

Nanopuits métalliques pour exalter les contrastes en microscopie optique

Percer des trous de quelques nanomètres dans un film métallique est une manière conceptuellement simple de réaliser des nouveaux composants photoniques. Malgré son apparente simplicité, un trou percé dans un écran opaque n'a toujours pas fini de livrer ses secrets et d'inspirer de nouvelles perspectives d'applications. Ces structures permettent en particulier d'augmenter l'émission de molécules individuelles fluorescentes et peuvent également être exploitées dans le cadre de la nanobiophotonique.

**J. Wenger, P.-F. Lenne,
E. Popov, J. Capoulade, H. Rigneault**

Institut Fresnel, Université Paul-Cézanne
Aix-Marseille III, CNRS UMR 6133, 13397
Marseille Cedex 20

J. Dintinger, T. W. Ebbesen

ISIS, Université Louis Pasteur, CNRS UMR
7006, 8 allée G. Monge,
67000 Strasbourg

N. Bonod

CEA, Centre d'études scientifiques
et techniques d'Aquitaine,
BP2, 33114 Le Barp
jerome.wenger@fresnel.fr
lenne@fresnel.fr
herve.rigneault@fresnel.fr

Mise en contexte

Sed etiam quodam Quarto modo, Diffracte. C'est par ce néologisme qu'en 1665 l'Italien Francesco Grimaldi donne la première description scientifique de la diffraction lumineuse. Il identifie un quatrième "mode" de propagation de la lumière, après le trajet (géométrique) direct, la réfraction et la réflexion. Depuis, la transmission lumineuse au travers de trous dans un écran opaque n'a cessé d'interpeller les scientifiques. Bien que le sujet soit en apparence simple, les observations expérimentales réservent encore aujourd'hui des surprises. Suivant la théorie communément admise de l'électromagnétisme, la transmission par unité de surface d'un trou nanométrique percé dans un métal infiniment conducteur varie comme $(d/\lambda)^4$, où d est le diamètre du trou et λ la longueur d'onde lumineuse. Cette loi prédit donc une transmission extrêmement faible pour $\lambda > d$. Cependant, le cas d'un trou dans un métal réel d'épaisseur et de conductivité finies est un sujet très différent. Les résultats de l'équipe de Thomas Ebbesen sur le phénomène de transmission exaltée en témoignent, comme l'indiquent les pics de transmission obtenus alors que la longueur d'onde est nettement plus grande que le diamètre des trous. Initialement observés pour des réseaux périodiques de nanopuits, ces phénomènes sont aussi présents pour des trous individuels isolés. Ils mettent en jeu des couplages avec des résonances électromagnétiques appelées plasmons de surface.

Les études actuelles sur les trous nanométriques dans un métal portent essentiellement sur leurs propriétés de transmission optique en champ lointain. Nous proposons une autre approche : étudier ces structures avec des molécules luminescentes pour sonder localement le champ lumineux. Nous obtenons un

premier résultat surprenant : des molécules fluorescentes placées dans un trou nanométrique émettent plus de lumière que dans une goutte de solution, avec une exaltation significative supérieure à 6. Cette propriété ouvre des perspectives d'applications intéressantes en biophotonique, dont nous donnons quelques aspects après avoir décrit nos récents résultats.

Procédure et résultats expérimentaux

■ Conditions expérimentales

Les nanostructures étudiées sont des trous circulaires isolés percés dans un film d'aluminium sur un substrat de verre. Les nanopuits ont des diamètres compris entre 100 et 400 nm, l'épaisseur du film métallique est de 250 nm et celle du substrat de verre de 150 μm (figure 1).

Pour sonder le champ électromagnétique dans le nanotrou, nous déposons une goutte de molécules fluorescentes et suivons le signal de fluorescence collecté par un montage de microscopie présenté sur la figure 2. Notre choix de reporters fluorescents s'est porté sur des molécules de Rhodamine 6G dans une solution aqueuse, en raison de leur stabilité et de leur rendement quantique élevé. Le signal de fluorescence est ensuite exploité

