Vincent Poulard qui a réalisé l'image de couverture du manuscrit de thèse.

Je n'aurais évidemment pas eu l'occasion de vivre cette expérience sans le soutien inconditionnel de ma famille : mes parents qui se sont fait du " mauvais sang ", ma sœur Karen et mon frère Grégory qui. . . je suis incapable de faire une liste exhaustive de tout ce qu'ils ont fait pour moi, entre autre, au cours de la période de rédaction mon frère a relu et corrigé mon manuscrit. Toute ma famille ainsi que Laila et Stéphane se sont mobilisés pour préparer du " bon mangé " ce qui ne m'a pas épargné de perdre du poids et de ressembler à un " clochard " pour reprendre l'expression de mon neveu Ewan. Un grand merci à Sylvie sans qui je n'aurais jamais eu la possibilité de reprendre mes études et qui m'a énormément soutenu. Je tiens également à remercier mes oncles Jean-Pierre et Noï qui m'ont donné l'opportunité de m'évader en voyageant " et tout ci tout ça. . . "

Les nanostructures d'or peuvent être utilisées comme antennes optiques : elles se couplent à un émetteur ou récepteur de photons en champ proche et amplifient l'interaction de celui-ci avec le champ lointain. Nous montrons ici comment des dimères de nanoparticules d'or assemblés autour d'un brin d'ADN fonctionnent comme des antennes aux fréquences optiques, alimentées par un émetteur quantique unique.

L'électrophorèse permet d'isoler des nanoparticules de 36 nm de diamètre fonctionnalisées par un seul monobrin d'ADN de 30 ou 50 bases et, après hybridation de séquences complémentaires, de dimères de géométries contrôlées. Les fréquences de résonance de ces assemblages indiquent un décalage spectral vers le rouge pour des distances interparticules réduites ; en excellent accord avec des calculs théoriques corrélés à une étude topologique par microscopie électronique cryogénique.

En alimentant ces dimères par une unique molécule d'ATTO647N, nous produisons des sources de photons uniques dont les taux d'émission spontanée sont exaltés de deux ordres de grandeur par rapport à des fluorophores isolés. Les taux de désexcitation mesurés sur plusieurs centaines de molécules uniques (isolées et en présence d'une ou deux nanoparticules d'or) coïncident quantitativement avec les exaltations estimées en théorie de Mie. Des mesures d'ensemble par spectroscopie de corrélation de fluorescence indiquent également une exaltation de plus d'un ordre de grandeur des coefficients d'extinction molaire et un gain en signal de fluorescence pour les dimères les plus courts malgré une réduction notable du rendement quantique. En modifiant fondamentalement l'environnement électromagnétique local, ces nanostructures hybrides offrent une nouvelle voie d'ingénierie des propriétés photochimiques de systèmes moléculaires.

Mots-clés

Émission spontanée, plasmon, nano-antennes optiques, temps de vie de fluorescence, spectroscopie de corrélation de fluorescence, section efficace de diffusion, électrophorèse, microscopie confocale, microscopie en champ sombre, molécule unique, ADN

Summary

Gold nanostructures act as optical antennas : they couple efficiently in the near field to photon emitters in order to enhance their radiation the far field. A typical way to design nanoantennas is to couple the plasmonic modes of several nanoparticles positioned a few nanometers apart. We demonstrate here how gold nanoparticle dimers can be assembled around a DNA double-strand that features a single dye molecule.

Using electrophoresis, we purify 36 nm diameter gold particles preferentially linked to a single DNA single strand. Hybridization of complementary sequences drives the assembly of dimers with spacings ranging between 7 and 18 nm. Shortening the DNA linker induces a clear red shift of the plasmon resonance wavelength as observed in scattering spectroscopy. A statistical analysis of scattering spectra is performed over several dozens of groupings and correlated with cryo-electron microscopy images and theoretical calculations.

By adding a single molecule in the centre of the particle dimers, we observe accelerated single photon emission in time-correlated fluorescence measurements. Efficient coupling between the active photon source and the passive gold nanostructure enhances the spontaneous emission rate by up to two orders of magnitude. Ensemble measurements in fluorescence correlation spectroscopy also indicate a one order of magnitude enhancement of the molar extinction coefficient and an increase of the fluorescence count rates for the shortest dimers while the quantum yield is significantly reduced. Dye molecule driven gold particle dimers thus operate effectively as antennas for light.

Key-words

Spontaneous emission, plasmons, optical nanoantennas, fluorescence lifetimes, fluorescence correlation spectroscopy, scattering cross-section, electrophoresis, confocal microscopy, darkfield microscopy, single-molecule, DNA

Table des matières

Introduction	xi
1 Exaltation de l'interaction lumière-matière aux échelles nanométriques	1
1.1 Pourquoi associer émetteur quantique et antenne nanométrique?	2
1.1.1 Densité locale des modes électromagnétiques (LDOS)	3
1.1.2 Introduction aux nano-antennes	5
1.2 Éléments passifs d'une nano-antenne	7
1.2.1 Résonance plasmon de nanoparticules petites par rapport à la longueur d'onde	8
1.2.2 Résonance plasmon de nanoparticules quelconques : Théorie de Mie	10
1.2.3 Couplage plasmon dans des groupements de sphères	13
1.3 Partie active d'une nano-antenne	15
1.3.1 Principes de la luminescence	16
1.3.2 Influence d'une nano-antenne sur un émetteur fluorescent	17
1.4 Etat de l'art	20
1.4.1 Couplage émetteur-particule par AFM	20
1.4.2 Couplage par des systèmes lithographiés	21
1.4.3 Couplage par voie chimique	23
1.5 Méthode de fabrication sélectionnée pour cette thèse	25
1.6 Conclusion	28
2 Synthèse de dimères de particules d'or liées par ADN et caractérisation morphologique	29
2.1 Auto-assemblage de dimères	31
2.1.1 Conjugaison de nano-particules d'or à des simples brins d'ADN	31
2.1.2 Purification par électrophorèse : séparation de particules monofonctionnalisées	32
2.1.3 Contrôle du nombre de brins d'ADN pour des particules de diamètre > 30 nm	35

2.1.4	Formation des dimères	38
2.1.5	Méthodes	40
2.2	Caractérisation morphologique par microscopie électronique en transmission	43
2.2.1	Microscopie électronique en transmission (TEM "sec")	44
2.2.2	Microscopie électronique en transmission sur grilles fonctionnalisées	45
2.2.3	Microscopie électronique cryogénique en transmission (cryo-EM) . .	47
2.3	Estimation des distances inter-particules	50
2.3.1	Méthode d'évaluation des diamètres et des distances "centre à centre"	50
2.3.2	Calcul de la fonction de projection	52
2.3.3	Ajustement de la fonction de projection sur les données expérimentales	55
2.4	Conclusion	56
3	Spectroscopie de diffusion d'antennes uniques assemblées sur ADN	57
3.1	Méthodes	59
3.1.1	Préparation des échantillons en chambre micro-fluidique	59
3.1.2	Dispositif expérimental	60
3.2	Résultats	63
3.2.1	Mesures des spectres de résonance	63
3.2.2	Analyse statistique des spectres de diffusion et corrélation avec leur morphologie	64
3.2.3	Comparaison entre les mesures expérimentales et des distributions théoriques	67
3.3	Conclusion	69
4	Dimères de nanoparticules d'or alimentés par une molécule unique : exaltation du taux d'émission spontanée	71
4.1	Problématiques	73
4.1.1	Choix d'un émetteur fluorescent	75
4.1.2	Effet du ROXS sur la Stabilité du fluorophore	77
4.2	Méthodes expérimentales	79
4.2.1	Synthèse des échantillons	80
4.2.2	Préparation de la micro-chambre	81
4.2.3	Dispositif expérimental	81
4.3	Résultats expérimentaux	83
4.3.1	Mesure de molécules uniques et traitement des données	83
4.3.2	Analyse statistique de l'exaltation des taux d'émission spontanée . .	85
4.4	Analyse par la théorie de Mie généralisée des distributions de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$. . .	87
4.4.1	Distributions théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour une distribution isotrope des orientations moléculaires	88
4.4.2	Distributions théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour une variation nanométrique des distances émetteur-particules	90
4.4.3	Discussion sur les distributions de taux d'émission spontanée	91
4.5	Efficacité théorique et expérimentale des nanoantennes	92

4.5.1	Calculs théoriques de l'efficacité des nanostructures	92
4.5.2	Mesures expérimentales du signal de fluorescence	93
4.6	Source de photons uniques accélérés	94
4.6.1	Dispositif Hanbury-Brown & Twiss	94
4.6.2	Mesures des anti-coïncidences	95
4.7	Conclusions	96
5	Mesures d'ensemble des propriétés photophysiques de dimères de NP- sAu alimentés par une molécule unique	97
5.1	Introduction à la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)	98
5.1.1	Principes généraux	98
5.1.2	Analyse des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence . . .	99
5.1.3	Caractérisation des propriétés photophysiques moléculaires au voi- sinage de nano-antennes	103
5.2	Méthodes	105
5.2.1	Dispositif expérimental de FCS	105
5.2.2	Dispositif expérimental de TCSPC	106
5.3	Résultats expérimentaux	107
5.3.1	Estimation des temps de diffusion et du nombre d'émetteurs	107
5.3.2	Mesures des exaltations du taux d'émission total Γ	109
5.3.3	Détermination expérimentale des gains à l'excitation et à l'émission	110
5.3.4	Analyse spectrale de l'exaltation de fluorescence	112
5.4	Discussion	113
5.4.1	calculs théoriques de temps de vie de fluorescence	113
5.4.2	Perspectives	114
5.5	Conclusion	115
	Conclusion et Perspectives	117
	Références	121

Introduction

Le nanomètre est devenu une échelle incontournable en matière condensée, que ce soit dans la conception de circuits intégrés optimisés ou pour avancer dans la compréhension de la machinerie biologique. Toutefois, à ces dimensions, l'interaction entre la lumière et la matière devient très faible : les sections efficaces d'absorption ou d'émission de photons sont plus de six ordres de grandeur plus petites que la longueur d'onde au carré et la propagation de la lumière est à peine modifiée (faible diffusion ou déphasage induit). Il est donc difficile de sonder et d'analyser optiquement des nanostructures mais aussi de leur faire absorber, diffuser ou émettre efficacement de la lumière. Exalter les interactions lumière / matière aux échelles nanométriques semble donc primordial au développement de capteurs, de détecteurs, de sources de lumières mais aussi de cellules solaires plus compacts et efficaces.

Alors qu'un atome isolé interagit efficacement avec une onde optique de fréquence correspondant exactement à une transition électronique, des phénomènes d'élargissement homogènes et inhomogènes en matière condensée réduisent considérablement les sections efficaces d'absorption, d'émission et de diffusion de la matière condensée à température ambiante. Il faut donc imaginer une méthode capable d'exalter, sur une large gamme de fréquences, les propriétés optiques de nanostructures qui sont régies par la physique quantique.

En 1946, E. M. Purcell a montré, dans un article de quelques lignes, que les propriétés optiques d'un système quantique ne lui sont pas intrinsèques [1]. Il indique que le taux d'émission spontané d'un atome, placé dans un état électronique excité, est considérablement modifié lorsque que celui-ci est au sein d'une cavité optique résonante. Ainsi, l'exaltation du taux d'émission de l'émetteur dans un mode de la cavité, de facteur de qualité Q et de volume V_m , est proportionnelle à Q/V_m appelé facteur de Purcell. Ce couplage ne se produit que si la fréquence d'émission des photons est égale à la longueur d'onde de résonance de la cavité ; mais est alors extrêmement efficace [2]. Ce couplage fort ne peut être reproduit en matière condensée, avec des microcavités, qu'à de très faibles

températures où les émetteurs quantiques présentent des largeurs spectrales proches de leur valeur naturelle [3].

Indépendamment, la première expérience qui a démontré que l'émission spontanée d'un système quantique dépend de son environnement, à été réalisée par K. H. Drexhage dans les années 60 [4]. La variation de la distance entre l'émetteur quantique et un miroir d'argent modifie le temps de vie de luminescence d'ions lanthanides. Dans ce cas, le processus n'est pas spécifique à une fréquence mais les modifications du taux d'émission ne sont que d'une dizaine de pourcents. Un couplage efficace entre les états de la matière et du rayonnement peut toutefois être transposé à température ambiante. Pour cela, le résonateur dans lequel est placé l'émetteur doit avoir une largeur de résonance spectrale similaire à ce dernier. En terme de facteur de Purcell, cela implique un faible facteur de qualité Q . Par conséquent, pour obtenir une forte exaltation du taux d'émission, il est nécessaire de confiner le champ dans un petit volume V_m . Il nous faut donc concevoir des résonateurs large bande qui vont se coupler à des échelles sub-longueur d'onde avec l'émetteur et réémettre un rayonnement en champ lointain.

Dans le domaine des télécommunications, les antennes ont été initialement conçues pour envoyer des signaux à longue distance. En effet, ces dispositifs sont très utilisés en électronique pour obtenir un couplage efficace entre une onde propagative et une source électrique ou un détecteur de taille sub-lambda, sur une large gamme de fréquences. La partie passive de l'antenne est composée de structures fortement polarisables qui servent à amplifier la puissance rayonnée en champ lointain. Ces propriétés sont donc très proches de celles recherchées pour la lumière avec, en guise d'absorbeur ou d'émetteur de champ électromagnétique, un système quantique.

L'idée est donc apparue dans la littérature en 2005 de redimensionner les antennes aux fréquences optiques pour coupler un émetteur quantique avec le champ lointain en l'entourant de nanoparticules de métaux nobles polarisables [5]. La lumière oscillant un million de fois plus rapidement que les ondes radio, les antennes obtenues vont être typiquement 10^6 fois plus petites que les antennes RF. Les métaux parfaits n'existent pas aux fréquences optiques mais des nanoparticules de métaux nobles (Au, Cu, Ag) peuvent être utilisés à leur résonance plasmon comme objets fortement polarisables permettant de confiner le champ électromagnétique.

Les antennes optiques demandent alors une précision de fabrication inférieure à la dizaine de nanomètres. Les techniques avancées en nanosciences permettent d'atteindre cette résolution par le biais de nouveaux processus de fabrication "top-down" (faisceau d'ion focalisé et lithographie par faisceau d'électrons) [6, 7, 8] et par voie chimique, par l'utilisation des techniques "bottom-up" d'auto-assemblage [9, 10, 11].

Cependant, fabriquer de façon reproductible et à grande échelle des nanoantennes couplées avec un émetteur unique reste d'une grande complexité. En effet, une variation nanométrique de la position de l'émetteur par rapport à la structure polarisable engendre une forte variation de la densité locale d'état optique [12, 13, 14]. Le contrôle, à cette échelle, de la position entre un émetteur et une nanoparticule d'or est possible en utili-

sant un microscope à force atomique [13, 14]. A plus large échelle, la lithographie électronique a également permis de coupler efficacement des émetteurs avec des nanostructures métalliques pour obtenir une émission spontanée exaltée et/ou directionnelle. Mais la position relative des parties actives et passives de l'antenne est soit aléatoire [15], soit présente une incertitude de plusieurs dizaines de nanomètres [16, 17, 18, 19]. Les techniques d'auto-assemblage permettent une meilleure résolution dans le contrôle de la position de l'émetteur vis à vis d'une nanostructure d'or. En particulier, l'ADN synthétique permet de positionner, avec une précision nanométrique, une molécule unique à proximité d'une nanoparticule d'or qui, dans ce cas, éteint l'émission spontanée [20]. En effet, une nanoparticule d'or individuelle n'est pas une bonne antenne avec une faible section efficace de diffusion et un faible confinement du champ. Il est donc préférable d'utiliser un dimère de nanoparticules confinant le champ en son centre. Des tentatives d'études de dimères de particules de métaux nobles associés, grâce à l'ADN, à un émetteur quantique ont été décrites dans la littérature [21, 22]. Néanmoins, une faible pureté des échantillons n'a pas permis une analyse statistique non-ambiguë de ces nanostructures. Des dimères d'or auto-assemblés, présentant un nombre incontrôlé de molécules fluorescentes, ont toutefois pu être purifiés par des techniques biochimiques usuelles et influencer les propriétés d'émission spontanée [23].

Dans ce travail de thèse, je vais démontrer qu'il est possible d'utiliser l'assemblage dirigé par des brins d'ADN pour produire, de manière reproductible, des dimères d'or purifiés présentant une section efficace de diffusion élevée et, surtout, un unique émetteur quantique. Je prouverai en particulier que la position de l'émetteur est contrôlée au nanomètre près au centre des dimères, permettant des modifications du taux d'émission spontanée et de la section efficace d'absorption de plus d'un ordre de grandeur. Des facteurs de Purcell supérieurs à 100 seront mesurés dans ces nanoantennes, tout en conservant les propriétés d'émission de photons unique d'un système quantique individuel.

Ce manuscrit est construit en cinq chapitres : le premier est consacré aux aspects théoriques qui régissent les phénomènes physiques impliqués dans l'étude des nano-antennes. Nous verrons pourquoi contrôler de façon très précise la position de l'émetteur dans la structure passive est un atout nécessaire pour obtenir un couplage efficace. De plus, nous verrons quelles sont les techniques existantes pour coupler un émetteur fluorescent avec une structure métallique. Puis, nous présentons la méthode que nous utilisons pour la réalisation d'un tel système.

Nous détaillons, au cours du second chapitre, comment fabriquer des dimères de nanoparticules d'or auto-assemblés autour d'un unique brin d'ADN. La fabrication de nanoantennes nécessite un contrôle total de l'environnement chimique et, en particulier, de connaître le nombre de brins d'ADN greffés par particule pour positionner l'émetteur quantique. Puis, nous validons notre méthode d'auto-assemblage par la caractérisation morphologique des groupements en microscopie électronique à transmission dans des conditions cryogéniques (cryo-EM).

Le troisième chapitre est voué à la caractérisation des spectres de résonance de nanostructures uniques en fonction de la distance interparticules, par le biais d'un microscope

confocal à champ sombre. L'étude statistique des fréquences de résonance est comparée à des calculs par la théorie de Mie généralisée en prenant en compte les paramètres géométriques estimés en cryo-EM. Nous concluons ce chapitre sur l'influence de la flexibilité de l'ADN sur les réponses optiques des groupements de nanoparticules.

Une fois notre méthode de fabrication validée et les réponses optiques parfaitement caractérisées, nous présentons, dans le chapitre quatre, l'influence des dimères sur l'émission spontanée d'une molécule unique. Nous détaillons une analyse statistique de l'exaltation de taux d'émission en fonction de différentes géométries d'échantillon que nous comparons à des calculs théoriques. Cette analyse permet d'estimer la position exacte de l'émetteur dans la structure passive et de montrer quels sont les paramètres géométriques qui influencent le taux d'émission et le signal de fluorescence. Nous montrons également qu'un dimère d'or associé à une molécule individuelle est une source accélérée de photons uniques.

Après avoir analysé le fonctionnement des antennes par des mesures de molécules uniques, nous estimons, dans le chapitre cinq, les valeurs quantitatives moyennes de la section efficace d'absorption, du taux d'émission et du rendement quantique de dimères d'or alimentés par une molécule fluorescente. Nous combinons, pour cela, plusieurs méthodes de mesures comme la spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS) et les mesures de fluorescence corrélées en temps (TCSPC).

Exaltation de l'interaction lumière-matière aux échelles nanométriques

Table des matières

1.1 Pourquoi associer émetteur quantique et antenne nanométrique ?	2
1.1.1 Densité locale des modes électromagnétiques (LDOS)	3
1.1.2 Introduction aux nano-antennes	5
1.2 Éléments passifs d'une nano-antenne	7
1.2.1 Résonance plasmon de nanoparticules petites par rapport à la longueur d'onde	8
1.2.2 Résonance plasmon de nanoparticules quelconques : Théorie de Mie	10
1.2.3 Couplage plasmon dans des groupements de sphères	13
1.3 Partie active d'une nano-antenne	15
1.3.1 Principes de la luminescence	16
1.3.2 Influence d'une nano-antenne sur un émetteur fluorescent	17
1.4 Etat de l'art	20
1.4.1 Couplage émetteur-particule par AFM	20
1.4.2 Couplage par des systèmes lithographiés	21
1.4.3 Couplage par voie chimique	23
1.5 Méthode de fabrication sélectionnée pour cette thèse	25
1.6 Conclusion	28

Le but de mes travaux de thèse est de contrôler l'émission spontanée d'une source quantique de lumière en matière condensée, en structurant le champ électromagnétique environnant par le biais d'une architecture métallique.

Contrôler le couplage entre un émetteur quantique et une structure métallique, de façon efficace et précise, requière une connaissance exhaustive des phénomènes physiques impliqués. Ce chapitre est consacré à introduire les concepts fondamentaux qui régissent les modifications des propriétés photophysiques d'un émetteur fluorescent à proximité d'une structure plasmonique. Il est scindé en quatre parties : introduction au concept d'antenne optique pour exalter l'interaction lumière / matière ; descriptions des parties passives (nanostructure métallique) et active (émetteur quantique) d'une nano-antenne ; discussion autour des résultats emblématiques de la littérature sur ce thème.

1.1 Pourquoi associer émetteur quantique et antenne nanométrique ?

Dans ce paragraphe, nous allons expliquer pourquoi une antenne redimensionnée aux fréquences optiques peut être particulièrement intéressante pour coupler une source quantique avec le champ électromagnétique.

En modulant l'environnement d'un émetteur quantique, il est possible de contrôler ses propriétés optiques. Ceci découle directement de la règle d'or de Fermi : si nous considérons un système quantique à deux niveaux d'énergie, notés $|g\rangle$ pour l'état fondamental et $|e\rangle$ pour l'état excité, localisé à \mathbf{r}_0 , avec un moment dipolaire de transition noté \mathbf{P} faiblement couplé au champ électromagnétique ; le taux de transition de $|e\rangle$ à $|g\rangle$ est donné par :

$$\Gamma = \frac{\omega}{\varepsilon_0 \hbar} |\langle g | \mathbf{P} | e \rangle|^2 \rho_p(r_0, \omega) \quad (1.1)$$

Où ω est la fréquence de transition, et ρ_p définit la densité des états électromagnétiques en \mathbf{r}_0 , couramment appelée LDOS pour "Local Density Of States". En modifiant l'environnement de l'émetteur, il est possible de modifier la LDOS et donc la capacité du système quantique à émettre des photons. La modification du taux d'émission en fonction de l'environnement local a été mise en évidence expérimentalement pour la première fois par Drexhage en 1966. Cette expérience consiste à mesurer le temps de vie de fluorescence d'émetteurs quantiques à proximité d'un miroir d'argent en fonction de la distance

d émetteur-surface. Le résultat de la mesure est présenté sur la figure 1.1 [4].

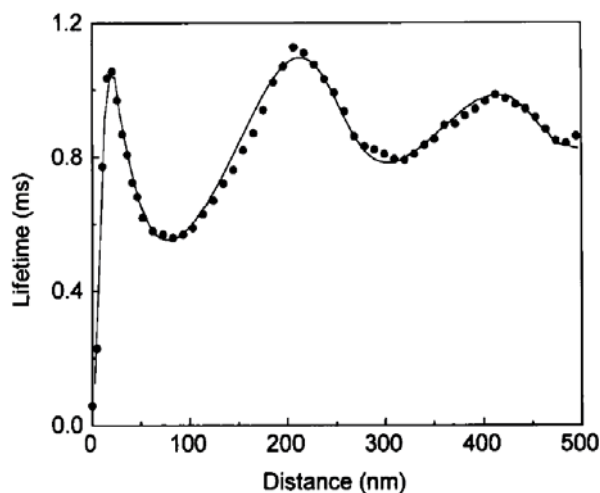


Figure 1.1 – Temps de vie de fluorescence des ions Eu^{3+} en fonction de la distance émetteurs-surface d (points). Calculs théoriques estimés par [24] (courbe continue noire). Image tirée de la référence [24].

Le taux d'émission Γ de l'émetteur quantique est défini comme $\Gamma = 1/\tau$, avec τ le temps de vie de l'état excité. D'après la figure 1.1 (tirée de l'article [24]), des oscillations du temps de vie sont constatées, ainsi qu'une brutale chute du temps de vie lorsque $d \rightarrow 0$. Après la publication de ces résultats, il a été possible d'expliquer quantitativement l'effet mesuré en analysant comment le champ rayonné par l'émetteur agit sur lui même [24].

1.1.1 Densité locale des modes électromagnétiques (LDOS)

Pour estimer la LDOS à la position d'un émetteur quantique, il faut analyser comment le champ rayonné, par celui-ci, l'influence après avoir interagit avec son environnement. Ceci peut être exprimé en fonction du tenseur de Green G [25, 26]. L'utilisation du formalisme de Green permet de relier un dipôle source au champ électrique qu'il génère en tout point de l'espace en régime monochromatique. La fonction de Green peut être introduite indifféremment pour un dipôle source quantique ou classique. La LDOS est alors définie de la façon suivante [26] :

$$\rho_p(r_0, \omega) = \frac{2\omega}{\pi c^2} [\mathbf{n}_p \cdot \text{Im}\{\mathbf{G}(r_0, r_0, \omega)\} \cdot \mathbf{n}_p] \quad (1.2)$$

où \mathbf{n}_p est le vecteur unité dans la direction du dipôle source \mathbf{P} .

Lorsque l'émetteur est dans le vide la LDOS est donnée par :

$$\rho_p = \frac{\omega^2}{\pi^2 c^3} \quad (1.3)$$

et le taux d'émission est :

$$\Gamma_0 = \frac{\omega^3 |\mathbf{P}|}{3\pi\hbar\epsilon_0 c^3} \quad (1.4)$$

La modification du taux d'amortissement par rapport au taux d'amortissement dans le vide Γ/Γ_0 , dépend donc uniquement du rapport des LDOS qui est une grandeur d'électrodynamique classique :

$$\frac{\Gamma}{\Gamma_0} = \frac{\rho_{\mathbf{p}}(\mathbf{r}_0, \omega)}{\rho_0(\omega)} \quad (1.5)$$

En accord avec les observations de Purcell en 1946, nous venons d'introduire que le taux d'émission n'est pas une propriété intrinsèque de l'émetteur [1]. Supposons qu'un émetteur soit placé dans une cavité optique (deux miroirs). Cette cavité est caractérisée par un certains nombres de modes optiques ρ_p . Lorsque la taille de la cavité est de l'ordre de la longueur d'onde d'émission de l'émetteur, l'intensité des modes est confinée au sein de la cavité.

Ainsi, Purcell considère un mode optique confiné dont la résonance correspond à l'énergie de transition d'un émetteur de l'état excité vers l'état fondamental. Dans ces conditions, Purcell prévoit une forte modification du taux d'émission comparée à un émetteur dans le vide Γ_0 . Le facteur de Purcell est alors défini par l'expression suivante :

$$F = \frac{\Gamma}{\Gamma_0} = \frac{3\lambda^3}{4\pi^2} \left(\frac{Q}{V_m} \right) \quad (1.6)$$

Une cavité résonante est caractérisée par son facteur de qualité Q et le volume du mode V_m de résonance. Lorsqu'un système quantique est en interaction avec les modes du champ électromagnétique, deux situations très différentes de couplage peuvent exister. Dans le cas où le couplage est faible (le champ optique est décrit comme un continuum de modes), on utilise la règle d'or de Fermi décrite ci-dessus et l'équation 1.6 peut être appliquée. Si, au contraire, la cavité présente de très faibles pertes optiques et des modes discrets, alors le photon émis par l'émetteur peut être réabsorbé après avoir été diffusé par son environnement local. Si le photon est absorbé puis réémis périodiquement (oscillations de Rabi), alors les niveaux électroniques du système quantique et les modes optiques de la cavité seront hybridés avec une levée de dégénérescence des fréquences de résonance. On parle de couplage fort [27].

L'interaction entre un émetteur quantique et une cavité résonante est un processus fondamental de l'électrodynamique quantique, en particulier avec des systèmes atomiques isolés [1, 28, 29]. Toutefois, reproduire ces processus en matière condensée est nettement plus complexe. Pourtant ils permettraient d'optimiser la capacité de la matière à émettre, absorber ou diffuser des photons. En matière condensée, l'émetteur interagit avec son environnement, ce qui entraîne un élargissement homogène de ses états électroniques. Il est

toutefois possible de minimiser ces effets à basse température pour obtenir un couplage fort entre un système quantique et une micro-cavité [3].

Mais pour pouvoir travailler à température ambiante, il faut utiliser un résonateur de largeur spectrale similaire à un émetteur fluorescent comme une boîte quantique semi-conductrice (QD), une molécule ou un cation métallique. Dans ce cas, la largeur homogène de l'émetteur en longueur d'onde est de plusieurs nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres. Dans le cadre de cette étude, nous ne nous intéresserons qu'à des cas de couplage faible entre l'émetteur et le champ électromagnétique à température ambiante. En terme de facteur de Purcell, ceci correspond à une très faible valeur de Q . Pour coupler efficacement l'émetteur quantique avec le champ électromagnétique, il va donc falloir confiner le champ pour avoir une valeur de V_m faible et compenser Q . Il faut alors imaginer des résonateurs qui vont se coupler à des échelles sub-longueur d'onde avec l'émetteur.

Les antennes radiofréquences permettent de coupler efficacement le champ électromagnétique avec une source ponctuelle en l'entourant de structures polarisables à des échelles sub- λ . De plus, elles peuvent fonctionner sur de larges gammes de fréquences. L'idée est donc apparue dans la littérature en 2005 de redimensionner les antennes aux fréquences optiques pour coupler un émetteur quantique avec le champ lointain en l'entourant de nanoparticules polarisables [5].

1.1.2 Introduction aux nano-antennes

De façon générale, on peut associer à une antenne le fait de convertir une onde propagative en énergie localisée pour se coupler efficacement à la matière à des échelles sub-longueurs d'onde [30]. Le principe général de la théorie des antennes optiques est illustré par la figure 1.2.

Contrairement aux micro-cavités, caractérisée par un spectre de résonance étroit, les antennes optiques vont pouvoir présenter des résonances large bandes compensées par des modes optiques confinés. Il serait alors possible d'exalter l'émission spontanée d'un émetteur quantique à température ambiante [31, 30].

Les antennes sont typiquement composées d'éléments passifs, fortement polarisables, alimentés par une source active, de taille petite par rapport à la longueur d'onde. La confection reproductible de nanostructures polarisables dans le domaine de l'optique nécessite des dimensions nanométriques qui n'ont été démontrées que récemment [6, 7, 8]. Aux fréquences optiques, la partie active de l'antenne sera également de taille nanométrique et régie par les lois de la physique quantique. Alors qu'en radiofréquences les antennes sont caractérisées par le gain en puissance émise par la source classique ; en optique, une nano-antenne alimentée par une source quantique va entraîner une variation du taux d'émission Γ . La différence de taille entre la partie active de l'antenne et la longueur d'onde implique une différence d'impédance en radiofréquences qui peut être redéfinie en optique pour une source quantique [31]. Comme la puissance dissipée par un dipôle classique est proportionnelle à la LDOS, le rapport des puissances dans une antenne et dans le vide est

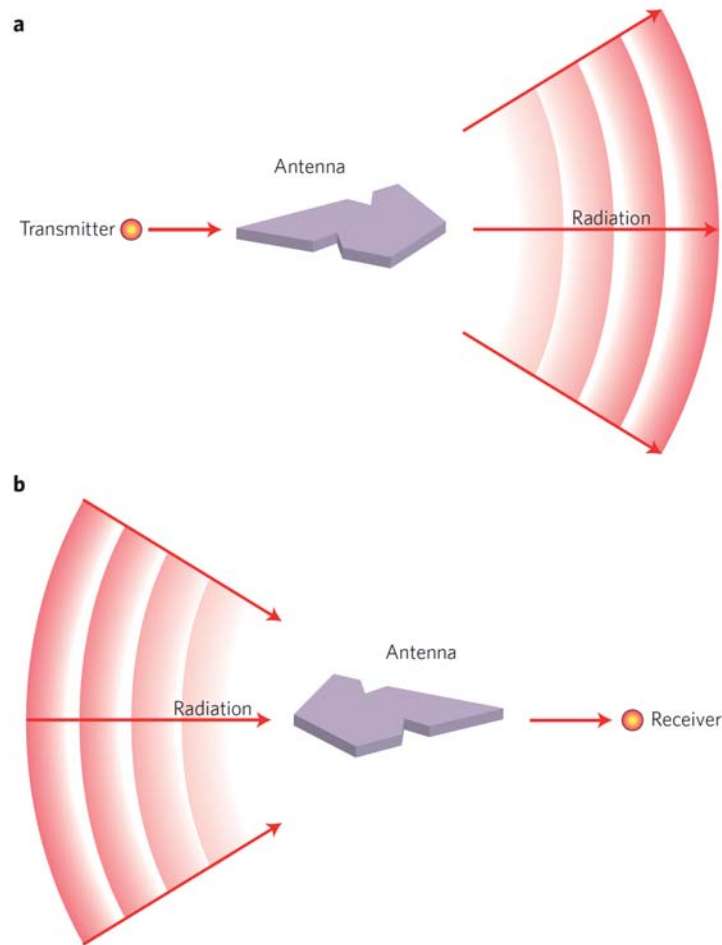


Figure 1.2 – Schéma de principe du concept d'antenne en émission (a) et en réception (b). tiré de l'article [30].

rigoureusement égal au rapport des taux d'émission d'une source quantique [32] :

$$\frac{\Gamma}{\Gamma_0} = \frac{P}{P_0} \quad (1.7)$$

où P_0 et P sont respectivement les puissances dissipées par un dipôle classique dans le vide et à proximité d'une antenne. Il est donc possible d'analyser une antenne par sa réponse classique pour estimer son influence sur un émetteur quantique.

La présence d'une antenne peut donc exalter les propriétés d'un système quantique servant d'émetteur ou de récepteur de lumière. Cependant, elles vont introduire des pertes non-radiatives dissipées sous forme de chaleur car il n'y a pas de métaux parfaits en optique. Dans le cas d'une antenne radiofréquence, on peut définir son efficacité comme le ratio entre la puissance rayonnée en champ lointain et la puissance totale émise par la source. En optique, on pourra également introduire une efficacité η comme le rapport entre le taux d'émission radiative Γ_R et le taux d'émission total Γ qui est la somme de l'émission non-radiative Γ_{NR} et de Γ_R [30].

Afin de se coupler efficacement avec un émetteur à température ambiante, la structure

passive doit répondre aux critères suivant : fortement polarisable, de taille sub-lambda (nanométrique) et de résonance large bande dans le visible. De plus, pour compenser le mauvais facteur de qualité associé à la largeur du spectre voulu pour se coupler à l'émetteur, le champ électromagnétique doit être fortement confiné. Nous verrons que les nanoparticules de métaux nobles (Ag, Au, Cu et Al) sont particulièrement adaptées pour remplir les exigences imposées pour le couplage à un émetteur à température ambiante.

1.2 Éléments passifs d'une nano-antenne

Dans ce paragraphe, nous allons expliquer pourquoi des nanoparticules de métaux nobles peuvent être utilisés comme éléments passifs d'une antenne optique. De manière générale, les nanostructures de métaux nobles peuvent se polariser sous une excitation optique grâce à leurs électrons de conduction qui répondent comme des électrons libres. La constante diélectrique d'un métal noble est alors généralement décrite par le modèle de Drude. Dans ce modèle, on traite classiquement la dynamique d'un électron à la position \mathbf{r} soumis au champ électrique oscillant à la fréquence ω :

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} + m\gamma \frac{d\mathbf{r}}{dt} = -eE \quad (1.8)$$

où m est la masse de l'électron et γ le coefficient d'amortissement qui est l'inverse du temps de collision des électrons sur les phonos et impuretés.

L'expression de la fonction diélectrique dans le modèle de Drude est définie de la façon suivante :

$$\epsilon_{Drude}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (1.9)$$

où ω_p est la fréquence plasma $\omega_p = \sqrt{ne^2/m_e\epsilon_0}$ (e est la charge d'un électron et m sa masse). En pratique, ce modèle n'est pas directement applicable car les métaux nobles présentent des transitions inter-bandes dans le proche UV, entre les bandes d (électrons de cœur) et la bande $s-p$ (électrons de conduction). Ces transitions sont d'ailleurs à l'origine des couleurs typiques du cuivre et de l'or. La présence de ces transitions électronique est généralement décrite par une constante diélectrique $\epsilon_\infty(\omega)$ de forme Lorentzienne. Il est alors possible de décrire correctement la constante diélectrique d'un métal noble avec un modèle de Drude-Lorentz :

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty(\omega) - \frac{\omega_p}{\omega(\omega + i\gamma)} \quad (1.10)$$

Pour des valeurs de ω inférieures à ω_p , la partie réelle de la constante diélectrique du métal peut être négative. C'est le contraste entre une constante diélectrique négative (pour les métaux nobles dans le visible) et une constante diélectrique positive (pour un

milieu diélectrique environnant) qui est à l'origine des propriétés optiques originales des nanostructures métalliques.

En particulier, il est possible de produire une oscillation des charges surfaciques du métal en les couplant de manière résonante avec la lumière. On parle dans ce cas de plasmon de surface délocalisé, également appelé plasmon-polariton de surface. Le terme "plasmon" est utilisé pour décrire une oscillation collective des électrons de conduction du métal. Ces plasmon-polaritons se caractérisent par une onde qui se propage le long de l'interface entre un métal noble et un diélectrique avec une décroissance exponentielle de l'intensité dans la direction normale à l'interface, caractéristique d'une onde évanescente [33].

Dans le cas d'un objet métallique de taille inférieure par rapport à la longueur d'onde de la lumière, il est également possible d'exciter une résonance plasmon. Le nuage électronique de la particule se polarise sous l'effet de l'excitation pour obtenir un système de charges oscillantes de taille sub-longueur d'onde. On parle alors de résonance plasmon localisée. Dans le paragraphe suivant, nous allons expliquer pourquoi cette interaction est résonante sur une large gamme de fréquences et pourquoi cela permet de concevoir la partie passive d'une antenne : c'est à dire des objets fortement polarisables permettant de confiner le champ électromagnétique à des échelles nanométriques.

1.2.1 Résonance plasmon de nanoparticules petites par rapport à la longueur d'onde

Pour des nano-particules métalliques, les plasmons de surfaces localisés apparaissent sous l'excitation d'une onde électromagnétique incidente. La fréquence de résonance de ces oscillations varie en fonction de la taille, de la forme, du type de métal, et de l'environnement diélectrique [34, 35, 36]. Pour comprendre l'origine des résonances plasmons dans les nanoparticules, nous allons considérer, dans un premier temps, une particule beaucoup plus petite que la longueur d'onde. Dans ce cas, le champ incident est homogène à l'échelle de l'objet et on peut considérer que la réponse du système sera proche de la réponse électrostatique (approximation quasi-statique).

Une particule sphérique homogène de rayon R , soumise à un champ statique (figure 1.3), va présenter un dipôle induit avec une polarisabilité scalaire de la forme :

$$\alpha_0(\omega) = 4\pi R^3 \frac{\epsilon_p(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon_p(\omega) + 2\epsilon_m} \quad (1.11)$$

où $\epsilon_p(\omega)$ et ϵ_m sont, respectivement, les constantes diélectriques de la particule et du milieu. Comme la partie réelle de ϵ_p peut être négative, la partie réelle du dénominateur de $\alpha_0(\omega)$ peut s'annuler : la polarisabilité diverge et on obtient une résonance plasmon. La longueur d'onde pour laquelle cette résonance apparaît dépend donc du métal ($\epsilon_p(\omega)$) et de l'environnement (ϵ_m) mais, dans l'approximation quasi-statique, elle est indépendante de la taille de la particule. La largeur de la résonance dépend du libre parcours moyen

des électrons dans le métal γ qui introduit des pertes d'énergie sous forme de chaleur.

Comme le dipôle induit dans la sphère oscille à la fréquence incidente ω , il peut rayonner en champ lointain. Toutefois, cette puissance rayonnée est nulle dans l'approximation quasi-statique car les effets retard sont négligés et le théorème optique (conservation de l'énergie) n'est plus vérifié. Ceci suppose que toutes les charges de la particule répondent simultanément au champ extérieur. En considérant $R \ll \lambda_{\text{inc}}$ où $\lambda_{\text{inc}} = 2\pi c/\omega$ est la longueur d'onde de l'onde incidente E_{inc} dans le vide, et en étudiant la réponse de la sphère en une position r bien supérieure à R , $r \gg R$, on peut approximer la réponse de la particule à un dipôle rayonnant induit avec une polarisabilité :

$$\alpha(\omega) = \frac{\alpha_0(\lambda)}{1 - i \frac{k^3}{6\pi} \alpha_0(\lambda)} \quad (1.12)$$

qui vérifie bien, dans le cas statique ($k \rightarrow 0$), $\alpha(\omega) = \alpha_0(\omega)$. On parle alors d'approximation dipolaire. Cette différence d'expression entre $\alpha(\omega)$ et $\alpha_0(\omega)$ est généralement nommée correction radiative. L'expression de la section efficace de diffusion est alors :

$$\sigma_{\text{diff}} = \frac{k^4}{6\pi} |\alpha(\omega)|^2 \quad (1.13)$$

Avec la correction radiative, la fréquence de résonance plasmon dépend de la taille de la particule avec un décalage spectral vers le rouge quand R augmente. Surtout, la largeur de la résonance dépend alors de deux contributions : le libre parcours moyen des électrons γ mais aussi les pertes par rayonnement. C'est pourquoi une particule métallique peut agir comme une antenne optique large bande : le faible facteur de qualité de sa résonance plasmon est en partie lié à des pertes radiatives. Le ratio entre les pertes par échauffement du métal (gênantes) et par rayonnement (souhaitées) sera un paramètre à optimiser dans la conception d'une nano-antenne.

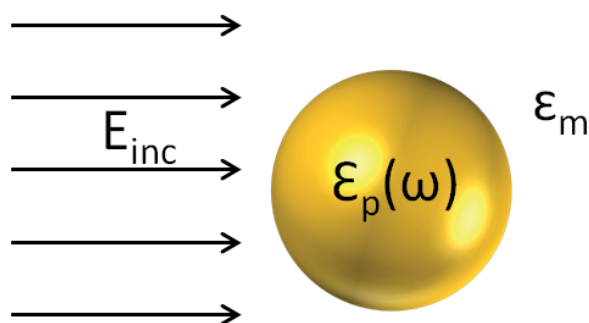


Figure 1.3 – particule sphérique de constante diélectrique ϵ_p dans un milieu homogène (ϵ_m) soumise à un champ électromagnétique.

Nous nous sommes focalisés sur le cas d'une particule sphérique mais l'approximation dipolaire peut être aisément généralisée à des particules non-sphériques comme représen-

tées sur la figure 1.4. En particulier, si on considère une particule ellipsoïde de volume V , l'expression de la polarisabilité quasi-statique vectorielle est donnée par :

$$\alpha_0(\omega)_i = V \frac{\epsilon_p(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon_m + L_i(\epsilon_p(\omega) - \epsilon_m)} \quad (1.14)$$

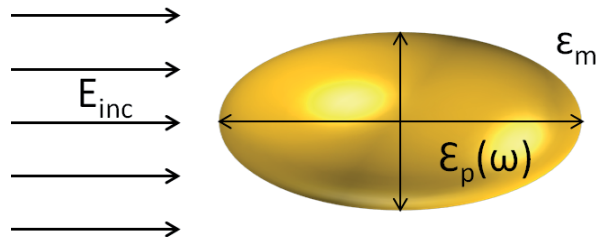


Figure 1.4 – particule elliptique longueur a pour le grand axe et b pour le petit axe, ϵ_p , ϵ_m sont respectivement les fonctions diélectriques de la particule et du milieu.

où L_i est un facteur géométrique dépendant de l'excentricité de l'ellipsoïde. La somme des L_i selon les trois axes de l'ellipsoïde vaut 1. Surtout, il est important d'observer que la polarisabilité est maintenant un vecteur présentant trois composantes qui vont diverger pour différentes valeurs de ω . Par conséquent, une particule non-sphérique peut présenter trois résonances différentes en fonction de la polarisation incidente. En introduisant la correction radiative décrite ci-dessus, il est possible de correctement décrire des particules de forme ellipsoïdale dans l'approximation dipolaire.

Il est intéressant de noter que la fréquence de résonance de la nanoparticule métallique peut donc être accordée, en jouant sur sa forme et sur le métal utilisé, à la longueur d'onde d'émission ou d'absorption d'un émetteur quantique.

1.2.2 Résonance plasmon de nanoparticules quelconques : Théorie de Mie

Jusqu'à présent, nous avons considéré une particule de taille inférieure à la longueur d'onde, ce qui nous a permis de traiter les propriétés optiques par une approximation dipolaire. Cependant, lorsque la taille de la particule devient plus grande, la phase du champ électromagnétique ne peut plus être considérée comme uniforme dans la particule. En effet, la distribution des charges ne décrit plus nécessairement un dipôle et des ordres plus élevés sont à prendre en compte. La résolution des équations de Maxwell pour une particule de taille et de forme quelconque est un problème complexe. Toutefois, elle est possible pour des particules sphériques en utilisant la théorie de Mie [37]. L'étude de particules sphériques permet de mettre en évidence tous les processus physiques sous-jacents à la conception d'une antenne optique. De plus, les particules utilisées dans cette thèse pourront, généralement, être approximées à des sphères.

La théorie de Mie est basée sur la résolution analytique des équations de Helmholtz en coordonnées sphériques. Cette théorie s'applique au cas particulier d'une sphère d'indice

quelconque n_p , en milieu homogène n_m , soumise à une onde plane incidente. Compte tenue de la symétrie sphérique du système, les champs \mathbf{E} et \mathbf{H} sont exprimés, en tout point de l'espace, sur une base d'harmoniques sphériques vectoriels en fonction de deux séries de paramètres a_n et b_n [37]. Les bases d'harmoniques sphériques vectoriels sont obtenues en combinant des harmoniques sphériques scalaires, décrivant la dépendance angulaire, et des fonctions de Riccotti-Bessel pour la dépendance radiale. Leurs expressions sont complexes mais les conditions aux limites des champs électromagnétiques, transverses et longitudinaux, à la surface de la sphère permettent d'exprimer simplement les paramètres a_l et b_l selon [37] :

$$\begin{aligned} a_l &= \frac{m\psi_n(mx)\psi'_n(x) - \psi_n(x)\psi'_n(mx)}{m\psi_n(mx)\xi'_n(x) - \xi_n(x)\psi'_n(mx)} \\ b_l &= \frac{\psi_n(mx)\psi'_n(x) - m\psi_n(x)\psi'_n(mx)}{\psi_n(mx)\xi'_n(x) - m\xi_n(x)\psi'_n(mx)} \end{aligned} \quad (1.15)$$

où x est un paramètre dimensionnel dépendant du rayon de la sphère R , des indices n_m et n_p , et de la longueur d'onde incidente λ selon $x = \frac{2\pi n_m R}{\lambda}$. x est un paramètre sans dimension et réel dans l'hypothèse où le milieu est supposé sans pertes. $m = n_p/n_m$ est le rapport des indices de réfraction entre la particule et son environnement. Les fonctions $\psi_n(x)$ et $\xi_n(x)$ sont définis à partir des fonctions de Bessel ($\mathbf{J}_n(x)$) et de Hankel ($\mathbf{H}_n(x)$) d'ordre n par $\psi_n(\rho) = \rho\mathbf{J}_n(\rho)$ et $\xi_n(\rho) = \rho\mathbf{H}_n(\rho)$.

La résolution analytique par la théorie de Mie fournit des solutions rigoureuses des réponses optiques de particules sphériques de taille quelconque. Elle permet surtout d'obtenir des expressions simples des sections efficaces d'extinction, de diffusion et d'absorption d'une particule sphérique [37] :

$$\begin{aligned} \sigma_{ext}^{np} &= \frac{\lambda^2}{2\pi n_m^2} \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1) \Re\{a_l + b_l\} \\ \sigma_{diff}^{np} &= \frac{\lambda^2}{2\pi n_m^2} \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1) (|a_l|^2 + |b_l|^2) \\ \sigma_{abs}^{np} &= \sigma_{ext}^{np} - \sigma_{diff}^{np} \end{aligned} \quad (1.16)$$

Ces équations permettent de mettre en évidence l'aspect multipolaire de la réponse optique d'une sphère de rayon similaire à la longueur d'onde. En se limitant à $l = 1$, on remonte à la réponse dipolaire de la sphère qui domine pour $R \ll \lambda$. La figure 1.5 illustre les calculs de la section efficace d'extinction d'une particule d'argent de 100 nm de diamètre. On observe deux pics de résonance dans les spectres d'extinction, de diffusion et d'absorption sur la figure 1.5-a. Le pic centré autour de 550nm correspond au mode dipolaire $l = 1$. Le deuxième pic autour de 430nm correspond à l'excitation d'un mode quadrupolaire $l = 2$. Les aspects dipolaires et quadrupolaires de ces deux modes peuvent être vérifiés en estimant le champ local à la surface de ces sphères par la Théorie de Mie

sur la figure 1.5-b. De tels calculs sont possibles car le champ électromagnétique peut être exprimé analytiquement en tout point en fonction des coefficients a_1 et b_1 et des harmoniques sphériques vectoriels.

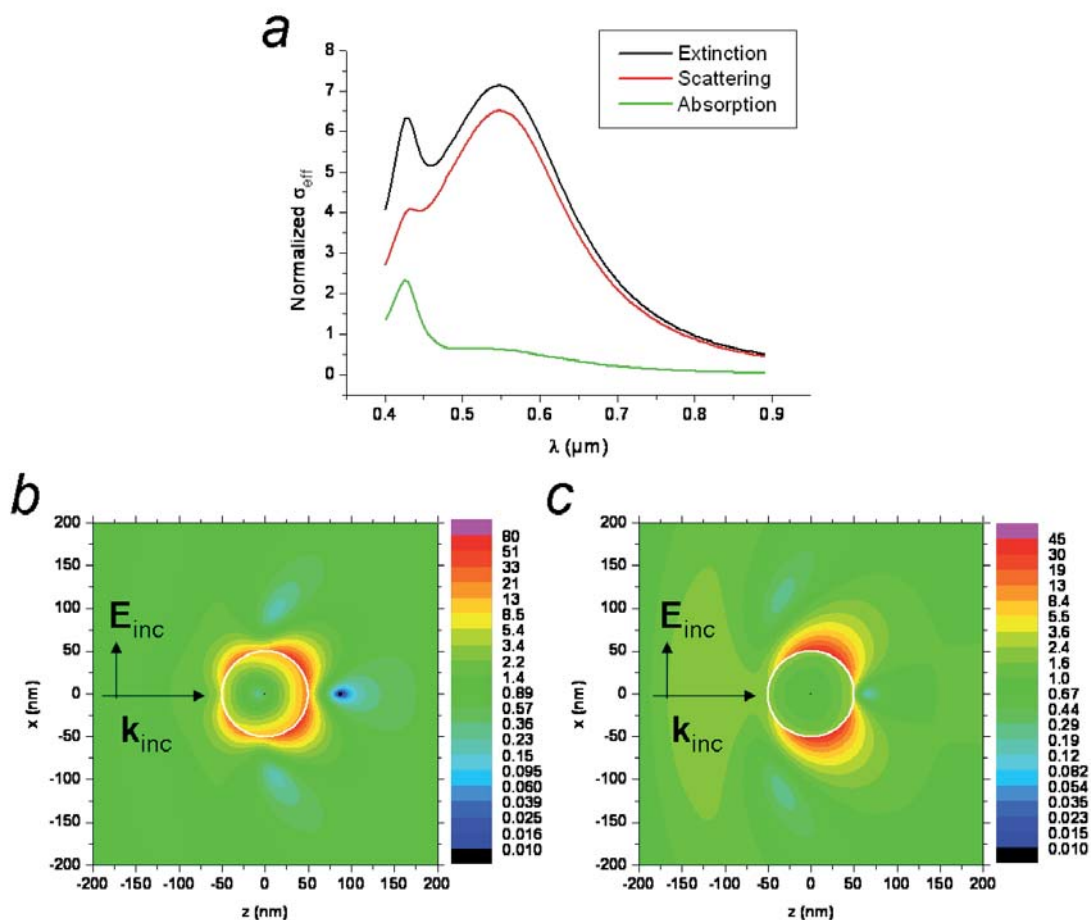


Figure 1.5 – (a) Calculs par la théorie de Mie des sections efficaces d'une particule sphérique d'argent de 100 nm de diamètre avec un indice diélectrique du milieu $n_m=1.5$ et de l'argent massif pour la particule. Cartes de la distribution de l'intensité calculées : longueur d'onde d'excitation $\lambda = 430 \text{ nm}$ (b), longueur d'onde d'excitation $\lambda = 550 \text{ nm}$ (c). Figure tirée de la thèse d'Alexis Devilez [127].

