

Films et nanostructures métalliques pour l'exaltation de la fluorescence moléculaire

Eric Le Moal, Emmanuel Fort, Sandrine Lévêque-Fort

▶ **To cite this version:**

Eric Le Moal, Emmanuel Fort, Sandrine Lévêque-Fort. Films et nanostructures métalliques pour l'exaltation de la fluorescence moléculaire. L'Actualité Chimique, 2009, 332, pp.36-44. hal-02518136

HAL Id: hal-02518136
https://hal.science/hal-02518136

Submitted on 24 Mar 2020

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

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

Films et nanostructures métalliques pour l'exaltation de la fluorescence moléculaire

Eric Le Moal, Emmanuel Fort et Sandrine Lévêque-Fort

Résumé La fluorescence d'une molécule est sensible à son environnement électromagnétique immédiat. La présence d'une structure métallique modifie l'excitation et l'émission des fluorophores, par le jeu d'interférences et la présence de modes de surface tels que les plasmons de surface. Dans cette perspective, des films métalliques de différentes morphologies ont été élaborés et caractérisés. Leur influence sur la réponse optique des fluorophores a été étudiée par la modélisation puis l'expérience, en fonction de paramètres comme la distance fluorophore/métal et l'orientation moléculaire. Une amplification importante du signal détecté est observée, ainsi qu'une photostabilisation des fluorophores et une modification des transferts d'énergie intermoléculaires. Cet article démontre l'intérêt de cette technologie pour améliorer la sensibilité dans les puces à ADN et pour l'imagerie des cellules et des tissus.

Mots-clés **Exaltation de fluorescence, substrat miroir, film métallique nanostructuré, plasmon de surface, puces à ADN, imagerie cellulaire.**

Abstract **Metallic films and nanostructures for molecular fluorescence enhancement**
Molecule fluorescence is subject to the influence of its direct electromagnetic environment. Excitation and emission processes can be modified by the presence of a metallic structure, due to interference phenomena and coupling to surface plasmon modes. Metallic films ranging in morphology from nanoparticles to percolated, continuous, plane and rough films were designed and characterized. Their influence on the optical behaviour of the fluorophores was investigated by experiments and a theoretical model, as a function of fluorophore-to-metal distance and molecular orientation. The detected signal is found to be amplified by one to two orders of magnitude. Moreover, fluorophore photostabilization and the modification of intermolecular energy transfer processes are reported. This paper demonstrates the interest in this technology for sensitivity improvement of DNA chip and for applications in cell and tissue imaging.

Keywords **Fluorescence enhancement, mirror substrate, nanostructured metallic film, surface plasmon, DNA-chip, cell imaging.**

Les interactions entre lumière et matière sont à la base d'un grand nombre de méthodes d'analyse, en physique fondamentale comme en chimie ou pour les sciences de la vie. Elles permettent généralement de sonder un échantillon sans contact et de manière non destructive. La fluorescence est notamment couramment utilisée comme « outil » d'analyse spectroscopique pour étudier la structure électronique d'un composé chimique (voir *encadré 1*). Elle fournit également un contraste spécifique pour la microscopie, apportant des informations complémentaires aux contrastes d'absorption, de réflexion ou de diffusion. Cette technique d'imagerie s'est imposée avec le développement de sondes fluorescentes et de leur utilisation pour le marquage spécifique en biologie. Cependant, dans de nombreuses applications, ses possibilités sont limitées par la faiblesse du signal et la faible stabilité photochimique de ces sondes fluorescentes. L'une des solutions proposées pour résoudre ce problème, en complément du développement de nouvelles sondes plus performantes, est d'agir sur les « mécanismes » de la fluorescence, en modifiant les propriétés électromagnétiques de l'environnement local des sondes fluorescentes [1]. Cela peut notamment être fait en plaçant une structure métallique (un film ou une nanoparticule métallique) dans leur environnement proche. L'interaction des sondes fluorescentes avec des structures métalliques est particulièrement forte lorsqu'elle met en jeu l'excitation résonante de modes de surface, nommés plasmons de surface. Ces modes, associés aux oscillations collectives des électrons de conduction, dépendent de la morphologie de ces structures métalliques. Ils peuvent ainsi être ajustés pour optimiser le couplage avec les entités fluorescentes (fluorophores) [2].

Élaboration et caractérisation de films et de nanostructures métalliques

Pour cette étude, nous avons élaboré des films métalliques d'or ou d'argent sur des lames de microscope standard en verre par évaporation thermique dans un bâti ultravide. Les caractéristiques des films métalliques ont été contrôlées précisément en modifiant la quantité de matériau déposée et les conditions expérimentales du dépôt, notamment la température du substrat. De cette façon, il a été possible d'obtenir une grande variété de morphologies (nanoparticules de taille et de forme bien définies, films d'îlots percolés, films continus plans ou rugueux…), chacune possédant des propriétés optiques différentes. La morphologie des films métalliques a été examinée par microscopie électronique en transmission et microscopie de force atomique, et leurs propriétés optiques par spectroscopie d'absorption visible. Pour les applications à l'exaltation de fluorescence, le film

Encadré 1

La fluorescence moléculaire

La fluorescence est la propriété qu'ont certaines molécules (fluorophores) d'absorber la lumière à une certaine longueur d'onde et d'émettre ensuite de la lumière à une longueur d'onde différente après un bref intervalle de temps nommé durée de vie de fluorescence. Les mécanismes de la fluorescence mono- et biphotonique sont décrits sur la *figure*. Ces deux mécanismes ne diffèrent que par le processus d'excitation du fluorophore. La fluorescence monophotonique est induite par l'absorption d'un seul photon et le taux d'excitation du fluorophore est proportionnel au flux de photons incidents. La fluorescence biphotonique implique l'absorption quasi simultanée de deux photons (processus non linéaire). Dans ce cas, le taux d'excitation du fluorophore dépend quadratiquement du flux de photons incidents. Ce phénomène est donc essentiellement observé lorsque le champ d'excitation est intense.

Les différents niveaux d'énergie du fluorophore impliqués dans l'absorption et l'émission de lumière sont conventionnellement représentés dans un diagramme simplifié de Perrin-Jabłonski. Les lignes horizontales épaisses représentent les états électroniques singulets (S_0) et (S_1), tandis que les lignes fines correspondent aux états vibrationnels. Les transitions entre ces états sont schématisées par des flèches verticales. Immédiatement après l'absorption photonique, plusieurs processus peuvent intervenir, le plus probable étant la relaxation vers le niveau vibrationnel le plus bas du premier état électronique excité (S_1). Ce processus, dit de conversion interne, est relativement rapide : de l'ordre de la picoseconde (10^{-12} s). La molécule excitée reste ensuite dans cet état durant une période de l'ordre de la nanoseconde (10^{-9} s), puis relaxe vers l'état électronique fondamental (S_0). Si cette relaxation s'accompagne de l'émission d'un photon, il s'agit alors d'un processus de fluorescence. D'autres voies de relaxation, avec différents degrés de probabilité, sont en compétition avec le processus d'émission de fluorescence. L'énergie de l'état excité peut être dissipée non radiativement sous forme de chaleur ou lors d'une réaction chimique. Le fluorophore excité peut également interagir avec une autre molécule et lui transférer son énergie par une autre voie de relaxation. La plupart des fluorophores peuvent répéter le cycle d'excitation/émission plusieurs milliers de fois avant que la molécule excitée dans un état hautement réactif ne soit photoblanchie (destruction de la fluorescence).