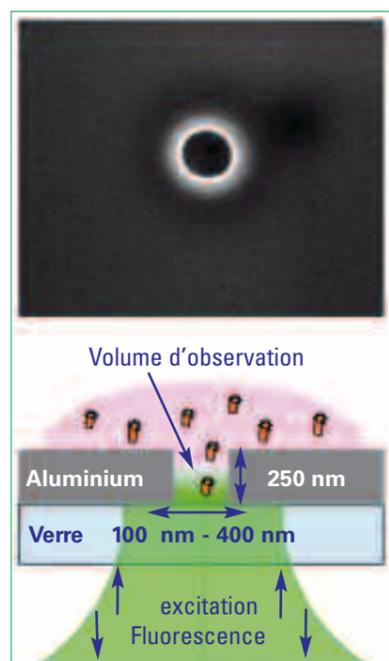


Figure 1. Image au microscope électronique d'un nanotrou de diamètre 200 nm et schéma des nanostructures étudiées. Les molécules fluorescentes sont en solution et diffusent au-dessus et dans le nanopuits.

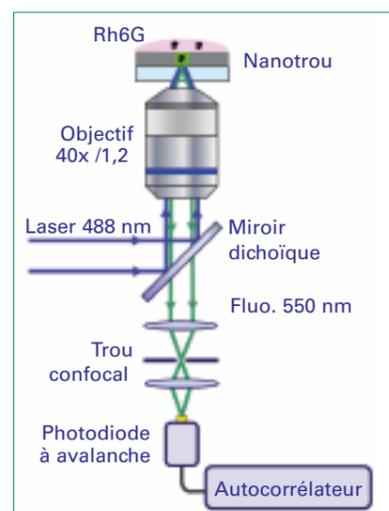
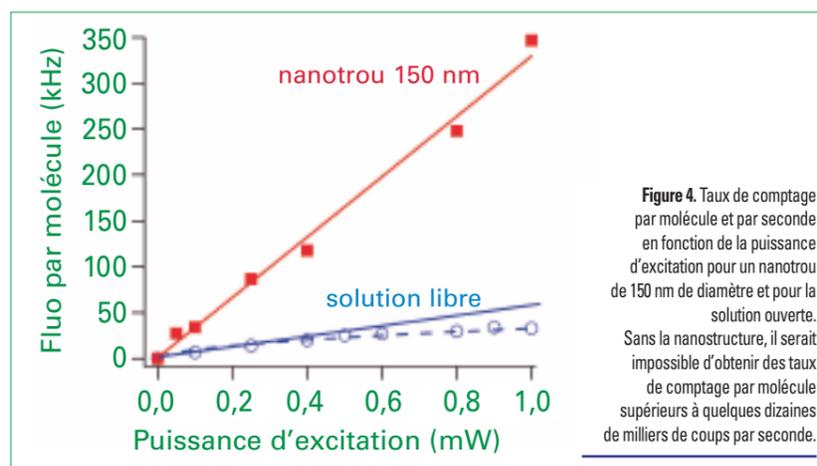
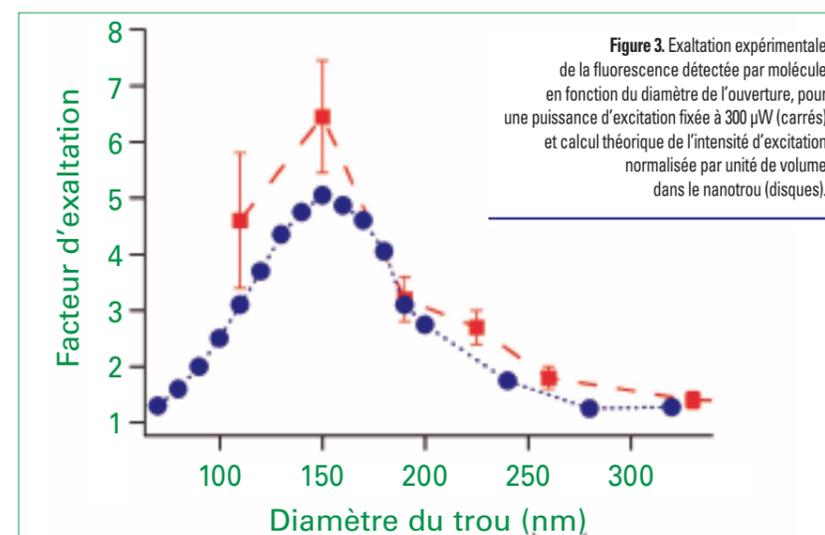


Figure 2. Principe du montage expérimental de microscopie confocale pour sonder un nanotrou isolé.

grâce à la technique de spectroscopie par corrélation de fluorescence (voir encadré). Cette méthode permet de déterminer précisément le nombre moyen de molécules observées. Connaissant la concentration en fluorophores dans la solution aqueuse, nous pouvons en déduire le volume observé dans nos expériences. Ce volume correspond sensiblement au volume géométrique du puits. Pour les plus petits diamètres, le volume observé est plus faible que le volume géométrique du trou, car le champ excitateur est alors évanescent et ne permet pas de sonder toute la structure.