Les cartes d'intensité des figures 1.5-b et -c sont calculées à $\lambda = 430 \text{ nm}$ et $\lambda = 550 \text{ nm}$. L'image figure 1.5-c indique deux points de surintensité à la surface de la sphère d'argent : la sphère répond comme un dipôle parallèle à la polarisation incidente. Cette surintensité de plus d'un ordre de grandeur à la surface de la sphère est due au contraste d'indice entre l'argent et le diélectrique environnant : elle démontre que les particules de métaux nobles peuvent confiner le champ électromagnétique à des échelles nanométriques. La figure 1.5-b montre, au contraire, quatre points intenses distribués à la surface de la particule, typique d'une résonance quadrupolaire. Les surintensités de champ à 430 nm sont même supérieures à celles observées à 550 nm : un mode multipolaire peut donc confiner efficacement le champ à la surface d'une nanoparticule.

Toutefois, les sections efficaces de la figure 1.5-a démontrent le comportement radicalement différent des modes dipolaires et multipolaires. En effet, à 550 nm , la section efficace

d'extinction est dominée par la section efficace de diffusion : les pertes radiatives sont donc majoritaires. Au contraire, le pic à 430nm n'apparaît presque pas dans la section efficace de diffusion mais est très net dans la section efficace d'absorption. Ceci signifie que le quadripôle induit ne rayonne pas efficacement mais introduit des pertes ohmiques. La faiblesse du rayonnement quadrupolaire se retrouve dans le facteur de qualité plus élevé de la résonance à 430nm par rapport à 550nm . La résonance quadrupolaire d'une sphère métallique fournira donc une mauvaise antenne : faible gamme de fréquence avec pertes par absorption dominantes. Au contraire, une sphère excitée à son mode dipolaire est une antenne optique : elle confine localement le champ, présente une résonance large bande et rayonne efficacement.

Si une sphère unique peut agir comme l'élément passif d'une antenne optique, la majorité des systèmes radio-fréquences utilisent plusieurs objets polarisables. La raison est double : les dipôles induits peuvent interférer de manière constructive dans une direction de l'espace pour obtenir une réponse directionnelle ; le champ sera d'avantage confiné entre plusieurs sphères qu'à la surface d'une. Dans le paragraphe suivant, nous allons expliquer comment le couplage électromagnétique entre plusieurs nanoparticules métalliques peut être analysé qualitativement par une description dipolaire. Nous indiquerons les limites de ce modèle et introduirons une généralisation de la théorie de Mie permettant de résoudre les équations de Maxwell pour un système quelconque de sphères soumises à une excitation en champ lointain ou proche (source dipolaire ponctuelle).

1.2.3 Couplage plasmon dans des groupements de sphères

Comme expliqué précédemment pour une sphère dans l'approximation dipolaire, la polarisabilité est scalaire. Par conséquent, pour trois polarisations incidentes orthogonales, la fréquence de résonance plasmon ne change pas. Si on approche deux sphères présentant des dipôles induits, ceux-ci se couplent et de nouveaux modes doivent être définis. Dans l'approximation quasi-statique, ce phénomène de couplage est similaire à l'interaction des orbitales p d'un atome d'hydrogène, c'est pourquoi ce couplage plasmon pour les dipôles induits d'une sphère est généralement nommé "modèle d'hybridation" [38]. Le couplage des dipôles induits de deux sphères est représenté sur la figure 1.6.

Les six modes dipolaires initialement dégénérés se couplent en deux modes longitudinaux et quatre modes transverses deux fois dégénérés. L'évolution de la fréquence de résonance de ces modes dépend de l'interaction des dipôles induits. Ainsi, si un dipôle induit est orienté comme les lignes du champ électrique issu de second dipôle induit, alors le couplage est "coopératif" et la fréquence de résonance est décalée vers le rouge (basses énergies). Dans le cas contraire, l'interaction induit un décalage spectral vers le bleu (hautes énergies). Trois modes ont été entourés sur la figure 1.6 : ils correspondent à des modes couplés dipolaires. On les décrit généralement comme des modes brillants. Le mode longitudinal fournit une interaction plus forte entre les dipôles induit : il domi-

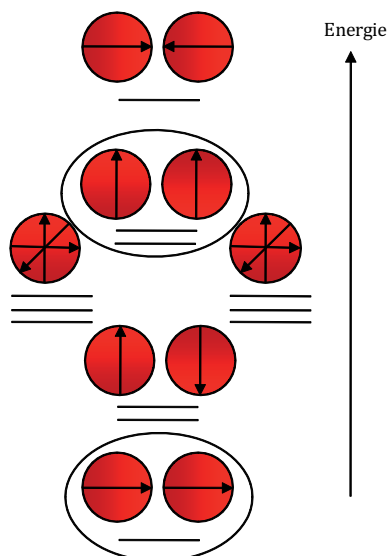


Figure 1.6 – Représentation schématique du couplage dipolaire entre deux sphères.

nera en général la réponse optique d'un dimère de particules et c'est lui qui sera utilisé pour l'élément passif d'une antenne optique. Les trois autres modes sont essentiellement quadrupolaires et ne se coupleront pas efficacement au champ lointain. On les dénomme souvent "modes sombres".

Ce raisonnement est quasi-statique et dipolaire. Il n'est donc valable que pour des particules très petites devant λ et pour des distances non-négligeables entre les sphères. Il ne peut donc être que qualitatif. Pour des petites particules très proches (distance bord à bord inférieure à leurs rayons), il faut considérer que le couplage va faire intervenir des modes d'ordres supérieurs (par exemple un dipôle induit dans une sphère se couplant au quadripôle induit dans l'autre). Par contre, le système couplé restant de dimension sub- λ , il est possible de considérer son couplage en champ lointain par une approximation dipolaire avec correction radiative.

Dans le cas où les particules deviennent de dimension semblable à la longueur d'onde, il est nécessaire de résoudre quantitativement les équations de Maxwell pour prendre en compte tous les processus multipolaires. Il est alors possible de résoudre analytiquement un groupement quelconque de sphères en milieu homogène en généralisant la Théorie de Mie. Cette généralisation passe par une expression des champs \mathbf{E} et \mathbf{H} en harmoniques sphériques vectoriels dans le référentiel de chaque sphère. L'expression des champs en tout point de l'espace passe alors par un changement de référentiel dans le référentiel du laboratoire. Les expressions mathématiques des harmoniques sphériques vectoriels, après changement de référentiel par translation et rotation, sont complexes mais restent analytiques. Il est alors possible de résoudre numériquement ce problème en regardant les conditions de continuité du champs électromagnétique à la surface des sphères et en se limitant à un ordre multipolaire l . Il faut alors vérifier que cet ordre a permis la convergence du calcul. Il sera alors possible d'obtenir les sections efficaces d'un ensemble de sphères et le champ électromagnétique en tout point de l'espace. Pour des groupements de particules de taille similaire à la longueur d'onde, les raisonnements issus du modèle d'hybridation peuvent ainsi être totalement inversés. En effet, le mode transverse décrit précédemment

comme sombre peut devenir brillant (section efficace de diffusion élevée) en prenant en compte les effets de phase dans le couplage entre les dipôles induits [39, 40].

La figure 1.7 présente le champ local entre deux sphères d'or de 40 nm dans un milieu d'indice $n_m = 1,5$, excitées avec une polarisation parallèle à l'axe du dimère à 685nm (mode longitudinal brillant) et avec une séparation bord à bord de 1 nm. On observe bien un très fort confinement du champ entre les sphères avec une exaltation de l'intensité incidente de près de 5 ordres de grandeur. La théorie de Mie généralisée permet donc d'étudier quantitativement les propriétés électromagnétiques d'un ensemble de sphères et de vérifier qu'un mode longitudinal dans un dimère doit fournir un élément passif efficace pour une nano-antenne.

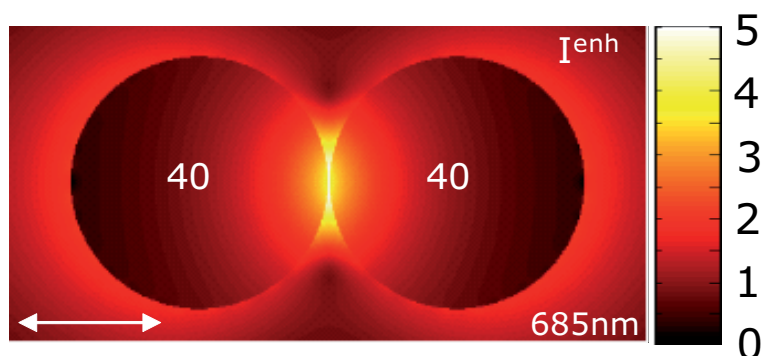


Figure 1.7 – Calculs par la théorie de Mie généralisée du champ électrique, entre deux sphères d'or de 40 nm dans un milieu d'indice $n_m = 1,5$, excitées avec une polarisation parallèle à l'axe du dimère à 685nm (mode longitudinal brillant) et avec une séparation "bord à bord" de 1 nm.

Comme expliqué en introduction de ce chapitre, le fonctionnement d'une antenne en émission peut être analysé en électrodynamique classique par la puissance totale émise par un dipôle source. La théorie de Mie généralisée permet d'étudier un ensemble de sphères soumis à une excitation locale. Pour remonter à la puissance totale ou rayonnée par le dipôle dans l'ensemble de sphère, il est plus aisé d'utiliser le formalisme de Green plutôt que d'exprimer directement les champs \mathbf{E} et \mathbf{H} en tout point de l'espace [41]. Nous allons voir dans le paragraphe suivant comment une nanostructure polarisable passive va influencer les propriétés photophysiques d'un émetteur quantique utilisé comme élément actif de l'antenne.

1.3 Partie active d'une nano-antenne

Dans ce paragraphe, nous allons, dans un premier temps, introduire les paramètres définissant l'absorption et l'émission d'un système quantique en matière condensée à température ambiante. Surtout, nous allons introduire comment ces propriétés vont être modulées en présence de nanostructures métalliques pour comprendre comment optimiser la structure de l'antenne optique. Ceci nous permettra, dans le paragraphe suivant, d'analyser les résultats marquants de la littérature et de définir notre cahier des charges pour conce-

voir de manière reproductible des nano-antennes alimentées par un émetteur quantique unique.

1.3.1 Principes de la luminescence

Un émetteur / récepteur quantique de photons est typiquement défini par sa capacité à absorber un photon pour passer dans un état excité (section efficace σ), sa rapidité à se désexciter (taux d'émission Γ) et son efficacité à émettre un photon plutôt que de perdre l'énergie sous forme de chaleur (rendement quantique ϕ). En matière condensée et à température ambiante, les niveaux électroniques de l'émetteur quantique sont couplés à des états vibrationnels (molécules organiques et organo-métalliques, nanoparticules luminescentes). Ces états sont quantifiés et peuvent être considérés comme étant des niveaux d'énergie supplémentaires au dessus de chaque niveaux électroniques. Le spectre d'absorption d'un émetteur à température ambiante est plus complexe à cause des énergies vibrationnelles (phonons) qui engendrent un élargissement des bandes d'absorption et d'émission. On utilise en général un diagramme de Jablonski pour décrire un émetteur quantique en matière condensé comme illustré sur la figure 1.8.

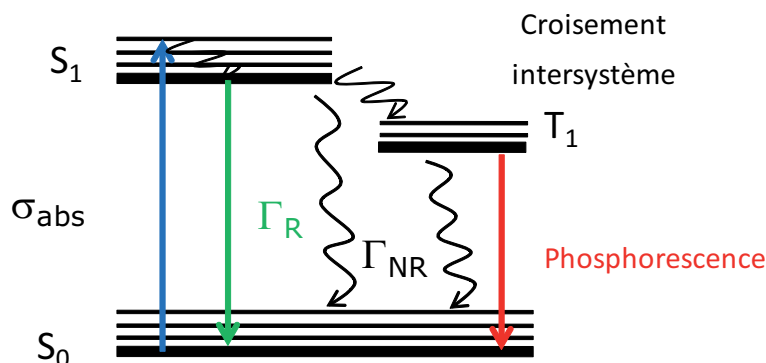


Figure 1.8 – Diagramme de Jablonski : représentation des niveaux électroniques fondamentaux

L'émission spontanée de photons est appelée fluorescence quand la transition suit un processus dipolaire électrique autorisé de spin. Dans ce cas le temps de décroissance (temps de vie de fluorescence) est de l'ordre de la nanoseconde à la picoseconde. Si la désexcitation ne peut pas se faire par un dipôle électrique (à cause de la symétrie des états fondamentaux et excités) ou si la transition n'est pas autorisée de spin, on parle de phosphorescence avec des temps de vie de la minute à la microseconde. L'énergie du photon est $E=h\nu = \frac{hc}{\lambda}$ avec h la constante de Planck, ν la fréquence, λ la longueur d'onde et c la vitesse de la lumière.

Nous considérons que l'émetteur est initialement dans son état fondamental S_0 . Lorsque un photon est absorbé, l'émetteur passe de l'état (supposé singulet) S_0 vers l'état excité S_1 . Cette transition instantanée est suivie par une relaxation rapide vers le niveau vibrationnel le plus faible de l'état excité $S_{1,\nu=0}$ (ν correspond aux numéros des niveaux vibrationnels). Pour un photon incident plus énergétique que l'état S_1 , l'émetteur peut être porté vers d'autres états excités S_n ($n > 1$). Le passage de l'état excité $S_{1,\nu=0}$ vers

l'état fondamental S_0 peut se faire soit en cédant l'énergie de façon radiative par émission de photons Γ_R , soit non-radiative Γ_{NR} en se couplant avec les phonons du système. L'émission de fluorescence se produit donc entre les états S_1 et S_0 avec un taux total $\Gamma = \Gamma_R + \Gamma_{NR} = 1/\tau$ où τ est le temps de vie de fluorescence. Si l'excitation se produit à l'instant $t = 0$ alors la probabilité $P_e(t)$ qu'il soit toujours dans l'état excité au temps quelconque t suit une loi mono-exponentielle décroissante de constante de temps τ . Compte tenu des états vibrationnels du système, le photon émis est décalé spectralement par rapport au photon absorbé. Cette différence d'énergie est appelée décalage de Stokes. Le ratio entre les taux de désexcitation radiative et non-radiative est le rendement quantique fluorescence, $\phi = \Gamma_R/(\Gamma_R + \Gamma_{NR})$.

On peut alors exprimer le signal de fluorescence émis par l'émetteur quantique comme le produit de la section efficace d'absorption σ par l'intensité incidente (probabilité d'atteindre l'état excité), le tout multiplié par le rendement quantique ϕ (probabilité de réémettre un photon). Ceci n'est toutefois vrai qu'en régime linéaire, quand le système quantique n'est pas saturé en excitation. Les processus de saturation seront discutés d'avantage dans le chapitre 5 de cette thèse. A saturation, le système quantique a une probabilité unitaire d'être dans l'état excité et le nombre de photons émis par seconde est simplement le taux radiatif Γ_R .

Il arrive cependant que l'état excité se désexcite en changement d'état de spin vers un état triplet T_1 , ce qui correspond à un "croisement inter-système". La transition $T_1 \rightarrow S_0$ étant interdite, l'émetteur reste dans ce niveau pendant une durée très longue devant la durée de vie de l'état excité S_1 . Le retour de $T_1 \rightarrow S_0$ a une probabilité de se réaliser par émission de photons (phosphorescence) ou par processus non radiatif. La présence de l'état T_1 est fondamental dans la photophysique d'un émetteur en matière condensée. En effet, cet état peut généralement interagir avec le dioxygène environnant qui est triplet dans son état fondamental. Cette interaction facilite la désexcitation non-radiative $T_1 \rightarrow S_0$ mais peut surtout entraîner une réaction chimique qui modifie les états électroniques de l'émetteur et détruit, en général, la fluorescence. On parle dans ce cas de photoblanchiment - processus courant avec des molécules à température ambiante - dont nous reparlerons dans les chapitres expérimentaux.

1.3.2 Influence d'une nano-antenne sur un émetteur fluorescent

Comme discuté au début de ce chapitre, la durée de vie de l'état excité n'est pas intrinsèque à la molécule et dépend fortement de l'environnement électromagnétique local. De plus, le couplage entre un émetteur et une structure métallique entraîne deux types d'émissions : radiatives qui fournit le signal de fluorescence ou non-radiatives qui sont liées aux pertes par dissipations thermiques. Le rendement quantique ϕ va donc être modifié en présence de la nano-antenne. Comme le champ d'excitation est localement exalté à la surface d'une nanoparticule métallique, la capacité d'un système quantique à absorber la lumière va également être décuplée. Finalement, si l'antenne est directionnelle, la collec-

tion de la lumière émise par la source quantique dans un système optique donné peut être modifiée.

Dans le cadre de cette thèse, nous n'allons étudier que des antennes de taille sub- λ pour lesquelles les effets de directivité sont négligeables. En effet, comme discuté en introduisant le couplage plasmon, un groupement de sphère petit par rapport à la longueur d'onde peut être approximé à un dipôle oscillant dont le rayonnement sera similaire à celui d'un émetteur quantique unique. De plus, les phénomènes d'exaltation de champ ont été décrits en introduisant la théorie de Mie.

Il nous reste donc à analyser l'évolution de Γ en présence de l'antenne, qui est similaire à l'augmentation de la puissance émise par un dipôle classique en traitant l'antenne en électrodynamique classique. C'est également vrai pour Γ_R en analysant la puissance rayonnée en champ lointain. La théorie de Mie généralisée va donc nous permettre d'analyser comment une sphère métallique va modifier Γ et ϕ .

L'augmentation de Γ_{NR} requière une grande attention car une antenne optique n'est intéressante que si elle permet d'émettre les photons en champ lointain. On définit donc l'efficacité de l'antenne η comme le ratio entre la puissance radiative et la puissance totale pour une source dipolaire classique ou le ratio entre Γ_R et Γ pour une source quantique. Le rendement quantique modifié ϕ dépend de Γ et Γ_R selon :

$$\phi = \frac{\Gamma_R}{\Gamma_R + \Gamma_{NR} + \Gamma_0(1 - \phi_0)/\phi_0} \quad (1.17)$$

où ϕ_0 et Γ_0 sont le rendement quantique et le taux de désexcitation de l'émetteur en absence de la nano-antenne.

Pour comprendre comment le couplage entre une sphère métallique et un dipôle source modifie Γ , nous reprenons, dans la figure 1.9, un calcul de la référence [12]. Les auteurs considèrent un émetteur dans un environnement diélectrique homogène d'indice 1.3, avec un rendement quantique intrinsèque de 1% dans le vide. La figure 1.9 présente des calculs théoriques de Γ_R et Γ_{NR} en fonction de la distance entre un dipôle source et une sphère d'argent de 60 nm de diamètre. Les calculs sont réalisés par théorie de Mie (nombre de multipôles = 60), avec une longueur d'onde d'émission correspondant au mode dipolaire de résonance plasmon de la sphère ($\lambda_{em} = 433nm$).

Nous observons sur la courbe 1.9-a une forte augmentation de Γ_R en se rapprochant de la surface de la sphère d'Ag. Cette augmentation est entièrement due au couplage de l'émetteur avec le mode dipolaire induit dans la nanoparticule qui rayonne efficacement en champ lointain. Par contre, l'évolution de Γ_{NR} avec la distance émetteur-particule est sensiblement différente. Tout d'abord, on observe que le taux non-radiatif augmente plus rapidement en se rapprochant de la nanoparticule et devient nettement supérieur à Γ_R . Surtout, le couplage au mode dipolaire n'explique pas l'évolution de Γ_{NR} . Celle-ci est, au contraire, due au couplage avec tous les modes multipolaires induits dans la sphère. Nous retrouvons donc l'argument introduit avec la théorie de Mie : le mode dipolaire va agir comme une antenne grâce à une section efficace de diffusion élevée. A l'inverse, les modes multipolaires contribuent, à courte distance, à l'extinction du signal de fluorescence par leurs fortes sections efficaces d'absorption. Ce sont ces processus qui sont à

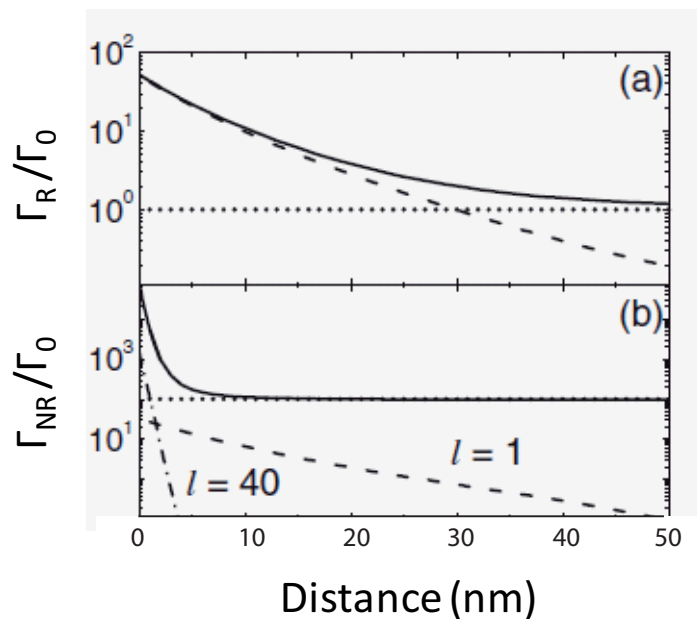


Figure 1.9 – Calculs théoriques du taux d'émission normalisé d'un dipôle à proximité d'une particule d'argent de 60 nm de diamètre, moyennés sur toutes les orientations du dipôle source : taux d'émission radiative Γ_R (a) et non-radiative Γ_{NR} (b) à proximité de la sphère (lignes continues noires) par rapport au cas dans le vide (pointillés noirs). Les lignes en tirets correspondent aux valeurs des taux d'émission en ne considérant que le mode dipolaire $n = 1$ et un mode multipolaire élevé $n = 40$. Ces calculs théoriques sont tirés de la référence [12].

l'origine de la diminution du rendement quantique de fluorescence d'émetteurs dans les nanostructures métalliques, généralement nommée "quenching" de l'émission spontanée. Il y aura donc un compromis à faire avec la distance émetteur-particule et avec la longueur d'onde d'émission pour se coupler préférentiellement à des modes dipolaires plutôt qu'à des modes multipolaires.

Il est également important de préciser que les calculs de la figure 1.9 sont moyennés sur toutes les orientations du dipôle source. En effet, l'orientation du couplage entre le dipôle source et le dipôle induit va également privilégier un rayonnement en champ lointain de l'antenne ou un échauffement de la sphère métallique. En approximation dipolaire, si le couplage est radial (dipôle source pointant vers la particule), le système couplé à très courte distance va agir comme un "super" dipôle et rayonner plus efficacement. Γ_R va augmenter. Au contraire, si le couplage est azimutal à très courte distance, le dipôle induit va être en opposition de phase avec le dipôle source et Γ_R va diminuer. Le mode dipolaire de la sphère est alors un mode sombre et le déphasage entre les dipôles source et induit peut entraîner de forts phénomènes d'émission directionnelle par interférences destructives [39].

Par conséquent, la conception d'une antenne optique alimentée par une source quantique va nécessiter de contrôler, à l'échelle nanométrique, la position de l'émetteur dans une nanostructure métallique. Cette précision est nécessaire pour maîtriser le couplage avec des modes d'ordres élevés qui entraînent un "quenching" important de la fluorescence. De plus, l'orientation du dipôle de transition de l'émetteur devra être prise en compte pour

estimer si l'augmentation de la densité de modes électromagnétiques est due à des pertes ohmiques ou radiatives. Finalement, il faudra de préférence utiliser un groupement de nanoparticules pour exploiter des modes dipolaires couplés (comme le mode longitudinal d'un dimère) qui confinent d'avantage le champ en excitation et présentent des sections efficaces de diffusion plus élevées.

1.4 Etat de l'art

Nous souhaitons fabriquer de façon reproductible des antennes optiques alimentées par un émetteur quantique. Dans ce paragraphe, nous allons discuter des exemples les plus emblématiques de la littérature pour mettre en perspective les méthodes de fabrication et d'analyse utilisées dans ce travail de thèse.

1.4.1 Couplage émetteur-particule par AFM

Les premières expériences de couplage d'une molécule fluorescente unique avec une sphère d'or ont été réalisées à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM, pour Atomic Force Microscopy) [13, 14]. Le principe de l'expérience est présenté sur la figure 1.10 (a). L'analyse des variations du signal de fluorescence et de Γ liées à la force de couplage entre une molécule seule et une NPAu, est illustrée sur la figure 1.10(b). Une nanoparticule d'or sphérique est fixée à l'apex de la pointe de l'AFM, ainsi, la distance entre la particule et l'émetteur est modifiée de façon contrôlée à une échelle nanométrique. Ces mesures confirment les calculs théoriques présentés sur la figure 1.9 : la distance entre une molécule fluorescente et la surface métallique entraîne soit une exaltation de l'émission de fluorescence soit, au contraire, une diminution complète (quenching) lorsque $Z \rightarrow 0$. De plus, la référence [14] montre que l'exaltation du signal de fluorescence est corrélée à une forte augmentation de Γ .

Une autre étude, parue dans Nature photonics [42], montre qu'il est également possible de contrôler le diagramme de rayonnement d'un émetteur. Ainsi, cette expérience met en évidence que le rayonnement angulaire de l'émission spontanée d'une molécule unique est modifié à l'aide d'une antenne de type monopole (ou dipôle demi-onde) par le biais d'un nano-bâtonnet en aluminium. L'émission angulaire du système couplé est gouvernée par le diagramme de rayonnement de l'antenne, quelle que soit l'orientation de la molécule.

Nous venons de voir qu'il est possible expérimentalement de mesurer l'interaction entre une nanoparticule métallique et un émetteur fluorescent unique. Ce couplage peut exalter le signal de fluorescence, le taux d'émission Γ et contrôler l'émission angulaire d'un émetteur. De plus, ces expériences confirment la nécessité fondamentale de contrôler la position de l'émetteur fluorescent au nanomètre près. Cependant, ces études présentent deux inconvénients majeurs :

- Les sphères d'or individuelles ne sont pas de bons éléments passifs d'une antenne car les modes dipolaires et multipolaires sont spectralement proches. Le couplage de plu-

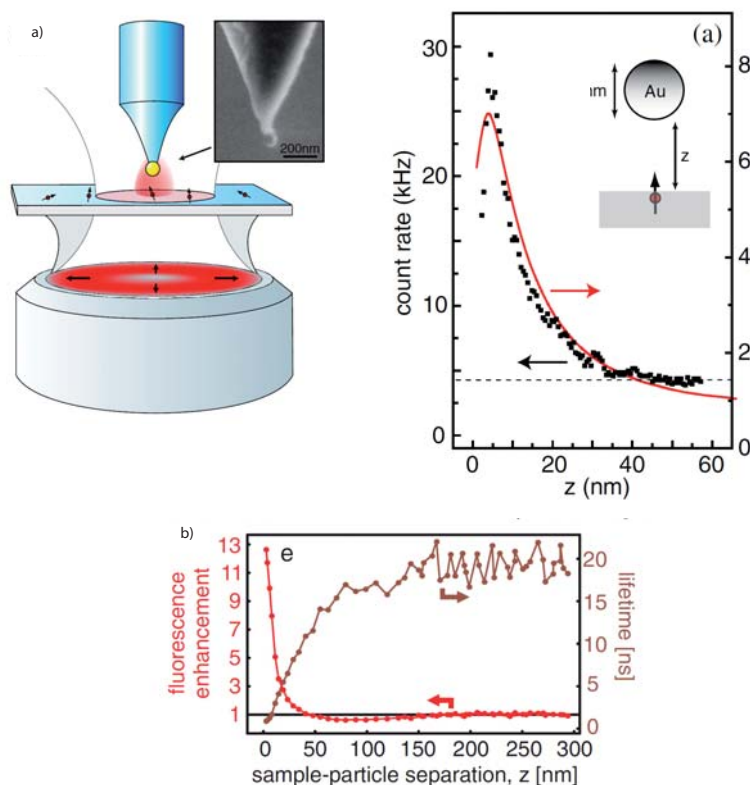


Figure 1.10 – Couplage de molécules uniques avec une NPAu à l'apex d'une pointe AFM : a) dispositif expérimental et signal de fluorescence en fonction de la distance molécule-particule, b) temps de vie de fluorescence corrélé aux mesures du signal de fluorescence en fonction de la distance inter-particule [13, 14].

sieurs sphères permet, au contraire, de décaler vers le rouge un mode dipolaire, favorisant l'émission radiative, par rapport aux modes multipolaires. De plus, une sphère à résonance plasmon offre un confinement de champ limité. En terme d'effet Purcell, pour obtenir une forte exaltation de Γ/Γ_0 , le champ électrique doit être confiné pour compenser le faible facteur de qualité de la résonance associé aux pertes radiatives et non-radiatives dans la particule métallique. De plus, un fort confinement de champ permet d'exalter la probabilité d'excitation en régime linéaire.

-Un microscope à force atomique ne permet d'obtenir un couplage émetteur-particule efficace que sur une expérience donnée et l'utilisation à grande échelle d'antennes optiques est alors impossible.

1.4.2 Couplage par des systèmes lithographiés

Ces deux défauts peuvent être palliés en fabriquant des nanostructures métalliques lithographiées (approche "top-down"). A l'aide de l'ingénierie plasmonique, les structures lithographiées sont intéressantes car, une fois optimisées, elles doivent fournir des antennes plus efficaces comparées à une particule sphérique seule, tout en étant fabriquées à grande échelle. Plusieurs exemples de structures plasmoniques lithographiées sont illustrées sur la figure 1.11.

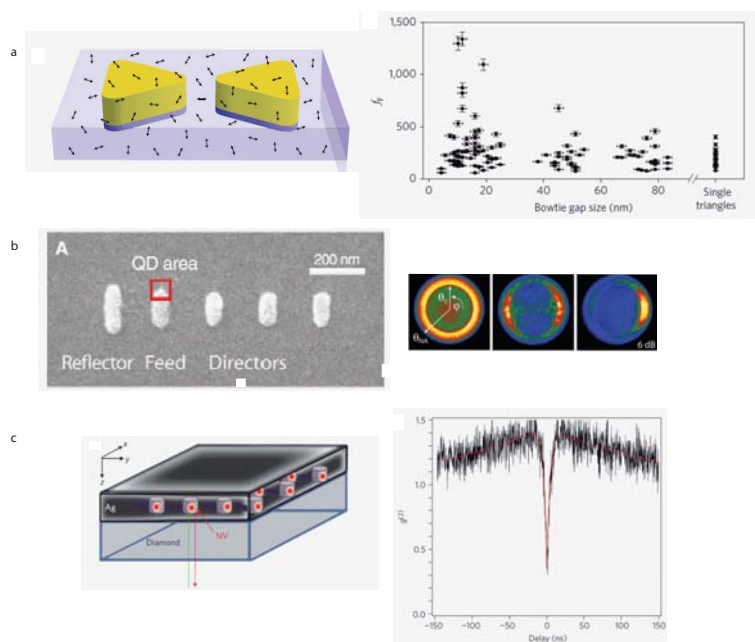


Figure 1.11 – Couplage de molécules par des structures plasmoniques lithographiées : a) Antenne bowtie et signal de fluorescence en fonction de la distance inter-particule [15], antenne de type Yagi-Uda couplée à une boîte quantique et diagramme de rayonnement [16], c) nano-ouverture d'argent couplée à un centre NV de diamant [15]

Le premier exemple concerne les études du groupe de W. E. Moerner [15]. Cette expérience est illustrée sur la figure 1.11(a). Ces travaux montrent l'exaltation de fluorescence par des dimères de nano-triangles (en forme de nœud papillon, "bow-tie") positionnés de telle sorte qu'ils aient un fort confinement et une importante intensité du champ entre les deux pointes des triangles pour une excitation polarisée dans l'axe du dimère. Cependant, les émetteurs fluorescents sont dispersés aléatoirement à la surface du substrat lithographié. Toutefois, quelques molécules se couplent efficacement à l'antenne lorsque celles-ci sont positionnées au centre ("hot spot") et orientées parallèlement au dimère. Ainsi, sous l'effet de la structure plasmonique, un important facteur d'exaltation de fluorescence est mesuré et une réduction du temps de vie de fluorescence. Dans cette étude, la structure plasmonique est très bien contrôlée, en revanche, la position et le nombre d'émetteur sont aléatoires.

Il est toutefois possible de contrôler la position d'un émetteur unique dans une structure lithographiée. Sur la figure figure 1.11 (b), une boîte quantique semi-conductrice (QD) est placée de façon contrôlée dans le champ proche d'une nano-antenne de type Yagi-Uda [16]. Cette géométrie, initialement utilisée en radio-fréquence, a été redimensionnée pour opérer dans le domaine des fréquences optiques. La figure 1.11 (b) illustre la structure lithographiée et la variation du diagramme de rayonnement de l'émetteur couplé. La fabrication de l'échantillon nécessite deux étapes de lithographie électronique et une technique de chimie de surface afin de positionner le QD. Le rayonnement de l'émetteur couplé à l'antenne est directionnel grâce à l'utilisation d'une première particule agissant comme un réflecteur et d'une série de nanostructures jouant le rôle de collecteur. Il est important de noter que la position du QD présente une incertitude de l'ordre de quelques dizaines de

nanomètres. Si cette incertitude n'est pas gênante pour contrôler le diagramme de rayonnement de l'antenne, elle empêchera une modification reproductible des taux d'émission. Un travail plus récent a démontré que les propriétés photophysiques des centres colorés NV du diamant (atome d'azote N associé à une lacune V) peuvent être modifiées en les couplant avec une nano-ouverture d'argent [17]. La figure 1.11-c est une représentation de l'échantillon lithographié et la statistique d'émission de photons d'un centre NV dans une nano-ouverture. Cette mesure d'anti-coïncidences montre que le centre NV reste une source de photons uniques en présence de la structure photonique. Deux inconvénients persistent dans cette étude : les variations de Γ/Γ_0 sont faibles (maximum de 6,6 : les nano-ouvertures ne sont pas de bonnes antennes) et surtout le centre NV a une position incertaine dans la nanoparticule de diamant qui fait plusieurs dizaines de nanomètres de diamètre.

Nous verrons dans la suite que des techniques par voie chimique (bottom up), permettent de résoudre le problème de contrôle de la position de l'émetteur observé en lithographie.

1.4.3 Couplage par voie chimique

Dans cette partie, nous introduisons quatre études de couplage d'émetteurs avec des particules métalliques fonctionnalisées par voie chimique.

La première étude, tirée de la référence [20], est illustrée sur la figure 1.12(a). Ce travail montre que l'utilisation d'ADN synthétique permet de placer une molécule fluorescente à proximité d'une NPAu de 15 nm de diamètre, avec une résolution nanométrique. Les brins d'ADN sont fonctionnalisés en bout de chaîne par un groupement chimique thiolé, afin de les accrocher à la surface de l'or. La molécule fluorescente est positionnée à l'autre bout du double brin d'ADN. L'utilisation de plusieurs longueurs de brins d'ADN permet de varier la distance entre l'émetteur et la particule d'or. Les mesures statistiques (figure 1.12 (a)) montrent des réductions du temps de vie de fluorescence corrélées aux brins d'ADN les plus courts. L'utilisation d'ADN synthétique a permis de placer une molécule unique à proximité de NPsAu de 15 nm de diamètre avec une résolution nanométrique. Néanmoins, les sphères d'or de cette taille "quenchent" l'émission de fluorescence à cause de leur section efficace de diffusion négligeable. De plus la procédure de fabrication ne permet pas de contrôler le nombre d'émetteurs par particule. Cependant, leur dispositif expérimental permet de trier optiquement les particules liées à une seule molécule fluorescente.

Pour favoriser l'émission radiative de l'émetteur fluorescent en présence d'une structure plasmonique, l'équipe de Joseph R. Lakowicz utilise des particules d'argent qui chauffent moins que les particules d'or [21]. Cette étude prétend analyser l'exaltation de l'émission de fluorescence d'une molécule unique de Cy5, à proximité d'une particule et au centre de dimères de sphères d'argent de 20 nm de diamètre. Les dimères sont liés par un brin d'ADN de 46 bases et l'émetteur est situé au centre. Les auteurs indiquent observer une exaltation de fluorescence d'un facteur $7\times$ sous l'influence d'une NPAu comparée aux molécules isolées, tandis qu'au centre du dimère, l'exaltation est d'un facteur 13. Le temps

de vie de fluorescence dans les deux géométries est évalué avec une réduction d'un facteur 4. Si les particules d'argent semblent intéressantes pour exalter le signal de fluorescence, les auteurs ne purifient pas leurs échantillons et ne prouvent jamais directement qu'ils mesurent leurs signaux de fluorescence en présence d'une particule ou au centre d'un dimère. En effet, le procédé de fabrication des dimères ne permet pas d'obtenir des échantillons homogènes : les auteurs estiment que 6 % à 7 % des particules étudiées dans un échantillon de "dimères" sont réellement des dimères liés par ADN. Or leurs études statistiques de molécules uniques n'indiquent aucunement une sous-population de dimères dans un échantillon ressemblant d'avantage à un système avec une particule unique. Il est plus probable que des effets d'agrégation dans les échantillons séchés, préparés pour les mesures optiques, leur permettent d'observer, par moment, de fortes exaltations du signal d'une molécule unique. La purification des échantillons et leur analyse morphologique apparaissent donc nécessaires pour s'assurer d'un couplage émetteur-particule reproductible.

Une étude, récemment publiée, a essayé de répondre à ce problème de purification avec des dimères assemblés par ADN autour d'une boîte quantique fluorescente (QD) [22]. Ce travail présente l'auto-assemblage de NPsAu sphériques de 80 nm de diamètre, fonctionnalisées par de l'ADN, autour d'une particule cœur-coquille de CdSe/ZnS. Pour lier les NPsAu aux QDs, ces dernières sont recouvertes de streptavidine et les brins d'ADN liés à l'or ont un groupement chimique thiolé d'un côté et une biotine de l'autre. Les auteurs indiquent obtenir des suspensions purifiées de dimères d'or grâce à l'électrophorèse. Toutefois, si l'obtention d'une suspension de dimères d'or avec des particules de 20 nm de diamètre est démontrée avec une analyse en microscopie électronique (TEM), les auteurs ne peuvent pas étudier les dimères de particules de 80 nm à cause de phénomènes d'agrégation en TEM. Des mesures d'ensemble et une mesure de QD unique démontrent des phénomènes d'exaltation de fluorescence et de taux d'émission mais les auteurs ne présentent pas d'étude statistique d'émetteurs uniques prouvant que les dimères de particules de 80 nm sont obtenus de manière reproductible. Si des dimères de particules d'or avec un émetteur au centre semblent une géométrie particulièrement intéressante pour former des antennes optiques, la purification et la caractérisation statistique des échantillons semblent primordiales.

Il est toutefois possible de purifier correctement des dimères de particules d'or associés à des molécules fluorescentes comme démontré dans des travaux de l'équipe de J. Feldmann [23]. Une suspension de dimères de NPsAu de 40 nm, liés par des protéines, est purifiée par électrophorèse et l'échantillon est caractérisé par TEM. Les particules sont couvertes de molécules fluorescentes qui interagissent avec le résonateur plasmonique (figure 1.12(c)). Les échantillons sont séchés sur un substrat pour les mesures optiques ultérieures : le séchage entraîne une grande variation de la distance inter-particules. Certaines molécules sont situées au centre du dimère, où le champ électromagnétique est le plus intense, mais la majorité est située hors du "hot spot". Le dispositif expérimental utilisé permet d'étudier simultanément les spectres de diffusion de résonance plasmon et l'émission de

fluorescence du même résonateur. Ainsi, ces mesures montrent comment la variation de la force de couplage plasmon modifie la forme des spectres de l'émission de fluorescence. Cette expérience expose une méthode de purification efficace des échantillons de dimères. En revanche, la procédure de fabrication ne permet de contrôler ni la position, ni le nombre d'émetteurs.

Nous avons vu dans ce paragraphe qu'il est possible d'introduire un émetteur fluorescent à proximité d'une particule métallique ou au centre de dimères par le biais d'un double brin d'ADN. De plus l'utilisation de groupement de particules permet de minimiser les pertes et favoriser l'émission radiative. La purification par gel d'électrophorèse semble une technique efficace pour obtenir des échantillons de dimères de grande pureté. Nous exposerons dans le paragraphe suivant la méthode de fabrication que nous avons sélectionnée.

1.5 Méthode de fabrication sélectionnée pour cette thèse

Nous venons de voir que l'avancement des nanosciences en plasmonique permet d'atteindre des résolutions nanométriques. En effet, par le biais de nouvelles techniques de fabrication "top-down" (lithographies optiques, électroniques ou par faisceaux d'ions) il est possible de fabriquer des structures plasmoniques performantes. Néanmoins, le positionnement d'un émetteur reste incertain. Les approches "bottom-up" d'auto-assemblage sont particulièrement adaptées (en particulier grâce à l'ADN synthétique) pour obtenir des distances de quelques nanomètres entre les nanoparticules et un émetteur à condition d'avoir une méthode de purification efficace. Cependant, l'exaltation de la fluorescence nécessite un groupement de plusieurs grandes sphères ($>$ à 30 nm de diamètre environ) couplées électromagnétiquement grâce à une distance inter-particule plus petite que le rayon des particules [43].

Pour cette thèse, nous avons choisi de fabriquer des dimères de particules d'or assemblés autour d'un brin d'ADN car c'est une molécule programmable, rigide, stable et aisément greffée à des surfaces d'or.

L'ADN est un polymère composé d'une succession d'acides désoxyribonucléiques appelées nucléotides. Les bases azotées sont attachées sur une ossature de phosphates via un sucre. On trouve quatre types de bases : Adénine (A), Thymine (T), Guanine (G) et Cytosine (C). Deux brins d'ADN de séquences complémentaires s'hybrident en respectant deux règles simples :

-L'Adénine (A) se lie à la Thymine (T) par deux liaisons hydrogène et la Guanine (G) se lie à la Cytosine (C) par trois liaisons hydrogène.

-L'hybridation se fait dans un sens donné. Les nucléotides comprennent chacun un pentose (sucre à 5 atomes de carbone) et les phosphates qui les relient sont liés à des côtés asymétriques du cycle. Les extrémités des brins sont appelées 5' et 3' en fonction de la position des liaisons phosphates sur les atomes de carbone du pentose. L'hybridation

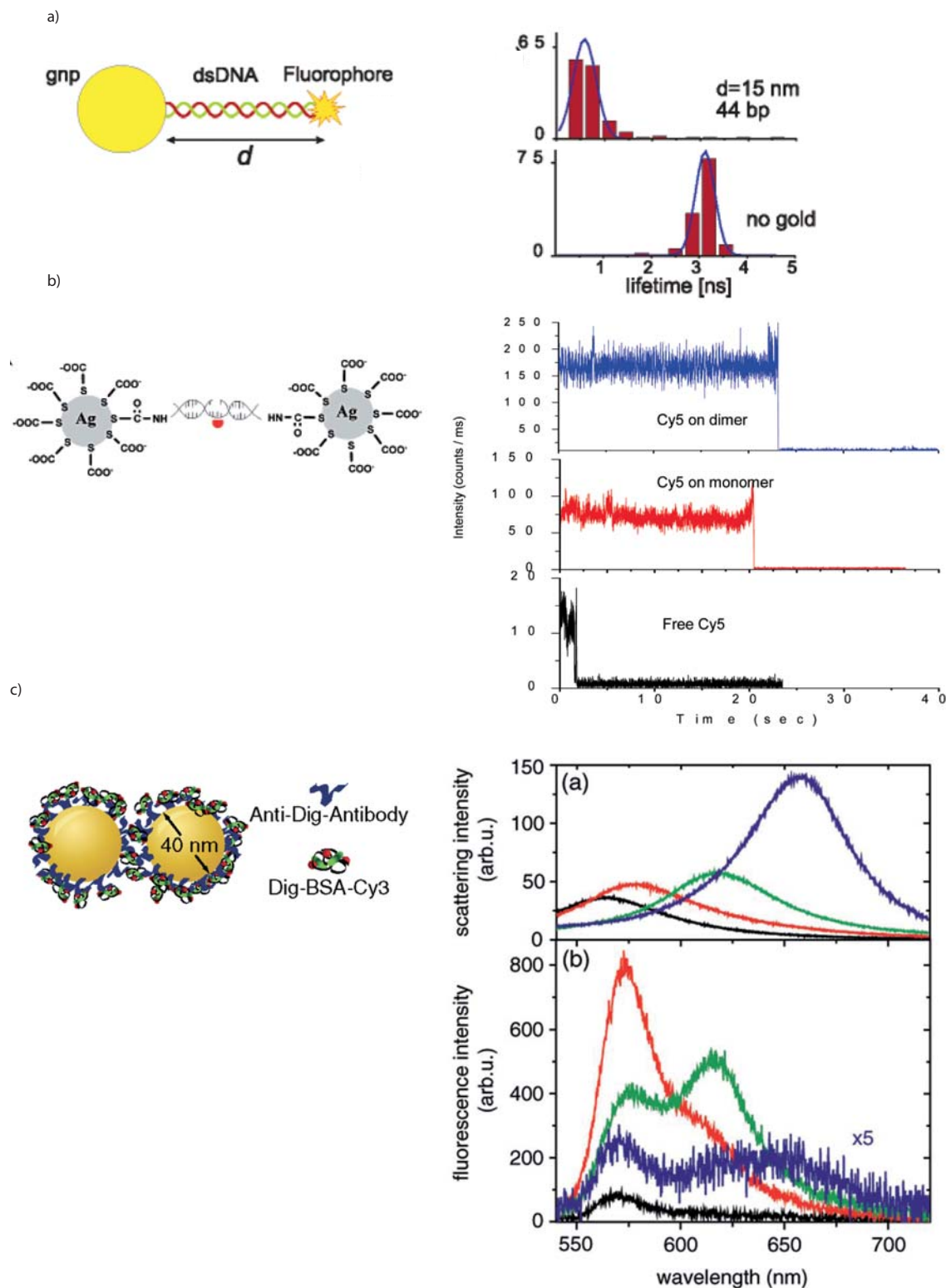


Figure 1.12 – Couplage par voie chimique : a) Molécule unique liée par un double brin d'ADN à une NPAu de 15 nm de diamètre, [20], b) mesures du signal de fluorescence de molécule dans des dimers d'argent de NPs de 20 nm de diamètre [21], c) mesures de la réponse spectrale de molécules à proximité de dimères de NPsAu de 40 nm de diamètre [23].

se fait de manière antiparallèle : l'extrémité 5' d'un brin est en contact avec l'extrémité 3' de l'autre et inversement.

Le double brin formé a une structure tridimensionnelle en double hélice de taille nanométrique comme le rappelle la figure 1.13. Si la largeur d'un brin d'ADN est d'environ 2 nm, sa longueur dépend linéairement de la taille de sa séquence : deux bases sont décalées d'environ 0,34 nm et il faut à peu près dix bases pour faire un tour de l'hélice. L'intérêt de l'ADN en nanosciences a été démontré en particulier dans les travaux de Ned Seeman [44]. La programmation de séquences d'ADN permet de produire, par simple mélange dans de l'eau salée, des nanostructures tridimensionnelles extrêmement complexes [44]. Récemment, de nombreux groupes se sont tournés vers des pliages ("origamis") 2D ou 3D d'ADN viral comme plate-formes d'assemblage de nanostructures [45, 11].

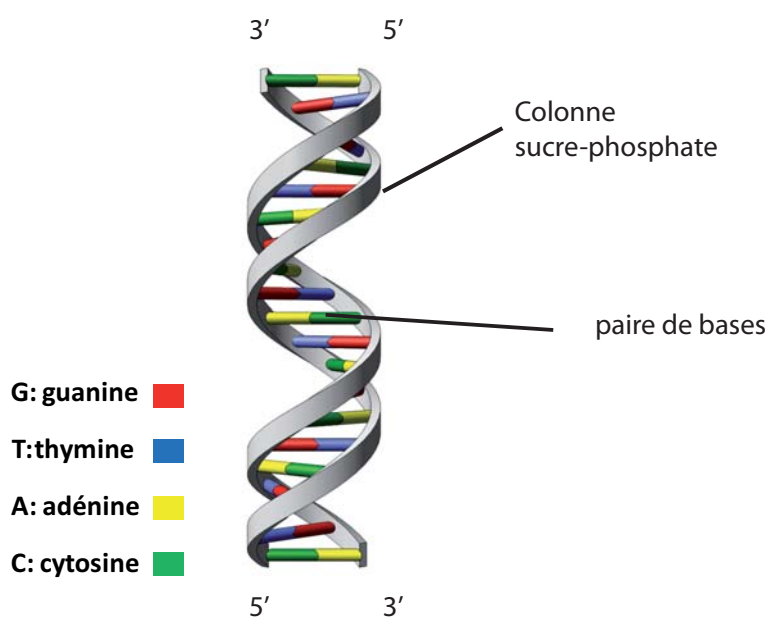


Figure 1.13 – Structure d'une double hélice d'ADN

Dans notre cas, l'ADN utilisé ne formera qu'une courte double hélice séparant les particules d'or. L'intérêt de l'ADN reste multiple :

- Sa rigidité est associée à une longueur de persistance d'une trentaine de nanomètres.

- On peut chimiquement modifier chaque base d'un brin pour associer des groupements réactifs (fonctions amines, biotines, thiols) et optiquement actifs (fluorophores) à des distances nanométriques : la synthèse de l'ADN se fait en greffant le premier nucléotide, coté 3', à un support solide puis en incorporant les bases suivantes une à une.

- Il est possible de ne greffer qu'un seul brin à la surface d'une particule d'or comme démontré par les travaux de l'équipe de A. P. Alivisatos [46]. Il est alors possible d'obtenir des suspensions pures de dimères dont l'environnement chimique est parfaitement maîtrisé [9], ce qui devrait nous permettre d'y inclure un émetteur quantique unique.

Toutefois, les groupements de NPsAu sur ADN n'ont été obtenus qu'avec des petites particules de sections efficaces de diffusion négligeables. Dans les chapitres expérimentaux

de ce travail, je vais démontrer comment, en adaptant l'assemblage sur ADN à des particules d'or de 40 nm de diamètre, il est possible de produire de manière extrêmement reproductible des nano-antennes alimentées par un émetteur quantique unique.

1.6 Conclusion

Les antennes optiques sont des systèmes particulièrement intéressants pour optimiser le couplage lumière / matière à des échelles nanométriques et se coupler efficacement à un émetteur quantique à température ambiante. Cependant, leurs performances dépendent de leur habilité à réémettre des photons. En approximant les particules par des dipôles induits il est possible de comprendre l'origine des résonances plasmoniques et leur intérêt dans la conception d'antennes. Par contre, la présence d'ordres multipolaires supérieurs doit être prise en compte pour estimer l'efficacité d'une antenne et son effet sur un émetteur quantique. C'est pourquoi mes travaux expérimentaux seront toujours comparés à des calculs obtenus par théorie de Mie généralisée pour ne négliger aucun effet, en particulier sur les pertes ohmiques dans les nanostructures d'or.

Cette introduction théorique a permis de mettre en évidence le besoin de contrôler la position de l'émetteur au sein de la structure plasmonique, pour favoriser l'émission radiative et le couplage avec un champ exalté en excitation. Nous allons montrer qu'il est possible d'introduire un émetteur unique à proximité d'une particule d'or ou au centre de dimères de NPsAu par le biais d'un double brin d'ADN. Cela permettra de modifier les propriétés photophysiques de l'émetteur : taux d'émission Γ , section efficace d'absorption σ et rendement quantique ϕ . Nous obtiendrons ainsi des sources quantiques de lumière accélérées.