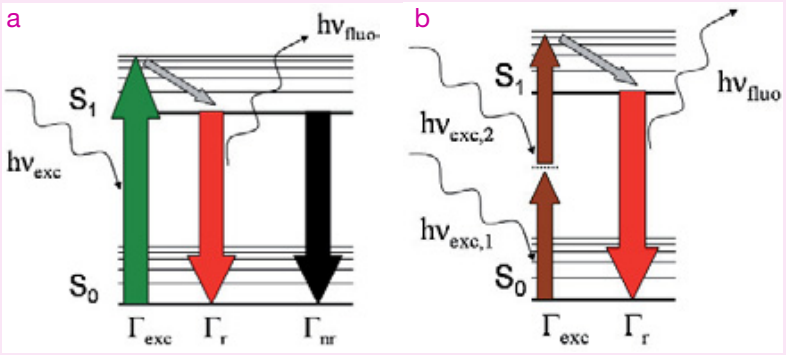


Diagramme simplifié de Perrin-Jabłonski pour les processus de fluorescence monophotonique (a) et biphotonique (b).
Légendes : niveaux électroniques, fondamental (S_0) et singulet excité (S_1) ; taux d'excitation (Γ_{exc}), d'émission radiative (Γ_r) et d'émission non radiative (Γ_{nr}) ; énergies des photons absorbés ($h\nu_{exc}$) et émis ($h\nu_{fluo}$).

métallique a été recouvert d'une couche mince d'alumine amorphe (Al_2O_3) permettant de contrôler la distance séparant la surface conductrice et l'échantillon déposé sur le substrat. Le dépôt d'alumine a été réalisé par ablation laser pulsée. Cette technique permet d'arracher de la matière à une cible solide par impulsions laser de grande puissance, tout en conservant la stœchiométrie du matériau ablaté.

Pour l'évaluation de leurs propriétés d'exaltation, les substrats ont été couverts d'un dépôt de colorant de faible densité (une fraction de monocouche), par évaporation thermique du colorant sous forme solide. L'interaction entre les fluorophores et le métal a été sondée en fonction de la distance les séparant grâce à un dispositif de microscopie de fluorescence multiphotonique comprenant un microscope inversé et une source laser impulsionnelle Ti:saphir. L'excitation par impulsions femto/picosecondes, à des taux de répétition élevés (MHz), donne la possibilité de réaliser des mesures de durée de vie de fluorescence. Elles consistent en la mesure statistique de l'intervalle de temps séparant l'impulsion d'excitation et la détection d'un photon de fluorescence (technique de comptage de photons uniques corrélés en temps). Les mesures résolues spectralement ont été réalisées au moyen d'un spectromètre de fluorescence et d'une source laser continue Ar. Un appareil commercial de type scanner a été utilisé pour la lecture des puces à ADN.

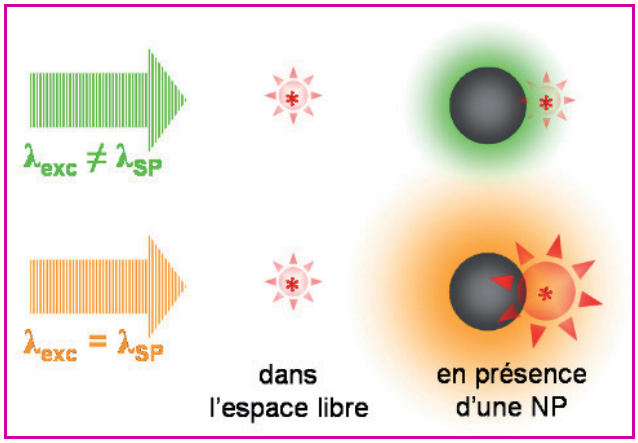


Figure 1 - Schéma d'un fluorophore (*) dans l'espace libre (1ère colonne) et d'un fluorophore couplé à une nanoparticule (NP) métallique (2e colonne), excités par un champ électromagnétique à une longueur d'onde lointaine (1ère ligne) ou proche (2e ligne) de la résonance plasmon (SP) de la nanoparticule. À la résonance plasmon, l'amplification locale du champ électrique autour de la nanoparticule exalte la fluorescence de la molécule.

Contrôle de la fluorescence moléculaire

Films d'îlots métalliques

La présence d'un film d'îlots métalliques peut modifier les processus d'excitation et d'émission des fluorophores. C'est le cas lorsque la distance séparant les molécules du film métallique est petite devant la longueur d'onde de la lumière incidente. Comme l'illustre la *figure 1*, l'excitation résonante des plasmons localisés dans les nanostructures du film induit une amplification du champ local, qui élève le taux d'excitation des fluorophores. Pour des particules de taille nanométrique, le champ électrique incident pénètre dans la nanoparticule et fait osciller les électrons de conduction. Les électrons sont soumis à une force de rappel qui tend à les

ramener vers les nœuds du réseau cristallin. Par conséquent, ce système se comporte comme un oscillateur amorti en oscillations forcées et possède une fréquence de résonance. Celle-ci dépend de la nature de la particule, de sa forme et de son environnement. L'effet d'amplification du champ n'est significatif qu'à la résonance plasmon (voir *encadré 2*). Il est donc nécessaire de pouvoir faire coïncider spectralement la résonance plasmon et le maximum d'absorption des fluorophores afin d'optimiser le couplage à l'excitation. En maîtrisant la morphologie du film par le contrôle de la quantité de métal déposé (d'une assemblée de particules sphériques à un film semi-continu), il est possible d'accorder la résonance plasmon sur une large gamme spectrale. Comme le montre la *figure 2*, le pic d'extinction d'un film d'argent d'épaisseur nominale 14 nm (λ = 570 nm) présente un déplacement spectral $\Delta\lambda$ = + 90 nm par rapport à un film de 2 nm (λ = 480 nm). Ce déplacement peut être amplifié en augmentant l'indice optique *n* du milieu entourant les particules métalliques, avec une surcouche de 2 nm d'alumine (*n* = 1,67), $\Delta\lambda$ = + 160 nm.

L'amplification du champ local joue un rôle majeur dans l'exaltation de la fluorescence biphotonique (voir *encadré 1*), pour laquelle le taux d'excitation des fluorophores dépend quadratiquement de l'intensité du champ d'excitation [3-4]. Dans ce cas, une amplification d'un ordre de grandeur de l'intensité du champ électrique au niveau des fluorophores

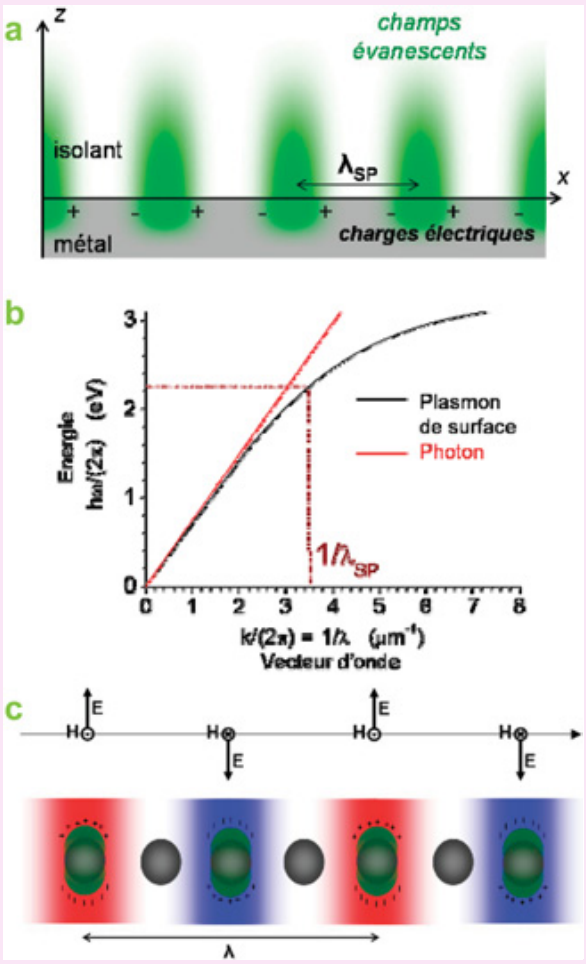
Encadré 2

Les plasmons de surface

Dans une approche classique, un métal peut être décrit comme un réseau tridimensionnel d'ions chargés positivement au travers duquel peuvent se déplacer les électrons de conduction. Ces derniers forment un gaz d'électrons que l'on nomme *plasma*. Les modes d'oscillations du plasma (appelés *plasmons*) jouent un rôle fondamental dans les propriétés optiques des métaux. Notamment, la réflexion de la lumière par une surface métallique est due à la réponse du plasma induite par les ondes électromagnétiques incidentes.