■ Premières observations

La connaissance du nombre moyen d'émetteurs nous permet de quantifier directement le nombre de photons détectés par molécule et par seconde. Ce nombre est comparé au taux de comptage de photons obtenu pour une molécule identique placée en solution libre, avec la même intensité d'excitation, convenablement choisie pour éviter tout phénomène de photoblanchiment ou de saturation de l'émetteur. De manière surprenante, le taux de fluorescence par molécule est augmenté par la présence de la nanostructure, avec des exaltations significatives allant jusqu'à 6,5, comme le montre la figure 3. En parallèle, nous avons également observé une réduction importante du temps de vie de la molécule (supérieure à 20), ainsi qu'un retard dans l'instauration de la saturation de la fluorescence, ce qui traduit une altération de l'environnement électromagnétique de l'émetteur par la nanostructure.



■ Apport de la nanostructure

D'un point de vue pratique, pour obtenir un plus fort signal de fluorescence par molécule en solution, il suffirait d'augmenter la puissance d'excitation, sans avoir recours à une nanostructure. Mais comme le montre la figure 4, cette approche possède des limites : pour des puissances d'excitation supérieures à 400 μ W, le taux d'émission par molécule en solution sature, avec un maximum d'émission par molécule en solution libre d'environ 40 000 photons détectés par seconde. En comparaison, avec un nanotrou, la saturation retardée permet d'obtenir des taux de comptage de plusieurs centaines de milliers de coups par seconde, un régime inaccessible en l'absence de nanostructure, ce qui constitue l'un de ses atouts.

Microscopie par corrélation de fluorescence

■ La corrélation de fluorescence (FCS, *Fluorescence correlation spectroscopy*) permet d'étudier la diffusion dynamique d'émetteurs fluorescents individuels. Cette technique repose sur l'analyse temporelle des fluctuations de l'intensité de fluorescence, qui sont directement reliées au passage des fluorophores au travers du volume d'observation. D'un point de vue pratique, cela revient à calculer la fonction d'autocorrélation de l'intensité détectée. Aux temps courts, cette fonction donne accès aux paramètres photophysiques des émetteurs ainsi qu'au nombre moyen de molécules détectées.

Aux temps longs, elle renseigne sur le temps de séjour moyen des molécules (temps de diffusion) et sur leur mode de diffusion au travers du volume d'observation. Pour que cette technique puisse s'appliquer avec un bon rapport signal à bruit, le nombre d'éléments diffusant ne doit pas être trop élevé, d'où la nécessité d'observer un faible volume. Cette condition est bien sûr immédiatement remplie dans le cas des trous nanométriques. Pour l'usage de molécules en solution libre, nous limitons le volume d'observation grâce à un filtrage spatial de la lumière de fluorescence (montage de microscopie confocale présenté sur la figure 2).

■ Interprétation

Pour comprendre l'origine de l'exaltation de la fluorescence, nous avons modélisé la propagation du champ excitateur dans la nanostructure, en utilisant une résolution numérique rigoureuse des équations de Maxwell. Il apparaît que l'intensité locale d'excitation dans le nanotrou est exaltée par rapport à l'intensité incidente d'un facteur 5 (pour une intégration sur l'ensemble du volume d'observation). L'exaltation de la fluorescence s'explique donc essentiellement par une augmentation locale de l'intensité d'excitation, qui apparaît lors de la transition entre un mode propagatif et un mode évanescent du champ excitateur dans la structure.