Synthèse de dimères de particules d'or liées par ADN et caractérisation morphologique

Table des matières

2.1	Auto-assemblage de dimères	31
2.1.1	Conjugaison de nano-particules d'or à des simples brins d'ADN	31
2.1.2	Purification par électrophorèse : séparation de particules monofonctionnalisées	32
2.1.3	Contrôle du nombre de brins d'ADN pour des particules de diamètre > 30 nm	35
2.1.4	Formation des dimères	38
2.1.5	Méthodes	40
2.2	Caractérisation morphologique par microscopie électronique en transmission	43
2.2.1	Microscopie électronique en transmission (TEM "sec")	44
2.2.2	Microscopie électronique en transmission sur grilles fonctionnalisées	45
2.2.3	Microscopie électronique cryogénique en transmission (cryo-EM)	47
2.3	Estimation des distances inter-particules	50
2.3.1	Méthode d'évaluation des diamètres et des distances "centre à centre"	50
2.3.2	Calcul de la fonction de projection	52
2.3.3	Ajustement de la fonction de projection sur les données expérimentales	55
2.4	Conclusion	56

La fonctionnalisation de nano-particules d'or (NPsAu) avec des brins d'ADN est un outil puissant pour produire des assemblages dont les propriétés optiques dépendent de la distance entre les particules [47,48]. Cette caractéristique a permis la conception de capteurs biologiques [49,50], de règles moléculaires ("molecular rulers") [51,52] et l'exaltation de la diffusion Raman [53,54] ou de l'émission de fluorescence de molécules ou nanoparticules [23,55,22]. Pour toutes ces applications, il est nécessaire d'avoir un contrôle total de l'environnement chimique des nanostructures et, en particulier, de connaître le nombre de brins d'ADN greffés par particule. L'utilisation de l'électrophorèse sur gel d'agarose et, plus récemment, de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), permet la purification de NPsAu liées avec un nombre connu de simples brins d'ADN thiolés. La maîtrise de l'hybridation entraîne alors un assemblage bien défini de groupements de particules [9,56,57]. Cependant, la stabilité des suspensions colloïdales de particules d'or limite cette approche à des particules de diamètre inférieur à 20 nm [58]. Pour des particules de cette taille, la purification par électrophorèse avec un nombre connu de brins d'ADN greffés nécessite des longueurs de brins de 90 ou 100 bases [58,57]. Toutefois l'utilisation de nano-particules en imagerie et en spectroscopie exaltée requière des nano-structures avec des sections efficaces de diffusion et des couplages plasmoniques non négligeables. Pour remplir ces conditions, les particules doivent avoir une taille supérieure à 30 nm de diamètre [51,52] et, pour un couplage plasmonique efficace, la distance inter-particule doit être inférieure au rayon des sphères [59,60]; ce qui nécessite l'utilisation de courts brins d'ADN. Au cours de ces travaux de thèse nous avons développé une méthode pour contrôler le nombre de courts brins d'ADN greffés sur des particules de diamètre supérieur à 30 nm.

Nous décrivons dans ce chapitre une méthode efficace de purification de nanoparticules d'or (NPsAu) d'un diamètre de 30 nm et 40 nm greffées avec un nombre contrôlé de brins d'ADN de longueurs pouvant être inférieures à 10 nm pour obtenir des distances inter-particules adéquates. Ces dimères sont obtenus par l'hybridation d'une double hélice d'ADN formées par deux séquences parfaitement complémentaires (cDNA). Nous avons ainsi fabriqué des groupements de NPsAu asymétriques et symétriques dont nous caractérisons la morphologie par microscopie électronique cryogénique en transmission (cryo-EM).

2.1 Auto-assemblage de dimères

2.1.1 Conjugaison de nano-particules d'or à des simples brins d'ADN

Les premiers travaux sur l'assemblage contrôlé de nanoparticules d'or par ADN datent de 1996 dans les groupes de Mirkin et Alivisatos [47, 48]. Ils exploitent des propriétés connues de la chimie de surface de l'or ; en particulier la grande affinité de ce métal pour des molécules présentant des fonctions soufrées comme les thiols (SH). Il est ainsi possible d'obtenir des liaisons fortes entre la surface d'une nanoparticule d'or et des mono-brins d'ADN fonctionnalisés avec un thiol en position 5' terminale [47, 48].

La greffe d'un nombre contrôlé de brins d'ADN thiolés à la surface des NPsAu est possible en suivant différentes étapes d'échanges de ligands et de purifications électrophorétiques, décrites dans la littérature [61, 62]. Nous devons à la fois minimiser les interactions non spécifiques entre l'ADN chargé négativement et la surface du métal ; mais aussi optimiser la stabilité de la suspension colloïdale.

Deux techniques permettent de maintenir la stabilité d'une solution de colloïdes :

La stabilisation électrostatique : la répulsion électrostatique est un phénomène important pour la dispersion des NPs dans l'eau, et plus généralement dans tous solvants polaires. Elle résulte de la répulsion entre deux surfaces de même charge.

La stabilisation stérique : le second moyen de protéger les particules de l'agrégation est la répulsion stérique. Il s'agit d'ajouter une couche protectrice de polymères à la surface des nanoparticules, ce qui rend impossible le contact direct entre les surfaces des NPs.

Les nanoparticules d'or commerciales sont préalablement stabilisées par des ions citrates. Ces NPsAu sont stables sous forme de suspensions peu concentrées (9.10^{10} particules par mL pour une suspension commerciale de sphères de 40 nm de diamètre). Pour la fabrication de dimères, en particulier pour visualiser les particules pendant la chromatographie par électrophorèse, nous avons besoin d'une solution initiale de NPAu 100 fois plus concentrée. Pour garantir la stabilité des particules à cette concentration, la première étape consiste à substituer le citrate par du bis(p-sulfonatophenyl) phenylphosphine (BSPP). Les citrates sont des ligands labiles qui sont facilement suppléés par le BSPP car la liaison phosphine-or est thermodynamiquement plus stable.

La couche de phosphine ainsi formée autour des particules métalliques est chargée négativement. Les forces de répulsion entre les NPsAu permettent de maintenir la stabilité de la suspension colloïdale fortement concentrée, dans un milieu de faible force ionique. L'étape suivante consiste à greffer un brin d'ADN à la surface de l'or. Pour cela nous prenons un volume de cette solution de NPsAu concentrée que nous mélangeons avec des brins d'ADN. Comme les liaisons phosphine-or ont une enthalpie libre plus faible que la liaison or-soufre, nous utilisons des brins d'ADN fonctionnalisés en bout de chaîne par un groupement chimique thiolé. Cependant, pour greffer des brins d'ADN chargés négativement,

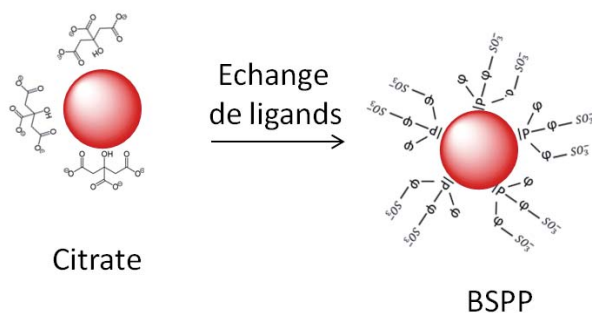


Figure 2.1 – Représentation schématique du premier échange de ligands. Les particules stabilisées avec du citrate sont passivées de bis(p-sulfonatophényl) phenylphosphine (BSPP) chargé négativement.

tivement aux NPsAu, également chargées négativement, nous devons modifier la salinité de la solution et écranter ces charges grâce à des cations Na^+ . La stabilité de la solution colloïdale pour des NPsAu de diamètre supérieur à 30 nm n'est toutefois optimale que pour des concentrations en NaCl inférieures à 50 mM. Nous avons réalisé qu'une force ionique intermédiaire, à 30 mM de NaCl, permet de greffer des brins d'ADN à la surface de l'or sans agrégation notable des particules.

Pour assurer la stabilité des NPsAu conjuguées, la surface du métal est ensuite passivée en ajoutant un excès de courts oligomères d'éthylène glycol (PEG, $n=6$) thiolés neutres. Ces courts oligomères peuvent présenter des groupements chimiques pour fonctionnaliser les NPsAu. En particulier, il est possible d'obtenir un groupement biotine terminal. Le PEG assure une stabilisation stérique de la suspension de particules, quand la force ionique est augmentée, nécessaire à l'hybridation de nanoparticules fonctionnalisées avec des séquences complémentaires d'ADN [61].

Pour minimiser le risque de détachement des brins d'ADN en présence de l'excès de molécules de PEG thiolé, les groupements chimiques des brins d'ADN, placés aux extrémités 5' ou 3', comportent trois fonctions thiols comme discuté dans plusieurs publications [61, 58, 63]. En effet, l'adsorption d'un thiol à la surface de l'or est thermodynamiquement stable mais cinétiquement instable : la liaison or-thiol est souvent décrite comme dynamique. Cette labilité est partiellement compensée en utilisant trois points d'"ancrage" des brins d'ADN à la surface de l'or.

2.1.2 Purification par électrophorèse : séparation de particules monofonctionnalisées

Le contrôle du nombre de courts brins d'ADN pour des particules supérieures à 20 nm, est une limite technologique qui n'a pas encore été franchie. La purification électrophorétique est une technique basée sur la différence de vitesse de diffusion, sous champ électrique statique, de biomolécules dans un gel aqueux. Pour une séparation efficace des particules greffées avec un nombre connu de brins d'ADN, les particules passivées doivent avoir une

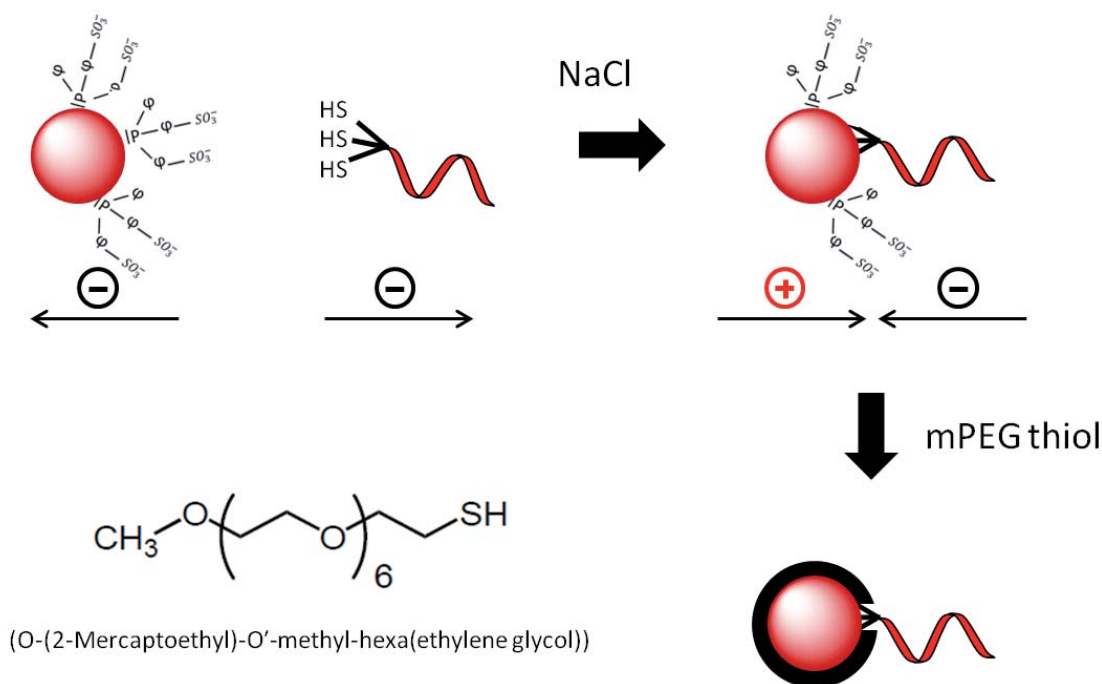


Figure 2.2 – La phosphine et le brin d'ADN sont chargés négativement. Les forces de répulsion induites ne permettent pas l'adsorption de ADN-or. Par écrantage des charges (Na^+), le brin d'ADN vient se greffer spécifiquement par liaison covalente à la surface de l'or. La phosphine qui entoure les particules est remplacée par un court oligomère neutre (Poly ethylene glycol) thiolé (PEG), pour augmenter la stabilité des groupements or-ADN.

différence de mobilité électrophorétique significative, liée à leur volume hydrodynamique et à leur charge. En pratique, les solutions que l'on souhaite purifier sont placées dans un gel formé d'agarose (polymère de sucre) et d'une solution tampon (dans notre cas du TBE : mélange de Tris, d'acide borique et d'EDTA). Une grande concentration d'agarose dans le gel réduit la taille des pores dans lesquels les objets peuvent migrer et leur vitesse de diffusion est diminuée. La concentration d'agarose est importante car elle détermine la taille des objets que l'on désire purifier. Les NPsAu sont chargées négativement, et donc, sous l'effet d'un champ électrique, elles migrent vers l'anode à travers les pores du gel de sucre.

La solution de colloïdes d'or inférieurs à 100 nm a une couleur rouge caractéristique de la résonance plasmon (530 nm). Contrairement à la purification électrophorétique de brins d'ADN, il n'est pas nécessaire d'utiliser des colorants pour visualiser le résultat final dans le gel d'agarose. La séparation des nano-structures est visible directement grâce à la couleur rouge de la solution colloïdale. Nous verrons dans la suite de ce chapitre des exemples de purification sur gel d'agarose, dans lesquels nous visualiserons nettement différentes bandes de couleur rouge distribuées verticalement entre la cathode et l'anode. Ces bandes indiquent la présence de particules fonctionnalisées ou de groupement de NPsAu que nous pouvons séparer par électrophorèse.

Par exemple, pour des particules d'or de 5 nm de diamètre, la formation de bandes séparées est possible en greffant des brins d'ADN d'une longueur de l'ordre de 50 bases

(17nm) [62]. La figure 2.3, tirée de l'article [57], illustre la purification de NPsAu de 5 nm, 8 nm et 18 nm liés à différentes longueurs de brins d'ADN. Les charges surfaciques des NPsAu étant négatives, elles migrent vers l'anode sous l'influence d'un champ électrique (la flèche noire indique la direction de diffusion vers l'anode). Les particules de 5 nm de diamètre ont été associées à des mono-brins de 50 bases (colonne 6). Comparativement à des particules nues (passivée par du BSPP, colonne 5) les bandes supplémentaires, faiblement séparées, indiquent le greffage d'un ou deux brins d'ADN. Dans le cas des particules de 18 nm, des brins d'ADN de 100 bases ont été utilisés (colonne 8). A nouveau, des bandes apparaissent par rapport aux particules ne comportant pas d'ADN thiolé (colonne 7). Le cas des NPsAu de 8 nm de diamètre est différent et démontre la flexibilité du greffage contrôlé d'ADN. Les colonnes 1 et 2 correspondent, respectivement, à des particules nues et à des particules d'or conjuguées avec un unique brin de 100 bases (complémentaire de celui utilisé avec les particules de 18 nm), préalablement purifiées par électrophorèse. Les colonnes 3 et 4 (identiques) démontrent qu'il est possible de greffer un unique brin de 50 bases sur une particule comportant déjà un brin de 100 bases, avec des séquences totalement décorrélées (dans ce cas la séquence de 50 bases est complémentaire de celle greffée sur les particules de 5 nm). L'hybridation de ces différents objets permet d'obtenir des trimères asymétriques de particules de 5 nm, 8 nm et 18 nm de diamètre [57].

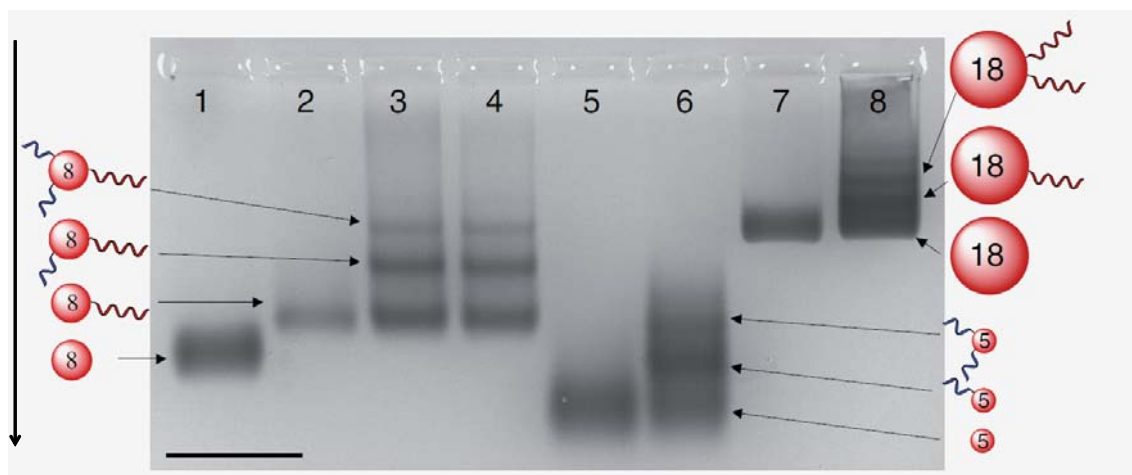


Figure 2.3 – Purification de particules de 5 nm de diamètre (colonnes 5 et 6) de 8 nm (colonnes 1-4) et de 18 nm de diamètre (colonnes 7, 8). Les colonnes 1, 5 et 7 sont des bandes de référence de particule simplement passivées de BSPP. La colonne 2 correspond à des particules liées à un unique brin de 100 bases. Les colonnes 3 et 4 montrent des NPsAu fonctionnalisées avec un brin de 100 bases et plusieurs brins de 50 bases. La colonne 6 illustre la purification de particules de 5 nm greffées avec un brin de 50 paires de bases. La colonne 8 caractérise la purification de particules de 18 nm fonctionnalisées avec un brin de 100 paires de bases.

Nous avons vu dans le chapitre d'introduction que la fabrication d'une nano-antenne nécessite de fortes sections efficaces de diffusion. Pour cela, les particules doivent avoir une taille supérieure à 30 nm de diamètre [51, 52], et la distance inter-particule doit être inférieure au rayon de la particule (pour obtenir un fort couplage plasmon), ce qui nécessite l'utilisation de courts brins d'ADN [59, 60]. Cependant, pour des NPsAu plus larges que 30 nm de diamètre, les brins d'ADN greffés devraient probablement présenter plusieurs

centaines de bases en longueur avant d'observer une différence significative de vitesses de diffusion dans le gel d'agarose.

La figure 2.4 montre le résultat final de la purification électrophorétique de particules d'or de 40 nm passivées de PEG méthylé et thiolé (colonne 1) et conjuguées avec des brins d'ADN trithiolés de 30 bases (colonne 2, après 12 heures d'incubation avec un excès de ($\times 33$) de brins d'ADN dans une solution de NaCl 30 mM).

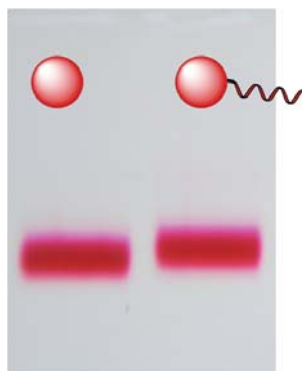


Figure 2.4 – Purification par électrophorèse de particules passivées de PEG (colonne 1) et fonctionnalisées d'un brin d'ADN trithiolé de 30 bases (colonne 2).

Nous pouvons constater que la colonne 2 ne présente pas de bandes avec des vitesses de diffusion distinctes. La seule bande visible est légèrement ralentie comparée à la colonne 1, ce qui indique une augmentation du volume hydrodynamique des particules lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec l'ADN. A ce stade, il est impossible d'estimer le nombre de brins greffés par particule. Pour pallier à ce problème, une solution consiste à augmenter la longueur effective de l'oligonucléotide trithiolé, afin d'augmenter, de façon significative, la différence de mobilité électrophorétique des particules une fois l'ADN greffé.

2.1.3 Contrôle du nombre de brins d'ADN pour des particules de diamètre > 30 nm

Afin de contourner la difficulté liée à une différence de mobilité électrophorétique insuffisante entre les objets à purifier, nous modifions la longueur effective du brin trithiolé. Pour contrôler le nombre de brins d'ADN greffés par particule, la séquence d'ADN trithiolée est hybridée avec de longs brins d'ADN de 100 bases, avant d'ajouter les NPsAu. En pratique l'ADN trithiolé est hybridé sur 15 bases avec un premier long brin de 100 bases (L1), lequel peut être allongé en ajoutant une autre longue séquence d'ADN de 100 bases (L2) également hybridée sur 15 bases, comme représenté schématiquement sur la figure 2.5. On peut ainsi augmenter la longueur effective du brin trithiolé en ajoutant des séquences de 100 bases (L1-L8) en fonction de la taille de la NP à purifier (le protocole est détaillé dans le paragraphe méthodes).

Nous concevons toutes les séquences d'ADN afin de s'assurer que l'hybridation des différents brins se produise dans un ordre contrôlé. En pratique, les 70 bases restantes

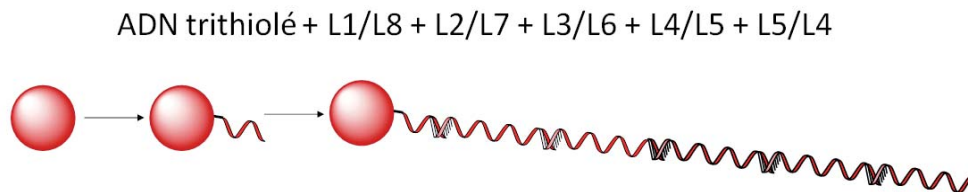


Figure 2.5 – Représentation schématique de la modification de la longueur effective de l'ADN thiolé par des longues molécules de 100 bases (L1-L8).

entre les longues molécules d'ADN de 100 bases sont des thymines, ce qui minimise les interactions non spécifiques entre les brins. Cette technique a déjà été démontrée dans la littérature avec l'hybridation d'un seul long brin d'ADN de 100 bases sur des particules d'or de diamètre inférieur à 10nm [56]. Les extensions de brins d'ADN sont ajoutées en excès afin de s'assurer que toutes les molécules d'ADN trithiolées sont hybridées avec le même nombre d'oligos. Dans un premier temps, seuls les brins trithiolés et les extensions d'ADN sont mélangés dans une solution de NaCl adéquat. Cette solution est ensuite plongée dans un bain thermique chauffé à 85°C afin de favoriser l'hybridation de l'ADN, puis refroidie pendant 12 heures avant d'ajouter des NPsAu comme illustré sur la figure 2.6.

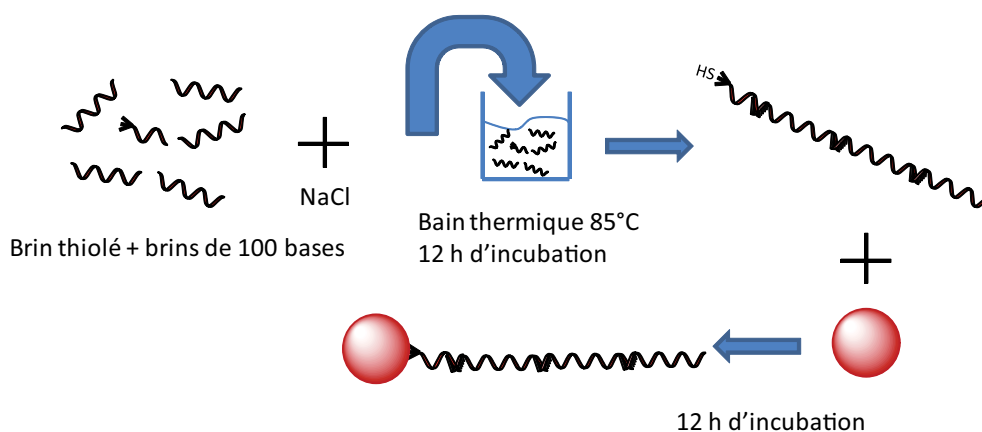


Figure 2.6 – Représentation schématique des étapes de fabrication de particules mono-conjuguées.

L'expérience de la figure 2.7 montre le résultat final de la purification de NPsAu de 40 nm de diamètre passivées de PEG (colonne 1), fonctionnalisées avec de l'ADN de 30 bases (colonnes 2), et fonctionnalisées avec la même séquence de 30 bases mais allongée par un nombre croissant de brins de 100 bases (1 à 5, colonne 3 à 7). On commence à distinguer des bandes à partir de l'ajout de trois brins de 100 bases (colonne 5). Une distinction plus nette des bandes est obtenue lors de l'hybridation de 5 longs brins d'ADN (colonne 7). Cette expérience démontre bien qu'il est possible de séparer des particules supérieures à 30 nm de diamètre conjuguées à de courts brins d'ADN en jouant sur le volume hydrodynamique des structures.

Néanmoins, pour réaliser l'expérience de la figure 2.7, une précaution particulière est nécessaire pour préserver la stabilité des solutions (colonnes 2-4). Des études ont en effet

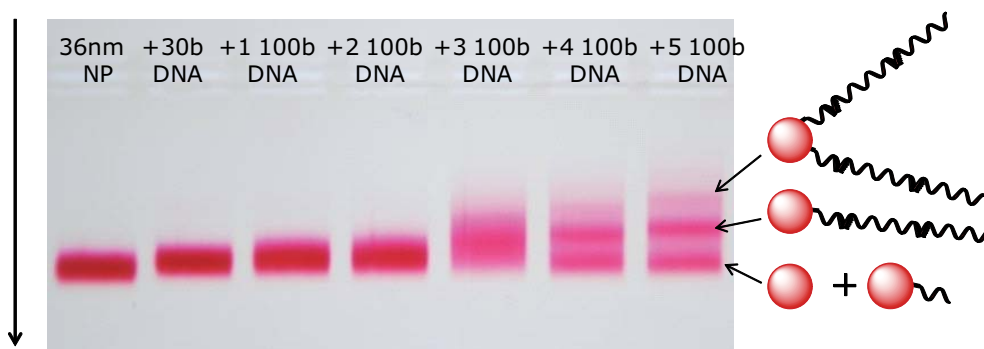


Figure 2.7 – Purification d'électrophorèse de NPsAu de 40 nm de diamètre liées à un brin d'ADN de 30 bases hybridé sur 15 bases avec un nombre d'oligonucléotides de 100 bases compris entre 1 et 5 (colonne 2 à colonne 7) comparé à une référence de particule seule (colonne 1).

montré [64, 65] qu'un excès significatif de longues molécules d'ADN augmente la stabilité des nanoparticules d'or. Ces travaux ont démontré la différence d'adsorption à la surface de l'or entre l'ADN simple brin (ADNsb) et une double hélice d'ADN (ADNdb). Un double ou simple brin d'oligonucléotide est un ligand très différent pour les NPsAu car l'ADNsb peut exposer ses bases hydrophobes qui interagissent de manière non-spécifique avec la surface d'or. Cette interaction stabilise la suspension colloïdale. Une double hélice d'ADN reste, quant à elle, rigide avec une "épine dorsale" sucre-phosphate chargée négativement et hydrophile. Dans ce cas, des double brins d'ADN ne stabilisent pas la suspension de nanoparticules. La présence du grand excès de mono-brins de 100 bases non-thiolés dans les colonnes 5 à 7 permet donc de stabiliser les NPsAu pour supporter la concentration de 30 mM en NaCl. Ce n'est pas le cas pour les colonnes 1 à 4 : dans ces cas, nous ajoutons un brin supplémentaire non-thiolé de 100 bases qui ne s'hybride avec aucun oligonucleotide impliqué dans la solution. En absence de ce mono-brin, les particules agrègent partiellement, entraînant l'apparition de bandes supplémentaires qui ne correspondent pas à l'accrochage de brins d'ADN. Ces bandes indiquent la présence de dimères, trimères, etc..., de NPsAu qui ne font nullement intervenir un liant d'ADN [66].

La technique décrite dans l'expérience figure 2.7 est utilisée pour l'assemblage contrôlé, autour d'un unique brin d'ADN, de dimères de particules de 30 nm et 40 nm de diamètre. Nous utilisons des brins d'ADN de 50 et 30 bases terminés coté 5' ou 3' par un groupement trithiolé. Nous avons vu, dans le paragraphe précédent, un exemple de fonctionnalisation de particules de 40 nm par un unique brin de 30 bases allongé de 5 monobrins de 100 bases. Nous avons également hybridé des particules plus petites, de 30 nm de diamètre, greffées avec des courts brins d'ADN complémentaires, en ajoutant cette fois 4 molécules d'ADN de 100 bases. La figure 2.8 est une purification électrophorétique de NPsAu de 30 nm (colonnes 1-4) et 40 nm (colonnes 5-8), greffées respectivement avec des brins de 30 bases (hybridés avec 4 longs brins de 100 bases) et avec la séquence complémentaire (hybridée avec 5 longs brins de 100 bases).

Les différentes colonnes (2-4 et 6-8) correspondent à une augmentation du ratio ADN/NPAu

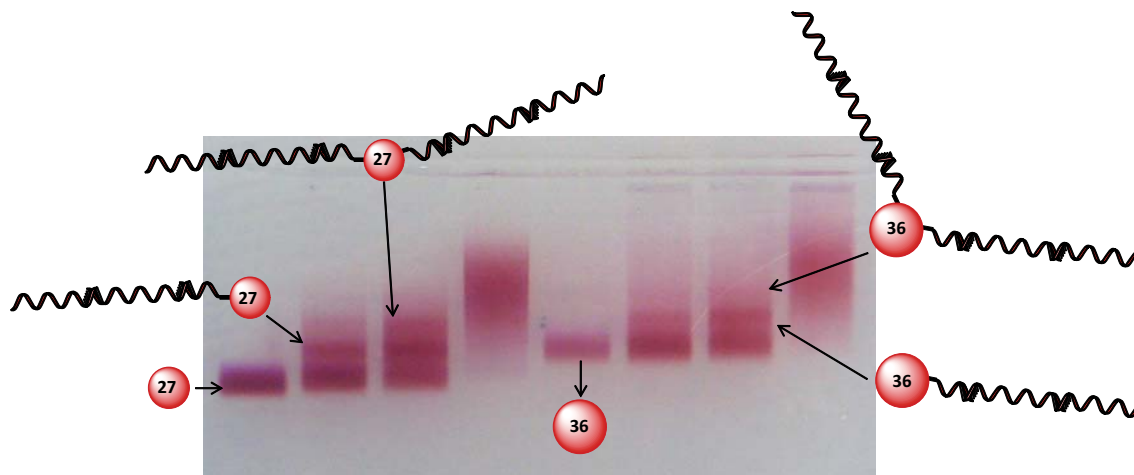


Figure 2.8 – Purification électrophorèse de particules d'or de 30 nm liées à un brin de 30b-trithiol hybridé à 4 longues molécules de 100 bases (colonnes 1-4) et 40 nm de diamètre liées à un brin de 30b-trithiol-comp hybridé à 5 longues molécules de 100 bases (colonnes 5-8).

que nous pouvons comparer aux particules non conjuguées, simplement passivées de PEG (colonnes 1 et 5). La densité relative des différentes bandes du gel d'agarose dépend fortement de l'excès de concentration de brins d'ADN par rapport aux nanoparticules d'or. Chaque bande correspond au greffage d'un brin supplémentaire par particule. Sur la figure 2.8, on voit que les bandes correspondant aux particules mono-conjuguées (colonnes 2, 3 et 7) sont bien contrastées. En augmentant le ratio ADN/NPAu, il est possible de fonctionnaliser les particules avec un nombre croissant de brins d'ADN. Toutefois, ce phénomène sature pour le greffage de plus de 3 ou 4 brins d'ADN car les bandes se superposent (colonnes 4 et 8). On peut donc optimiser les conditions de préparation de particules monoconjuguées en ajustant le ratio ADN/NPAu.

2.1.4 Formation des dimères

Les NPsAu monoconjuguées (colonnes 2, 3 et 6 et 7 de la figure 2.8) sont récupérées en découpant la bande correspondante du gel d'agarose. Les particules en sont extraites dans la solution tampon, utilisée en électrophorèse, pour être ensuite concentrées par centrifugation pour permettre l'hybridation [9, 62]. Pour faciliter l'hybridation, les longs brins d'ADN hybridés sur 15 bases sont décrochés par traitement thermique (55 °C - la température de fusion de 15 paires de bases est d'environ 40-45°C), puis les échantillons sont mélangés avec les NPsAu greffées à la séquence complémentaire en augmentant la concentration de NaCl (40 mM). L'ensemble incube pendant environ 12 heures en laissant la température redescendre lentement à l'ambiante. Les étapes de la fabrication des dimères sont illustrées sur la figure 2.9.

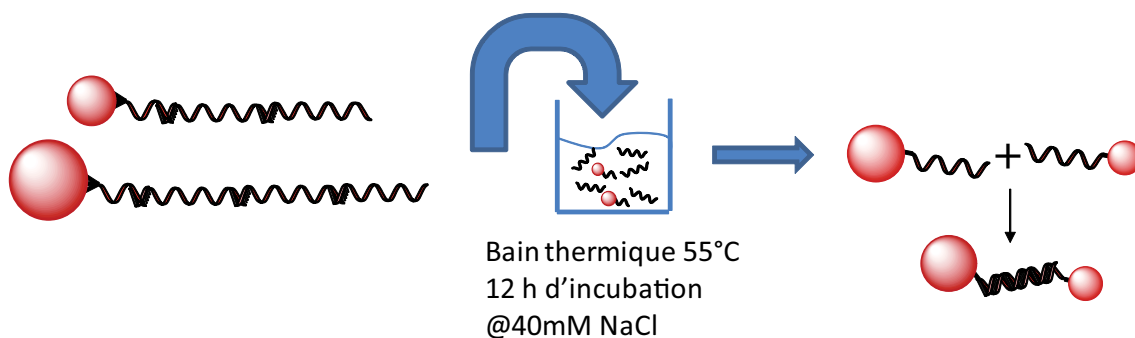


Figure 2.9 – Représentation schématique : Les NPsAu monoconjuguées extraits du gel d'agarose sont plongées dans un bain thermique à 55°C pour décrocher les longues molécules d'ADN de 100 bases, puis l'hybridation se fait avec une concentration de NaCl de 40mM.

Les NPsAu monoconjuguées sont alors hybridées pour fournir des dimères asymétriques de particules d'or de 30 et 40 nm de diamètre, liés par des brins d'ADN de 30 et 50 paires de bases. La figure 2.10 illustre schématiquement les géométries des dimères asymétriques : le brin d'ADN de 50 pb peut être parallèle ou perpendiculaire à l'axe du dimère, tandis que le brin de 30 bases est conservé parallèle.

Une deuxième purification électrophorétique (figure 2.11) sépare les dimères des nanostructures qui n'ont pas réagi lors de la dimérisation et des groupements de taille supérieure (trimères, ...). En fonction de la taille des particules monoconjuguées, nous obtenons la purification de dimères symétriques et asymétriques. Le succès de la synthèse des

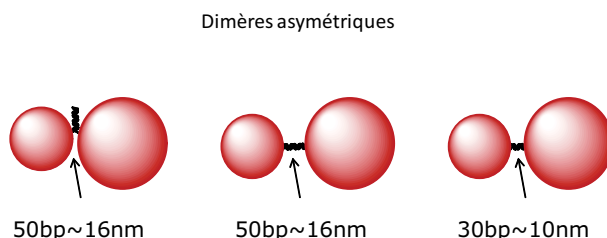


Figure 2.10 – Représentation schématique de dimères de particules de 30 nm et 40 nm de diamètre liées par un double brin de 50 et 30 paires de bases.

dimères est visible sur les secondes bandes du bas des colonnes 2 et 3 de la figure 2.11a et des colonnes 3 et 4 de la figure 2.11b. Dans la suite de ce chapitre nous vérifierons l'efficacité de la synthèse de ces groupements par microscopie électronique.

L'obtention préférentielle de dimères confirme que les différentes bandes des figures 2.7 et 2.8 correspondent bien à des particules greffées à un seul brin d'ADN. Néanmoins, on constate qu'une faible bande de trimères peut être observée dans le gel d'agarose. Ceci signifie que le procédé de fabrication n'est pas efficace à 100% pour supprimer les nanoparticules d'or multiconjuguées lors de la première étape de purification. On observe systématiquement cet effet avec la technique de purification par électrophorèse comparée à la HPLC, qui permet une meilleure purification mais requiert une plus grande concentration

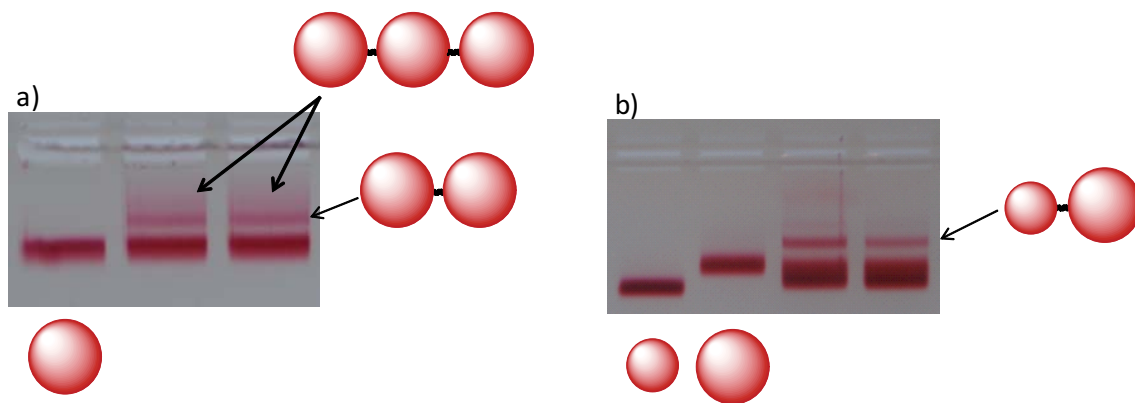


Figure 2.11 – Deuxième purification par gel d'électrophorèse, pour séparer l'hybridation de dimères des particules mono-conjuguées. (a) Dimères symétriques constitués de particules d'or de 40nm de diamètre. (b) Dimères asymétriques de NPsAu de 30 nm et 40 nm.

de NaCl, incompatible avec de particules d'or de plus de 30 nm de diamètre [58]. Il est également possible de fabriquer des trimères en mélangeant des NPsAu greffées de deux brins d'ADN avec des particules conjuguées de brins complémentaires. Dans ce cas, la troisième bande est nettement plus intense. Les bandes correspondant aux dimères sont ensuite découpées et la solution est extraite (le protocole d'extraction est détaillé dans la paragraphe 2.1.5).

En pratique, les bandes sont placées dans un réservoir contenant la solution tampon utilisée en électrophorèse. Sous l'effet d'un champ électrique, on fait migrer les dimères dans le tampon, permettant leur extraction à la pipette. Ces solutions peuvent être conservées plusieurs semaines à une température de 4°C. Leurs morphologies seront analysées par cryo-EM et décrites dans le paragraphe suivant. Leurs propriétés optiques, qui seront exposées dans le prochain chapitre, seront caractérisées en microscopie confocale de diffusion utilisant une illumination en champ sombre (darkfield).

2.1.5 Méthodes

Échange de ligands

Nous faisons réagir les particules d'or de 30 nm et 40 nm de diamètre stabilisées de citrate (BBInternational(UK)) avec du bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine (BSPP, Strem Chemicals). Nous incubons pendant 12 heures un volume de 50 mL de particules avec 10 mg de BSPP. Cette solution est ensuite concentrée par centrifugation pour retirer le surnageant. La solution est alors rincée trois fois par dilution/centrifugation avec de l'eau milli-Q. Pour finir, la solution est resuspendue dans une solution de 0.5 mM de BSPP. Nous obtenons ainsi une concentration finale de NPsAu de 0.05 μ M et 0.02 μ M pour les particules de 30 nm et 40 nm.

Les brins de 30 et 50 bases trithiolés sont hybridés sur 15 paires de bases, coté 3', avec un premier long brin (L1). Les brins complémentaires, 30b-trithiol-comp et 50b-trithiol-comp, sont hybridés de la même façon avec une autre séquence de longue molécule (L8). Le brin 50b-3'-trithiol-comp est hybridé, coté 5', avec un long brin (L3'-comp). De manière générale, le brin L_i est hybridé avec $L(i+1)$ sur 15 paires de bases. Le L3'-comp est, quant à lui, hybridé directement avec le brin L3. Pour les particules de 40 nm, les séquences de 30b-trithiol et 50b-trithiol sont allongées avec 5 brins de 100 bases (L1 à L5, colonne 7 de la figure 2.7). Dans les mêmes conditions, les brins 30b-trithiol-comp et 50b-trithiol-comp sont rallongés par des molécules de séquences L8 à L4. Quant à l'ADN 50b-3'-trithiol-comp, l'ordre est L3', L3, L4, L5 et L6.

Ces longues molécules d'ADN (L1-8) sont mélangées avec le brin d'ADN trithiolé dans un volume de 10 μ L avec une concentration finale de 40 mM de NaCl. Le premier long brin (L1 ou L8) est ajouté avec un excès trois fois supérieur au brin d'ADN trithiolé. Les brins supplémentaires sont ajoutés avec une augmentation de leur concentration de 1.5X. Cette solution est ensuite plongée dans un bain thermique à 85°C, qu'on laisse refroidir pendant 12 heures afin de garantir une hybridation totale.

Le protocole de la figure 2.8 est le suivant : nous mélangeons 0.1 pmol de NPsAu de 30 nm ou 0.06 pmol de NPsAu de 40 nm avec 2 pmol de brins d'ADN trithiolés qui ont été préalablement hybridés avec un nombre choisi de brins de 100 bases. La solution contenant les NPsAu et l'ADN est ensuite incubée 12 heures à température ambiante. Le volume final de la solution est de 15 μ L avec 30 mM de NaCl et une concentration finale de 1 mM de BSPP. Le BSPP est utilisé comme agent réducteur qui permet de minimiser l'oxydation des groupements thiols par l'eau.

Pour l'expérience de la figure 2.7, lorsque le nombre de longs brins de 100 bases est inférieur à 3, nous ajoutons 100 pmol d'un brin d'ADN de 100 bases, qui ne s'hybride ni avec les brins thiolés ni avec d'autres oligonucleotides impliqués. Par exemple dans les premières colonnes de la figure 2.7, le brin d'ADN de 30b-trithiol-comp n'a pas d'extension ou est simplement hybridé avec deux longs brins L8 et L7. En pratique, pour éviter l'agrégation de ces échantillons, on ajoute un large excès de 100 pmol de L1.

Avant la séparation par électrophorèse, la surface des NPsAu est passivée avec un excès de courts oligomères d'éthylène glycol(PEG) thiolés neutres [61]. Le PEG méthylé et thiolé est ajouté aux NPsAu de 40 nm de diamètre avec un excès de 7.10^5 qu'on laisse incubé pendant 30 minutes. Ces courts oligomères peuvent présenter des groupements chimiques pour fonctionnaliser les NPsAu. En particulier, il est possible d'obtenir un groupement biotine terminal. Le PEG biotinylé est obtenu sous forme d'un dimère lié par un pont disulfure. La réduction du pont disulfure se fait avec un excès de 20X de BSPP, qu'on laisse incubé pendant deux heures. On incorpore ensuite du méthyl PEG avec un ratio de méthyl PEG/biotine PEG de 16, qu'on laisse réagir avec les NPsAu pendant une durée

de 30 minutes.

Les solutions sont placées dans un gel d'agarose de 1.5% en poids (0.5x Tris-Borate-EDTA comme solution tampon) en ayant préalablement ajouté un volume de ficoll pour 4 volumes d'échantillon pour éviter que la solution diffuse hors du gel. Le gel est ensuite soumis à un champ électrique de 8 V/cm pendant 1 heure, ce qui nous permet d'obtenir le résultat des figures 2.7 et 2.8. Nous procédons à l'extraction suivant la procédure suivante [62,9] : les bandes, correspondant aux particules passivées d'un brin d'ADN trithiolés, sont coupées puis placées dans un réservoir préalablement sculpté dans le gel d'agarose rempli de la solution tampon (0.5x TBE). Le champ électrique fait migrer les particules contenues dans la tranche de gel vers le réservoir. Les particules mono-conjuguées sont prélevées à la pipette puis concentrées par centrifugation.

Fabrication des dimères

Les échantillons de NPsAu mono-conjuguées, d'une concentration d'environ 10nM, sont mélangés dans un volume final de $15\mu L$, avec une concentration de 40 mM de NaCl, puis plongés dans un bain thermique à $55^{\circ}C$ qu'on laisse refroidir pendant 12 heures. Les solutions sont placées dans un gel d'agarose de 1.5% avec le même procédé que celui décrit précédemment. Les bandes correspondant aux dimères sont découpées, puis placées dans un réservoir contenant une solution tampon (TBE), qui, sous l'effet d'un champ électrique fait migrer la solution de dimères dans le tampon, avant d'être finalement extraites à la pipette. Ces solutions peuvent être conservées plusieurs semaines à une température de $4^{\circ}C$.

2.2 Caractérisation morphologique par microscopie électronique en transmission

Nous allons voir dans cette section que la caractérisation morphologique des groupements de NPsAu liés par des brins d'ADN requière une attention particulière à la fois sur la stabilité des NPs ainsi que sur la rigidité de l'échafaudage d'ADN. Le contrôle des forces électrostatiques qui régissent l'équilibre des dimères en solution est un facteur important pour garantir des distances inter-particules fidèles à celles attendues par le choix des longueurs des brins d'ADN utilisés.

Le microscope électronique en transmission permet de visualiser directement l'image de l'échantillon sur un écran fluorescent ou une caméra placés dans le plan conjugué image d'un système de lentilles magnétiques. Il est également possible d'imager la figure de diffraction des électrons dans le plan de Fourier. Pour un échantillon suffisamment mince, placé sous un faisceau d'électrons, le signal transmis permet de visualiser directement une

image contrastée de l'échantillon. La limite de résolution dépend de la longueur d'onde de De Broglie des électrons.

Nous allons dans un premier temps caractériser la morphologie des solutions de dimères à l'aide d'un microscope électronique en transmission "sec". Le qualificatif "sec" est employé pour signifier que les échantillons sont déposés directement sur un substrat constitué d'une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone. Nous verrons qu'il est impossible, dans ces conditions, d'estimer la distance inter-particule à cause des interactions des dimères avec le substrat et des effets de séchage. Pour pallier à ces contraintes, nous allons fonctionnaliser la surface des grilles de TEM avec différentes couches de protéines, afin de fixer les dimères à la surface. Nous verrons que cette solution n'est pas idéale pour garantir la conformation des nano-structures telle qu'elles sont obtenues en solution. Cependant, dans un environnement cryogénique, l'analyse des images de microscopie électronique en transmission permet d'obtenir une excellente caractérisation morphologique. Cette technique requière de mettre en œuvre une méthode de calcul pour prendre en compte la projection d'un objet à 3 dimensions sur un plan en 2 dimensions perpendiculaire à l'axe du faisceau d'électrons.

2.2.1 Microscopie électronique en transmission (TEM "sec")

Les mesures de TEM "sec" ont été effectuées à l'ESPCI (École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris) par le Dr. Xiangzhen Xu du laboratoire LPEM sur un système JEM 2010 F de marque Jéol. Le fort contraste d'absorption du faisceau d'électrons entre les particules d'or et le substrat permet de caractériser leur taille et leur forme. Les grilles de support utilisées sont constituées d'une couche de carbone et d'une grille de cuivre pour dissiper les charges qui s'accumulent sous l'effet du bombardement d'électrons. Le film de carbone est hydrophobe et ne permet pas de déposer directement les échantillons de suspension de dimères. Il est nécessaire d'exposer les grilles de TEM à un plasma d'oxygène, ce qui a pour effet d'oxyder la surface.

Pour faciliter cette analyse, nous allons caractériser des dimères asymétriques afin de mettre en évidence les interactions spécifiques entre les particules dues à l'ADN et éviter toute confusion avec une agrégation non-spécifique. Des études ont montré que les groupements de nanoparticules d'or de tailles supérieures à 10 nm de diamètre tendent à s'agréger lorsqu'elles sont déposées sur des grilles de TEM [67], comme illustré sur l'image de la figure 2.12. La stabilité des NPsAu en solution aqueuse est, quant à elle, maintenue grâce à la répulsion électrostatique due aux charges effectives négatives et à la couche de PEG qui minimise l'interaction entre les surfaces d'or des NPs.

Sur la figure 2.12, les particules d'or de 30 nm et 40 nm de diamètre liées par un double brin de 30 paires de bases (30pb) sont représentées par les cercles sombres. Le substrat de carbone est visible en gris clair. Pour réaliser cette expérience, une goutte de la solution contenant les dimères est déposée sur la grille de TEM. Nous retirons le surplus par absorption sur un papier filtre. La grille est ensuite séchées à l'air libre. On constate qu'il y a des dimères asymétriques, au centre et en bas à droite de l'image, mais également

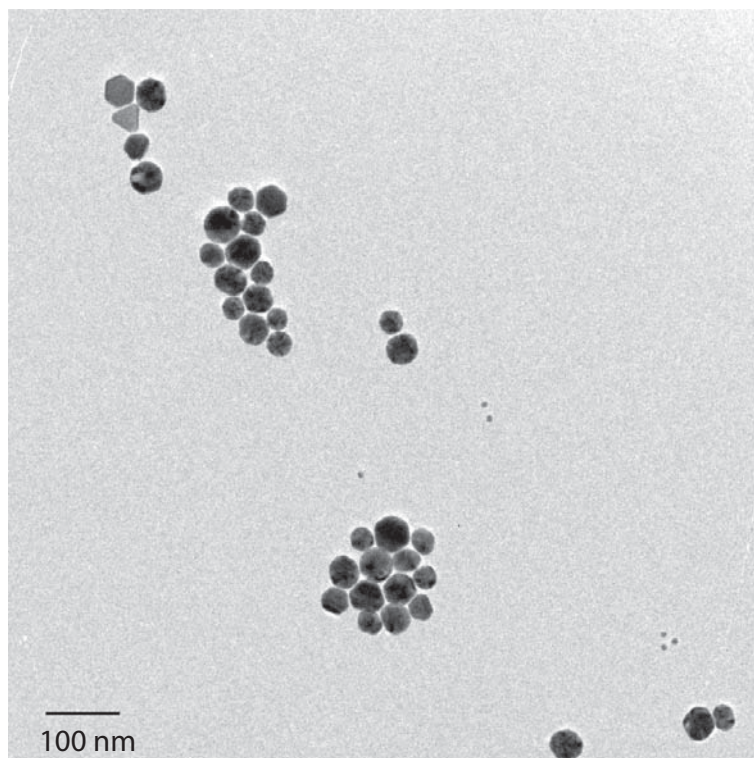


Figure 2.12 – Image de microscope électronique en transmission. Les nano-structures composées de particules d’or de 40 nm et 30 nm sont déposées sur la grille de carbone puis séchées à température ambiante.

beaucoup d’agrégats. Le séchage sur la grille de carbone induit donc une agglomération des groupements de NPsAu. La distance entre les particules correspond probablement à l’épaisseur de la couche de PEG entourant les NPs. A ce stade, il est donc impossible d’obtenir des informations sur l’échafaudage d’ADN et donc de valider notre procédure d’hybridation. Pour limiter ce problème, nous avons fixé les dimères de NpsAu à la surface des grilles de TEM fonctionnalisées par des protéines [68].

2.2.2 Microscopie électronique en transmission sur grilles fonctionnalisées

Nous fonctionnalisons la surface des grilles de microscope avec plusieurs couches de protéines pour éviter l’agrégation des particules, comme illustré schématiquement sur la figure 2.13.

Pour greffer les particules à la surface de la grille, celles-ci sont recouvertes d’une molécule qui aura une interaction spécifique avec la surface fonctionnalisée des NPsAu. Dans le paragraphe précédent, nous avons décrit la procédure pour enrober les NPsAu de biotine à l’aide d’un PEG biotinylé. Nous avons vu que les grilles de TEM ne sont pas hydrophiles, il est donc nécessaire de traiter la surface de la grille avec un plasma d’oxygène afin qu’elle ait une affinité avec la solution qui sera déposée.