Certains de ces modes plasmons, désignés sous le terme *plasmons de surface*, restent confinés au niveau de la surface du métal [20]. Ils se propagent le long de l'interface métal/diélectrique. Les oscillations du plasma sont transversales à l'interface (voir *figure a*) et sont associées à un champ électromagnétique évanescent qui décroît exponentiellement de part et d'autre de l'interface suivant la direction normale. L'examen des courbes de dispersion associées aux plasmons de surface aide à comprendre les possibilités de couplages avec la lumière. Les courbes de dispersion représentent pour un mode donné la variation de l'énergie en fonction de l'impulsion, proportionnelle au vecteur d'onde. En raison du principe de conservation de l'énergie et de l'impulsion, les couplages ne sont permis qu'aux intersections des courbes de dispersion. La *figure b* représente la courbe de dispersion associée aux plasmons de surface à l'interface métal/diélectrique et la limite du cône de lumière associé aux modes électromagnétiques se propageant dans le milieu diélectrique. L'absence d'intersection interdit tout couplage : l'énergie des plasmons de surface ne peut pas être convertie sous forme de lumière, et réciproquement, une onde lumineuse plane ne peut pas exciter les plasmons de surface. Ce couplage reste néanmoins possible dans certaines configurations particulières, notamment en utilisant un film métallique déposé sur un substrat diélectrique et dont l'épaisseur est de quelques dizaines de nanomètres seulement. Si l'indice optique du substrat diélectrique est supérieur à celui du milieu diélectrique de l'autre côté du film métallique, alors il est possible d'exciter les plasmons de surface en éclairant le film métallique à travers le substrat diélectrique (configurations de Kretschmann ou d'Otto). Un tel couplage peut également être réalisé en rendant la surface métallique rugueuse.

Les structures métalliques dont les dimensions sont petites devant la longueur d'onde de la lumière, comme par exemple les nanoparticules métalliques, possèdent également des modes plasmons, mais ceux-ci sont localisés et non propagatifs (confinés suivant les trois dimensions de l'espace). À certaines longueurs d'ondes, ces modes plasmons peuvent être excités de manière résonante par la lumière (voir *figure c*). En particulier, les nanoparticules d'argent et d'or présentent des pics d'absorption et de diffusion optique très intenses dans le spectre UV-visible et proche infrarouge associés aux résonances plasmons. Une amplification très importante du champ électromagnétique local est associée à ces résonances, les nanoparticules métalliques se comportant comme des *nano-antennes*. Son intensité est maximale à la surface des nanoparticules métalliques et décroît exponentiellement suivant la direction normale à cette surface.



(a) Schéma représentant les charges électriques à l'interface entre un métal et un isolant et les champs évanescents associés aux plasmons de surface. (b) Courbe de dispersion associée aux plasmons de surface à l'interface argent/alumine (ligne noire) et limite du cône de lumière associé aux modes électromagnétiques se propageant dans l'alumine (ligne rouge). Les traits en pointillés rouges indiquent l'énergie d'un photon de longueur d'onde λ_0 = 550 nm dans l'espace libre (hc/λ_0 = 2,25 eV). (c) Schéma représentant les oscillations des charges électriques induites par un champ électromagnétique dans des nanoparticules métalliques de taille petite devant la longueur d'onde de la lumière. Au niveau de chaque particule sont précisés la direction et le sens des vecteurs champ électrique **E** et champ magnétique **H**.

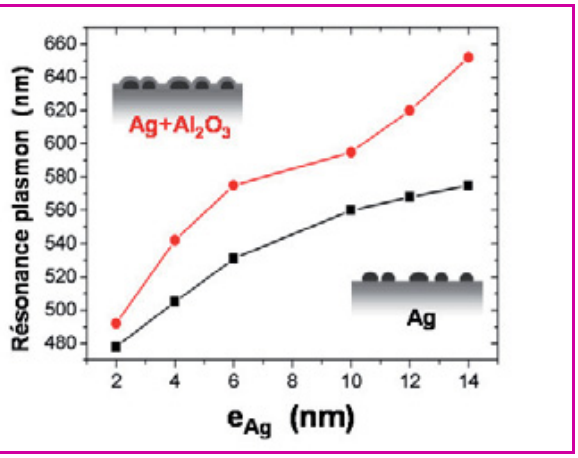


Figure 2 - Position spectrale du maximum d'extinction du film d'argent, déterminée par spectroscopie d'absorption optique en transmission, en fonction de son épaisseur nominale e_{Ag}.
■ : film nu ; ● : film couvert d'une couche de 2 nm d'alumine.

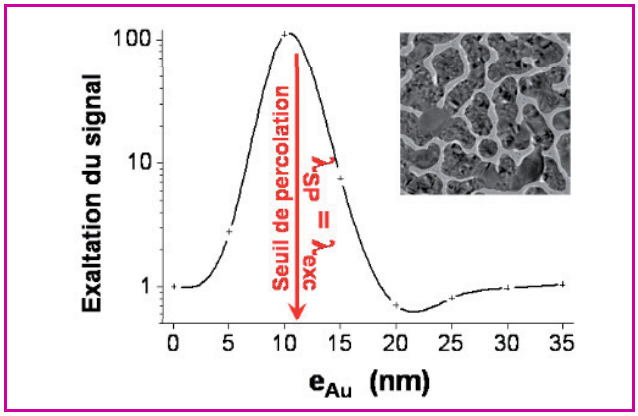


Figure 3 - Facteur d'amplification du signal de fluorescence d'un dépôt d'éosine sur un film d'îlots d'or, sous excitation à deux photons (λ_{exc} = 833 nm, λ_{fluo} = 535 nm), en fonction de l'épaisseur nominale du film métallique e_{Au}. Insert : cliché de microscopie électronique en transmission d'un film métallique proche du seuil de percolation.

produit théoriquement une amplification de deux ordres de grandeur du flux de photons émis. Nous avons étudié expérimentalement la fluorescence biphotonique de molécules d'éosine déposées sur un film d'îlots d'or à différents stades de croissance du film. La *figure 3* présente la variation relative du signal de fluorescence par rapport à un dépôt identique sur une lame de verre nue, en fonction de l'épaisseur nominale du film métallique. Une amplification d'un facteur 100 est mesurée lorsque le film est au seuil de percolation (voir *figure 3*), cette morphologie procurant les plus intenses exaltations de champ local [2]. Ce type de films nanostructurés est particulièrement intéressant car sa résonance plasmon est dans le domaine d'excitation biphotonique des colorants absorbant dans le visible (proche infrarouge).