Applications à la nanobiophotonique

Lorsqu'une limite se présente, il est toujours excitant de chercher à la contourner. C'est le cas en microscopie optique, où différentes techniques ont été développées pour observer un volume plus petit que celui fixé par les lois de la diffraction (microscopie à déplétion stimulée STED, sonde de champ proche NSOM...). L'utilisation des trous nanométriques dans des films métalliques apparaît comme une méthode alternative, qui présente l'avantage d'être simple et robuste, et qui correspond à la première proposition historique de microscopie optique en champ proche, formulée en 1928 par E.H. Syngé. Grâce au phénomène d'exaltation que nous avons décrit précédemment, les nanotrous

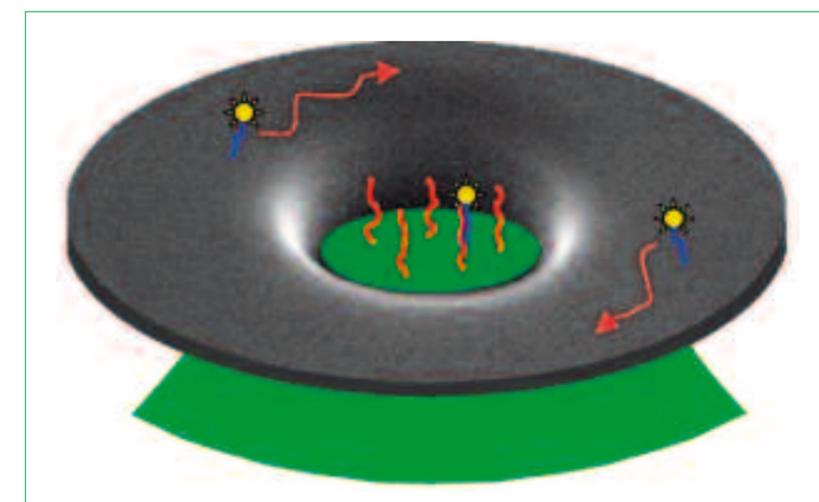


Figure 5. Exemple d'utilisation d'un nanopuits pour suivre l'association de deux espèces moléculaires : une sonde fixée au fond du puits et une cible diffusant librement.

peuvent être utilisés pour détecter le faible flux lumineux émis par des molécules individuelles. Nous détaillons ici quelques applications dans le domaine de la nanobiophotonique.

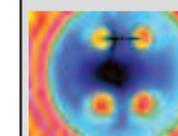
■ Analyse de molécules individuelles dans une solution de forte concentration

Grâce au trou nanométrique, le volume d'analyse en microscopie optique est rendu plus petit que la limite de diffraction. Cela donne la vision intuitive d'une nano-chambre de réactions chimiques, où il est possible d'étudier des associations de molécules individuelles dans des solutions de forte concentration (typiquement la dizaine de micromolaire). Un premier avantage est d'accéder à des informations à l'échelle de la molécule individuelle qui ne sont pas accessibles par des mesures d'ensemble comme la dynamique temporelle et la répartition statistique des réactions. Un second avantage est de pouvoir travailler avec des concentrations suffisamment élevées pour observer certaines réactions biochimiques, les enzymatiques en particulier. De plus, l'usage du nanopuits diminue le temps nécessaire à une molécule pour traverser le volume d'observation, ce qui permet de suivre plus rapidement des cinétiques chimiques et améliore la résolution temporelle du système.

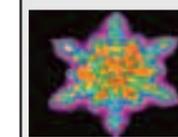
Tous ces avantages s'appliquent aussi à l'étude des interactions de deux marqueurs fluorescents s'excitant à des longueurs d'onde différentes. Un apport supplémentaire

Silver

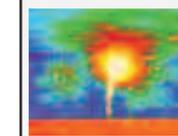
Le choix gagnant pour vos applications thermiques.



ÉLECTRONIQUE



ANALYSE DE MATERIAUX



SIGNATURE INFRAROUGE



ÉTUDE & CONCEPTION
FRÉQUENCE D'ACQUISITION D'IMAGES TRÈS ÉLEVÉE



A World Class Supplier of IR Imaging Systems

www.cedip-infrared.com

Photonics for Innovation



Tirez le meilleur de votre système de vision

Série MeVis-C

Objectifs pour la mesure, monture C

- Excellente résolution, sans distorsion ni aberration
- Pour le visible et le proche infrarouge
- Capteurs CCD N&B et couleur
- Focales : 12, 16, 25, 35 & 50 mm
- **NOUVEAU** : Existe en version motorisée



Série MeVis-C

Série TL

Objectifs télécentriques, monture C

- Insensible aux variations de distance de l'objet
- Haute résolution, très faible distorsion
- Construction robuste
- Applications : contrôle qualité, métrologie