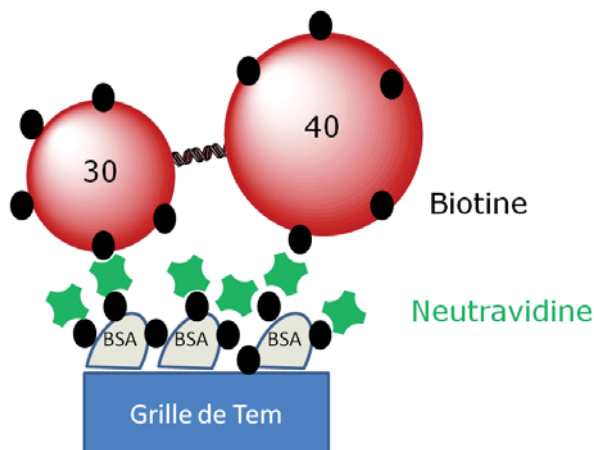


Figure 2.13 – Fonctionnalisation des grilles de carbone avec deux couches de protéines. Les particules sont enrobées de PEG biotinyté qui se lie à la Neutravidine déposée sur les grilles de TEM.

La procédure de fonctionnalisation des grilles est la suivante.

On dépose sur la grille de carbone un volume de $5\mu\text{L}$ de solution de BSA-biotine (albumine de sérum bovin, plus couramment nommée en anglais bovine serum albumin) de concentration 1 mg/mL d'eau qu'on laisse incuber pendant 5 min . L'excédent de solution est retiré par capillarité à l'aide d'un papier absorbant et la grille est rincée avec du T50 (50 mM NaCl , 10 mM Tris-HCL , $\text{pH } 7$). La BSA-biotine a une affinité non spécifique avec le substrat. Nous déposons ensuite un volume de $5\mu\text{L}$ d'une solution de Neutravidine (1mg/mL) pendant 5 min . La grille est ensuite nettoyée avec du T50. Toutefois, les couches de protéines ne sont pas déposées de façon homogène sur toute la surface de la grille. Pour limiter les interactions non spécifiques entre les particules et la surface de carbone qui n'a pas été fonctionnalisée, nous ajoutons un volume de $5\mu\text{L}$ de "Superblock" sur la surface de la grille, qu'on laisse incuber pendant 5 min . Cette solution est ensuite rincée avec du T50. Un volume de $5\mu\text{L}$ de solution de dimères de NPsAu ($1\text{-}10\text{nM}$), extrait du gel de la figure 2.11, est déposé sur la grille. La Neutravidine est adsorbée par la biotine ajoutée à la surface de l'or. Les dimères sont incubés pendant 5 min avant d'être rincés avec du T50, puis séchés. La figure 2.14 montre une image de dimères greffés à la surface de la grille de TEM. Ils s'agit de dimères de NPsAu de 30 nm et 40 nm liés par un double brin de 30 bp .

Nous observons sur la figure 2.14 une diminution des agrégats et une meilleure répartition des dimères à la surface de la grille comparée à la figure 2.12. Afin de voir si la procédure de fonctionnalisation de la surface des grilles de TEM permet bien une interaction spécifique entre les nano-structures et le substrat, plusieurs tests paramétriques ont été réalisés tels que le fait de varier les temps d'incubation des différentes solutions ou sur la nécessité d'utiliser le "Superblock".

Les particules adsorbées sur la grille de TEM, par interaction entre la biotine et la Neutravidine, se figent dans une configuration spécifique. Toutefois, nous observons que les dimères de particules d'or ont une distance "centre à centre" qui ne correspond pas aux

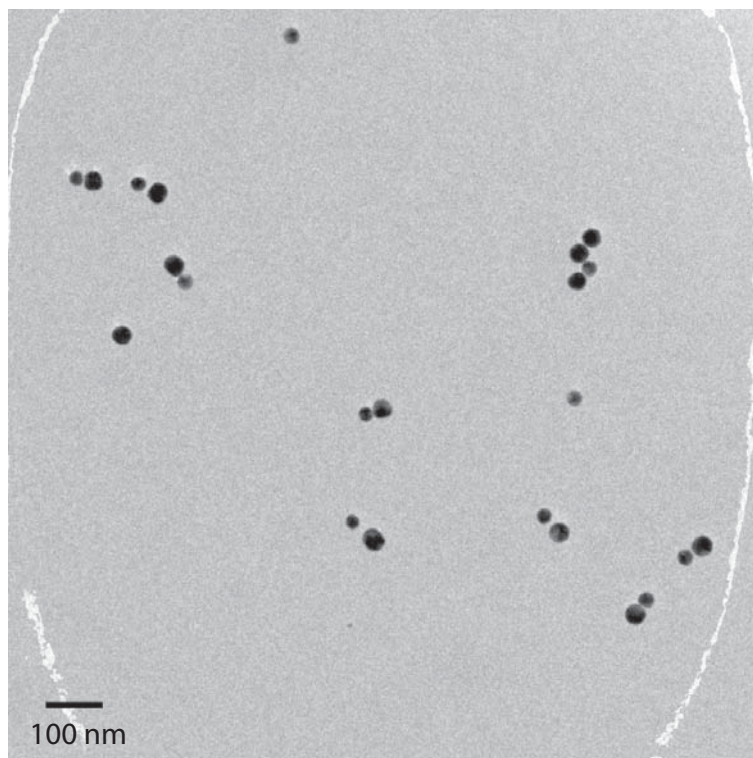


Figure 2.14 – Image de microscopie électronique en transmission. La surface de la grille est fonctionnalisée de plusieurs couches de protéines. Les dimères de particules d'or de 30 nm et 40 nm, liées par un double brin de 50bp, sont enrobés de PEG biotinylé et greffés à la surface de la grille.

longueurs de brins d'ADN utilisés. Les grilles de TEM sont séchées avant d'être imagées : ceci induit probablement une agrégation non spécifique des NPs_{Au} qui rend impossible l'estimation de la distance "centre à centre" liée à l'ADN qui lie les dimères.

Pour contourner ce problème, on effectue la caractérisation morphologique à l'aide d'un microscope électronique en transmission cryogénique (cryo-EM). La cryo-fixation est une technique permettant de conserver la conformation des groupements telle qu'obtenue en suspension dans un milieu de force ionique donnée.

2.2.3 Microscopie électronique cryogénique en transmission (cryo-EM)

Les inconvénients rencontrés lors de l'utilisation du TEM "sec" ne permettent pas de caractériser la morphologie des nano-structures liées par des brins d'ADN. La microscopie cryogénique en transmission (cryo-EM) pallie aux inconvénients liés aux effets de séchage ou aux interactions avec la surface de la grille [69, 70]. Les mesures en condition cryogénique ont été réalisées par le Dr. Éric Larquet, du laboratoire LEBS à Gif-sur-Yvette, sur un instrument de l'IMPMC à l'Université Paris VI (Microscope JEOL 2100 LaB6). Les grilles de cryo-EM sont différentes des grilles de TEM "sec" décrites dans les paragraphes précédents. En effet, la surface de carbone comporte des trous dans lesquels les particules seront imagées.

Pour cette technique, nous déposons une goutte d'une solution contenant des dimères directement sur la grille à trous après que celle-ci ait été traitée au plasma d'oxygène. Par l'intermédiaire d'un papier filtre, cette goutte est "blottée" en vue d'obtenir une couche d'épaisseur homogène à la surface de la grille. La grille est ensuite maintenue par une pince pour être plongée dans l'éthane liquide afin d'être rapidement refroidie. Au final, on obtient une fine couche de glace vitreuse comportant les dimères. La grille est récupérée dans l'azote liquide avant d'être introduite dans le microscope pour éviter la formation de cristaux (opaques pour le faisceau d'électrons) dans la membrane d'eau vitrifiée. On obtient des images contrastées comme présentées sur la figure 2.15.

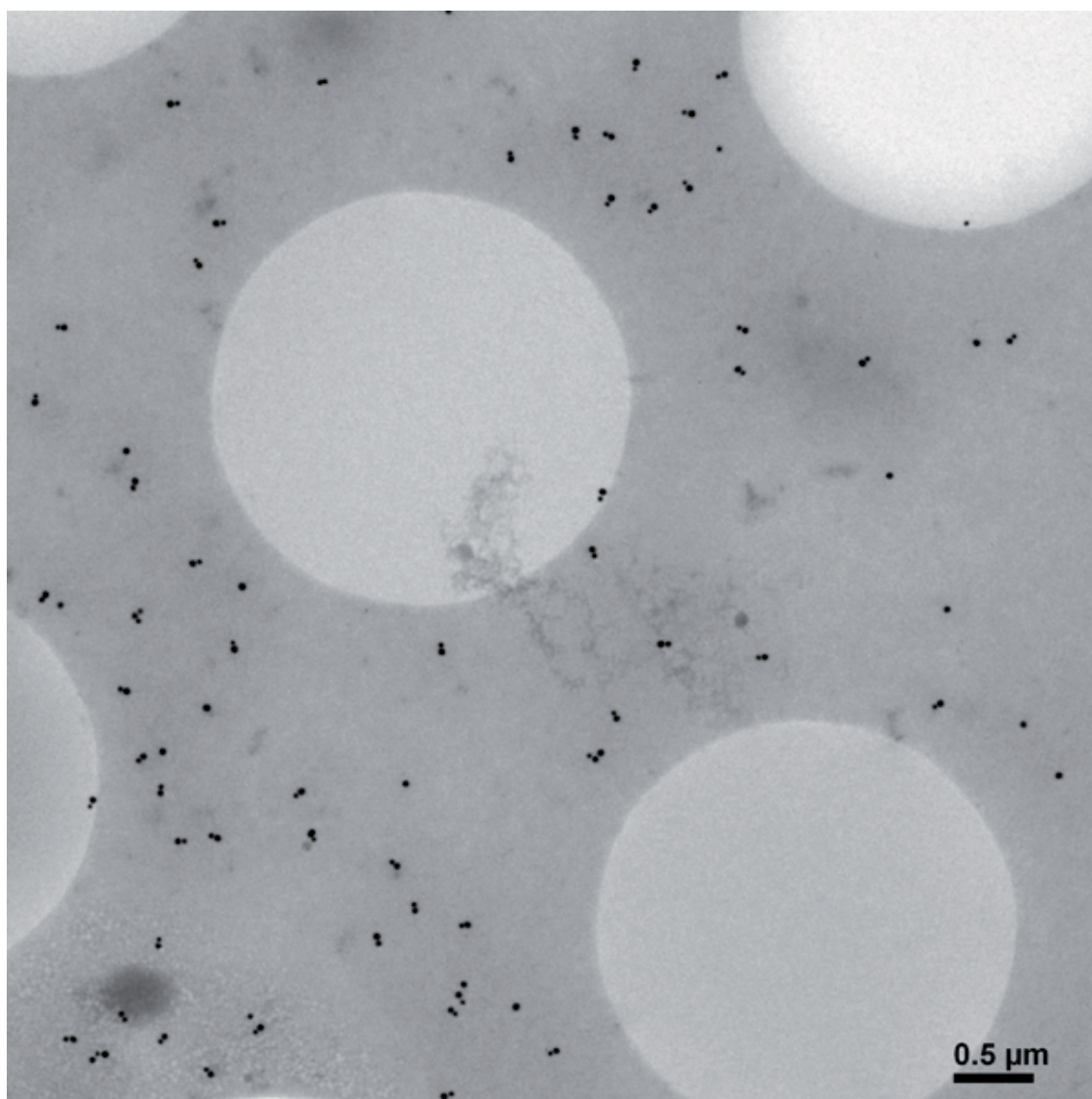


Figure 2.15 – Image de cryo-EM dimères de NPsAu de 30 nm et 40 nm de diamètre liées par un double brin de 50 pb à faible grandissement.

La figure 2.15 montre des dimères de NPsAu de 30 nm et 40 nm de diamètre liés par un double brin de 50 pb. Le faible grandissement permet d'avoir une vue d'ensemble de l'échantillon et ainsi de pouvoir apprécier la pureté de la solution de dimères. Les NPsAu sont visibles par des points noirs, la couche de carbone par le fond gris foncé et

les trous par les cercles gris clair. Les trous ont pour but d'éviter l'adsorption des NPs sur le carbone qui pourrait fausser la distance inter-particule. Les particules sont dispersées à la surface de la grille mais préférentiellement sur le carbone. Ce phénomène n'est pas une contrainte car l'étude se fera sur les dimères localisés dans les trous. Le fait que les NPsAu soient préférentiellement dispersées sur la couche de carbone est probablement lié à des interactions non-spécifiques entre les NPsAu et la surface de carbone de la grille de cryo-EM.

La figure 2.16 montre des images de cryo-EM de dimères de NPsAu de 30 nm et 40 nm de diamètre synthétisées avec différentes longueurs de brins d'ADN. Les images (a) et (b) présentent des dimères liés avec un double brin de 50 pb, perpendiculaire à l'axe du dimère. Une des deux particules est liée par le côté 5' du brin d'ADN, tandis que l'autre est greffée côté 3' de la séquence complémentaire. La figure 2.16 (c,d) présente également un dimère lié par une double hélice de 50 pb. Dans ce cas les deux particules sont liées côté 5' des deux brins d'ADN. La figure 2.16 (e,f) correspond à un dimère lié avec un double brin d'ADN de 30 bp côté 5'.

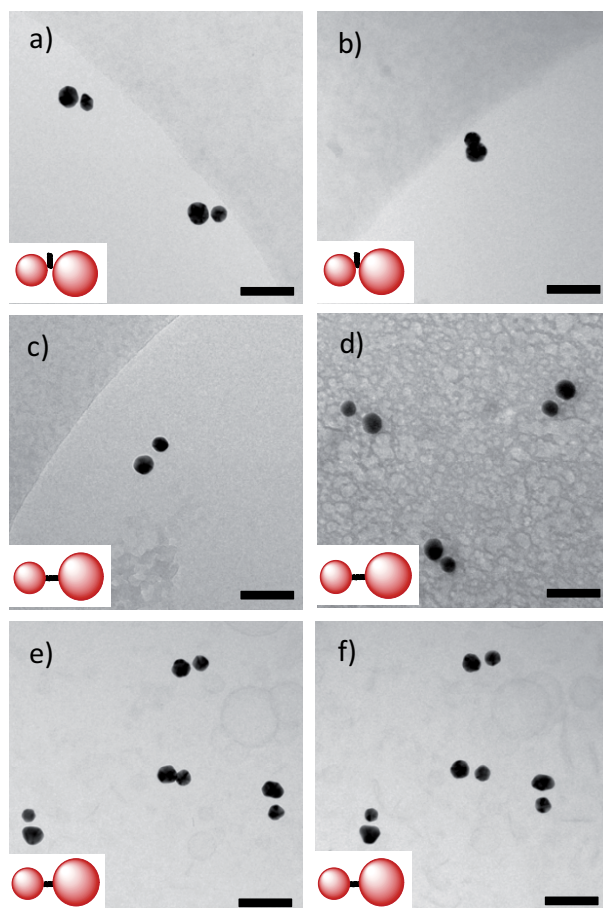


Figure 2.16 – Images de microscope électronique cryogénique en transmission pour trois géométries différentes de dimères de particules d'or de 30 nm et 40 nm de diamètre. Les images (a,b) et (c,d) illustrent des dimères liés par un double brin de 50 paires de bases, (e,f) dimères liés par un double brin de 30 paires de bases, avec une orientation de l'échantillon tourné de 45° entre l'image (e) et (f).

Le film d'eau vitrifié à la surface des grilles de carbone mesure plusieurs dizaines de nanomètres d'épaisseur [69,70]. En raison du refroidissement rapide de l'échantillon, les dimères sont figés dans des orientations différentes et certains sont probablement partiellement en contacts avec la surface de la grille. Sur les images de la figure 2.16, les dimères sont localisés dans les trous sauf pour la figure 2.16(d). Les figures 2.16(e,f) représentent des images du même dimère avec une orientation de l'échantillon tournée de 45° entre l'image (e) et (f). En figure 2.16(e), les NPsAu sont partiellement superposées ce qui induit une estimation erronée de la distance. Sur la figure 2.16(f) la distance semble correspondre aux longueurs des brins d'ADN utilisés. Il est donc nécessaire de prendre en compte l'angle entre le faisceau d'électrons et l'échantillon pour déterminer les distances inter-particules.

Dans le paragraphe suivant, nous estimerons cette fonction de projection. Nous avons analysé un grand nombre d'images de cryo-EM à faible grandissement, pour estimer la pureté des échantillons des trois géométries de dimères présentées dans les encadrés (a-e) de la figure 2.16. Ces puretés sont respectivement de 48%, 68% et 73%. Le reste des échantillons est composé de particules seules de 40 nm de diamètre (car les particules de 30 nm de diamètre sont mieux séparées par électrophorèse) et moins de 7% d'agrégats.

2.3 Estimation des distances inter-particules

2.3.1 Méthode d'évaluation des diamètres et des distances "centre à centre"

Les distributions de distances inter-particules et des diamètres des NPsAu sont estimées en analysant automatiquement les images de cryo-EM. Ces estimations se font en ajustant un cercle autour de chaque nanoparticule puis en mesurant la distance entre les centres de masse. Nous estimons également les distributions de diamètres des particules, par les diamètres des cercles ajustés, qui sont présentées pour des NPsAu de 30 nm et 40 nm sur la figure 2.17. La distribution est ajustée par deux fonctions gaussiennes (courbe noire). On distingue bien deux distributions, l'une centrée à $\mu_{30} = 27.3$ nm et l'autre centrée à $\mu_{40} = 36$ nm, avec un écart type respectif de $\sigma_{30} = 1.65$ nm et $\sigma_{40} = 2.8$ nm. Ces mesures montrent que les particules utilisées ont une dispersion de taille non négligeable.

Les mesures statistiques des distances "centre à centre" pour trois géométries de dimères différents sont présentées sur la figure 2.18. La distribution (a) illustre les distances "centre à centre" des dimères liés par un double brin de 50 pb perpendiculaire à l'axe du dimère. Les mesures (b) correspondent aux dimères de 30 pb et la distribution (c) représente des dimères de 50 pb. Nous avons vu dans le paragraphe précédent que l'estimation de la distance "centre à centre" est erronée si nous ne prenons pas en compte l'angle entre le faisceau d'électrons et l'orientation du dimère dans la fine couche d'eau vitrifiée. Toutefois, nous observons déjà une augmentation globale de la distance inter-particule en passant d'un brin d'ADN liant de 30 bp à 50 bp (b,c). De plus, nous vérifions que placer le brin d'ADN perpendiculaire au dimère, grâce à un brin trithiolé en 3', permet de minimiser la distance inter-particule [57]. Dans les trois géométries, l'analyse des images montre de

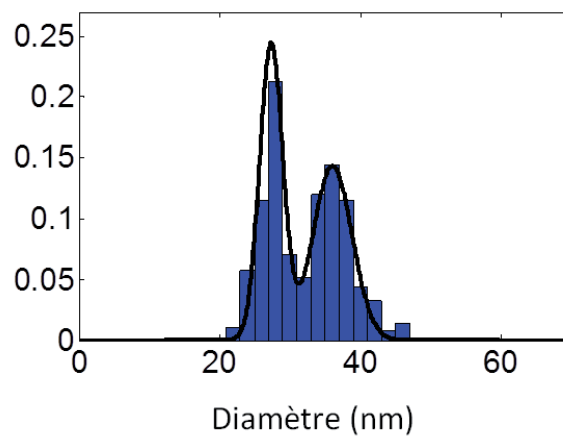


Figure 2.17 – Distributions des diamètres des particules de 30 nm et 40 nm estimées à partir des images de cryo-EM

larges distributions qui peuvent s'expliquer par trois facteurs : la dispersion des diamètres de particule représentée sur la figure 2.17; la distribution de distance "bord à bord" liée aux échafaudages d'ADN; et la projection de l'axe du dimère sur un plan perpendiculaire au faisceau d'électrons.

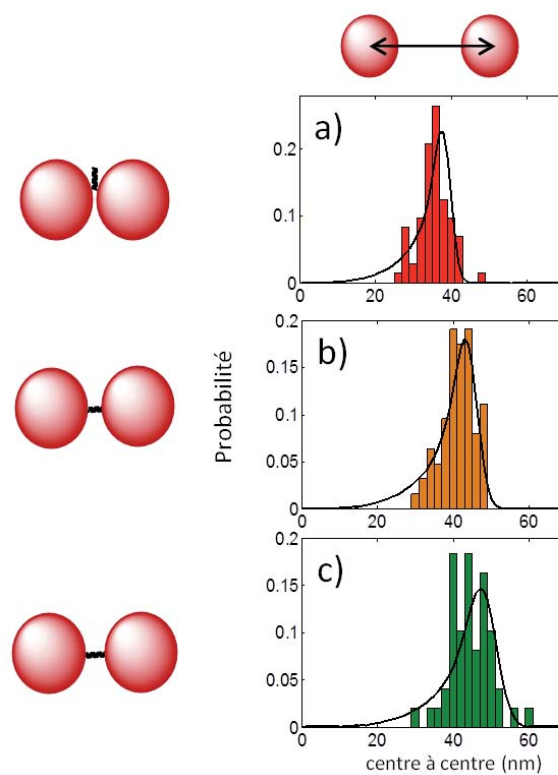


Figure 2.18 – Distributions des distances "centre à centre" a) dimère lié par un double brin de 50bp perpendiculaire b) dimère lié par un double brin de 30bp c) dimère lié par un double brin de 50bp.

2.3.2 Calcul de la fonction de projection

Nous avons régulièrement observé une superposition partielle entre les deux particules d'un dimère sur des images de cryo-EM. Les trois images de la figure 2.19 représentent le même dimère avec des orientations de l'échantillon tournées de 45° entre chaque image. Cette figure illustre clairement que nos échantillons sont fondamentalement tridimensionnels et qu'il est nécessaire de prendre en compte la projection du dimère sur le plan perpendiculaire à l'axe du faisceau d'électrons pour évaluer précisément la distance inter-particule.

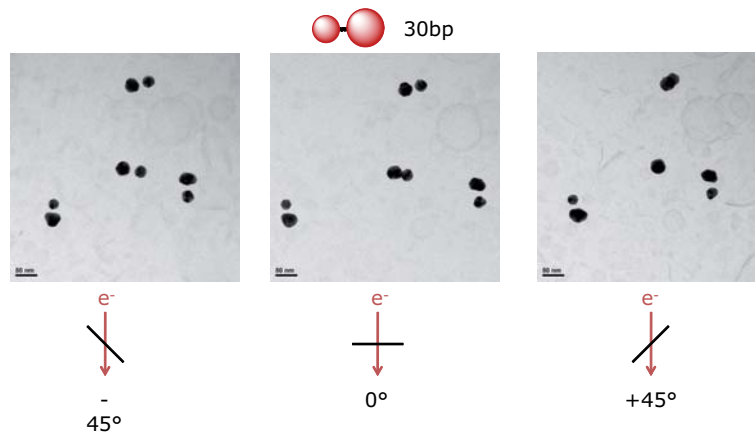


Figure 2.19 – Images de cryo-EM de Dimères de 30 bp. L'échantillon est tourné de 45° entre chaque image

Nous devons estimer la distribution des distances "bord à bord", s , afin de caractériser et de comprendre la géométrie des brins d'ADN qui relient les particules dans nos dimères. Soit l la longueur "centre à centre", obtenue en additionnant la distance s avec les rayons des nanoparticules estimés à partir de la figure 2.17. On définit \tilde{l} comme étant la distance de projection "centre à centre" mesurée en analysant les images de cryo-EM. La figure 2.20 est une illustration schématique en trois dimensions d'un dimère figé dans la couche de glace. La distribution $D_l(l)$ est donc simplement obtenue à partir de la distribution de distance $D_s(s)$ (à déterminer) et des distributions gaussiennes D_{d30} et D_{d40} des diamètres des particules de 30 nm et 40 nm estimés à partir des mesures de la figure 2.17. La fonction de distribution d'angles entre le faisceau d'électrons et l'axe du dimère $D_\theta(l, \tilde{l})$ est définie entre $[0, \pi/2]$. La fonction de distribution $D_{\tilde{l}}(\tilde{l})$ est donc la convolution de $D_l(l)$ par la distribution d'angles $D_\theta(\theta)$. Les calculs de la fonction de projection $D_{\tilde{l}}(\tilde{l})$ sont détaillés dans la suite de ce paragraphe.

Pour une couche cryogénique épaisse, la distribution angulaire devrait être isotrope, ce qui correspond à $D_\theta(l, \tilde{l}) = 1/\pi$. Cependant la couche d'eau vitreuse ne mesure que quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur afin qu'elle soit suffisamment transparente au faisceau d'électrons et que les images soient contrastées [70]. Comme les dimères ont une longueur d'environ 100 nm, la probabilité de trouver des nano-structures parallèles à l'axe du faisceau d'électrons est pratiquement nulle. A ce stade, il est impossible de fournir une analyse précise des distributions de distance à partir des images de cryo-EM

sans connaitre la distribution angulaire.

Calcul de la fonction $D_{\tilde{l}}(\tilde{l})$

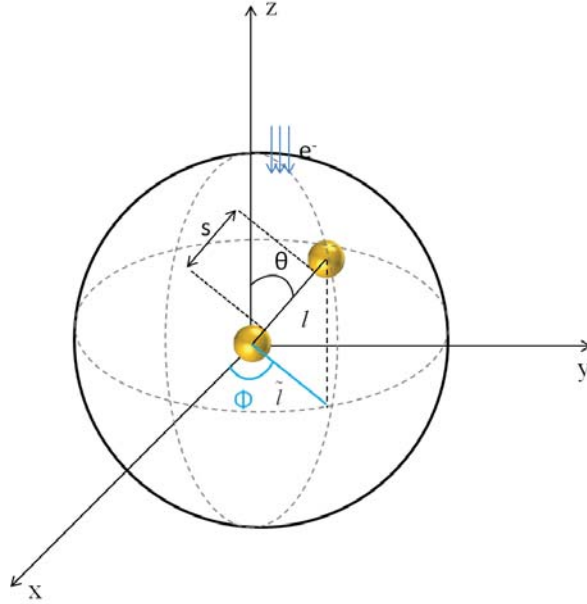


Figure 2.20 – Représentation schématique en trois dimensions de dimères figés dans une fine couche de glace vitrifiée.

L'estimation de la distribution de distance ne dépend pas de l'angle Φ défini dans le plan (x,y) car, quelle que soit l'orientation du dimère dans ce plan, la distance projetée reste invariante.

Nous supposons une distribution Gaussienne pour $D_l(l)$, définie de la façon suivante :

$$D_l(l) = \frac{1}{\sigma_l \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(l-\mu_l)^2}{2\sigma_l^2}} \quad (2.1)$$

avec $\mu_l = \mu_{30} + \mu_{40} + \mu_s$ et $\sigma_l = \sqrt{\sigma_{30}^2 + \sigma_{40}^2 + \sigma_s^2}$

La distribution de distances $D_{\tilde{l}}(\tilde{l})$ est définie en fonction de la distribution d'angles de l'axe du dimère dans l'épaisseur de la couche vitrifiée $D_\theta(\theta)$:

$$D_{\tilde{l}}(\tilde{l}) = \int_0^{\pi/2} D_\theta(\theta) D_l(l(\theta, \tilde{l})) d\theta \quad (2.2)$$

D'après la représentation de la figure 2.20, $l = \frac{\tilde{l}}{\sin\theta}$. On remplace dans l'équation 2.3 $D_\theta(\theta)$ par $D_\theta(\tilde{l}, l)$

$$D_{\tilde{l}}(\tilde{l}) = \int_{\tilde{l}}^{+\infty} D_\theta \left(\arcsin \left(\frac{\tilde{l}}{l} \right) \right) D_l(l) \frac{d\theta}{dl} dl \quad (2.3)$$

$$\text{avec } \frac{d\theta}{dl} = -\frac{\tilde{l}}{l} \frac{1}{\sqrt{l^2 - \tilde{l}^2}} \quad (2.4)$$

$D_{\tilde{l}}(\tilde{l})$ peut donc être exprimée de la façon suivante :

$$D_{\tilde{l}}(\tilde{l}) = \int_{\tilde{l}}^{+\infty} D_l(l) D_{\theta}(l, \tilde{l}) \frac{\tilde{l}}{l} \frac{1}{\sqrt{l^2 - \tilde{l}^2}} dl \quad (2.5)$$

Il est maintenant nécessaire d'utiliser une fonction de distribution $D_{\theta}(\theta)$ compatible avec la présence d'une couche vitreuse fine par rapport à la longueur des dimères. $D_{\theta}(\theta) = (2/\pi) \sin^2(\theta)$ correspond, par exemple, à une probabilité nulle dans l'axe parallèle au faisceau d'électrons et une probabilité maximum dans le plan de l'échantillon. Toute puissance paire de $\sin(\theta)$ va également avoir cette propriété et $D_{\theta}(\theta)$ peut probablement s'exprimer comme une série en $\sin^{2n}(\theta)$. Le deuxième terme normalisé de cette série s'écrit comme $D_{\theta}(\theta) = (8/3\pi) \sin^4(\theta)$. La figure 2.21 est une représentation tridimensionnelle des deux premiers termes de la série.

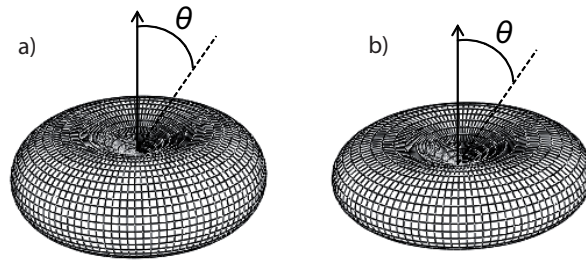


Figure 2.21 – Représentation tridimensionnelle des deux premiers termes de la série de la fonction de distribution $D_{\theta}(\theta)$, (a) $D_{\theta}(\theta) = (2/\pi) \sin^2(\theta)$, (b) $D_{\theta}(\theta) = (8/3\pi) \sin^4(\theta)$

Dans nos échantillons, nous avons observé des dimères avec des angles supérieurs ou égaux à $\pi/4$ entre le dimère et le plan de l'échantillon (par exemple sur la figure 2.19). Par conséquent, nous nous sommes limités aux termes en $\sin^2(\theta)$ et $\sin^4(\theta)$ pour cette analyse. Ces deux fonctions peuvent s'exprimer en fonction de l et \tilde{l} comme :

$$D_{\theta}(l, \tilde{l}) = \frac{2}{\pi} \left(\frac{\tilde{l}}{l} \right)^2 \quad D_{\theta}(l, \tilde{l}) = \frac{8}{3\pi} \left(\frac{\tilde{l}}{l} \right)^4 \quad (2.6)$$

On trace sur la figure 2.22 l'évolution de la distribution gaussienne de l , centrée à 45 nm avec un écart type de 3 nm, pour ces deux distributions angulaires. La courbe noire correspond à la distribution gaussienne initiale. La courbe bleue représente une distribution isotrope de l'orientation du dimère, $D_{\theta}=1/\pi$, qui s'étend jusqu'à $\tilde{l}=0$. Ceci signifie qu'il y a une probabilité non nulle de trouver des dimères orientés quasi parallèles à l'axe du faisceau d'électrons. Les courbes rouge et verte sont obtenues avec des distributions d'angles $D_{\theta}(\theta) = (2/\pi) \sin^2(\theta)$ et $D_{\theta}(\theta) = (8/3\pi) \sin^4(\theta)$. Le centre, la largeur et la forme

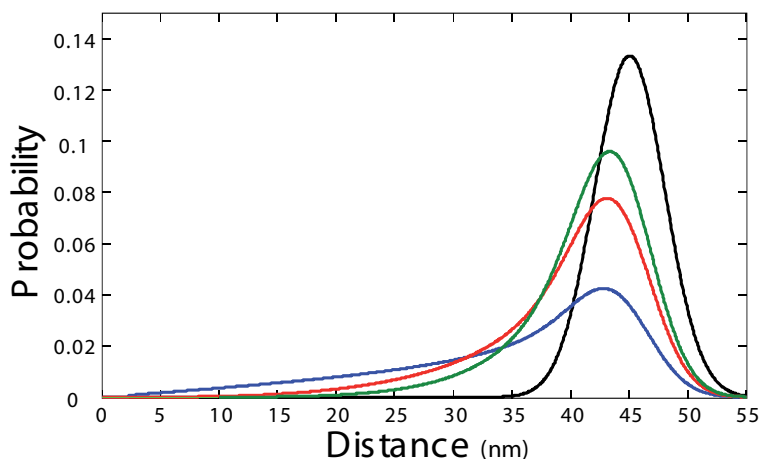


Figure 2.22 – Graphique de comparaison entre la distribution gaussienne D_l (courbe noire) et la distribution de projection $D_{\tilde{l}}(\tilde{l})$ pour $D_\theta(\theta) = \frac{1}{\pi}$ (courbe bleue), $D_\theta(\theta) = \frac{2}{\pi} \sin^2(\theta)$ (courbe rouge) et $D_\theta(\theta) = \frac{8}{3\pi} \sin^4(\theta)$ (courbe verte)

de ces distributions gaussiennes "projetées" correspondent qualitativement aux distributions des distances observées expérimentalement (figure 2.18). Lorsque l'on permute les deux fonctions angulaires, on observe une incertitude sur le centre des distributions d'environ 1 nm et sur les écarts types de 0.5 nm. Même si les données expérimentales ne peuvent pas être parfaitement ajustées sans connaître la fonction de projection exacte, l'utilisation d'une de ces deux distributions d'angles fournira une bonne estimation de la distance inter-particule.

2.3.3 Ajustement de la fonction de projection sur les données expérimentales

Nous obtenons les courbes noires de la figure 2.18 en utilisant la distribution d'angles $D_\theta(l, \tilde{l}) = (\frac{2}{\pi})(\tilde{l}/l)^2$. Les centres des distributions s , pour les trois géométries différentes, sont à 7 nm, 13 nm et 17.5 nm avec un écart type de ± 1 nm, ± 2 nm, ± 3 nm. Le choix déterministe de la fonction de projection angulaire introduit donc une erreur de l'ordre de 1 nm et 0.5 nm, respectivement, pour le centre des distributions et les écarts types. Il est important d'observer que les estimations de s correspondent aux distances attendues pour les échafaudages organiques utilisés. La longueur des doubles brin d'ADN de 50 pb et 30 pb est, respectivement, de 16.5 et 10 nm et la largeur de la double hélice est environ de 2 nm. Pour apprécier la distance totale entre les particules, nous devons prendre en compte la longueur du brin d'ADN, la longueur des groupements trithiolés et la couche de PEG qui est de l'ordre de 2 nm [63]. Les valeurs des distances, estimées par les ajustements des distributions de la figure 2.18, sont proches des longueurs maximales des différents éléments organiques impliqués dans les trois géométries puisqu'elles atteignent 6 nm, 14 nm et 20.5 nm. Il est donc probable que les charges négatives à la surface des NPsAu et de l'hélice d'ADN tendent à étirer la structure, en particulier pour les échantillons des distributions (b) et (c). Pour l'échantillon représenté par la distribution (a), il est même possible que l'hybridation ne se fasse pas sur toute la longueur du brin ; ce qui justifierait

une estimation de s plus élevée expérimentalement que celle attendue en sommant les différents éléments organiques impliqués.

Il est important de noter que pour maximiser la rigidité de l'ADN, la solution tampon utilisée pour les mesures de cryo-EM contient une quantité de charges plus faible ($<1\text{mM}$) que dans des études précédemment publiées sur la topologie d'échantillons or-ADN [50, 61, 52] (environ 1 mM de NaCl). A ces concentrations de sel, les températures de fusion des séquences de 30 bp et 50 bp sont respectivement de 44 et 55°C (ces valeurs ont été estimées en utilisant le logiciel Vector NTI de Invitrogen), ce qui indique que nos échantillons restent stables à température ambiante. Surtout, la concentration de NaCl va fortement influencer sur les distances inter-particules de NPsAu liées par ADN [50, 71]. Pour des concentrations de NaCl plus grandes que 300 mM , les mesures des distances sont plus courtes que celles attendues lorsque l'ADN est étiré. Cependant, pour de faibles forces ioniques (50 mM NaCl), les groupements sont étirés par les interactions électrostatiques avec un espacement cohérent avec l'échafaudage d'ADN utilisé [71]. Ceci conforte donc l'hypothèse que, dans nos échantillons pauvres en cations Na^+ , les dimères de NPsAu chargés négativement sont étirés et rigidifiés par des forces électrostatiques répulsives.

2.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu qu'il était possible de purifier des nano-particules d'or de 36 nm de diamètre préférentiellement attachées avec un seul brin d'ADN d'une longueur inférieure à 10 nm . La synthèse des dimères de nanoparticules d'or avec différentes longueurs de brins d'ADN est réalisée avec une grande pureté. On estime la distance inter-particule à partir d'images de cryo-EM en prenant en compte la distribution de diamètre des nanoparticules d'or et l'orientation du dimère par rapport à l'axe du faisceau d'électrons. Les mesures de distance sont en bon accord avec la longueur du brin d'ADN et la taille des groupements terminaux thiolés. Les dimères sont observés en géométrie étirée dans une solution tampon de faible force ionique.

La possibilité de fabriquer des groupements avec de larges particules espacées d'une courte distance va nous permettre d'étudier les phénomènes de couplage plasmonique dans des dimères uniques par microscopie confocale en champ sombre. Nous verrons ainsi qu'il est possible de faire varier la réponse optique des dimères en modifiant leurs paramètres géométriques (chapitre 3). Le fait de n'avoir qu'un brin d'ADN nous permettra surtout d'ajouter une molécule fluorescente au centre des dimères (chapitres 4.5, 5) : il nous sera ainsi possible de fabriquer à grande échelle des antennes optiques alimentées par un unique émetteur quantique.

Spectroscopie de diffusion d'antennes uniques assemblées sur ADN

Table des matières

3.1	Méthodes	59
3.1.1	Préparation des échantillons en chambre micro-fluidique	59
3.1.2	Dispositif expérimental	60
3.2	Résultats	63
3.2.1	Mesures des spectres de résonance	63
3.2.2	Analyse statistique des spectres de diffusion et corrélation avec leur morphologie	64
3.2.3	Comparaison entre les mesures expérimentales et des distributions théoriques	67
3.3	Conclusion	69

Dans ce chapitre, nous souhaitons étudier comment la variation de l'échafaudage d'ADN dans les dimères modifie leurs résonances plasmons. Comme les nanoparticules d'or ont un spectre d'extinction qui dépend de leur taille et de leur forme (qui peuvent varier d'un dimère à l'autre d'après les mesures en cryo-EM), des mesures optiques d'ensembles vont être dominées par des phénomènes d'élargissement inhomogènes. C'est pourquoi nous allons étudier des dimères individuels pour analyser l'évolution de leurs propriétés optiques en fonction de la longueur et la forme de l'hélice d'ADN qui les compose.

Nous présentons des mesures de spectres de diffusion de dimères de NPsAu de 36 nm de diamètre en microscopie confocale à champ sombre [51, 34, 61, 72, 52]. Nous verrons ainsi la corrélation entre la réduction de la distance entre les particules observées en cryo-EM et l'augmentation du couplage plasmon. Une étude statistique des distributions des fréquences de résonance est comparée à des calculs par la théorie de Mie généralisée, afin d'analyser l'influence de la rigidité de l'ADN sur les propriétés optiques des dimères. Nous avons vu dans le chapitre précédent que les dimères de particules d'or sont sensibles aux forces ioniques élevées, aux effets de séchage et aux interactions avec le substrat. Pour minimiser ces effets, les suspensions de groupements de particules sont étudiées dans l'eau.

Comme discuté dans le chapitre introductif, les nanoparticules d'or ont une interaction résonnante avec la lumière visible. Lorsqu'elles sont éclairées par une onde lumineuse proche de leur résonance plasmon, la polarisabilité diverge, ce qui conduit à une augmentation de la section efficace de diffusion. Parmi les modes multipolaires pouvant être induits dans une nanoparticule, le mode dipolaire est celui qui se couple le plus efficacement avec le champ lointain. Par conséquent, il est directement mesurable à l'aide d'un microscope confocal classique à champ sombre pour des particules d'or de diamètre supérieur à 30 nm. Pour des NPsAu plus petites, la section efficace d'absorption domine et il faut utiliser des méthodes interférométriques [73, 74] ou photothermiques [75] pour les étudier et les imager.

Lorsque deux particules sphériques sont très proches l'une de l'autre (distance bord-à-bord inférieure à leurs rayons), un couplage multipolaire de leur résonances plasmons a lieu en champ proche. En champ lointain, deux modes dipolaires dominent le rayonnement d'un dimère : les modes longitudinal et transverse. Néanmoins, le mode longitudinal domine nettement la diffusion d'un dimère et c'est lui que l'on observera essentiellement en champ sombre. La force du couplage en champ proche, qui dépend de la distance entre les particules, se traduit alors par un décalage spectral de la longueur d'onde de résonance vers le rouge (basses énergies). Il est donc possible d'étudier la force de couplage en champ

proche des modes plasmons entre deux particules par des mesures de spectre de diffusion en champ lointain.

3.1 Méthodes

3.1.1 Préparation des échantillons en chambre micro-fluidique

Les mesures optiques sont réalisées dans l'eau afin d'éviter que les groupements liés par ADN ne se dénaturent par déshydratation ou d'éventuelles interactions avec le substrat. Les échantillons sont introduits dans une chambre micro-fluidique contenant une solution tampon de faible force ionique. Les suspensions de dimères sont fabriquées puis extraites d'un gel d'agarose suivant la procédure décrite dans le chapitre précédent. Une représentation en coupe de la chambre micro-fluidique est présentée sur le figure 3.1.

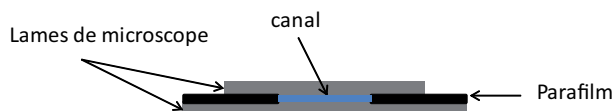


Figure 3.1 – Vue en coupe de la représentation schématique de la micro-chambre

On utilise deux lamelles de verre carrées de 200 mm et 250 mm de côté et de 120 μm d'épaisseur empilées et scellées ensemble avec deux couches de parafilm (épaisseur environ 200 μm). Cette structure en sandwich est chauffée à 100°C afin de coller les deux lamelles ensemble. Le volume du canal est compris entre 40 et 50 μL . Les lames de verre sont fonctionnalisées avec de la BSA-biotine et de la Neutravidine [76]. Le protocole est identique à celui présenté lors de la fonctionnalisation des grilles de TEM du chapitre précédent et les différentes solutions utilisées sont rincées après quelques minutes d'incubation avec du T50. La solution d'échantillon de NPsAu est, quant à elle, rincée à l'eau, puis la micro-chambre est scellée hermétiquement avec de la cire chaude. Par ce procédé, il est possible de faire des mesures de dimères en suspension dans l'eau avec une force ionique faible (< 1mM NaCl). Une des deux particule est enrobée de PEG biotinylé afin d'être greffée à la surface de la lame de la micro-chambre, tandis que la deuxième particule reste en suspension, comme illustré sur le schéma 3.2.

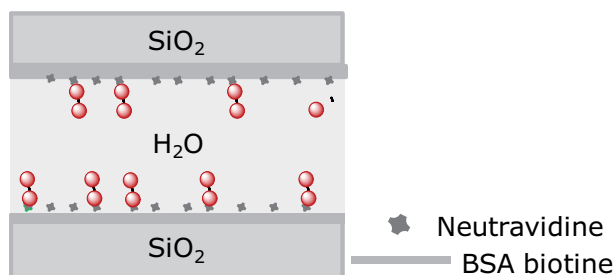


Figure 3.2 – Représentation schématique de la micro-chambre fonctionnalisée avec les dimères greffés à la surface

Le fait que les dimères soient étudiés dans l'eau, avec une faible concentration en NaCl, nous permet d'avoir un environnement à force ionique faible identique aux mesures de microscopie électronique. Nous avons vu lors de l'analyse en cryo-EM que, dans ces conditions, les nano-structures sont étirées par des forces électrostatiques répulsives. Des études ont en effet montré l'influence de la force ionique sur les mesures de spectres de diffusion [77]. Nous verrons dans la suite de ce chapitre une comparaison entre les mesures des spectres de résonance et la caractérisation morphologique faite à partir des mesures de cryo-EM.

3.1.2 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est basé sur une excitation et une détection en champ lointain. L'acquisition des spectres de diffusion des trois géométries de dimères, décrites dans le chapitre précédent, est réalisée à l'aide d'un microscope confocal classique en champ sombre, permettant de collecter la lumière diffusée par des objets uniques. Pour cela, le montage est basé sur un microscope classique inversé (IX71, Olympus) avec une excitation à l'aide d'une lumière blanche incohérente non polarisée. La focalisation se fait sur l'échantillon par l'intermédiaire d'un condenseur en champ sombre à immersion à huile, d'ouverture numérique $NA \in [1.2-1.4]$. La lumière diffusée par l'objet est collectée par un objectif à huile d'ouverture numérique plus petite que celle du condenseur ($NA=0.6$), afin de collecter uniquement la lumière diffusée et de s'affranchir des rayons incidents (voir illustration 3.3).

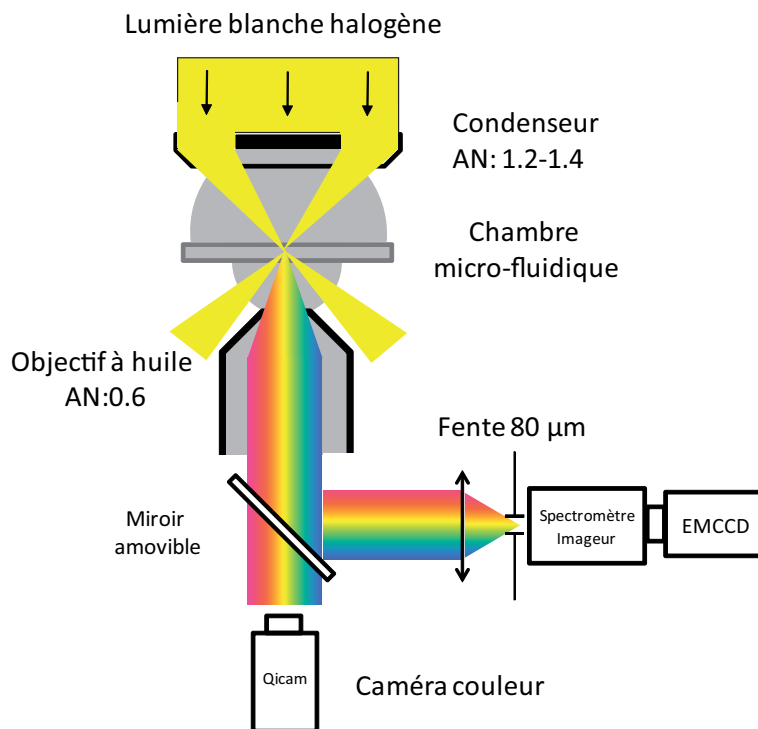


Figure 3.3 – Représentation schématique d'un microscope en champ sombre associé à une caméra EMCCD+ spectromètre imageur et une CCD couleur.

La diffusion des NPsAu peut être soit dirigée vers une caméra couleur CCD (Qicam, Roper), permettant d'observer une large zone de l'échantillon (figure 3.4), soit vers un spectromètre imageur (ImSpector V8E, Specim) couplé à une caméra EMCCD (iXon+ 512×512, Andor) comme illustré sur la figure 3.3. La fente de $80\mu\text{m}$ à l'entrée du spectromètre filtre spatialement la lumière diffusée et nous permet ainsi d'étudier des objets uniques.

La figure 3.4 illustre l'image en champ sombre de dimères de NPsAu de 36 nm de diamètre liés par un double brin d'ADN de 50 pb prise par la caméra couleur (Qicam). Les nano-structures étudiées ont une grande section efficace de diffusion, il est ainsi possible de les analyser en champ lointain. Nous avons vu dans le premier chapitre que la fréquence plasmon dépend à la fois de la taille et de la forme des nano-structures. Ces effets sont visibles sur l'image 3.3, un grand nombre de diffuseurs présente des couleurs différentes (allant du vert au orange). Après une analyse précise des spectres de diffusion, nous verrons dans la suite de ce chapitre, quels sont les principaux facteurs qui engendrent ces variations de couleurs.

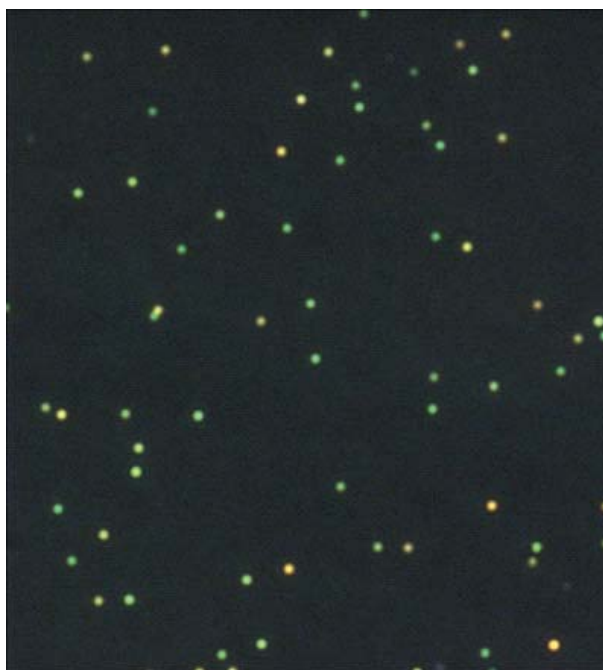


Figure 3.4 – Image en couleur de diffusion de dimères en plein champ, prise par la caméra couleur Qicam

Les images obtenues par la caméra EMCCD comportent le spectre des dimères uniques et sont traitées afin d'estimer les sections efficaces de diffusion. En pratique, la fente du spectromètre joue le rôle de trou de confocalité permettant de sélectionner une zone spatiale de l'échantillon dans la direction horizontale, et le réseau disperse spectralement la lumière selon la direction verticale du plan de la caméra. L'image 3.5 représente l'intensité de la lumière diffusée mesurée après dispersion spectrale sur la caméra EMCCD. La zone délimitée en pointillés encadre l'intensité de diffusion de l'objet à analyser, le signal de fond est évalué dans la partie de l'image encadrée par un trait continu.

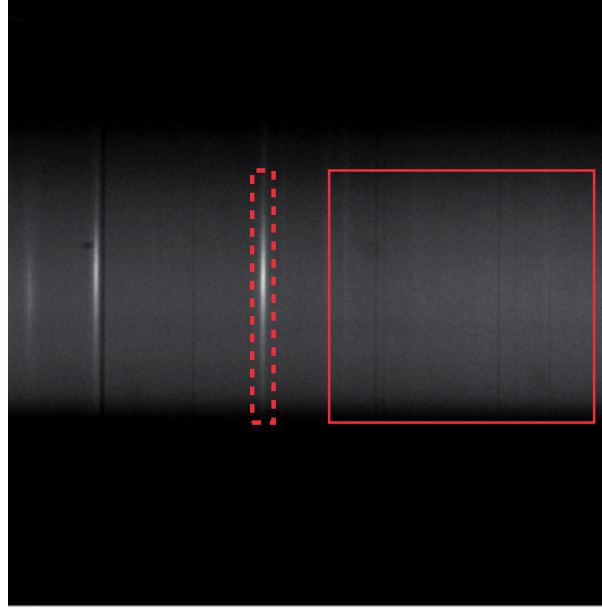


Figure 3.5 – Image spectrale acquise par la caméra EMCCD avec un temps d’intégration de 3 secondes et un gain de 30. La zone délimitée en pointillés correspond à l’intensité de la lumière diffusée par un objet unique : l’axe horizontal indique la position spatiale de l’objet sur l’échantillon et la lumière diffractée par le réseau est selon l’axe vertical. Le cadre continu rouge correspond à la zone dans laquelle est estimée le signal de fond

Avant de traiter les spectres de diffusion des NPsAu, nous devons calibrer le dispositif en longueur d’onde car l’image 3.5 est donnée en pixels. Une relation affine permet de convertir les numéros de pixels de l’axe vertical en longueur d’onde. L’étalonnage du dispositif est réalisé en mesurant le spectre d’une lampe à vapeur de mercure. Pour ne conserver que l’information spectrale du diffuseur S , nous extrayons un signal de fond dans une zone contigue au diffuseur à analyser S_{fond} , normalisé à 1 pixel d’intégration. Ce signal résiduel est ensuite soustrait des mesures spectrales S_{brut} avant correction par le spectre de la lumière blanche d’excitation S_{fond} . Le spectre de diffusion S est donc estimé de la façon suivante :

$$S = \frac{S_{brut} - S_{fond}}{S_{fond}} \quad (3.1)$$

La longueur d’onde de résonance obtenue avec S n’est pas sensible aux erreurs d’alignement une fois le spectromètre calibré. C’est pourquoi nous allons mettre l’accent sur l’évolution de cette fréquence en fonction de la géométrie des dimères pour mettre en évidence la force du couplage plasmon. Par contre, la mesure de l’amplitude de la section efficace de diffusion à résonance dépend fortement de l’alignement du montage. Il est alors difficile d’analyser l’évolution de cette amplitude sur plusieurs dizaines de dimères dans des micro-chambres différentes. Toutefois, comme toutes les acquisitions de spectres sont faites dans les mêmes conditions (le temps d’intégration de 3 s avec un gain de 30), la variation de l’intensité mesurée est directement liée à l’amplitude de la section efficace de

diffusion des dimères, aux erreurs d'alignement près.