En raison de la distribution du champ autour des îlots métalliques (voir *encadré 2*), les molécules les plus proches des îlots bénéficient du champ d'excitation le plus intense. Cependant, la proximité des structures métalliques est également source de pertes d'énergie [5]. Le couplage avec les plasmons de surface permet aux molécules excitées de transférer une partie de leur énergie au métal sans émettre de photons (transfert non radiatif). L'efficacité de ce processus augmente lorsque la distance au métal diminue. En raison de la compétition entre l'amplification du champ local et le transfert d'énergie non radiatif au métal, il existe une distance fluorophore/métal optimale pour l'exaltation du signal de fluorescence [6]. Pour un film d'argent proche du seuil de percolation (de 10 nm d'épaisseur nominale), cette distance optimale est d'environ 10 nm [7].

Lorsque l'épaisseur nominale du dépôt métallique augmente, sa morphologie et ses propriétés optiques tendent vers celles d'un film continu. Le film métallique ne se comporte plus comme une assemblée de nanostructures résonantes, mais comme un miroir. Ce cas de figure est traité ci-après.

Films métalliques plans

À température ambiante, un dépôt d'argent de 60 nm d'épaisseur nominale forme un film continu dont le coefficient de transmission est quasi nul pour la lumière visible. Sur une lame de verre sans défaut, ce film présente une rugosité de l'ordre du nanomètre (moyenne quadratique). On peut alors négliger les phénomènes de diffusion optique et considérer la surface métallique comme un miroir, dont le coefficient de réflexion n'est limité que par l'absorption dans le métal (quelques pourcents seulement). Nous avons étudié, expérimentalement et par simulations, la fluorescence de molécules (cyanine 3, rhodamine B et fuchsine basique) déposées sur ce type de miroir, en contrôlant la distance fluorophore/métal grâce à une couche séparatrice d'alumine [8]. Une manière simplifiée de décrire une molécule fluorescente est de considérer uniquement le niveau fondamental et le premier niveau singulet excité (système à deux niveaux). La relaxation de l'état excité à l'état fondamental de la molécule s'apparente alors à une transition dipolaire et peut être mise en équations en utilisant le modèle d'un oscillateur dipolaire. Le champ électrique émis par un oscillateur dipolaire possède une composante radiative qui se propage dans l'espace et une composante évanescente qui reste confinée autour de l'émetteur. Cette composante évanescente joue notamment un rôle important dans les pertes d'énergie par couplage au substrat. Le modèle développé intègre également les variations locales du champ d'excitation et simule la collection de la lumière émise au moyen d'un objectif de microscope, afin d'évaluer le facteur d'amplification du signal détecté. La *figure 4* présente les résultats théoriques et expérimentaux en fonction de l'épaisseur *d* de la couche séparatrice.

L'interférence entre les champs incidents et réfléchis forme un champ stationnaire à proximité de la surface métallique. Par conséquent, l'intensité du champ d'excitation varie en fonction de la distance au métal. Aux ventres du réseau d'interférences (*i.e.* là où les interférences sont constructives), le taux d'excitation peut être plus de six fois supérieur à celui de fluorophores adsorbés sur une lame de verre standard. D'autre part, l'interaction du dipôle d'émission avec son image dans le miroir modifie le taux d'émission. Pour la cyanine 3, le modèle prévoit une augmentation d'un facteur 2 du rendement quantique lorsque les molécules sont à une distance optimale du métal. Lorsque la fluorescence est détectée au moyen d'un objectif de microscope à air, la présence du miroir améliore également l'efficacité de collection, grâce à la redirection de la lumière émise vers l'ouverture de l'objectif : un gain d'un facteur 2,5 est attendu pour une ouverture numérique de 0,4. Expérimentalement, des

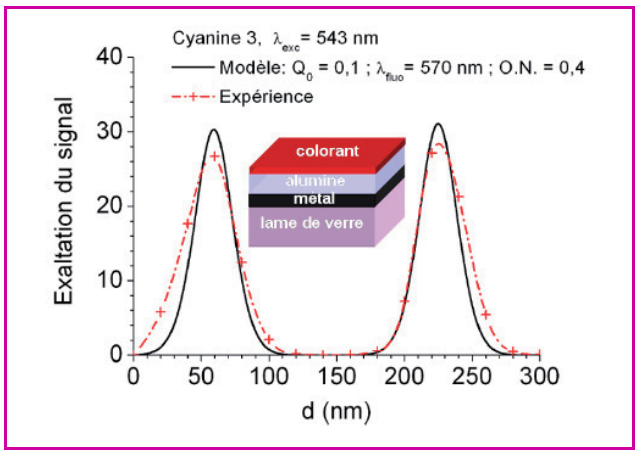


Figure 4 - Facteur d'exaltation théorique et expérimental. Signal de fluorescence calculé pour une assemblée de dipôles orientés aléatoirement, situés à une distance *d* de la surface d'argent.
La collection est réalisée au moyen d'un objectif de microscope d'ouverture numérique 0,4. Le signal de fluorescence est normalisé par rapport à celui d'une assemblée de dipôles similaires directement adsorbés sur un substrat de verre. Les calculs théoriques (ligne continue noire) sont comparés aux mesures expérimentales (croix rouges et ligne en pointillés) lesquelles ont été obtenues pour un film de cyanine 3 évaporé sur un substrat miroir. Insert : schéma de l'échantillon.

facteurs d'exaltation G = 26,7 et 28,3 ont été relevés pour les distances optimales respectives d_1 = 59 nm (premier pic, *figure 4*) et d_2 = 225 nm (second pic), en bon accord avec le modèle théorique [8].

La présence d'une surface métallique influence également les processus de photoblanchiment (voir *encadré 1*) [9]. Il est possible d'accroître la durée de photostabilité de la molécule (*i.e.* de diminuer le taux de photoblanchiment) en réduisant simplement la puissance d'excitation. Cependant, le nombre moyen de photons émis par la molécule avant photodestruction restant inchangé, l'efficacité de détection n'est pas meilleure. Par contre, le nombre moyen de cycles de fluorescence avant photodestruction est inversement proportionnel à la durée de vie de l'état excité. Celle-ci est indépendante du taux d'excitation mais est sensible aux interactions électromagnétiques de la molécule avec son environnement (elle dépend directement du taux d'émission) [10-11]. La *figure 5* présente les variations relatives de la durée de vie, calculées pour un dipôle dont les propriétés d'émission sont celles de la rhodamine B, en fonction de sa position et de son orientation par rapport au substrat d'argent. Si l'on considère une orientation dipolaire aléatoire (moyenne sur un grand nombre de dipôles) à une distance *d* = 60 nm du métal, le modèle donne une durée de vie réduite d'un facteur 1,8. Expérimentalement, on mesure pour la rhodamine B dans les mêmes conditions une diminution de la durée de vie d'un facteur 2 (τ = 2,60 ns sur le verre et 1,31 ns sur le substrat miroir). La photostabilisation des fluorophores, associée à l'amélioration de l'efficacité de collection, permet ainsi de détecter plus de photons de fluorescence avant leur photodestruction (près de cinq fois plus d'après le modèle). L'exaltation du signal de fluorescence permet en outre d'allonger la période d'observation des échantillons, puisqu'il est possible d'obtenir sur le substrat métallisé un signal de même intensité que sur le substrat standard tout en diminuant par ~ 30 la puissance d'excitation. Ces deux points sont d'un grand intérêt pour les applications biomédicales.