Série TL

Sur-Mesure

Pour vos séries spéciales

Etude, prototypage et fabrication en série sont assurés par un seul et même partenaire : **LINOS Photonics.**

www.linos.fr

LINOS Photonics France

90, avenue de Lanessan
69410 Champagne au Mont d'Or
Tel. +33 (0)4 72 52 04 20
Fax. +33 (0)4 72 53 92 96
e-mail : info-fr@linos.com

LINOS

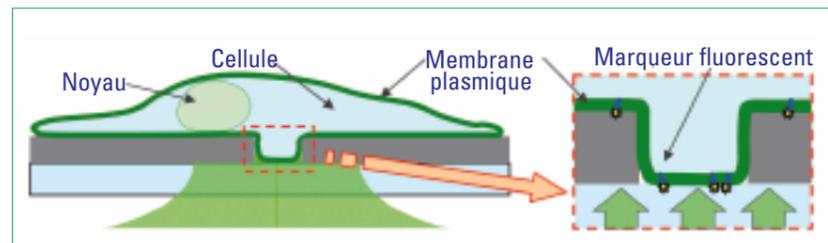


Figure 6. Montage d'un nanopuits comme masque physique pour observer la diffusion d'émetteurs fluorescents dans la membrane de cellules vivantes.

des nanotrous dans ce cadre est de fixer physiquement le volume d'excitation correspondant à chaque marqueur, ce qui simplifie le problème critique du recouvrement des faisceaux d'excitation.

Plusieurs modes d'étude seront possibles en analysant les fluctuations du signal de fluorescence : oligomérisation de molécules à haute concentration ; association de deux espèces moléculaires, l'une étant fixée dans le puits et l'autre pouvant diffuser et s'associer avec la première ; association de deux espèces diffusantes (figure 5).

■ Développement de biopuces à ADN à haute efficacité optique

En exploitant l'exaltation du signal optique, les nanotrous peuvent servir de nanosources optiques ou de nanopuits pour des détections rapides et hautement parallèles d'associations moléculaires, en particulier dans des applications de type puces à ADN. L'exaltation optique peut encore être augmentée en exploitant des nanotrous structurés, où un réseau périodique circulaire a été gravé autour des trous. Ce réseau permet d'exciter efficacement des plasmons de surface qui exaltent la transmission du champ optique incident et améliorent la directivité du faisceau de fluorescence. Outre l'augmentation du signal optique lié à l'exaltation, les nanopuits permettent également une diminution du bruit en isolant les sites actifs contenant les sondes.

La possibilité de détecter des événements d'hybridation individuels n'apporte pas seulement une amélioration de la sensibilité ; elle permet également de rapporter des informations statistiques sur la variété des hybridations et sur leur dynamique temporelle. Toutes ces informations supplémentaires pourront être utilisées pour le diagnostic.

■ Étude de l'architecture fine de membranes cellulaires

En agissant comme un trou de filtrage placé directement dans le plan objet, le nanopuits autorise une observation confocale d'une zone plus petite que la limite de diffraction optique. Cette ultra-résolution peut être mise à profit pour étudier la diffusion latérale de marqueurs individuels dans des membranes biologiques de cellules vivantes.

On peut ainsi accéder à l'organisation fonctionnelle et à la dynamique temporelle des membranes cellulaires avec une résolution spatiale submicrométrique, comme le montre le schéma de la figure 6.

Comme premier exemple d'application, nous avons étudié la diffusion latérale de lipides individuels dans une membrane modèle à des échelles sub-longueur d'onde. Actuellement, nous appliquons la technique de corrélation de fluorescence dans des membranes de cellules vivantes. Notre objectif est de mettre en évidence des microdomaines lipidiques, dont la taille, plus petite que la limite de diffraction, est encore mal connue.

En quelques mots...

Les trous nanométriques percés dans des films métalliques sont des composants optiques simples et robustes, qui permettent d'exalter le signal optique tout en réduisant le volume d'observation sous la limite de diffraction. Ces propriétés optiques remarquables offrent des perspectives d'applications innovantes en nanophotonique et en biophotonique.

Informations complémentaires

Développements instrumentaux pour la nano- et la biophotonique, publications récentes : voir notre site web www.fresnel.fr/mosaic

Références :

- W.L. Barnes, A. Dereux et T. W. Ebbesen, Nature 424, 824-830 (1998).
- H. Rigneault, et al, Phys. Rev. Lett. 95, 117401-117404 (2005).
- M.J. Levene, et al., Science 299, 682-686 (2003).