3.2 Résultats

3.2.1 Mesures des spectres de résonance

La caractérisation de la résonance plasmon est faite pour des dimères symétriques composés des plus grosses particules (36 nm de diamètre) pour lesquelles nous maîtrisons la fonctionnalisation. La section efficace de diffusion des particules de 36 nm de diamètre est en effet 5,6 fois plus grande que celle de particules de 27 nm. Les mesures optiques sont faites à faible concentration pour éviter de mesurer plusieurs groupements dans le même volume focal. Les diffuseurs sont alors séparés les uns des autres de quelques micromètres.

La figure 3.6-a est une image en champ sombre de dimères de nanoparticules symétriques de 36 nm de diamètre liés par un double brin d'ADN de 50 pb perpendiculaire à l'axe principal. Chaque point lumineux correspond à une nanostructure unique dont nous pouvons mesurer le spectre de diffusion.

La figure 3.6-b représente des mesures typiques du spectre de diffusion des quatre géométries de nano-structures étudiées. La courbe bleue illustre la résonance d'une particule seule de 36 nm. Les dimères de 50 pb et 30 pb, où l'ADN est parallèle à l'axe du dimère, sont présentés en vert et jaune. La courbe rouge est la mesure du spectre de résonance d'un dimère lié par un double brin de 50 pb perpendiculaire à l'axe du dimère. La figure 3.6-b montre donc que les dimères de nanoparticules d'or, comparés aux particules d'or seules, ont une section efficace de diffusion plus importante et un décalage spectral vers le rouge. Ces deux effets sont d'autant plus accentués que la longueur des brins d'ADN est réduite. Ce phénomène est du à la domination du spectre de diffusion des dimères par le mode longitudinal qui rayonne plus efficacement que les modes transverse. Nous retrouvons donc le phénomène introduit en chapitre introductif : la résonance longitudinale d'un dimère se décale vers le rouge en réduisant le longueur du brin d'ADN.

En regardant plus précisément la figure 3.6-a, on observe différentes intensités et couleurs de diffusion pour chaque point. Ceci provient de la pureté de nos échantillons qui n'est pas de 100 % en dimères mais de l'ordre de 70 % comme observé en cryo-EM. Ainsi la nanostructure entourée en rouge a un spectre et une section efficace de diffusion typique d'un dimère (l'échantillon étudié implique une brin d'ADN de 50 pb perpendiculaire à l'axe du dimère). Par contre, l'objet entouré en bleu a un spectre typique d'une nanoparticule unique (similaire au spectre bleu de la figure 3.6-b). Le cercle blanc a un spectre ne correspondant ni à l'un ni à l'autre : sa section efficace de diffusion est trop élevée et son spectre est trop décalé dans le jaune. Il s'agit probablement d'un agrégat plus gros ou d'un dimère faisant intervenir une particule fortement non-sphérique (comme parfois observé en cryo-EM) [34]. La figure 3.7 illustre un exemple de mesures faite sur un agrégat et/ou des particules non sphériques. Nous observons deux résonances centrées, respectivement,

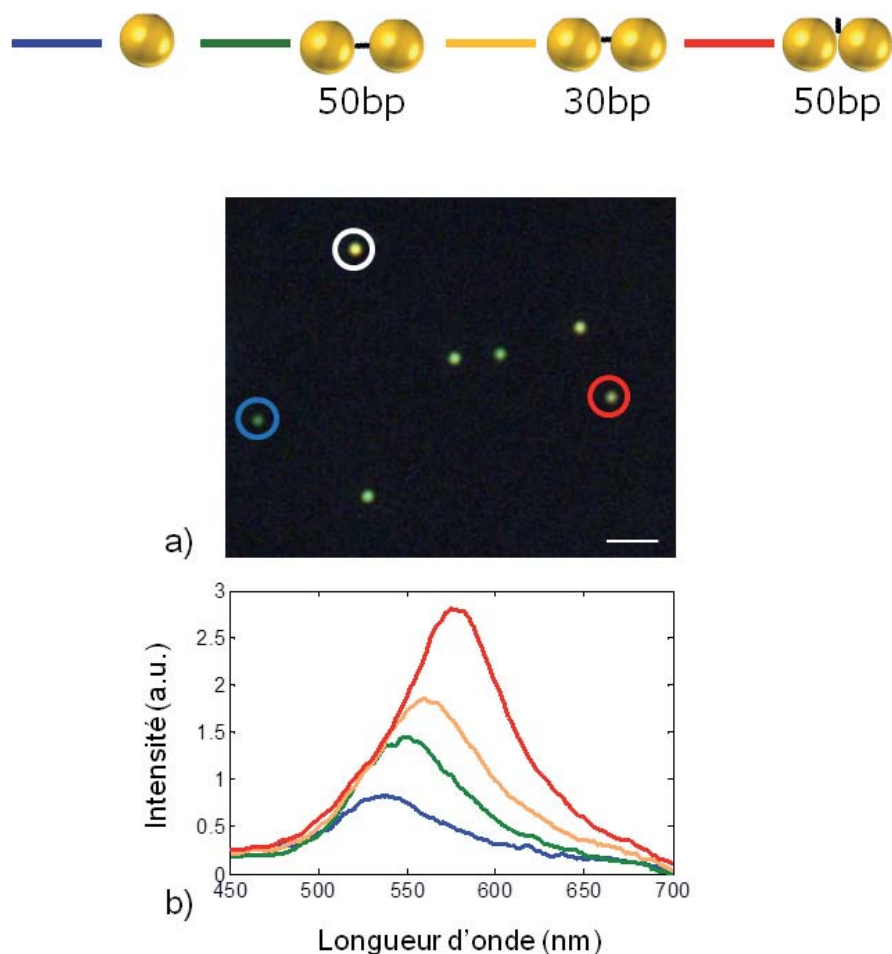


Figure 3.6 – (a) Exemple d’images en champ sombre prises par la caméra couleur (Qicam , temps d’acquisition de 500 ms). Le diffuseur entouré d’un cercle bleu représente une particule seule de 36 nm, le cercle rouge entoure la lumière diffusée par un dimère, et le cercle blanc identifie un agrégat. (b) Spectres de résonance de particules seules (courbe bleue), de dimères de 50 pb et 30 pb (courbes verte et jaune), et d’un dimère lié d’un double brin d’ADN de 50 pb perpendiculaire à l’axe principal (courbe rouge).

à 520 nm et à 630 nm. Pour étudier précisément les propriétés optiques des dimères, nous avons effectué une étude statistique sur un grand nombre de diffuseurs en excluant les nanostructures émettant comme des particules seules (entre 26% et 29% des mesures) ou celles dont la résonance est fortement décalée vers le rouge ou présente deux résonances (environ 6% du total des mesures). Ces pourcentages sont similaires à ceux observés pour des particules seules ou des agrégats en images de cryo-EM.

3.2.2 Analyse statistique des spectres de diffusion et corrélation avec leur morphologie

L’analyse statistique nécessite d’étudier un grand nombre de diffuseurs. Plusieurs dizaines de spectres de diffusion ont été mesurés pour les échantillons de particules seules ainsi que pour les trois géométries de dimères décrites plus haut. Au total 185 spectres

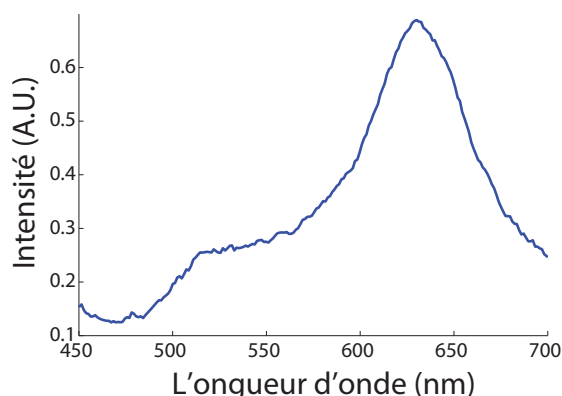


Figure 3.7 – Spectre typique de résonance, significatif d'une agrégation ou/et des particules non sphériques

ont pu être traités.

Les distributions des longueurs d'onde de résonance, illustrées sur la figure 3.8, comprennent 67% des spectres mesurés après soustraction des mesures correspondant à des particules seules et à des agrégats. Nous les associons, sur la même figure, aux distributions de distances inter-particules de dimères et aux diamètres des particules analysés à partir des images de cryo-EM. Les encadrés a(i) et b(i) de la figure 3.8 représentent les distributions des spectres de résonance et des distances inter-particules de dimères liées par un double brin d'ADN de 50 pb perpendiculaire à l'axe du dimère. Les encadrés a(ii) et b(ii) ainsi que a(iii) et b(iii) correspondent aux distributions de dimères liés par un double brin de 30 pb et 50 pb. L'histogramme des diamètres des particules d'or illustré dans l'encadré a(iv) a permis d'estimer leur taille en ajustant deux distributions gaussiennes centrées à 27 nm et 36 nm. Les longueurs d'onde de résonance de particules de 36 nm seules sont affichées sur la figure b(iv).

Nous observons sur les encadrés figures b(i),(ii),(iii), un léger décalage vers le bleu des centres de masse des distributions de longueur d'onde de résonance. Ceci signifie que l'allongement de longueur de l'échafaudage d'ADN entraîne bien une diminution du couplage plasmon. Toutefois, ce décalage est faible par rapport aux larges dispersions de mesures pour les trois échantillons de dimères (figure b(i-iii)).

Deux principales conclusions peuvent être tirées de ces figures : les brins d'ADN les plus courts sont corrélés avec les spectres de résonance les plus décalés vers le rouge, comme l'illustrent les distributions a/b(iv) à a/b(i) ; et les mesures topologiques et optiques (colonnes a et b), présentent toutes de larges distributions.

En pratique, la largeur des distributions en topologie provient de deux contributions :

-La distribution des diamètres des particules seules, estimées à 27.3 nm et 36 nm avec des écarts types respectifs de ± 1.65 nm et ± 2.8 nm (figure 3.8b(iv)).

-La distribution des distances inter-particules (colonne(a)). La courbe noire sur les encadrés a(i-iii) correspond à une distribution gaussienne de distance "centre à centre". L'estimation de s correspond aux distances "bord à bord" des trois géométries de brin

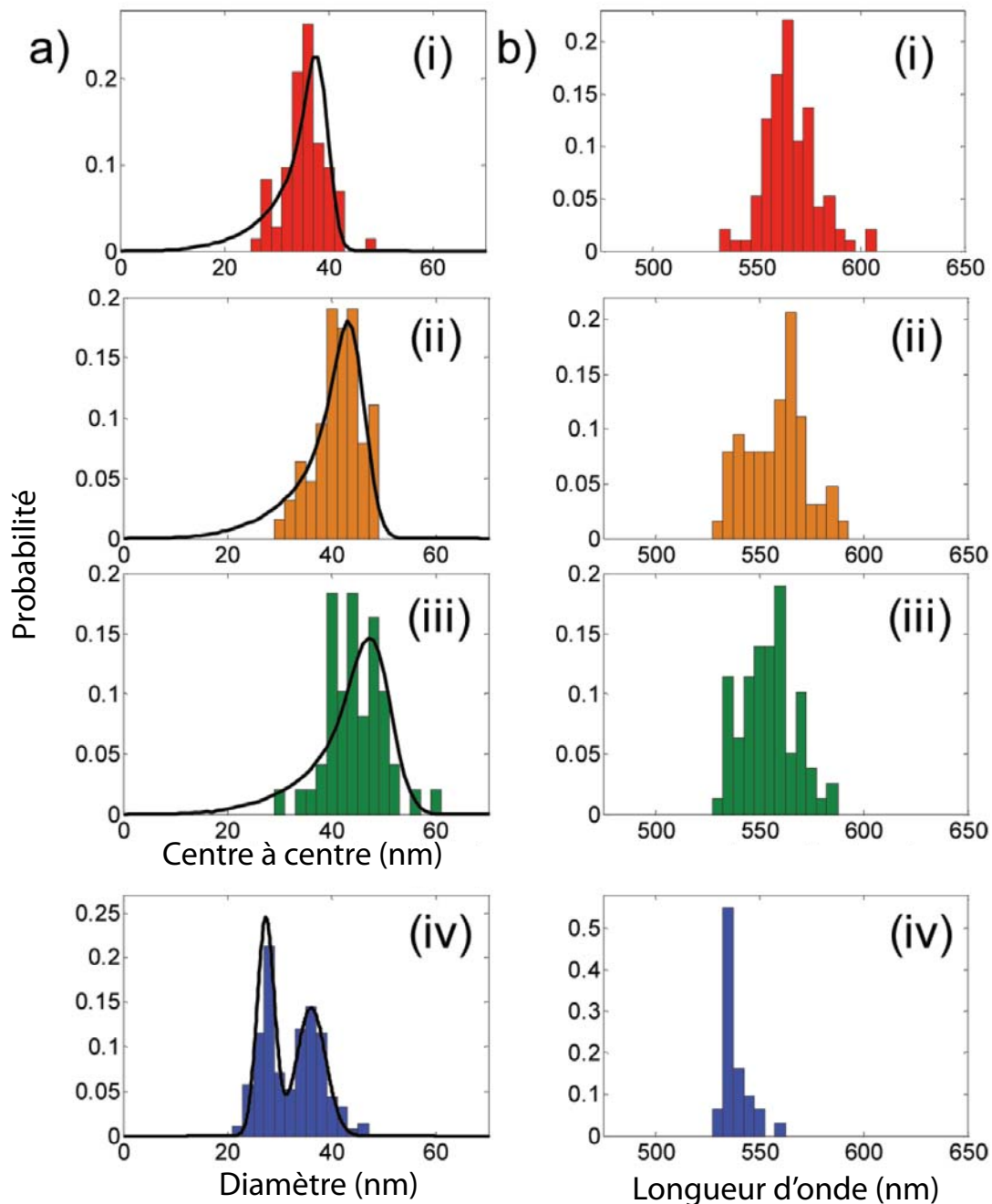


Figure 3.8 – Distributions (a) des distances "centre à centre"(i-iii) et diamètre (iv) de dimères de NPsAu de 27 et 36 nm de diamètre, estimées à partir des images de Cryo-TEM. (b) Distributions des spectres de résonance de NPsAu seules de 36nm et de dimères symétriques mesurées par microscopie en champ sombre d'objets uniques : (i)NPsAu liées par un double brin d'ADN de 50 pb perpendiculaire à l'axe du dimère(barre rouge);(ii)séquences d'ADN de 30 pb parallèle à l'axe du dimère (barre orange);(iii)séquences d'ADN de 50 pb parallèle à l'axe du dimère (barre verte); Particules seules(iv). La courbe noire des encadrés a(i-iii) correspond à la fonction de projection de la distribution gaussienne des distances s et la distribution gaussienne des diamètres des particules de 36 et 27 nm de diamètre a(iv). Les barres (a) et (b) ont une largeur de 2 nm et 5 nm.

d'ADN centrées à 7, 13 et 17.5 nm avec des écarts types respectifs de ± 1 , ± 2 et ± 3 nm. Le détail du calcul de la fonction permettant d'évaluer s et la discussion sur l'analyse des valeurs des distances estimées sont décrits dans le chapitre précédent. La cohérence des valeurs des distances trouvées en fonction de la force ionique du milieu et du type d'échantillon est également détaillée dans le chapitre précédent.

Nous souhaitons donc comprendre si les distributions de distances observées en cryo-EM expliquent à elles seules les larges distributions de fréquences de résonances mesurées. Nous comparons donc, dans le paragraphe suivant, les résultats des mesures expérimentales avec des distributions théoriques prenant en compte les morphologies expérimentales des échantillons.

3.2.3 Comparaison entre les mesures expérimentales et des distributions théoriques

Pour analyser les distributions des longueurs d'ondes de résonance expérimentales de la figure 3.8b, on les compare avec des calculs théoriques faits à partir de la théorie de Mie généralisée (TMG). Les calculs ont été effectués par l'équipe des Dr. N. Bonod et B. Stout de l'Institut Fresnel à Marseille. Cette méthode de calcul nous fournit une résolution analytique des équations de Maxwell pour des groupements de sphères dans un environnement diélectrique homogène [41, 78, 79]. Les solutions numériques sont résolues pour un nombre limité de multipôles ($n=30$) lorsque la convergence du calcul est obtenue. La constante diélectrique de l'or est tabulée par des valeurs de la littérature [80]. Les calculs nous permettent d'obtenir la longueur d'onde de résonance plasmon du mode longitudinal pour les trois géométries de dimères de NPsAu. Les mesures optiques sont faites en solution, mais les particules d'or sont entourées par des molécules organiques telles que le PEG, l'ADN et toutes les protéines utilisées pour fonctionnaliser les surfaces de verre de la micro-chambre. L'environnement diélectrique n'est donc pas homogène avec une valeur qui varie entre 1.33 (l'eau) et 1.5 (composants organiques). Or, les caractéristiques du milieu influent sur la réponse optique des nano-structures : de nombreuses études ont montré expérimentalement le décalage spectral de la résonance plasmon de dimères en fonction de l'indice de réfraction du milieu [35].

La figure 3.9a montre le résultat des calculs de la longueur d'onde de résonance longitudinale des dimères de NPsAu de 36 nm en fonction de la distance inter-particule s pour trois différentes valeurs de la constante diélectrique environnante. Nous superposons aux calculs théoriques les valeurs des centres des distributions des données expérimentales de la figure 3.8b des trois différentes géométries de dimères (carrés de couleur). Les valeurs des distances s , et les barres d'erreurs horizontales, sont estimées à partir des centres et des écarts types de l'ajustement Gaussien de la figure 3.8a. Les longueurs d'ondes de résonances des géométries de dimères et l'évaluation de la barre d'erreur proviennent, quant à elle, des centres et des écarts types de l'ajustement Gaussien de la figure 3.8b.

L'évolution des longueurs d'onde de résonance expérimentales, pour les différents brins

d'ADN, suit la courbe théorique rouge à $n=1.4$. Nous observons donc que les nanostructures sont dans un environnement d'indice diélectrique intermédiaire entre 1.33 et 1.5. La courbe théorique rouge ne suit pas exactement les valeurs mesurées expérimentalement, mais permet d'estimer l'indice à considérer dans des distributions théoriques de longueurs d'onde de résonance.

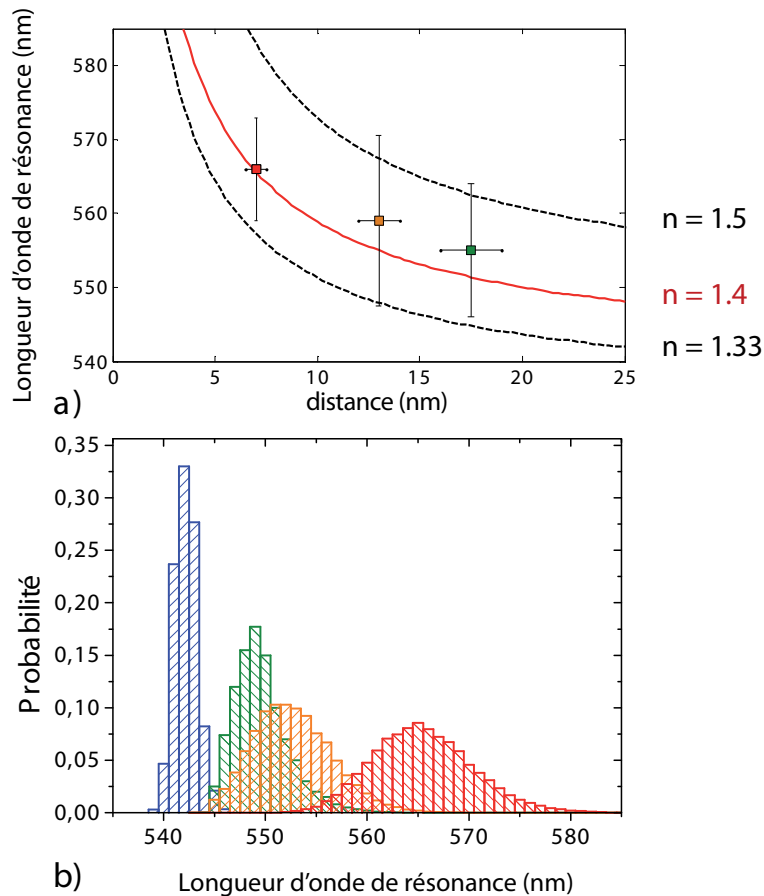


Figure 3.9 – (a) Calculs théoriques de la résonance plasmon du mode longitudinal de sphère de NPAu de 36 nm de diamètre et de dimères en fonction de la distance, pour différents indices de réfraction, qui sont comparés aux données expérimentales. Les courbes du bas vers le haut correspondent à un indice de réfraction de 1.33 à 1.5, $n=1.4$ pour la courbe rouge. (b) Calculs théoriques des distributions des longueurs d'onde de résonance estimés par TMG pour des dimères de particules sphériques en prenant en compte les distributions de diamètre et de distance de la figure 3.8a pour les trois échantillons de dimères et les particules seules de 36 nm avec $n=1.4$ (la largeur de la barre est de 1 nm) : NPsAu seules (rayure bleue) ; NPsAu liées par un double brin d'ADN de 50 pb perpendiculaire à l'axe du dimère (rayure rouge) ; séquences d'ADN de 30 pb parallèle à l'axe du dimère (rayure orange) ; séquences d'ADN de 50 pb parallèle à l'axe du dimère (rayure verte).

Un des principaux avantages de la théorie de Mie généralisée est la vitesse de calcul qui permet d'étudier un grand nombre de variations des paramètres du système. La figure 3.9b présente un calcul théorique de la distribution de longueurs d'onde de résonance, en prenant en compte la distribution Gaussienne des diamètres des particules seules et des distances inter-particules estimées à partir des images de cryo-EM.

Le centre des distributions théoriques coïncide avec les données mesurées mais la largeur

des distributions est moins étendue que l'observation expérimentale. L'écart type des calculs théoriques est 2.5 fois plus petit pour les particules seules et les plus courts dimères (représentés sur la figure 3.8 a(i) et b(i)), tandis qu'il est pratiquement 4 fois plus petit pour les dimères de 30 pb et 50 pb (figures 3.8 a/b(ii) et a/b(iii)). Nous observons également, une large distribution des spectres de résonance des particules seules sur la figure 3.9b. Globalement, toutes les distributions théoriques sont nettement plus étroites que les distributions des longueurs d'onde mesurées. Des facteurs supplémentaires doivent donc être pris en compte pour expliquer les distributions expérimentales tels que la variation locale de l'indice diélectrique, et la non-sphéricité des particules. L'influence de la forme des particules sur les spectres de résonance de dimères a d'ailleurs été démontrée et discutée dans la littérature [34].

Afin de comprendre avec précision l'influence de la rigidité des liaisons de brin d'ADN sur les propriétés optiques de dimères auto assemblés, il serait donc nécessaire de réduire la dispersion de taille et de forme de la solution de NPsAu. Toutefois, la faible dispersion des distributions théoriques pour les dimères de 30 pb et 50 pb (en prenant en compte les variations de taille et de distances estimées expérimentalement) signifie que la flexibilité de l'échafaudage organique formant le dimère n'est pas le facteur principal d'élargissement des distributions de fréquences de résonance. L'influence des propriétés mécaniques de l'ADN sur les réponses optiques des dimères dépendra probablement de la force ionique du milieu, conservée faible ici pour maintenir la rigidité de l'ADN par répulsion électrostatique.

3.3 Conclusion

Il est possible de caractériser des particules d'or de 36 nm ainsi que des dimères avec de courtes distances inter-particule en mesurant le couplage des modes plasmoniques par le biais de leur spectre de diffusion. Cette étude fut réalisée avec un microscope confocal classique en champ sombre associé à un spectromètre, permettant de mesurer des objets uniques. Nous avons vérifié qu'une diminution de la distance entre les NPs entraîne une augmentation du couplage plasmon avec un décalage vers le rouge du mode longitudinal. Les mesures des distributions des fréquences de résonance ont été analysées en utilisant des calculs par théorie de Mie généralisée qui prennent en compte les distributions morphologiques estimées en cryo-EM. Cette analyse indique une influence minimale de la flexibilité de l'ADN sur les larges distributions mesurées. La dispersion de forme des NPs est un paramètre probablement plus influent. L'utilisation de brin d'ADN pour contrôler la distance inter-particule paraît donc robuste pour contrôler la position d'une molécule fluorescente unique placée spécifiquement au centre du dimère.

Dimères de nanoparticules d'or alimentés par une molécule unique :
exaltation du taux d'émission spontanée

Table des matières

4.1 Problématiques	73
4.1.1 Choix d'un émetteur fluorescent	75
4.1.2 Effet du ROXS sur la Stabilité du fluorophore	77
4.2 Méthodes expérimentales	79
4.2.1 Synthèse des échantillons	80
4.2.2 Préparation de la micro-chambre	81
4.2.3 Dispositif expérimental	81
4.3 Résultats expérimentaux	83
4.3.1 Mesure de molécules uniques et traitement des données	83
4.3.2 Analyse statistique de l'exaltation des taux d'émission spontanée	85
4.4 Analyse par la théorie de Mie généralisée des distributions de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$	87
4.4.1 Distributions théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour une distribution iso- trope des orientations moléculaires	88
4.4.2 Distributions théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour une variation nanomé- trique des distances émetteur-particules	90
4.4.3 Discussion sur les distributions de taux d'émission spontanée	91
4.5 Efficacité théorique et expérimentale des nanoantennes	92
4.5.1 Calculs théoriques de l'efficacité des nanostructures	92
4.5.2 Mesures expérimentales du signal de fluorescence	93
4.6 Source de photons uniques accélérés	94
4.6.1 Dispositif Hanbury-Brown & Twiss	94
4.6.2 Mesures des anti-coïncidences	95

4.7 Conclusions 96

Les fréquences optiques représentent une gamme particulièrement intéressante du spectre électromagnétique car elles correspondent aux transitions électroniques les moins énergétiques de la matière mais sont globalement hors de la gamme de longueur d'onde des phonons. Ainsi, une structure nanométrique - molécule organique fortement π -conjuguée, cation métallique ou boîte quantique semi-conductrice - sera ressentie par la lumière comme un système quantique individuel. Toutefois, alors que les photons interagissent efficacement avec un atome lorsqu'ils ont une fréquence correspondant exactement à la différence d'énergie entre les niveaux de celui-ci, des élargissements homogènes ou inhomogènes en matière condensée entravent la capacité des nanostructures d'absorber, de diffuser ou d'émettre de la lumière. Ces faibles sections efficaces sont associées à une mauvaise adaptation d'impédance entre la longueur d'onde dans le visible et la taille nanométrique de l'objet [31]. Des antennes optiques peuvent alors être utilisées pour compenser ce décalage d'impédance sur une large gamme de fréquence afin d'exalter, aux échelles nanométriques, l'interaction lumière-matière. Dans ce chapitre, nous verrons comment utiliser l'ADN pour introduire une molécule unique au centre des dimères de nano-particules. Nous montrerons ainsi que ces nanostructures correspondent à des antennes avec des exaltations du taux d'émission spontané de deux ordres de grandeur tout en restant des sources de photons uniques. Une comparaison quantitative entre l'exaltation du taux d'émission et des calculs théoriques, confirmera le contrôle de la position d'un émetteur quantique à l'échelle du nanomètre, tout en produisant 10 milliards de copies de ces structures en parallèle.

4.1 Problématiques

L'environnement électromagnétique d'un émetteur est fortement perturbé par la présence d'une antenne polarisable, et les travaux fondateurs de Purcell indiquent que le taux d'émission spontanée sera alors fortement modifié [12,81]. Contrairement aux micro-cavités utilisées en électrodynamique quantique, les antennes optiques ont une influence large bande pour exalter l'émission spontanée d'un émetteur en matière condensée à température ambiante [31,30]. Ainsi, la largeur de la résonance des dimères d'or, estimée dans le chapitre précédent, est similaire aux spectres de luminescence de molécules ou de nanostructures luminescentes. En terme de facteur de Purcell, le faible facteur de qualité de cette résonance est compensé par un confinement du champ sub-longueur d'onde. Cependant les métaux nobles introduisent des pertes non-négligeables : il existe des canaux de désexcitation non-radiatifs qui dominent pour de courtes distances entre l'émetteur et l'antenne due à un couplage avec les modes multipolaires [12]. Ces modes ne sont pas

radiatifs et sont généralement décrits comme des "modes sombres" car ils ne rayonnent pas en champ lointain. En revanche, les résonances dipolaires des nanoantennes sont brillantes et se couplent avec le champ lointain. Les particules sphériques d'or ou d'argent ne sont toutefois pas des antennes efficaces [12] à cause du chevauchement spectral des modes dipolaires et multipolaires et au faible confinement du champ. Leur position peut cependant être contrôlée aux échelles nanométrique pour se coupler avec des molécules uniques (MU) à l'aide de microscopes à force atomique [13, 14]. Les particules de forme allongée et les paires de particules, avec de courtes distances inter-particules, permettent de concevoir des antennes plus efficaces, car elles induisent un meilleur confinement électromagnétique et comportent un mode longitudinal brillant décalé vers le rouge [82, 43]. L'utilisation de tels objets implique toutefois des techniques de synthèse permettant, d'une part, de contrôler la position d'un émetteur quantique unique, et d'autre part, de le positionner sur la zone spécifique où le champ est confiné.

La reproductibilité et la fabrication à grande échelle de nanoantennes alimentées par un émetteur unique sont complexes car des modulations géométriques à l'échelle du nanomètre engendrent une modification notable du couplage électromagnétique qui fait varier de façon drastique la densité locale d'état optique [12, 13, 14] et le diagramme de rayonnement final [42, 83]. Une interaction efficace entre un émetteur et une antenne a été seulement observée récemment dans trois cas spécifiques. Une étude de l'Université de Stanford a porté sur le couplage de molécules avec des antennes "nœud papillon", fabriquées par lithographie électronique [15]. Toutefois, dans ce cas, les molécules sont dispersées de manière aléatoire et l'obtention d'un couplage émetteur-antenne efficace est statistiquement rarissime. Deux études plus contrôlées ont démontré l'interaction entre une boîte quantique semiconductrice et une antenne d'or de type Yagi-Uda [16] ; ainsi que le couplage entre des centres luminescents du diamant (NV pour nitrogen vacancy) et une nano-ouverture en argent [17]. Cependant, ces deux articles exploitent des techniques lithographiques qui induisent une incertitude sur la position du dipôle de transition de l'émetteur dans l'antenne de plusieurs dizaines de nanomètres.

L'utilisation d'ADN synthétique a par contre permis de placer des MU à proximité de NPsAu de 15 nm de diamètre avec une résolution nanométrique [20]. Néanmoins, les sphères d'or de cette taille éteignent l'émission spontanée par leur section efficace de diffusion négligeable. L'exaltation de la fluorescence par des antennes optiques nécessiterait un groupement de plusieurs grandes sphères couplées électromagnétiquement grâce à une distance interparticule plus petite que le rayon des particules [43]. Nous avons vu dans les chapitres précédents que nous sommes capables de produire des dimères de particules d'or de 36 nm de diamètre liées par un unique double brin d'ADN d'une longueur de l'ordre de 10 nm, avec une importante section efficace de diffusion [10]. Les caractérisations optiques et morphologiques de nos échantillons ont montré que les brins d'ADN sont étirés par des forces électrostatiques lorsqu'ils sont dans un milieu de faible force ionique [10]. Les longueurs des brins d'ADN peuvent être modifiées afin de varier la distance entre la molécule, placée au centre du double brin, et la surface d'or. Pour valider notre méthode

de fabrication et mettre en évidence l'interaction lumière-matière, le choix de la molécule est une étape importante.

4.1.1 Choix d'un émetteur fluorescent

Les antennes optiques permettent de concentrer la lumière propagative incidente sur un volume nanométrique de matière condensée. Réciproquement, lorsque de la lumière est émise par cet échantillon de matière - boîte quantique, molécule fluorescente, etc... - l'antenne permet d'introduire de nouveaux canaux de rayonnement électromagnétique [84, 13, 14]. Nous savons fabriquer des dimères de particules sphériques d'or liées par une unique double hélice d'ADN sur lequel un émetteur quantique pourrait être placé [85]. Deux grandes catégories d'émetteurs peuvent être considérées en matière condensée : les systèmes moléculaires (organique ou organo-métalliques) et les nanostructures inorganiques (boîtes quantiques semiconductrices, centres NV du diamant, clusters de métaux nobles...). Le choix du bon émetteur pour alimenter l'antenne va ainsi prendre en compte la capacité d'intégration sur une hélice d'ADN mais aussi ses propriétés photophysiques. Le temps de vie de l'émetteur dans le vide (ou un milieu homogène d'indice faible) est ainsi un critère primordial pour qu'une modulation de plusieurs ordres de grandeur des taux d'émission soit mesurable expérimentalement (l'état de l'art est d'environ 10 ns pour une molécule unique [15]). De plus, la capacité de l'émetteur d'agir comme un dipôle unique est importante pour pouvoir analyser le comportement de l'antenne alimentée par des calculs d'électrodynamique classique. Des propriétés comme le rendement quantique, la photostabilité, et la position spectrale des raies d'absorption et d'émission, rentrent également en compte dans cette sélection.

Nanostructures inorganiques :

Boîtes quantiques : les boîtes quantiques semiconductrices sont des particules nanométriques dont la taille permet un confinement quantique de leurs fonctions d'onde électroniques. Leurs propriétés d'émissions spontanées les rapprochent d'atomes artificiels avec des temps de vie supérieurs à la dizaine de nanosecondes et une longueur d'onde de fluorescence dépendant directement de leur taille (pouvant varier de peut varier de 1 à 60 nm [86]). En conjonction avec leur bonne photostabilité (malgré un clignotement important), ces propriétés en font de bonnes candidates pour alimenter une nanoantenne. Surtout, des études récentes ont prouvé qu'il est possible de les greffer à l'ADN [87, 88, 22]. Toutefois, ces émetteurs présentent plusieurs défauts majeurs pour étudier précisément des modifications de taux d'émission dans des antennes optiques et pour produire des sources de photons uniques. Tout d'abord, elles ne rayonnent pas comme un dipôle oscillant unique mais comme deux dipôles dégénérés d'amplitude relative variable [89, 90, 91]. Surtout, l'émission spontanée des boîtes quantiques ne présente pas, en général, une désexcitation mono-exponentielle [92]. De plus, soumises à de fortes excitations (comme dans le champ confiné d'une antenne), elles forment des états multiexcitoniques [93]. Ces multiexcitons sont dus à la production de plusieurs paires électron-trou qui se recombinaient par

des processus rapides, essentiellement non-radiatifs (effet Auger). Des expériences à température ambiante ont montré que la probabilité d'avoir une source de photons uniques est alors réduite [94]. La recombinaison par effet Auger est un phénomène rapide proportionnel au volume du nanocrystal et se situe dans des gammes de temps picosecondes [93]. Par conséquent, une boîte quantique en présence de nanostructures métalliques va présenter au moins trois taux caractéristiques de désexcitation [90] qui rendra extrêmement difficile l'extraction d'une modification de temps de vie relative à l'antenne optique. Pour quantifier avec précision le ratio du taux d'émission avec et sans antenne, il est primordial de pouvoir dissocier la réduction du temps de vie liée à la photophysique intrinsèque de l'émetteur à celle liée aux effets Purcell.

Centre NV du diamant : certaines impuretés contenues dans le diamant peuvent présenter des états électroniques quantifiés avec l'émission spontanée caractéristique d'une source dipolaire unique. Parmi les centres colorés du diamant, on distingue le centre NV, constitué d'un atome d'azote et d'une lacune. Le temps de vie de fluorescence des centres NV est de l'ordre de la dizaine de nanosecondes, avec une décroissance mono-exponentielle, et ils présentent une excellente photostabilité [95]. Toutefois, ils ont des sections efficaces d'absorption faibles par rapports aux boîtes quantiques et aux meilleurs colorants organiques. De plus, la chimie de surface de ce type d'émetteur n'est pas ne permet pas de greffer simplement des centres NV du diamant sur l'ADN. Mais le défaut principal de ces systèmes est l'absence de contrôle sur la position de l'impureté luminescente dans la nanoparticule qui introduit une incertitude de plus de 10 nm sur la position exacte du dipôle rayonnant [17]. Ce problème est rédhibitoire pour obtenir un couplage reproductible entre les éléments actifs (émetteur) et passifs (NPAu) d'une antenne optique. Notre choix s'est donc porté sur des émetteurs moléculaires, de taille sub-nanométrique, qui peuvent être chimiquement greffés sur une base spécifique de la séquence d'ADN.

Émetteurs fluorescents organiques :

Il existe un grand nombre de molécules fluorescentes organiques telles que les cyanines, (carbo-)rhodamines, oxazines,... [96,97] ; mais aussi de systèmes organo-métalliques pour lesquels l'émission spontanée provient d'un cation de métal de transition [98] ou de lanthanide [99]. L'émission spontanée lente des systèmes organo-métalliques (de quelques centaines de nanosecondes pour des complexes de ruthénium à quelques millisecondes pour les lanthanides) est intéressante pour mesurer expérimentalement des grandes variations de taux d'émission. Toutefois leur greffage à l'ADN est peu documenté dans la littérature et leurs propriétés d'émission par phosphorescence peut passer par des transitions dipolaires magnétiques et/ou par un rayonnement isotrope [99,100]. Au contraire, les molécules organiques π -conjuguées rayonnent comme des dipôles individuels et permettent ainsi de sonder leur environnement par des mesures de temps de vie [101,102]. De plus, leur greffage à l'ADN est commercial. Nous avons donc privilégié l'utilisation d'émetteurs organiques.

Les émetteurs organiques optimisés présentent typiquement des temps de vie radiatifs de quelques nanosecondes. Pour des systèmes de rendement quantique élevé ($\leq 50\%$), le

temps de vie total varie en général entre 3 et 4 nanosecondes. Avec une résolution maximale de 10 ps pour la mesure de temps de vie d'une molécule fluorescente [15], une variation de Γ de deux ordres de grandeur sera mesurable. Un émetteur de rendement quantique faible (de quelques %) permettrait d'être moins sensible à la dissipation thermique dans les nanoantennes et de mesurer ainsi des signaux de fluorescence plus élevés [15,103]. Toutefois, les temps de vie initiaux de ces émetteurs de quelques centaines de ps ne permettraient pas d'étudier des molécules efficacement couplées à une antenne optique (variation de Γ au mieux d'un ordre de grandeur). Nous souhaitons donc utiliser un colorant organique de temps de vie initial, et donc de rendement quantique, élevés. Dans ce cas, nous pouvons espérer mesurer une variation de deux ordres de grandeur sur le temps de vie de fluorescence. Pour les dimères d'or de 36 nm de diamètre décrits dans les chapitres précédents, présentant des distances bord-à-bord de 13 à 20 nm, des calculs de théorie de Mie généralisée permettent d'estimer les modifications maximales des taux d'émission. A résonance des antennes (550 nm), les facteurs de Purcell devraient dépasser 3 ordres de grandeur. Par contre, en se plaçant dans le rouge de la résonance, où le dipôle source se couple préférentiellement au mode dipolaire de l'antenne plutôt qu'aux modes d'ordres élevés, les augmentations de Γ devraient se limiter à deux ordres de grandeur. Nous avons donc choisi un émetteur se désexcitant autour de 650 nm. Le dernier critère de sélection est alors la photostabilité de l'émetteur pour faciliter les mesures de molécules uniques. Notre choix s'est alors porté sur l'ATTO647N qui présente un haut rendement quantique (65 %), un temps de vie initial élevé (3,2 ns), émet autour de 670 nm, peut être greffé de manière covalente à une base aminée d'ADN, et qui présente une photostabilité remarquable dans des solutions appauvries en oxygène et contenant des couples oxydo-réducteurs optimisés (ROXS pour "Reducing and Oxidizing System") [97]. De plus, comme cette molécule est cationique, elle aura tendance à interagir de manière non-spécifique avec le squelette anionique de l'ADN en prenant une conformation fixe [104,105].

4.1.2 Effet du ROXS sur la Stabilité du fluorophore

L'étude de molécules organiques fluorescentes uniques est contraignante car des phénomènes photophysiques, tels que le clignotement et le photoblanchiment, compliquent l'interprétation des fluctuations du signal de fluorescence et limite le temps d'observation. Le dioxygène tient un rôle important dans la stabilité du fluorophore : l'état triplet fondamental de O_2 peut réagir chimiquement avec un état triplet excité d'une molécule fluorescente. Cette interaction limite la durée de vie de l'état triplet et donc le clignotement des émetteurs. Toutefois, si l'interaction entre états triplets entraîne une réaction d'oxydation, les électrons π -conjugués qui permettent la luminescence dans le visible se retrouvent utilisés dans des liaisons saturées avec l'oxygène, ce qui décale irréversiblement les résonances électroniques moléculaires dans l'UV. Ce phénomène est le mécanisme le plus courant de photoblanchiment. L'appauvrissement en oxygène va donc accroître le clignotement en allongeant la durée de vie de l'état triplet de l'émetteur (qui réduit le niveau du signal de fluorescence) mais aussi minimiser le blanchiment. Il serait donc souhaitable

de raccourcir le temps de vie de l'état triplet dans un milieu appauvri en oxygène. La diminution de la concentration en oxygène d'une solution aqueuse est possible en utilisant un système enzymatique catalysant l'oxydation d'une molécule choisie. Dans notre cas nous allons utiliser le protocatchuante-3-4-dioxygénase (PCD) pour catalyser l'oxydation de l'acide protocatéchique (PCA) [106]. En ce qui concerne la réduction du temps de vie de l'état triplet, différentes techniques ont été proposées [97, 107, 108]. Nous allons voir dans ce paragraphe comment, en permettant des réactions intermédiaires par l'ajout d'agents oxydo-réducteurs, on favorise le dépeuplement de l'état triplet vers l'état fondamental. Le principe du système oxydo-réducteur ROXS est illustré schématiquement sur la figure 4.1. Dans ce cas, on schématise la photophysique des fluorophores par un modèle à trois niveaux incluant un état fondamental S_0 , un état excité S_1 et un état excité triplet T_1 , comme présenté sur la figure 4.1 (tirée de la référence [97]).

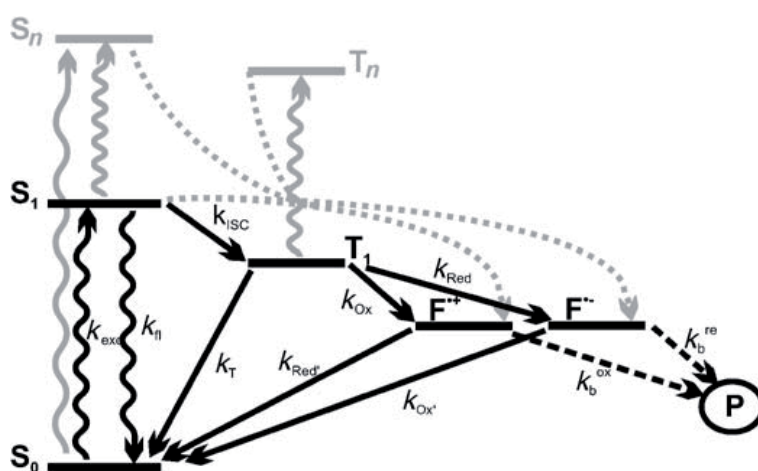


Figure 4.1 – Processus photo-induit de fluorophores organiques.

Après une excitation optique, le système passe de l'état singulet fondamental S_0 vers le premier état excité singulet S_1 . Le retour à l'état fondamental peut se faire de différentes manières. L'une d'elle est l'émission spontanée d'un photon que nous nommons Γ_R dans cette thèse et qui est indiqué par K_{fl} dans cette figure. L'état S_1 peut également relaxer vers l'état triplet T_1 , avec un taux du transfert intersystème K_{isc} , en compétition avec celui de fluorescence K_{fl} . Le ROXS permet de rapidement dépeupler l'état triplet par transfert d'électrons, soit par oxydation avec du methylviologène (MV) formant un radical cationique F^+ soit par réduction par de l'acide ascorbique (AA) formant un radical anionique F^- . Ces deux états sont rapidement dépeuplés vers l'état fondamental S_0 [97].

La figure 4.2 (tiré de l'article [97]), illustre une étude comparative entre différentes molécules absorbant et émettant dans le rouge avec et sans ROXS figure 4.2.

Les expériences présentées sur la figure 4.2, montrent que la photostabilité est fortement prolongée par l'utilisation d'oxydo-réducteur. Les barres de couleur noire sont des mesures faites sur des molécules dans un tampon phosphate. En ajoutant le ROXS, la molécule d'ATTO647N a une augmentation du nombre de photons détectés de $8.40 \pm 0.13 \times 10^5$, illustrée par les barres de couleur verte. Le clignotement est aussi un phénomène contraignant, qui est caractérisé par l'alternance entre un état brillant et un état noir. La fi-

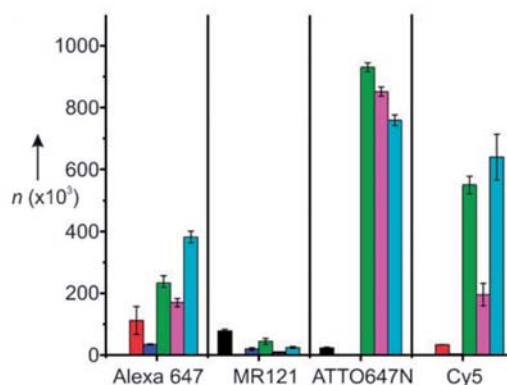


Figure 4.2 – Nombre de photons moyens par molécule pour des fluorophores rouges Alexa647, MR121, ATTO647N, et Cy5. Les mesures sont faites dans du PBS (barres noires), l'appauvrissement d'oxygène avec 1mM AA (barres rouges), avec 1mM MV (barres bleues), avec du ROXS (1 mM AA plus 1 mM de MV (vertes), ou 2mM TX plus 1mM MV (cyan), ou 2mM TX (magenta).

gure 4.3, tirée du même article, montre le signal de fluorescence au cours du temps de l'ATTO647N dans du PBS et le signal de fluorescence lorsque la molécule est dans un milieu oxydo-réducteur (ROXS).

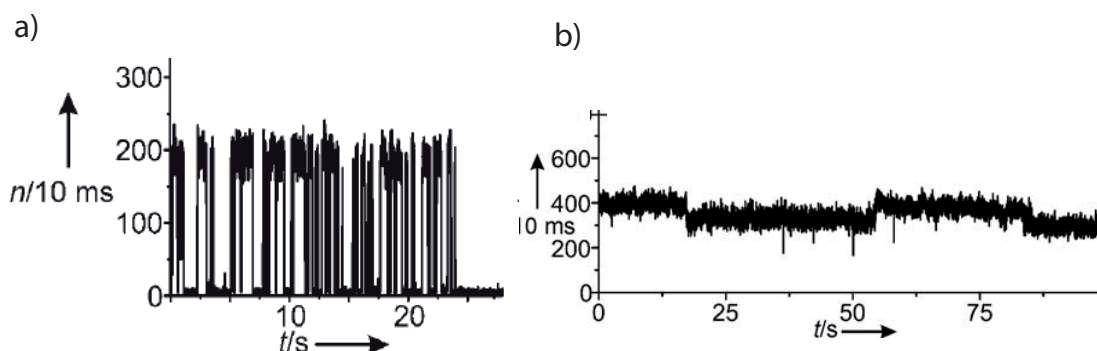


Figure 4.3 – Signal de fluorescence de molécules d'ATTO647N uniques fonctionnalisées sur un brin d'ADN mesurées dans du PBS (a) et PBS avec oxydant-réducteur (b).

Sur la courbe de la figure 4.3(a) sans ROXS, on observe que la molécule d'ATTO647N montre un état sombre de plusieurs ms. Cependant, lorsque la molécule est dans un milieu oxydo-réducteur (ROXS), on obtient une émission beaucoup plus stable et un signal de fluorescence plus élevé. Nous avons donc choisi la molécule d'ATTO647N pour nos expériences de mesure de molécule unique.

4.2 Méthodes expérimentales

L'interaction entre une molécule fluorescente et un dimère de particules liées par de l'ADN, a déjà été discutée dans la littérature, mais les échantillons étaient inhomogènes

et ne permettaient pas une analyse statistique de l'émission de photons [21][15] ou nécessitaient l'utilisation d'un microscope à force atomique pour corrélérer les géométries des nano-structures aux propriétés de diffusion Raman [54]. Dans ce paragraphe, nous décrivons la fabrication de chambres de microfluidique contenant essentiellement des dimères présentant une molécule unique greffée au centre de deux NPsAu.

4.2.1 Synthèse des échantillons

Nous allons étudier trois types d'échantillons : des molécules uniques d'ATTO647N greffées à un double brin d'ADN DE 50 paires de bases ; la même structure d'ADN greffée à la surface d'une sphère d'or de 36 nm de diamètre ; et des dimères de NPsAu de même taille, liées par une unique double hélice comportant en son centre un colorant organique. Comparer ces trois échantillons nous permettra d'analyser l'influence d'une nanoparticule et du couplage avec une seconde sphère d'or dans dimères. De plus, nous étudierons l'influence du couplage émetteur-NPAu en utilisant deux longueurs de brin d'ADN : 30 et 50 paires de bases.

La fabrication des échantillons analysés est la suivante :

- L'échantillon de molécules uniques associé à un double brin d'ADN est utilisant une séquence de 50 bases présentant une ATTO647N greffée sur la 25ème base (adénosine) fonctionnalisée avec un groupement amine. Le greffage de l'ATTO647N sur le brin aminé est effectué par le fabricant de l'ADN synthétique (Fidelity Systems Inc.). Ce brin est hybridé avec un excès double de sa séquence complémentaire présentant une fonction biotine en 5' terminal en présence de 100 mM de NaCl.
- L'échantillon de monomères (particules seules de 36 nm de diamètre greffées à un brin présentant un ATTO647N) est obtenu en greffant un brin de 30 ou 50 bases trithiolé en 5' sur une nanoparticule avant séparation par électrophorèse des NPsAu monofonctionnalisées. Ces brins d'ADN présentent en 15ème et 25ème bases une unique molécule d'ATTO647N greffée sur base aminée (cytosine et adénosine, respectivement pour les séquences de 30 et 50 bases). Ces particules sont hybridées à un excès du brin complémentaire présentant une biotine en 5' terminal avant purification par électrophorèse.
- Les suspensions de dimères sont obtenues en utilisant les particules monofonctionnalisées avec un brin de 30 ou 50 bases trithiolé et lié à une ATTO647N. Dans ce cas, on les hybride avec des particules de 36 nm passivées avec du PEG biotinylé et monofonctionnalisées avec la séquence d'ADN complémentaire avant purification par électrophorèse. Une représentation schématique des trois types d'échantillons, greffés à la surface d'une lamelle de microscope, est donnée sur la figure 4.4. Les suspensions de dimères et de particules seules sont préparées pour les deux longueurs de brins d'ADN dans des concentrations comprises entre 20 et 50 fmoles.