En outre, l'exaltation des processus d'émission radiative permet de compenser partiellement la baisse de rendement quantique habituellement observée lorsque la densité moléculaire devient grande. L'auto-extinction de la fluorescence (ou « self-quenching ») intervient dans un système de molécules fluorescentes identiques, lorsque deux molécules proches l'une de l'autre agissent comme un piège pour l'énergie d'excitation. Ce phénomène est dû au transfert d'énergie incohérent entre des molécules distribuées aléatoirement [12]. Il est possible de limiter cette baisse de signal en modifiant l'environnement électromagnétique des molécules. En effet, la réduction de la durée de vie de l'état excité, induite par la présence d'une surface métallique, permet de favoriser la relaxation des molécules par couplage aux modes électromagnétiques (photons, plasmons de surface) [13]. Nous avons étudié la fluorescence de films de colorants (fuchsine basique et cyanine 3) de différentes densités, déposés sur une lame de verre et un substrat métallisé, et comparé les facteurs d'exaltation de fluorescence (mesurés à la distance optimale *d* = 60 nm) (*figure 6*). Pour les deux colorants étudiés, on observe une hausse du facteur d'exaltation lorsque la densité surfacique ρ_s de fluorophores augmente (c'est-à-dire lorsque la distance intermoléculaire moyenne $r = 1/\sqrt{\rho_s}$ diminue). Pour la cyanine 3, on mesure une exaltation d'un facteur 19 pour $\rho_s = 2{,}1.10^{-4}$ MC

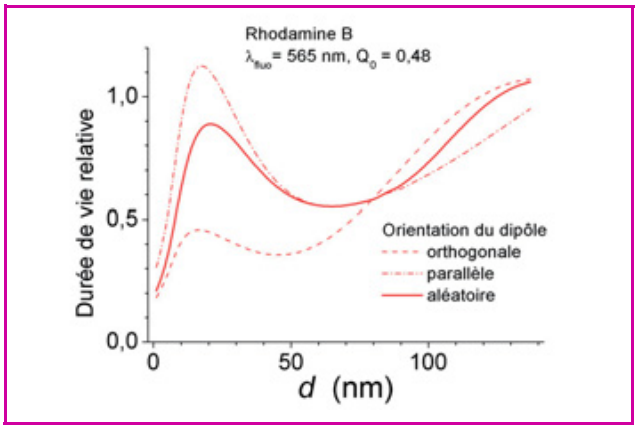


Figure 5 - Durée de vie de fluorescence calculée pour une assemblée de dipôles orientés parallèlement, orthogonalement et aléatoirement, situés à une distance *d* de la surface d'argent.
La durée de vie de fluorescence est normalisée par rapport à celle d'une assemblée de dipôles similaires directement adsorbés sur un substrat de verre.

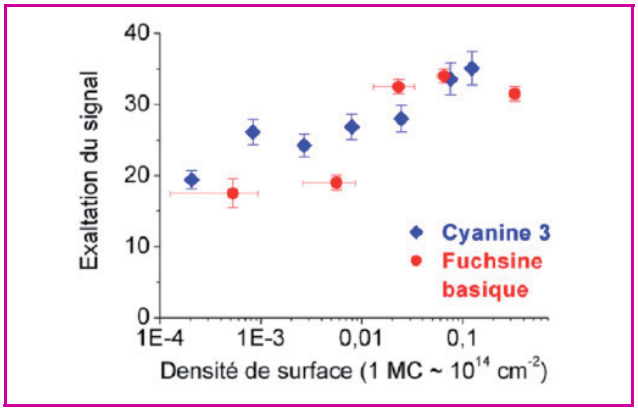


Figure 6 - Facteur d'exaltation de fluorescence d'un film de colorant (cyanine 3 et fuchsine basique) déposé sur un substrat métallisé (Ag 50 nm + Al_2O_3 60 nm) pour différentes densités surfaciques de fluorophores.
Les densités surfaciques sont déterminées par mesure de l'absorption optique en transmission et sont exprimées ici en monocouches (MC), en supposant 1 MC = 10^{14} cm^{-2}.

(r ~ 70 nm) et 35 pour ρ_s = 0,12 MC (r ~ 3 nm). La constance du facteur d'exaltation en fonction de la puissance d'excitation montre que l'influence de la surface métallique sur l'auto-extinction n'est pas liée à la saturation des fluorophores, mais uniquement à la compétition entre les processus d'émission par couplage aux modes électromagnétiques et les processus intermoléculaires de transfert d'énergie incohérent.

Jusqu'ici, nous n'avons pas pris en compte les propriétés particulières liées à la rugosité de surface des films métalliques continus. Dans la partie qui suit, nous montrons comment contrôler cette rugosité et utiliser ces effets au bénéfice de la détection de fluorescence.

Films métalliques rugueux

Lorsque la distance séparant les fluorophores d'un film métallique plan est petite devant la longueur d'onde, la partie évanescente du champ d'émission des molécules peut se coupler aux plasmons de surface (voir *encadré 2*) [14-15]. Le couplage aux plasmons de surface et le transfert d'énergie au métal diminuent considérablement l'émission de fluorescence. Cependant, ce processus peut devenir favorable à la détection de la fluorescence si l'on parvient à convertir l'énergie en photons. Une rugosité de surface à l'échelle nanométrique permet cette conversion [2] et le contrôle de cette rugosité est capital pour maîtriser le processus d'exaltation. En effet, les directions dans lesquelles l'énergie est réémise et l'efficacité du processus dépendent fortement des fréquences spatiales et de l'amplitude des variations du profil de la surface [16]. Nous avons développé et breveté une technique originale permettant d'élaborer des surfaces métalliques de rugosité contrôlée et optimisée pour l'exaltation de fluorescence [17].

Cette technique, qui consiste à déposer plusieurs couches métalliques à différentes températures du substrat, nous permet d'obtenir un film quasi continu d'une rugosité bien contrôlée et grande devant celle permise par une croissance en une seule étape. La *figure 7* présente la topographie de surface d'un film d'argent, réalisée par microscopie de force atomique, et la distribution de fréquences spatiales calculée par analyse de Fourier de cette image topographique. La distribution de fréquences spatiales renseigne sur les possibilités de couplage entre la lumière et les plasmons de surface permises par la rugosité de la surface métallique. La présence de périodicités (fréquences spatiales) sur la surface permet en effet de pallier le désaccord entre les vecteurs d'ondes associés aux photons et aux plasmons de surface en fournissant l'impulsion manquante [16]. Grâce à un large spectre de fréquences spatiales (centré sur 9,1 μm^{-1} et d'une largeur à mi-hauteur de 10,4 μm^{-1}) et une importante amplitude de rugosité (16 nm en moyenne quadratique), la surface métallique présentée *figure 7* permet une conversion radiative très efficace de l'énergie des plasmons de surface, sur tout le spectre visible et dans tout l'angle solide de collection de la lumière. La *figure 8* présente une image de fluorescence (en fausses couleurs) d'un film de Rhodamine B déposé sur un film d'argent plan et un film d'argent rugueux, avec une couche séparatrice d'alumine variant en épaisseur de 0 à 120 nm. Un gain de signal d'un facteur 52 est mesuré à la distance optimale *d* = 60 nm sur le film rugueux, soit un gain supplémentaire d'un facteur 1,7 par rapport au film plan.

L'utilisation de cette technique pour l'exaltation du signal de fluorescence dans différentes applications biomédicales est présentée ci-après.

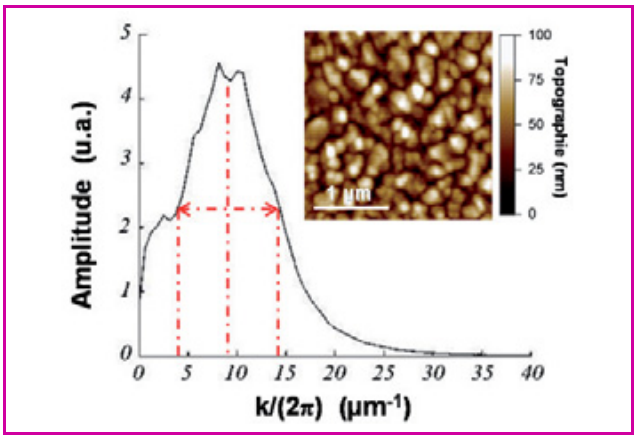


Figure 7 - Distribution de fréquences spatiales de la surface d'un film d'argent nanorugueux.
La fréquence spatiale k/(2π) = 9,1 μm^{-1} correspond au maximum de la distribution. Les lignes en pointillés rouges permettent de visualiser la largeur à mi-hauteur de cette distribution.

Applications biologiques

Puces à ADN

Les puces à ADN employant le marquage fluorescent (voir *encadré 3*) présentent actuellement un certain nombre de limites freinant leur utilisation routinière en laboratoire et en clinique. Le rendement de l'hybridation restant faible, une quantité relativement grande de matériel génétique est nécessaire pour obtenir des mesures valides. Ce problème provient d'une part de propriétés chimiques. L'encombrement autour des brins d'oligonucléotides, dû à leur arrangement sur la surface de la puce, réduit l'accessibilité des sondes. L'adsorption de cibles sur la surface (sans qu'il y ait hybridation avec une sonde complémentaire) dégrade également le rapport signal sur bruit lors de la lecture de la

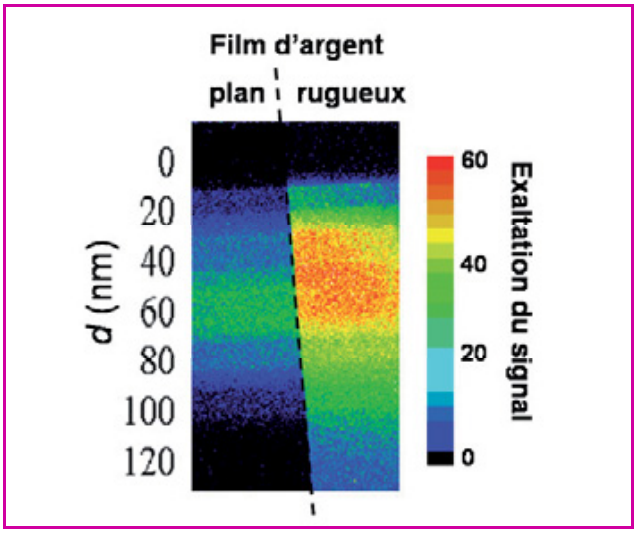


Figure 8 - Image de fluorescence d'un film de colorant (cyanine 3) évaporé sur un film d'argent plan (moitié gauche de l'image) et sur un film d'argent nanorugueux (moitié droite) préalablement recouverts d'une couche d'alumine d'épaisseur variant de 0 à 120 nm par pas de 20 nm.
Le film nanorugueux est préparé par dépôts successifs d'un film de 50 nm d'argent à T_{ech} = 200 °C et d'un film de 50 nm d'argent à température ambiante.

Encadré 3

Les puces à ADN

Cette technologie est conçue pour l'analyse parallèle d'acides nucléiques et permet d'identifier différentes séquences d'ADN présentes dans un échantillon [21]. L'une de leurs fonctions est de déterminer le niveau d'expression d'un gène dans la cellule, c'est-à-dire son abondance. Le substrat de la puce à ADN est généralement une surface plane (*e.g.* de verre ou de nylon) ou portant un réseau de réservoirs microscopiques appelés micropuits. Cette surface présente un grand nombre de « zones actives », appelées spots, au niveau desquelles un grand nombre d'oligonucléotides d'une séquence connue sont greffés à la surface par une liaison chimique. Ces brins fixés à la surface jouent le rôle de sondes. La puce est ensuite mise en contact avec une mixture d'acides nucléiques extraits d'un échantillon à analyser et conjugués à des marqueurs permettant leur détection. Ces acides nucléiques jouent le rôle de cibles. Chaque cible se lie préférentiellement à une sonde complémentaire pour former une double hélice. La composition de la mixture est déduite de la concentration de cibles hybridées en chaque spot [22]. Pour obtenir cette information, la puce est rincée pour éliminer les cibles non hybridées, puis la présence de cibles hybridées est détectée et quantifiée grâce aux signaux émis par les marqueurs. La méthode de détection des cibles hybridées dépend du type de marqueurs utilisés, les plus communs étant les fluorophores moléculaires, les isotopes radioactifs et les enzymes. Les marqueurs fluorescents sont généralement détectés dans des systèmes automatisés d'imagerie à balayage laser (scanners). La *figure* ci-dessous résume les différentes étapes du traitement d'une puce à ADN utilisant un jeu de deux marqueurs fluorescents différents pour comparer l'expression des gènes dans deux échantillons cellulaires.

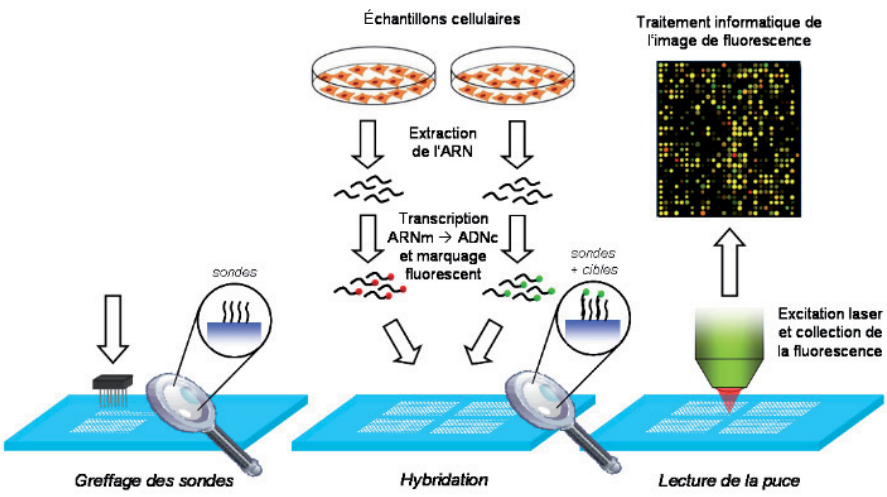


Schéma de principe d'une puce à ADN utilisant un marquage fluorescent bicolore (*e.g.* cyanine 3/cyanine 5) permettant de comparer le niveau d'expression de gènes dans deux échantillons cellulaires différents.

puce. D'autre part, la configuration optique utilisée dans la plupart des lecteurs de puces commerciaux (détection en épifluorescence avec un objectif à air) est caractérisée par une faible efficacité de collection. Par conséquent, l'utilisation des puces à ADN nécessite généralement une préamplification biochimique par réplication *in vitro* du matériel génétique (« polymerase chain reaction », PCR). Cette étape est longue et coûteuse, et il est difficile de pouvoir obtenir un résultat autre que qualitatif, ou semi-quantitatif, après amplification du matériel initial.

En collaboration avec l'entreprise Genescore, nous avons développé des puces à ADN sur des substrats métallisés. La *figure 9* présente les images de fluorescence (en fausses couleurs) de séries de spots identiques d'ADN marqués cyanine 3, réalisées dans des conditions d'observation similaires sur trois substrats différents (substrat standard, films d'argent plan et rugueux). Nous avons mesuré une amplification du signal d'un facteur 24 sur le film d'argent plan et d'un facteur 42 sur le film d'argent rugueux. Des facteurs d'exaltation similaires ont été mesurés avec le marquage cyanine 5. Nous avons également démontré le caractère linéaire de l'exaltation de fluorescence sur ces substrats métallisés, condition nécessaire à la reproductibilité des mesures quantitatives de l'expression de gènes. Le gain en sensibilité de détection sur les puces à ADN permet de réduire les quantités de matériel génétique nécessaires à l'analyse. Lorsqu'une amplification d'un facteur 40-50 est suffisante, la technique proposée peut également se substituer aux coûteuses méthodes biochimiques d'amplification des gènes. L'utilisation de ces substrats rugueux fournit un gain de signal deux à trois fois plus grand que celui obtenu à l'aide des substrats métallisés actuellement disponibles dans le commerce [18].