Les deux séquences d'ADN utilisées sont les mêmes qu'aux paragraphes précédents. L'étude topologique par cryo-EM des suspensions de dimères a permis de déterminer des distances inter-particules de 13 ± 1 nm pour le brin de 30 pb et de 17.5 ± 1.5 nm pour les brins de 50 pb avec une pureté estimée à 70% [10]. Le PEG utilisé pour enrober les NpsAu comportant le brin d'ADN avec l'ATTO647N sont méthylés et seules les NPsAu liées à la séquence

complémentaire, non-fluorescente, sont biotinyllées. Seule la biotine pourra se lier à la surface de verre de la micro-chambre fonctionnalisée avec de la Neutravidine [10, 109]. On applique ici le même procédé de fonctionnalisation des micro-chambres que celui exploité pour les mesures des spectres de diffusion. Le choix de passiver la surface des NPsAu ne comportant pas d'ATTO647N avec du PEG biotinyllé, assure que la sous-population probable de monomères dans les échantillons de dimères ne contiendra pas de molécule fluorescente.

4.2.2 Préparation de la micro-chambre

La fabrication de la micro-chambre est identique à celle utilisée pour les mesures de diffusion des dimères en suspension (paragraphe 3.1.1). Pour la mesure de molécules fluorescentes uniques, une précaution particulière est nécessaire pour éviter une fluorescence parasite des lames. Ainsi, une fois nettoyées à l'acétone et à l'éthanol, les lamelles sont placées dans un plasma de 80% d'argon et 20% d'oxygène, pendant une durée de 5 min, afin d'oxyder les impuretés organiques pouvant subsister à la surface pour les photoblanchir.

La lamelle de microscope est fonctionnalisée avec de l'albumine de bovin biotinyllée (BSA) et de la Neutravidine (le protocole de fonctionnalisation est détaillé dans le paragraphe 3.1.1). Les solutions de nanostructures sont injectées dans la microchambre avec un temps d'incubation de 8 min, puis rincées avec une solution tampon (T50). Nous ajoutons le ROXS, qui est constitué d'un système enzymatique d'appauvrissement en oxygène et d'un oxydo-réducteur comme expliqué ci-dessus. Le système enzymatique d'appauvrissement d'oxygène est composé de 10 mM d'acide protocatéchique (PCA) et de 200 nM de protococatechuate-3,4-dioxygénase (PCD) [106]. Le ROXS est obtenu en injectant un agent réducteur (1 mM d'acide ascorbique) et oxydant (1mM de methyl viologène) [97, 107]. Le ROXS est injecté dans la microchambre qui est ensuite scellée hermétiquement avec de la cire chaude. La figure 4.4B présente une image typique de cryo-EM de dimères de 30 bp.

4.2.3 Dispositif expérimental

La figure 4.5 présente un schéma simplifié du montage utilisé pour mesurer le temps de vie de fluorescence de nano-objets uniques. L'analyse de la fluorescence de molécules uniques se fait à l'aide d'un dispositif basé sur un microscope inversé (Olympus IX71), associé à un système électronique rapide (Hydraharp 400, Picoquant). Ce système permet de mesurer la statistique des temps d'arrivée des photons, connu sous le nom en anglais de Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC). Le principe est de mesurer un retard temporel de l'émission de photons de fluorescence par rapport à l'excitation. Pour cela, la carte électronique mesure le temps écoulé entre l'excitation fournie par une diode de synchronisation (PicoQuant TDA 200)(START) et le premier photon de fluorescence détecté par une photodiode à avalanche (STOP). En répétant cette procédure suffisamment

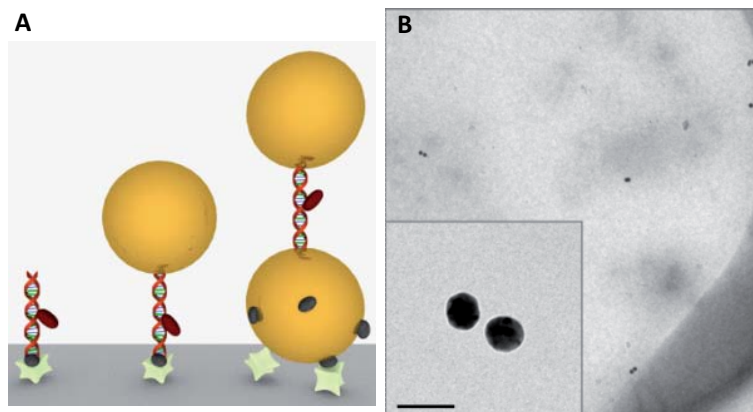


Figure 4.4 – (a) Représentation des trois échantillons étudiés, greffés à la surface d'une lame de verre (les points noirs représentent la biotine, les prismes gris sont le Neutravidine). En pratique, la particule de 36 nm dont le diamètre est trois fois supérieur que la longueur du brin d'ADN. (b) Images de Cryo-EM avec un faible et un grand agrandissement de dimères de 30 pb (barres d'échelle=500 et 50 nm).

de fois pour obtenir une analyse statistique conséquente, nous obtenons un histogramme du nombre de photons détectés en fonction du temps.

Les échantillons sont illuminés via un miroir dichroïque par une source supercontinuum pulsée non-polarisée (SC450-pp, Fianium), spectralement filtrée à 635 nm. La fréquence de répétition d'excitation est de 10 MHz avec une largeur d'impulsion laser d'environ 50 ps. On utilise une faible excitation d'environ 200 W cm^{-2} , ce qui assure que les mesures de fluorescence sont effectuées sans saturer les molécules. L'émission du signal de fluorescence est à $670 \pm 25 \text{ nm}$. L'excitation et la collection se font par le même objectif de microscope d'ouverture numérique 1.3. Le signal de fluorescence est dirigé soit sur une camera EMCCD (Ixon, Andor) (qui nous assure que les sources fluorescentes sont à la limite de diffraction), soit, après avoir été filtré spatialement par un trou de confocalité de $100 \mu\text{m}$, focalisé sur des photodiodes à avalanches APD (MPD-5CTC). Le filtrage spatial permet de s'affranchir de l'émission d'objets à proximité. La figure 4.6 est un exemple d'image de fluorescence de molécules d'ATTO647N placées au centre de dimère de 50pb, prise par la caméra EMCCD avec une excitation plein champ ($30 \mu\text{W}$).

On aperçoit sur cette image que les points brillants n'ont pas tous les mêmes intensités. Cette variation dépend de plusieurs facteurs que nous détaillerons dans la suite de ce chapitre. Chaque molécule unique est détectée par la caméra sous la forme d'un point brillant occupant environ 5 pixels, correspondant, d'après le grossissement du microscope et la taille des pixels, à la limite de diffraction. La caractérisation du montage expérimental se fait en estimant la largeur à mi-hauteur de la fonction d'appareil (FWHM pour Full width at half maximum de l'IRF, pour Instrument Response Function). Pour cela, nous envoyons une impulsion laser sur une lame de verre puis nous enregistrons le signal réfléchi sur les APD. Par ce procédé, nous avons estimé une FWHM de $75 \pm 5 \text{ ps}$. Nous verrons dans la suite de ce chapitre qu'il est possible de mesurer des temps de vie de l'ordre de quelques dizaines de picosecondes avec ce dispositif. Ceci correspond à l'état de l'art

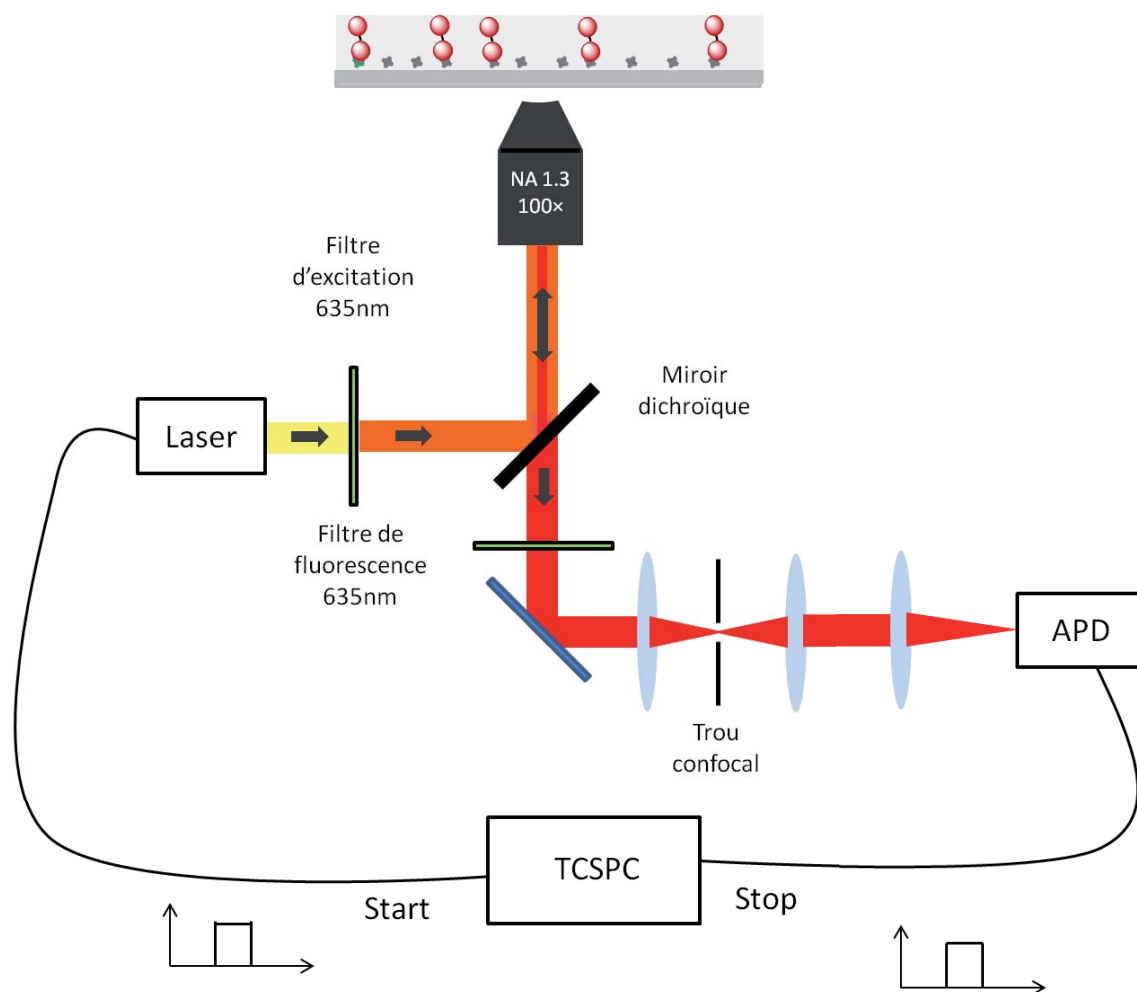


Figure 4.5 – Schéma de principe d'une expérience de mesure de temps de vie de fluorescence (TCSPC : Time Correlated Single Photon Counting, APD : Single Avalanche Photodiode).

actuel de ce type d'instrument [15].

4.3 Résultats expérimentaux

4.3.1 Mesure de molécules uniques et traitement des données

Des exemples typiques de temps de vie et d'intensité du signal de fluorescence, pour les trois géométries d'échantillons, sont donnés sur la figure 4.7a. Le photoblanchiment visible par la chute abrupte du niveau du signal sur la figure 4.7b confirme que ces mesures sont faites sur des émetteurs uniques. Les codes couleurs choisis permettent de différencier les trois types d'échantillons mesurés : le bleu pour les molécules isolées, le vert pour les molécules à proximité d'une seule particule d'or (liée avec deux longueurs de brins d'ADN différentes de 50 pb et 30 pb) et le rouge pour une molécule placée au centre d'un dimère (lié également avec un double brin d'ADN de séquence 30 pb ou 50 pb).



Figure 4.6 – Exemple d'image de fluorescence de dimères liés avec un double brin d'ADN de 50 paires de bases, alimentés au centre par une molécule d'ATTO647N unique, capturée par la caméra EMCCD (temps d'acquisition 100 ms, gain de 100, puissance incidente $30\mu\text{W}$).

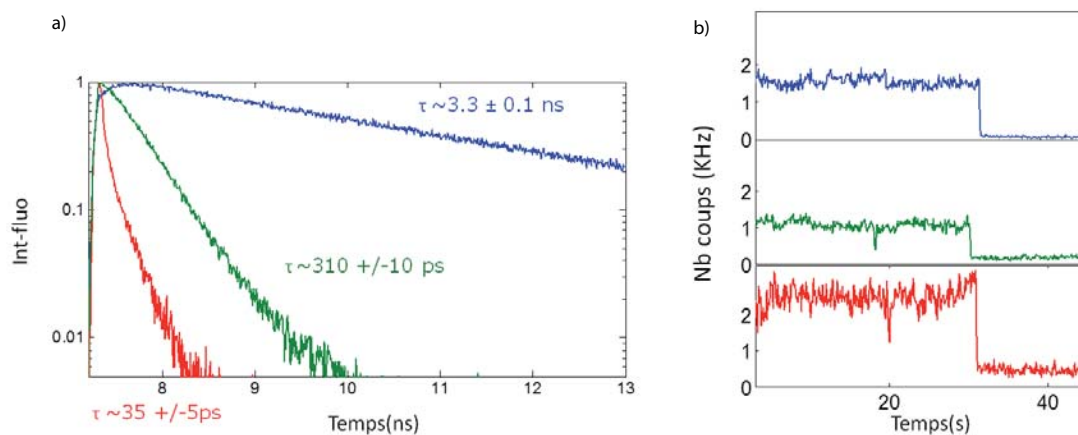


Figure 4.7 – (a) temps de vie de fluorescence typique (b) signal de fluorescence (moyenné sur 100 ms) de molécules d'ATTO647N pour un émetteur isolé (courbe bleue, temps de vie estimé $3.2 \pm 0.150 \text{ ns}$), NPAu seule fonctionnalisée avec un brin d'ADN de 50 bp (courbe verte, temps de vie estimé $310 \pm 10 \text{ ps}$), dimère de 30 pb (courbe rouge, temps de vie estimé $35 \pm 5 \text{ ps}$).

La décroissance de l'ATTO547N seul, sur la figure 4.7a, est nettement mono-exponentielle et correspond à un temps de vie mesuré de $3.2 \pm 0.1 \text{ ns}$. Par contre, les courbes verte et rouge n'ont pas une allure de déclin du temps de vie de type mono-exponentiel. Ceci est dû à l'influence de l'IRF sur la forme des courbes. Pour estimer sans ambiguïté ces temps

de vie courts, nous ajustons les données avec une convolution de l'IRF et d'une fonction mono-exponentielle décroissante [15] comme représenté sur la figure 4.8. Sur cette figure, les courbes continues de couleur (bleue, verte, et rouge) sont les mesures de déclin du signal de fluorescence de l'ATTO647N isolée, du monomère 50 pb et d'un dimère 30bp. La courbe continue noire représente l'IRF. L'ajustement par la convolution de l'IRF avec une fonction mono-exponentielle décroissante est représenté par les courbes en pointillés noirs. La courbe verte, qui correspond à un monomère fonctionnalisé avec un brin de 30 pb, indique une réduction du temps de vie de fluorescence d'un ordre de grandeur comparé à la molécule isolée ($310 \pm 10 ps$). Pour le dimère de 30 pb, le temps de vie de fluorescence est estimé à $35 \pm 5 ps$, soit 91 fois plus court que le temps de vie mesuré sur la molécule isolée. Cette parfaite correspondance entre l'ajustement et la mesure expérimentale, confirme que les données ont bien une décroissance mono-exponentielle. Par ce procédé d'analyse, notre résolution temporelle est de l'ordre de 10 ps. Pour confirmer la forte modification du temps de vie dans les échantillons de dimères et pour comprendre ce phénomène entre les différentes géométries d'échantillons, nous réalisons une étude statistique sur un grand nombre de molécules.

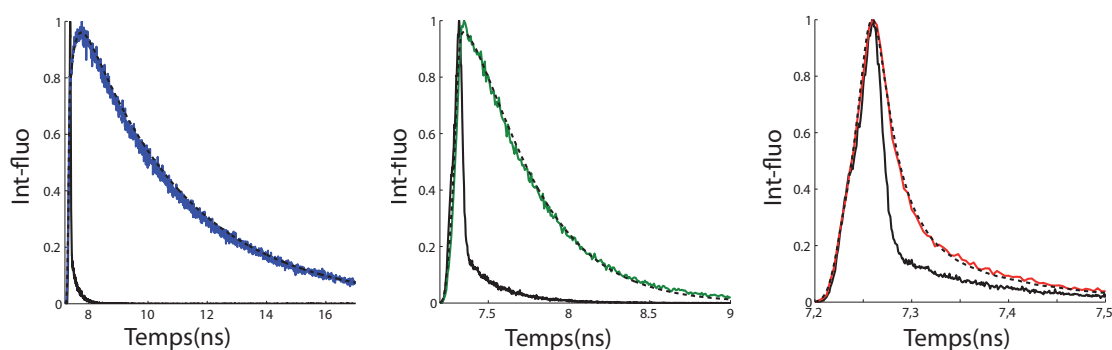


Figure 4.8 – (a) IRF (courbe continue noire) convoluée avec une fonction mono-exponentielle décroissante (courbe en pointillée noire) utilisée pour ajuster les mesures expérimentales (courbes continues : bleue ATTO647N isolée ($\tau = 3.2 \pm 0.1 ns$), verte Monomère 50 pb ($\tau = 310 \pm 10 ps$) rouge pour le dimère de 30 pb ($\tau = 35 \pm 5 ps$)).

4.3.2 Analyse statistique de l'exaltation des taux d'émission spontanée

L'analyse statistique des mesures de l'exaltation du taux d'émission est réalisée sur 420 molécules dans des configurations différentes : molécules d'ATTO647N isolées ; à proximité d'une NPAu, et au centre de dimères. Les monomères et les dimères sont fonctionnalisés avec deux longueurs de brin différentes, 50 bp et 30 bp. Au total 81% des mesures ont pu être ajustées par l'IRF convoluée avec une fonction mono-exponentielle décroissante ; 8% ont été rejetées de l'analyse suite à un faible rapport signal à bruit (dû à un photoblanchiment précoce) et 11 % présentaient des décroissances bi-exponentielles (associées à un signal de fond important ou à plusieurs molécules dans le même volume focal). L'association du déclin mono-exponentiel et de la stabilité des signaux de fluorescence en

fonction du temps (figure 4.7b), indique que l'orientation de la molécule est stable pendant la mesure. Une conclusion similaire a été donnée par des mesures d'anisotropies résolues en temps avec des molécules fluorescentes zwitterioniques et cationiques attachées à un double brin d'ADN [104, 105]. Le résultat de cette analyse indique que la rotation de la molécule est entravée par l'interaction avec la double hélice d'ADN (probablement en se liant dans le grand sillon). La figure 4.9 représente les distributions mesurées de l'exaltation du taux d'émission normalisé $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$, avec $\langle\Gamma_0\rangle$ la moyenne du taux d'émission de la molécule d'ATTO647N isolée. Nous rappelons que Γ est inversement proportionnel au temps de vie de fluorescence $\Gamma = 1/\tau$.

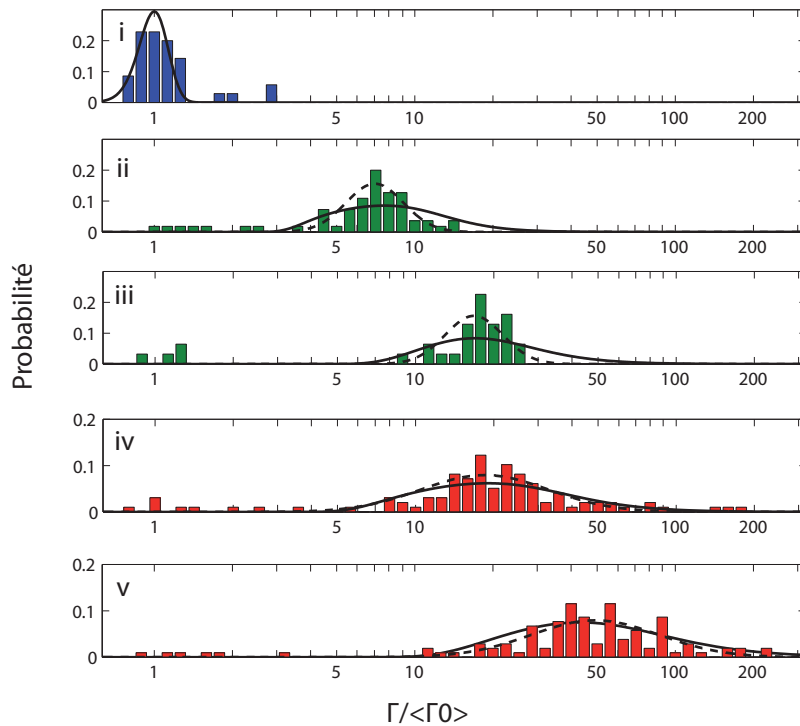


Figure 4.9 – Distribution de l'exaltation du taux d'émission $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$. Molécules d'ATTO647N isolées (i), monomères de 50 bp (ii), et 30 pb (iii), dimères de 50 pb (iv) et 30 pb (v). La largeur de la barre expérimentale $\Delta\Gamma/\Gamma = \Delta\tau/\tau = 0.12$. La courbe continue noire (i) est un ajustement gaussien des distributions expérimentales $\Gamma_0/\langle\Gamma_0\rangle$. Les courbes continues noires (ii-v) correspondent aux calculs théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ en formulant l'hypothèse d'une orientation du dipôle isotrope de la molécule, avec une distance émetteur-particule fixée à 8 nm pour les brins d'ADN de 50 pb (ii,iv) et à 6 nm pour les brins d'ADN de 30 pb (iii,v). Ces distributions sont pondérées avec une dépendance en angle de l'efficacité de l'antenne. Les courbes hachurées noires (ii-v) sont des distributions théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour $\theta = \pi/4$ avec une distribution gaussienne de d centrée à 6.5 nm et 8.25 nm pour les brins d'ADN de 30 bp et 50 bp, l'écart type de d est à ± 0.5 nm pour une particule seule (ii,iii) et ± 1 nm pour les dimères (iv,v).

Sur ce graphique, nous observons que les mesures de l'exaltation du taux d'émission faites sur un grand nombre de MUs, isolées et influencées par une ou deux NPsAu pour différentes longueurs de brin d'ADN, confirment une modification drastique du comportement des 5 échantillons. Cette modification est visible par la variation de l'exaltation

du taux d'émission $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ entre les différents échantillons. La présence d'une nanoparticule unique amplifie la vitesse de désexcitation d'environ un ordre de grandeur quand les dimères liés par de l'ADN de 30 bp permettent d'atteindre deux ordres de grandeur d'exaltation.

Les différences de facteurs d'exaltation de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ ne sont pas seulement dues au changement de distance entre l'émetteur et la particule quand on allonge le brin d'ADN de quelques nanomètres (10 bp) (monomères des encadrés(ii) et (iii) et les dimère (iv) et (v)). Nous l'observons également pour la même distance molécule-particule, lorsque la molécule est proche d'une NP seule et au centre du dimère (phénomène visible sur les histogrammes (ii) et (iv) pour une longueur de brin d'ADN de 50 pb et sur les distributions (iii) et (v) pour une séquence de 30 pb). Pour une MU au centre des dimères, on observe toujours $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ trois fois supérieur aux taux d'émission des monomères. Les mesures de dimères de 30 bp, visibles sur la figure 4.9v, montrent des exaltations du taux d'émission proche de deux ordres de grandeur. Les molécules organiques ont un temps de vie typiquement de l'ordre de la nanoseconde. Ces mesures d'exaltations, pour les dimères de 30 bp correspondent aux valeurs maximales que nous pouvons mesurer sans ambiguïtés avec notre dispositif expérimental (temps de vie de 10 ps) [15].

Il serait possible de synthétiser des échantillons permettant des exaltations du taux d'émission de trois ordres de grandeur : soit en réduisant la longueur du brin d'ADN, soit en choisissant une molécule qui émettrait à résonance du mode longitudinal du dimère ($\sim 550nm$). Cependant, de tels temps de vie ne pourraient être mesurés en TCSPC. Afin de comprendre au mieux l'influence de la géométrie sur l'exaltation du taux d'émission, on compare ces distributions expérimentales aux calculs théoriques représentés par les courbes hachurées et continues noires. Nous verrons, dans le paragraphe suivant, l'origine de la largeur de la distribution observée. Celle-ci peut être interprétée de deux façons : soit en considérant l'orientation de la transition dipolaire vis à vis du dimère (courbes continues), soit en tenant compte de l'influence de la variation de distance entre la molécule et la particule pour une orientation moléculaire préférentielle (courbes hachurées).

4.4 Analyse par la théorie de Mie généralisée des distributions de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$

$\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ est calculé en utilisant la théorie de Mie généralisée (TMG). La TMG fournit une solution analytique des équations de Maxwell pour des groupements de sphères dans un environnement diélectrique homogène. La résolution numérique se fait en prenant un nombre suffisant de multipôles pour faire converger le calcul [41]. Nous utilisons la constante diélectrique de l'or massif pour les nanoparticules [80] et une constante de 1,4 pour l'environnement inhomogène (solution tampon et ligands organiques). Cette valeur apparaît comme la mieux adaptée pour nos échantillons d'après l'analyse des spectres de résonance des dimères, effectuée dans le chapitre précédent. Les calculs théoriques ont été effectués par nos collaborateurs de l'Institut Fresnel à Marseille.

Deux paramètres modifient fortement l'efficacité du couplage entre les antennes métalliques et la molécule fluorescente peuvent justifier les larges distributions de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ obtenues sur la figure 4.9. Le premier de ces paramètres est l'angle $\theta \in [0, \pi/2]$ entre la transition dipolaire de la MU et le brin d'ADN. Le second est la distance d entre la surface de la particule et la molécule. Pour différencier les parties radiatives et non-radiatives des taux d'émission spontanée, nous estimons également $\Gamma_r/\langle\Gamma_0\rangle$. Le ratio $\eta = \Gamma_r/\Gamma$ est appelé l'efficacité de l'antenne [30] et est estimé par le ratio entre la puissance rayonnée en champ lointain et la puissance totale dissipée dans l'antenne quand celle-ci est alimentée par une source dipolaire classique [110].

4.4.1 Distributions théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour une distribution isotrope des orientations moléculaires

La figure 4.10 présente les évolutions théoriques de Γ/Γ_0 , Γ_r/Γ_0 et η en fonction de θ par des dimères de nanoparticules d'or de 36 nm de diamètre avec des distances interparticules de 12 nm et 16 nm (distance émetteur-particule d de 6 nm et 8 nm). Lorsque $\theta = 0$, le couplage entre le fluorophore et les NPsAu est longitudinal. Pour des dimères avec des distances particule-émetteur qui varient entre 5 et 10 nm, nous estimons par TMG que le taux d'émission est maximum avec une efficacité de l'antenne optimum $23\% < \eta < 42\%$. A l'opposé, pour $\theta = \pi/2$, le couplage est transverse : le dimère est dit en "mode sombre" et le ratio Γ_r/Γ évolue entre $0.02\% < \eta < 2.4\%$ avec un minimum de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$. Pour les particules seules, η devient non négligeable en couplage transverse ($0.5\% < \eta < 18\%$) et le mode longitudinal produit moins d'émission en champ lointain que dans le cas d'un dimère ($14\% < \eta < 40\%$). Les calculs précédents indiquent qu'il est peu probable de mesurer en champ lointain les molécules couplées transversalement. Pour prendre en compte le "quenching" du fluorophore dans ce mode, nous considérons que la probabilité de mesurer une molécule à θ donné est proportionnelle à l'efficacité de l'antenne pour cette valeur d'angle.

Le calcul des distributions théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ est effectué en plusieurs étapes :

- En considérant une distribution isotrope des orientations moléculaire, la probabilité de trouver une molécule à θ donné est $\sin(\theta)$.
- Les valeurs de Γ/Γ_0 obtenues par TMG sur la figure 4.10a peuvent être ajustées par une courbe en $\Gamma_{Trans} + (\Gamma_{Long} - \Gamma_{Trans}) \cos^2(\theta)$ où Γ_{Trans} et Γ_{Long} sont les exaltations de taux d'émission en couplages transeverse ($\theta = \pi/2$) et longitudinal ($\theta = 0$). Cet excellent ajustement théorique indique un couplage essentiellement dipolaire entre l'émetteur et les modes induits dans les nanoparticules. Nous pouvons alors en déduire une relation bijective simple entre θ et Γ/Γ_0 . Un même ajustement de Γ_r/Γ_0 en $\Gamma_{RTrans} + (\Gamma_{RLong} - \Gamma_{RTrans}) \cos^2(\theta)$ peut être obtenu.
- Nous exprimons alors $\sin(\theta)$, Γ_r/Γ_0 et η comme des fonctions de Γ/Γ_0 . La figure 4.11 présente $\sin(\theta)$ et η en fonction de Γ/Γ_0 pour les valeurs correspondants au monomère de 36 nm à une distance $d=8$ nm. La courbe continue bleue, correspondant à $\sin(\theta)$, serait la distribution théorique en négligeant l'efficacité de l'antenne : la majorité des molécules

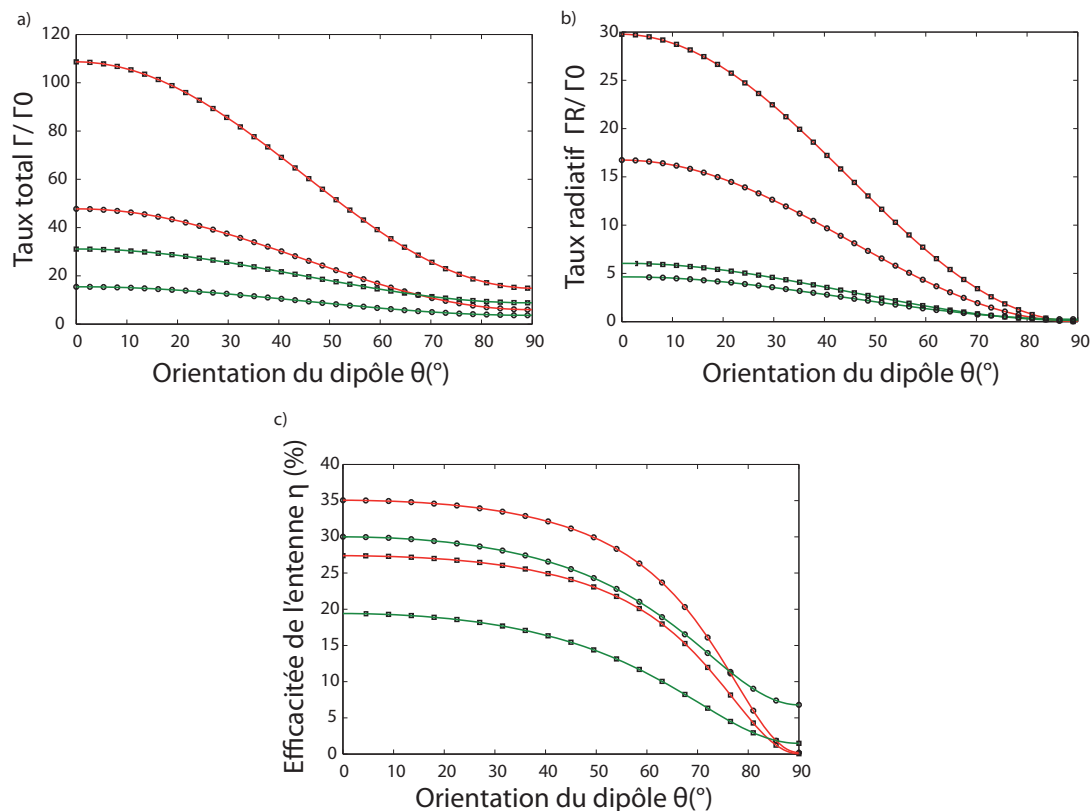


Figure 4.10 – Calculs théoriques du taux d'émission et des efficacités de l'antenne. Évolution du taux d'émission total (a) et radiatif (b) ainsi que l'efficacité de l'antenne (c), en fonction de l'orientation de l'émission du dipôle, θ , pour une distance d émetteur-particule fixée, pour des émetteurs seuls à proximité d'une unique NPAu de 36 nm de diamètre (trait continu vert) et au centre de dimère de NPAu (trait continu rouge). Les marqueurs carrés et les cercles correspondent aux distances $d=6$ nm et $d=8$ nm respectivement. Les traits continus sont des ajustements du taux d'émission en $A + B \cos^2(\theta)$.

mesurées devraient être transverses. Les temps de vie mesurés et les signaux de fluorescences obtenus sont en désaccord total avec ce résultat : les temps de vie sont plus courts que ceux calculés pour un mode transverse et, surtout, les molécules présentent des signaux similaires aux molécules isolées. Elles ne sont donc pas couplées à un mode sombre.

- Nous supposons alors que la distribution théorique de Γ/Γ_0 correspond à la multiplication de $\sin(\theta)$ par η , avant normalisation. Nous obtenons alors la courbe rouge qui correspond qualitativement aux distributions expérimentales de la figure 4.9.

- Nous prenons également en compte les fluctuations de temps de vie des molécules isolées, $\Gamma_0/\langle\Gamma_0\rangle$, mesurées sur la figure 4.9i et qui sont ajustées par une distribution Gaussienne (courbe continue noire). En convoluant la distribution théorique de Γ/Γ_0 par la distribution Gaussienne de $\Gamma_0/\langle\Gamma_0\rangle$, nous obtenons la courbe noire sur la figure 4.11 et les courbes noires continues sur les figures 4.9ii-v.

Les courbes théoriques continues noires, présentées sur les figures 4.9ii-v, sont donc en accord quantitatif avec les distributions expérimentales de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$. La distance inter-

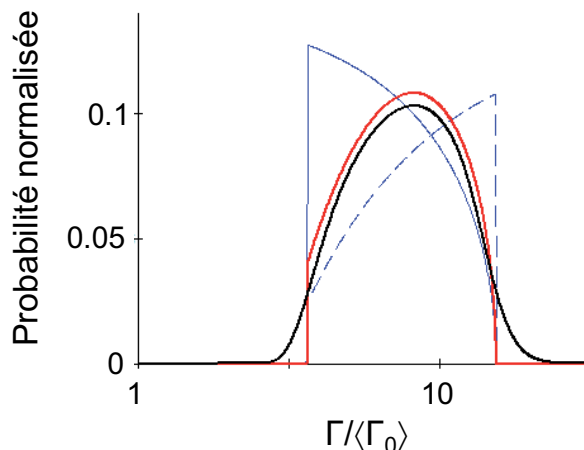


Figure 4.11 – Calcul de la distribution théorique de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour un monomère avec $d = 8nm$ et une distribution isotrope de θ . Les courbes bleues correspondent à $\sin(\theta)$ (continue) et η (hachurée) en fonction de Γ/Γ_0 . La courbe rouge correspond à la multiplication de $\sin(\theta)$ par η en fonction de Γ/Γ_0 . La courbe noire correspond à la distribution théorique de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ en prenant en compte la distribution expérimentale de $\Gamma_0/\langle\Gamma_0\rangle$.

particule d est le seul paramètre libre. Elle est fixée à 12 nm pour les brins d'ADN de 30 bp (figure 4.9iii et v) et 16 nm pour les séquences de 50 bp (figure 4.9ii et iv). Ces valeurs sont en très bon accord avec les distances estimées par cryo-EM dans les chapitres précédents [10].

4.4.2 Distributions théoriques de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour une variation nanométrique des distances émetteur-particules

De faibles distributions de la distance d entre l'émetteur et la particule peut induire un élargissement des distributions de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour une orientation de la transition dipolaire donnée. En pratique, les molécules cationiques et zwitterioniques de grandes tailles interagissent typiquement avec le grand sillon de la double hélice favorisant une orientation de la molécule à $\pi/4$ [111, 105, 104]. Pour $\theta = \pi/4$ et en prenant une variation de d comprise entre 4-10 nm, On obtient une décroissance de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ quasi exponentielle, (voir figure 4.12). Ainsi, une distribution gaussienne de d correspond quasiment à une distribution log-normale de Γ/Γ_0 .

Les courbes noires en pointillées de la figure 4.9 correspondent à des distributions gaussiennes de d avec un écart type de 1 nm pour les dimères de 30 bp et 50 bp et de 0.5 nm pour les particules seules en prenant $\theta = \pi/4$. Nous prenons également en compte, comme pour les calculs de Γ/Γ_0 en fonction de θ , la distribution Gaussienne $\Gamma_0/\langle\Gamma_0\rangle$ mesurée sur molécules isolées. Le centre des distributions de d utilisées sur la figure 4.9 est à 6.5nm pour les brins d'ADN de 30 pb et 8.25nm pour les séquences de 50 pb. Ces valeurs coïncident avec les distances estimées lors de l'analyse des caractéristiques morphologiques faites à partir des images de cryo-EM [10] et sont très similaires aux valeurs utilisées pour le calcul dans le cas d'une distribution isotrope angulaire. Le facteur 2, entre les écarts

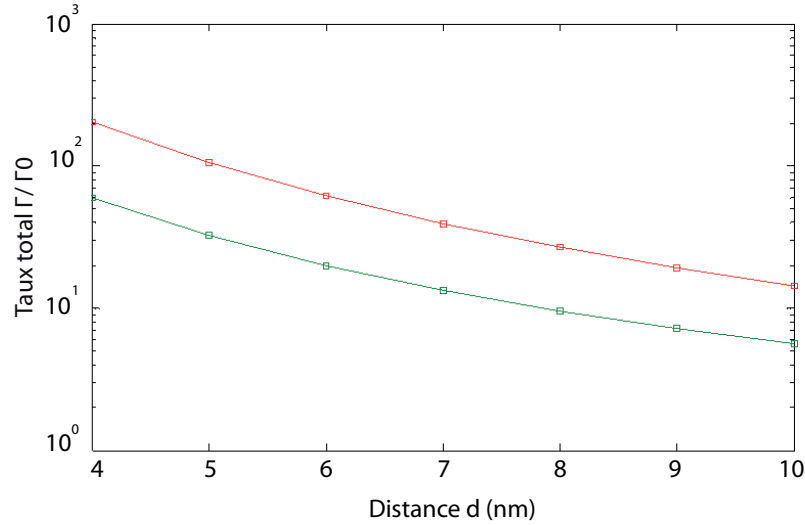


Figure 4.12 – Evolution du taux d'émission total pour un dipôle à proximité d'une NPAu de 36 nm de diamètre (ligne continue verte), ou au centre d'un dimère de NPAu (ligne continue rouge), pour $\theta = \pi/4$, en fonction de la variation de la distance d , entre l'émetteur et la surface de la NPAu, Les calculs de la théorie de Mie sont représentés par les marqueurs.

types de la distribution de d pour les particules seules et les dimères, se justifie par le nombre de liaisons thiols mécaniquement flexibles entre les particules d'or et les doubles brin d'ADN. En effet, les monomères sont liés par une seule liaison thiol aux NPsAu or, les dimères possèdent deux accroches. A nouveau, les distributions théoriques s'ajustent quantitativement avec les distributions expérimentales.

4.4.3 Discussion sur les distributions de taux d'émission spontanée

L'excellente correspondance entre les mesures de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ et les deux calculs théoriques présentés ci-dessus indique que, lorsque la longueur du brin d'ADN entre l'émetteur et la particule est modifiée de 10 pb, on observe une variation de cette distance d' ~ 2 nm. Ce contrôle sur la position d'un émetteur quantique dépasse largement la résolution permise par les méthodes de lithographie top-down. De plus, cette valeur est confirmée dans les deux hypothèses extrêmes des calculs théoriques : distance fixée et distribution isotrope de l'orientation de la molécule par rapport au brin d'ADN (courbes continues noires) ; angle fixé à $\theta = \pi/4$ avec une variation de la distance particule-molécule. Pour cette dernière hypothèse, on obtient un écart type de la distance d de ± 1 nm pour les dimères et ± 0.5 pour les monomères (courbes en pointillées). D'autres paramètres expérimentaux, tels que la distribution de la taille et de la forme des particules, peuvent élargir les distributions théoriques de près de 10%. On en conclut que, dans notre cas, les expériences correspondent probablement à un système intermédiaire avec une distribution de l'orientation de la molécule limitée et une variation de la distance plus petite que ± 1 nm dans le cas des dimères. Cette étude démontre donc le contrôle excellent et reproductif de

la position de la molécule offert par l'ADN.

4.5 Efficacité théorique et expérimentale des nanoantennes

4.5.1 Calculs théoriques de l'efficacité des nanostructures

L'efficacité théorique $\eta = \Gamma_r/\Gamma$, obtenue par la théorie de Mie, est estimée pour une longueur d'onde d'émission de 670 nm. Ces calculs, présentés sur la figure 4.13 indiquent que, pour une distance particule-émetteur donnée, les dimères permettent d'exalter les taux d'émission de trois ordres de grandeur avec une plus haute efficacité η . Les calculs sont effectués dans l'hypothèse d'une distance particule-molécule fixée et une distribution isotrope de l'orientation de la molécule par rapport au brin d'ADN.

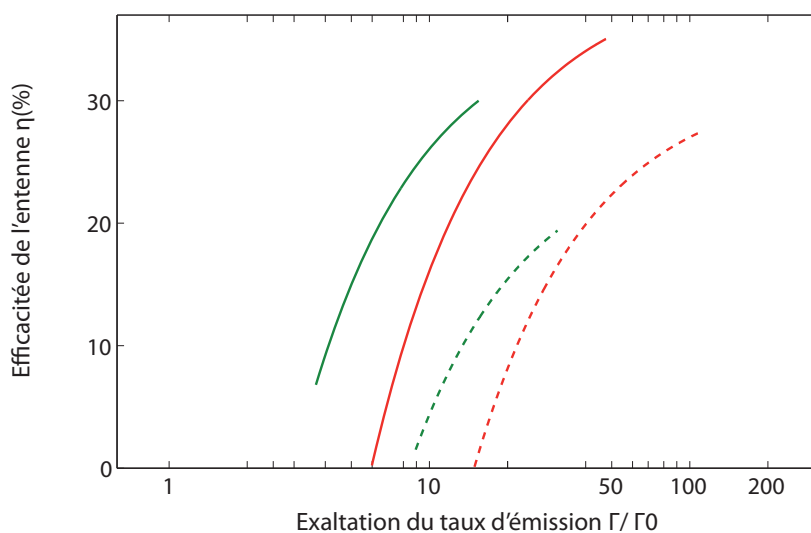


Figure 4.13 – Evolution de l'efficacité de l'antenne $\eta = \Gamma_r/\Gamma$ en fonction de Γ pour des NPsAu de 36 nm de diamètre (lignes vertes) et des dimères (lignes rouges). Ces courbes sont obtenues en combinant les calculs de la figure 4.10a et 4.10c. Les lignes hachurées correspondent à $d=6$ nm et les lignes continues à $d=8$ nm.

Les monomères de NPsAu de 36 nm sont illustrés en vert et les dimères sont représentés par les courbes rouges. Cette figure est obtenue en combinant les calculs de la figure 4.10a et 4.10c. Les courbes en pointillés et continues sont estimées pour des distances émetteur-particules $d=6$ nm et $d=8$ nm, respectivement. Pour égaler l'exaltation de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ des dimères de 30 bp couplés en mode longitudinal, la molécule devrait être à moins de 4 nm de la surface d'une seule nanoparticule d'or. Dans cette configuration, le monomère aurait une efficacité $\eta = 8\%$ comparée à $\eta = 27\%$ dans un dimère. Les efficacités théoriques sont cependant plus petites que le rendement quantique de l'ATTO647N de 65% d'après les données du fabricant. Par conséquent, la présence de l'antenne va entraîner une réduction du rendement quantique.

4.5.2 Mesures expérimentales du signal de fluorescence

Les calculs théoriques de l'efficacité des antennes prédisent une réduction de η entre une molécule isolée et le centre d'un dimère. Cependant, on observe, en mesurant expérimentalement les intensités du signal de fluorescence, une augmentation du niveau de fluorescence dans les dimères de plus courtes distances inter-particules. La figure 4.14 représente les mesures du signal de fluorescence (nombre de coups par seconde) des MU, avant photoblanchiment, en fonction du $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ mesuré, pour les trois géométries d'échantillons considérés.

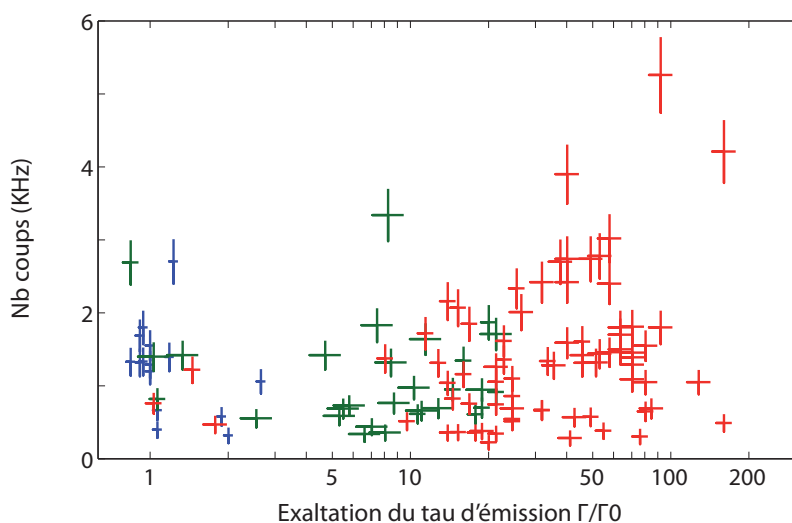


Figure 4.14 – Niveau du signal de fluorescence. Distribution du nombre de photons détectés pour une molécule seule en fonction de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ pour une molécule isolée (points bleus), et des dimères de 30 bp et 50 bp (points rouges). Tous les points représentés sur ce graphique correspondent aux mesures faites sur des molécule ayant un photo-blanchiment net. Les barres d'erreurs horizontales indiquent les incertitudes des ajustements par la fonction mono-exponentielle $\Delta\tau/\tau=\Delta\Gamma/\Gamma$ qui varie entre 0.05 et 0.3. Les barres verticales correspondent à une erreur de 20% typiquement observée sur les mesures du niveau de fluorescence.

Les points bleus représentent les mesures pour des molécules d'ATTO647N isolées. Les molécules proches d'une seule particule sont représentées en vert, englobant les deux longueurs de brins d'ADN (30 bp et 50 bp). Les points rouges regroupent les données des dimères pour les deux différentes distances inter-particules. La large dispersion des données mesurées est probablement due aux différentes orientations hors plan des molécules. La variation de l'efficacité de collection nuit à l'estimation directe du rendement quantique effectif. Cependant la figure 4.14 montre que des MsU couplées à des dimères de NPsAu peuvent présenter une augmentation de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ de deux ordres de grandeur avec un accroissement du flux de photons. Le plus grand nombre de coups par seconde est toujours observé pour les échantillons de dimères de 30 pb, tandis que les plus faibles signaux de fluorescence sont, quant à eux, toujours associés aux mesures de la molécule liée à une seule particule avec une séquence du brin d'ADN de 30 pb. Dans le cas des dimères, la réduction du rendement quantique effectif de l'ATTO647N à proximité des

nano-antennes est donc compensée par l'exaltation de l'excitation, en particulier quant la distance d diminue. A l'inverse, les particules seules induisent un signal de fluorescence plus faible (quenching) à mesure que la distance diminue [20].

L'utilisation d'une molécule avec un faible rendement quantique initial permettrait d'avoir une plus grande augmentation du nombre de coups par seconde dans les nano-antennes [18, 15]. Toutefois, cette caractéristique est associée à un temps de vie initial plus court que celui de L'ATTO647N. Dans ces conditions expérimentales, il ne serait pas possible de mesurer de grandes exaltations de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ comme dans le cas de la figure 4.9. L'estimation expérimentale de l'efficacité de l'antenne requiert une connaissance précise de l'orientation des brins d'ADN dans la micro-chambre. Une autre solution est d'effectuer des mesures moyennées par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) [18]. Ces mesures moyennées sont détaillées dans le chapitre suivant.

4.6 Source de photons uniques accélérés

4.6.1 Dispositif Hanbury-Brown & Twiss

Comparé aux différentes techniques top-down utilisées pour la fabrication de nano-antennes d'or [15], les solutions colloïdales de NPsAu produisent une faible photoluminescence ce qui facilite la mesure du signal de fluorescence spécifique à une molécule. Dans cette partie, nous souhaitons vérifier que nous conservons une émission de photons uniques lorsque l'antenne est alimentée par une molécule fluorescente. L'analyse statistique de photons uniques permet d'obtenir cette information. Pour cela, la partie détection du dispositif expérimental est modifiée en utilisant un montage Hanbury-Brown & Twiss. Il consiste, après avoir séparé le signal de fluorescence par une lame 50/50, à ajouter un deuxième détecteur identique au premier. La modification du dispositif expérimental est illustrée sur la figure 4.15. Les photons de fluorescence sont détectés par des photodiodes qui génèrent une impulsion à chaque événement de photodétection. On mesure le délai entre la détection d'un photon sur un détecteur relié à l'entrée START de l'hydraharp 400 et le deuxième détecteur relié à l'entrée STOP. Au moment de l'excitation, la molécule dans son état fondamental est portée dans un état excité. Elle reste dans cet état jusqu'à ce qu'elle se désexcite en émettant éventuellement un photon. Au plus un seul photon est émis par impulsion incidente [112].

Cependant il est nécessaire de prendre des précautions expérimentales :

- la largeur de l'impulsion laser doit être suffisamment courte pour n'avoir qu'un seul cycle d'absorption et d'émission de la molécule.
- le taux de répétition de l'impulsion laser doit être supérieur au temps de vie de fluorescence.

Dans le cas de ces mesures, nous augmentons la puissance d'excitation car la détection de coïncidences d'émission de photons sur deux détecteurs est peu probable.

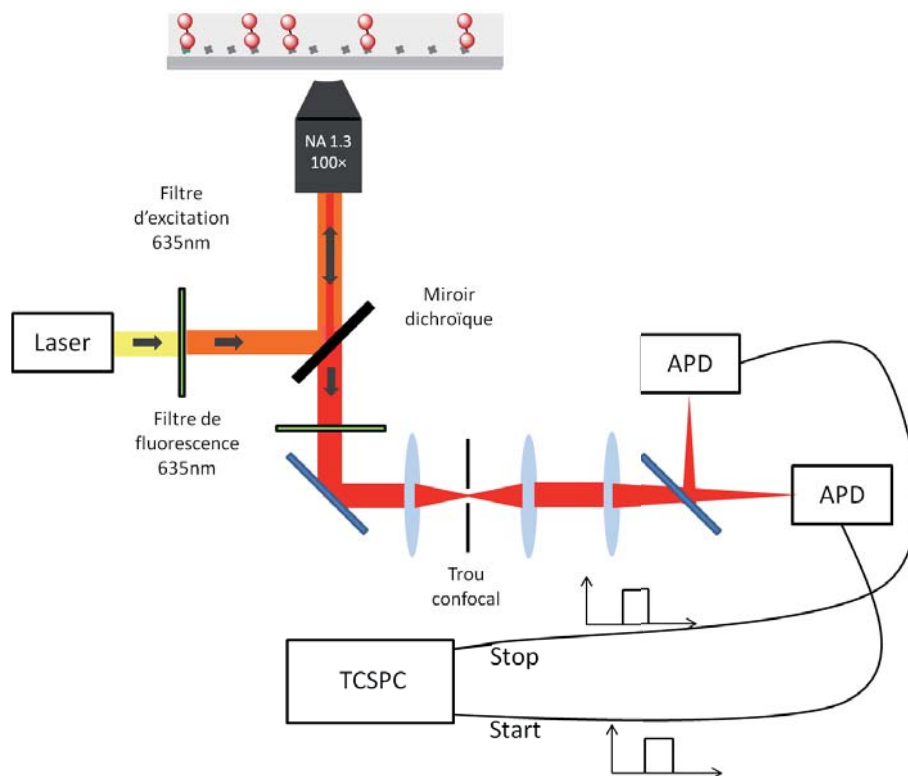


Figure 4.15 – Schéma du dispositif expérimental de mesures d'anti-coïncidences par une détection de type Hanbury-Brown & Twiss.