Imagerie cellulaire

Nous avons montré, par des travaux expérimentaux et théoriques, que l'utilisation de substrats miroirs (lames de microscope couvertes d'un film plan continu d'or ou d'argent) permet d'accroître le signal et le contraste en microscopie de fluorescence appliquée à l'analyse des cellules et tissus biologiques [8, 19]. Dans ce type d'applications, les échantillons fluorescents sont généralement d'épaisseur micrométrique. De manière générale, la taille des cellules biologiques est comprise entre 1 et 10 µm pour les cellules procaryotes, 10 et 100 µm pour les cellules eucaryotes. En clinique, les microtomes électriques servant à préparer les sections de tissu biologique permettent typiquement de réaliser des coupes de 2 à 25 µm d'épaisseur.

En présence d'un substrat métallisé, le taux d'émission d'un fluorophore varie en fonction de la distance qui le sépare de l'interface réfléchissante. Cependant, l'amplitude de ces variations décroît avec la distance, en raison de la portée limitée de l'interaction du dipôle avec son image dans le miroir. Par conséquent, l'exaltation à l'émission joue surtout un rôle pour les échantillons de faible épaisseur (petite devant la longueur d'onde d'émission). Pour les échantillons d'épaisseur micrométrique, l'amélioration de la sensibilité à la détection est principalement liée à l'augmentation du taux d'excitation des fluorophores et de l'efficacité de collection de la fluorescence. Les contributions de ces deux effets sont plus modestes que pour un émetteur ponctuel car moyennées sur toute l'épaisseur de l'échantillon, mais sont néanmoins significatives. Le principal avantage de cette technique est de compenser la faible efficacité de collection des objectifs de faible grossissement et de faible ouverture numérique. Ces derniers sont très utilisés en laboratoire et en clinique en raison du large champ d'observation et de la grande profondeur de champ qu'ils procurent. Ces caractéristiques permettent en effet, contrairement aux objectifs à immersion, de sonder la totalité de l'épaisseur de l'échantillon sans modifier la focalisation de l'objectif et de disposer en une image d'une population statistique de cellules plus importante (donc plus représentative). De plus, l'absence de liquide d'immersion assure facilité d'emploi et compatibilité avec l'automatisation des tâches.

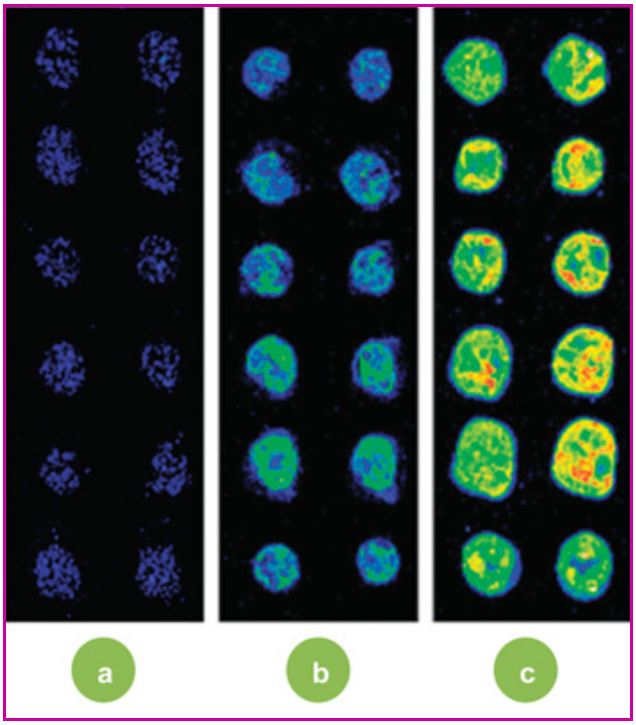


Figure 9 - Images de fluorescence (détails, fausses couleurs) d'une puce à ADN, réalisées dans les mêmes conditions de détection (même puissance d'excitation laser et même sensibilité à la détection), pour trois différents types de substrat : lame de verre standard (a), film d'argent plan (b) et film d'argent nanorugueux (c).

En collaboration avec l'Institut Curie d'Orsay, nous avons appliqué cette technique à l'étude statistique d'une culture de cellules épithéliales modèles (lignée MDCK) [8]. La *figure 10* présente la configuration dans laquelle l'échantillon est observé (*a*) et une image de fluorescence d'un échantillon cellulaire sur un substrat de verre dont la moitié droite est couverte d'un film d'argent (*b*). Trois types d'organelles sont marqués avec des fluorophores spécifiques et l'image de fluorescence en fausses couleurs est la superposition des signaux correspondant à chacun de ces organelles : microtubules (rouge), appareils de Golgi (vert), mitochondries (bleu). Une amplification moyenne d'un facteur 2,5 à 4,5 est observée sur l'ensemble du spectre de réflectivité du substrat miroir. Une localisation plus précise des structures subcellulaires est rendue possible par le gain de contraste. L'observation simultanée d'un grand nombre de cellules (large champ d'observation) est ici la garantie d'une analyse statistique fiable et rapide. Une application en clinique, développée en collaboration avec l'Hôpital Saint-Louis de Paris, a également mis en évidence l'intérêt de cette technique pour l'analyse cytogénétique et histologique pour le diagnostic médical [19].

Conclusion

Les techniques de fluorescence ont bénéficié d'un nouvel essor depuis que l'on sait modifier et contrôler les propriétés des fluorophores en agissant physiquement sur leur proche environnement. Une véritable ingénierie des processus d'excitation et d'émission s'est développée, utilisant une large gamme d'« outils » (surfaces miroirs, films nanostructurés, nanoparticules métalliques, etc.). Dans ce travail, nous avons démontré l'efficacité des substrats métallisés pour amplifier le signal de fluorescence. Nous avons mis en évidence la pertinence de leur utilisation pour améliorer la sensibilité à la détection dans un contexte biomédical. Pour les puces à ADN, cette technique apporte un gain de signal supérieur à 40 sans qu'aucune modification du dispositif de mesure ou du protocole de préparation de l'échantillon ne soit nécessaire. Pour l'imagerie des cellules et des tissus biologiques, l'utilisation des substrats métallisés avec les objectifs de microscope à air permet une amélioration du contraste des images, tout en conservant les avantages de ce type d'objectifs (largeur et profondeur de champ, absence de liquide d'immersion).

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier leurs collaborateurs sans l'aide desquels ces travaux n'auraient pas pu être menés à bien : F.P. Cordelières (Plateforme d'imagerie, Institut Curie, Orsay), A. Janin et H. Murata (Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Hôpital Saint-Louis, Paris), D. Le Clerre, F. Richard et L. Talini (Genescore, ESPCI, Paris), R. Briandet et J.-M. Herry (UBHM, INRA, Massy). Pour leur aide tout au long de sa thèse de doctorat, E. Le Moal remercie C. Ricolleau, M.-P. Fontaine-Aupart et J.-P. Lacharme. Ces travaux ont été réalisés grâce aux financements de la Ville de Paris (ESPCI), du CNRS (Programme « Puces à ADN »), du ministère de la Recherche (ACI « Nanosciences-Nanotechnologies ») et de l'Université Paris-Diderot (Paris 7).

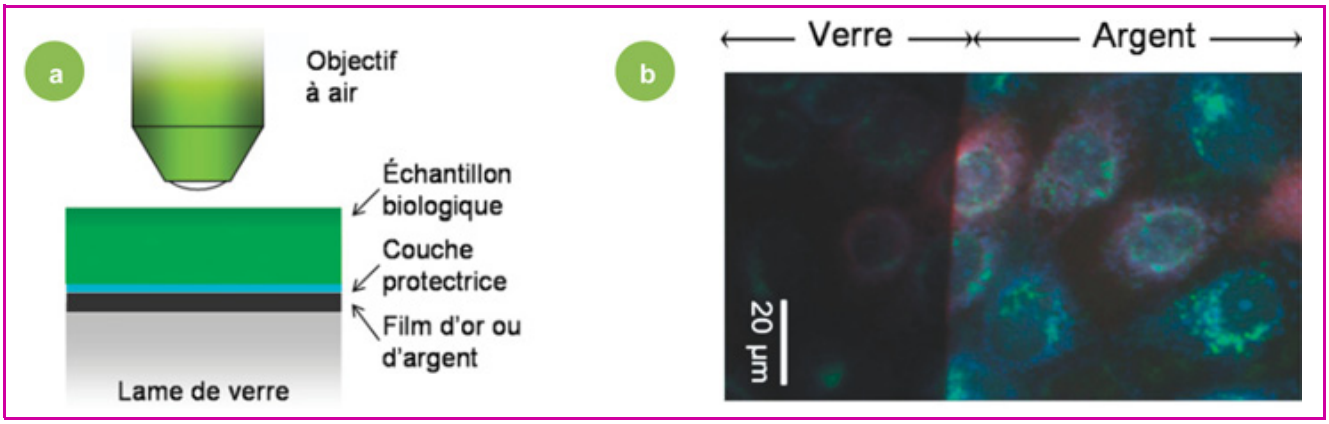


Figure 10 - (a) Schéma d'utilisation des substrats miroirs pour la microscopie d'épifluorescence en biologie. (b) Image de fluorescence (détail) de cellules épithéliales sur un substrat miroir d'argent (le métal est retiré sur la partie gauche de l'image). Marquage fluorescent : microtubules (rouge), appareils de Golgi (vert), mitochondries (bleu).

Références

L'intégralité du rapport de thèse rapportant plus en détail les travaux présentés ici est disponible sur http://pastel.paristech.org/2727.

[1] Barnes W.L., Dereux A., Ebbesen T.W., Surface plasmon subwavelength optics, *Nature*, **2003**, *424*, p. 824.

[2] Fort E., Grésillon S., Surface enhanced fluorescence, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2008**, *41*, p. 013001.

[3] Glass A.M., Wokaun A., Heritage J.P., Bergman J.G., Liao P.F., Olson D.H., Enhanced two-photon fluorescence of molecules adsorbed on silver particle films, *Phys. Rev. B*, **1981**, *24*, p. 4906.

[4] Moskovits M., Surface-enhanced spectroscopy, *Rev. Mod. Phys.*, **1985**, *57*, p. 783.

[5] Anger P., Bharadwaj P., Novotny L., Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence, *Phys. Rev. Lett.*, **2006**, *96*, p. 113002.

[6] Wokaun A., Lutz H.-P., King A.P., Wild U.P., Ernst R.R., Energy transfer in surface enhanced luminescence, *J. Chem. Phys.*, **1983**, *79*, p. 509.

[7] Kümmerlen J., Leitner A., Brunner H., Aussenegg F.R., Wokaun A., Enhanced dye fluorescence over silver island films: analysis of the distance dependence, *Mol. Phys.*, **1993**, *80*, p. 1031.

[8] Le Moal E., Fort E., Lévêque-Fort S., Cordelières F.P., Fontaine-Aupart M.-P., Ricolleau C., Enhanced fluorescence cell imaging with metal-coated slides, *Biophys. J.*, **2007**, *92*, p. 2150.

[9] Vasilev K., Stefani F.D., Jacobsen V., Knoll W., Kreiter M., Reduced photobleaching of chromophores close to a metal surface, *J. Chem. Phys.*, **2004**, *120*, p. 6701.

[10] Drexhage K.H., Interaction of light with monomolecular dye layers, *Prog. Opt.*, **1974**, *12*, p. 163.

[11] Amos R.M., Barnes W.L., Modification of the spontaneous emission rate of Eu^{3+} ions close to a thin metal mirror, *Phys. Rev. B*, **1997**, *55*, p. 7249.

[12] Knoester J., Van Himbergen J.E., On the theory of concentration self-quenching by statistical traps, *J. Chem. Phys.*, **1987**, *86*, p. 3571.

[13] Philpott M.R., Effect of surface plasmons on transitions in molecules, *J. Chem. Phys.*, **1975**, *62*, p. 1812.

[14] Chance R.R., Prock A., Sylbey R., Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces, *Advances in Chemical Physics*, I. Prigogine, S.A. Rice (eds), Wiley Interscience, New York, **1978**, *37*, p. 1-65.

[15] Barnes W.L., Fluorescence near interfaces: the role of photonic mode density, *J. Mod. Opt.*, **1998**, *45*, p. 661.

[16] Andrew P., Barnes W.L., Molecular fluorescence above metallic gratings, *Phys. Rev. B*, **2001**, *64*, p. 125405.

[17] Fort E., Lévêque-Fort S., Le Moal E., Fontaine-Aupart M.-P., Ricolleau C., Fluorescence detection device, Brevet WO 2006/092735 A1, **2006**.

[18] Le Moal E., Lévêque-Fort S., Pottier M.-C., Fort E., Nanoroughened plasmonic films for enhanced biosensing detection, *Nanotechnology*, **2009**, *20*, p. 225502.

[19] Le Moal E., Fort E., Lévêque-Fort S., Janin A., Murata H., Cordelières F.P., Fontaine-Aupart M.-P., Ricolleau C., Mirror slides for high-sensitivity cell and tissue fluorescence imaging, *J. Biomed. Opt.*, **2007**, *12*, p. 024030.

[20] Raether H., *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*, Springer tracts in modern physics, Springer-Verlag, **1988**, *111*.

[21] Brown P.O., Botstein D., Exploring the new world of the genome with DNA microarrays, *Nat. Genet. Suppl.*, **1999**, *21*, p. 33.

[22] Pirrung M.C., How to make a DNA chip, *Angew. Chem. Int.*, **2002**, *41*, p. 1276.



E. Le Moal



E. Fort



S. Lévêque-Fort

Eric Le Moal, ***prix de thèse 2007 de la division de Chimie Physique*** (*auteur correspondant*)
est post-doctorant dans l'équipe « Films organiques » de l'Institut de Chimie Physique et Théorique de l'Université de Bonn[1], boursier de la Fondation Alexander-von-Humboldt et docteur de l'UPMC (Paris 6).
Les travaux présentés dans cet article ont été menés dans le cadre d'une thèse de doctorat au Laboratoire de Physique du solide (ESPCI, Paris), dans l'équipe « Matériaux nanostructurés et nanoplasmonique » (Paris 7) et en collaboration avec le Laboratoire de Photophysique Moléculaire de l'Université d'Orsay (Paris-Sud).

Emmanuel Fort
est maître de conférences de l'Université Paris Diderot (Paris 7) et mène ses travaux de recherche au Centre d'Images Plasmoniques Appliquées de l'Institut Langevin[2].

Sandrine Lévêque-Fort
est chargée de recherche CNRS au Laboratoire de Photophysique Moléculaire de l'Université Paris-Sud, dans l'équipe « Biophotonique »[3].

1 Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Bonn, Wegelerstr. 12, D-53115 Bonn (Allemagne).
Courriel : Eric.LeMoal@pc.uni-bonn.de
2 Institut Langevin, ESPCI ParisTech, CNRS UMR 7587, Université Paris Diderot, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05.
3 Laboratoire de Photophysique moléculaire, UPR 3361 CNRS, Université Paris-Sud, Bât. 210, 91405 Orsay Cedex.