4.6.2 Mesures des anti-coïncidences

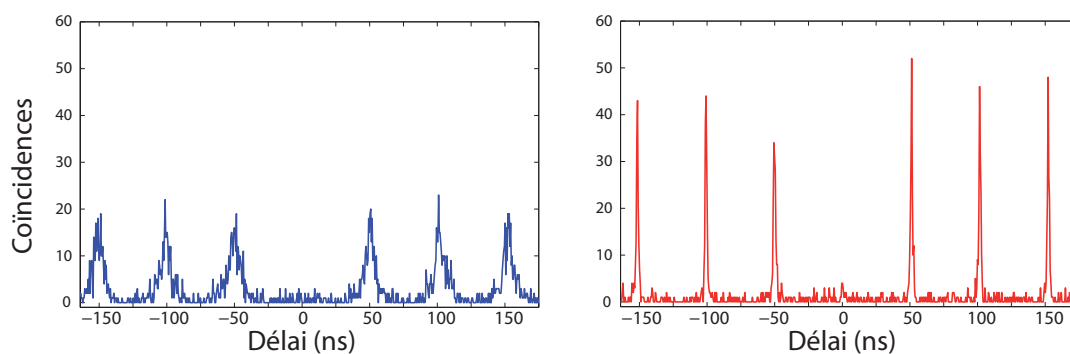


Figure 4.16 – Mesures de coïncidences de photons uniques. Statistique typique d'émission de photons de (a) de molécule d'ATTO647N isolée et (b) d'un dimère de 30 bp.

La courbe bleue représente l'analyse statistique des photons émis par une molécule d'ATTO647N isolée. Au délai nul sur l'axe des abscisses, on ne mesure pas de coïncidences ce qui démontre qu'il ne peut pas y avoir deux photons émis au même instant. L'histogramme des anti-coïncidences pour une molécule unique placée au centre d'un dimère de 30 pb, est illustré en rouge. Cette analyse nous permet de conclure que nous mesurons bien une seule molécule par dimère tout en conservant les propriétés d'une source de photons uniques. L'observation de pics plus étroits lorsque la molécule fluorescente est sous l'influence d'une nano-antenne signifie que le dimère améliore nettement la

cohérence temporelle de de l'émission spontanée d'une source quantique unique.

4.7 Conclusions

Nous avons vu dans ce chapitre qu'il est possible d'introduire une molécule d'ATTO647N unique à proximité d'une particule d'or ou au centre de dimères de NPsAu par le biais d'un double brin d'ADN. Un très bon accord entre les calculs théoriques et les données expérimentales démontre un contrôle de la position de l'émetteur à l'échelle du nanomètre au centre du dimère. Lorsque la longueur du brin d'ADN est modifiée de 10 pb, entre l'émetteur et la particule, on estime une variation de cette distance de 2 nm. Cette précision est aujourd'hui inaccessible avec les méthodes de lithographie top-down. Suite aux deux hypothèses faites sur les calculs théoriques, nous estimons que nos échantillons présentent une distribution limitée de l'orientation de la molécule autour de $\theta = \pi/4$ et une faible variation de la distance émetteur-particule de $\pm 1nm$ (dans le cas des dimères). Nous obtenons donc des suspensions d'une grande pureté de dimères d'or alimentés par une molécule qui agissent comme des sources de photons uniques accélérées. Les nano-antennes optiques auto-assemblées sont donc des systèmes idéaux pour comprendre comment les modes brillants ou sombres permettent d'exalter [15] ou de modifier le rayonnement électromagnétique [16] de l'émission spontanée ; mais aussi de guider et collecter l'énergie électromagnétique ("light harvesting") [113]. Toutefois, ces travaux sur molécules uniques ne permettent pas une estimation expérimentale de l'efficacité de l'antenne sans une connaissance précise de l'orientation des brins d'ADN dans la micro-chambre. Des mesures par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) [18] vont nous permettre d'évaluer une valeur moyennée de cette efficacité ainsi que du rendement quantique effectif. Ces travaux sont détaillées dans le chapitre suivant.

Mesures d'ensemble des propriétés photophysiques de dimères de
NPsAu alimentés par une molécule unique

Table des matières

5.1	Introduction à la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)	98
5.1.1	Principes généraux	98
5.1.2	Analyse des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence	99
5.1.3	Caractérisation des propriétés photophysiques moléculaires au voisinage de nano-antennes	103
5.2	Méthodes	105
5.2.1	Dispositif expérimental de FCS	105
5.2.2	Dispositif expérimental de TCSPC	106
5.3	Résultats expérimentaux	107
5.3.1	Estimation des temps de diffusion et du nombre d'émetteurs	107
5.3.2	Mesures des exaltations du taux d'émission total Γ	109
5.3.3	Détermination expérimentale des gains à l'excitation et à l'émission	110
5.3.4	Analyse spectrale de l'exaltation de fluorescence	112
5.4	Discussion	113
5.4.1	calculs théoriques de temps de vie de fluorescence	113
5.4.2	Perspectives	114
5.5	Conclusion	115

Dans ce chapitre, nous allons démontrer comment, par le biais d'antennes optiques (dimères de NPsAu) en suspension, nous pouvons expérimentalement contrôler les propriétés d'absorption et d'émission d'émetteurs uniques. Ceci nous permettra de mettre en évidence des propriétés photophysiques remarquables comme une exaltation de plus d'un ordre de grandeur des sections efficaces d'absorption et des taux d'émission avec une grande brillance pour un rendement quantique faible. Nous utilisons les dimères de NPsAu décrits dans le chapitre précédent : 40 nm de diamètre liés par des brins de 30 et 50 bases et comportant une molécule d'ATTO647N unique. La mesure de fluorescence de nano-structures individuelles par TCSPC ne permet pas d'estimer quantitativement certains paramètres comme le rendement quantique, le gain de fluorescence, ainsi que le taux d'excitation. Cette limite est due, d'une part, au manque de contrôle de l'orientation des dimères dans la micro-chambre et, d'autre part, à une incertitude sur l'alignement du microscope d'un échantillon microfluidique à un autre. Nous allons donc utiliser une combinaison de plusieurs méthodes de caractérisation comme la spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS), les mesures de fluorescence corrélées en temps (TCSPC) ainsi que la spectroscopie d'émission de fluorescence, pour quantifier des valeurs moyennes des propriétés photophysiques de ces émetteurs hybrides métallo-organiques : section efficace d'absorption, temps de vie de fluorescence et rendement quantique. La grande pureté des suspensions de dimères de NPsAu sera, par ailleurs, confirmée par des mesures de coefficients de diffusion translationnelle et rotationnelle qui sont accessibles par les mesures FCS.

5.1 Introduction à la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

5.1.1 Principes généraux

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une technique d'analyse du signal de fluorescence basée sur les fluctuations temporelles d'intensité. Ces fluctuations sont induites par un faible nombre d'objets fluorescents diffusant à travers un petit volume confocal d'analyse. La FCS permet ainsi une analyse quantitative du nombre moyen d'émetteurs dans un volume de détection, la caractérisation de leur brillance et la déduction de leurs propriétés de diffusion translationnelle ou rotationnelle [114, 115]. L'image 5.1 représente des dimères auto-assemblés en libre diffusion dans un volume de détection. Contrairement aux mesures présentées dans le chapitre précédent 4, cette technique de me-

sure ne nécessite pas de fonctionnaliser une surface pour immobiliser les nano-structures. Les émetteurs en solution diffusent par mouvement Brownien dans et hors du volume confocal d'analyse. Les molécules fluorescentes sont excitées uniquement lorsqu'elles diffusent dans le petit volume d'observation, ce qui limite le photoblanchiment de la molécule organique, et permet ainsi de les mesurer sur une plus longue période.

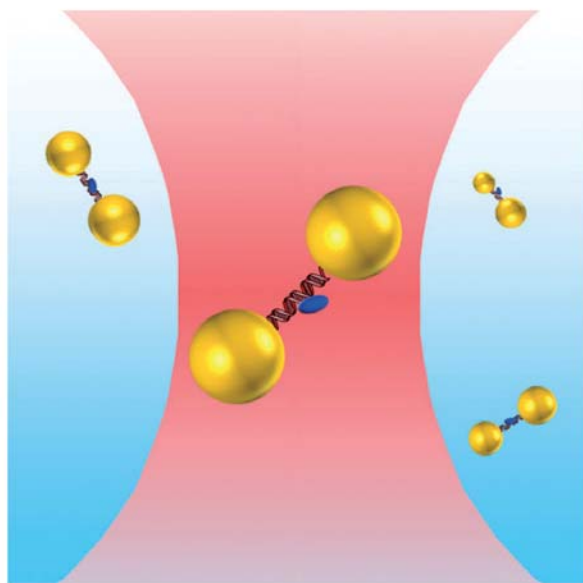


Figure 5.1 – Suspension de dimères de NPs Au comportant une molécule d'ATTO647N et diffusant dans et hors du volume focal d'analyse FCS.

La combinaison de deux techniques de caractérisation de fluorescence, telles que la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et les mesures de temps de vie de fluorescence (TCSPC), permet également de caractériser les propriétés photophysiques de molécules en analysant leur saturation en excitation [103]. Comme l'émission de fluorescence d'un émetteur est fortement modifiée lorsque celui-ci est à proximité de nano-particules métalliques, la FCS est particulièrement utile pour caractériser l'influence d'antennes optiques sur la photophysique moléculaire [103].

Contrairement aux mesures de nanostructures individuelles du chapitre précédent, toutes les données présentées dans ce chapitre sont des mesures moyennées. L'intensité de fluorescence $F(t)$ est collectée pour calculer la fonction de corrélation $g^{(2)}(\tau) = \langle F(t)F(t + \tau) \rangle / \langle F(t) \rangle^2$, avec $F(t)$ le signal de fluorescence, et $\langle \rangle$, la moyenne temporelle. Ces mesures ont été effectuées à l'Institut Fresnel à Marseille par le Dr. Jérôme Wenger.

5.1.2 Analyse des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence

L'analyse des données de FCS permet de déterminer la concentration de la solution (nombre de molécules dans le volume d'analyse) ainsi que les temps de diffusion translationnelle et rotationnelle. L'interprétation des mesures de FCS est basée sur un modèle

standard de diffusion brownien en trois dimensions, pour des spécimens simples, en supposant un profil gaussien en excitation et en détection [115].

L'expression de la fonction d'autocorrélation temporelle $g^2(\tau)$ correspondant à une diffusion brownienne 3D est définie de la façon suivante :

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 - \frac{B}{F}\right)^2 \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d} \sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_d}}} \quad (5.1)$$

où N est le nombre total d'émetteurs, F l'intensité de fluorescence totale, B le bruit de fond, τ_d le temps de diffusion translationnelle et s le ratio entre la dimension transverse et axiale du volume d'analyse. Le bruit affecte uniquement l'amplitude de la fonction d'autocorrélation : le nombre de molécules dans le volume confocal peut alors être surestimé si le bruit n'est pas pris en compte. En revanche, les temps caractéristiques de diffusion ne sont pas influencés par la correction du bruit de fond [116]. Le temps de diffusion translationnelle τ_d est lié au coefficient de diffusion D par $\tau_d = W_{xy}^2/4D$ où W_{xy} est la largeur transverse du volume de détection. D est liée au rayon hydrodynamique R_h par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (5.2)$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue et η la viscosité de milieu. La figure 5.2 présente le corrélogramme $g(\tau)^{(2)}$ obtenu avec des brins d'ADN de 50 bp présentant une molécule d'ATTO647N. Les conditions expérimentales, dans lesquelles cette mesure est obtenue sont décrites, dans la suite de ce chapitre. Toutefois, il est intéressant d'analyser ces données dès le début de ce chapitre pour mettre en évidence les informations accessibles par des mesures de FCS.

L'ajustement de la courbe d'auto-corrélation $g(\tau)^{(2)}$ en figure 5.2 implique deux paramètres : le nombre moyen d'émetteurs N (4,8 molécules ici) et le temps de diffusion translationnelle τ_d (d'environ 1,53 ms). Les autres paramètres de l'équation 5.1 sont estimés expérimentalement de manière indépendante. En divisant F par N , il est alors possible de remonter à la brillance moyenne des émetteurs, CRM (pour "count rate per molecule"). Dans cet exemple, l'amplitude de la courbe à $\tau \rightarrow 0$ est l'inverse du nombre moyen d'émetteurs. Toutefois, ceci n'est vrai que si l'on peut négliger des phénomènes photophysiques et mécaniques rapides (dans la gamme des μs) comme le couplage inter-système (typiquement passage dans un état triplet excité de l'émetteur) ou la rotation du fluorophore. Dans le cas général, la fonction d'auto-corrélation va s'écrire comme :

$$g^{(2)}\tau = 1 + \frac{1}{N} \left(1 - \frac{B}{F}\right)^2 \left(1 + n \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_2}\right)\right) \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d} \sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_d}}} \quad (5.3)$$

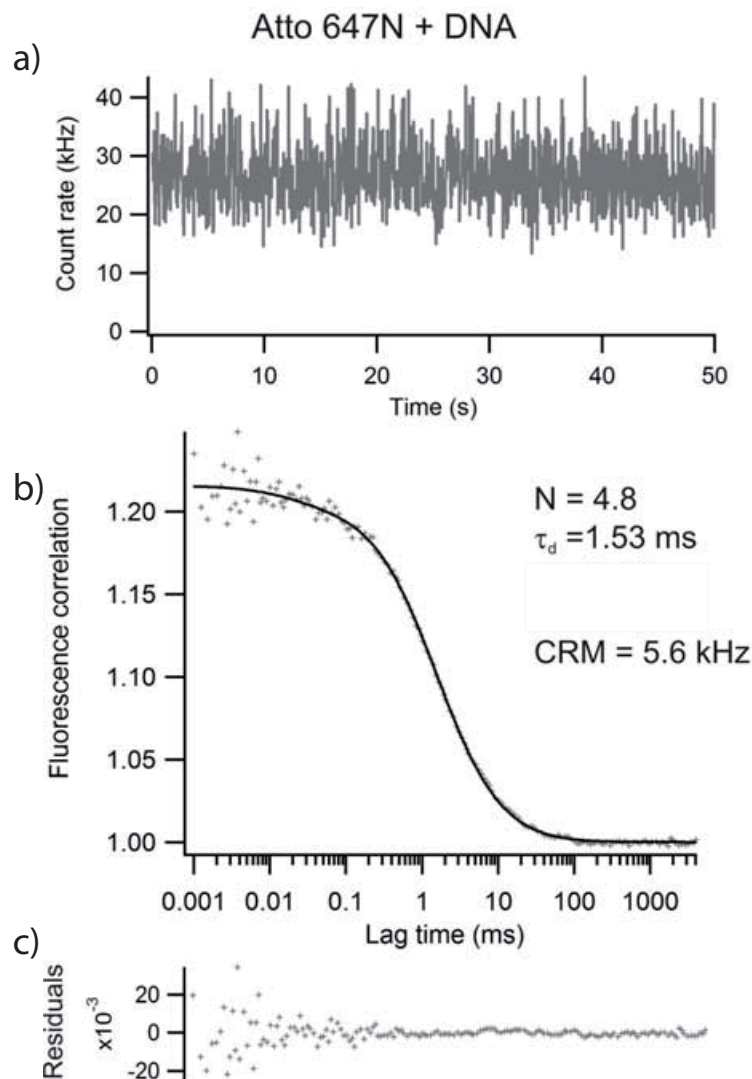


Figure 5.2 – Corrélogramme obtenu avec des brins d'ADN de 50 bp présentant une molécule d'ATTO647N : données expérimentales (points) et ajustement théorique (courbe continue noire) obtenu à partir de l'équation 5.1.

où τ_2 est le temps caractéristique du processus microseconde (triplet ou rotation) et n son poids relatif. L'excellent ajustement de la figure 5.2 sans introduire de temps τ_2 signifie deux choses : la rotation du brin d'ADN de 50 bp est trop rapide et le couplage inter-système est négligeable pour l'ATTO647N. Ceci n'est plus le cas pour un dimère de 30 bp comme indiqué sur la figure 5.3. Dans ce cas, le corrélogramme présente un plateau secondaire dans la gamme des microsecondes. En ajustant les données expérimentales avec l'équation 5.3, il est possible d'estimer N , τ_d , n et τ_2 . Il n'est possible d'ajuster efficacement un nombre aussi grand de paramètres que si τ_d et τ_2 sont sensiblement différents comme sur la figure 5.3 où ils valent, respectivement, 9,2 ms et 38 μ s.

L'origine du plateau microseconde peut être photophysique ou mécanique.

Comme l'ATTO647N seul présente un passage négligeable vers un état triplet, l'origine vient probablement de la rotation du dimère ralentie vis à vis d'un brin d'ADN nu par

la présence des nanoparticules. Le temps de diffusion rotationnelle τ_2 est lié au coefficient rotationnel Θ par $\tau_2 = 1/6\Theta$. Pour un ellipsoïde prolate de 93 nm de long et de 40 nm de large (similaire à nos dimères en première approximation), le temps de diffusion rotationnelle théorique est de 33,4 μs . Cette valeur est en excellent accord avec l'estimation expérimentale de τ_2 .

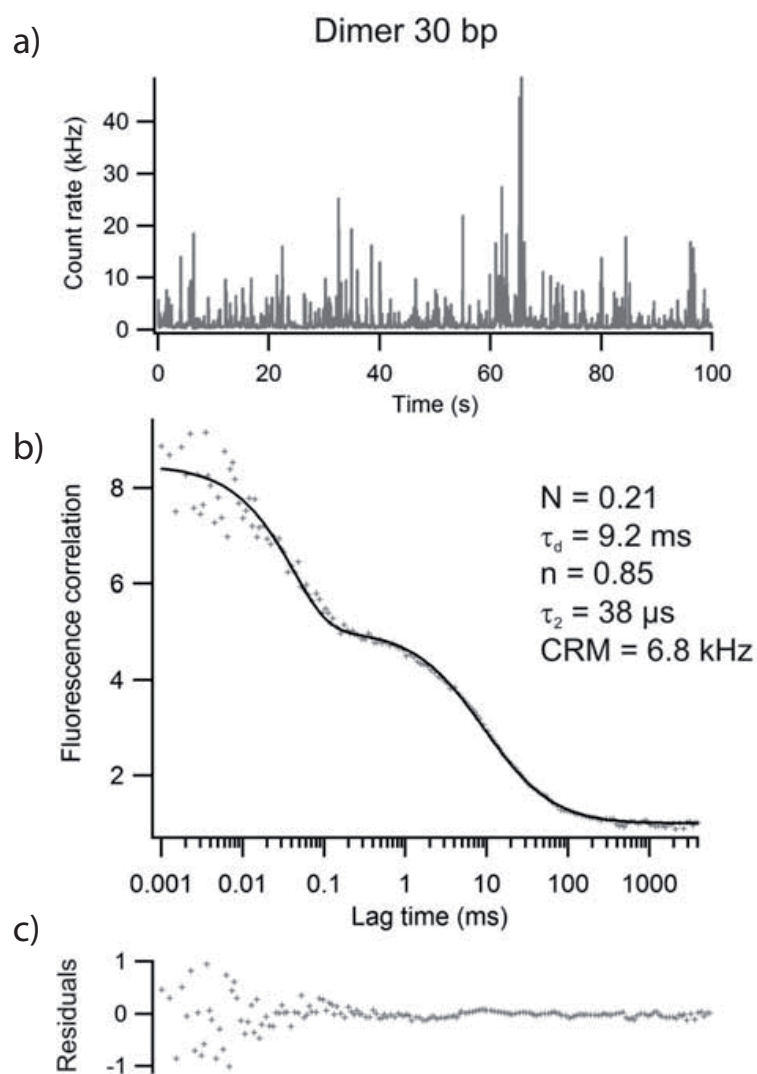


Figure 5.3 – Corrélogramme obtenu avec des dimères de 30 bp présentant une molécule d'ATTO647N : données expérimentales (points) et ajustement théorique (courbe continue noire) obtenu à partir de l'équation 5.3.

Les mesures de FCS avec des monomères et des dimères de particules de 40 nm, associés à un brin de 30 bp ou 50 bp contenant une molécule d'ATTO647N, doit donc nous permettre d'estimer précisément leur brillance moyenne (*CRM*) mais aussi de caractériser leur rayon hydrodynamique et leur vitesse de rotation.

5.1.3 Caractérisation des propriétés photophysiques moléculaires au voisinage de nano-antennes

Comme l'ont indiqué les mesures de molécules uniques du chapitre précédent, le CRM d'une molécule d'ATT0647N va être modifié en présence d'une ou deux nanoparticules d'or. Le taux de fluorescence par molécule est donné par la relation $CRM = \langle F \rangle / N$ et dépend de la section efficace d'absorption σ et du rendement quantique ϕ des chromophores, selon la relation [117] :

$$CRM = \kappa \phi \frac{\sigma I_{exc}}{1 + I_{exc}/I_{sat}} \quad (5.4)$$

où κ est l'efficacité de collection, I_{exc} l'intensité d'excitation et I_{sat} l'intensité de saturation. $\kappa \approx 1$ pour des monomères ou dimères de taille nanométrique qui rayonnent comme des dipôles en champ lointain. I_{sat} peut être exprimée en fonction du taux d'émission total Γ , $I_{sat} = \Gamma/\sigma$, en négligeant les contributions de l'état triplet (comme cela a été confirmé sur l'analyse des temps de corrélation). L'ajustement de courbes de saturation avec l'équation 5.4 va donc nous permettre, en mesurant Γ moyen, de déduire les changements relatifs de la section efficace d'excitation σ et du rendement quantique ϕ induits par les NPsAu, comparés à la solution de référence d'ATTO647N dont les propriétés photophysiques sont données par le fournisseur.

L'estimation de l'exaltation de fluorescence η_F est définie par le ratio entre le CRM sous l'influence de NPsAu et le CRM de l'ATTO647N isolée (CRM_{ref}).

$$\eta_F = \frac{CRM}{CRM_{ref}} \quad (5.5)$$

En pratique, l'ajustement des courbes de saturation avec l'équation 5.4, permet de déduire l'exaltation du signal de fluorescence par une étude asymptotique : estimation de l'exaltation de fluorescence dans le régime linéaire, $I_{exc} \ll I_{sat}$ et dans le régime de saturation $I_{exc} \gg I_{sat}$.

Régime linéaire $I_{exc} \ll I_{sat}$:

le taux de fluorescence par molécule (CRM_{lin}) peut donc s'exprimer de la façon suivante :

$$CRM_{lin} = \phi \sigma I_{exc} \quad (5.6)$$

Régime de saturation $I_{exc} \gg I_{sat}$:

Dans la limite asymptotique du régime de saturation, le taux de fluorescence par molécule CRM_{sat} , est définie de la façon suivante :

$$CRM_{sat} = \phi\sigma I_{sat} \quad (5.7)$$

Le taux de fluorescence par molécule CRM_{sat} ne dépend plus de l'intensité d'excitation I_{exc} . En supposant que l'émetteur peut être décrit par un système quantique à deux niveaux, cette équation se simplifie comme :

$$CRM_{sat} = \Gamma_R \quad (5.8)$$

Une estimation des intensités de saturation des monomères et dimères, par rapport à une molécule d'ATTO647N sur un brin d'ADN nu, va donc nous permettre de remonter directement à l'évolution du taux radiatif en présence des antennes.

Pour caractériser expérimentalement l'exaltation de fluorescence au voisinage d'une nano-antenne, la démarche consiste à combiner des études FCS en fonction de la puissance d'excitation I_{exc} et des mesures de temps de vie de fluorescence, selon la procédure suivante :

- Le taux de fluorescence par particule CRM , est mesuré en FCS en faisant varier la puissance d'excitation, ceci pour les cinq échantillons étudiés.
- Les points expérimentaux du taux de fluorescence par particule CRM en fonction de I_{exc} , sont ajustés avec l'équation 5.4. A partir de cette ajustement numérique, nous en déduisons l'exaltation de fluorescence dans le régime linéaire $\eta_{F,lin}$ et à saturation $\eta_{F,sat}$.
- Dans le régime de saturation, nous estimons l'évolution de Γ_R , dans l'hypothèse que les émetteurs sont identiques et se comportent comme des systèmes quantiques à deux niveaux.
- Le taux d'émission total Γ est caractérisé par la mesure de temps de vie de fluorescence en TCSPC. Le ratio entre Γ et Γ_R permet d'estimer le rendement quantique en présence des antennes.
- L'évolution de σ en présence de l'antenne est estimée à partir des CRM en régime linéaire et des rendements quantiques. En utilisant le coefficient d'extinction molaire ϵ de l'ATTO647N, nous pourrions en déduire ϵ pour les différentes suspensions de nanostructures à la longueur d'onde d'excitation.

Cette procédure doit donc nous permettre d'estimer toutes les propriétés photophysiques moyennes des monomères et dimères alimentés par l'ATTO647N.

5.2 Méthodes

5.2.1 Dispositif expérimental de FCS

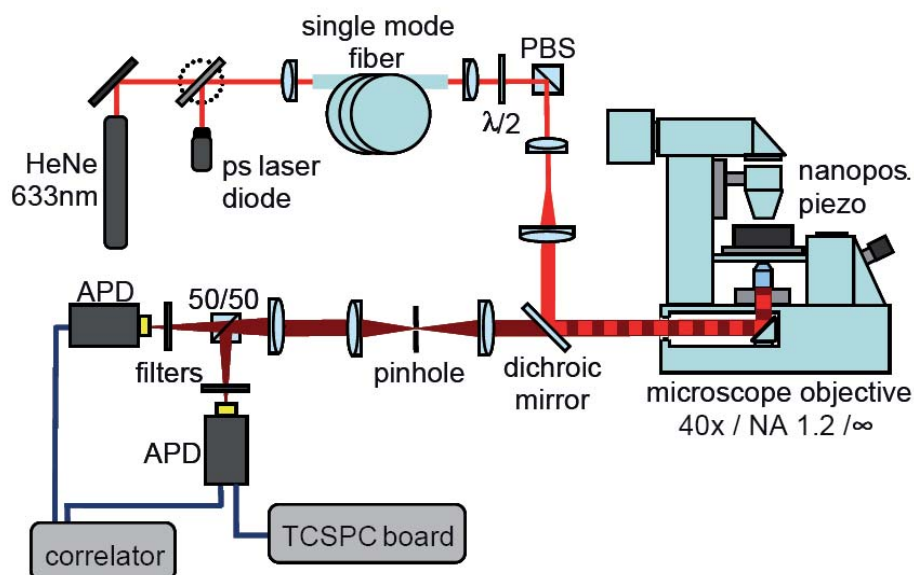


Figure 5.4 – Représentation schématique du dispositif expérimental de mesure de FCS et de TCSPC, tirée de l'article [118].

Les mesures en FCS sont faites par l'équipe de J. Wenger à l'Institut Fresnel. Le montage utilisé est basé sur un microscope inversé (Zeiss Axiovert 35M). L'excitation des nano-structures pour les mesures en FCS s'effectue avec un laser HeNe continu (633 nm) polarisé linéairement. L'excitation linéaire, en absence d'analyse en polarisation, permet d'observer les temps de diffusion rotationnelle des échantillons. Malgré nos concentrations typiques de 200 pM d'émetteurs fluorescents, il faut s'assurer qu'il y ait au moins 0.2 émetteurs fluorescents détectés dans le volume confocal pour un bon rapport signal/bruit. Pour adapter le volume de mesure à la concentration des émetteurs, la pupille arrière de l'objectif de microscope (8.9 mm) n'est pas totalement illuminée par l'étendue spatiale du faisceau laser (4 mm). Ceci permet de réduire l'ouverture numérique afin d'obtenir un volume d'analyse plus important. Le dispositif expérimental, présenté sur la figure 5.4, permet également de procéder à des mesures de temps de vie de fluorescence par TCSPC. Cette configuration sera détaillée dans la section suivante.

La puissance du faisceau incident est contrôlée par une lame demi-onde ($\lambda/2$) associée à un cube polariseur. Afin de basculer entre les mesures de FCS et TCSPC sans avoir de problème d'alignement, une fibre monomode (Thorlabs P3-630A-FC-5) permet d'assurer un parfait chevauchement spatial entre le laser continu HeNe et la diode laser utilisée pour les mesures TCSPC. Les deux faisceaux empruntent le même trajet optique en sortie de la fibre afin d'assurer une parfaite conjugaison des deux points focalisés sur l'échantillon. L'excitation et la collection des photons de fluorescence se font à l'aide du même objectif

à immersion à eau de forte ouverture numérique (Zeiss C-Apochromat, grossissement $\times 40$, d'ouverture numérique 1.2). Un miroir dichroïque (Omega filter XF2072), placé avant l'objectif, laisse passer l'excitation laser dans un sens et uniquement la fluorescence dans l'autre sens ($\lambda=670$ nm). Les émetteurs utilisés pour les mesures de FCS et de temps de vie, sont les mêmes que ceux étudiés dans le chapitre 4.1. Toutefois, pour la synthèse de ces nanostructures, le diamètre moyen des nanoparticules d'or est de 40 nm comparé à 36 nm dans les chapitres précédents. Pour rappel, la molécule organique utilisée (ATTO647N) dont les spectres d'absorption et d'émission se situent respectivement à 630 nm et 670 nm, a un rendement quantique de 65% estimé par le fournisseur. Le signal de fluorescence est ensuite filtré spatialement à l'aide d'un trou confocal de 50 μm , placé dans le plan image de l'objectif de microscope. Le signal à la sortie est divisé en deux par un cube séparateur 50/50, puis traverse un filtre de fluorescence à 670 ± 20 nm, pour être ensuite focalisé sur deux photodiodes à avalanche MPD (Micro Photon Devices de PicoQuant MPD-5CTC, avec un temps mort de 50 ns et une surface active de 100 μm). Les fluctuations du signal de fluorescence sont analysées par corrélation croisée des signaux de chacun des détecteurs à l'aide d'un corrélateur ALV6000.

Une solution d'Alexa Fluor 647 est utilisée comme référence pour calibrer le volume confocal d'analyse FCS (4.5 fL), la taille transversale du waist ($W_{(xy)}=570$ nm) et le ratio s entre la dimension transverse et axiale du volume d'analyse (0,2).

5.2.2 Dispositif expérimental de TCSPC

Pour les mesures de temps de vie de fluorescence, l'excitation est faite à l'aide d'un laser picoseconde opérant à 636 nm (Picoquant LDH-P-635), avec un taux de répétition de 80 MHz. La carte électronique utilisée pour les mesures de temps de vie de fluorescence est une PicoHarp 300 (PicoQuant). La largeur à mi-hauteur de la réponse d'instrument (IRF) en montage TCSPC est de 120 ps. L'analyse de l'IRF montre que la courbe a une forme décroissante bi-exponentielle : $IRF(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)$, avec $A_1 = 0.65$, $A_2 = 0.35$, $k_1 = 17.2410^9 s^{-1}$ et $k_2 = 4.5910^9 s^{-1}$. Le signal de sortie $S(t)$ du module TCSPC est la convolution entre l'IRF et le déclin de fluorescence, lequel est présumé mono-exponentiel. La convolution entre la décroissance de fluorescence mono-exponentielle et la bi-exponentielle de l'IRF donne une fonction tri-exponentielle utilisée pour ajuster les données expérimentales de temps de vie de fluorescence. L'ajustement du déclin de temps de vie est estimé avec seulement trois paramètres libres, car les coefficients A_1 , A_2 , k_1 et k_2 sont fixés par l'analyse de IRF. La figure 5.5 montre le résultat de l'ajustement d'un dimère de 30 pb avec IRF convoluée avec une fonction mono-exponentielle.

Il n'est pas courant de présenter les données de déclin de temps de vie de fluorescence avec un axe vertical linéaire, mais ceci permet de mettre en évidence la qualité de l'ajustement. Nous avons estimé le temps de vie de fluorescence à 65 ps pour cette géométrie.

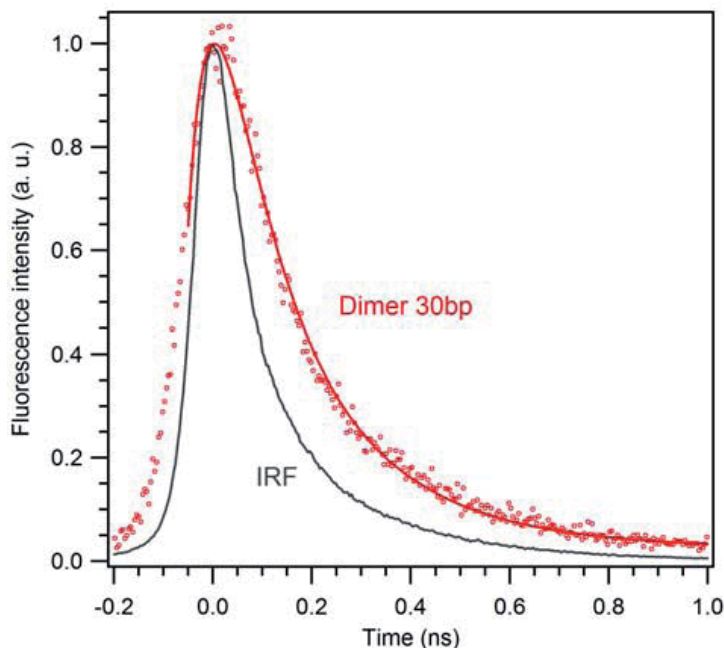


Figure 5.5 – Déclin de temps de vie de fluorescence de dimères de 30 pb. Les points représentent la mesure expérimentale, la ligne continue noire représente la fonction de réponse d’appareil, la ligne continue rouge est la fonction d’ajustement (IRF + mono-exponentielle). Le résultat de cet ajustement permet d’estimer un temps de vie de 65 ps.

5.3 Résultats expérimentaux

5.3.1 Estimation des temps de diffusion et du nombre d’émetteurs

Nous avons caractérisé 5 différentes géométries d’échantillon : une solution de référence de molécules d’ATTO647N fixées sur une double hélice d’ADN de 50 pb (ATTO), une solution de NPsAu de 40 nm de diamètre fonctionnalisées avec un double brin d’ADN de 50 bp ou de 30 pb, sur lequel est greffée une molécule unique d’ATTO647N (respectivement mono50 et mono30) ; et une suspension de dimères de NPsAu de 40 nm liés par un double brin d’ADN de 50 pb ou 30 pb contenant également une molécule unique d’ATTO647N au centre (dim50 et dim30).

Les données des figures 5.6 illustrent les mesures FCS pour quatre échantillons. La mesure du mono30 n’est pas incluse pour une meilleure visualisation. Ce graphique montre la fonction de corrélation de fluorescence pour les échantillons d’ATTO (courbe noire), mono50 (courbe verte), dim50 et dim30 (courbes bleue et rouge). La puissance d’excitation est de $65 \mu W$, et le bruit de fond est estimé à 0.13 KHz. Ceci correspond à 0.5% de l’intensité de fluorescence moyenne de l’échantillon de référence d’ATTO647N et entre 3% et 10% du signal de fluorescence pour les échantillons de dimères et de monomères, à cause de plus faibles concentrations. Le bruit est évalué en mesurant les fluctuations d’intensité $F(t)$ d’une solution sans émetteur fluorescent. Les données figure 5.6 sont normalisées par le nombre d’émetteurs moyen contenus dans le volume d’analyse, et permet

d'obtenir une meilleure visualisation des variations des temps de diffusion caractéristiques des échantillons.

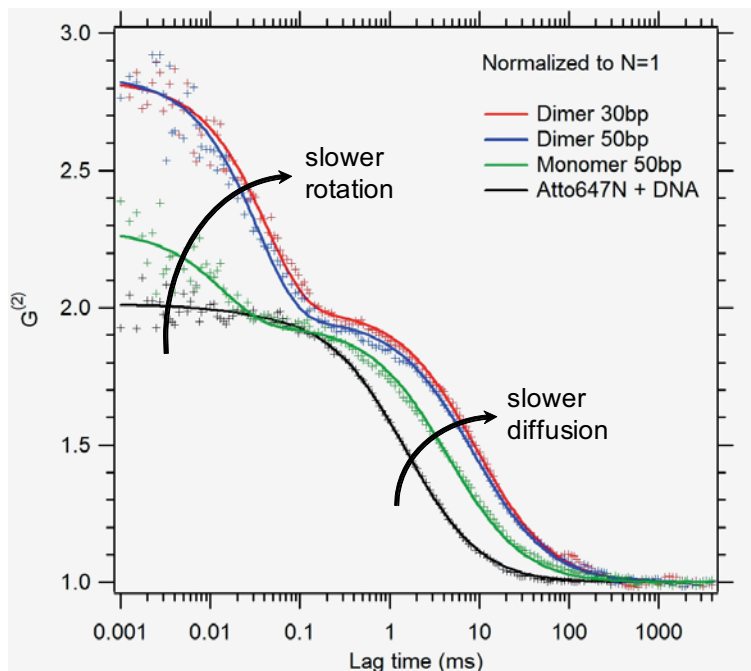


Figure 5.6 – Effets des variations des vitesses de diffusion rotationnelle et translationnelle sur les corrélogrammes pour les échantillons : ATTO647N isolée fixée sur un brin d'ADN de 50 pb (courbe noire), Monomères 50pb (courbe verte), dimères 50 pb (courbe bleue) et dimères 30pb (courbe rouge), les flèches illustrent la différence de forme entre les courbes, liée à la variation du volume hydrodynamique entre les nano-objets.

Sur la figure 5.6, deux temps caractéristiques sont visibles : inférieur ou supérieur à $100 \mu s$. En deçà de $100 \mu s$, la flèche noire illustre la différence de vitesse rotationnelle entre les échantillons et pour les temps supérieurs à $100 \mu s$, nous évaluons la vitesse de diffusion translationnelle qui correspond à la vitesse à laquelle l'objet traverse le volume d'excitation.

Nous comparons les valeurs des temps de diffusion d'un échantillon de référence d'ATTO (liée à un double brin d'ADN 50 pb) avec ceux des différentes géométries de nano-objets sur le tableau 5.7. Ces temps augmentent graduellement en fonction du nombre de NPsAu composant les nano-structures comme illustré par les flèches sur la figure 5.6.

Ces valeurs mettent en évidence la pureté des solutions mesurées. En effet, l'ajustement des corrélogrammes de FCS ne peut se faire que si la population de brins d'ADN avec ATTO et sans NPsAu est inférieure à 5% dans les échantillons de monomères. Cette population est négligeable pour les solutions de dimères. Par contre, une sous-population de 0-30 % de monomères dans les suspensions de dimères est possible compte-tenu du plus faible écart de temps de diffusion. L'estimation des temps de diffusion rotationnelle théoriques est réalisée en simulant un monomère par une sphère et les dimères par une particule ellipsoïde allongée (dernière colonne du tableau 5.7) [119]. Le bon accord entre les calculs théoriques et les observations expérimentales confirme que le plateau observé sur la fonction de corrélation $g(\tau)^{(2)}$ inférieur à $100 \mu s$ est bien induit par la diffusion

rotationnelle et non pas par la variation d'intensité liée au temps de vie de l'état triplet (clignotement).

Le tableau 5.7 répertorie les valeurs des temps de diffusion rotationnelle et translationnelle, les coefficients de diffusion et les rayons hydrodynamiques pour les cinq géométries d'échantillon.

Échantillon	Temps de diffusion (ms)	Coefficient de diffusion (cm^2s^{-1})	Rayon hydrodynamique (nm)	Temps de rotation (μs)	Temps de rotation (μs) (théorique)
ATTO	1.53 ± 0.05	5.3×10^{-7}	4.1	-	-
mono50	4.3 ± 0.1	1.9×10^{-7}	11.5	11 ± 1	$11^{[a]}$
mono30	4.2 ± 0.1	1.9×10^{-7}	11.3	11 ± 1	$11^{[a]}$
dim50	9.6 ± 0.2	8.5×10^{-8}	25.7	36 ± 2	$36.9^{[b]}$
dim30	9.2 ± 0.2	8.8×10^{-8}	24.6	38 ± 2	$33.4^{[c]}$

Figure 5.7 – [a] sphère de 44 nm de diamètre. [b] ellipsoïde de 40 nm de largeur et 99 nm de longueur. [c] Ellipsoïde de 40 nm de largeur et 93 nm de longueur.

5.3.2 Mesures des exaltations du taux d'émission total Γ

La figure 5.8 illustre les mesures du signal de décroissance de fluorescence des échantillons : d' ATTO647N (points noirs), de mono50 (points verts), de mono30 (points bleus), de dim50 (points violets) et de dim30 (points rouges). L'ajustement des mesures expérimentales est faite par une fonction mono-exponentielle convoluée avec la fonction de réponse d'appareil (courbes continues noires).

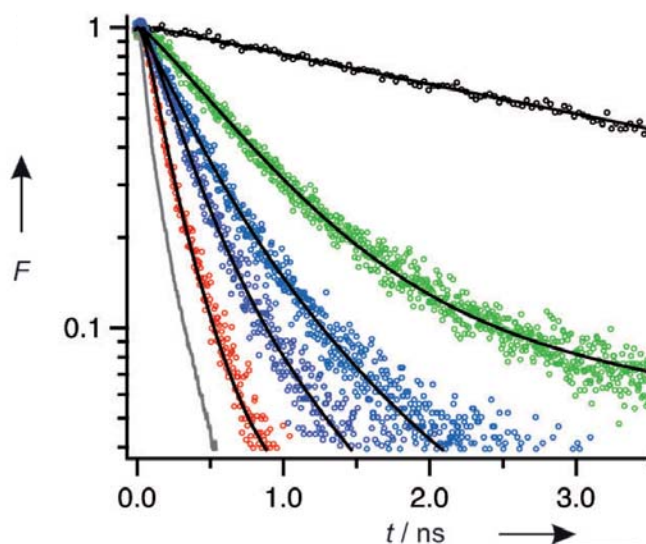


Figure 5.8 – Déclin du signal de fluorescence mesuré en TCSPC : ATTO647N (points noirs, $\tau = 4.3 \pm 0.1\text{ns}$), mono50 (points verts, $\tau = 615 \pm 20\text{ps}$), mono30 (points bleus, $\tau = 135 \pm 15\text{ps}$), dim50 (points violets, $\tau = 185 \pm 15\text{ps}$) et dim30 (points rouges, $\tau = 65 \pm 10\text{ps}$), ajustés par une courbe mono-exponentielle convoluée avec la fonction de réponse d'appareil IRF (courbe grise) afin d'estimer τ (courbes continues noires).

Pour les échantillons de monomères, l'interpolation des courbes de déclin est réalisée avec 2.5% d'une sous-population de molécules seules. Nous prenons en compte une sous-population de 30% de mono50 dans les échantillons de dim50. L'obtention du bon ajustement des courbes de déclin confirme la pureté des échantillons estimés en FCS et reste cohérent avec les valeurs estimées par les mesures de cryo-EM du chapitre 2 (pureté des dimères de l'ordre de 70%). Ces mesures mettent à nouveau en évidence la forte influence des NPsAu sur le temps de vie de fluorescence, estimé à 4.3 ns pour la référence ATTO et une forte réduction pour les dim30 à 65 ps.

Le temps de vie de fluorescence dans le chapitre précédent pour l'ATTO était estimé à $\tau = 3.2$ ns. Les mesures en FCS sont faites dans l'eau, contrairement aux mesures du chapitre précédent réalisées dans un milieu oxydo-réducteur (ROXS). Le ROXS modifie le rendement quantique de la molécule. Plus particulièrement, le méthylviologène contenu dans la composition du ROXS réduit le rendement quantique de molécules organiques en augmentant le nombre de canaux de désexcitation non radiative par des réactions d'oxydation [120].

5.3.3 Détermination expérimentale des gains à l'excitation et à l'émission

La figure 5.9 montre l'évolution du taux de fluorescence par molécule CRM en fonction de la puissance d'excitation pour les cinq échantillons : ATTO647N (courbe noire), mono50 (courbe verte), dim50 (courbe bleue), mono30 (courbe violette) et dim30 (courbe rouge). Les points sont les mesures expérimentales et les traits continus sont l'ajustement numérique par l'équation 5.4.

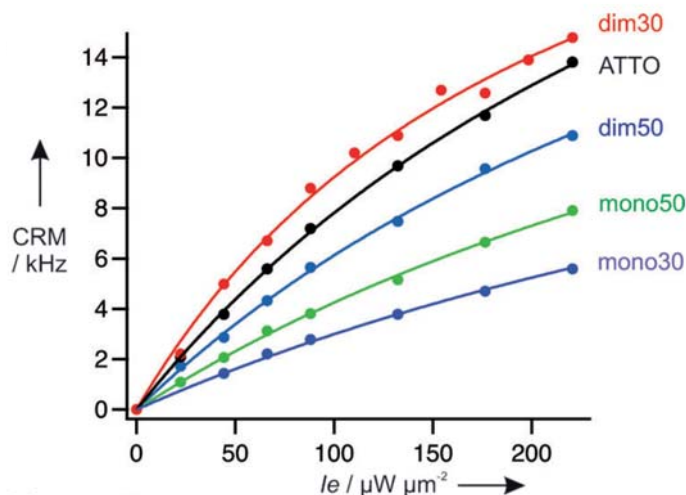


Figure 5.9 – Évolution des taux de comptage par molécule CRM (points) en fonction de la puissance d'excitation. Les points expérimentaux sont ajustés avec l'équation (lignes continues).

Nous procédons à l'estimation du facteur d'exaltation de fluorescence $\eta F = CRM/CRM_{\text{ref}}$ dans le régime linéaire pour connaître précisément l'exaltation du signal de fluorescence dans les dimères. L'extrapolation de l'intensité de fluorescence à saturation permet de remonter au taux de désexcitation radiatif. Il n'est pas possible d'atteindre la saturation expérimentalement à cause de phénomènes de photoblanchiment à forte excitation. Cette valeur de Γ_R permet d'estimer ϕ qui permet d'estimer l'augmentation du coefficient d'extinction molaire ϵ . De façon remarquable, les dimères de NPsAu de 30 pb produisent $1.35\times$ plus de signal que l'échantillon de référence ATTO, pour un rendement quantique très faible, tandis que pour les autres géométries, la brillance est atténuée. Ceci confirme les mesures expérimentales de ces nano-objets faites dans le chapitre précédent.

Échantillon	Facteur d'exaltation de fluorescence ^[a]	τ (ps)	$\epsilon(M^{-1}cm^{-1})$	ϕ (%)
ATTO	1	4300±100	10^5 ^[b]	65 ^[c]
mono50	0.51 ± 0.01	615 ± 20	$(3.4\pm 0.4)\times 10^5$	9.3 ± 1.0
mono30	0.35 ± 0.01	135 ± 15	$(12\pm 2)\times 10^5$	1.8 ± 0.3
dim50	0.76 ± 0.02	185 ± 15	$(11\pm 1.5)\times 10^5$	4.8 ± 0.7
dim30	1.35 ± 0.04	65 ± 10	$(57\pm 9)\times 10^5$	1.6 ± 0.3

Figure 5.10 – [a] Estimation à faible excitation dans le régime linéaire, en fonction de l'ATTO. [b] extrapolation à 633 nm. [c] caractéristiques fournies par le fabricant pour la molécule d'ATTO647N dans l'eau.

Mis à part l'échantillon mono50, la section efficace d'absorption et le taux de désexcitation de tous les échantillons présentent des exaltations de plus d'un ordre de grandeur. Le dim30 est légèrement plus brillant que la référence d'ATTO avec un rendement quantique de 1.6%. Ceci est dû à une plus grande section efficace d'excitation qui compense la réduction du rendement quantique due aux pertes ohmiques des NPsAu. Il est donc possible de confectionner des émetteurs hybrides métal-organiques lumineux avec des temps de vie inférieurs à 100 ps par le biais d'une ingénierie de l'environnement photonique.

Il faut prendre en considération que ces mesures sont moyennées dans toutes les positions et orientations des émetteurs dans le volume confocal d'analyse. Pour certaines positions et orientations, l'exaltation du signal de fluorescence sera bien supérieure à celle estimée.

L'analyse statistique des images de cryo-EM des échantillons de dimères, indique que les liaisons d'ADN de 30 pb et 50 pb correspondent à des distances respectives de 13 ± 2 nm et 17.5 ± 3 nm [10]. Nous observons une exaltation du signal de fluorescence seulement pour une molécule fluorescente au centre d'un dimère de NPsAu de 40 nm lorsque la distance molécule-particule est inférieure à 8 nm. L'exaltation de fluorescence est d'un facteur 1.35 pour une distance de 6.5 nm comparé à un facteur de 0.76 pour une distance de 9 nm. Pour les échantillons de monomères, la tendance est inversée : le signal de fluorescence est divisé par un facteur 3 pour une distance émetteur-particule d'environ de 6.5 nm (mono30), comparé à un facteur 2 pour une distance de 9 nm (mono50).

5.3.4 Analyse spectrale de l'exaltation de fluorescence

Afin de vérifier que les facteurs d'exaltation précédents ne sont pas liés à une modification de la structure électronique de l'émetteur, nous effectuons des mesures complémentaires des spectres de fluorescence pour les cinq échantillons : ATTO647N (coube noire), mono50 (courbe verte), dim50 (courbe bleue), mono30 (courbe violette), dim30 (courbe rouge), comme illustré sur la figure 5.11.

Les mesures des spectres d'émission de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un dispositif expérimental identique à celui utilisé pour les mesures FCS. Le signal de fluorescence, une fois filtré spatialement, est envoyé vers un spectrographe (Jobin-Yvon SPEX 270M) équipé d'une caméra CCD refroidie par azote liquide. Les spectres des intensités de fluorescence sont normalisés par le nombre d'émetteurs présents dans le volume d'analyse, estimé en FCS.

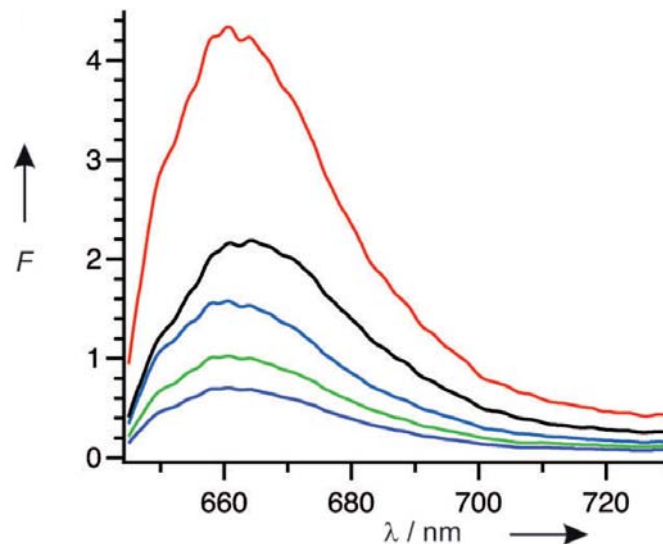


Figure 5.11 – Spectres d'émission de fluorescence normalisés par le nombre de molécules détectées dans le volume d'analyse en FCS. Les échantillons étudiés : ATTO647N (coube noire), mono50 (courbe verte), dim50 (courbe bleue), mono30 (courbe violette), dim30 (courbe rouge)

Nous constatons que tous les spectres sont centrés à 670 nm, correspondant à la valeur d'émission de fluorescence donnée pour l'ATTO647N. Ceci indique que l'interaction entre l'émetteur et l'antenne ne modifie pas les niveaux d'énergies électroniques de la molécule, caractéristique d'un régime de couplage électromagnétique faible sans couplage des fonctions d'onde électroniques. Nous avons choisi un émetteur dont les pics d'absorption et l'émission sont fortement décalés dans le rouge comparé à la résonance plasmon des dimères de NPsAu de 40 nm de diamètre (560 nm). Les raisons du choix d'un tel émetteur absorbant et émettant hors résonance sont détaillées dans le chapitre 4.

Nous représentons également les spectres d'émission de fluorescence des échantillons mono50, mono30, dim50, et dim30 normalisés avec l'échantillon de référence d'ATTO. Les spectres d'émission de fluorescence sont illustrés sur la figure 5.12. Il est ainsi plus aisé de comparer

les spectres de fluorescence par molécule et d'évaluer le facteur d'exaltation de fluorescence η_F , pour chaque longueur d'onde d'émission. Ces spectres de fluorescence (figure 5.12) indiquent les mêmes facteurs quantitatifs d'exaltation et d'atténuation du signal de fluorescence que ceux déduits de l'étude FCS (figure 5.9).

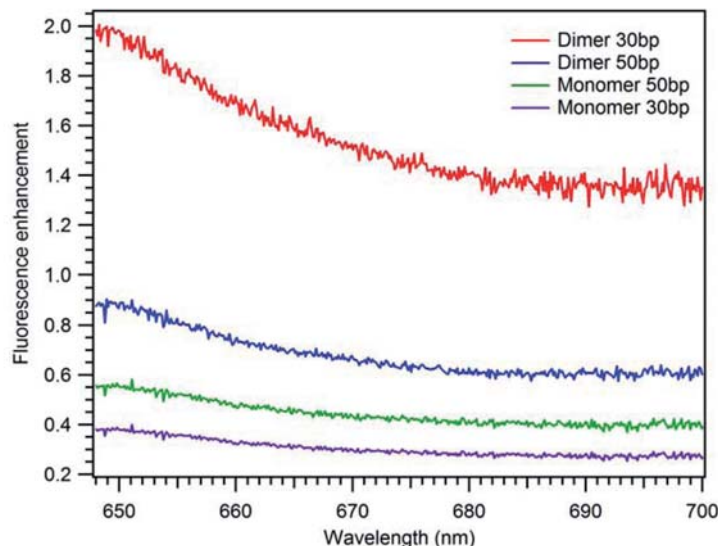


Figure 5.12 – Spectres d'exaltation d'émission de fluorescence normalisés par rapport à la solution de référence d'ATTO647N isolée. Échantillons : mono50 (courbe verte), dim50 (courbe bleue), mono30 (courbe violette), dim30 (courbe rouge).

Dans la gamme de 650-690 nm de longueurs d'onde, les valeurs de l'exaltation de fluorescence η_F apparaissent en légère décroissance en fonction de la longueur d'onde d'émission. Cependant, une plus grande exaltation est visible pour les longueurs d'onde décalées vers le bleu par rapport au pic d'émission de l'ATTO647N (670nm). Cette déformation est typique d'un spectre de fluorescence décalé par rapport à la résonance plasmon de nanostructures d'or [23].

5.4 Discussion

5.4.1 calculs théoriques de temps de vie de fluorescence

Pour confirmer les fortes variations des temps de vie de fluorescence estimés expérimentalement pour les cinq échantillons et s'assurer qu'elles correspondent bien aux effets attendus pour les différentes géométries d'échantillons de NPsAu mono-conjuguées et de dimères, nous comparons ces valeurs aux estimations de τ obtenues par calculs théoriques. En pratique, le temps de vie de fluorescence est obtenu en calculant la puissance dissipée par un dipôle source dans les monomères et dans les dimères de NPsAu, en électrodynamique classique [43,121]. Ces calculs sont à nouveau effectués par théorie de Mie généralisée dans l'équipe des Dr. N. Bonod et B. Stout à l'Institut Fresnel. Le contrôle du nombre

de brins d'ADN greffé par particule permet d'obtenir des nano-structures avec une molécule fluorescente unique, dont la position est contrôlée à l'échelle nanométrique [105, 85], mais dont l'orientation de la transition dipolaire de la molécule n'est pas maîtrisée. Nous supposons donc une distribution isotrope de l'angle entre le dipôle de transition et l'axe du brin d'ADN, comme dans le chapitre précédent. La distance entre l'émetteur et la NPAu est fixée à 6.5 nm et 9.5 nm pour les brins de 30 bp et 50 bp. Ces valeurs correspondent aux estimations faites en cryo-EM (chapitre 2). Elles sont similaires, mais légèrement supérieures à celles évaluées à partir des distribution de $\Gamma/\langle\Gamma_0\rangle$ du chapitre 4 [85]. En FCS les échantillons ont une force ionique plus faible (1 mM NaCl) que pour les mesures de fluorescence de molécule unique (50 mM NaCl), ce qui explique cette différence par la variations des forces électrostatiques répulsives. Nous obtenons, pour ces distances, des valeurs théoriques de τ de 574 ps et 182 ps pour mono50 et mono30; et 198 ps et 69 ps pour dim50 et dim30. Ces estimations montrent une excellente correspondance avec les valeurs évaluées expérimentalement (tableau 5.10). Ces calculs prennent en compte la dépendance de la brillance des molécules vis à vis de l'angle entre l'émetteur et le dimère.

5.4.2 Perspectives

L'analyse théorique en électrodynamique classique permet aussi de comprendre comment optimiser, par le biais de l'ingénierie plasmonique, l'exaltation de la luminosité des émetteurs dans des nano-structures métalliques [43, 121]. La brillance dépend fortement de l'orientation de la transition dipolaire de la molécule dans l'axe du dimère [85]. Les calculs théoriques d'efficacité de l'antenne présentés dans le chapitre 4 mettent en évidence l'impact de l'orientation du dipôle source sur l'émission en champ lointain. Il est important de rappeler que les mesures FCS sont moyennées sur l'ensemble des émetteurs dans la solution. Si toutes les molécules étaient orientées le long de l'axe du dimère (couplage longitudinal), la théorie prédit un facteur 3 d'exaltation de fluorescence, avec un maximum pour le coefficient d'extinction molaire ε et une valeur minimum du taux d'émission τ . Toutefois, ceci requière des liaisons chimiques rigides entre la molécule et une ou deux bases d'ADN. Le contrôle de l'orientation de la molécule dans les systèmes hybrides métal-organiques apparaît essentiel pour fabriquer des nano-structures lumineuses avec une émission spontanée de fluorescence ultra-rapide.

Il faut également noter que les valeurs estimées dans ce chapitre font appel à plusieurs hypothèses fortes : l'analyse des courbes de saturation suppose des émetteurs identiques, pouvant être décrits par un modèle quantique à deux niveaux. Les valeurs mesurées de Γ_R sont d'ailleurs plus faibles qu'attendues par la théorie de Mie. Une sous-estimation de Γ_R , et donc de ϕ , va surestimer la section efficace d'absorption. Les valeurs expérimentales sont en effet légèrement supérieures à celles estimées théoriquement. Il serait donc très intéressant d'affiner l'analyse de ces échantillons inhomogènes, en particulier en estimant le rendement quantique de molécules uniques; ou en connaissant expérimentalement la distribution d'angle entre le dipôle de transition de la molécule et les dimères d'or.

5.5 Conclusion

Nous démontrons dans ce chapitre que les groupements de NPsAu peuvent être utilisés pour contrôler électromagnétiquement les propriétés photophysiques des molécules organiques fluorescentes, tout en préservant leur solubilité en milieu aqueux. Ces émetteurs hybrides métal-organiques sont totalement caractérisés par des valeurs moyennes de leur coefficient d'extinction molaire, leur temps de vie de fluorescence, leur rendement quantique et leurs coefficients de diffusion rotationnelle et translationnelle. La caractérisation des dimères de 30 bp montre une exaltation de la section efficace d'absorption et une exaltation du taux d'émission de plus d'un ordre de grandeur comparé aux molécules organiques isolées, tout en produisant un plus grand signal de fluorescence. Ces chromophores hybrides sont des émetteurs brillants avec un temps de vie inférieur à 100 ps, et un faible rendement quantique de quelques pourcents compensé par une large section efficace d'excitation. L'estimation des résultats expérimentaux de τ est en bon accord avec les calculs basés sur l'électrodynamique classique. Ces calculs indiquent que la luminosité d'un émetteur peut être optimisée dans un complexe ADN-chromophore rigide, en contrôlant l'orientation de la molécule, en modifiant la longueur d'onde d'émission de la molécule fluorescente dans la gamme de résonance plasmon des nano-antennes ou en minimisant les pertes ohmiques du métal.

Conclusion et Perspectives

L'objet de cette étude était de montrer le contrôle de l'émission spontanée d'une molécule unique au centre d'un dimère particules d'or auto-assemblé sur ADN et de section efficace de diffusion élevée. Nous avons, dans un premier temps, mis au point une méthode efficace et reproductible de synthèse et de purification de ces dimères liés par une hélice d'ADN dont la longueur est de l'ordre de 10 nm. L'électrophorèse est apparue comme une technique efficace de purification de NPsAu d'or de 36 nm de diamètre préférentiellement attachées avec un seul brin d'ADN (chapitre 2). La synthèse des dimères avec différentes longueurs de brins d'ADN est ainsi réalisée avec une pureté de l'ordre de 70 %. L'analyse des images de cryo-EM a permis d'estimer la distance inter-particule et de montrer qu'elles sont en bon accord avec la longueur du brin d'ADN et la taille des groupements terminaux thiolés. La caractérisation morphologique montre que les dimères sont observés en géométrie étirée dans une solution tampon de faible force ionique. Ainsi, nous montrons la possibilité de fabriquer des groupements avec de larges particules espacées d'une courte distance.

Les fortes sections efficace de diffusion, offertes par ces groupements, m'ont permis d'étudier les phénomènes de couplage plasmonique d'objets uniques par microscopie confocale en champ sombre (chapitre 3). Nous observons une augmentation de la section efficace de diffusion des dimères et un décalage de la résonance plasmon vers le rouge quand la distance inter-particule diminue. Les mesures expérimentales des distributions de fréquences de résonance ont été comparées à des valeurs théoriques en utilisant la théorie de Mie généralisée et les paramètres géométriques estimés en cryo-EM. Cette analyse indique une influence minimale de la flexibilité de l'ADN sur les réponses optiques. Ainsi, nous démontrons que l'utilisation de brins d'ADN pour contrôler la distance inter-particule est un outil robuste pour maîtriser les distances entre un groupement de plusieurs grandes sphères et ainsi obtenir un couplage efficace. Ces premières étapes nous ont permis de fabriquer et de caractériser les structures passives des nano-antennes [10].

Le contrôle du nombre de brins d'ADN nous a permis d'introduire une molécule d'ATTO647N

unique à proximité d'une particule d'or ou au centre de dimères de NPsAu (chapitre 4). L'analyse statistique de l'exaltation du taux d'émission montre une augmentation du facteur de Purcell de deux ordres de grandeur lorsque l'émetteur est situé au centre des dimères les plus courts. Un très bon accord entre les calculs théoriques et les données expérimentales démontre un contrôle de la position de l'émetteur à l'échelle nanométrique au centre du dimère. Cette précision est aujourd'hui inaccessible avec les méthodes de lithographie top-down. Ainsi, nous démontrons qu'il est possible de contrôler la position de la source active à l'échelle du nanomètre, tout en produisant 10 milliards de copies de nano-antennes en parallèle. Nous conservons les propriétés d'une source de photons uniques tout en accélérant fortement l'émission spontanée dans un dimère [85].

Les mesures de molécules uniques (chapitre 4) ne permettent pas d'estimer expérimentalement l'efficacité de l'antenne. Cependant, des mesures par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS, chapitre 5) nous ont permis d'évaluer une valeur moyenne de l'efficacité par le rendement quantique effectif. L'analyse FCS a aussi permis d'estimer une augmentation de plus d'un ordre de grandeur de la section efficace d'absorption et du taux de d'émission pour les dimères, comparées aux molécules isolées. De plus, les dimères les plus courts produisent $1.35\times$ plus de signal que l'échantillon de molécules isolées pour un rendement quantique très faible estimé à 1.6%. En effet, le champ exalté à l'excitation pour cet échantillon compense la réduction de rendement quantique dû aux pertes ohmiques des NPsAu [66].

Les valeurs estimées en FCS (chapitre 5) font appel à une hypothèse forte : l'analyse des courbes de saturation suppose des émetteurs identiques, pouvant être décrits par un modèle quantique à deux niveaux. Les valeurs mesurées de Γ_R sont d'ailleurs plus faibles qu'attendues par la théorie de Mie. Une sous-estimation de Γ_R , et donc de ϕ , entraîne une surestimation de la section efficace d'absorption. Il serait donc très intéressant d'affiner l'analyse de ces échantillons inhomogènes, en particulier en estimant le rendement quantique de molécules uniques ou en connaissant expérimentalement la distribution d'angles entre le dipôle de transition de la molécule et les dimères d'or. L'une des perspectives ouvertes par ce travail serait donc l'estimation de l'orientation des dimères dans nos échantillons pour l'analyse de l'anisotropie de fluorescence en trois dimensions. Ceci est notamment possible en étudiant l'intensité de fluorescence dans le plan de l'échantillon et en utilisant une polarisation d'excitation radiale ou azimutale [122]. En comparant les intensités de fluorescence d'émetteurs de même orientation, isolés et au centre d'un dimère, il serait possible d'estimer une distribution statistique des rendements quantiques effectifs.

Surtout, l'analyse théorique en électrodynamique classique nous a permis de mettre en évidence des voies d'optimisation des performances des nano-antennes. L'exaltation du signal de fluorescence des émetteurs dans des nano-structures métalliques serait probablement augmentée d'un facteur 3 si l'orientation des molécules était fixée le long de l'axe du dimère (couplage longitudinal). Il est également possible d'accroître considérablement l'exaltation en excitation des molécules si celles-ci absorbent au pic de résonance plasmon de l'antenne. On peut alors espérer une augmentation du signal de fluorescence malgré une

diminution probable du rendement quantique. L'ingénierie des modes plasmons de l'antenne doit également permettre d'en augmenter notablement l'efficacité. En particulier, l'utilisation de plus grosses particules, de particules d'argent ou de particules anisotropes fournirait une section efficace de diffusion plus importante. Des premiers résultats sur l'utilisation de dimères de particules de 80 nm ou 100 nm de diamètre viennent d'être publiés et indiquent des exaltations du signal de fluorescence d'une molécule unique de plus d'un ordre de grandeur [11]. Toutefois, la pureté des dimères décrits est souvent de l'ordre de 10 %.

Au delà d'une simple amélioration des performances des antennes décrites dans ce manuscrit, l'obtention de dimères d'or alimentés par une molécule unique ouvre la voie à de nouvelles études photophysiques passionnantes. Ainsi, en modulant les taux d'excitation et d'émission de plus d'un ordre de grandeur sur une transition électronique, nous modifions probablement les probabilités de transiter vers d'autres états de spin ou de symétrie électronique. En modifiant la probabilité d'être dans un état triplet excité, nous allons sûrement changer le clignotement et la photostabilité d'une molécule unique [97]. De plus, il est possible d'ajouter une deuxième molécule sur le brin d'ADN et de regarder, par exemple, comment deux émetteurs, couplés de manière résonante par un mécanisme Förster (FRET), vont être influencées par une nano-antenne.

Il est également possible de changer la nature de l'émetteur quantique au centre de l'antenne. En effet, les transitions électroniques des molécules organiques ont des forces d'oscillateur parmi les plus élevées de la matière condensée. Une nano-antenne serait donc encore plus utile avec des cations métalliques ou des lanthanides dont les dipôles de transition (électriques et parfois même magnétiques [99]) sont plusieurs ordres de grandeur plus faibles que ceux de l'ATTO647N mais dont les propriétés d'émission sont des sondes de leur environnement (champ magnétique statique, pression [123], température [124],...).

A moyen terme, de nombreuses perspectives existent également pour des antennes plus complexes ou actives. En particulier, l'efficacité d'une antenne optique peut être amplifiée en la rendant directive de telle sorte à collecter toute l'émission spontanée dans l'ouverture numérique d'un objectif de microscope. Ceci a déjà été démontré dans des antennes complexes de type Yagi Uda [16]. Toutefois, des études théoriques réalisés en collaboration entre les instituts Fresnel et Langevin ont mis en évidence que des antennes brillantes et directionnelles pouvaient être réalisées avec un nombre limité de particules (≤ 4) [125, 39]. Un projet ANR est en cours pour la réalisation de telles nanostructures.

Nous avons également mis en évidence dans ce travail que des variations nanométriques de la distance émetteur-particule modifiaient fortement les taux d'émission spontanée. Il doit donc être possible de moduler, par un facteur extérieur, la réponse optique de nos dimères d'or pour produire des antennes optiques actives. On peut notamment penser à des processus chimiques pouvant modifier *in situ* la longueur du brin d'ADN comme l'ouverture spécifique d'une boucle d'ADN [126] ; mais aussi à un champ électrique statique compte tenu des forces électrostatiques dominant la morphologie des dimères.

Globalement, ce travail de thèse offre une boîte à outil flexible pour la conception et

l'étude de nanostructures associant, de manière contrôlée et reproductible, un émetteur quantique et des particules fortement polarisables par la lumière.

Références

- [1] E Purcell. Spontaneous emission probabilities at radio frequencies. *Phys. Rev*, 69(11-1) :681–681, 1946.
- [2] J Zydzik, A M Vredenberg, N E J Hunt, E F Schubert, D C Jacobson, and J M Poate. Controlled Atomic Spontaneous Emission from Er in a Transparent Si/SiO₂ Microcavity. 71(4) :517–520, 1993.
- [3] E. Peter, P. Senellart, D. Martrou, A. Lemaître, J. Hours, J. Gérard, and J. Bloch. Exciton-Photon Strong-Coupling Regime for a Single Quantum Dot Embedded in a Microcavity. *Physical Review Letters*, 95(6) :1–4, 2005.
- [4] K. H. Drexhage, M. Fleck, H. Kuhn, F. P. Schafer, and W. Sperling. Beeinflussung der fluoreszenz eines europiumchelates durch einen spiegel. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 70(9-10) :1179, 1966.
- [5] Jean-Jacques Greffet. Applied physics. Nanoantennas for light emission. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728) :1561–3, 2005.
- [6] J. N. Farahani, D. W. Pohl, H.-J. Eisler, and B. Hecht. Single Quantum Dot Coupled to a Scanning Optical Antenna : A Tunable Superemitter. *Physical Review Letters*, 95(1) :1–4, 2005.
- [7] P Mühlischlegel, H-J Eisler, O J F Martin, B Hecht, and D W Pohl. Resonant optical antennas. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728) :1607–9, 2005.
- [8] P. J. Schuck, D. P. Fromm, A. Sundaramurthy, G. S. Kino, and W. E. Moerner. Improving the Mismatch between Light and Nanoscale Objects with Gold Bowtie Nanoantennas. *Physical Review Letters*, 94(1) :14–17, 2005.
- [9] Daniela Zanchet, Christine M. Micheel, Wolfgang J. Parak, Daniele Gerion, Shara C. Williams, and a. Paul Alivisatos. Electrophoretic and Structural Studies of DNA-Directed Au Nanoparticle Groupings. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(45) :11758–11763, 2002.
- [10] Mickaël P Busson, Brice Rolly, Brian Stout, Nicolas Bonod, Eric Larquet, Albert Polman, and Sébastien Bidault. Optical and topological characterization of gold nanoparticle dimers linked by a single DNA double strand. *Nano letters*,

- 11(11) :5060–5, 2011.
- [11] G P Acuna, F M Möller, P Holzmeister, S Beater, B Lalkens, and P Tinnefeld. Fluorescence enhancement at docking sites of DNA-directed self-assembled nanoantennas. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6106) :506–10, 2012.
- [12] A. Femius Koenderink A. Polman Mertens, H. Plasmon-enhanced luminescence near noble-metal nanospheres : Comparison of exact theory and an improved Gersten and Nitzan model. *Physical Review B*, 76(11) :1–12, 2007.
- [13] Pascal Anger, Palash Bharadwaj, and Lukas Novotny. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Physical Review Letters*, 96(11) :3–6, 2006.
- [14] Sergei Kühn, Ulf Håkanson, Lavinia Rogobete, and Vahid Sandoghdar. Enhancement of Single-Molecule Fluorescence Using a Gold Nanoparticle as an Optical Nanoantenna. *Physical Review Letters*, 97(1) :1–4, 2006.
- [15] Shanhui Fan Yuri Avlasevich Klaus Müllen W. E. Moerner Anika Kinkhabwala, Zongfu Yu. Large single-molecule fluorescence enhancements produced by a bow-tie nanoantenna. *Nature photonics*, 3(187) :654–657, 2009.
- [16] Alberto G Curto, Giorgio Volpe, Tim H Taminiau, Mark P Kreuzer, Romain Quindant, and Niek F van Hulst. Unidirectional emission of a quantum dot coupled to a nanoantenna. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5994) :930–3, 2010.
- [17] Jennifer T Choy, Birgit J M Hausmann, Thomas M Babinec, Irfan Bulu, and Mugees Khan. Enhanced single-photon emission from a diamond – silver aperture. *Nature Photonics*, pages 1–6, 2011.
- [18] Heykel Aouani, Oussama Mahboub, Nicolas Bonod, Eloïse Devaux, Evgeny Popov, Hervé Rigneault, Thomas W Ebbesen, and Jérôme Wenger. Bright unidirectional fluorescence emission of molecules in a nanoaperture with plasmonic corrugations. *Nano letters*, 11(2) :637–44, 2011.
- [19] C Belacel, B Habert, F Bigourdan, F Marquier, L Coolen, C Schwob, C Javaux, B Dubertret, P Senellart, and A Maitre. Controlling spontaneous emission with plasmonic optical patch antennas. pages 1–5.
- [20] J Seelig, K Leslie, a Renn, S Kühn, V Jacobsen, M van de Corput, C Wyman, and V Sandoghdar. Nanoparticle-induced fluorescence lifetime modification as nanoscopic ruler : demonstration at the single molecule level. *Nano letters*, 7(3) :685–9, 2007.
- [21] J Zhang, Y Fu, M H Chowdhury, and J R Lakowicz. Metal-enhanced single-molecule fluorescence on silver particle monomer and dimer : Coupling effect between metal particles. *Nano Lett.*, 7(7) :2101–2107, 2007.
- [22] Eyal Cohen-Hoshen, Garnett W Bryant, Iddo Pinkas, Joseph Sperling, and Israel Bar-Joseph. Exciton-plasmon interactions in quantum dot-gold nanoparticle structures. *Nano letters*, 12(8) :4260–4, 2012.
- [23] M. Ringler, A. Schwemer, M. Wunderlich, A. Nichtl, K. Kürzinger, T. A. Klar, and J. Feldmann. Shaping Emission Spectra of Fluorescent Molecules with Single Plasmonic Nanoresonators. *Physical Review Letters*, 100(20) :1–4, 2008.
- [24] R. R. Chance A. Prock R. Silbey I. Prigogine, Stuart A. Rice. Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces. 1978.

- [25] B. Hecht L. Novotny. Principles of Nano-Optics. *Cambridge Univ.*, 2006.
- [26] Karl Joulain, Rémi Carminati, Jean-Philippe Mulet, and Jean-Jacques Greffet. Definition and measurement of the local density of electromagnetic states close to an interface. *Physical Review B*, 68(24) :1–10, 2003.
- [27] M. A. Wilson, P. Bushev, J. Eschner, F. Schmidt-Kaler, C. Becher, R. Blatt, and U. Dörner. Vacuum-field level shifts in a single trapped ion mediated by a single distant mirror. *Phys. Rev. Lett.*, 91 :213602, 2003.
- [28] M. Gross S. Haroche P. Goy, J. M. Raimond. Observation of Cavity-Enhanced Single-Atom Spontaneous Emission. *Phys. Rev. Lett*, 50(24) :1903–1906, 1983.
- [29] J. M. Raimond, M. Brune, and S. Haroche. Manipulating quantum entanglement with atoms and photons in a cavity. *Rev. Mod. Phys.*, 73 :565–582, 2001.
- [30] Lukas Novotny and Niek van Hulst. Antennas for light. *Nature Photonics*, 5(2) :83–90, 2011.
- [31] Jean-Jacques Greffet, Marine Laroche, and François Marquier. Impedance of a Nanoantenna and a Single Quantum Emitter. *Physical Review Letters*, 105(11) :1–4, 2010.
- [32] Mario Agio. Optical antennas as nanoscale resonators. *Nanoscale*, 4(3) :692–706, 2012.
- [33] William L Barnes, Alain Dereux, and Thomas W Ebbesen. Surface plasmon sub-wavelength optics. *Nature*, 424 :824–830, 2003.
- [34] B M Reinhard, M Siu, H Agarwal, A P Alivisatos, and J Liphardt. Calibration of dynamic molecular rule based on plasmon coupling between gold nanoparticles. *Nano Lett.*, 5(11) :2246–2252, 2005.
- [35] Prashant K Jain and Mostafa a El-Sayed. Noble metal nanoparticle pairs : effect of medium for enhanced nanosensing. *Nano letters*, 8(12) :4347–52, 2008.
- [36] Johann Berthelot, Alexandre Bouhelier, Caijin Huang, Jérémie Margueritat, Gérard Colas-des Francs, Eric Finot, Jean-Claude Weeber, Alain Dereux, Sergei Kostchev, Hicham Ibn El Ahrach, Anne-Laure Baudrion, Jérôme Plain, Renaud Bachelot, Pascal Royer, and Gary P Wiederrecht. Tuning of an optical dimer nanoantenna by electrically controlling its load impedance. *Nano letters*, 9(11) :3914–21, 2009.
- [37] Bohren Craig F. and Huffman Donald R. *Absorption and Scattering of light by Small Particles*. Wiley-vch edition, 2004.
- [38] Hui Wang, Daniel W Brandl, Fei Le, Peter Nordlander, and Naomi J Halas. Nanorice : a hybrid plasmonic nanostructure. *Nano letters*, 6(4) :827–32, 2006.
- [39] Brice Rolly, Brian Stout, and Nicolas Bonod. Metallic dimers : When bonding transverse modes shine light. *Physical Review B*, 84(12) :1–8, 2011.
- [40] Sarah Y. Suck, Sébastien Bidault, Nicolas Bonod, Stéphane Collin, Nathalie Bardou, Yannick De Wilde, and Gilles Tessier. Digital Heterodyne Holography Reveals the Non-Quasi-Static Scattering Behaviour of Transversally Coupled Nanodisk Pairs. *International Journal of Optics*, 2012 :1–8, 2012.

- [41] B. Rolly N. Bonod B. Stout, A. Devilez. Multipole methods for nanoantennas design : applications to Yagi-Uda configurations. *Journal of the Optical Society of America B*, 28(5) :1213, 2011.
- [42] T. H. Taminiau, F. D. Stefani, F. B. Segerink, and N. F. van Hulst. Optical antennas direct single-molecule emission. *Nature Photonics*, 2(4) :234–237, 2008.
- [43] Lavinia Rogobete, Franziska Kaminski, Mario Agio, and Vahid Sandoghdar. Design of plasmonic nanoantennae for enhancing spontaneous emission. *Optics letters*, 32(12) :1623–5, 2007.
- [44] Nadrian C Seeman. DNA in a material world. *Nature*, 421(6921) :427–31, 2003.
- [45] Paul W K Rothmund. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440(7082) :297–302, 2006.
- [46] Daniela Zanchet, Christine M. Micheel, Wolfgang J. Parak, Daniele Gerion, and a. Paul Alivisatos. Electrophoretic Isolation of Discrete Au Nanocrystal/DNA Conjugates. *Nano Letters*, 1(1) :32–35, 2001.
- [47] A P Alivisatos, K P Johnsson, X G Peng, T E Wilson, C J Loweth, M P Bruchez, and P G Schultz. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature*, 382(6592) :609–611, 1996.
- [48] C A Mirkin, R L Letsinger, R C Mucic, and J J Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592) :607–609, 1996.
- [49] R Elghanian, J J Storhoff, R C Mucic, R L Letsinger, and C A Mirkin. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277(5329) :1078–1081, 1997.
- [50] J I L Chen, Y Chen, and D S Ginger. Plasmonic Nanoparticle Dimers for Optical Sensing of DNA in Complex Media. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(28) :9600–9601, 2010.
- [51] C Sonnichsen, B M Reinhard, J Liphardt, and A P Alivisatos. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat. Biotech.*, 23(6) :741–745, 2005.
- [52] H Y Wang and B M Reinhard. Monitoring Simultaneous Distance and Orientation Changes in Discrete Dimers of DNA Linked Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 113(26) :11215–11222, 2009.
- [53] D Graham, D G Thompson, W E Smith, and K Faulds. Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles. *Nat. Nanotech.*, 3(9) :548–551, 2008.
- [54] Dong-Kwon Lim, Ki-Seok Jeon, Hyung Min Kim, Jwa-Min Nam, and Yung Doug Suh. Nanogap-engineerable Raman-active nanodumbbells for single-molecule detection. *Nature materials*, 9(1) :60–7, 2010.
- [55] Jian Zhang, Yi Fu, and Joseph R Lakowicz. Enhanced Förster Resonance Energy Transfer (FRET) on Single Metal Particle. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces*, 111(1) :50–56, 2007.
- [56] F A Aldaye and H F Sleiman. Dynamic DNA templates for discrete gold nanoparticle assemblies : Control of geometry, modularity, write/wrase and structural

- switching. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(14) :4130–4131, 2007.
- [57] S Bidault, F J G de Abajo, and A Polman. Plasmon-based nanolenses assembled on a well-defined DNA template. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(9) :2750–2751, 2008.
- [58] Shelley a Claridge, Huiyang W Liang, S Roger Basu, Jean M J Fréchet, and a Paul Alivisatos. Isolation of discrete nanoparticle-DNA conjugates for plasmonic applications. *Nano letters*, 8(4) :1202–6, 2008.
- [59] W Rechberger, A Hohenau, A Leitner, J R Krenn, B Lamprecht, and F R Aussenegg. Optical properties of two interacting gold nanoparticles. *Optics Comm.*, 220(1-3) :137–141, 2003.
- [60] P K Jain, W Y Huang, and M A El-Sayed. On the universal scaling behavior of the distance decay of plasmon coupling in metal nanoparticle pairs : A plasmon ruler equation. *Nano Lett.*, 7(7) :2080–2088, 2007.
- [61] B M Reinhard, S Sheikholeslami, A Mastroianni, A P Alivisatos, and J Liphardt. Use of plasmon coupling to reveal the dynamics of DNA bending and cleavage by single EcoRV restriction enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(8) :2667–2672, 2007.
- [62] D Zanchet, C M Micheel, W J Parak, D Gerion, and A P Alivisatos. Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates. *Nano Lett.*, 1(1) :32–35, 2001.
- [63] Zhi Li, Rongchao Jin, Chad a Mirkin, and Robert L Letsinger. Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. *Nucleic acids research*, 30(7) :1558–62, 2002.
- [64] Huixiang Li and Lewis Rothberg. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39) :14036–9, 2004.
- [65] H X Li and L J Rothberg. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(35) :10958–10961, 2004.
- [66] Sébastien Bidault and Albert Polman. Water-Based Assembly and Purification of Plasmon-Coupled Gold Nanoparticle Dimers and Trimers. *International Journal of Optics*, 2012 :1–5, 2012.
- [67] S A Claridge, H Y W Liang, S R Basu, J M J Frechet, and A P Alivisatos. Isolation of discrete nanoparticle - DNA conjugates for plasmonic applications. *Nano Lett.*, 8(4) :1202–1206, 2008.
- [68] L L Yang, H Y Wang, B Yan, and B M Reinhard. Calibration of Silver Plasmon Rulers in the 1-25 nm Separation Range : Experimental Indications of Distinct Plasmon Coupling Regimes. *J. Phys. Chem. C*, 114(11) :4901–4908, 2010.
- [69] J Dubochet, J Lepault, R Freeman, J A Berriman, and J C Homo. Electron-Microscopy of Frozen Water and Aqueous-Solutions. *J. Microsc.*, 128(Dec) :219–237, 1982.
- [70] J Dubochet, M Adrian, J J Chang, J C Homo, J Lepault, A W Mcdowall, and

- P Schultz. Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens. *Quart. Rev. Biophys.*, 21(2) :129–228, 1988.
- [71] So-Jung Park, Anne a. Lazarides, James J. Storhoff, Lorenzo Pesce, and Chad a. Mirkin. The Structural Characterization of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticle Networks Formed by DNA Hybridization. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(33) :12375–12380, 2004.
- [72] Lynell R Skewis and Björn M Reinhard. Spermidine modulated ribonuclease activity probed by RNA plasmon rulers. *Nano letters*, 8(1) :214–20, 2008.
- [73] K. Lindfors, T. Kalkbrenner, P. Stoller, and V. Sandoghdar. Detection and Spectroscopy of Gold Nanoparticles Using Supercontinuum White Light Confocal Microscopy. *Physical Review Letters*, 93(3) :3–6, 2004.
- [74] Otto L. Muskens, Guillaume Bachelier, Natalia Del Fatti, Fabrice Vallee, Arnaud Brioude, Xuchuan Jiang, and Marie-Paule Pileni. Quantitative Absorption Spectroscopy of a Single Gold Nanorod. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(24) :8917–8921, 2008.
- [75] David Boyer, Philippe Tamarat, Abdelhamid Maali, Brahim Lounis, and Michel Orrit. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science (New York, N. Y.)*, 297(5584) :1160–3, 2002.
- [76] X H Huang, I H El-Sayed, W Qian, and M A El-Sayed. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(6) :2115–2120, 2006.
- [77] Jennifer I L Chen, Yeechi Chen, and David S Ginger. Plasmonic nanoparticle dimers for optical sensing of DNA in complex media. *Journal of the American Chemical Society*, 132(28) :9600–1, 2010.
- [78] Melvin Lax. Multiple Scattering of Waves. *Rev. Mod. Phys.*, 23(4) :287–310, 1951.
- [79] W J Wiscombe. Improved Mie scattering algorithms. *Appl. Opt.*, 19(9) :1505–1509, 1980.
- [80] P B Johnson and R W Christy. Optical Constants of the Noble Metals. *Phys. Rev. B*, 6(12) :4370–4379, 1972.
- [81] C. Vandenbem, D. Brayer, L. S. Froufe-Pérez, and R. Carminati. Controlling the quantum yield of a dipole emitter with coupled plasmonic modes. *Physical Review B*, 81(8) :1–9, 2010.
- [82] H. Mertens and a. Polman. Strong luminescence quantum-efficiency enhancement near prolate metal nanoparticles : Dipolar versus higher-order modes. *Journal of Applied Physics*, 105(4) :044302, 2009.
- [83] Sebastien Bidault Brice Rolly, Brian Stout and Nicolas Bonod. Crucial role of the emitter particle distance on the directivity of optical antennas. *Optics Letters*, 36(17) :3368–3370, 2011.
- [84] J. Aizpurua, Garnett W. Bryant, Lee J. Richter, and F. J. García de Abajo. Optical properties of coupled metallic nanorods for field-enhanced spectroscopy. *Physical Review B*, 71(23) :1–13, 2005.
- [85] Mickaël P. Busson, Brice Rolly, Brian Stout, Nicolas Bonod, and Sébastien Bidault.

- Accelerated single photon emission from dye molecule-driven nanoantennas assembled on DNA. *Nature Communications*, 3 :962, 2012.
- [86] Grabolle M. Cavaliere-jaricot S. Nitschke R. Resch-genger, U. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 9 :5, 2008.
- [87] A. H. Fu, C. M. Micheel, J. Cha, H. Chang, H. Yang, and A. P. Alivisatos. Discrete nanostructures of quantum dots/au with dna. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(35) :10832–10833, 2004.
- [88] Grigory Tikhomirov, Sjoerd Hoogland, P E Lee, Armin Fischer, Edward H Sargent, and Shana O Kelley. DNA-based programming of quantum dot valency, self-assembly and luminescence. *Nature nanotechnology*, 6(8) :485–90, 2011.
- [89] Xavier Brokmann, Marie-Virgine Ehrensperger, Jean-Pierre Hermier, Antoine Triller, and Maxime Dahan. Orientational imaging and tracking of single CdSe nanocrystals by defocused microscopy. *Chemical Physics Letters*, 406(1-3) :210–214, 2005.
- [90] D. Canneson, I. Mallek-Zouari, S. Buil, X. Quélin, C. Javaux, B. Mahler, B. Dubertret, and J.-P. Hermier. Strong Purcell effect observed in single thick-shell CdSe/CdS nanocrystals coupled to localized surface plasmons. *Physical Review B*, 84(24) :1–6, 2011.
- [91] Céline Vion, Piernicola Spinicelli, Laurent Coolen, Catherine Schwob, Jean-Marc Frigerio, Jean-Pierre Hermier, and Agnès Maître. Controlled modification of single colloidal CdSe/ZnS nanocrystal fluorescence through interactions with a gold surface. *Optics express*, 18(7) :7440–55, 2010.
- [92] P. Spinicelli, S. Buil, X. Quelin, B. Mahler, B. Dubertret, and J. P. Hermier. Bright and grey states in cdse-cds nanocrystals exhibiting strongly reduced blinking. *Phys. Rev. Lett.*, 102(13) :136801, 2009.
- [93] A. A. Klimov, V. I. Mikhailovsky, D. W. McBranch, C. A Leatherdale, and M. G. Bawendi. Quantization of multiparticle auger rates in semiconductor quantum dots. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5455) :1011–3, 2000.
- [94] Brent Fisher, Jean Caruge, Don Zehnder, and Mounqi Bawendi. Room-Temperature Ordered Photon Emission from Multiexciton States in Single CdSe Core-Shell Nanocrystals. *Physical Review Letters*, 94(8) :1–4, 2005.
- [95] Orestis Faklaris, Damien Garrot, Vandana Joshi, Frédéric Druon, Jean-Paul Boudou, Thierry Sauvage, Patrick Georges, Patrick a Curmi, and François Treussart. Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 4(12) :2236–9, 2008.
- [96] A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, and G. B. Behera. Cyanines during the 1990s : A review. *Chem. Rev.*, 100(6) :1973–2011, 2000.
- [97] Jan Vogelsang, Robert Kasper, Christian Steinhauer, Britta Person, Mike Heilemann, Markus Sauer, and Philip Tinnefeld. A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 47(29) :5465–9, 2008.

- [98] O. Maury and H. Le Bozec. Molecular engineering of octupolar nlo molecules and materials based on bipyridyl metal complexes. *Acc. Chem. Res.*, 38(9) :691–704, 2005.
- [99] Sinan Karaveli and Rashid Zia. Spectral Tuning by Selective Enhancement of Electric and Magnetic Dipole Emission. *Physical Review Letters*, 106(19) :193004, May 2011.
- [100] B. Rolly, B. Bebey, S. Bidault, B. Stout, and N. Bonod. Promoting magnetic dipolar transition in trivalent lanthanide ions with lossless mie resonances. *Phys. Rev. B*, 85 :245432, 2012.
- [101] Renaud A. L. Vallée, Mircea Cotlet, Mark Van der Auweraer, Johan Hofkens, K Müllen, and Frans C De Schryver. Single-molecule conformations probe free volume in polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 126(8) :2296–7, 2004.
- [102] E Castanié, V Krachmalnicoff, A Cazé, R Pierrat, Y De Wilde, and R Carminati. Distance dependence of the local density of states in the near field of a disordered plasmonic film. *Optics letters*, 37(14) :3006–8, 2012.
- [103] Heykel Aouani, Jérôme Wenger, Davy Gérard, Hervé Rigneault, Eloïse Devaux, Thomas W Ebbesen, Farhad Mahdavi, Tingjun Xu, and Steve Blair. Crucial role of the adhesion layer on the plasmonic fluorescence enhancement. *ACS nano*, 3(7) :2043–8, 2009.
- [104] Jay R Unruh, Giridharan Gokulrangan, G H Lushington, Carey K Johnson, and George S Wilson. Orientational dynamics and dye-DNA interactions in a dye-labeled DNA aptamer. *Biophysical journal*, 88(5) :3455–65, 2005.
- [105] Annette Kupstat, Thomas Ritschel, and Michael U Kumke. Oxazine dye-conjugated dna oligonucleotides : Förster resonance energy transfer in view of molecular dye-DNA interactions. *Bioconjugate chemistry*, 22(12) :2546–57, 2011.
- [106] Colin Echeverría Aitken, R Andrew Marshall, and Joseph D Puglisi. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophysical journal*, 94(5) :1826–35, 2008.
- [107] Antoine Le Gall, David Dulin, Gilles Clavier, Rachel Méallet-Renault, Philippe Bouyer, Karen Perronet, and Nathalie Westbrook. Improved photon yield from a green dye with a reducing and oxidizing system. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 12(9) :1657–60, 2011.
- [108] D. I. Cherny Bagshaw, C. R. Blinking fluorophores : what do they tell us about protein dynamics. *Biochem. Soc. Trans*, 34(34) :979–982, 2006.
- [109] Björn M Reinhard, Sassan Sheikholeslami, Alexander Mastroianni, a Paul Alivisatos, and Jan Liphardt. Use of plasmon coupling to reveal the dynamics of DNA bending and cleavage by single EcoRV restriction enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8) :2667–72, 2007.
- [110] J. E. Sitpe J. M. Wylie. Quantum electrodynamics near an interface. 30(3), 1984.
- [111] Suzanne E Howson, Albert Bolhuis, Viktor Brabec, Guy J Clarkson, Jaroslav Malina, Alison Rodger, and Peter Scott. Optically pure, water-stable metallo-helical ‘flexicate’ assemblies with antibiotic activity. *Nature chemistry*, 4(1) :31–6, 2012.

- [112] B Lounis and W E Moerner. Single photons on demand from a single molecule at room temperature. *Nature*, 407(6803) :491–3, 2000.
- [113] Svetlana V Boriskina and Björn M Reinhard. Spectrally and spatially configurable superlenses for optoplasmonic nanocircuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8) :3147–51, 2011.
- [114] Elke Haustein and Petra Schwill. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods*, 29(2) :153 – 166, 2003.
- [115] Sudipta Maiti, Ulrich Haupts, and Watt W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy : Diagnostics for sparse molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(22) :11753–11757, 1997.
- [116] Heykel Aouani. *Nano-antennes optiques pour l'exaltation et le contrôle de la fluorescence moléculaire dans des volumes sub-longueur d'onde*. PhD thesis, 2011.
- [117] Davy Gérard, Jérôme Wenger, Nicolas Bonod, Evgeni Popov, Hervé Rigneault, Farhad Mahdavi, Steve Blair, José Dintinger, and Thomas Ebbesen. Nanoaperture-enhanced fluorescence : Towards higher detection rates with plasmonic metals. *Physical Review B*, 77(4) :1–8, 2008.
- [118] G Davy, Oussama Mahboub, Nicolas Bonod, Evgeny Popov, and Thomas W Ebbesen. Emission and excitation contributions to enhanced single molecule fluorescence by gold nanometric apertures Abstract :. *Optics Express*, 16(5) :8855–8865, 2008.
- [119] Christoph M. Pieper and Jörg Enderlein. Fluorescence correlation spectroscopy as a tool for measuring the rotational diffusion of macromolecules. *Chemical Physics Letters*, 516(1-3) :1–11, 2011.
- [120] Reiko Sadamoto, Nobuyuki Tomioka, and Takuzo Aida. Photoinduced electron transfer reactions through dendrimer architecture. *Journal of the American*, (3) :3978–3979, 1996.
- [121] Alexis Devilez, Brian Stout, and Nicolas Bonod. Compact metallo-dielectric optical antenna for ultra directional and enhanced radiative emission. *ACS nano*, 4(6) :3390–6, 2010.
- [122] Alexey I Chizhik, Anna M Chizhik, Dmitry Khoptyar, Sebastian Bär, and Alfred J Meixner. Excitation isotropy of single CdSe/ZnS nanocrystals. *Nano letters*, 11(3) :1131–5, 2011.
- [123] Sandrine Ithurria, Philippe Guyot-Sionnest, Benoit Mahler, and Benoit Dubertret. Mn2 as a Radial Pressure Gauge in Colloidal Core/Shell Nanocrystals. *Physical Review Letters*, 99(26) :5–8, 2007.
- [124] Lionel Aigouy, Gilles Tessier, Michel Mortier, and Benoit Charlot. Scanning thermal imaging of microelectronic circuits with a fluorescent nanoprobe. *Applied Physics Letters*, 87(18) :184105, 2005.
- [125] Nicolas Bonod, Alexis Devilez, Brice Rolly, Sebastien Bidault, and Brian Stout. Ultracompact and unidirectional metallic antennas. *Physical Review B*, 82(11) :115429, 2010.
- [126] Laurent Lermusiaux, Alexandra Sereda, Benjamin Portier, Eric Larquet, and Sébastien Bidault. Reversible switching of the interparticle distance in dna-templated

- gold nanoparticle dimers. *ACS Nano*, 6(12) :10992–10998, 2012.
- [127] Alexis Devilez. *Optical microlenses and nanoantennas*. PhD thesis, Université Paul Cezanne Aix-Marseille III, 2010.
- [128] Adrien Dousse, Jan Suffczyński, Alexios Beveratos, Olivier Krebs, Aristide Lemaître, Isabelle Sagnes, Jacqueline Bloch, Paul Voisin, and Pascale Senellart. Ultrabright source of entangled photon pairs. *Nature*, 466(7303) :217–20, 2010.
- [129] Brice Rolly, Brian Stout, Sebastien Bidault, and Nicolas Bonod. Crucial role of the emitter-particle distance on the directivity of optical antennas. *Optics letters*, 36(17) :3368–70, 2011.
- [130] David P Fromm, Arvind Sundaramurthy, Anika Kinkhabwala, P James Schuck, Gordon S Kino, and W E Moerner. Exploring the chemical enhancement for surface-enhanced Raman scattering with Au bowtie nanoantennas. *The Journal of chemical physics*, 124(6) :61101, 2006.
- [131] R. M. Amos and W. L. Barnes. Modification of the spontaneous emission rate of eu^{3+} ions close to a thin metal mirror. *Phys. Rev. B*, 55 :7249–7254, 1997.
- [132] Joseph R. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy, 4th ed. *Springer, Berlin*, 2006.
- [133] A Femius Koenderink. Plasmon nanoparticle array waveguides for single photon and single plasmon sources. *Nano letters*, 9(12) :4228–33, 2009.
- [134] Tim H Taminiau, Fernando D Stefani, and Niek F van Hulst. Enhanced directional excitation and emission of single emitters by a nano-optical Yagi-Uda antenna. *Optics express*, 16(14) :10858–6, 2008.
- [135] Jingjing Li, Alessandro Salandrino, and Nader Engheta. Shaping light beams in the nanometer scale : A Yagi-Uda nanoantenna in the optical domain. *Physical Review B*, 76(24) :1–7, 2007.
- [136] Holger F Hofmann, Terukazu Kosako, and Yutaka Kadoya. Design parameters for a nano-optical Yagi-Uda antenna. *New Journal of Physics*, 9(7) :217–217, 2007.
- [137] R. R. Chance. Lifetime of an emitting molecule near a partially reflecting surface. *The Journal of Chemical Physics*, 60(7) :2744, 1974.
- [138] So-Jung Park, Anne a. Lazarides, James J. Storhoff, Lorenzo Pesce, and Chad a. Mirkin. The Structural Characterization of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticle Networks Formed by DNA Hybridization. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(33) :12375–12380, 2004.
- [139] T. Lund-Hansen, S. Stobbe, B. Julsgaard, H. Thyrrerstrup, T. Sünner, M. Kamp, A. Forchel, and P. Lodahl. Experimental realization of highly efficient broadband coupling of single quantum dots to a photonic crystal waveguide. *Phys. Rev. Lett.*, 101 :113903, 2008.
- [140] G. Mie. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3) :377—445, 1908.
- [141] Björn M Reinhard, Merek Siu, Harish Agarwal, a Paul Alivisatos, and Jan Liphardt. Calibration of dynamic molecular rulers based on plasmon coupling between gold nanoparticles. *Nano letters*, 5(11) :2246–52, 2005.

- [142] Duncan Graham, David G Thompson, W Ewen Smith, and Karen Faulds. Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 3(9) :548–51, 2008.
- [143] K Suzuki, K Hosokawa, and M Maeda. Controlling the Number and Positions of Oligonucleotides on Gold Nanoparticle Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(22) :7518–7519, 2009.
- [144] Sassan Sheikholeslami, Young-wook Jun, Prashant K Jain, and a Paul Alivisatos. Coupling of optical resonances in a compositionally asymmetric plasmonic nanoparticle dimer. *Nano letters*, 10(7) :2655–60, 2010.
- [145] S A Claridge, S L Goh, J M J Frechet, S C Williams, C M Micheel, and A P Alivisatos. Directed assembly of discrete gold nanoparticle groupings using branched DNA scaffolds. *Chem. Mater.*, 17(7) :1628–1635, 2005.
- [146] Z X Deng, Y Tian, S H Lee, A E Ribbe, and C D Mao. DNA-encoded self-assembly of gold nanoparticles into one-dimensional arrays. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44(23) :3582–3585, 2005.
- [147] D Zanchet, C M Micheel, W J Parak, D Gerion, S C Williams, and A P Alivisatos. Electrophoretic and structural studies of DNA-directed Au nanoparticle groupings. *J. Phys. Chem. B*, 106(45) :11758–11763, 2002.
- [148] J W Liu and Y Lu. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45(1) :90–94, 2006.
- [149] Juwen Liu and Yi Lu. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 45(1) :90–4, 2005.
- [150] N Warnasooriya, F Joud, P Bun, G Tessier, M Coppey-Moisan, P Desbiolles, M Atlan, M Abboud, and M Gross. Imaging gold nanoparticles in living cell environments using heterodyne digital holographic microscopy. *Opt. Express*, 18(4) :3264–3273, 2010.
- [151] K H Su, Q H Wei, X Zhang, J J Mock, D R Smith, and S Schultz. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.*, 3(8) :1087–1090, 2003.
- [152] Hongyun Wang and Björn M Reinhard. Monitoring Simultaneous Distance and Orientation Changes in Discrete Dimers of DNA Linked Gold Nanoparticles. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces*, 113(26) :11215–11222, 2009.
- [153] D K Lim, K S Jeon, H M Kim, J M Nam, and Y D Suh. Nanogap-engineerable Raman-active nanodumbbells for single-molecule detection. *Nat. Mater.*, 9(1) :60–67, 2010.
- [154] D Patrick O’Neal, Leon R Hirsch, Naomi J Halas, J Donald Payne, and Jennifer L West. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer letters*, 209(2) :171–6, 2004.
- [155] Alexander J Mastroianni, Shelley a Claridge, and a Paul Alivisatos. Pyramidal and

- chiral groupings of gold nanocrystals assembled using DNA scaffolds. *Journal of the American Chemical Society*, 131(24) :8455–9, 2009.
- [156] Brian Stout, J C Auger, and A Devilez. Recursive T matrix algorithm for resonant multiple scattering : Applications to localized plasmon excitations. *J. Opt. Soc. Am. A*, 25 :2549–2557, 2008.
- [157] D Dulin, A Le Gall, K Perronet, N Soler, D Fourmy, S Yoshizawa, P Bouyer, and N Westbrook. Reduced photobleaching of BODIPY-FL. *Proceedings of the Tenth International Meeting on Hole Burning, Single Molecule and Related Spectroscopies*, 3(4) :1563–1567, 2010.
- [158] S Schultz, D R Smith, J J Mock, and D A Schultz. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(3) :996–1001, 2000.
- [159] L R Skewis and B M Reinhard. Spermidine modulated ribonuclease activity probed by RNA plasmon rulers. *Nano Lett.*, 8(1) :214–220, 2008.
- [160] X M Qian, X Zhou, and S M Nie. Surface-Enhanced Raman Nanoparticle Beacons Based on Bioconjugated Gold Nanocrystals and Long Range Plasmonic Coupling. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(45) :14934–14935, 2008.
- [161] Ximei Qian, Xi Zhou, and Shuming Nie. Surface-enhanced Raman nanoparticle beacons based on bioconjugated gold nanocrystals and long range plasmonic coupling. *Journal of the American Chemical Society*, 130(45) :14934–5, 2008.
- [162] J Sharma, R Chhabra, C S Andersen, K V Gothelf, H Yan, and Y Liu. Toward reliable gold nanoparticle patterning on self-assembled DNA nanoscaffold. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(25) :7820–7821, 2008.